



BİLDİRİ KİTAPÇIĞI

I. ULUSLARARASI VI. VETERİNER FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ KONGRESİ

04 | 07 EYLÜL 2019

EDİTÖRLER

Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ

Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ

Erciyes Üniversitesi- Sabancı Kültür Merkezi

KAYSERİ TÜRKİYE

www.vetfarmatoks2019.com





BASIM YERİ

Aktaş Ofset Matbaacılık
Kazım Karabekir Cad. Murat Çarşısı
No:41/7 İskitler / ANKARA
Tel : 0312 253 65 44 • Faks : 0312 341 56 26
www.aktasmatbaacilik.com

Kongre Düzenleme Kurulu

Onursal Başkanlar

Prof.Dr. Mustafa ÇALIŞ (Erciyes Üniversitesi Rektörü)

Prof.Dr. Ender YARSAN (Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Başkanı)

Kongre Düzenleme Kurulu Başkanı

Prof.Dr. Murat KANBUR

Kongre Sekreteryası

Doç.Dr. Levent ALTINTAŞ

Dr. Muhammet Yasin TEKELİ

Kongre Saymanı

Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ

Düzenleme Kurulu

Prof.Dr. Gökhan ERASLAN

Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN

Prof.Dr. Feride KOÇ

Doç.Dr. Begüm Yurdakök DİKMEN

Doç.Dr. Mürsel KARABACAK

Dr. Sedat SEVİN

Kongre Bilim Kurulu

Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY (Ondokuzmayıs Üniversitesi)

Prof.Dr. Tülay BAKİREL (İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi)

Dr. Shimon BAREL (Kimron Veterinary Institute, İsrail)

Prof.Dr. Wolfgang BÄUMER (Freie University, Berlin, Germany)

Prof.Dr. Yavuz Osman BİRDANE (Afyon Kocatepe Üniversitesi)

Prof.Dr. Gürdal DAĞOĞLU (Fırat Üniversitesi)

Prof.Dr. Ömer DEMET (Dicle Üniversitesi)

Prof.Dr. Abdullah DOĞAN (Kafkas Üniversitesi)

Prof.Dr. Gökhan ERASLAN (Erciyes Üniversitesi)

Prof.Dr. Ramesh GUPTA (Murray State University, Kentucky, USA)

Dr. Ishraga G. İBRAHİM (Central Veterinary Research Laboratories, Khartoum, Sudan)

Prof.Dr. Haki KARA (Cumhuriyet Üniversitesi)

Prof.Dr. İzzet KARAHAN (Balıkesir Üniversitesi)

Prof.Dr. Asım KART (Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)

Prof.Dr. Cavit KUM (Adnan Menderes Üniversitesi)

Prof.Dr. Aneliya MILANOVA (Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria)

Prof.Dr. Muhammad Ovais OMER (University of Veterinary and Animal Science, Pakistan)

Dr. Shahram SAGHAEI (Islamic Azad University, Tahrán, İRAN)

Assoc.Prof. Tomaž SNOJ (Ljubljana University, Ljubljana, Slovenia)

Dr. Mahmodul Hasan SOHEL (Erciyes Üniversitesi)

Prof.Dr. Songül SONAL (Uludağ Üniversitesi)

Prof.Dr. Bünyamin TRAŞ (Selçuk Üniversitesi)

Prof.Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniversitesi)



**I. ULUSLARARASI VI. VETERİNER
FARMAKOLOJİ & TOKSİKOLOJİ KONGRESİ**



**I. INTERNATIONAL VI. VETERINARY
PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY CONGRESS**

04.09.2019 / ÇARŞAMBA • WEDNESDAY

08.00 - 16.30	Kurslar
16.30	Kayıt
17.00 - 18.30	Açılış Programı (Sabancı Kültür Merkezi)
17.00 - 17.30	Açılış Konuşmaları
17.30 - 18.00	Müzik Dinletisi
18.00 - 18.30	Prof.Dr. Tuncay Dilci Dijital- Bağımlılık Mücadele Derneği Başkanı
19.30	Açılış Yemeği (Kocasinan Belediyesi Sosyal Tesisleri)

05.09.2019 / PERŞEMBE • THURSDAY

SALON 1 • ROOM 1		SALON 2 • ROOM 2	
09.00 - 10.15	Öturm Başkan: Begüm Yurdakök Dikmen		
09.15 - 09.45	Ramesh Gupta <i>Nutraceuticals in Veterinary Medicine: Current and Future Challenges</i>		
09.45 - 10.15	Aneliya Milanova <i>ABC Transporters in Poultry in Health and Disease</i>		
10.15 - 10.45	Ara / Kahve Molası • Break / Coffee Break		
10.45 - 12.00	Öturm Başkan: Selim Sekkin		
11.00 - 11.30	Tomaz Snoj <i>Do Hormones in Food Cause Risk for Human Health?</i>		
11.30 - 12.00	Renata Stysova Rychtarikova <i>Use of Intracellular Dynamics in Sensitive Detection of Xenobiotics in Water</i>		
12.00 - 13.30	Öğle Yemeği • Lunch		
13.30 - 14.35	Öturm Başkan: Murat Kanbur / Levent Altıntaş	Öturm Başkan: Feride Koç / Fatih Sakin	
13.35 - 13.50	Izzet Karahan <i>Antioksidantlar: Ne Kadar ve Nasıl Kullanılmalı, Etkili mi? Antioxidants: How Much and How to Use, is it Effective?</i>	Fusun Ternamoğulları <i>Sanlıurfa İlinde Bazı Ağır Metal (Cd ve Pb) Kirilliliğinin Güvercin Kanlarında Mevsimsel Değerlendirilmesi Seasonal Evaluation of Some Heavy Metals (Cd and Pb) Pollution in Pigeon Blood Samples in Sanliurfa Province</i>	
13.50 - 14.05	Muharem Satılmış <i>Sperma Dilüsyon Solüsyonlarına İlave Edilen Eritropoietinin Spermatozoal Parametreleri ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisi Effects of Erythropoietin Which is Added To Semen Dilution Solutions on Spermatozoal Parameters and Oxidative Stress</i>	İsmail Bolat <i>Ratlarda Akut Kadmium Toksikasyonunda Merkezi Sinir Sisteminde GFAP Ekspresyonlarının Araştırılması Investigation of GFAP Expression in The Central Nervous System in Acute Cadmium Toxication in Rats</i>	
14.05 - 14.20	Sinan Ince <i>Kadmium Verilen Drosophila Melanogaster'lerde Vitamin E'nin DNA Hasarı Ve Üreme Performansı Üzerine Koruyucu Rolünün Araştırılması Investigation of the Protective Role of Vitamin E on DNA Damage and Reproductive Performance in Drosophila melanogasters Exposed to Cadmium</i>	Ulaş Acaröz <i>Model Organizma Drosophila Melanogaster'lerde Bisfenol A Uygulaması Sonucu DNA ve Üreme Performansında Meydana Gelen Değişimlere Karşı Resveratrolün Etkilerinin Belirlenmesi Determination of the Effects of Resveratrol Against Bisphenol A-induced DNA and Reproductive Performance Alterations in Model Organism Drosophila Melanogasters</i>	
14.20 - 14.35	Abdulkadir Kaya <i>Alüminyumun Yüksek Isı Etkisi İle Suyu Geçirici ve Bu Suyun Koçlarda İn Vitro Sperm Parametrelerine Etkisi Transition of Aluminum to Water by High Heat Effect and the Effect of Aluminum on İn Vitro Parameters in Ram Semen</i>	İlknur Karaca Bekdik <i>Ürolitiazisli Bir Kedi ve İki Köpekte Kotervin" in Etkinliğinin Araştırılması Investigation of The Effectiveness of Kotervin" at Treatment in A Cat and Two Dogs With Urolithiasis</i>	
14.35 - 14.45	Ara / Kahve Molası • Break / Coffee Break		
14.45 - 16.05	Öturm Başkan: Songül Sonal / Nurullah Özdemir	Öturm Başkan: Handan A. Vural / Bilal Cem Liman	
14.50 - 15.05	Yavuz Kürşad Daş <i>Samsun Bölgesinde Üretilen Sığır Sütlerinde Tetrasiklin Antibiyotik Kalıntıları Tetracycline Antibiotics in Raw Cow's Milk Produced in Samsun Province, Turkey</i>	Ender Yarsan <i>Balda Kirliletiç Maddeler Pollutants in Honey</i>	
15.05 - 15.20	Irene Sartini <i>Assessment of marbofloxacin pharmacokinetics and tissue depletion profiles in Bilgorajka geese</i>	Hasan Hüseyin Oruç <i>Türkiye'de Zehirlenme Şüpheli An Ölümleri Honey Bee Deaths with Suspected Poisonings in Turkey</i>	
15.20 - 15.35	Şükran Erkaç <i>Gaziantep Bölgesinden Toplanan Çiğ Süt Ve Yöresel Peynir Örneklerinde HPLC Vastasiyla Aflatoksin Kalıntılarının Araştırılması Investigation of Aflatoxin Residues by HPLC of Raw Milk and Local Cheese Samples Collected from Gaziantep Region</i>	Kutlay Gürbulak <i>Tarantula Cubensis Ekstraktı Geçerli ve Hayvan Sağlığında Önemli The Fact of Tarantula Cubensis Extract and Its Importance in Animal Health</i>	
15.35 - 15.50	Cansu Öncü Algan <i>Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Bazı Alabalık Kas Örneklerinin Florfenikol Kalıntısı Yönünden Taranması Screening of Trout Samples Sold in Ankara Markets in Terms of Florfenicol</i>	Gül Banu Çiçek Bideci <i>Dioksin: Çevremizdeki Tehlike Dioxin: Danger Around Us</i>	
15.50 - 16.05	İlker Şimşek <i>Besin Zincirinde Mikroplastikler Microplastics in The Food Chain</i>	Yusuf Yavuz Demirezen <i>Varroa Destructor'e Karşı Sentetik Piretroid, Organik Asit ve Esansiyel Yağ Asit Etkinliğinin Araştırılması Investigation of The Effectiveness of Synthetic Pyrethroid, Organic Acid and Essential Fat Acid Against Varroa Destructor</i>	
16.05 - 16.15	Ara / Kahve Molası • Break / Coffee Break		
16.15 - 18.05	Öturm Başkan: Ahmet Ateşşahin / Sinan Ince	Öturm Başkan: Gökhan Ertaşın / Yavuz Kürşad Daş	
16.20 - 16.35	Hüsamettin Ekici <i>Deneyisel Olarak Tip II Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Yara Modelinde Kudret Nari (Mimodica charantia) Meyvesi Yağının Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri Effects of Bitter Melon (Mimodica charantia) oil on Wound Healing in an Experimental Type II Diabetic Wound Model</i>	Ali Bilgili <i>Farklı Saklama Koşullarında Muhafaza Edilen A, D, E Vitaminlerini İçeren Bazı Veteriner Müstahzarlarının Etkin Madde Düzeyleri Active Substances Levels in Some Veterinary Preparations Containing A, D, E Vitamins Stored in Different Conditions</i>	
16.35 - 16.50	Yusuf Alan <i>İnula Helenium Subsp. Pseudoheleium Ekstraktlarının Fenolik Madde İçerdiği, Antimikrobiyal ve DNA Koruyucu Aktiviteleri Phenolic Content, Antimicrobial and DNA Protective Activities of Inula helenium subsp. pseudoheleium Extracts</i>	Burak Dik <i>Potansiyel Antidiyabetik Aktivite Benzimidazole Derivative Albendazole and Lansoprazole Drugs in Different Doses in Experimental Type 2 Diabetic Rats</i>	
16.50 - 17.05	Sinem Pehlivan <i>Kısnış'n (Coriandrum sativum L.) Sitotoksik Etkinliğinin İn Vitro Araştırılması İn Vitro Cytotoxic Activity of Coriander (Coriandrum sativum L.)</i>	Ahmet Uyar <i>Streptozotocin İle Diyabet Oluşumu İndüklenen Ratlarda Meydana Gelen Testis Hasarı Üzerine Çakşır (Ferula L) Ekstraktının İyileştirici Etkisi: Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bir İnceleme Ameliorative effect of Ferula L extract against testicular damages of streptozotocin-induced diabetic rats: A histopathological and immunohistochemical investigation</i>	
17.05 - 17.20	Hidayet Tutun <i>Kayıtsız Çekirdeği Yağının Myeloma Hücreleri Üzerinde Antiproliferatif Etkisinin Araştırılması Investigation of antiproliferative effect of apricot seed oil on myeloma cells</i>	Ruhi Kabakçı <i>Di-(2-Etilheksil) Fitalat (DEHP)A Maruz Kalan Kedi Üterusunun Kasılma Aktivitesindeki Değişiklikler Alterations in the Contractile Activity of Cat Uterus Exposed to Di (2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)</i>	



**I. ULUSLARARASI VI. VETERİNER
FARMAKOLOJİ & TOKSİKOLOJİ KONGRESİ**



**I. INTERNATIONAL VI. VETERINARY
PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY CONGRESS**

05.09.2019 / PERŞEMBE • THURSDAY

SALON 1 • ROOM 1			SALON 2 • ROOM 2		
17.20 - 17.35	Erhan Ayna	Broyler Yemine (42 Gün Boyunca) AFB1 Katılarak Oluşturulan Deneyisel Afliktoksikozisde Işrgan Otu Tohumu (Urtica Dioica L Seed) Ekstraktının Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması <i>Investigation of the Protective Efficacy of Nettle Seed (Urtica Dioica L Seed) Extract in Experimental Aflatoxicosis Formed by Adding AFB1 to Broiler Feed for 42 Days</i>	Enes Güncüm	Amoksisilin Nanopartiküllerinin Toksikite Potansiyelinin Değerlendirilmesi <i>Screening The Toxicity Potential of Amoxicillin Nanoparticles</i>	
17.35 - 17.50	Ataman Bilge Sarı	Balık Yetiştiriciliğinde Bitkilerin Bağışıklık ve Büyüme Uyarıcı Olarak Kullanım Potansiyeli <i>The Potential Use of Plants As Immunostimulants and Growth Promoter in Fish Farming</i>	Ayça Cakmak	GG4 (GXXXG) Motif Açısından Fare, Sığır, İnsan ve Sığır alfa-1A Adrenajik Reseptörleri Arasındaki Farklılıkların Araştırılması <i>GG4 (GXXXG) Motif Based Differences Between Bovine, Rat, Mouse And Human alpha-1A Adrenajic Receptors</i>	
17.50 - 18.05	Mehmet Buğra Kıvrak	Arıoüstakı Koyunlarda Letrozolün Farmakokinetiği ve Gonadotropinler Üzerine Etkisi <i>Pharmacokinetic and Effect of Letrozole on Gonadotropins in Anestrous Sheep</i>	Fatma Ceren Kırız	Japon Bildiricilerinde Danofloksasin ve Marbofloksasinin Kalıntı Düzeylerinin Belirlenmesi <i>Determination of Danofloxacin and Marbofloxacin Residue Levels in Japanese Quail</i>	
19.00	GALA YEMEĞİ • GALA DINNER (Kayseri İl Emniyet Müdürlüğü Sosyal Tesisi)				

06.09.2019 / CUMA • FRIDAY

SALON 1 • ROOM 1			SALON 2 • ROOM 2		
09.00 - 10.15	Oturum Başkanı: Abdurrahman Aksoy				
09.15 - 09.45	Dalibor Stys	The Use of Changes in Fish School Hierarchy in the Sensitive Detection of Psychoactive Compounds			
09.45 - 10.15	Wolfgang Baumer	Certain Janus Kinase Inhibitors Inhibit also TRPV1 - Implications for Targeting Itch and Pain			
10.15 - 10.45	Ara / Kahve Molası • Break / Coffee Break				
10.45 - 12.00	Oturum Başkanı: Mürsel Karabacak				
11.00 - 11.30	Mario Giorgi	Novel Molecules for Pain Relief in Veterinary Medicine: An Update			
11.30 - 12.00	Shimon Barel	Pesticide Exposure and Risk Assessment to Bees and Beehive Products			
12.00 - 13.30	Öğle Yemeği • Lunch				
13.30 - 14.35	Oturum Başkanı: Kutlay Gürbülak / Hüsamettin Ekiçi		Oturum Başkanı: Haki Kara / Oğuzhan Yavuz		
13.35 - 13.50	Yavuz Osman Birdane	Acil Servise Gelen Zehirleme Vakalarının Değerlendirilmesi Evaluation of Poisoning Cases in The Emergency Department	Begüm Yurdakök Dikmen	Adli Veteriner Toksikoloji Yönlü Hayvan İstismarı Animal Abuse and Veterinary Forensic Toxicology	
13.50 - 14.05	Diñcer Erdag	Sistemin'in Toksik Etkilerinin Araştırılması A. Sistemin'in Farelerde LD50 Düzeyinin Belirlenmesi Investigation of Toxic Effects of Cysteamine A. Determinatin of LD50 Level of Cysteamine	Aytaç Ünsal Adıca	Geleneksel Veteriner Farmakoloji Eğitime Alternatif Yöntemler: Ankara Üniversitesi Örneği Alternative Methods for Traditional Veterinary Pharmacology Education: A Proposal for Ankara University	
14.05 - 14.20	Ruhi Türkmen	Glifosat-Bazlı Herbisite Akut Maruziyet Sonrası Sıçanlarda DNA Hasarı, Oksidan/Antioksidan Denge ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi Evaluation of DNA Damage, Oxidant/Antioxidant Balance and Some Biochemical Parameters in Rat Following Acute Exposure to Glyphosate-based Herbicide	Pınar Şahintürk	Antimikrobiyal Dirençle Mücadelede Yükselen Yıldız: Tek Sağlık Yaklaşımı The Rising Star in Combating Antimicrobial Resistance: One Health Approach	
14.20 - 14.35	Mahmodul Hasan Sohel	Intracellular Drug Delivery by Exosomes: Present Condition and Future Perspective	Arif Ciloğlu	Parazitlerde İlaç Dirençliliği ve Dirençlilik Analizleri Drug Resistance in Parasites and Analyses of the Resistance	
14.35 - 14.45	Ara / Kahve Molası • Break / Coffee Break				
14.45 - 16.00	Panel: Vektör Mücadelesi ve Halk Sağlığı • Moderatörler: Abdullah İnci / Ender Yarsan Panelistler: Bayram Sertkaya; Tarım ve Orman Bakanlığı, Hayvan Sağlığı ve Karantina Daire Başkanı / Sebahattin Yazıcı; Trabzon Büyükşehir Belediyesi, Sağlık ve Sosyal İşler Daire Başkanı / İsmail Kılıç; Kayseri İl Sağlık Müdürlüğü, Halk Sağlığı Hizmetleri Başkanı / Elçin Balıcı; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı				
16.00 - 16.10	Ara / Kahve Molası • Break / Coffee Break				
16.10 - 17.45	Oturum Başkanı: Ayhan Filazi / Halis Ögüz		Oturum Başkanı: Ali Bilgili / Hasan Hüseyin Öruc		
16.15 - 16.30	Muhammet Yasin Tekeli	Monensinin Çıvıvı Karaciğer Doku Kültürü Hücrelerinde Hepatotoksik Etkileri Hepatotoxic Effects of Monensin on Chick Liver Tissue Culture Cells	Levent Altıntaş	Laboratuvar Hayvanlarında İlaç Kullanımı Drug Use in Laboratory Animals	
16.30 - 16.45	Emine Kübra Bilir	Trabecular Meshwork Hücrelerine Kök Hücre Farklılaştırılması Stem Cell Differentiation into Functioning Trabecular Meshwork Cells	Cağrı Sinmez	Türkiye'de Toksikolojik Ve Güvenlik İlgili Değerlendirmelerde Kullanılan Deney Hayvanları Üzerine Bir Araştırma An Inquiry on Experimental Animals Used in Toxicological or Other Safety Evaluations in Turkey	
16.45 - 17.00	M. Yenal Akkurt	Köpek Mastositom Hücre Serisinde c-KIT Geninin siRNA Aracılı Susturulması Silencing of the c-KIT gene through siRNA in Canine Mastocytoma Cell Line	Zeyno Nuhoğlu	Türkiye'de Laboratuvar Hayvanlarında Anestezi, Analjezi ve Ötenazi Anesthesia, Analgesia and Euthanasia in Laboratory Animals in Turkey	
17.00 - 17.15	Recep Uyar	MCF7 Hücrelerinin BPA Ve DEHP Varlığında Vincristin'e Tepkisi Response of MCF7 Cells to Vincristin in Presence of BPA and DEHP	Özgür Kuzukıran	Nanopartiküller ve Sucul Ortam Üzerindeki Toksik Etkileri Nanoparticles and Their Toxic Effects on Aquatic Environment	
17.15 - 17.30	İzzet Burçin Satıroğlu	Türkiye'de Yetiştirilen Gökkuşuğu Alabalıklarından İzole Edilen Chrysobacterium Türlerinde Plazmid Aracılı Kinolon Direnç Genlerinin Belirlenmesi Determination of Plasmid-mediated Quinolone Resistance Genes in Chrysobacterium Species Isolated From Farmed Rainbow Trout in Turkey	Muhammet Haydar Uysal	Nanoteknoloji ile Birlikte Gelen Yeni Bir Çalışma Alanı: Nanotoksikoloji A New Study Area Coming Together with Nanotechnology: Nanotoxicology	
17.30 - 17.45	Enes Atmaca	Gökkuşuğu Alabalığında (Oncorhynchus mykiss) Farklı Soğukta Saklama Modellerinde Biyojen Amin Düzeyleri ve Kimyasal Kalite İndeksi The Biogenic Amine Levels and Chemical Quality Index in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) at Various Storage Modellings	Erdem Aslan	Bir Molekülün Yolculuğu The Journey of a Molecule	
17.45 - 18.00	Ara / Kahve Molası • Break / Coffee Break				
18.00 - 19.00	Ödül Töreni / Bir Sonraki Kongre Merkezinin Belirlenmesi				
19.45	Akşam Yemeği • LUNCH				

Poster sunumları kongre boyunca ilgili alanlarda asılı bulundurulacaktır. Bildirilerdeki sorumlu yazarların, çay/kahve aralarında posterlerinin başında bulunması gerekmektedir. 9

07.09.2019 / CUMARTESİ • SATURDAY

Sosyal Program

POSTER BİLDİRİLER – POSTER PRESENTATIONS

- P01 Rekombinant DNA Teknolojisi ile Aşı Üretimi
Vaccine Production with Recombinant DNA Technology
Büşra MALAS, Hüsamettin EKİCİ
- P02 Olgu Sunumu: Sincap Maymunu(Saimiri sciureus) Akut Fipronil Toksikasyonu
Case Report: Squirrel Monkey's (Saimiri sciureus) Acute Fipronil Toxication
Onur DEMİR, Özgen ÖZDEMİR, Asiye TOY KOÇAK, Zeynel ARSLAN, Sedat SEVİN
- P03 Kanatlı İşletmelerinde Ektoparazit Enfestasyonları ve Mücadele Programları
Ectoparasite Infestations and Control Programs In Poultry Companies
Yavuz ALTUN, Ender YARSAN
- P04 Asetilkolinin Glioblastoma Hücrelerinde Hücre Canlılığına Etkisi
The effects of Acetylcholine on the Cell Viability in Glioblastoma Cells
Yeliz KAYA, Görkem KISMALI, Soner CENGİZ, Tevhide SEL
- P05 L-Karnitin ve Magnezyumun Deneysel Diyabet Oluşturulan Ratların Dokularında Oksidatif Stres ile Sitokinler Üzerine Etkilerinin Araştırılması
The Effects of L-Carnitine and Magnesium on Oxidative Stress and Cytokines in Experimental Diabetic Rats
Meryem SENTÜRK, Meryem EREN, Zeynep SOYER SARICA
- P06 Tuz Yardımlı Sıvı-Sıvı Özütleme Yöntemi Kullanılarak Sütte Makrosiklik Lakton Grubu Antihelmintik İlaçların Çoklu Kalıntılarının Belirlenmesi İçin Hızlı ve Duyarlı Bir HPLC Analiz Yöntemi
A Fast and Sensitive HPLC Method for Determination of Multiple Residues of Macrocyclic Lactone Anthelmintic Drugs in Milk Using Salt Assisted Liquid-Liquid Extraction
Cengiz GÖKBULUT, Büşra ASLAN, Oğuzhan KORKUT, Elif AKSÖZ
- P07 Tuz Yardımlı Sıvı-Sıvı Özütleme Yöntemi Kullanılarak Sütte Benzimidazol Grubu Antihelmintik İlaçların Çoklu Kalıntılarının Belirlenmesi İçin Hızlı ve Duyarlı Bir HPLC Analiz Yöntemi
A Fast and Sensitive HPLC Method for Determination of Multiple Residues of Benzimidazole Anthelmintic Drugs in Milk Using Salt Assisted Liquid-Liquid Extraction
Cengiz Gökbulut, Büşra Aslan, Elif Aksöz, Oğuzhan Korkut
- P08 Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Achillea Millefolium (Civanperçemi)'un DNA Koruyucu Etkisi
DNA Protective Effect of Achillea Millefolium (Yarrow) in Diabetic Rats Treated by Streptozotocin
Kübra Güney KAYA, Selim SEKKİN
- P09 İndometazin ile Oluşturulan Gastrik Ülser Modelinde Oleuropeinin DNA Hasarı ve Oksidatif Stres Üzerindeki Etkisi
The Effect of Oleuropein on DNA Damage And Oxidative Stress in Gastric Ulcer Model with Indometazine
Adem YAVAŞ, Selim SEKKİN
- P10 İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Patojen Bakterilerin Varlığının ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması
Investigation of The Presence of Pathogenic Bacteria in Urinary Tract Infections and Their Antibiotic Susceptibilities
Selin ÇATIĞOĞLU, Selim SEKKİN
- P11 Nanoteknoloji ve Veteriner Farmakoloji Alanında Kullanılması
Nanotechnology and Using in Veterinary Pharmacology
Gül Banu ÇİÇEK BİDECI
- P12 Türkiye'de Tıbbi Bitkilerin Etnoveteriner Kullanımları
Ethnoveterinary Uses of Medicinal Plants in Turkey
Ceren ANLAS, Ataman Bilge SARI, Tülay BAKİREL, Oya USTUNER

- P13 Bazı Propolis Ekstraktlarının Antioksidan ve Antiradikal Aktivitelerinin Araştırılması
Investigation of Antioxidant and Antiradical Activities of Some Propolis Extracts
Hasan AYDIN
- P14 Didesildimetilamonyum kloridin Rat Duodenum, Jejunum ve İleum Düz Kasları Üzerine Etkilerinin Araştırılması
The Investigation Of The Effects Of Didecyldimethylammonium Chloride On The Smooth Muscle of Duodenum, Jejunum And Ileum In Rats
Yunus Emre UZGUR, Ebru YILDIRIM, Begüm YURDAKÖK DİKMEN
- P15 Gamitromisinin In Vitro Rat Uterus Düz Kası Üzerine Etkisi
The Effect of Gamithromycin on Smooth Muscle of Rat Uterus In Vitro
Tolga TRAK, Ebru YILDIRIM, Begüm YURDAKÖK DİKMEN
- P16 P-glikoprotein'in Antibakteriyel Tedavideki Rolü ve Biyosensör Teknolojisi ile Tespiti
Role of P-glycoprotein on Antibacterial Therapy and Detection of p-gp with Biosensor Technology
Yağmur TURGUT, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN, Recep UYAR, Mehmet Altay ÜNAL
- P17 Tıbbi Bitkiler veya Ürünler Ne Kadar Güvenli
How Safe are Medicinal Plants or Products
Sinem PEHLIVAN, Melike Füsün DEMİR
- P18 Balda Zehirli Etki Oluşturan Bitkiler
Toxic Plants in Honey
Sümeyye Aliye ÜNAL, Ender YARSAN
- P19 Erkek Reprodüktif Toksikolojide Musk Keton ve Musk Ksilen
Musk Ketone and Musk Xylene in Male Reproductive Toxicology
Barış ÖTÜN, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN
- P20 Hayvan Yem ve Yem Hammaddelerinde Aflatoksin B1'in Belirlenmesi İçin Analiz Yöntemleri
Analytical Methods for Determination of Aflatoxin B1 in Animal Feeds and Feedstuffs
Saima MUSHTAQ, Yavuz Kürşad DAŞ, Abdurrahman AKSOY
- P21 Tıbbi Bitkilerin Esansiyel Yağ ve Solvent Ekstraktlarının Kimyasal İçeriklerinin Taranması ve Veteriner Fitoterapi Yönünden Karşılaştırılması: *Foeniculum vulgare* Mill. Örneği
Screening and Comparison of Chemical Contents of Essential Oil and Solvent Extracts of Medicinal Plants in Line With The Potential Use in Veterinary Medicine: A sample - Foeniculum vulgare Mill.
Mustafa YİPEL, Nurullah ÖZDEMİR
- P22 Veteriner Hekimlikte Zehirlenme Şüpheli Örneklerin Sistemik Toksikolojik Analizi
Systematic Toxicological Analysis of Poisoning Suspected Samples in Veterinary Medicine
Oğuzhan YAVUZ, Orhan TOKUR, Zeyno NUHOGLU, Saima MUSHTAQ, Aylin PEHLIVAN, Ozge MARANGOZ
- P23 Kenevirin Sıçanlarda Fertilité Üzerine Etkileri
The Effect of Cannabis on Fertility in Rats
Serdal KURT, M.Mesud HÜRKÜL
- P24 Çiftlik hayvanlarında oksidatif stresin fertilité üzerindeki rolü
The role of oxidative stress on fertility in farm animals
Serdal KURT, M. Mesud HÜRKÜL
- P25 Alkalın komet yöntemi kullanılarak diklofenak sodyum genotoksitesinin in vitro incelenmesi
In vitro investigation of diclofenac sodium genotoxicity using alkaline comet assay
Anıl Yılmaz, Sevtap Aydın
- P26 *Salvia officinalis* L. Esansiyel Yağının Kimyasal İçeriğinin Taranması ve Veteriner Fitoterapi Yönünden Değerlendirilmesi
Screening of the Chemical Composition of Salvia officinalis L. Essential Oil and Evaluation in Terms of Veterinary Phytotherapy
Mustafa YİPEL, Nurullah ÖZDEMİR

- P27 Kırmızı Yanaklı Su Kaplumbağalarında (*Trachemys scripta elegans*) Asiklovirin Farmakokinetiği Üzerine Benzilpenisilinin Etkisi
Effect of Benzylpenicillin on Acyclovir Pharmacokinetics in Red-Eared Slider Turtles (Trachemys scripta elegans)
Duygu DURNA CORUM, Orhan CORUM, Orkun ATIK, Hatice ESER FAKI, Feray ALTAN, Kamil UNEY
- P28 Koyunlarda Levofloksasinin Dağılım Kinetiği Üzerine Tolfenamik Asit ve Flunixin Meglumine Etkisi
Influences of Tolfenamic Acid and Flunixin Meglumine on Disposition Kinetics of Levofloxacin in Sheep
Duygu DURNA CORUM, Orhan CORUM, Ramazan YILDIZ, Hatice ESER FAKI, Merve IDER, Gul CETIN, Kamil UNEY
- P29 Farklı Balık Türlerinden Elde Edilen Mukusun Ratlarda Karrageninle İndüklenen İnflamatuvar Pençe Ödemine Etkileri
Effects of Mucus From Different Fish Species on Carrageenan Induced Inflammatory Paw Edema in Rats
Mustafa HITIT, Orhan CORUM, Mehmet OZBEK, Kamil UNEY, Ertugrul TERZI, Gokhan ARSLAN, Adem Yavuz SONMEZ
- P30 Fare, İnsan ve Kedi Beta-1 Adrenerjik Reseptörlerinde GG4 (GXXXG) Motif Farklılıkları
GG4 Motif Based Differences Between Beta-1 Adrenergic Receptors of Human, Mouse and Cat.
Süleyman AYDIN, Ayça ÇAKMAK
- P31 Plasental Transport Proteinleri ve Çevresel Kirleticiler
Placental Transport Proteins and Environmental Pollutants
Recep UYAR, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN, Yagmur TURGUT, Ayhan FİLAZİ
- P32 Kitosan Biyopolimeri ile Birlikte Kullanılan Plateletten Zengin Plazmanın (PRP), İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması
Investigation of In Vitro Efficacy of Platelet Rich Plasma (PRP) Used with Chitosan Biopolymer
Mustafa TÜRK, Melike ATAMAN
- P33 Hastalıklarda Mitokondriyal Disfonksiyonun Rolü
The Role of Mitochondrial Dysfunction in Diseases
Hatice ESER FAKI, Bunyamin TRAS
- P34 Oksitetrasiklin İçeren Veteriner Müstahzarların Etken Madde Düzeyleri Üzerine Farklı Saklama Şartlarının Etkileri
Active Matter Levels in the original and open forms of the veterinary preparations kept under different storage conditions and containing oxytetracycline
Shahram SAGHAEL, Ender YARSAN
- P35 Hayvan Yetiştiriciliği ve Gıda Üretim Yerlerinde Dezenfektan Kullanımı
Use of Disinfectants in Food Production Areas and Animal Breeding
Cansu ÖNCÜ ALGAN, Emine BAYDAN
- P36 Çad'da Antidiyabetik Olarak Kullanılan Bitkiler
Antidiabetic Plants Used in Chad
Allafouza Tidjani MAHAMAT, Levent ALTINTAŞ
- P37 Bazı Organik Klorlu Bileşikler ve Poliklorlu Bifenillerin Balık Hücre Hattı Üzerindeki Proliferatif/Antiproliferatif Etkisi
Proliferative/Antiproliferative Effect of Selected Organochlorine Compounds (OCs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on A Fish Cell Line
Orhan TOKUR, Abdurrahman AKSOY
- P38 İneklerde Kuru Dönem Tedavisinde Cephapirin Benzathine ile Cephapirin Benzathine+Proteolitik Enzimlerin Etkinliğinin Karşılaştırılması
Comparison of Effectiveness of Cephapirin Benzathine and Cephapirin Benzathine+Proteolytic Enzymes in the Treatment of Dry off in Cows
Merve SARIOĞLU

- P39 Kedilerde ve Köpeklerde Ağır Metal Maruziyetinin Belirlenmesi
The Evaluation of Heavy Metal Exposure in Cats and Dogs
Handan Hilal ARSLAN, Oğuzhan YAVUZ, Duygu TARHAN,
Özge MARANGOZ, Başar Ulaş SAYILKAN, Alev Meltem ERCAN,
Ercan KARABULUT, Mehmet Erman OR
- P40 Pharmacokinetics and Tissue Residues of Meloxicam in Geese: Computing A Theoretical Effective Dose
I. Sartini, B. Łebkowska-Wieruszewska, A. Lisowski, A. Poapolathep, M. Giorgi
- P41 Pharmacokinetics of Vilazodone in Dogs: Can Feeding Affect it?
I. Sartini, M. Gbylik-Sikorska, B. Łebkowska-Wieruszewska, A. Gajda, A. Lisowski, C. J. Kowalski,
A. Posyniak, A. Poapolathep, M. Giorgi



**ÇAĞRILI
BİLDİRİLER**

**INVITED
SPEAKERS**

**I. INTERNATIONAL
VI. VETERINARY
PHARMACOLOGY
and TOXICOLOGY
CONGRESS**

04 | 07 SEPTEMBER 2019

Erciyes University Sabancı Cultural Center

KAYSERİ - TURKEY

www.vetfarmatoks2019.com



Nutraceuticals in Veterinary Medicine: Current And Future Challenges

Ramesh C. Gupta

Toxicology Department, MSU Breathitt Veterinary Center, Hopkinsville, KY USA; Ajay Srivastava and Rajiv Lall, Vets Plus Inc, Menomonie, WI, USA

ABSTRACT: The complementary and alternative medicines, commonly referred to as Ayurvedic, Unani, Traditional Chinese, and herbal medicines, have been used for thousands of years for good health and for the prevention and treatment of diseases in humans and animals. By the turn of the 21st century, the use of nutraceuticals in veterinary medicine became as popular as it is in human medicine. Out of the US and Europe, 80% of people rely on dietary supplements. Presently, 150 million Americans consume at least one supplement every day. Currently, the nutraceutical industry is worth more than \$250 billion per year. By having antioxidative, anti-inflammatory, immunomodulatory, cytoprotective, apoptotic/anti-apoptotic, antimicrobial, anti-parasitic, anti-fungal and many other properties, nutraceuticals are used for cardiac, respiratory, hepatic, neurodegenerative, metabolic and diabetes, arthritis, cancer, and other ailments. Phytochemicals are also playing a vital role in controlling vectors and thereby mitigating the spread of diseases such as malaria, West Nile, Lyme, dengue, and others around the globe. In spite of their worldwide use, nutraceuticals lack mechanistic rationale and quality standards compared to pharmacotherapeutic drugs because of their inadequate efficacy, safety and toxicity evaluation, and regulatory guidelines. In the EU, current regulations require evidence that herbal medicinal products meet acceptable standards of quality, safety, and efficacy before a product can be issued. In the US, the only major regulation related to nutraceuticals is the 1994 passage of the Dietary Supplement Health and Education Act by the US Congress. Currently, the nutraceutical industry is facing too many challenges, including bioavailability and bioenhancers, quality control, evidence of therapeutic efficacy, food-nutraceutical-pharmaceutical interaction, and assurance of product safety. In the context of poor absorptions and bioavailability, iron transport tocopheryl polyethylene glycol succinate (ITPGS) appears to be an ideal promising molecule as bioenhancer to improve absorption and bioavailability of nutraceuticals. Future investigations may focus on hormesis, metabolomics, nutriphenomics, pharmacophore, and

bioinformatics. In conclusion, with the current world population at eight billion, rising health care costs, and drug resistance, the use of complementary and alternative medicine is inevitable. By all means, the future of nutraceuticals in human and animal health seems bright as novel nutraceuticals will divulge optimal efficacy with few or no side effects.

References

1. Gupta RC (2016) *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Academic Press/Elsevier, Amsterdam. 1022 pp.
2. Yurdakok-Dikmen B, Turgut Y, Filazi A (2018) Herbal bioenhancers in veterinary phytomedicine. *Front Vet Med* 5. 249.
3. Gupta RC, Srivastava A, Lall R (2019) *Nutraceuticals in Veterinary Medicine*. Springer Nature, Switzerland. 850 pp.
4. Srivastava A, Lall R, Talukder J, DuBourdieu D, Gupta RC (2019) Iron transport tocopheryl polyethylene glycol succinate in animal health and diseases. *Molecule*. Under review.

Certain Janus kinase inhibitors inhibit also TRPV1 - Implications for targeting itch and pain.

Wolfgang Bäumer^{1,2}, Laura Sanabria-Ojeda¹, Tomoki Fukuyama¹ and Denis Fourches³

¹Department of Molecular Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC

²Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin.

³Department of Chemistry, North Carolina State University, Raleigh, NC

Our working group could demonstrate for the two Janus kinase (JAK) inhibitors oclacitinib and tofacitinib that as an off-target effect they inhibit the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) or capsaicin receptor. We wondered, whether this is a general property of JAK inhibitors or just true for the two structurally similar JAK inhibitors. By molecular docking experiments we identified AZD1480 as a JAK inhibitor with similar inhibitory profile as oclacitinib but predicted to lack significant binding activity to the capsaicin binding site of TRPV1.

In vitro, we collected the dorsal root ganglia (DRG) of BALB/c mice and used Fura-2 ratiometric calcium imaging to evaluate response of DRG neurons to itch inducing mediators like IL-31, histamine, chloroquine and capsaicin after preincubation with AZD1480 and compared the data with those obtained for oclacitinib and tofacitinib. *In vivo* female BALB/c mice that were treated orally with 30 mg/kg AZD1480, 30 minutes prior to an intradermal injection of IL-31, histamine, and chloroquine. The mice's scratching behavior was recorded for 30 minutes after stimulus injection. Also, wiping response to capsaicin was recorded. Comparable to oclacitinib and tofacitinib, AZD1480 significantly reduced the *in vitro* response of DRG neurons to IL-31, histamine, and chloroquine. Mice treated with AZD1480 also showed significant reduction in scratching behavior after stimulus with IL-31, histamine, and chloroquine. Of note, histamine and chloroquine are pruritic mediators that are not activating the JAK-pathway. However, in contrast to oclacitinib and tofacitinib, the capsaicin induced wiping behavior was only slightly reduced. This data imply that AZD1480 has broad anti-itch properties but fewer impact on TRPV1 associated pain. In more general it opens the possibility to characterize JAK inhibitors for an off-target effect which might give them superior efficacy in pain- and itch- related diseases like atopic dermatitis or rheumatoid arthritis.

ABC transporters in poultry in health and disease

Aneliya Milanova

Department of Pharmacology, Physiology of Animals and Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, 6000 Stara Zagora, Bulgaria

ATP-binding cassette (ABC) efflux membrane transporters are now recognized to affect the absorption, distribution and elimination of a wide range of drugs. Moreover, increasing evidence suggest their role in the pathogenesis of important diseases. Efflux proteins, encoded by ABCB1, ABCC2 and ABCG2 genes, are expressed in poultry species. The tissue localization of ABCB1, ABCC2 and ABCG2 resembles that described in mammals, suggesting similar functions in drug disposition, albeit with quantitative differences between individual animal species. Their level of expression and functional activity could be modulated by drugs, probiotics and by infection diseases. Fluoroquinolones are their substrates and they provoke inhibition of their function. That could explain the specific kinetic behavior, of these drugs including the high concentrations in the gastrointestinal tract after parenteral administration and some drug-drug interactions. Experimentally induced colibacillosis provokes significant decrease of ABCB1 mRNA expression in gastro-intestinal tract. These levels are partly restored after oral treatment with fluoroquinolones. Coccidiosis can down-regulate expression of ABCB1 mRNA in the target tissue for *Eimeria spp.* and treatment with coccidiocidal drugs lead to partial restoration of the levels of this efflux transporter. Recognition of the importance of the structure and function of microbiome in the gastrointestinal tract as a key factor for the health of poultry is increasing. Oral administration of *Lactobacillus spp.*, with or without antibiotics, significantly changes ABCC2 and ABCG2 mRNAs in the duodenum and in the liver of chickens.

All these investigations in chickens suggest that more attention should be paid to the effects of drug administration, structure of microbiome, bacterial endotoxins and protozoan infections, as well as inflammation on the levels of expression and function of ABC transporters. Since these proteins serve as a barrier at different sites of organism, they have not only a protective role, but might serve also as targets to improve the penetration of drugs into target tissues.

Do hormones in food cause risk for human health?

Tomaž Snoj

Veterinary Faculty, Institute of Preclinical Sciences; 1000 Ljubljana, SLOVENIA

In many countries consumption of food of animal origin has increased in the last decades. In the same period drop of semen quality was observed and increased incidence of chryptorhism, hypospadias and some hormone-related cancers (testicular, prostate, breast cancer) were reported by several studies. It is assumed that besides lifestyle, exogenous compounds with hormonal (mostly estrogenic) activity in food and water might be associated with these disorders. Environmental pollutants with estrogenic activity (some pesticides, bisphenols, phthalates, PCBs...) and hormones in the food of animal origin might interact with consumers endocrine system and cause reproductive and health disorders. Food of animal origin contains relatively high amounts of androgens, estrogens, progestogens, and glucocorticoids. Thus, the modern western diet is a source of considerable amounts of exogenous hormones. Of all foods hen's egg yolk contains the highest amounts of estrogens. Additionally, nowadays cows are milked to 7th or 8th month of pregnancy when estrogen production by the placenta is on a high level and thus milk of such cows contains a high amount of estrogens. Therefore, milk that we consume now contains much more estrogens than milk which was consumed 100 years ago. Meat also contains several hormones and increased meat consumption presents additional exposure to exogenous hormones. Moreover, due to the steroid thermo-tolerance, thermally processed products contain the same amounts of steroid compounds as non-processed products. Since the veterinary profession is responsible for food safety assurance, the presence of hormones in food should be taken into consideration by competent authorities. Even though there is no scientific conclusion about the role of exogenous hormones in the incidence of reproductive and health disorders, intensive consumption of food of animal origin might be a piece in a mosaic of occurrence of the mentioned health issues.

The Use of Changes in Fish School Hierarchy in the Sensitive Detection of Psychoactive Compounds

Dalibor Štys

University of South Bohemia, CZECHIA

We constructed a 5iD viewer [1] -- a system of 4 mirrors in an illumination box recording simultaneously 5 views on a given experimental object, i.e. a fish aquarium in this case, by a fast-speed high-resolution digital camera. The 5iD system was calibrated in order to correct acquired time-lapse image data geometrically and colourimetrically, e.g. [2]. In this way, we obtained a realistic three-dimensional time-lapse view on the behaviour of fish school in the aquarium. The next image processing of the system and visualization of the resulted data gave us information on movement (trajectory) of each fish individual as well as on mutual interactions of the fish individuals of *Puntius tetrazona* in school hierarchy in time. The obtained results were strongly dependent on the number, sex and size/maturity of fish individuals as well as on the concentration of the psychoactive compound such as ethanol in the aquarium. From our preliminary results we can conclude that the behaviour of the fish school and individuals shows the general features of behaviour which is typical of any animal group/society including the human one.

References:

1. Štys D. et al., Int. Scholar. Sci. Res. Innovation 9(1) 2015.
2. Rychtáriková et al., Arxiv 1708.04685.

Topic: Use of Intracellular Dynamics in Sensitive Detection of Xenobiotics in Water

Reneta Stysova Rychtarikova

University of South, CZECHIA

One of the microscopic technique which is still a bit repressed is bright-field photon transmission microscopy. The main advantages of this method from the point of view of biology are that we need not allocate any labels to live cells and tissues, this technique does not require any complicated biological sample preparation as well as any complicated technical microscope arrangement (as in case of fluorescent light microscopy or electron microscopy). However, the method of bright field suffers from low contrast of the observed intracellular structures. To localize the centre of mass of dynamical light-diffracting objects such as organelles in order to be able to be tracked in time-lapse bright-field microscopy image sets of unlabeled live cells and tissues can be crucial for understanding of many biological phenomena like cell growth, mass transportation, and cell migration.

We developed algorithms for tracking cell organelles in bright-field microscopy data sets and statistical evaluation of the organelles' trajectories. We utilized some of the physical approaches, methods, devices, and algorithms developed at the Institute of Complex Systems, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic: The microscopic image data were acquired using a custom-made sub-resolved videoenhanced microscope equipped with a strong source of illumination (which highlights the borders of diffracting objects), a high-resolved high-speed colour camera (which give a primary signal of high structured objects), and a sample holder movable along the optical axis (which allows us to find in-focus objects in each optical cut), e.g., [1]. The primary camera signal in the form of the Bayer mask, raw, image was processed by the algorithm of simultaneous optical path and camera calibration and image data correction [2]. The in-focus part of the images will be selected on the basis of computation of variables derived from the Rényi information entropy – a point information gain, a point divergence gain and relevant entropies and entropy densities [3–4].

Currently, using the approaches mentioned above, we deal with the observation and evaluation of changes of the intracellular and cellular dynamics of human sarcoma cells under the presence of pesticides.

References:

1. Rychtáriková R. et al., *Ultramicroscopy* 179, 1—14, 2017.
2. Rychtáriková R. et al., Arxiv 1709.03894v2, Supplementary information.
3. Rychtáriková R. et al., *Entropy* 18(10), 372, 2016.
4. Rychtáriková R. et al., *Entropy* 20(2), 106, 2018.

Pesticide exposure and risk assessment to bees and beehive products

Shimon Barel¹, Roy Sperling², Levent Aydın³, A. Onur Girisgin³, Jakob A. Shimshoni⁴

¹ Department of Toxicology, Kimron Veterinary Institute, Ministry of Agriculture, Beit-Dagan, Israel.

² Department of Instrumental Analytic, Bilacon GmbH, Berlin, Germany.

³ Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Uludağ, Bursa, Turkey

⁴ Department of Food Quality & Safety, Institute for Postharvest and Food Sciences, Agricultural Research Organization, Volcani Center, Rishon Letzion, Israel.

Background and Aims: Pesticide residues acquired by bee foragers outside of the colony are of concern. We now know that a variety of pesticides used in honey bee colonies can have adverse, sub lethal effects on individual bees and their tissues. Honey bees may also contact insecticides applied to crops both before and during crop bloom.

Several studies claimed that pesticides tend to accumulate in hives, mainly in honey, beeswax and pollen. Forager honeybees from colonies placed in natural ecosystems and agricultural crops carry numerous environmental chemicals from air, soil, water, and vegetation, which accumulate in their hives mainly within honey, beeswax and pollen.

Honeybees are increasingly being employed to monitor environmental pollutants such as heavy metals, pesticides and radionuclides. Previous studies indicated honey bees capability to detect various compounds environmental pollutants such as heavy metals, pesticides and radionuclides at ppt/ppq levels.

Most risk assessments have focused on direct acute exposure of bees to agrochemicals from spray drift. However, the large number of pesticide residues found in pollen and honey demand a thorough evaluation of all residual compounds so as to identify those of highest risk to bees.

Aims: To evaluate toxicological and food safety risk of pesticide contamination as well as prophylactic and detoxification mechanisms of pesticides in hive.

To evaluate whether bee products are efficient bio indicator for toxic agrochemicals as pesticides and natural toxins as pyrrolizidine alkaloids (PAs) toxic secondary metabolites produced by various weeds, at agricultural-residential interfaces.

*** Not: Tam metni 465. sayfada yer almaktadır.**

Methods About 32 beehives were placed at 7 different sites at a rural area of 3 km radius for one year (June 2017-Jun 2018). Various orchards and field crops were grown during the respective year, in which different pesticides (insecticides, fungicides, acaricides and herbicides) were employed during that time period. Beehives were monitored and analyzed for 660 pesticides, fungicides and herbicides. Pesticides were determined in honey and beeswax (n=50), by GC-MS/MS and LC-MS/MS and the wax-to-honey partitioning was determined for each beehive.

Results: At least two pesticides (acaricides) contaminated the honey and beeswax samples simultaneously, in which, amitraz metabolites and coumaphos were frequently detected. The neonicotinoid insecticides and the hydrophilic herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, were found only in honey samples. Whereas the lipophilic pesticides were predominantly found in beeswax. In honey, Nineteen different pesticides were found in beeswax, including amitraz metabolites and coumaphos commonly used for apiculture treatment against varroa mites. The number of pesticides found in the beehive didn't reflect the number of pesticides used in the aforementioned field. Seven pesticides were found in honey at concentrations ten times lower than in beeswax. The total mean pesticide concentration in honey was 45.7 µg/kg (n=32). chromium displayed the highest mean concentration (65 µg/kg), followed by zinc, whereas lead and molybdenum occurred only in beeswax.

Conclusions: The study clearly demonstrates beeswax lack of potential to be used as a general bioindicator for pesticide exposure. On the other hand, honey might be a more suitable bioindicator for the field application of neonicotinoids. Since neonicotinoids are polar and water soluble compounds, they display a stronger tendency to distribute within the honey compartment rather than in wax, while the non-polar pesticides displayed a greater tendency to accumulate in bees wax, as was demonstrated by our field data.

The physico-chemical properties i.e. lipophilicity and octanol/water partition coefficient (Kow), polarity, density, fluidity and solubility of bee products such as beeswax, honey, pollen and propolis, are key parameters for their underlying detoxifying process and colony defense system. The natural protection mechanisms eventually leading to enhanced bees and bee product safety can be explained and demonstrated by the physio-chemical properties of the beeswax.



**KURS
NOTLARI**

**COURSE
NOTES**

**I. INTERNATIONAL
VI. VETERINARY
PHARMACOLOGY
and TOXICOLOGY
CONGRESS
04 | 07 SEPTEMBER 2019**

Erciyes University Sabancı Cultural Center

KAYSERİ - TURKEY

www.vetfarmatoks2019.com



Biyosidal ürünler, halk ve çevre sağlığı alanında kullanılan pestisitler ve güvenli kullanımları

Oğuzhan YAVUZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 55139, Samsun

Özet: Kimyasal veya biyolojik açıdan herhangi bir zararlı organizma üzerinde kontrol edici etki gösteren aktif madde ve formülasyonlara biyosidal ürün adı verilmekte ve halk (çevre) sağlığı alanında kullanılan pestisitler biyosidal ürün kapsamında değerlendirilmektedir. Bütün dünyada vektör mücadelesinde en fazla kullanılan yöntem olan pestisitlerin yararları yanında birçok istenmeyen etkileri mevcuttur. Bu nedenle, pestisitlerin halk sağlığı alanında güvenli kullanım pratiklerinin bilinmesi insan, hayvan ve çevre sağlığının korunması açısından son derece önemlidir. Bu bildiride biyosidal ürün kavramı ve biyosidal ürün grupları, halk sağlığı alanında kullanılan pestisitler, pestisitlerden kaynaklanabilecek zararlar ve güvenli pestisit kullanımı hakkında bilgi verilmiştir.

Abstract: Biocidal products are defined as active substances and preparations intended to control of any harmful organism by chemical or biological means and public (environmental) health pesticides are evaluated in frame of biocidal products. In addition to the benefits of pesticides, which are the most widely used methods in vector control worldwide, there are many undesirable effects. Therefore, knowing the safe use practices of public health pesticides is very important for the protection of human, animal and environmental health. In this paper, information regarding the concept of biocidal product and biocidal product groups, pesticides used in public health area, adverse effects of pesticides and safe pesticide use are given.

Giriş

İnsanlar ve evcil hayvanlar yüzyıllardan beri zararlı canlılarla bir arada yaşamakta ve bu zararlılar ısırma, kan emme gibi basit rahatsızlıklardan; sıtma, tifüs, Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi gibi son derece tehlikeli hastalıkları bulaştırmaya kadar birçok istenmeyen etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle halk sağlığının korunması, insan ve hayvanlardaki vektörel hastalıkların engellenmesi ve yaşam standartlarının artırılması için zararlılarla mücadele şarttır. Vektör zararlıların etkin ve güvenli kontrolü için birçok bileşenin bir arada değerlendirildiği ve esas olarak kimyasal maddelerin en az düzeyde kullanılmasını gerektiren entegre mücadele uygulamaları son derece önemli olmakla birlikte; kolayca bulunabilmeleri,

uygulamalarının pratik olması, kısa zamanda etkin sonuçlar elde edilebilmesi gibi nedenlerle pestisitlerin çeşitli şekillerde uygulanması ile gerçekleştirilen kimyasal mücadele günümüzde en sık kullanılan yöntem durumundadır (Yavuz, 2001; Bonnefoy ve ark., 2008).

Pestisitler birçok alanda uygulanmalarına rağmen, temel olarak zirai mücadele ve halk (çevre) sağlığı alanında kullanımları ön plana çıkmaktadır. Halk sağlığı alanı, ev, ofis, park-bahçe, barınak gibi insan ve evcil hayvanların yerleşim, çalışma ve gündelik yaşamıyla ilgili fiziki çevrede zararlılara karşı yapılan mücadeleyi kapsamaktadır (Yavuz, 2001; Şencan, 2017). Halk sağlığı alanında vektör mücadelesinde kullanılan pestisitler yaygın olarak kullanılmaya başlandıkları 1940'lardan günümüze kadar geleneksel olarak zirai mücadele pestisitlerinden ayrı olarak değerlendirilmiş ve özel olarak uygulama ve güvenlik kuralları geliştirilmiştir. Avrupa Birliği yaklaşık 20 yıl önce halk sağlığı pestisitleri ile düzenlemeleri "Biyosidal ürünler" kapsamına almıştır, ülkemizde de mevzuat uyumunun gerçekleştirilmesi ile halk sağlığı alanında kullanılan pestisitler, biyosidal ürün olarak değerlendirilmektedir (European Commission, 1998, Sağlık Bakanlığı, 2009).

Halk sağlığı alanında vektör mücadelesinde vazgeçilmez bir konumda olan pestisitler, sınırsız ve sorumsuz şekilde kullanılmaları sonucu ne yazık ki günümüzün en tehlikeli çevre kirleticilerinden biri durumuna gelmiştir. Bu nedenle zararlı mücadelesi yaparken, aynı zamanda insan, hayvan ve çevre sağlığının korunması için pestisitlerin güvenli kullanım kuralları ve prensiplerinin bilinmesi ve titizlikle uygulanması son derece önem taşımaktadır (Kaya, 2002; Çetin, 2016).

Bu bildiride biyosidal ürün kavramı ve biyosidal ürün grupları, halk sağlığı alanında kullanılan pestisitler, kullanım alanları, sınıflandırılmaları, uygulamada önemli pestisit grupları, pestisitlerden kaynaklanabilecek zararlar ve güvenli pestisit kullanımı hakkında bilgi verilecektir.

Biyosidal ürün kavramı ve biyosidal ürün grupları

Avrupa Birliği tarafından Şubat 1998'de yayımlanan 98/8 EC sayılı "Biyosidal Ürünler Direktifi" ile kullanımı yaygınlaşan biyosidal ürün; bir veya birden fazla aktif madde içeren, kullanıma hazır halde satışa sunulmuş, kimyasal veya biyolojik açıdan herhangi bir zararlı

organizma üzerinde kontrol edici etki gösteren veya hareketini kısıtlayan, uzaklaştıran, zararsız kılan, yok eden aktif maddeleri ve müstahzarlara verilen isimdir (European Commission, 1998).

Bu direktif ile halk sağlığı alanında kullanılan pestisitler de dahil olmak üzere, temel olarak zararlı mücadelesinde kullanılan ürünler 4 ana grup altında 23 başlıkta toplanmıştır. Ülkemizde de mevzuat uyum çalışmalarına Sağlık Bakanlığınca başlanmış ve Biyosidal Ürün Yönetmeliği 2009 yılının sonunda yayımlanmıştır (Sağlık Bakanlığı, 2009). Direktif Mayıs 2012’de yerini 528/2012 sayılı düzenlemeye bırakmış ve biyosidal ürünler 22 tip olarak belirlenmiştir (European Commission, 2012). Biyosidal Ürünler Yönetmeliği de 2014 yılında uyumlu hale getirilmiştir. Biyosidal ürün grupları, ürün tipleri ve temel kullanım alanları Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Biyosidal ürün grupları, ürün tipleri ve temel kullanım alanları (Kaynak: European Commission, 2012)

No	Ürün Tipi	Tanımı ve temel kullanım alanları
1. ANA GRUP: DEZENFEKTANLAR		
Ürün tipi 1	İnsan hijyeni	İnsanlarda hijyenik amaçla vücut ve kafa derisinin dezenfeksiyonu için kullanılan ürünler
Ürün tipi 2	Doğrudan insan ve hayvanlar üzerinde kullanılmayan dezenfektan ve algisidler (yosun önleyiciler)	-Doğrudan gıda ve yem ile temas etmeyen yüzey, materyal, ekipman ve mobilyaların dezenfeksiyonu için kullanılan ürünler -Yüzme havuzu, akvaryum, banyo ve diğer sular, klima sistemleri, kişisel, halka açık ve profesyonel aktiviteler için kullanılan duvar ve yüzeylerin dezenfeksiyonu için kullanılan ürünler -İnsan tüketimine sunulmayan hava ve suların dezenfeksiyonu, kimyasal tuvaletler, atık su, hastane atıkları ve toprak hijyen ürünleri -Yüzme havuzları, akvaryumlar ve diğer sular ile ilgili ekipman ve altyapı materyalinde yosun önleyiciler -Dezenfektan özelliklere sahip işlenmiş ürünler üretmek amacıyla kullanılan kumaş, peçete, maske, boya ve diğer malzemeler
Ürün tipi 3	Veteriner hijyen	-Dezenfektanlar, dezenfeksiyon sabunları, oral veya haricen uygulanan hijyen ürünleri veya antimikrobiyel fonksiyona sahip ürünler -Hayvan barınaklarında ve taşınmasında kullanılan materyal ve yüzeylerin dezenfeksiyonunda kullanılan ürünler

Ürün tipi 4	Gıda ve yem alanı	-İnsan ve hayvanların tüketimine sunulan gıda ve yemlerin (içme suyu dahil) üretimi, taşınması ve depolanmasında kullanılan ekipman, konteynır, araç ve yüzeylerin dezenfeksiyonunda kullanılan ürünler
Ürün tipi 5	İçme suyu	-İnsan ve hayvanlara sunulan içme suyu dezenfektanları

Tablo 1. (Devam)

2. ANA GRUP: KORUYUCULAR

Ürün tipi 6	Ürünlerin depolama süresince korunmasında kullanılan ürünler	-Gıdalar, yem maddeleri, kozmetikler, tıbbi ürünler ve tıbbi cihazlar dışındaki üretilmiş ürünlerin mikrobiyal bozulmasını engelleyerek raf ömrünü garantiye almak için kullanılan koruyucular -Rodentisit, insektisit ve diğer zararlı mücadele yemlerinin depolanmasında kullanılan koruyucular
Ürün tipi 7	Film koruyucular	-Boya, plastik, izolasyon malzemeleri, duvar yapıstırıcıları, kağıtlar ve sanat eserleri gibi malzemeleri mikrobiyal bozunma ya da yosun üremesine karşı korumak için kullanılan filmler veya kaplama malzemeleri
Ürün tipi 8	Ahşap koruyucular	-Üretim veya kullanım aşamasında ahşap malzemeleri tahrip eden böcekler ve diğer organizmalara karşı koruyucu ürünler -Bu ürün tipi hem koruyucu hem de oluşan sorunu giderici ürünleri kapsar
Ürün tipi 9	Elyaf, deri, kauçuk ve polimerize materyal koruyucuları	-Deri, kauçuk, kağıt ve kumaş gibi elyaf ya da polimerize materyallerin mikrobiyolojik bozulmaya karşı koruyucu ürünler -Bu ürün tipi, mikroorganizmaların malzeme yüzeyine yerleşmesini ve bu sayede koku oluşumunu engelleyen biyosidal ürünleri içerir
Ürün tipi 10	İnşaat malzemesi koruyucuları	Ahşap dışındaki duvarcılık, kompozit ve diğer inşaat malzemelerinin mikrobiyal ve alg bulaşmasına karşı koruyan ürünler
Ürün tipi 11	Soğutma ve işleme sistemlerinde kullanılan sıvı koruyucuları	-Soğutma ve işleme sistemlerinde kullanılan su veya diğer sıvıları mikroplar, algler gibi zararlı organizmalara karşı koruyucu ürünler -İçme ve havuz suyu dezenfektanları bu ürün tipine dahil değildir
Ürün tipi 12	Salyangoz önleyiciler	Sanayi işlemlerinde kullanılan malzemelerin, ekipmanların ve yapıların üzerinde salyangozları engellemek ve kontrol etmek için kullanılan ürünler
Ürün tipi 13	İşleme ve kesme sıvı koruyucuları	Metal, cam veya diğer materyalin işlenmesinde veya kesilmesinde kullanılan sıvıların mikrobik bozulmaya karşı korunmasında kullanılan ürünler

Tablo 1. (Devam)

3. ANA GRUP: HAŞERE KONTROL		
Ürün tipi 14	Rodentisitler	Fare, sıçan ya da diğer kemiricilerin kontrolünde kullanılan ürünler
Ürün tipi 15	Avisitler	Kuşların kontrolünde kullanılan ürünler
Ürün tipi 16	Mollusisitler, vermisitler ve diğer omurgasızların kontrolünde kullanılan ürünler	Yumuşakcalar, solucanlar ve diğer omurgasızların kontrolünde kullanılan ve diğer gruplara girmeyen ürünler
Ürün tipi 17	Pisisitler	Balıkların kontrolünde kullanılan ürünler
Ürün tipi 18	Insektisitler, akarisitler ve diğer artropodların kontrolünde kullanılan ürünler	Böcekler, akarlar gibi artropodların kontrolünde kullanılan ürünler
Ürün tipi 19	Kovucu ve çekiciler	Zararlı organizmaların kontrolünde kullanılan ürünler (pire gibi omurgasız, ya da kuş, balık ve kemiriciler gibi omurgalı), kovma ya da çekme özelliğinden dolayı, insan ya da hayvan hijyeninde dolaylı ya da dolaysız olarak kullanılan ürünler
Ürün tipi 20	Diğer omurgalıların kontrolü	Zararlı omurgalıların kontrolünde kullanılan ve diğer ürün tiplerine girmeyen ürünler
4. ANA GRUP: DİĞER BİYOSİDAL ÜRÜNLER		
Ürün tipi 21	Antifouling ürünler	Tekne, su kültürü ekipmanları ve suda kullanılan diğer yapılar üzerinde yapı bozucu organizmaların (mikroplar ve daha yüksek bitki ve hayvan türleri) büyümesini ve yerleşmesini kontrol etmek için kullanılan ürünler
Ürün tipi 22	Mumyalama ve hayvan postu doldurma sıvıları	İnsan ya da hayvan cesetlerinin korunmasında ve dezenfeksiyonunda kullanılan ürünler

Halk sağlığı alanında kullanılan pestisitler

Pestisit terimi kısaca **pest (haşarat)** adı verilen zararlı canlıları öldürmek için kullanılan madde anlamına gelir. Ama genel tanımı şöyledir: İnsan ve hayvan vücudu ile bitki ve cansız cisimlerin üzerinde ya da çevresinde bulunan veya yaşayan; ayrıca besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında onların besin değerlerini azaltan veya hasara uğratan zararlıları (böcek, kemirici, yabani ot, mantar, toprak kurdu vb.) öldürmek için kullanılan maddelerdir (Kaya, 2002).

Pestisitlerin bugünkü anlamda yoğun ve yaygın şekilde kullanımları İsviçreli kimyacı Paul Mualler'in, 1939 yılında diklorodifenil trikloroetan'ın (DDT) pestisit özelliğini belirlemesi ve organik klorlu insektisitlerin piyasaya sürülmesi ile başlamış ve İkinci Dünya Savaşı yıllarında sinir gazı olarak bulunan paratyon ve diğer organik fosforlu bileşiklerin kullanılmaya başlanması pestisit kullanımında önemli bir dönüm noktası olmuştur. İlk kullanıma girdiklerinde adeta mucize olarak görülen organik klorlu insektisitlerin zararlarının anlaşılması ve 1970'lerden itibaren kullanımlarının kısıtlanmaya başlanmasıyla hedef dışı canlılara ve çevreye daha az zararlı karbamatlar, sentetik piretroidler gibi bileşikler geliştirilmiştir. Özellikle sentetik piretroid grubunun halk sağlığı alanında kullanılmaları, gerek zehirliliklerinin uygunluğu, gerekse birikici yönlerinin zayıflığı bakımlarından büyük faydalar sağlamıştır. Günümüzde bütün dünyada pestisitler çok yaygın şekilde kullanılmakta olup, tüketilen pestisit miktarı her geçen yıl daha da artmaktadır (WHO, 2006; Bonnefoy, 2008).

Genel olarak pestisitlerin kullanım yerleri **tarımsal amaçlı (ziraî mücadele) kullanım** ve **halk (çevre) sağlığı alanında kullanım** olarak ikiye ayrılır. Bunun yanında doğrudan insanlar ve hayvanların üzerinde kullanılan pestisitler de önemli kullanım alanlarındandır. Pestisitlerin kullanıldığı diğer alanlar bahçecilik, balık yetiştiriciliği, ormancılık, tütsüleme ve ahşap koruma, depo, ambar vb. bölgelerin zararlılardan korunması, duvar kâğıdı yapıştırıcılığı, boyalar vb. inşaat sektörü, denizlerin ve deniz taşıtlarının zararlılardan korunması, gıdaların saklanması olarak belirtilebilir (Yavuz, 2001).

Pestisitler farklı özellikleri dikkate alınarak değişik şekillerde sınıflandırılmaktadırlar: etki ettikleri zararlıya göre (insektisitler, akarisitler, rodentisitler vb.), etki şekillerine göre (mide, temas, sistemik zehirler; fumigantlar; repellentler vb.), etkiledikleri zararlının gelişim evresine göre (larvisitler, adultisitler vb.), etki hızlarına göre (yere sericiler, kalıcı etkililer), kalıcılıklarına göre (kalıcı olmayanlar, kalıcılar vb.), kimyasal yapı ve kaynaklarına göre (organik fosforlular, sentetik piretroidler, neonikotinoidler vb.) sınıflandırılmaktadırlar (Yavuz, 2001; Kaya, 2002). Önemli bir sınıflandırma şekli olan pestisitlerin zehirliliklerine göre sınıflandırılmalarına ileriki bölümlerde değinilecektir.

Halk sağlığı alanında kullanılan önemli pestisit grupları

İlk kullanılmalarından bugüne kadar çevre sağlığı alanında kullanılan en önemli insektisitler organik klorlular, asetil kolin estera z inhibitörleri (organik fosforlular ve karbamatlar),

piretrin ve sentetik piretroidler ve neonikotinoidler olarak belirtilebilir. Bunun yanında zararlı böceklerin larva formlarına karşı kullanılan böcek gelişim düzenleyicileri (kitin sentez inhibitörleri ve juvenil hormon analogları) ve bakteriyel ürünler ile böcekleri öldürmeyi ortamdaki veya insan ve evcil hayvanların vücutlarından uzak tutan repellent maddeler de çevre sağlığı kapsamında ele alınması gereken ürünlerdir (Yavuz, 2001; WHO, 2006; Çetin, 2016).

Organik klorlu insektisitler, hidrokarbonların çeşitli oranlarda klorlanması ile elde edilen ürünlerdir. Geçmişte çevre sağlığı alanında çok geniş boyutlarda kullanılan dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), aldrin, endosülfan, lindan, dieldrin, metoksiklor, heptaklor, klordan gibi organik klorlular çevrede çok uzun süre kalmaları, ekolojik dengeyi bozmaları, besin zincirine girerek insanlarda kanser başta olmak üzere birçok istenmeyen etkilere neden olmaları nedeniyle günümüzde tamamen terkedilmiş ve neredeyse bütün dünyada yasaklanmıştır (Yavuz, 2001; Kaya, 2002).

Asetil kolin esteraz inhibitörleri, yakın zamana kadar halk sağlığı alanında vektör mücadelesinde en fazla kullanılan insektisit gruplarından biridir. Organik fosforlu ve karbamat insektisitler memelilerde sinir uçlarında asetil kolin'i parçalayarak *asetil kolin esteraz* enzimini baskılayarak, asetil kolinin birikmesini ve tüm muskarinik ve nikotinik reseptörlerin aşırı uyarılmasına neden olurlar. Organik fosforlularda enzimi bağlama dönüşümsüzken, karbamatlarda bu bağlanmanın dönüşümlü olduğu kabul edilir. Organik fosforlular insanlarda ve evcil hayvanlarda özellikle yüksek dozlarda perakut ve akut zehirliliğe neden olarak ölüme yol açabilir. Yakın geçmişe kadar, halk sağlığı alanında sentetik piretroidlerle birlikte en çok kullanılan organik fosforlu insektisitler, hedef dışı organizmalarda özellikle akut zehirliliklerinin yüksek olması nedeniyle günümüzde kullanımları sınırlanmış ve hemen tamamı yasaklanmıştır (Yavuz, 2001; Kaya, 2002; Çetin, 2016).

Sentetik piretroid insektisitler, *pyrethrum* ya da *krisentam* çiçeklerinden (*Chrysanthemum cinerariaefolium*, *C. coccineum*) ekstre edilen ve piretrin maddesinden sentezlenen bileşiklerdir. Doğal piretrinlerden sentezlenen birçok sentetik piretroidler, son yıllarda bitki koruma, veteriner hekimliği ve özellikle halk sağlığı alanında en fazla kullanılan insektisit

grubu haline gelmiştir. Sentetik piretroidlerin memeliler için oldukça güvenli olmaları ve birçok zararlıya karşı biyolojik etkinlik göstermeleri tercih edilmelerinin başlıca sebepleridir. Ancak sentetik piretroidlerin önemli bir özelliği, memelilere karşı güvenli görünümüne rağmen, biyotransformasyonlarının çok yavaş ve vücuttaki yarı ömürlerinin uzun olması nedeniyle **balıklara, bazı su canlılarına ve bal arılarına karşı aşırı zehirli olmalarıdır**. Bu yüzden balıkların ve bal arılarının bulunduğu bölgelerde çok dikkatli kullanılmalıdırlar. Ev içi kullanım sırasında uygulanan ortamda akvaryum bulunması halinde bu özellikleri unutulmamalıdır.

Neonikotinoid insektisitler, ilk defa 1970'li yıllarda kurşun bileşikler üzerinde yapılan çalışmalarda tesadüfen düşük insektisit etkili bileşikler olarak keşfedilen ve günümüzde hem zirai mücadele hem de halk sağlığı alanında yaygın kullanılan maddelerdir. Neonikotinoid insektisitlerin kimyasal yapıları nikotine benzediğinden “yeni nikotin-benzeri insektisitler” olarak isimlendirilmektedir. Hem böceklerde hem de hedef dışı canlılarda merkezi sinir sistemindeki nikotinik asetilkolin reseptörlerine bağlanarak nikotin benzeri uyarıcı etkilere neden olurlar. Böceklerde bu bağlanma sıkı ve geri dönüşümsüzdür, bu nedenle de böceklerdeki toksik etkileri kuşlar ve memelilere göre çok daha şiddetlidir. Ancak, neonikotinoid insektisitlerin çevreye, özellikle de arı kolonileri üzerine zararlı etkileri özellikle Avrupa Birliğinde (AB) tartışma konusu olmuş ve imidakloprid, klotianidin ve tiametoksam'ın zirai mücadele amacıyla kullanımları yasaklanmıştır. Neonikotinoid insektisitlerin biyosidal ürün olarak halk sağlığı alanında zararlı mücadelesinde kullanımlarına ilişkin bir kısıtlama bulunmamaktadır (Marangoz ve Yavuz, 2018).

Larva mücadelesinde kullanılan Böcek Gelişim Düzenleyicileri (BGD; Insect Growth Regulators; IGRs) ve bakteriyel ürünler de halk sağlığı alanında zararlı mücadelesinde önemli ürünlerdir. BGD'ler, haşerelerin yaşam evrelerinin belirli dönemlerinde etki ederek, gelişimini o evrede durdururlar. Genel kapsamda juvenil hormon analogları, kitin sentez inhibitörleri ve diğer böcek gelişim düzenleyiciler olarak gruplandırılırlar (Kaya, 2002). Juvenil Hormon Analogları, böceklerin metamorfozu sırasında larvadan pupaya geçişi engellerler. Bu maddeler memelilere karşı zehirli olmamaları bakımından büyük yarar sağlarlar. Kitin Sentez İnhibitörleri ise, böceklerin dış iskeletinin büyük bileşeni olan kitinin oluşumuna engel olurlar. Omurgalılar ve çoğu bitkilerde kitin bulunmadığından kitinin kontrolü ile ilgili bu

maddelerin kullanımı insan, evcil ve yabani hayvanlar ve bitkiler için emin görülmektedir. Bunun yanında bazı bakteriler sporları ve toksinleri sayesinde vektör kontrolünde kullanılmaktadırlar. Bakterileri canlı uygulamak yerine, günümüzde bu bakterilerin toksin içeren sporları fermantasyon yolu ile üretilip izole edilmekte ve çeşitli formülasyonlar halinde hazırlanarak kimyasal insektisidler gibi kullanılmakta ve bunlara *biyoinspektisid* adı verilmektedir. Bakteri spor ve toksinleri larvalar tarafından yenildiğinde protein endotoksini içermeleri nedeniyle sindirimden sonra larvaların barsak epiteline hücum ederek epiteli parçalarlar ve larvanın ölümüne neden olurlar. İnsanlar için oldukça güvenli olduklarından larva öldürücü olarak gerektiğinde içme suyu ve tarım amaçlı kullanılan sularda da kullanılabilirler (Yavuz, 2001).

Böcek ve diğer eklem bacaklıların konak arama davranışını bozmak üzere geliştirilmiş kimyasal madde veya ürün olarak tanımlanan repellent (kaçırıcı, kovucu) maddeler insan ve evcil hayvanların doğrudan derilerine, üzerlerinde bulunan giysilerine ve bazı durumlarda perde ve ağlara uygulandıklarında sivrisinek, karasinek, kene gibi zararlıların saldırısını engelleyen veya onları kovan ürünlerdir. Önceleri yoğunlukla sivrisineklere karşı kullanılan ürünler piyasada yer alırken, ülkemizde özellikle Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı vakalarının 2002 yılından itibaren görülmeye başlanmasıyla kenelere karşı kullanılan repellent ürünler de önemli ölçüde artmıştır (Dinler ve Yavuz, 2010).

Halk sağlığı alanında önemli pestisit grupları ve biyosidal ürün olarak kullanılmak üzere Avrupa Birliğinde ve ülkemizde ruhsatlı aktif madde örnekleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Halk sağlığı alanında önemli pestisit grupları ve biyosidal ürün olarak kullanılmak üzere Avrupa Birliğinde ve ülkemizde ruhsatlı aktif madde örnekleri (Sağlık Bakanlığı, 2019).

Pestisit grubu	Biyosidal ürün olarak kullanılan ruhsatlı aktif maddeler
Organik klorlular*	DDT, Hexachlorobenzene, Lindan, Endosulfan
Organik fosforlular*	Chlorpyriphos etyl, Chlorpyriphos metyl, Malathion, Temephos, Fenithrothion, Fenthion
Karbamatlar	Bendiocarb, Fenoxycarb
Sentetik piretroidler	Cypermethrin, Cyphenothrin, Cyfluthrin, d-phenothrin, alpha-Cypermethrin, Imiprothrin, Deltamethrin, epsilon-Momfluorothrin, Etofenprox, Lambda-cyhalothrin, Metofluthrin, Permethrin, Transfluthrin
Neonikotinoidler	Clothianidin, Acetamiprid, Dinotefuran, İmidacloprid, Thiamethoxam

Böcek gelişim düzenleyiciler	Hexaflumuron, Diflubenzuron, Cyromazine, Pyriproxyfen, S-Methoprene
Bakteri kökenli larvisitler	Bacillus sphaericus, Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Serotype H14, Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki
Repellentler	DEET, Z-tricosene, Decanoic acid, Ethyl butylacetylaminopropionate (IR3535), Lauric acid, Azadirachta Indica ekstraktı, Methyl nonyl ketone, Nonanoic acid, Pelargonic acid

*Biyosidal ürün olarak halk sağlığı alanında zararlı mücadelesinde kullanımları yasaklanmıştır.

Pestisitlerin Önemli Zararları

Zararlı mücadelesinde artık vazgeçilmez nitelikte görünen pestisitlerin suistimal derecesinde bilinçsizce ve kontrolsüz bir şekilde kullanımları hâlinde, çok önemli sağlık sakıncaları ortaya çıkabilmektedir. Pestisitlerden kaynaklanan başlıca sorunlar zararlıların direnç kazanmaları, akut ve kronik zehirlilik, karsinojenik, mutajenik, teratojenik etki riskleri ve çevre ve besin kirlenmesi olarak belirtilebilir (Yavuz, 2001; Bonnefoy, 2008).

Pestisitlere direnç (rezistans); kısaca zararlıların daha önce başarıyla uygulanan pestisitlerden artık etkilenmemeleridir. Dünya Sağlık Örgütü ise direnç olgusunu "normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin belirli bir dozuna karşı, aynı türün diğer bir popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi" şeklinde tanımlamaktadır. Son 50 yıldır vektör kontrolünde büyük miktarlarda kullanılan pestisitlere karşı zararlılarda direnç oluştuğu artık tartışılmaz bir gerçektir (Yavuz, 2001; Çetin, 2016).

Pestisitler, kullanılma şeklinin bir gereği olarak, belli hedef zararlıları öldürmek için, etkin bir şekil altında doğrudan çevreye, barınaklara, insan ve hayvanlara uygulandığından, zehirlenme riski her zaman vardır. İdeal bir pestisit zararlılara yönelik seçkin bir etkinlik göstermesi istenmesine rağmen, öngörülen derecede seçkinlik göstermeyen bu tür bileşikler, insan, hayvan sağlığı ve çevre yönünden sürekli sakıncalar oluşturan maddeler niteliğindedir. Pestisitlerin üretimi, paketlenmesi, dağıtımı ve uygulanması aşamalarında mesleki ilişkisi olan pek çok kişi bu tür ilâçlara maruz kalabildiği gibi, aynı ortamda bulunan insanlar, çevredeki hayvanlar, tarımsal yönden yararlı canlılar, arılar, ipek böcekleri ve balıklar zarar görebilir (Kaya, 2002).

Pestisitler canlı vücuduna ağız, deri ve solunum yolları ile girer. Bunlar arasında önemli temas yollarından biri deri yoluyla maruz kalmadır. Deriden maruziyet sonucunda irkilti, ekzama ve sistemik enfeksiyonlara kadar bozukluklar meydana gelebilir. Bu maruziyet şeklinde deri rengi, cinsiyet, sıcaklık, nem, bulaşık giysilerin uzun süre giyilmesi vb. faktörler önemlidir. Bu faktörlerle birlikte pestisit içerisinde bulunan taşıyıcı ve yardımcı maddeler de deriden emilimde önemli rol oynar ve çoğu zaman pestisit ile birlikte bulunan taşıt maddeler emilimi azaltır. Pestisitler özellikle açık alan ilâçlaması sisleme veya ULV (ultra low volume; çok küçük hacimli uygulama) şeklinde uygulandıklarında, deri yanında, vücuda solunum sistemi aracılığıyla girer; damla çapı 1-3 mikron arasında olan partiküller alveollere kadar ulaşım kolayca emilirken, ≥ 3 mikron olanlar daha az emilirler. Pestisitler içme suyu veya besinlerdeki kalıntıları, kazara, intihar veya kasıtlı olarak başkasını zehirlmek için kullanıldıklarında, ağız yoluyla vücuda girerler (Yavuz, 2001; Kaya, 2002; WHO, 2006; Bonnefoy, 2008).

Karsinojenik etki riski başta organik klorlu bileşikler olmak üzere pestisitlerin en önemli zararlarından, Doza bağlı şekilde pestisitlerden bazılarının deney hayvanlarında, özellikle karaciğer ve tiroid bezinde olmak üzere, iyi ve kötü huylu tümörlerin oluşmasına yol açtıkları; bazı epidemiyolojik çalışmalarda da mesleki ve çevresel olarak pestisitlerden etkilenen kişilerde kanser riskinde artış olduğu bildirilmektedir (Yavuz, 2001).

Bazı pestisitlerin mutajenik ve teratojenik etkileri vardır. ABD'de yapılan çalışmalarda tarım işçilerinin çocuklarında extremité eksikliği gibi bozuklukların yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde yeterli bilgi bulunmamakla birlikte *DDT* ve *türevlerinin*, malatyon, diklorvos, paratyon gibi organik fosforlar ve metil karbamatlar başta olmak üzere karbamat bileşiklerinin bir çoğunun bu tür etkileri vardır (Yavuz, 2001; Bonnefoy, 2008).

Pestisitler, hedef zararlılar ve insan dışında çevrede de olumsuz etkilere yol açabilir ve günümüzün en önemli çevre kirleticilerinden biridir. Ayrıca pestisitler, zararlıların doğal düşmanlarına, arılara, balıklara, kuşlara ve yaban hayvanlarına da zararlı olabilirler. Bu etkileri nedeniyle birçok pestisit yasaklanmıştır. Yiyeceklerdeki pestisit kalıntıları da insan ve evcil hayvanlar için önemli bir sorundur. Pestisitler ayrıca atık yönetim hataları, sızıntı,

sıçrama vb. sebeplerle yeraltı sularına da ulaşabilmekte ve çevre için tehlike oluşturmaktadır (Bonney, 2008).

Güvenli Pestisit Kullanımı

Görüldüğü gibi, kontrollü bir şekilde ve uygulama talimatlarına göre uygulanmış olsalar bile, pestisitlerin tamamıyla güvenle ve sakıncasızca kullanılmaları söz konusu değildir, yani az veya çok tehlikelidirler. Bu nedenle, pestisitlerin zehirliliklerinin ortaya konması için birçok çalışma yapılmakta ve pestisitler toksikolojik özelliklerine göre sınıflandırılarak, kullanımları uygulama şekilleri buna göre düzenlenmektedir. Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü ve Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın yapmış olduğu zehirlilik sınıflandırmaları kabul görmektedir (Yavuz, 2001).

Pestisitlerin zehirliliklerine göre sınıflandırılmalarının temeli, sıçanlar için akut oral (ağız yoluyla) LD₅₀ değerine dayanır. LD₅₀ değeri, bir maddenin deneme hayvanlarına herhangi bir yolla, bir defada verildiği zaman deneme hayvanlarının % 50'sini öldüren mg/kg cinsinden dozu ifade etmektedir. Bu değer ne kadar küçükse, maddenin zehirliliği o kadar fazladır. Oral LD₅₀ ile birlikte dermal (deri yoluyla) LD₅₀ değeri daha düşükse, dermal LD₅₀ dikkate alınmaktadır (WHO, 2006). Dünya Sağlık Örgütü'nün ve EPA'nın bu kriterlere göre yapmış olduğu zehirlilik sınıflandırmaları Tablo 3 ve 4'de görülmektedir.

Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü tarafından pestisitlerin zehirliliklerine göre sınıflandırılması (WHO, 2006).

Tehlike Sınıfı	Sıçanlar için LD ₅₀ (mg/kg)			
	Ağız Yoluyla		Deri Yoluyla	
	Katı	Sıvı	Katı	Sıvı
Ia-İleri Derecede Tehlikeli	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib-Yüksek derecede Tehlikeli	5-50	20-200	10-100	40-400
II-Orta Derecede Tehlikeli	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III-Hafif Tehlikeli	≥ 501	≥ 2001	≥ 1001	≥ 4001
Tablo 5-Normal kullanımda pratik olarak zararsız	≥ 2000	≥ 3000	—	—

Bu sınıflandırmada etkin madde esas alınmaktadır. Fakat bu etkin maddeler bazı formülasyonlar içerisinde belli yoğunluklarda bulunabilecekleri gibi çoğu zaman bir formülasyonda birden fazla etkin madde bulunabilir. Doğal olarak bu durumda

formülasyonun zehirlilik sınıfı değişecektir. Bu gibi hâllerde formülasyonun zehirlilik değeri çeşitli formüllerle hesaplanmaktadır (WHO, 2006).

Tablo 4. EPA tarafından pestisitlerin zehirliliklerine göre sınıflandırılması.

Zehirlilik Sınıfı	Sıçanlarda oral LD ₅₀ (mg/kg)	Sıçanlarda dermal LD ₅₀ (mg/kg)	Sıçanlarda solunum LC ₅₀ (mg/L)	Göze etkisi	Deriye etkisi
Sınıf I	≤ 50	≤ 200	≤ 0.2	Yakıcı, 7 gün içinde korneada bulanıklık dönüşümsüz	Yakıcı
Sınıf II	50-500	200-2000	0.2-2.0	Korneadaki bulanıklık 7gün içinde dönüşümlü; 7 gün kalıcı irkilti	72 saatte şiddetli irkilti
Sınıf III	500-5000	2000-20 000	2.0-20	Korneada bulanıklık yok; 7 gün içinde dönüşümsüz irkilti	72 saatte orta derecede irkilti
Sınıf IV	≥ 5000	≥ 20 000	≥ 20	İrkilti yok	72 saatte orta-hafif derecede irkilti

Zehirliliklerine göre bu şekilde sınıflandırılan ve çok önemli sakıncaları olan pestisitlerin, zararlarını olabildiğince azaltabilmek için, pestisit uygulamalarında aşağıdaki kurallara mutlaka uyulması gerekmektedir (Yavuz, 2001; Kaya, 2002; WHO, 2006; Bonnefoy, 2008, Çetin, 2016).

1. Vektör mücadele programlarında kimyasal mücadele yerine imkan bulunduğu diğer mücadele yöntemlerinin kullanılmasına çalışılmalıdır.
2. Uygun pestisit seçimi; Pestisit kullanmak gerekiyorsa en uygun olanı seçilmeye çalışılmalıdır. ***Yani hedef zararlılara karşı en etkili, çevre ve canlılar için en az zararlı ve maliyeti en ucuz pestisit seçilmelidir.*** Bir bölgede mücadeleye başlamadan önce, o bölgedeki popülasyonların daha önce hangi pestisitlerle karşılaştıkları, bölgedeki tarımsal pestisit kullanım durumu incelenerek direnç oluşumunun engellenmesi de önemli bir konudur. ***Ayrıca halk ve çevre sağlığı alanında kullanılacak pestisitlerin mutlaka Sağlık Bakanlığı tarafından izinlendirilmiş olması gerekmektedir.***

3. Pestisit uygulanan mesken ve barınaklar ile iş ve çalışma yerlerinin kapı ve pencereleri belli bir süre iyice kapatılmalı ve bu süre sonunda da çok iyi bir şekilde havalandırılmalıdır. Uygulama sırasında ve sonrasında havalandırma esnasında uygulama alanında insanlar ve evcil hayvanlar bulunmamalıdır.
4. Uygulama öncesi koruyucu önlemler alınmalı, uygulayıcılar eğitilmeli, uygulamalar asla çocuklara yaptırılmamalı, diğer işçiler ilâçlama sahasından uzaklaştırılmalıdır.
5. Ambalajı bozuk ilâçlar satın alınmamalı, kullanılan ilacın üzerindeki etiket bilgileri eksiksiz ve okunur olmalıdır.
6. Uygulayıcılar, tulum, şapka, çizme, eldiven, maske gibi koruyucu malzemeleri mutlaka kullanmalıdır.
7. Aşırı zehirli olan ***tarım zararlılarına karşı kullanılan pestisitler asla halk sağlığı alanında kullanılmamalıdır.***
8. Gerekli donanım, pestisit ve diğer malzemeler zamanında hazırlanmalı, ekipmanların bakım ve ayarları düzenli olarak yapılmalıdır.
9. Pestisit karıştırırken veya uygularken yemek yenmemeli, içki ve sigara içilmemeli, en küçük bir bulaşmada bulaşık yerler hemen su ve sabunla yıkanmalıdır.
10. Kullanım öncesi pestisitler hakkında gerekli bilgi edinilmeli, pestisit dozu önerilen oranda ve hedef zararıya uygun zamanda uygulanmalıdır.
11. Uygulama uygun hava koşullarında, rüzgârsız, yağışsız havada ve günün serin saatlerinde yapılmalıdır.
12. Pestisit uygulanan sahaya ve tarım alanları ile meyve bahçelerine uyarıcı levhalar asılmalı, çiftlik hayvanları, arılar sahadan uzak tutulmalıdır.
13. Pestisit artıkları kuyu ve kanal ile diğer su kaynaklarına, göl ve göletlere dökülmemeli ve bulaştırılmamalıdır.
14. Uygulama bittikten sonra artan pestisitler derhal ortamdan uzaklaştırılmalı (depoya geri götürülmeli), kullanılan alet ve ekipmanlar temizlenmeli, koruyucu elbiseler değiştirilip yıkanmalı, uygulayıcılar su ve sabunla temizlenmelidir.
15. Boş kaplar açığa atılmamalı, usulüne uygun olarak yakılarak veya gömülerek imha edilmelidir.
16. Pestisitler, çocuklarla hayvanların yetişemeyecekleri ve bulamayacakları şekilde saklanmalı, besin maddeleri ile aynı yerde taşınmamalı ve depolanmamalıdır.

Sonuç

Halk sağlığı alanında vektör ve diğler zararlılarla mücadelede vazgeçilmez olan pesitisitlerin, kimyasal yapılarından ve uygulanma şekillerinden kaynaklanan zararları vardır. Bu nedenle etkili ve güvenli bir mücadele için, pestisitlerin istenmeyen etkileri hakkında başta uygulayıcılar olmak üzere toplumun her kesiminin bilgilendirilerek güvenli pestisit uygulama pratiğinin yaygınlaştırılması, halk ve çevre sağlığı açısından son derece önemlidir.

Kaynakça

1. Bonnefoy X, Kampen H, Sweeney K. Public Health Significance of Urban Pests. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2008; p. 292.
2. Çetin H. Kent Zararlıları-Biyoloji, Ekoloji ve Mücadele Yöntemleri (Vektörler ve Diğlerleri). Antalya: Yıldız Ofset Matbaacılık, 2016; p. 203.
3. Dinler O, Yavuz O. Kenelerden Korunmak Amacıyla Kullanılan Repellent Kovucu Maddeler ve Toksikolojik Değlerlendirilmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi; 67(4): 199-212.
4. European Commission. Directive 98/8/EC of The European Parliament And of The Council of 16 February 1998, Concerning the placing of biocidal products on the market. OJ L 123/1, 1998.
5. European Commission. Regulation (EU) No 528/2012 of The European Parliament And of The Council of 22 May 2012 Concerning The Making Available on The Market And Use of Biocidal Products. OJ L 167/1, 2012.
6. Kaya S, Piringci İ, Bilgili A. (Eds). Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Baskı 2. Ankara: Medisan Yayınevi, 2002.
7. Marangoz Ö, Yavuz O. Neonikotinoidler ve çevresel etkileri. IV. Ulusal Vektör Mücadelesi Sempozyumu, 1-4 Kasım, 2018; Antalya-Türkiye.
8. Sağlık Bakanlığı. Biyosidal Ürünler Yönetmeliğli. 31.12.2009 tarih ve 27449 sayılı Resmi Gazete, 2009.
9. Sağlık Bakanlığı. Biyosidal Ürünlerde Kullanımı Onaylanan Aktif Maddeler Listesi. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/cevre-sagligi/4-biyo-ab-uygulama/aktif-madde-listeleri/Liste_1_Approved_Active_Substances_List_20190513.pdf; Accessed Date: 23.08.2019.
10. Şencan İ. Belediyeler İçin Biyosidal Ürün Uygulamaları Rehberi. Ankara: Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2017; p. 114.
11. WHO. Pesticides And Their Application For The Control of Vectors And Pests of Public Health Importance, Sixth edition. Geneva: World Health Organisation, WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1, 2006; p. 125.
12. Yavuz O. Kemiriciler-Vektör ve Haşerelerden Korunma, Sağlık Meslek Liseleri Çevre Sağlığı Bölümü Ders Kitabı. Ankara: Çare Tek Bilim Eğitim Ltd. Şti., 2001; p. 186.

Halk Sağlığı Açısından Önemli Bazı Vektör Canlılar

Prof. Dr. Hüseyin ÇETİN

Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya

Özet: Bu bildiride halk sağlığı açısından önemli vektör özellikleri olan sivrisinek, hamamböceği, ev sineği (karasinek), pire ve kum sineği (tatarcık veya yakarca) gibi bazı canlıların biyolojileri, ekolojileri, davranışları ve mücadele yöntemleri hakkında bilgiler sunulmuştur.

Anahtar kelimeler; Halk sağlığı, Vektör, Zararlılar

Some Vectors of Public Health Importance

Abstract: In this paper, information about biology, ecology, behavior and control methods of some public health pests such as mosquitoes, cockroaches, house flies, fleas and sand flies are presented.

Keywords; Public Health, Vector, Pests

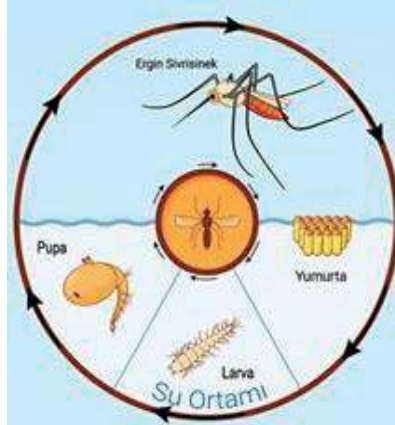
GİRİŞ

Dünya üzerinde görülen enfeksiyon hastalıkları arasında sivrisinek, kum sineği ve keneler aracılığıyla bulaştırılan vektörel hastalıklar olan Sıtma, Zika Virus, Leishmaniasis ve Kırım Kongo Kanamalı Ateşi gibi hastalıklar ön plana çıkmaktadırlar. Vektör canlılar gerek dokuları içerisinde gerekse vücut yüzeyleri, bacakları ve ağız parçaları üzerinde taşıyabilecekleri patojenler olan bakteri, virüs, mantar ve çeşitli parazitleri beslenme, dinlenme ve benzeri faaliyetleri sırasında üzerinde bulundukları sağlıklı hayvan veya insana canlıya aktarabilirler. Vektörel hastalıklarla mücadelede başarıyı getiren en temel öge vektör canlıları kontrol altında tutmak olarak görülmektedir. Vektör mücadelesinde öncelikle hedef canlıların

biyolojileri ve ekolojileri hakkında bilgi sahibi olmak, davranışlarına ve biyolojilerine uygun mücadele yöntemlerini kullanmak esastır. Dünya üzerinde her yıl sadece sivrisinekler tarafından taşınan hastalıklar sebebiyle yüz binlerce insan hayatını kaybetmektedir. Bu bildiride ülkemizde de görülen bazı vektörel hastalıkların taşıyıcısı olan sivrisinek, kum sineği (tatarcık), karasinek, pire ve hamamböceği gibi canlıların biyolojileri, ekolojileri ve davranışları yanı sıra kontrol yöntemleri üzerinde bilgiler sunulmuştur.

BAZI VEKTÖR CANILAR

- a) Sivrisinekler;** Dünya üzerinde 3500'den fazla türü bilinen sivrisineklerin (Diptera: Culicidae) ülkemizde 50'den fazla türü kayıt edilmiştir. Culex, Aedes, Anopheles ve Culiseta gibi önemli cinsleri bulunan sivrisineklerin kutuplar dışında dünyanın hemen hemen her yerinde yayılış gösterdiği bilinmektedir. Sivrisinekler dört yaşam evresine sahiptirler; yumurta, larva ve pupa evreleri suya bağımlı bu organizmaların, erginleri serbest olarak doğada dolaşmakta ve konakları üzerinden beslenmektedir (Şekil 1). Sivrisineklerin sadece dişileri kan emmektedir. Gerek erkek gerekse dişiler enerji ihtiyaçlarını karbonhidrat ağırlıklı bitki öz sularını tüketerek karşılarlar. Sivrisinek dişlerinin kan emme davranışı göstermesi dünya üzerinde yüz binlerce insanın ölmesine veya hastalanmasına sebep olan değişik hastalıkların vektörlüğünü yapmalarına neden olmaktadır.



Şekil 1. Sivrisinek yaşam döngüsü

Culex ve *Culiseta* gibi cinslerde yer alan sivrisinekler yumurtalarını su yüzeyine her birinde çok sayıda yumurta bulunan paketler halinde bırakırken, *Aedes* gibi bazı cinslerde daha sonra su altında kalabilecek su ortamına yakın bitki, toprak vb. ortama bırakmaktadırlar. Uygun su koşullarda (çoğunlukla yaz aylarında) yumurtadan ergin oluşuncaya kadar geçen süre yaklaşık 7-10 gün'dür. Su sıcaklığı azaldıkça bu süre uzamaktadır. Pek çok sivrisinek türü larvalarının gelişiminin su sıcaklığının 8-10 derecenin altına düşmesi ile durduğu bilinmektedir. Larva evresi kendi içinde dört evreden oluşmaktadır ve larvalar su içerisindeki organik atıklar, planktonlar vb. ile beslenmektedir. Pupa ergin öncesi evresi olup, su içerisinde hareket edebilir, beslenmez ve virgüle benzeyen bir şekle sahiptir.

Sivrisineklere karşı çeşitli mücadele metotları kullanılmasına rağmen en çok tercih edilen yöntem kimyasal kullanımıdır. Ergin sivrisineklere karşı gece yapılan soğuk sisteme (ULV) çalışmaları, sivrisineklerin erginlerin dinlenebileceği yüzeylere yapılan rezidüel uygulamalar ve larva mücadele çalışmaları sivrisinek kontrolünde en çok kullanılan yöntemlerdir. Biyolojik mücadele kapsamında bazı bakteri toksinleri (Örn: *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) ve *Bacillus sphaericus* (Bs) ve doğal predatör olan böcek (ters yüzücüler-*Notonecta* ve balıklar-*Gambusia* kullanılmaktadır. Balık kullanımı sadece yapay ortamlar olan süs havuzları, sera sulama havuzları ve kullanılmayan yüzme havuzları gibi alanlarda yapılmalıdır.

Entegre mücadele çalışmaları kapsamında sivrisineklere ortam oluşturabilecek durgun suların akar hale getirilmesi, konutlar etrafında içinde su birikebilecek her türlü su havuzu, rögar, kap ve ortamın kontrol/bertaraf edilmesi, boşaltılması en çevreci uygulamalardır.

Larva mücadelesinde farklı etki mekanizmalarına sahip ürünler kullanılmaktadır (Şekil 2). Bunlardan birinci grup, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) ve *Bacillus sphaericus* (Bs) bakteri preparatlarıdır. Bakteriler tarafından üretilen endotoksinlerin larvanın sindirim sistemine girmesi ve parçalanması sonucu oluşan toksik bileşikler larvaları ölüme götürmektedir. İkinci grup, kitin sentezi inhibitörleridir ve böceklerin gelişim sırasında sentezlediği kitinin sentezini inhibe ederek böceklerde morfolojik bozukluklara sebep olarak birkaç gün içerisinde ölüme yol açarlar. Üçüncü grup, juvenil hormon analogları böceklerde bulunan gençlik (juvenil) hormonu taklit eden bazı maddelerin ortama verilmesi ile böceğin gelişiminin bozulması ve genellikle pupa evresinde ölüme sebebiyeti ile sonuçlanmaktadır.

Juvenil hormon analoglarında ölümünün geç olması bazen ürünlerin etkisiz olduğu gibi yanlış anlaşılmalara sebep olabilmektedir. Dördüncü grup, spinosinler, bir toprak actinomycetes olan *Saccharopolyspora spinosa*'nın fermentasyon sonucu oluşturduğu insektisit etkili maddelerdir. Spinosad, spinosin A ve spinosin D adlı nörotoksik etkili iki makrolid lakton molekülünün karışımıdır. Beşinci grup ise yüzey gerilimi ajanları olup su yüzeyine püskürtüldüklerinde larvaların atmosferik oksijeni kullanmalarını engelleyerek ölüme sebep olmaktadır (Ser ve Çetin 2016).



Şekil 2. Sivrisinek larva mücadelesi yapan bir uygulayıcı personel ve gece saatlerinde soğuk sisleme (ULV) çalışması yapılması

Ergin mücadelesinde kullanılan ürünler ise sentetik piretroidler olarak bilinirler ve doğal piretrinlerin alkol ve asit köklerinde yapılan değişikliklerle geliştirilmiştir. Doğal piretrinler *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae) bitkisinin kurutulmuş çiçeklerinin ekstraksiyonundan elde edilmiştir (Ser ve Çetin 2016). Sentetik piretroidler sinir hücrelerinin membranlarındaki sodyum kapılarına etki ederler. Ergin mücadelesinde kullanılan bu ürünler insektisit formülasyonlarında düşürücü (Örn: Tetramethrin, esbiotrin gibi) ve sinerjist (Örn: PBO- Piperonyl butoxide gibi) maddeler ile birlikte kullanılarak aktiviteleri artırılabilir. Sivrisineklerin gizlenebileceği ortamlarda yüzeylere yapılacak rezidüel insektisitler oldukça etkilidir (Tablo 1). Ayrıca akşam saatlerinde soğuk sisleme (ULV) çalışması yapılması ülkemizde yaygın olarak görülmektedir (Şekil 2).

Tablo 1. Dünya Sağlık Örgütü tarafından tavsiye edilen bazı rezidüel ürünler (WHO/CTD/WHOPES/97.2 ve WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1)

Etken madde	Uygulama sıklığı (ay)	Uygulama dozu (gr ai/m ²)
Alpha-cypermethrin	4-6	0.02-0.03
Cyfluthrin	3-6	0.02-0.05
Cypermethrin	4-6	0.5
Deltamethrin	2-3	0.02-0.025
Permethrin	2-3	0.5
Etofenprox	3-6	0.1-0.3
Lambda-cyhalothrin	3-6	0.02-0.03
Bu tabloda verilen ürünler örnek olarak verilmiştir. Önerilen dozlar Dünya Sağlık Örgütü dozlarıdır ve bölgeden bölgeye, direnç seviyeleri gibi faktörlere göre etkinliği değişebilmektedir.		

- b) Ev sineği-Karasinek (*Musca domestica* L.);** Ev sinekleri yumurta, larva, pupa ve ergin evreleri içeren tam başkalaşım (holometabol) hayat döngüsüne sahip canlılardır. Dişi ergin bireyler bir kez döllenirler ve erkek sineklerinin spermlerini depolarlar. Organik madde bakımından zengin ve nemli gübrelik alanlar, çöp konteynırları gibi ortamlara üç-dört gün aralıklarla her yumurtlamada ortalama 100-120 adet, toplamda 500-700 arasında yumurta bırakırlar. Organik madde içerisine/üzerine bırakılan yumurtalar 24 saat içerisinde açılır, yumurtadan çıkan larva üç larva evresi geçirir. Larvalar gelişimlerini tamamladıktan sonra nem oranı düşük kuru ortamlara doğru hareket eder ve hareketsiz olan pupa evresine geçerler. Yumurtadan ergin oluşuncaya kadar geçen süre uygun koşullarda yaklaşık 10-12 gün sürmektedir. Sıcaklığa bağlı olmakla birlikte bir ergin ev sineği ömür uzunluğu yaklaşık 15-20 gün sürmektedir. Yumurtlama, çiftleşme, beslenme ve uçuş davranışı gibi faaliyetleri 15 °C'nin altında durmaktadır. Ev sineği erginleri gündüz aktivite gösteren ve gece dinlenen canlılardır. Gece dinlendikleri alanlar gündüz üredikleri ve beslendikleri alanlara yakın ve rüzgâr almayan bölgelerdir. Dişi ergin bireylerin gözleri arasındaki mesafe geniş iken erkek bireylerde dardır (Şekil 3) (Çetin, 2016; Koç ve Çetin 2017). Pupalar oluştuğlarında açık renkidir ve zamanla koyulaşırlar (Şekil 4).



Şekil 3. Ev sineklerinde eşleşme davranışı ve gözler arasındaki mesafeye göre cinsiyet ayrımı

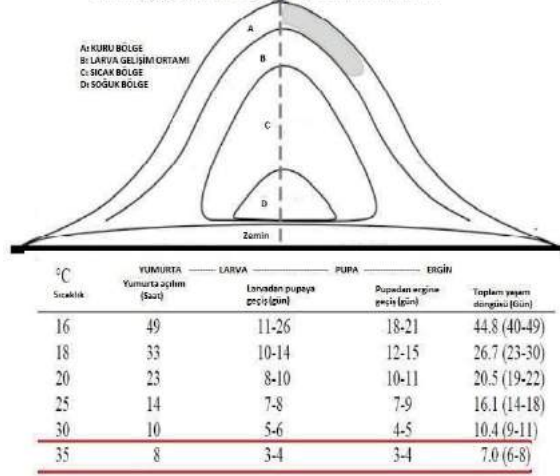


Şekil 4. Ev sineği son evre larvası (3. evre) ve pupası

Ev sinekleri yalayıcı-emici ağız tipine sahiptir. Beslenme şekilleri nedeniyle çeşitli patojenlerin yüksek miktarda bulundukları ortamlarda beslendiklerinde çeşitli patojenlerin yayılmalarına neden olurlar. Böylelikle dizanteri, kolera, tifo ve tüberküloz gibi hastalıkların yayılmasına sebep olurlar. Aynı zamanda büyükbaş hayvan yetiştiriciliğinde et ve süt gibi ürünlerin veriminin azalmasına neden olarak ekonomik kayıplara yol açarlar (Levine ve Levine 1991; Förster ve ark., 2009). Gerek vektörel özellikleri gerekse ekonomik kayıplara neden olmaları sebebiyle ev sinekleri ile etkili bir biçimde mücadele edilmesi gerekmektedir.

Ev sineklerine karşı yürütülen mücadele çalışmaları ergin ve larva olmak üzere iki farklı şekilde yapılmaktadır. Larva mücadelesi için genel olarak böcek gelişim düzenleyici insektisitler (kitin sentez inhibitörleri ve juvenil hormon analogları) tercih edilmektedir. Larva gelişim ortamına uygulanan bu tür biyosidal ürünlerin larvaların gelişimlerini bozarak ev sineklerine karşı etkinlik sağlamaktadırlar. Larva mücadelesinde kullanılan ürünlerin organik maddece zengin ortamlarda larvaların tercih ettiği ortamlar olan organik madde yüzeyinden 5-10 cm daha derine işlemesi gerekmektedir (Şekil 5). Aksi takdirde uygulamalarda sadece kuru organik madde yüzeyinde kalan ürün yeterli etkinlik göstermeyecektir.

Gübrenin yüzeyi kurudur. Bu nedenle larvasitlerin B bölgesine kadar ulaşması gerekir. Ürünü (larvasiti) bol su ile karıştırarak B bölgesine ulaştırabilirsiniz. Ev sineği-karasinek larvası nemli B bölgesini tercih ederken, pupa kuru A bölgesini veya zemini tercih eder.



Şekil 5. Ev sineği gelişim ortamları ve farklı sıcaklıklardaki gelişim süreleri

Larva mücadelesi ile birlikte yürütülen ergin mücadelesinde ise ağırlıklı olarak sentetik piretroid ve neonotinoid grubu insektisitler kullanılmaktadır. Ergin mücadelesinde kullanılan ürünler spreyleme ve boyama yöntemi ile ergin sineklerin dinlendiği ve beslendiği ortamlarda mücadele amacıyla kullanılmaktadırlar. Ürün formülasyonları içerisinde bulunan z-9-tricosane gibi feromon benzeri maddeler yanı sıra balık yemi, et, şeker, peynir suyu ve meyve bulunan tuzaklar oldukça çekici özelliktedir. Ayrıca ergin sineklerde ortaya çıkan direncin kırılmasında Piperonyl butoxide katkı sağlayabilmektedir (Çetin ve ark. 2019)

Ev sinekleri gündüz saatlerinde aktif hareket eden ve geceleri yerden yüksek nesnelerin kenar kısımlarında, halatlar ve kablolar üzerinde dinlenen canlılardır. Bu davranışları ip, halat ve şeritler üzerine uygulanan yapıştırıcıların ev sineklerini dinlenme ortamlarına asılması durumunda yakalamakta ve insektisit kullanmadan çok sayıda birey etkisiz hale getirilebilmektedir (Şekil 6).



Şekil 6. Ev sineği larva mücadelesi yapan bir uygulayıcı personel ve yapışkan bant/ip yöntemi ile ergin sineklere tuzaklama yapılması

Hamamböcekleri; Yarı başkalaşım (Hemimetabol) geçiren böceklerdir, yaşam döngülerinde yumurta, nimf ve ergin evreleri bulunmaktadır. Mutfaklar, banyolar, fırınlar, foseptikler, bodrum katları, rögarlar, kiler ve depolar önemli gizlenme ve yaşama ortamlarıdır. Genel olarak gün ışığı bulunan ortamları tercih etmeyen ve gece saatlerinde hareket eden organizmalardır. Türleri göre nem ve sıcaklık istekleri değişiklik gösterebilmektedir. Ağırlıklı olarak gece aktif (nokturnal), gündüzleri sıcak, karanlık ve kuru/nemli yarık ve çatlaklarda saklanarak geçiren canlılardır (Çetin 2016; Oz ve ark 2017).

Hamamböcekleri besin-gıda zehirlenmeleri, gastroenteritis, antrax, pnomoni, hepatit, mantar hastalıkları ve astım gibi çeşitli hastalık etkenlerinin mekanik vektörlüğünü yapar ve bulaştırırlar.

Ülkemizde yaygın olarak görülen ve en çok bilinen türleri; *Blattella germanica* L. (Alman hamamböceği), *Periplaneta americana* L. (Amerikan hamamböceği), *Blatta orientalis* L. (Doğu-Oriental hamamböceği), *Supella longipalpa* (F.) (Kahverengi-bantlı hamamböceği)'dir (Tablo 2) (Şekil 7) (Çetin 2016; Oz ve ark 2017).

Tablo 2. Ülkemizde bulunan 4 önemli hamamböceği türünün genel özellikleri.

	<i>Blattella germanica</i>	<i>Supella longipalpa</i>	<i>Periplaneta americana</i>	<i>Blatta orientalis</i>
Vücut Uzunluğu	12-15 mm	10-14 mm	35-40 mm	20-27 mm
Renk	Sarımsı kahverengi, pronotumunda boyuna iki koyu renkli çizgi vardır	Kahverengi, Sarımsı kahverengi, pronotumunda enine koyu ve açık bant vardır.	Kızılımsı kahve pronotumunda halka şeklinde açık bant vardır.	Koyu siyah
Yaşam alanı	Sıcak ve kuru	Sıcak ve kuru	Ilık ve nemli	Serin ve nemli

Hamamböceği mücadelesinde başarının kaynağı hijyen koşullarının yeterli olarak sağlanmasına dayanmaktadır. Konutlar, gıda işletmeleri, hastaneler ve yurtlar gibi farklı ortamlarda düzenli aralıklarla temizlik yapılması, yüksek vakum gücüne sahip elektrikli süpürgelerle süpürme yapılması, açıkta gıda bırakılmaması, gıdaların paket ve kapalı ambalajlarda saklanması gibi tedbirler hamamböcekleri ile mücadelede başarının temelini oluşturmaktadır.



Şekil 7. Ergin Alman ve Amerikan hamamböcekleri (sol resim, Alman-sağ resim Amerikan)

Hamamböceği popülasyonlarının yüksek olduğu noktalarda ortamda kalıcı (rezidüel) özellikleri 1-3 ay gibi sürelerle rahatlıkla ulaşan sentetik piretroid grubu insektisitlerin hamamböceklerinin gizlenebileceği ve bulunabileceği dolap arkası, çekmece altları, süpürgelik, lavabo gider çevreleri, foseptik kapaklarının iç yüzü, su kanalları ve rögar gibi alanlara uygulanması fayda sağlamaktadır (Tablo 3). Popülasyonlarının düşük olduğu alanlarda el tipi aerosol ve sprey ürünler hamamböceklerine karşı hızlı düşürücü ve yüksek öldürücü özellikte olmaktadır (Çetin 2016; Oz ve ark 2017).

Son yıllarda kullanımı yaygınlaşan, insan ve hayvan sağlığı açısından düşük riske sahip jel yem ürünler hamamböceği mücadelesinde oldukça başarılı ürünlerdir. Genellikle aktif madde olarak fipronil, abamectin, imidacloprid ve hydramethylnon gibi maddeleri bulunduran 0.05-0.1 gram ağırlığındaki (yaklaşık bir damla-kibrit çöpü başı kadar) yem hamamböceklerinin gizlenebilecekleri ortamlara bırakılır. Yemler içerisinde bulunan çekici özellikteki maddelerin hamamböceklerini cezp etmesi ortamdaki bireylerin yemleri hızlı şekilde tüketmelerine ve etkinliğin yüksek olmasına neden olmaktadır. Hamamböceklerinde görülen kanibalizm davranışı yemi yedikten sonra ölen bireylerinde tüketilmesi ile domino etkisi göstererek çok sayıda bireyin ölümüne neden olabilmektedir. Yemlerin düzenli aralıklarla takip edilmesi popülasyonun yüksek olduğu bölgelerde yem eksilen ortamlara yenilerinin konulması/takviye yapılması gerekmektedir. Jel yemler, kullanımının kolay ve başarısının yüksek olması, çevreye insektisit bulaşmasının en az seviyede tutulması, ortamdaki hayvan ve insanları uzaklaştırmaya gerek kalmadan uygulanması gibi sebeplerle özellikle kreş, bakım evi, restoran, hastane gibi alanlarda kullanımları büyük avantajlara sahiptir (Çetin 2016).

Tablo 3. Hamamböceklerine karşı rezidüel çalışmalarda kullanılan bazı ürünler (WHO/CTD/WHOPES/97.2)

Etken madde	Sınıfı	Uygulama dozu (gr ai/m ²)
α-Cypermethrin	Sentetik piretroit	0.03-0.06
Bifenthrin	Sentetik piretroit	0.048–0.096
Cyfluthrin	Sentetik piretroit	0.04
Deltamethrin	Sentetik piretroit	0.05
Etofenprox	Sentetik piretroit	0.1-0.3
λ-Cyhalothrin	Sentetik piretroit	0.02–0.03
Cyphenothrin	Sentetik piretroit	0.3
Cypermethrin	Sentetik piretroit	0.05-0.2
Permethrin	Sentetik piretroit	0.25
Bu tabloda verilen ürünler örnek olarak verilmiştir. Önerilen dozlar Dünya Sağlık Örgütü dozlarıdır ve bölgeden bölgeye, direnç sevipleri gibi faktörlere göre etkinliği değişebilmektedir.		

Kum sinekleri (Tatarcık-Yakarca); Ülkemizde halk arasında tatarcık, yakağan, yakarca olarak da bilinen kum sinekleri ergin sivrisineklerin yaklaşık 1/3'ü büyüklüktedirler (Şekil 8). Ülkemizde yayılış gösteren türler ağırlıklı olarak Phlebotomus cinsine ait türlerdir. Dinlenme durumunda kanatları karın üzerinde "V" harfi şeklinde tutarlar ve sadece ergin dişileri kan emmektedir. Çok iyi uçamayan erginler kısa sıçramaları andıran uçuş şekilleri ile

karakterizedirler. Kum sinekleri ülkemizde her yıl oldukça fazla kişide görülen Leishmania parazitleri tarafından oluşturulan şark çıbanı hastalığının ve tatarcık humması etkenlerinin taşıyıcısıdır (Gürel ve ark. 2012).

Kum sinekleri yumurta, larva, pupa ve ergin evrelerinden oluşan tam başkalaşımını sıcaklığa ve nem oranına bağlı olarak en ideal koşullarda dahi 1-4 ay süresinde tamamlamaktadırlar. Larvalarını doğada bulmak neredeyse imkânsız olan bu canlılar organik atıkça zengin ve nemli alanlarda (çürümüş bitki, çim birikintileri, yaprak küfleri, hayvan dışkıları, gübrelerde, mağaralarda ve kaya diplerinde) gelişirler (Çetin ve Özbel 2017).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi ve Dünya Sağlık Örgütü dâhil hiç bir kurum kum sineği-yakarca larva mücadelesi için ürün önermemektedir. Sadece erginlere yönelik çalışmaları desteklemektedir. Sivrisineklere karşı etkili tüm ergin öldürücüler oldukça başarılı sonuçlar vermektedir (Tablo 1). Erginlerinin gizlendiği alanlara kalıcı insektisitler uygulanmakta, yaz aylarında ise yine erginlere karşı geceleri soğuk sisleme (ULV) çalışmalarını ile mücadele yapılmaktadır. Kalıcı-rezidüel özellikteki insektisitlerin hayvan barınaklarının yerden 1.5-2 m yükseklikteki alanlarında kullanılması oldukça yararlıdır.



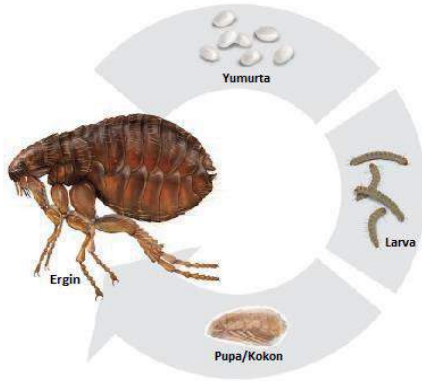
Şekil 8. Ergin kum sineği-tatarcık ile sivrisineğin büyüklük açısından kıyaslanması (sol resim, kum sineği-sağ resim sivrisinek)

Bahçe duvarı gibi ortamlardaki çatlakların onarılması, sıvanması, badana yapılması, duvarların dip kısımlarına süpürgelik yapılması, çimlerin düzenli biçilmesi ve organik atıkların düzenli toplanması gibi yöntemlerde mücadelelerine katkı sağlamaktadır.

Konutlar içerisinde kullanılacak elektro-likit ve elektro-tablet ürünlerde ergin kum sinekleri üzerinde düşürücü (knock-down edici) ve öldürücü özelliğe sahiptirler.

Kum sinekleri farklı kemirici türler üzerinde beslenebildiklerinden kemirgenlere yönelik yapılan mücadele çalışmaları popülasyonlarının azalmasında katkı sağlamaktadır (Çetin ve Özbek 2017).

e) Pireler; Bugüne kadar yapılmış araştırmalarda 2500'den fazla türü bilinen pireler (Siphonaptera: Pulicidae) insanlık tarihinde veba hastalığının vektörü olarak bilinen canlılardır. Vücutlarının yanlardan basık olması, kanatsız olmaları ve 20-30 cm arasında ileri ve yukarı sıçrayabilmeleri genel özelliklerindendir. Hem dişi hem de erkek ergin bireyler kan emebilir, erkekler dişilere göre biraz daha küçük vücuda sahiptirler. Tam başkalaşım gösteren pirelerin ülkemizde *Pulex irritans*, *Ctenocephalides felis felis* ve *Ctenocephalides canis* türleri insanlara en fazla saldıran türler olarak bilinmektedir. Yumurtadan ergin oluşuncaya kadar geçen başkalaşım süresi ortamın nemi ve sıcaklığından etkilenebilmekte 14-140 gün arasında başkalaşım tamamlanabilmektedir (Şekil 9) (Çetin 2016).



Şekil 9. Pire yaşam döngüsü

Pireler genel olarak bahar ve yaz aylarında sıklıkla görülmekle birlikte iklimlendirilmiş ortamlarda kış aylarında kedi ve köpek gibi evcil hayvanlar üzerinde görülebilmektedirler. *Ctenocephalides* cinsi pireler kedi ve köpeklerde en yaygın olarak görülen ektoparazitlerdendir (Farkas ve ark 2009; Coşkun ve Çetin 2018).

Pireler insan ve hayvan sağlığı açısından önemli canlılardır ve pireler deride kaşıntıya, kıl ve tüylerde dökülmeye neden olmaları yanı sıra birçok hayvan hastalığının vektörlüğünü de yaparlar. Pirelerin kedi ve köpek gibi hayvanların kılları arasında gizlenmesi ve yumurtlaması davranışları nedeniyle hayvan kıllarının aralıklarla tıraş edilmesi pirelere karşı belirgin koruma sağlamaktadır. Şampuanlar, banyo solüsyonları, pire tasmaları, pire tozu, pire spreyleri, damlalar ve ağız yoluyla verilen insektisitler yardımıyla pire tespit edilen evcil hayvanları parazitlerinden temizlemek mümkündür. Larvaların ve yumurtaların bulunabileceği halı gibi yüzeylere insektisit uygulamak bir gün ile bir kaç ay arasında pirelerden korunma sağlayabilmektedir. Pire kontrolünde kullanılan ürünlerin başlıcaları topikal damla (spot-on) şeklinde deriye uygulanan, enjeksiyon yoluyla ve oral yolla verilen ürünlerden oluşmaktadır. Ayrıca pire koruyucu, tasmalar, şampuanlar ve spreylere de bulunmaktadır (Coşkun ve Çetin 2018).

SONUÇ

Ülkemiz iklimi, toprak yapısı, bitki örtüsü ve bulunduğu coğrafik konum gibi değişik özellikleri ile vektör çok sayıda türe ev sahipliği yapmaktadır. Vektör canlıların, biyoloji, ekoloji ve davranışlarının bilinmesi ülkemizde görülen ve görülme olasılığı olan vektör kaynaklı hastalıklarla mücadelede katkı sağlayacaktır. Vektör mücadele çalışmaları sadece kimyasallar kullanılarak değil bireylerin bilgi ve farkındalık seviyesini arttırıcı kültürel tedbirler, eğitim, afiş ve broşür çalışmaları, mekanik mücadele ve biyolojik mücadele çalışmaları ile entegre mücadele şeklinde yürütülmelidir.

KAYNAKÇA

1. Coşkun G., Çetin H., Kış Aylarında Evcil Kedi ve Köpeklerdeki Pire (Siphonaptera: Pulicidae) Enfestasyonları ile İlgili Antalya, Türkiye'den Bir Araştırma, Türkiye Parazitoloji Dergisi , vol.42, pp.277-280, 2018.
2. Çetin H., Kent Zararlıları, Biyoloji, Ekoloji ve Mücadele Yöntemleri (Vektörler ve diğereklere), Yıldız Ofset, ANTALYA, 2016
3. Çetin H., Kocak O., Öz E., Koç S., Polat Y., Arıkan K., Evaluation of some Synthetic Pyrethroids and Piperonyl Butoxide Combinations against Turkish House Fly (*Musca domestica* L.) Populations, Pakistan Journal Of Zoology, vol.51, pp.703-707, 2019
4. Çetin H., Özbel Y., Kum Sinekleri (Yakarca, Tatarcık) ve Kontrol Yöntemleri (Sand Flies and Their Control Methods), Türkiye Parazitoloji Dergisi, vol.41, pp.102-113, 2017
5. Farkas R., Gyurkovszky M., Solymosi N., Beugnet F., 2009. Prevalence of flea infestation in dogs and cats in Hungary combined with a survey of owner awareness. Med Vet Entomol 23: 187-94.

6. Gürel, M.S., Ölgün, M.K., Yeşilova, Y., Özbel. Y. 2012. Cutaneous Leishmaniasis in Turkey. Turkish J. Parasitol 36 (2): 121-129.
7. Koç S., Çetin H., Ev Sineği (*Musca domestica* L.) Biyolojisi ve Mücadele Yöntemleri, Vektör Artropodlar ve Mücadelesi, Özbel Y, Ed., Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, ss.259-272, 2017
8. Oz E., Yanikoğlu A., Çetin H., Hamamböcekleri (Blattodea: Blattidae) biyolojisi, ekolojisi ve mücadele yöntemleri, Vektör Artropodlar ve Mücadelesi, Özbel Y, Ed., Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, ss.467-481, 2017
9. Ser Ö., Çetin H., Pestisitlerin Vektör Mücadelesinde Kullanımları (The Use of Pesticides in Vector Control), Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Farmakoloji ve Toksikoloji Özel Dergisi, vol.2, pp.26-34, 2016
10. WHO 2006. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1. http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_WHOPES_GCDPP_2006.1_eng.pdf. Geneva: World Health Organization.
11. WHO 1997. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. WHO/CTD/WHOPES/97.2

Vektör Kontrol Programlarında Kullanılan Bazı Cihazlar

Prof. Dr. Hüseyin ÇETİN

Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya

Özet: Vektörlerin kontrolü için ekipman seçimi, vektör kontrol planlamasının önemli bir parçasıdır. Yüzeylere rezidüel uygulama yapılması, larva gelişim ortamlarına larvasit uygulanması ve açık alanların havadan spreyleneşmesi, soğuk sisleyiciler (ULV cihazları), pulverizatörler, sis üfleyiciler (mist blower) ve termal sisleyiciler kullanılarak yapılır. Bu sunumda, vektörlerin kontrolünde pestisit uygulamak için kullanılan başlıca ekipmanlar hakkında bazı bilgiler verilmiştir. Her uygulama metodu kendine has uygun damlacık boyutuna sahip olması nedeniyle cihazlarda damlacık boyutu çok önemlidir. Tüm cihazların bakımı ve kalibrasyonu düzenli aralıklarla yapılmalıdır. Tüm ekipmanlarda sadece her makine için önerilen biyosit formülasyonları kullanılmalıdır. Ayrıca, pestisitlerin uygulanması için bir yöntem seçerken göz önünde bulundurulması gereken faktörler arasında vektörlerin aktivite zamanları ve davranışı göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Biyositler, Ekipman, Vektör kontrolü*

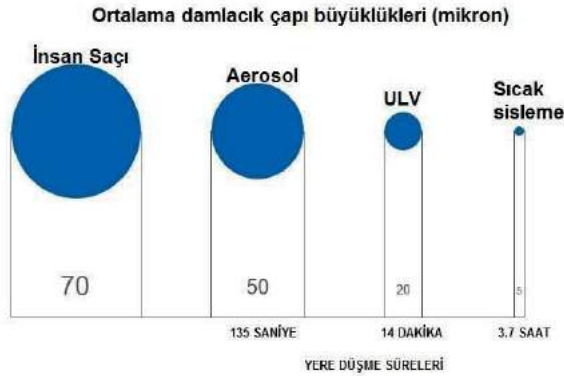
Some equipment used in vector control programs

Abstract: The selection of equipment for control of vectors is an important part of vector control planning. Residual treatment of surfaces, application of larvicides to breeding sites and aerial spraying of space areas are made by using ultra-low-volume cold foggers, hand-operated compression sprayer, mist blowers and thermal foggers. In this presentation some information about major equipment used to apply pesticides for control of vectors is given. The size of the droplet is very important as each application has an optimal droplet size. All devices must be maintained and calibrated at regular intervals. Only biocide formulations recommended for each machines should be used in all equipments. Also factors that should be considered in choosing a method for application of pesticides include the activity time and behavior of the vectors.

Key words: *Biocides, Equipment, Vector control*

GİRİŞ

Vektör mücadelesi çalışmalarında kullanılan biyosidal ürünlerin vektörlerin gelişebileceği, dinlenebileceği veya gizlenebileceği noktalara uygulanmasında farklı özelliklere sahip cihaz ve ekipmanlar kullanılmaktadır. Bu tür cihazlar elde, sırtta veya araç üstünde taşınabilir özellikte farklı büyüklükte ve hacme sahiptirler. Çalışmalarındaki genel prensip cihazların biyosit (akarisit veya insektisit) ile çözgenin (su, mazot vb) karışımının cihazlara uygun damlacık çapı ve hacminde cihazdan püskürtülmesidir. Cihazdan çıkan damlacıkların boyutları havada askıda kalma sürelerini değiştirmektedir (Tablo 1). Uygulayıcılar tarafından kullanılan farklı cihazlar 400 mikron veya daha fazla büyüklükte çok kaba, 100-400 mikron çapı arasında ince, 50-100 mikron çapında mist (pus veya karartı), 0.01-50 mikron çapları arasında aerosol veya sis olarak adlandırılan damlacıklar oluşturabilirler. Sivrisinekler için en ideal damlacık çapı, 10-20 mikron, daha büyük yapılı sineklerde ise 30 mikron olan damlacık çapları en uygun çaptır.



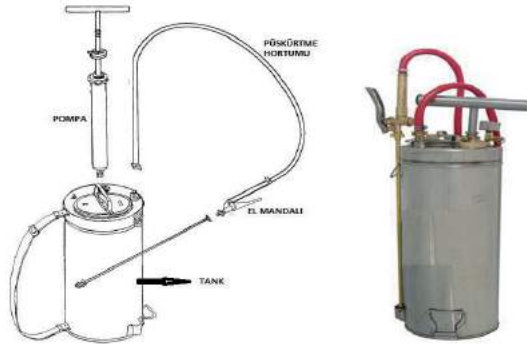
Şekil 1. Soğuk sisleme (ULV), sıcak sisleme, aerosol damlacık çaplarının saç teli kalınlığı ile kıyaslanması

Tablo 1. Vektör mücadelesinde kullanılan cihazlardan çıkan damlacıkların büyüklükleri ve askıda kalma süreleri

Damlacık çapı (mikrometre)	Düşme süresi (10 metrede)
1	93.7 saat
5	3.7 saat
10	56 dakika
20	14 dakika
50	135 saniye
100	36 saniye

Dünya Sağlık Örgütü tarafından vektör mücadelesinde kullanılan sırtta taşınabilir cihazların 25 kg, elde taşınan cihazların 20 kg'dan fazla olmaması önerilmektedir. Cihazlar içerisinde konulacak karışımların miktarlarının belirlenmesi amacıyla küçük cihazlarda 1 litre, büyük cihazlarda 5 litrelik göstergeler yer alması uygun olarak değerlendirilmektedir.

a) **Pulverizatörler;** Bu aletler sırtta veya omuzda taşınmakta olup değişik depo kapasitelerine ve püskürtme çubukları üzerinde farklı tip memelere sahiptirler. Çalıştırma kolunun aşağı yukarı hareket ettirilmesiyle veya hava basma kolunun aşağı yukarı hareket ettirilmesiyle, depo içerisinde basınç oluşturulacak şekilde hava basılır. Cihazlar poliüretan veya çelik özellikte dış darbe ve çarpmalardan, biyosidal üründen etkilenmeyecek şekilde tanklara ve aksamlara sahiptirler. Mekanik ve motorlu gibi farklı tipleri olmakla birlikte vektör mücadelesinde en çok kullanılan mekanik cihazdır. Oluşturulan hava basıncı cihaz içindeki karışımın yüzeye veya ortama püskürtülmesinde olanak sağlar. Vektör mücadelesinde gerek ergin gerekse larva mücadelesinde kullanılan bu cihazlar etkin şekilde kullanıldıklarında vektör mücadele hizmetinin en önemli cihazı olarak göze çarpmaktadırlar.



Şekil 2. Bir pulverizatörün genel görüntüsü



Şekil 3. Sırtta ve omuzda taşınabilen pulverizatör örnekleri

- b)** Sıcak sisleme (Termal Sisleme-Termal Fogging); İki binli yılların başına kadar ülkemizde sokak aralarında gezinen oldukça gürültülü ve duman şeklinde püskürtme yapan bu cihazların açık alanlarda araç üstünde kullanımları ilgili yönetmelikle yasaklanmıştır.

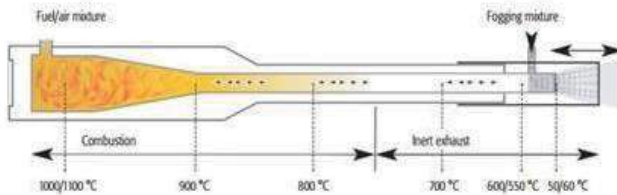
Cihazın çalışma prensibinde mazot vb. yağ bazlı maddelerle seyreltilen biyosidal ürün yaklaşık 1000 °C gibi yüksek sıcaklık altında çalışan ve uygulama noktası (çıkış noktası) yaklaşık 50-60 °C olan bir cihazdan çıkarken hava ile karşılaşınca yoğunlaşır ve beyaz renkte duman oluşur. Damlacık çapları genel olarak 20 µm'den küçüktür. Cihaz içerisinde kullanılan solventin yüksek sıcaklıkta tutuşma ve metan gazı ile reaksiyon sonucu patlama riski bulunduğundan özellikle gazların birikebileceği ortamlarda kullanılması sırasında dikkatli davranılması gerekmektedir. Sıcak sisleme cihazın tam olarak çalıştığından ve ucundan alev çıkmadığından emin olduktan sonra sisleme çalışması yapılmalıdır.



Şekil 4. Bir rögarda ve yağmur suyu kanalında sıcak sisleme cihazı kullanılarak yapılan biyosidal ürün uygulamaları

Açık alanlarda kullanımı Sağlık Bakanlığı tarafından yasaklanan bu cihazların sadece rögar, kanalizasyon sistemi, fosseptik çukuru gibi kapalı sistemlerde kullanılmasına izin verilemektedir. Bu yöntemde solvent olarak yaygın olarak kullanılan mazotun oldukça yüksek maliyeti olması yanı sıra hedef dışı canlılara da zararlı etkileri bulunmaktadır. Otoyollar yakınında uygulama yaparken ortaya çıkan dumanın sürücülerin sürüş emniyetini riske atabileceği unutulmadan tedbirler alınmalıdır aksi takdirde trafik kazalarının oluşumuna sebebiyet verilebilir.

Sıcak sisleme yönteminde damlacıklar oldukça küçüktür ve hava akımlarından rahatlıkla etkilenecek uygulama yapılan alandan kısa sürede uzaklaşabilirler. Cihazdan çıkan damlacıklar uygun hava akımı olan kanalizasyon sistemleri ve yağmur kanalları gibi birçok ortamda uzak mesafelere nüfuz edebileceklerinden bu ortamlarda gizlenen sivrisinek ve hamamböceği gibi canlılara karşı oldukça yüksek başarı sağlamaktadır.



Şekil 4. Bir sıcak sisleme cihazındaki sıcaklık değişiminin gösterilmesi

- c) Soğuk Sisleme (Ulv-Ultra Low Volume); Ülkemizde belediyeler tarafından en çok kullanılan bu yöntemde el tipi, sırt tipi ve araç üstü uygulama cihazları bulunan soğuk sisleme makinelerinde biyosidal ürün karışım tankında su ile seyreltilir, yüksek

basınçla püskürtülürken hızlı dönen türbünlere çarpar uygulama memelerden ortalama 20 µm çaplı damlacıklar şeklinde püskürtülür. Bu yöntem yüzey alana (hektara) atılan biyosidal ürün miktarı çok az olduğu için Çok Düşük Hacim (Ultra Low Volume-ULV) olarak da bilinir.

Rüzgârın az (1-5 m/sn) veya havanın durgun olduğu zamanlarda, araç hızı 10-15 km/saat'ten fazla olmayacak şekilde vektörlerin aktif olduğu saatlerde uygulama yapılabilir. Kapalı alanlarda yapılması durumunda uygulamadan sonra en az 30 dakika dış kapı ve pencerelerin kapalı, iç kapıların ise açık tutulması sonrasında ise ortamın en az birkaç saat iyice havalandırılması gerekmektedir. ULV yapılması için uygun sıcaklık değeri genel olarak 15 ile 35 derece arasındaki sıcaklıklardır. Damlacıkların askıda kalma durumlarını etkileyebileceğinden daha yüksek ve düşük sıcaklıklarda uygulama yapılmaması önerilmektedir.



Şekil 5. El tipi soğuk sisleme (ULV) cihazı



Şekil 6. Akşam saatlerinde araç üstündeki bir ULV cihazı ile sisleme çalışması yapılması

d) Mist-Blowers; Son yıllarda özellikle uygulama güçlüğü çekilen geniş alanlara kısa sürede ve kolaylıkla uygulama olanağı sağlaması nedeniyle sıklıkla tercih edilen mist blower cihazları ortalama 300-500 litre tank kapasitesine sahiptirler. Mist-blower spreylelerinde damlacık çapları 50-100 mikron arasındadır. Sırt tipi pulverizatörlerle müdahale edilemeyecek büyüklüklerde alanlarda kısa sürede zaman ve işçilikten kazanılarak uygulama yapılabilir. Uygulama cihazının üst kısmında bulunan hareketli başlık sayesinde araç hareket halinde iken çöp konteynırları, gübrelikler gibi alanlarda en azından 10-15 metreye kadar püskürtme yapılarak ilaçlama yapılması sağlanabilmektedir. Sivrisinek ve ev sineğı larvalarına karşı geniş alanlarda yapılan çalışmalarda oldukça uzun hortum sistemleri ve püskürme gücü yardımıyla uzak mesafelere müdahale olanağı sağlamaktadır.



Şekil 7. Bir mist blower cihazının genel görünümü



Şekil 8. Bir mist blower cihazının açık alanda biyosidal ürün uygulaması

SONUÇ

Vektör mücadele çalışmalarında kullanılan cihazlarda biyosidal ürün karışımı hazırlanırken uygulamaya yetecek miktarda hazırlanması, fazla karışım hazırlanmaması ve karışımların cihazlarda bekletilmemesi önerilmektedir. Cihazların püskürttükleri damlacıkların çaplarının düzenli aralıklarla kontrol edilmesi ve kalibrasyonlarının yapılması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

1. WHO, Equipment of Vector Control, Third Edition, <http://whqlibdoc.who.int/publications/1990/9241544031.pdf>
2. WHO, Space spray application of insecticides for vector and public health pest control A practitioner's guide. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5
3. Çetin H. 2016., Kent Zararlıları, Biyoloji, Ekoloji ve Mücadele Yöntemleri (Vektörler ve diğerleri), Yıldız Ofset, Antalya



**TAM METİN
SÖZLÜ
BİLDİRİLER**

**FULL TEXT ORAL
PRESENTATIONS**

**I. INTERNATIONAL
VI. VETERINARY
PHARMACOLOGY
and TOXICOLOGY
CONGRESS**

04 | 07 SEPTEMBER 2019

Erciyes University Sabancı Cultural Center

KAYSERİ - TURKEY

www.vetfarmatoks2019.com



Antioksidanlar: Ne Kadar ve Nasıl Kullanılmalı, Etkili mi?

İzzet KARAHAN¹ Hasan SUSAR¹

¹Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Balıkesir

Özet: Canlılar sürekli oksidanlara maruz kalır. Serbest radikal olarak adlandırılan bu ürünler eşlenmemiş elektronu bulunan atom ve moleküllerdir. Reaktif oksijen ürünleri (ROS) sağlıklıyken de, hastalık koşullarında da oluşabilir. Vücuda zarar veren serbest radikallerle mücadelede antioksidanlar, oksidanların hasar yapıcı etkilerini azaltıp vücudun içeriden ve dışarıdan yenilenmesini sağlarlar ve canlıların vücut fonksiyonlarının sorunsuz bir şekilde sürdürülebilmesi için gerekli maddelerdir. Pek çok çalışmada antioksidanların koruyucu ve/veya tedavi edici etkilerine yönelik olumlu bulgu ve sonuçlar vardır. Diğer yandan, antioksidan kullanılmasının koruyucu veya tedavi edicini etkisinin çok az olduğuna ya da olmadığına ve yüksek dozlarda veya sürekli kullanılmasının bazı toksik etkiler ile oksidan etkiyi arttırabileceğine dair sonuçları vurgulayan araştırmalar da vardır. Sunulan bu derleme bildiride, antioksidanları kullanımı ile fayda/zararları ve etkili olup olmadığına dair bilgiler verilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, Koruyucu etki, Kullanım, Tedavi.

Antioxidants: How Much and How to Use, Is It Effective?

Abstract: Living things are constantly exposed to oxidants. These products, called free radicals, are atoms and molecules with unpaired electrons. Reactive oxygen products (ROS) can occur in health conditions or disease conditions. In the fight against free radicals that harm the body, antioxidants reduce the destructive effects of oxidants and allow the body to regenerate internally and externally and these substances are necessary for maintaining the body functions of living things without any problems. Many studies have positive findings and conclusions about the protective and / or therapeutic effects of antioxidants. On the other hand, there are studies that emphasize that the use of antioxidants has little or no protective or therapeutic effect, and that high doses or continuous use may increase the oxidant effect with some toxic effects. In this review report, information on related the use of antioxidants and their benefits/disadvantages and whether it is effective are given.

Keywords: *Antioxidants, Protective effect, Treatment, Use.*

Giriş

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin çeşitli sebeplere bağlı olarak oluşumunun artması ve bunların etkisizleştirilmesinde vücutta görevli antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır. Oksidatif stresin temel ürünleri olan reaktif oksijen türleri (ROS) oldukça yüksek reaktiviteye sahip moleküller olup, mitokondriyum başta olmak üzere hücre organellerinde normal metabolizmanın sonucu olarak veya iskemi-reperfüzyon, yaşlanma, radyasyon, yüksek oksijen basıncı, inflamasyon ve ksenobiotiklere (kimyasal maddelere) maruz kalma gibi sebeplere bağlı olarak üretilirler. Başlıca reaktif oksijen türleri Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve Hidrojen peroksit (H_2O_2)'tir. Bunlardan ilk ikisi serbest radikal olup hidrojen peroksit ise prooksidandır. Bunlar oksidatif stres, başta kanser olmak üzere diyabet, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar, ateroskleroz ve inflamatuvar bozukluklar gibi birçok hastalığın patogenezinin sorumludur (2,4,25,27).

Fizyolojik koşullar altında hücreler, ROS oluşumunu ve yok edilmesini dengeleyen temizleyici sistemler kullanarak ROS seviyelerini kontrol eder. Ancak oksidatif stres durumunda, aşırı ROS hücrel proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilir ve bu da çeşitli hastalıkların oluşumuna katkıda bulunabilecek ölümcül hücrel hasarlara neden olabilir. ROS'un aşırı üretimi veya antioksidan enzimlerin inhibisyonu proteinler, lipidler ve DNA gibi bazı makromoleküllere zarar verebilir, membran lipidlerinin peroksidasyonu, proteinlerin denatürasyonu ve DNA hasarını içeren çeşitli mekanizmalar yoluyla hücrel hasar ve nekrozu uyarır ve bu durumlar pekçok ksenobiyotik toksisitesinin etiyolojisinde yer alır (8,12,13,18).

Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Oksidatif stres, pekçok hastalığın patogeneğinde olduğu gibi tedavisinde de önemli bir rol oynayabilir. ROS ve ürünlerinin ayrıca, hücre homeostazının korunmasında, gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde, hücre proliferasyonunda apoptozu indükleyerek kansere karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadır. Fizyolojik koşullar altında hücreler, ROS oluşumunu ve yok edilmesini dengeleyen temizleyici sistemler kullanarak ROS seviyelerini kontrol eder. ROS üretimi ve atılması arasındaki denge sayısız biyolojik süreç ve hastalık koşullarına bağlı olduğundan kritik öneme sahiptir. Bu hücrel redoks dengesi, farklı hücre içi bölmelerde bulunan güçlü bir antioksidan sistemiyle sağlanır (7,10,17,22,32).

Bu endojen antioksidan sistemler enzimatik (süper oksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) vb. ile enzimatik olmayanlar (glutatyon, melatonin, selenyum, askorbik asit, lipoik asit, α -tokoferol, vb.)'dır. Ayrıca ekzojen antioksidanlar olarak vitamin E (α -tokoferol), vitamin A (β -karoten), vitamin C (askorbik asit), bakır, çinko ve selenyum gibi mineraller ile gıdalarda bulunan flavonoidler, polifenoller ve değişik kimyasal maddeler vardır. Son yıllarda, doğal antioksidanlar, güvenilir olması ve istenmeyen yan etkileri olmaması nedeniyle daha fazla tercih edilir duruma gelmişlerdir (4,11,15,19,22,29).

Gıdalarda Antioksidanlar

Antioksidanlar gıdaların yapısında doğal olarak bulunur. Gıdalar; flavonoidler, polifenoller, flavonlar, antosiyaninler, ellajitanninler, likopenler, resveratrol, kateşin ve epikateşinler, kuersetin, fisetin, rutin, morin, kaemferol, amigdalin, hesperidin, narinjin ve narinjenin, viniferin, triterpenoidler, hidroksisinnamik, benzoik, gallik, sinapik, vanilik, sirinjik, kafeik, ferulik ve pkumarik asit gibi maddeler yanında bazı vitaminler (A, E, C) ve/veya vitamin ön maddesi olan α -tokoferol, tokotrienol, karotenoidler, likopen, askorbik asit, ile mineraller (Se, Zn, Cu) gibi antioksidanlardan bir ve/veya birkaçını içerebilmektedir. Meyve ve sebzelerde bulunan ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşikler, vitaminler (A, C ve E vitamini) ve karotenoidler, oksidatif stresle ilişkili bu hastalıklardan korunmada etkili bileşikler olarak öne çıkmaktadırlar. Bu bahsedilen maddelerin tümünün antioksidan aktivitelerinin ortaya konulmasına yönelik çok sayıda araştırma vardır (2-6,14,15,32).

Besleyici özellikleri dışında içerdikleri etkin maddelerden dolayı vücudumuza fizyolojik yararlar sağlayan ve/veya kronik hastalık riskini azaltabilen besinlere fonksiyonel besinler denilmektedir. Nutrasotik terimi besinsel desteği, fonksiyonel besinleri, tıbbi besinleri ve probiyotikleri de içeren bir terimdir. Nutrasotikler besinsel değeri yanı sıra vücutta olumlu fizyolojik etkileri olan ve/veya kronik hastalık riskini azaltabilen, besinlerden ayrıştırılarak saflaştırılan ve genel olarak tablet, kapsül veya damla şeklinde tüketilen ürünlerdir. Özellikle nutrasotiklerin önemli bir kısmı benzer ilaç şekillerinde besin ya da diyet takviyesi (dietary supplement) adı altında ve pek çoğu da antioksidanları içeren müstahzarlar olarak dikkat çekmektedir (2,4,5,7).

Antioksidanların günlük yediğimiz ve içtiğimiz hemen her besinde bulunan besin öğelerinden biri olduğu bilinen bir gerçektir. Özellikle son yirmi yılda antioksidanların etkilerine yönelik yapılan bilimsel (epidemiyolojik, klinik ve deneysel) araştırmaların bulguları sağlıklı yaşam ve tedavi alanına abartılı bir yansımaları antioksidan etkili ürünlerin (doğrudan fonksiyonel besin maddesi, nutrasotik veya besin katkıları) abartılı bir şekilde tüketim çılgınlığına yol açmaktadır. Bunun diğer bir sebebi de en basitinden kanser başta olmak üzere pek çok ciddi hastalıkların sadece antioksidanlar ile önlenebileceği ve/veya tedavi edileceği algısının oluşmasıdır (1,10,11,18,24).

Antioksidanların Etkinliği ve Etkisizliğine Yönelik Araştırmalar

Geçmişte yapılan bazı araştırmalar ve son yıllarda yapılan bilhassa epidemiyolojik ve klinik deneysel çalışmalar antioksidanların etkisiz, hatta zararlı olduğuna yönelik bilgi ve bulguları da içermektedir. Her ne kadar başlangıçta yapılan çalışmalar, antioksidan takviyelerin sağlığı teşvik edebileceğini öne sürse de, sınırlı sayıda antioksidan içeren daha sonraki klinik araştırmalarda hiçbir fayda tespit edilmemiş, hatta bazı antioksidanlarla fazla takviyenin zararlı olacağını öne sürmüştür. Bu çalışmalarda vurgulanan en önemli noktalar, antioksidanların ne kadar ve nasıl kullanılmasına yöneliktir (6,8,16,18).

Vitamin C güçlü bir antioksidan olup, bazı in vitro koşullarda prooksidan ve glikat proteini de olabilir. Bu durumlar, yüksek C vitamini alımının ateroskleroza sebep olacağı fikrinin öne sürülmesine neden olmuştur. Yüksek miktarda vitamin C alımının kardiyovasküler hastalık riski üzerine yapılan bir çalışmada, diyabetli kadınlarda menopoş sonrasında kardiyovasküler hastalığa bağlı ölüm riskini artırdığı gösterilmiştir. Diyabetin ciddiyeti, C vitamini tüketimiyle kardiyovasküler hastalık mortalitesi arasındaki ilişkide güçlü bir bağ olmasının düşük olduğu ancak; tamamlayıcı C vitamini ve kardiyovasküler hastalık riskinin gözlenen ilişkisinin tesadüfi değilse, ekstra C vitamini diyabetteki bu belirgin zararlı etkisinin olabileceği öne sürülmüştür. Burada, C vitamininin in vitro serbest demir varlığında proksidan olarak görev yapabileceği, aşırı demir yüklenmesi ve muhtemelen serbest demirin indüklenmesi gibi bir demir metabolizması bozukluğu ve alternatif olarak, C vitamini glikasyon yapan proteinlerle veya lipid peroksidasyonunu uyarak hasara neden olabileceği temel etki mekanizmaları olarak değerlendirilmiştir (1,21,25). Ayrıca askorbik asitin antioksidan etkisinin yanında oksidan etki göstermesinde proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali oluştırmaya uygun ferro demire dönüştürmesinin ve bu özelliğinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğu, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği de kaydedilmiştir (10,12,21). Tümör hücrelerinin çok miktarda askorbik asit içerdiiği ve C vitamininin hücre içi olarak indirgenen ve askorbik asit olarak tutulan dehidroaskorbik asit formunda kolaylaştırıcı glikoz

taşıyıcılardan girdiği tespit edilmiştir. Kanser hücrelerinde yüksek askorbik asit seviyelerinin kemoterapi veya radyasyon terapisine müdahale edebileceği, çünkü bu tedavilerin oksidatif mekanizma ile hücre ölümünü tetiklediğini düşünülmektedir. Bu nedenle askorbik asit takviyesinin, kanser tedavisinin etkisini azaltabileceği ifade edilmiştir. Buna neden olarak güçlü bir antioksidan olan askorbik asitin, kanser hastalarında kemoterapinin neden olduğu oksidatif stresi ortadan kaldıracağı veya nötralize edebileceği savunulmakla birlikte tümör hücrelerindeki rolünü ve kanser kemoterapisinde kontrendikasyonunu anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu ileri sürülmüştür (1,20,21,23). Araştırmacılar; lipid hidroperoksidlerin, DNA'ya zarar verebilecek ürünler oluşturmak için askorbik asit ile reaksiyona girebileceğini, askorbik asidin mutagenezi ve kanser riskini artırabileceğini ve lipid hidroperoksitlerden toksik metabolitler oluşturabildiğini de öne sürmüşlerdir. Bu metabolitler in vivo olarak önemli miktarda DNA hasarına yol açabilmektedir. Ancak, askorbik asidin, lipidlerden toksik metabolitler üreterek kanser ve diğer hasarlara neden olabileceğini kabul etmeden önce göz önünde bulundurulması gereken birçok soru olduğu unutulmamalıdır (1,4,8,9,13,29).

Farelerde antioksidanların akciğer kanserini hızlandırması üzerine yapılan çalışmada, diyetin N-asetilsistein (NAC) ve E vitamini gibi antioksidanlar ile takviye edilmesinin tümör ilerlemesini belirgin şekilde arttırdığını ve farelerde canlı kalmayı azalttığını tespit etmişlerdir. Antioksidanların endojen ROS savunma sisteminde yer alan genlerin fonksiyonunu azaltmıştır. NAC ve E vitamini, fare ve insan akciğer tümör hücrelerinde ROS oluşum, DNA hasarına yol açmakta ve p53 ekspresyonunu azaltarak tümör hücresi proliferasyonunu arttırmaktadır. p53'ün etkisizleştirilmesi, tümör büyümesini antioksidanlarla aynı derecede arttırmakta ve antioksidan etkisini ortadan kaldırmaktadır. Böylece, antioksidanlar, tümör büyümesini hızlandırır. Genlerdeki somatik mutasyonlar tümörün ilerlemesinde geç ortaya çıktığından, NAC ve benzeri antioksidanlar kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan yüksek riskli insanlarda tümörlerin erken büyümesini veya prekanseröz lezyonların oluşmasını hızlandırabilir. Birçok epidemiyolojik çalışmada vitamin E takviyesinin özellikle kalp hastalıklarında oluşan oksidatif stresle ilgili olaylarda etkili olmadığı da gösterilmiştir (7,11,13,20,28,30).

Akciğer kanseri ve kardiyovasküler hastalıklar üzerine yapılan bir çalışmada beta karoten verilmesinin, serum beta karoten seviyelerini 12 kat yükselttiğini, ancak bu seviyelerin redoks ilişkileri veya diğer hücrel mekanizmalar için önemli olan diğer bileşiklerle ciddi dengesizliğe neden olabileceği için toksik etkiler oluşturabileceği kanaatine varılmıştır. Araştırmacılar beta karoten uygulamasının E vitamini düzeyini önemli ölçüde düşürdüğüne yönelik çalışmaya karşılık kendilerinin böyle bir etki bulmadıklarını bildirmişlerdir (26). Diğer yandan A vitamini öncüsü olarak kullanılan likopenin (mısır yağı içerisinde 4 mg/kg ağızdan) karaciğer, böbrek ve kalp dokularında oluşturulan hasarlarda eşzamanlı uygulamasının koruyucu etki yaptığını, buna karşılık önceden yapılan uygulamalarının ise etkili olmadığı gösterilmiştir (3,14,15,33). Diğer yandan yapılan pek çok epidemiyolojik çalışmada hastalık riski yüksek insan grupları (sigara içen, sigarayı bırakmış, asbeste maruz kalan, doktorlar vb.)’nda beta karoten ve/veya vitamin A takviyelerinin hastalık insidanslarında değişime neden olmadığı, hatta bazı çalışmalarda örneğin akciğer kanseri insidansında % 28’e varan artışlara sebep olduğu gösterilmiştir (26,27,28,31).

Multivitaminlerin aşırı kullanımı ile prostat kanseri arasındaki pozitif ilişkiyi araştırılan bir çalışmada, selenyum, karoten, folat ve çinko gibi bireysel mikrobesein takviyesi alan erkeklerde ileri ve ölümcül prostat kanseri riskini arttırdığını ortaya konulmuştur. Bu durumlara neden olarak birkaç önyargıda bulunmaktadır. Prostat kanserleri, mevcut PSA tarama uygulamaları ile tespit edilebildiği için E vitamini, selenyum veya folat takviyesi kullanan erkeklerde eşzamanlı olarak ağır multivitamin kullanımıyla lokalize prostat kanseri riskinin artması, bunu kullananların PSA taramasına maruz kalma ihtimalinden kaynaklanmış olabileceği kanaatine varmışlardır. Bu veriyi destekleme amacıyla prostat, akciğer, kolorektal ve yumurtalık kanseri tarama çalışmasında sigara içenlerde artan E vitamini alımı ile kanser riski arasında artan bir ilişki gösterilmiştir. Bu çalışmalar E vitamininin bu olaylarda etkisiz olduğunu ortaya koymaktadır. (17, 20, 28). Diğer bir epidemiyolojik çalışmada herhangi bir hastalık olmadan antioksidanların alınmaya başlanmasına rağmen, tek tek incelediğinde, özellikle betakaroten ve vitamin A ile vitamin E’nin tek ya da kombinasyon halinde kullanımlarının ölümleri arttırdığı, vitamin C’de ise ölümleri arttırıcı bir etki görülmezken, selenyum kullanılımasının ise genel olarak az da olsa ölümleri azalttığı yönünde bulgular elde edilmiştir (1,9,11,21,23,26,30).

Selenyum, vücutta hem yararlı hem de zararlı hücrel tepkimeleri uyarak hem oksidan hem de antioksidan olarak görev yapar. Diyetle fazla alınması durumunda, protein tiyol gruplarını doğrudan oksitleyerek ve çapraz bağlanmayla dolaylı olarak, okside edici bir redoks kayması ve Fenton reaksiyonu yoluyla oksijen radikallerini üreterek apoptotik hücre ölümü ile sonuçlanan oksidatif stres ve hücrel hasarlara neden olmaktadır. Ayrıca bu ortamda selenyumun glutasyon (GSH) ile reaksiyona girmesi, GSH ile hücrel okside edilmiş GSSG (Glutasyon Disülfid)'nin dışı aktarılmasında GSH tükenmesine neden olur. Selenyum tarafından üretilen daha oksitleyici bir ortam oluşur ve bu durum çoğu biyomoleküle, DNA'ya, proteinlere ve lipitlere zarar verebilir ve böylece hücrel hasarı arttırabilir (22). Diğer yandan; Kuersetin H_2O_2 'in akciğer epitel hücrelerinde neden olduğu DNA hasarının oluşturduğu toksiteyi tersine çevirir. Genel olarak, gözlemlenen bu koruma, kuersetinin antioksidan aktivitesine atfedilir. Kuersetin burada oluşan serbest radikallerin etkili bir temizleyicisidir. Ancak, eş zamanlı olarak kuersetinin tiyol reaktif bir metabolitinin oluşması ve bunun GSH seviyelerinde oluşturduğu azalma sonucu kuersetinden beklenen antioksidan etkinin oluşmasını engeller (4,9,22,30).

Sonuç

Tüm bu bilgiler vücuttaki antioksidan mekanizmaların karmaşık olduğu ve antioksidanların genellikle karmaşık olayların bir parçası olarak hareket ettiğidir. Bu nedenle, tek antioksidan hepsi ile aynı şeyi yapamaz. Antioksidanların böbrek, karaciğer ve diğer organ hasarları gibi oksidatif stres kaynaklı hastalık ve komplikasyonlara karşı koruma sağladığı görülmesine rağmen, bu antioksidanların sorunu önleyeceği veya iyileştireceği anlamına gelmez. Bu bağlamda, bir antioksidan ortamdaki serbest radikalleri temizledikten sonra, oksidatif zincirdeki değişimin başka bir antioksidan tarafından tamir edilmemesi halinde, bir pro-oksidan olmaya başladığı iyi bilinmektedir. Buna karşın, normal beslenme düzeninde besinlerle antioksidanların alınmasının daha faydalı olduğu ileri sürülmektedir. Bunun muhtemel açıklaması, besinlerde antioksidanların bir karışımı olduğu ve genellikle bir veya iki madde kullanılarak alınması ve antioksidan zincirin sürekli ve iyi bir şekilde çalışmasıdır. Bu durumda, bu tür takviyelerin nihai etkisi, olumsuz veya zarar verici (hasar yapıcı) bir etki şeklinde olmayacaktır (9,10,13,18,19,22,26,31).

Bu çalışmaların tümünde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta; hangi antioksidanın, hangi dozda, ne kadar süreyle tüketildiğinde söz konusu hastalık riskinden hangi oranda korunduğu konusudur. Bunların belirlenmesine yönelik olarak her antioksidan için farmakokinetik-toksikokinetik özelliklerinin hem sağlıklı hem de hasta bireylerde ortaya konulması, kronik toksisite denemelerinin (teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkiler) yapılması ve bu denemeler sonucunda diyetle alınması gereken miktar (RDA, Recommended Dietary Allowances, Her yaş ve cinsiyetten bireyin sağlıklı beslenme kriterlerini tam olarak karşılayacak miktar); Yeterli miktarda alım (AI, Adequate Intakes, Belirli yaş ve cinsiyetteki bireylerde yeterli seviyeyi oluşturmak için alınması gereken miktar) ile Güvenli olarak tüketilebilecek en yüksek miktar (IU, Tolerable Upper Intake Levels, Yan ve toksik etki oluşturmadan kullanılabilecek en yüksek miktar) gibi parametrelerin iyi belirlenmesi gereklidir (5,6,12,16,17,25).

Sonuç olarak özellikle antioksidanları içeren fonksiyonel gıdalar, nutrasotikler ve diyet katkılarına ilgi hızla artmakta ve her geçen gün yeni bir ürün piyasaya sunulmaktadır. Tüm bunların sağlık açısından güvenilirliği en önemli husustur. Risk ve faydalar birlikte göz önünde bulundurularak tüm bu ürünler değerlendirilmelidir. Ancak hiçbir antioksidanın ve bu tip ürünün mucize olmadığının bilinmesi gerekir. Tüm insanların bu ürünlerin tüketimine karşı doğru bir şekilde bilinçlendirilmesi ve konuyla ilgili gerekli yasal düzenlemeler mutlaka yapılmalıdır. Diğer yandan antioksidanların normal beslenme düzeninde, doğal olarak hayvansal ve bitkisel besinler içerisinde vücudun ihtiyacını karşılayacak miktarlarda alınması gereklidir.

Burada temel ilke Hipokratın dediği gibi **“Yedikleriniz ilacınız olsun, ilaçlarda yemeğiniz olsun”** prensibi olmalıdır.

Kaynaklar

1. Agus DB, Vera JC ve Golde DW. Stromal cell oxidation: A mechanism by which tumors obtain vitamin C. Cancer Res. 1999; 59: 4555-4558.
2. Atalay D, Erge HS. Gıda Takviyeleri ve Sağlık Üzerine Etkileri. Food and Health. 2018; 4: 98-111.

3. Ateşşahin A, Yılmaz S, Karahan İ, Çeribaşı AO, Karaoğlu, A. [HTML]Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*, 2005; 212, (2-3), 116-123.
4. Boots WA, Haenen G and Bast A. [HTML]Health Effects of Quercetin: From Antioxidant to Nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 2008; 585, (2-3), 325-337.
5. Coşkun T. Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2005; 48: 69-84.
6. Dereli D. Antioksidan çılgınlığı: Antioksidan nedir? Antioksidan çeşitleri nelerdir? https://www.tavsiyeediyorum.com/makale_802.htm. Erişim tarihi: 19.08.2019.
7. Dündar Y, Aslan R. Bir antioksidan olarak vitamin E. *Genel Tıp Dergisi*. 1999; 9(3): 109-116.
8. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine*. 2017; 104: 144-164.
9. Ghosh J. Rapid induction of apoptosis in prostate cancer cells by selenium: reversal by metabolites of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 315: 624-635.
10. Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2012; 75, (3): 637-644.
11. Halliwell B, Rafter J, and Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 268-276S.
12. Howes RM. The free radical fantasy a panoply of paradoxes. *Ann NY Acad Sci*. 2006; 1067: 22-26.
13. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein T ve Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53 dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 11848-52.
14. Karahan İ, Yılmaz S, Ateşşahin A. Ratlarda cisplatin ve gentamisin kan ile karaciğerde oluşturdıkları oksidatif stres üzerine lükopeninin etkileri. *F Ü Sağ Bil Derg*. 2006; 20 (1): 39-43.
15. Karahan İ, Ateşşahin A, Yılmaz S, Çeribaşı AO, Sakin F. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Toxicol*. 2005; 215: 198-204.
16. Kardeh S, Esfahani S, Alizadeh AM. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *European Journal of Pharmacology* 2014; 735: 150-168.
17. Khurana RK, Jain A, Jain A, Sharma T, Singh B. Administration of antioxidants in cancer: debate of the decade. *Drug Discovery Today*. 2018; 23(4).
18. Kopaei MR, Baradaran A, Rafieian M. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2013; 18(7): 628.
19. Kowald A ve Kirkwood TBL. Towards a network theory of ageing: a model combining the free radical theory and the protein error theory. *J Theoretical Biol*. 1994; 168(1): 75-94.
20. Lawson KA, Wright ME, Subar A, Mouw T, Hollenbeck A, Schatzkin A, Leitzmann MF. Multivitamin use and risk of prostate cancer in the national institutes of health – aarp diet and health study. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99(10): 754-764.
21. Lee DH, Folsom AR, Harnack L, Halliwell B, Jacobs DR. Does supplemental vitamin C increase cardiovascular disease risk in women with diabetes? *Am J Clin Nutr*. 2004; 80: 1194-1200.
22. Lee KH ve Jeong D. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: The selenium paradox. *Molecular Medicine Reports*. 2012; 5: 299-304.
23. Lee SH, Oe T ve Bliar IA. Vitamin C induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science* 2001; 292: 2083-2086.

24. Lei XG, Zhu J-H, Cheng W-H, Bao Y, Ho Y-S, Reddi AR, Holmgren A, Arnér ESJ. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiol Rev.* 2016; 96: 307–364.
25. Nasrı H, Mahmoud Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants and antioxidants: Why they are not always beneficial? *Iranian J Publ Health*, 2014; 43 (2): 255-257.
26. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine.* 1996; 334(18): 1150-1155.
27. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clinical and Experimental Investigations.* 2015; 6(3): 331-336.
28. Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med* 2014; 6, 221ra15.
29. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends *caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metabolism.* 2007; 6(4): 280–293.
30. Spyrou G, Bjornstedt M, Kumar S and Holmgren A. AP-1 DNA-binding activity is inhibited by selenite and selenodiglutathione. *FEBS Lett.* 1995; 368: 59-63.
31. Wani G, Milo GE, D'Ambrosio SM. Enhanced expression of the 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine triphosphatase gene in human breast tumor cells. *Cancer Letters.* 1998; 25(1-2): 123–130.
32. Yılmaz İ. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2010; 17(2): 143-153.
33. Yılmaz S, Ateşşahin A, Şahna E, Karahan İ, Özer S. [HTML]Effects of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity-nephrotoxicity. *Toxicology*, 2006; 218, (2–3), 164-171.

Kadmiyum Verilen *Drosophila melanogaster*'lerde Vitamin E'nin DNA Hasarı ve Üreme Performansı Üzerine Koruyucu Rolünün Araştırılması

Fahriye Zemheri NAVRUZ¹, Damla Arslan ACARÖZ², Ulaş ACARÖZ³, Sinan İNCE⁴

¹Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 74100 Bartın, Türkiye

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Bayat Meslek Yüksek Okulu, 03780, Afyonkarahisar, Türkiye

³Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

⁴Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

Özet: Kadmiyum çevre ve besin zincirinin en önemli kirleticilerinden biridir. Bu ağır metal insanlarda ciddi sağlık risklerine neden olmaktadır ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından Grup 1 (İnsanlar için kanserojen) olarak sınıflandırılmıştır. Vitamin E (α -tokoferol) günlük diyetimizle alınması gereken önemli bir antioksidan kaynağıdır. Bu çalışmada kadmiyuma maruz bırakılan *Drosophila melanogaster*'lerde vitamin E'nin üreme performansı ve DNA hasarı üzerindeki olası koruyucu rolü araştırıldı. DNA hasarının belirlenmesinde Comet yöntemi kullanıldı. *Drosophila melanogaster*'in besi yerlerine kadmiyum ve vitamin E sırasıyla 0.125 mM ve 25 mg/L dozlarında 15 gün boyunca ilave edildi. Elde edilen sonuçlara göre kadmiyum uygulanan gruplarda DNA hasarında artış olduğu, buna karşın vitamin E'nin kadmiyum tarafından indüklenen DNA hasarını azalttığı görüldü. Ayrıca, kadmiyumun üreme performansında azalmaya neden olduğu, buna karşın vitamin E'nin ise üreme performansını olumlu etkilediği saptandı. Sonuç olarak kadmiyumun *Drosophila melanogaster*'lerde meydana getirdiği olumsuz etkileri vitamin E'nin engellediği ve koruyucu özellik gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Comet Analizi, DNA hasarı, *Drosophila melanogaster*, Kadmiyum, Vitamin E.

Investigation of the Protective Role of Vitamin E on DNA Damage and Reproductive Performance in *Drosophila melanogaster*s Exposed to Cadmium

Abstract: Cadmium is one of the most important contaminants in the environment and food chain. This heavy metal causes serious health risks in humans and is classified as Group 1 (Carcinogenic to humans) by the International Agency for Research on Cancer. Vitamin E (α -tocopherol) is an important source of antioxidants that should be taken with our daily diet. This study investigated the possible protective role of vitamin E on the reproductive performance and DNA damage in *Drosophila melanogaster*s exposed to cadmium. Comet assay was employed to determine DNA damage. Cadmium and vitamin E were added to broth of *Drosophila melanogaster* at 0.125 mM and 25 mg/L, respectively. According to the results, there was an increase in DNA damage in cadmium treated groups, whereas vitamin E decreased cadmium-induced DNA damage. In addition, cadmium caused a decrease in reproductive performance; however vitamin E positively affected reproductive performance. In conclusion, the negative effects of cadmium on *Drosophila melanogaster*s was prevented by vitamin E and vitamin E showed protective properties.

Keywords: Cadmium, Comet Analysis, DNA damage, *Drosophila melanogaster*, Vitamin E.

Giriş

Kadmiyum, yerkabuğunda doğal olarak bulunan ve ciddi çevresel kirleticilerden biridir. Alkali akümülatörlerin, boya ve plastiklerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan kadmiyum diğer kimyasallar gibi başta su olmak üzere çevre kirliliğinde önemli bir rol oynamaktadır (Rizki ve ark., 2004). Kadmiyumun *Drosophila melanogaster*lerde zararlı etkiler meydana getirdiği ve yapılan bir çalışmada da kadmiyumun *Drosophila melanogaster*'da cinsiyete bağlı resesif ölümcül mutasyonların sıklığı ve baskın germ hücrelerinde öldürücü mutasyonların artışına neden olduğu vurgulanmıştır (Pesheva ve ark., 1997). Diğer bazı araştırmalarda, kadmiyumun deniz gastropodu olan *Nerita chamaeleon* ve solucanlar üzerinde genotoksik etkiler meydana getirdiği rapor edilmiştir (Fourie ve ark., 2007; Sarkar, 2015).

Diyetle alınanların yanı sıra dışarıdan alınan antioksidanların oksidatif dengenin sürdürülmesi ve/veya oksidatif hasara karşı önemli rol oynadığı bilinmektedir (Brenneisen ve ark., 2005). Askorbik asit (C vitamini), alfa tokoferol (vitamin E) ve retinol (A vitamini) serbest radikalleri ve dolayısıyla oksidatif zincir reaksiyonlarını kesen en güçlü antioksidanlar olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar ile bu maddelerin oksidatif hasar sonucu oluşan serbest radikallerin oluşumunu engellediği ve hücrelerin canlılığının sürdürülmesine katkı sağladıkları belirtilmiştir (Bahadorani ve ark., 2008).

Drosophila melanogaster çok kısa sürede ve hızlı üreme oranına sahiptir ve memelilerin biyolojik, fizyolojik ve nörolojik özelliklerinin birçoğu ile benzerlik gösteren ökaryotik bir canlıdır (Pandey ve Nichols, 2011; Miguel-Aliaga ve ark., 2018). Genotoksosite (Mukhopadhyay ve ark., 2004), oksidatif stres (Soares ve ark., 2017), çeşitli hastalıkların moleküler mekanizmalarının aydınlatılması (Fariel ve ark., 2015; Kreipke ve ark., 2017), yaşlanma ve ömür uzunluğu çalışmalarında (Pletcher ve ark., 2002; Arica ve ark., 2017) sıklıkla kullanılan bir model organizmadır. Bu çalışma ile kadmiyuma maruz bırakılan *Drosophila melanogaster*'lerde vitamin E'nin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla kadmiyum ve vitamin E uygulamaları sonucu *Drosophila melanogaster*'lerin üreme performansları ve pupa sayıları belirlendi. Uygulamalar sonucu meydana gelen DNA hasarı ise Comet analizi ile değerlendirildi.

Materyal ve Metod

Drosophila melanogaster kültürleri, laboratuvar koşullarında 24±1°C sabit sıcaklığa ayarlı % 60-70 nemde soğutmalı inkübatörde yapıldı. Her bir grup için çiftleşmemiş 10 erkek 10 dişi ergin birey cam kültür şişelerinde kadmiyum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ve vitamin E (Evicap, Koçak Farma, Türkiye) içeren 50 ml besi yeri içinde 15 gün boyunca yetiştirildi. Besi yeri hazırlanmasında 104 g mısır unu, 94 g şeker, 9 g bira mayası, 6 g agar, 1020 ml distile su, 6 ml asit karışımı (7.83 ml ortofosforik asit + 8.36 ml propiyonik asit + 1081 ml distile su) kullanıldı. Çalışma için *Drosophila melanogaster* deney grupları toplamda 5 grup olacak şekilde; kontrol, etanol (% 1), kadmiyum (0.125 mM), vitamin E (25 mg/L; etanol içinde çözödürölen) ve kadmiyum ile vitamin E'nin birlikte uygulamasının yapıldığı gruplardan oluşturuldu. Çalışmada kullanılan kadmiyum miktarı Rizki ve ark. (2004) ve vitamin E miktarı

Koana ve ark (1997)'nin belirttikleri miktarlar esas alınarak yapıldı. Çalışmanın sonunda *Drosophila melanogaster*'lerin üreme performansı, pupa sayıları ve Comet analizi ile de DNA hasarı (Olive ve Banáth, 2006) belirlenerek arbitrary unit (AU) olarak ifade edildi. Çalışma sonunda *Drosophila melanogaster*'lerdeki üreme performansları için elde edilen veriler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Bununla birlikte DNA hasarı bulgularının değerlendirmesinde gruplar arası değerlendirme tek yönlü varyans analizi (SPSS 20) ile ve gruplar arası önemliliklerin değerlendirilmesinde ise Duncan post-hoc testi uygulandı. İstatistiksel açıdan $p<0.05$ değeri önemli kabul edildi.

Bulgular

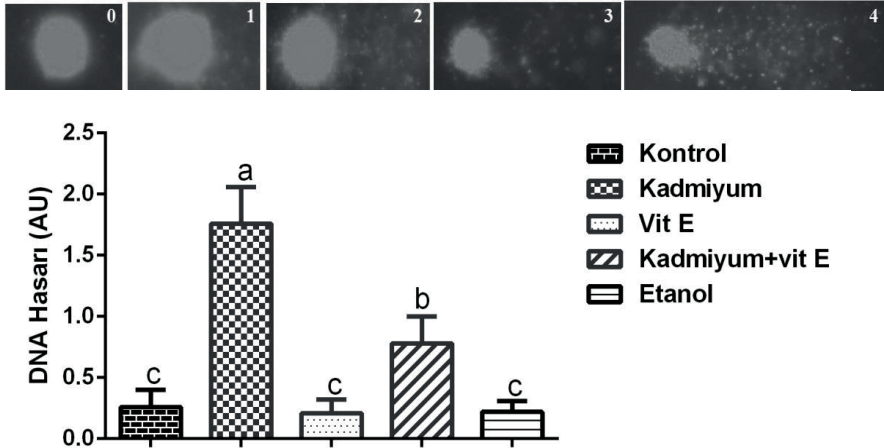
Çalışmada, kadmiyumun *Drosophila melanogaster*'lerde üreme performansını ve pupa gelişimini azalttığı belirlendi. Buna karşın kadmiyum ile birlikte vitamin E uygulanması sonucu *Drosophila melanogaster*'lerde kadmiyum verilen grupta karşılaştırıldığında üreme performansının ve pupa gelişiminin arttığı tespit edildi.

Drosophila melanogaster'lerde kadmiyum uygulanan grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DNA hasarının fazla olduğu belirlendi ($p<0.05$). Buna karşın vitamin E'nin kadmiyum ile indüklenen DNA hasarını azalttığı tespit edildi ($p<0.05$). Tek başına vitamin E ile etanol uygulaması yapılan gruplarda üreme performansı, pupa gelişimi ve DNA hasarının kontrol grubuna yakın olduğu ve verilen miktarda vitamin E ile etanol uygulamasının olumsuz bir etki göstermediği belirlendi.

Tablo 1. Kadmiyuma maruz bırakılan *Drosophila melanogaster*'lerde üreme performansı üzerine vitamin E'nin etkisi

Gruplar	Ergen					Pupa	
	Dişi	%	Erkek	%	Toplam	Gelişim	%
Kontrol	43	100	55	100	98	124	100
Kadmiyum	7	16.2	5	9.1	12	16	12.9
Vit E	43	100	53	96.3	96	122	98.3
Kadmiyum+Vit E	25	58.1	23	41.8	48	51	41.1
Etanol	42	97.6	52	94.5	94	111	89.5

Drosophila melanogaster'lerde kadmiyum ve vitamin E'nin tek başlarına ve beraber uygulamasının üreme performansı ve pupa gelişimi üzerine etkisi Tablo 1'de, bununla birlikte Comet analizi ile tespit edilen DNA hasarı bulguları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Kadmiyuma maruz bırakılan *Drosophila melanogaster*'lerde DNA hasarı üzerine vitamin E'nin etkisi. Farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0.05$)

Tartışma

Yapılan bazı araştırmalarda kadmiyumun *Drosophila melanogaster*'lerde toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Rizki ve ark., 2004; Guan ve ark., 2019). Rizki ve ark (2004), kadmiyumun farklı konsantrasyonlarını (0.25, 0.5, 0.75 ve 1 mM) *Drosophila melanogaster*'lerde kanat nokta testi ile genotoksisite açısından değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda kadmiyumun kanat hücrelerinde somatik mutasyonunda herhangi bir artışa neden olmadığını bununla birlikte larva gelişimleri ile larvadan erginliğe geçişin azaldığını belirtmişlerdir. *Drosophila melanogaster*lere 10 gün boyunca 52 mg/L verilen kadmiyumun DNA metilasyonu üzerinde yaptığı etkilerin değerlendirildiği bir diğer çalışmada, Toplam 71 diferansiyel olarak metillenmiş bölge ve 63 diferansiyel olarak metillenmiş gen tüm genom bisülfid sekans ile tanımlanmış, kadmiyum grubunda toplam 39 genin demetillendiği (Cdc42 ve Mek1 gibi genlerin), ancak 24'ünde artmış metilasyon görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca geliştirme, üreme ve enerji metabolizması ile ilişkili olan Baz, Act5C ve ss de dahil olmak üzere dijital ekspresyon kütüphanesinden diferansiyel olarak eksprese edilmiş genlerle örtüşen 37 diferansiyel olarak metillenmiş gen görüldüğü ifade edilmiştir (Guan ve ark.,

2019). Kadmiyumun belirtilen bu olumsuz etkileri dikkate alındığında, yapılan bu çalışmada da kadmiyumun *Drosophila melanogaster*'lerde üreme performansını ve pupa gelişimini olumsuz etkilediği ve DNA hasarı meydana getirdiği belirlenmiştir.

Yapılan birçok çalışmada antioksidan özelliğe sahip maddelerin, kimyasal ajanların *Drosophila melanogaster*'lerde oluşturduğu zararlı etkilere karşı koruyucu etki gösterdiği belirtilmiş; Jimenez-Del-Rio ve ark. (2010) herbisit bir ilaç olan parakuatin *Drosophila melanogaster*'lerde oluşturduğu bozulmuş hareket aktivitesine karşı 0.1-1 mM miktarlarda verilen gallik asit, ferulik asit, kafeik asit, kumarik asit, propil gallat, epikateşin, epigallokateşin ve epigallokateşin gallat polifenollerinin güçlü nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, antienflamatuar ve antibakteriyel özelliklere sahip (-)- α -bisabololun (5, 25 ve 250 μ mol/L) *Drosophila melanogaster*'lerde rotenon (500 μ mol/L) ile indüklenen motor fonksiyon kaybı ve oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir (Leite ve ark. 2018). Nagpal ve Abraham (2017) yaptıkları bir çalışmada antioksidan özellikleri bilinen β -karoten (% 0.25, 0.5, 1) ve çay polifenonun (% 1) *Drosophila melanogaster*'lerde 10 Gy γ -radyasyon ile oluşturulan cinsiyete bağlı resesif ölümcül mutasyon ve oksidatif strese karşı koruyucu etki oluşturduğunu belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da, antioksidan ve hücre koruyucu etkisi bilinen vitamin E'nin kadmiyumun DNA üzerindeki olumsuz etkilerini engellediği belirlendi.

Sonuç

Sonuç olarak kadmiyumun *Drosophila melanogaster*'lerin üreme performansını olumsuz etkilediği ve DNA hasarına yol açtığı tespit edildi. Buna karşın kadmiyum ile birlikte uygulanan vitamin E'nin *Drosophila melanogaster*'lerde üreme performansını arttırdığı ve DNA hasarını engellediği belirlendi.

Kaynaklar

1. Arica Ş. Ç., Demirci S., Özyılmaz A., Öz S., Arslantaş E. Bazı makroalglerin *Drosophila melanogaster*'in hayatta kalışı üzerine etkileri. EgeJFAS. 34(4): 451-454, 2017.
2. Bahadorani S., Bahadorani P., Phillips J. P., Hilliker A. J. The effects of vitamin supplementation on *Drosophila* life span under normoxia and under oxidative stress. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 63(1), 35-42, 2008.

3. Brenneisen P., Steinbrenner H., Sies H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular aspects of medicine*, 26(4-5), 256-267, 2005.
4. Foriel S., Willems P., Smeitink J., Schenck A., Beyrath J. Mitochondrial diseases: *Drosophila melanogaster* as a model to evaluate potential therapeutics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 63: 60-65, 2015.
5. Fourie F., Reinecke S. A., Reinecke A. J. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3), 361-368, 2007.
6. Guan D. L., Ding R. R., Hu X. Y., Yang X. R., Xu S. Q., Gu W., Zhang M. Cadmium-induced genome-wide DNA methylation changes in growth and oxidative metabolism in *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics*, 20(1), 356, 2019.
7. Jimenez-Del-Rio M., Guzman-Martinez C., Velez-Pardo C. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. *Neurochem. Res.* 35(2): 227-238, 2010.
8. Koana T., Okada M. O., Ikehata M., Nakagawa M. Increase in the mitotic recombination frequency in *Drosophila melanogaster* by magnetic field exposure and its suppression by vitamin E supplement. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 373(1), 55-60, 1997.
9. Kreipke R. E., Kwon Y. V., Shcherbata H. R., Ruohola-Baker H. *Drosophila melanogaster* as a model of muscle degeneration disorders. In: *Current topics in developmental biology*. Vol. 121. Academic Press. pp. 83-109, 2017.
10. Leite G. O., Ecker A., Seeger R. L., Krum B. N., Lugokenski T. H., Fachinetto R., Sudati J. H., Barbosa N. V., Wagner C. Protective effect of (-)- α -bisabolol on rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 96(4): 359-365, 2018.
11. Miguel-Aliaga I., Jasper H., Lemaitre B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 210(2): 357-396, 2018.
12. Mukhopadhyay I., Chowdhuri D. K., Bajpayee M., Dhawan A. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 19(2): 85-90, 2004.
13. Nagpal I., Abraham S. K. Protective effects of tea polyphenols and β -carotene against γ -radiation induced mutation and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Genes Environ.* 39: 24, 2017.
14. Olive P. L., Banáth J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1(1): 23-29, 2006.
15. Pandey U. B., Nichols C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63(2): 411-436, 2011.
16. Pesheva M. G., Chankova S. G., Avramova T., Milanov D. V., Genova G. K. Genotoxic effect of cadmium chloride in various test-systems. *Genetika*, 33(2), 183-188, 1997.
17. Pletcher S. D., Macdonald S. J., Marguerie R., Certa U., Stearns S. C., Goldstein D. B., Partridge L. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Current Biol.* 12(9): 712-723, 2002.
18. Rajak P., Dutta M., Khatun S., Mandi M., Roy S. Exploring hazards of acute exposure of Acephate in *Drosophila melanogaster* and search for l-ascorbic acid mediated defense in it. *Journal of hazardous materials*, 321, 690-702, 2017.

19. Rizki M., Kossatz E., Creus A., Marcos R. Genotoxicity modulation by cadmium treatment: Studies in the *Drosophila* wing spot test. *Environmental and molecular mutagenesis*, 43(3), 196-203, 2004.
20. Sarkar A., Bhagat J., Ingole, B. S. Rao, D. P. Markad, V. L. Genotoxicity of cadmium chloride in the marine gastropod *Nerita chamaeleon* using comet assay and alkaline unwinding assay. *Environmental toxicology*, 30(2), 177-187, 2015.
21. Soares J. J., Rodrigues D. T., Gonçalves M. B., Lemos M. C., Gallarreta M. S., Bianchini M. C., Denardin E. L. Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy. *Biomed. Pharmacother.* 95: 245-251, 2017.

Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Alabalık Örneklerinin Florfenikol Kalıntısı Yönünden Taranması

Cansu Öncü ALGAN¹ Sinem PEHLİVAN¹ Yağmur TURGUT¹ Emine BAYDAN¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ziraat Mahallesi, Şehit Ömer Halisdemir Bulvarı, 06110 Altındağ/Ankara

Özet: Balık yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıklar önemli ekonomik kayıplara sebep olabilmektedir. Bakteriyel hastalıklarla mücadelede çeşitli antibiyotikler etkin olabilmekle birlikte, yetiştiricilikte özellikle AB ülkelerinde izinli olan antibiyotikler kullanılabilmektedir. Bu kapsamda Florfenikol (FF) balık hastalıklarıyla mücadelede en yaygın ve etkin şekilde kullanılan, az sayıdaki izinli antibiyotiklerden biridir. Diğer pek çok veteriner ilaçta olduğu gibi gıda değeri olan hayvanlarda antibiyotikler kullanılırken ürün (balık) hasat edilmeden önce ilaç kalıntı arınma süresinin (İKAS) muhakkak uygulanması gerekir. Bu süre kullanılan ilacın, hayvanın tüketilebilir kısımlarındaki kalıntı miktarının kabul edilebilir seviyeye inmesi için geçmesi gereken süredir. Bu süreye uyulmadığında hayvansal ürünlerde ilaç kalıntılarının rastlanabilmektedir. Bu durum ise halk sağlığı yönünden pek çok sakıncalı duruma sebep olmaktadır. Yapılan bu araştırmada Ankara piyasasında, 2019 Haziran-Temmuz döneminde satışa sunulan alabalık kas dokularının valide HPLC yöntemle FF yönünden taranması amaçlanmıştır. Bu amaçla belirtilen dönemlerde toplanan ve menşeleri kaydedilen toplam 20 alabalık kas dokusu analiz edilmiştir. Alabalık kas dokusunda FF analizi için metot validasyonunda LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.17µg/g ve 0.57µg/g, geri kazanım ise üç farklı konsantrasyon (0.75, 1.5 ve 3 ppm; her bir konsantrasyon için n=6) için sırasıyla ort %75.28, 81.54 ve 92.63 olarak belirlenmiştir. Analizler sonucunda hiçbir örnekte LOD üzeri FF değeri belirlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Alabalık, Ankara, Florfenikol, Kalıntı, Kas.

Screening of Trout Samples Sold in Ankara Markets in Terms of Florfenicol

Abstract: Bacterial diseases in fish farming can cause significant economic losses. While various antibiotics can be effective in the fight against bacterial diseases, approved antibiotics can be used for aquaculture in European Union countries. In this context, Florfenicol (FF) which is one of the few allowed antibiotics, has a widespread spectrum and is effective against fish diseases. As with the most veterinary medicine drugs, while administering antibiotics to food value animals, residue clearance time protocols must be followed before harvesting fish product. That definition referred to the time needed for the used drug quantity to pass an acceptable level in the consumable parts of the animal. Failure to completion of this period may result in drug residues in animal products. If this period is not completed, drug residues can be found in animal products and it might be caused to unintentional effects in terms of public health. In this study, it was aimed to determine the Florfenicol (FF) value in trout muscle tissues that were sold in Ankara market between June-July 2019 period, with a validated HPLC method. For this purpose, a total of 20 trout muscle tissues that collected in the indicated periods and the origins were recorded and analyzed. In the method validation for Florfenicol (FF) analysis in trout muscle tissue, LOD and LOQ values were determined respectively as 0.17 µg/g and 0.57 µg/g, the recovery values were determined respectively as 75.28, 81.54 and 92.63 for three different concentrations (0.75, 1.5 and 3 ppm; n = 6 for each concentration). As a result of the analysis, there wasn't determine FF value over the LOD in any sample.

Keywords: Ankara, Florfenicol, Muscle, Residue, Trout.

Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliği, nüfus artışı ile birlikte tüm Dünya'da ve Türkiye'de giderek artmaktadır. Ülkemiz, coğrafi yapısı ve iklim koşulları göz önünde bulundurulduğunda, deniz ve iç sularımızda çeşitli su ürünlerinin yetiştirilmesine ve geliştirilmesine imkân sağlamaktadır. Bu ürünler arasından besinlerini kara hayvanlarına göre daha çabuk ete çevirme özellikleri, yağ asiti bakımından zengin ve lezzetli olmalarından dolayı alabalık üretimi ülkemizde ilk sıralarda yer almaktadır (Akbulut, 2001; Yeltekin 2012). Kültür

ortamında yetiştirilen balıklar; sularda meydana gelen kirlilik, yüksek yoğunlukta yetiştirme, su kalitesinde azalma, beslenme yetersizliği gibi nedenler ile stres altında olurlar ve bu da balıklarda hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olur. Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan bu hastalıklarda antibiyotik kullanımını gerekli kılmaktadır. Veteriner hekimlikte çeşitli enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve Kloramfenikol analogu olan florfenikol; geniş etki spektrumuna ve bakteriyostatik etkiye sahip olması, istenmeyen yan etkilerinin az olması, dirençli bakterilere karşı etkili olması ve dokulara iyi geçebilmesi sebebi ile güvenilir bir şekilde kullanılabilen bir antibiyotiktir (Keyes ve ark., 2000; Akşit ve ark., 2008; Ansari ve ark., 2014). Kloramfenikol ve thiamphenicol bileşikler, insanlardaki aplastik anemi riski ve yüksek bakteriyel direnç gelişimi nedeniyle yasaklanmıştır (Granja ve ark., 2012). Kültür balıkçılığında, kalıntı süresine uyulmadan bilinçsiz antibiyotik uygulanması, dokularda uygunsuz şekilde yüksek kalıntı seviyelerine yol açabilir. Buna bağlı olarak çevrede ilaca dirençli patojenik mikroorganizmaların ortaya çıkması ve tüketicilerde alerjik reaksiyonlar, toksik etkilerin ortaya çıkması nedeniyle halk sağlığı için potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır (Barani ve ark., 2015).

Bu çalışmamızda Haziran-Temmuz 2019 döneminde Ankara piyasasında satışa sunulan alabalık örneklerinin florfenikol yönünden taranması amaçlanmıştır.

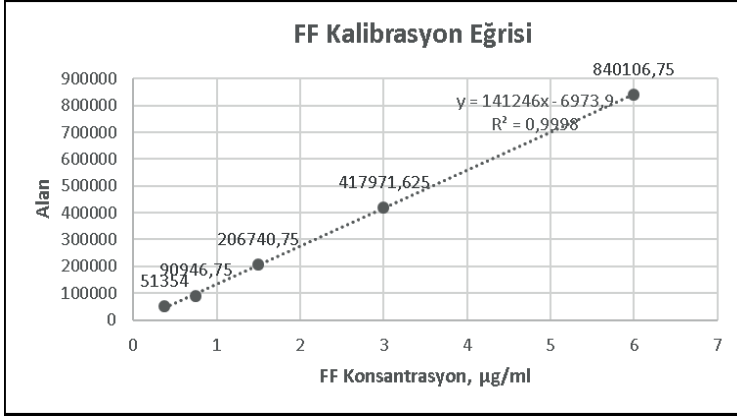
Materyal ve Metot

Araştırmada Haziran-Temmuz 2019 döneminde Ankara piyasasında satışa sunulan, fakat yetiştirilme yerleri Türkiye'nin farklı bölgeleri olan toplam 20 alabalık kas örneği kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları için ise Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü-Trabzon (SUMAE)'dan temin edilen ve ilaç kullanılmayan alabalık kas örnekleri kullanılmıştır. Örneklerde FF analizi için metot validasyon çalışması EuroChem'e (2014) göre yapıldı. Metot validasyonu için özgüllük, doğrusalılık, geri kazanım, hassasiyet (% $RSD_{r_{havuz}}$ olarak tekrarlanabilirlik, % $RSD_{R_{havuz}}$ olarak tekrar üretilebilirlik), korelasyon katsayısı (r), tespit limiti (LOD), miktar limiti (LOQ) parametreleri değerlendirildi. Bu amaçla 6 farklı kör örnek ve 3 farklı FF konsantrasyonunda (0.75, 1.5, 3 µg/ml) çalışılarak özgüllük, doğrusalılık, doğruluk (% geri kazanım), kesinlik (% $RSD_{r_{havuz}}$ olarak tekrarlanabilirlik, % $RSD_{R_{havuz}}$ olarak tekrar üretilebilirlik), korelasyon katsayısı (r) ile 6 farklı kör ve tek konsantrasyon (0.75

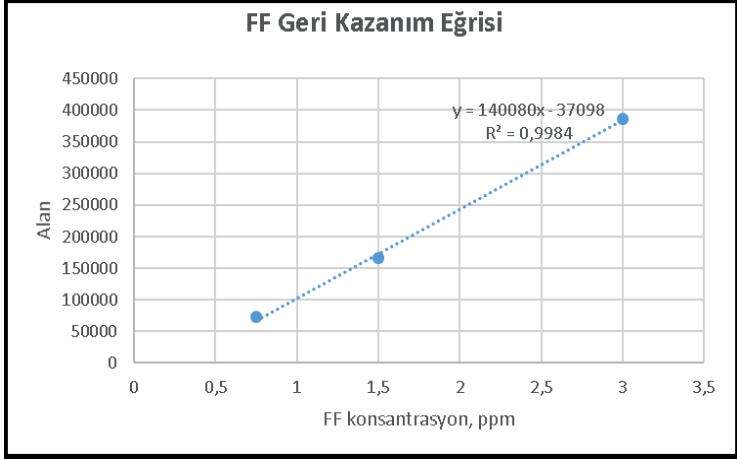
$\mu\text{g/ml}$) üzerinden LOD, LOQ yönünden değerlendirildi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $\text{LOD} = 3 \cdot s_0$ (s_0 = Sonuçların standart sapması) ve $\text{LOQ} = 10 \cdot s_0$ (s_0 = Sonuçların standart sapması) formülleri kullanılarak belirlendi. Kalibrasyon eğrisi, metanol + su (3:7) karışımında 100 $\mu\text{g/ml}$ ve olacak şekilde hazırlanan ana ve %0.1 asetik asitle hazırlanan 30 $\mu\text{g/ml}$ ara stok FF standart çözeltisi kullanılarak, bundan %0.1 asetik asit yardımıyla hazırlanan bir dizi ileri seyreltme (0, 0.375 $\mu\text{g/ml}$, 0.75 $\mu\text{g/ml}$, 1.5 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$) kullanılarak elde edilen ortalama değerlerden ($n=8$, her konsantrasyon için) hazırlandı. Sonuçların MRL yönünden değerlendirilmesinde AB Komisyon Tüzüğü (No 37/2010) esas alındı. Kas örneklerinden FF ekstraksiyonu için Anadon ve ark. (2008), Van de Rie ve ark. (2003), Rodrigo ve ark. (2012), Yao Feng ve ark. (2016), Gao ve ark (2016) metotlarından yararlanıldı. Analizlerde kullanılan solventlerin hepsi HPLC saflıkta idi. Analiz için 1 g balık kas dokusu kıyılarak üzerine 1 ml %0.1 ml asetik asit, 4 ml 0.1 M PBS (pH: 7) ve 4 ml etil asetat eklenerek 10 dk vortekste karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 10 dk 5000 rpm’de santrifüj edildi. Fazlar ayrıldıktan sonra üstteki etil asetat kısmından 3 ml temiz bir tüpe aktarıldı. İlk tüpteki örnek üzerine tekrar 3 ml etil asetat eklenerek başlangıçtaki işlemler tekrar edildi. Fazlar ayrıldıktan sonra üstteki fazdan alınan 3ml etil asetat temiz tüpteki 3 ml etil asetat üzerine ilave edildi (toplam 6 ml etil asetat). Toplanan etil asetat önceden sırasıyla 3’er ml etil asetat, metanol ve deiyonize su ile şartlandırılan ve ardından metanol:su karışımı (1:3, ml) ile yıkanan C18 kartuştan geçirildi. Ardından kartuştan 4 ml etil asetat geçirilerek analitin elüsyonu yapıldı. Elüe edilen etil asetat fazı 40 C azot evaporatörde uçuruldu. Kalıntı üzerine 1 ml mobil faz eklendi. Üzerine 2 ml hekzan eklenerek ılımlı şekilde çalkalandı. Fazlar ayrıldıktan sonra altta kalan fazdan (hekzan olmayan) enjektör ile çekilerek 0.45 μm ’lik cronus filtreden geçirilerek viyale kondu ve HPLC’de okundu (Dedektör: Photo Diode Array Detector, Akış: Isocratic flow, Mobil faz: 725 ml ultra saf su, 265 ml asetonitril, 4 ml 10% asetik asit, İnjesiyon hacmi: 20 μl , Kolon sıcaklığı: 25°C, C18 Kolon: Phenomenex Hper Clone ODS (150 mm $\times$ 4.60 mm $\times$ 5 μm), Dalga boyu: 223 nm, Akış hızı: 0.8 ml/min, Süre: 30 min.).

Bulgular

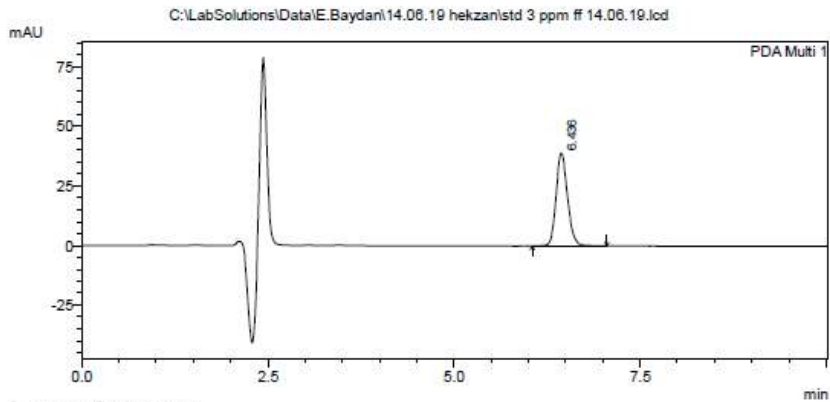
Çalışmanın validasyonuna ilişkin sonuçlar sırasıyla Şekil1, 2, 3, 4, 5 ile Tablo 1’de verilmiştir.



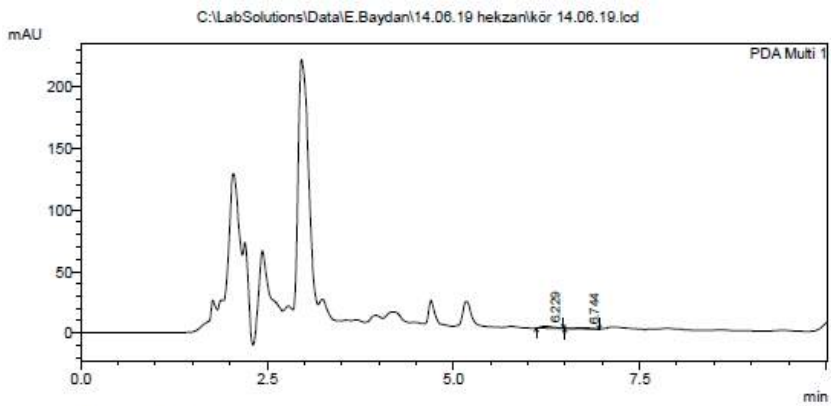
Şekil 1. FF'nin farklı konsantrasyonları ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi (n=8, her konsantrasyon için).



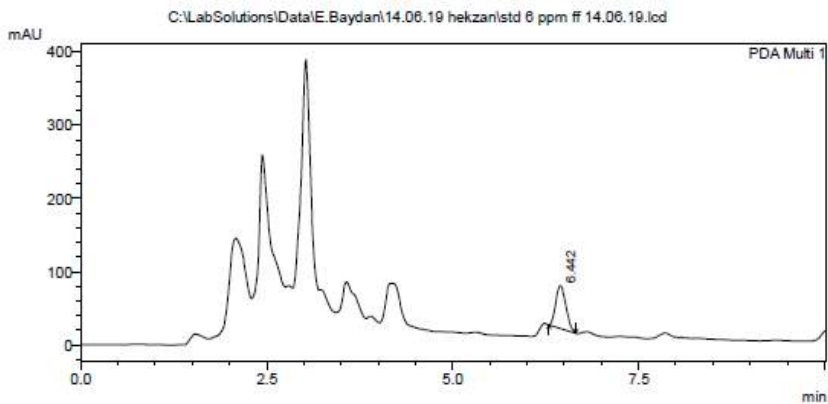
Şekil 2. Kör balık dokusuna 0.75, 1.5 ve 3 µg/g (n=6 her konsantrasyon için) konsantrasyonlarda FF ilavesi ile elde edilen geri kazanım eğrisi



Şekil 3. Standart FF (3µg/ml) kromatogramı.



Şekil 4. Kör alabalık dokusu kromatogramı.



Şekil 5. Kör alabalık dokusuna 6µg/g konsantrasyonda ilave edilen FF'ye ait kromatogram.

Tablo 1. Alabalık kas dokusundan FF analizi için metodun doğruluk (% geri kazanım), kesinlik (% RSD_r havuz olarak tekrarlanabilirlik, % RSD_R havuz olarak tekrar üretilebilirlik), LOD ve LOQ sonuçları.

Katılan FF (µg/g)	Bulunan FF (µg/g), n= 6, her kons. için) (Ort.±SD)	% Geri Kazanım	RSD _r havuz	%RSD _R havuz	Korelasyon katsayısı (r)	LOD µg/g	LOQ µg/g
			17.7	13.8	0.99	0.17	0.57
0.75	0.56 ± 0.057	75.28					
1.5	1.22 ± 0.203	81.54					
3	2.77 ± 0.651	92.63					
		Ort. 82.9					

2019 Haziran-Temmuz döneminde farklı satış yerlerinden toplanan 20 balık örneğinde LOD değeri üzerinde herhangi bir kalıntıya rastlanamamıştır.

Tartışma ve Sonuç

HPLC - DAD cihazında çalışılan yöntemin validasyon sonuçları, analiz metodunun gökkuşağı alabalık kasında FF ölçümü için başarılı olduğunu ve elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin AB'nin belirlediği MRL değerlerinden daha düşük olması, örnek sonuçlarının değerlendirilmesinde yeterli olacağını göstermiştir (Şekil 1, 2,3, 4, 5 ve Tablo 1). AB düzenlemesine göre (Commission Regulation EU No 37/2010), FF'nin MRL düzeyinin balığın yenilebilir kısımlarında (kas+deri) FF+FFA düzeyinin 1 ppm'in üzerinde olmaması ve ilaç kalıntı arınma süresinin (İKAS) bunun üzerinden belirlenmesi zorunluluğu vardır. Ancak, bazı ülkelerde balık ve diğer hayvan türleri için İKAS değerleri sadece FF üzerinden ve farklı düzeyler esas alınarak yapılmaktadır (USDA Foreign Agricultural Service, 2011; Chae ve ark., 2018; Government of Canada, 2018). Buna göre Kore'de balık için FF 0.2 ppm, Kanada'da balık kası için FF+FFA olarak 0.8 ppm (USDA Foreign Agricultural Service, 2011; Government of Canada, 2018) esas alınmaktadır. Türleri göre, özellikle de balık türleri arasında ilaçların biyotransformasyonu bakımından önemli farklar bulunmaktadır. FF hayvanlar tarafından alındıktan sonra ana metabolit olan FFA'ya ve bunun yanı sıra oksamik asit, FF alkol ve monokloridflorfenikol'e, daha sonra ise tüm metabolitlerde FFA'ya dönüşmektedir. Bu nedenle FFA belirteç metabolit olarak alınmaktadır (EMEA, 2000; Li ve ark., 2006). Ancak, pisi balığında (*Paralichthysolivaceus*) olduğu gibi bazı balık türlerinde FFA'nın şekillenmediği de

vurgulanmaktadır (Lim ve ark., 2010; Granja ve ark., 2012). FF ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte, genel olarak FF'nin kas ve böbrekte FFA'ya göre daha yüksek olduğu, karaciğerde ise FFA düzeyinin daha yüksek olduğu ve kas dokusunda uygulamadan sonraki örnekleme günlerine bağlı olarak yaklaşık FFA:FF oranının 1:5 –1:3 şeklinde olduğu görülmektedir (Li ve ark., 2006). Ayrıca, antibakteriyel etkinlik yönünden FF'ye göre FFA 90 kez daha az aktif, florfenikol alkol 30 kez daha az aktif, FF-oksamik ise aktif olmayan olarak belirlenmiştir (EMEA, 2000). Bu durum FF üzerinden yapılan çalışmalarda kesinlik olmasa da toplam kalıntı düzeyi için bir kestirme yapılmasını sağlayabilecektir. Belirtilen nedenle FF+FFA üzerinden yapılan değerlendirmelerin yanı sıra FF üzerinden yapılan değerlendirmelere de rastlanmaktadır (Gökmen ve ark., 2014; Fadaeifard ve ark., 2015; Rezk ve ark., 2015; Mostafa ve ark., 2017). Gökmen ve ark. (2014) tarafından yapılan araştırmada Elazığ'da beş farklı alabalık işletmesinden temin edilen hasat öncesi ve sonrası 25'er adet (toplam 50) alabalık örneğinin FF yönünden HPLC metotla taranması sonucunda hasat öncesi dönemindeki alabalıkların deri dokusunun %44'ünde, kas dokusunun %32'sinde ve karaciğer dokusunun %16'sında; hasat dönemindeki alabalıkların ise deri dokusunun %40'ında, kas dokusunun %36'sında ve karaciğer dokusunun %32'sinde FF belirlenmiş ve özellikle hasat öncesi dönemdeki düzeylerin MRL değerinin üzerinde olduğu belirlenmiştir. İran'da rastgele seçilerek toplanan 40 alabalık örneğinin FF yönünden taranması sonucunda 14'ünde FF bulunduğu, bunların 5'inde düzeyin MRL (1 mg/kg^{-1}) düzeyinin üzerinde olduğu belirlenmiştir (Ansari ve ark., 2014). İran'da yapılan başka bir çalışmada ise İran'ın 3 farklı bölgesinden 2011 yılı ilkbahar ve yaz döneminde toplanan 45 kültür alabalığı kas ve karaciğer dokusunun FF yönünden ELISA ile yapılan taramasında en yüksek ve en düşük düzeyler sırasıyla karaciğer için $31.42 \pm 53.52 \text{ ng/g}$ ($>150 \text{ g balık}$) ve $10.35 \pm 2.33 \text{ ng/g}$ ($<50 \text{ g balık}$) ve kas için $48.84 \pm 50.36 \text{ ng/g}$ ($50-150 \text{ g balık}$) ve $18.20 \pm 15.41 \text{ ng/g}$ ($> 150 \text{ g balık}$) olarak bulunmuştur (Fadaeifard ve ark., 2015).

Balık yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımını zorunlu kılan hastalıkların patlak verdiği sonbahar-kış dönemleri ve yavru dönemlerinde antibiyotik kalıntılarına rastlama olasılığı daha fazla gözükmektedir. Yapılan bu çalışmada toplanan 20 örneğin hiçbirinde LOD üzeri değerin görülmemesi muhtemelen örneklerin toplandığı Haziran-Temmuz dönemiyle (hastalıkların nispeten daha düşük olduğu) ilgili olduğu düşünülmektedir. Normal koşullarda

Türkiye’de hayvansal ürünler kalıntıları yönünden T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından periyodik aralıklarla taranmaktadır. Ancak, son yıllarda balık yetiştiriciliğinde FF gibi bazı antibiyotiklerin kullanımı giderek yaygın bir hal almıştır. Bu durum balık yetiştiriciliğinde kontrollerin daha sıkı yapılması zorunluluğunu da gerektirmektedir. Ancak, Türkiye’de hayvan yetiştiriciliğinin pek çok alanında gerek yetiştirici, gerekse tüketici yönüyle verilen eğitim programları ve sıkı kontroller sayesinde bu konuda epey aşama kaydedildiği de gözlenmektedir. Daha sağlıklı gelecek nesiller yetiştirmek ve kalıntısız ürün tüketimini sağlamak için üniversite ve devlet kurumları benzer çalışmalarla omuz omuza vererek bu alanda daha da mükemmelin yakalanması çalışmalıdır.

Kaynaklar

- 1- AKBULUT, Süleyman, and Akif KETEN. "Düzce Yöresindeki Alabalık Yetiştiriciliği Üzerine Bir Çalışma." Türkiye Ormancılık Dergisi 2.1 (2001): 49-60.
- 2- AKŞİT, Dilek, and KUM' Cavit. "Gökkuşağı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda Sık Görülen Patojen Mikroorganizmaların Tespiti ve Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi." Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 19.1 (2008): 1-7.
- 3- Anadón, A., Martínez, M. A., Martínez, M., Ríos, A., Caballero, V., Ares, I., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2008). Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol-amine in chickens. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 56, 11049– 11056.
- 4- Ansari, M.,Raissy, M. 2014. Determination of florfenicol residue in rainbow trout muscles by HPLC Chaharmahalva Bakhtiari Province, Iran. Comparative Clinical Pathology. 23: 61-62
- 5 -Barani, Afshin, and Aziz A. Fallah. "Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, fluoroquinolones and florfenicol in farmed rainbow trout in Iran." Food and agricultura limmunology 26.3 (2015): 420-429.
- 6- Chae, W-S.,Yoo, C-Y., Tutkun, L., Kim, S., Lee, H-J. 2018. Determination of florfenicol residues in swine tissues using high-performance liquid chromatography with ultraviolet photometric detector. J PrevVetMed. 42: 171-176
- 7- EMEA. Committee for veterinary medicinal products florfenicol, summary report (5) https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/florfenicol-extension-fish-summary-report-5-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf, Erişim: 23.08.2019
- 8- EURACHEM (2014). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Available at <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv> accessed: December 22, 2018.
- 9- Fadaeifard, F., Rahimi, E., Raissy, M., Faghani, M. 2015. Determination of Florfenicol Residues in the Muscle and Liver of Cultured Rainbow Trout in Iran by ELISA. Journal of Chemical Health Risks. 5: 267–272
- 10- Feng, Yao, et al. "A simple and economic method for simultaneous determination of 11 antibiotics in manure by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography." Journal of soils and sediments 16.9 (2016): 2242-2251.

- 11- Granja, R. H. M. M., de Lima, A. C., Patel, R. K., Salerno, A. G., & Wanschel, A. C. B. A. (2012). Monitoring of florfenicol residues in fish muscle by HPLC-UV with confirmation of suspect results by LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*, 4, 125– 129
- 12- Gao, J.,Cui Y, Tao, Y., Huang, L., Peng, D., Xie, S., Wang, X., Liu, Z., Chen, D., Yuan, Z.(2016). Multi class method for the quantification of 92 veterinary antimicrobial drugs in live stock excreta, waste water, and surface water by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*39: 4086–4095
- 13- Government of Canada.2018. List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue-limits-mrls-veterinary-drugs-foods.html>, Erişim tarihi: 20.08.2019
- 14- Gökmen, S., Dağoğlu, G., Baykalır, B.G. 2014. Alabalıkların Yenilebilir Doku Örneklerinde Florfenikol Kalıntılarının Araştırılması. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*28: 05 – 08.
- 15- Granja, R., Lima, A.C., Patel, R.K., Salerno, A.G., Wanschel, A.C.B.A. 2012. Monitoring of florfenicol residues in fish muscle by HPLC-UV with confirmation of suspect results by LC-MS/MS. *Drug testing and analysis* 4: 125-129.
- 16- Keyes, Kathleen, et al. "Detection of Florfenicol Resistance Genes in Escherichia coli Isolated from Sick Chickens." *Anti microbial agents and chemotherapy* 44.2 (2000): 421-424.
- 17- Li, J., Ding, S., Zhang, S., Li, C., Li, X., Liu, Z., Liu, J., Sjen, J. 2006. Residue depletion of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in Swine tissues after intramuscular administration. *J AgricFoodChem.* 54:9614-9
- 18- Lim, J. H., Kim, M. S., Hwang, Y. H., Song, I. B., Park, B. K., & Yun, H. I. (2010). Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. *Aquaculture*,307, 71– 74.
- 19- Mostafa, A.E.,Abdel Salam, R.A., Hadad, G.M., Eissa, I.A. 2017. Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and water samples by HPLC/UV and LC-MS/MS. *RSC Adv.*7: 46171-46182
- 20- Rezk, M.R.,Riad, S.M., Khattab, F.I., Marzouk, H.M. 2015. Multi-residues determination of antimicrobials in fish tissues by HPLC–ESI-MS/MS method. *Journal of Chromatography B*, 978–979: 103–110
- 21- USDA Foreign Agricultural Service (2011). Global Agricultural Information Network, GAIN Report. Korea's Veterinary Drug MRL Situation. https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Korea's%20Veterinary%20Drug%20MRL%20Situation_Seoul_Korea%20-%20Republic%20of_11-16-2011.pdf. Erişim tarihi: 20.08.2019.
- 22- Yeltekin, Aslı Çilingir. "Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) Yağ Asiti ve Önemi." *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 17.2 (2012): 118-123.
- 23- Van de Riet, J. M., Potter, R. A., Christie-Fougere, M., & Burns, B. G. (2003). Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*,86, 510– 514.

Besin Zincirinde Mikroplastikler

İlker ŞİMŞEK¹

¹Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Çevre Sağlığı Bölümü, Çankırı, Türkiye

Özet: Plastik malzemeler, hafif, ucuz, dayanıklı ve kolay işlenebilir olmalarından dolayı, yaygın olarak kullanılmasına rağmen, günümüzde büyük bir çevre sorunu haline gelmiştir. Mikroplastik (MP) terimi, 5 mm'den küçük olan tüm plastik malzemeleri tanımlarken, birincil ve ikincil MP'ler şeklinde kategorize edilmektedirler. Birincil MP'ler, üretilmiş pelet uçları ve mikro boncukları içerir. İkincil MP'ler ise büyük plastik atıkların ve sentetik tekstillerin mekanik veya kimyasal parçalanması ile oluşmaktadır. MP'ler, evsel, endüstriyel atıklar, trafik kirliliği, kullanılmış büyük plastiklerin çevrede parçalanması ve kanalizasyon-atıksu arıtma tesisleri gibi çeşitli antropojenik aktivitelerden kaynaklanmaktadır. Doğal koşullar altında, UV radyasyonu, termal oksidasyon, fiziksel aşınma ve biyolojik bozulma etkileri nedeniyle bozulmaktadır. Küçük boyutları nedeniyle MP'ler, zooplankton, filtre beslenme yapan solucanlar, balıklar ve kabuklular gibi çok çeşitli deniz canlıları tarafından yiyecek sanılarak yutulmaktadır. Toplamda, 267 farklı tür hayvanın, plastik kirliliğinden zarar gördükleri bildirilmektedir. Bu zararlarının yanısıra yapılarındaki monomerlerine, katkı malzemelerine adsorbe edilmiş çevre kirleticilerinin sızması nedeniyle, canlılarda kimyasal toksisite meydana gelebilmektedir. MP'lere kronik maruziyet, zamanla oluşabilecek birikim etkisinden dolayı daha büyük endişe kaynağı olarak öngörülmektedir. Organizmalarda MP'lerin toksisitesi ve birikiminin insanlar içinde potansiyel sağlık riskleri vardır. Bu nedenle MP kirliliği açısından plastik içeren atıkların geri dönüşüme kazandırılması ve üretim ve kullanıma kısıtlama getirilmesi önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Besin zinciri, Kimyasal toksisite, Mikroplastik.

Microplastics in The Food Chain

Abstract: Since it is a light, inexpensive, durable and easily processable material, plastics have been widely used, but today have become a major environmental problem. Microplastic (MP) is a term used for plastics smaller than 5 mm. They are categorized as primary MP's and secondary MP's. Primary MP's include produced pellet tips and microbeads. Secondary MP's are formed by mechanical or chemical breakdown of large plastic residues and synthetic textiles. MP's are caused by various anthropogenic activities such as domestic, industrial, traffic, disintegration of used large plastics and sewage-wastewater treatment plants. Under natural conditions, MP's deteriorate due to their effects of UV radiation, thermal oxidation, mechanical wear and biological degradation. Due to their small size, MP's, are swallowed by a wide variety of marine organisms such as zooplankton, filter-feeding worms, fish and crustaceans thought as food. It is known that at least 267 different species, including turtles, seals, seahorses, fish and whales, are get harmed from the plastic pollution by swallowing and entanglement. In addition to these damages, chemical toxicity may occur in the organisms swallowed by the leakage of environmental pollutants adsorbed to their monomers and additives. Chronic exposure to MP's is predicted to be of greater concern due to the accumulation effect that may occur over time. Toxicity and accumulation of MP's in organisms have potential health risks for humans. Therefore, in terms of MP pollution, it is important to recycle plastic containing wastes and to restrict production and use.

Keywords: *Chemical toxicity, Food chain, Microplastic.*

Giriş

Plastikler günümüzde hafif, esnek, kolay işlenebilen ve ekonomik olarak ucuz bir madde olduğundan dolayı çok yaygın kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan plastikler; polietilentereftalat (PET), poliamid (nylon), polyester, polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS) ve polivinil klorür (PVC) dür. Kullanım sıklığına göre plastik tiplerinin % 40 PE, % 25 PS, % 19 PP olduğu belirtilmiştir (Ceylan, 2017). Yaklaşık olarak her yıl 5-13 milyon ton plastik malzemenin okyanusa atıldığı, bunun 0,3 milyon ton/yıl kadarının ise yüzeye asılı

kaldığı belirtilmiştir. Buna göre plastiklerin önemli bir kısmının deniz organizmaları tarafından asimile edildiği veya sedimentte biriktiği değerlendirilmektedir (Yao ve ark., 2019). Mikroplastikler (MP), National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) tarafından (Hanvey ve ark., 2017) alt sınır olmadan üst sınırı 5 mm olan sentetik polimerler olarak tanımlanırlar (Tablo-1). Birincil MP'ler ve ikincil MP'ler olarak kategorize edilirler (Li ve ark., 2018). Birincil MP'ler, üretilmiş pelet uçları ve mikro boncukları içerir (aşındırıcı parçacıklar, kişisel bakım ürünlerine dahil edilmiştir) ya da ikincil MP'ler büyük plastik artıkların ve sentetik tekstillerin (mikro fiber) mekanik veya kimyasal parçalanması ile oluşur (Hanvey ve ark., 2017). Büyük parçalar, MP'lere dönüştükçe, parça sayısı artmakta ve çevre kirliliği riski artmaktadır. Buna ek olarak, partikül boyutları küçüldükçe de, canlılar tarafından kolaylıkla besinle karıştırılırlar ve yutabilecek organizma sayısı artar (Shim ve Thomposon, 2015). MP'lerin boyut, şekil, yoğunluk, renk ve kimyasal bileşim gibi fiziko-kimyasal özellikleri, bunların çevrede taşınması ve biyoyararlanımlarını büyük ölçüde etkilemektedir (Santos ve Duarte, 2015). Tipik olarak, yüksek yoğunluklu parçacıklar sucul ortamlarda batar ve sediment içinde birikir. Düşük yoğunluklu parçacıklar ise deniz yüzeyinde yüzerek, biyolojik kirlenme, türbülans ve tatlı su kaynaklarına transfere yol açarlar (Cauwenberghe ve Janssen, 2014). MP'ler giderek artan bir ivmeyle; hava, kara, kıyı ve sularda tehlike oluşturmaya devam etmektedir (Aslan, 2018).

Tablo 1. Önerilen Terminoloji Özeti (Hanvey ve ark., 2017).

Büyüklik aralığı	Önerilen Terminoloji
>20 cm	Makroplastik
5-20 cm	Mezoplastik
1-5 mm	Büyük mikroplastik
1-1000 nm	Küçük mikroplastik
<1000 nm	Nano plastik

Mikroplastik Kaynakları

MP çöplerin kaynakları; ev, endüstri ve taşımacılık alanlarında kullanılmış büyük plastiklerin, çevrede parçalanmasıyla oluşan partiküller ve kanalizasyon-atıksu arıtma tesisleri gibi çeşitli antropojenik aktivitelerdir (Yurtsever, 2015). MP'ler temelde; karasal (ör. çöp, mikro boncuklar) ve deniz kökenli (ör. balık ağları, şamandıralar) maddelerden köken alırlar

(Rezania ve ark., 2018). Mikro boncuklar, atık su vasıtasıyla su kaynaklarına girerken, tarımsal faaliyetlerde kullanılan bir aracın aşınmasıyla ufalanan plastikler toprakta birikmektedir (Aslan, 2018). MP'lerin polimerik bileşimin tanımlanması genellikle Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilir. Diğer analitik teknikler, piroliz gazı kromatografi-kütle spektrometre (Pyr-GC-MS), Raman spektroskopisi, Taramalı elektron mikroskobu-enerji dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi (SEM-EDS) ve Çevresel tarama elektron mikroskobu-enerji dağılım X-ışını spektroskopisi (ESEM-EDS)'de mikroplastik polimerleri tanımlamak için kullanılmaktadır (Santos ve Duarte, 2015).

Mikroplastiklerin Parçalanmaları

Tek bir plastik malzeme parçalanarak milyonlarca MP parçacıklarına dönüşebilmektedir (Yurtsever, 2015). MP'leri parçalara ayıran faktörler antropojenik olabileceği gibi, hava, rüzgâr, güneş, UV ışınları, su gibi doğal faktörler de olabilir (Aslan, 2018). Doğal koşullar altında MP'ler, UV radyasyonu, termal oksidasyon, fiziksel aşınma ve biyolojik bozulma etkileri nedeniyle bozulmaktadır. Bu işlemler sırasında MP'lerin polimer yapılarında zincir bölünmesi, orantısızlık ve oksijen içeren fonksiyonel gruplarda artış gibi kimyasal değişiklikler olduğu, ancak bu işlemlerin çok yavaş gerçekleştiği belirtilmiştir (Zhu ve ark., 2019).

Sucul Ekosisteme Girişleri

Deniz ekosistemlerinde MP kirliliği; sedimentler, açık sular ve organizmalarda rapor edilmiştir (Rezania ve ark., 2018). MP'lerin rüzgar, hava ve akarsular vasıtasıyla taşınarak çevreye dağıldığı, su kaynaklarında ise rüzgar, kıyı akıntıları, dalga hareketleri, mikroorganizmalar, canlılar ve gelgit olayları gibi çeşitli faktörlerle taşınımının gerçekleştiği bildirilmektedir (Yurtsever, 2018). Ayrıca, plastikler çok yavaş bir şekilde bozulduğundan çeşitli organizmalar için yüzen substratlar olarak da hareket ederler ve böylece yabancı türlerin uzun menzilli taşınmasına katkıda bulunarak yerel biyoçeşitlilik için ek bir risk teşkil edebilmektedirler (Avio ve ark., 2015).

Besin Zincirinde Mikroplastikler

Küçük boyutları nedeniyle MP'ler, zooplankton, filtre beslenme yapan solucanlar, balıklar ve kabuklular gibi çok çeşitli deniz canlıları tarafından yiyecek sanılarak yutulmaktadır (Teng ve

ark., 2019). MP'ler, mikroalglere veya tohumlara bağlanarak, çeşitli deniz organizmaları tarafından gıdalarla birlikte yutulabilmektedir (Rose ve Webber, 2019). Yutulduktan sonra, MP'ler emilir ve dolaşım sistemi ile farklı organlara dağılıbilirler. Bu nedenle, özellikle iritan ve biyo uyumlu olmayan MP'lerin zararlı etkileri, tahmin edilenden çok daha yüksek oranda gerçekleşebilmektedir (Barboza ve ark., 2018). Laboratuvar deneyleri, planktonik organizmalar da dahil olmak üzere copepodlar, cladocerans, salps ve larva balıklar gibi çeşitli omurgasızların ve deniz dibinde yaşayan kum kurtları, deniz hıyarları, amphipods ve mavi midyelerin MP'leri yuttuklarını göstermiştir (Sun ve ark., 2017). Mp'lerin suda yaşayan organizmalarda birikmesi ve dağılması türe özgüdür ve partikül büyüklüğüne göre farklılık gösterir. Örneğin 8-10 µm MP'ler çoğunlukla yengeç solungaçları ve bağırsağında bulunurken, 10 µm MP'ler midye dolaşımına taşınabilir; 5 µm MP'ler zebra balığının karaciğerinde birikebilmektedir (Deng ve ark., 2017). Dünyanın en büyük filtre besleyicilerinden biri olan Akdeniz yüzgeç balinası, *Balaenoptera physalus*, bir seferde yaklaşık 70.000 litre (L) su filtre eder. *B. physalus* tarafından, su ve plankton kaynaklı MP yutulması riski vardır (Wright ve ark., 2013). Hazmedilemeyen MP'leri midelerinde biriktiren deniz kuşları, besin alamamaları nedeniyle ağızdan ölebilmektedirler (Yu ve ark., 2018). MP'ler midye, istiridye ve yengeç gibi su ürünleri sayesinde, besin piramidinin en alt seviyesinden, en üst seviyesine ulaşabilmektedir. Dolayısıyla insan sağlığı için de büyük risk oluşturmaktadırlar (Çatalbaş, 2017). Kaplumbağa, fok, denizaslani, balık ve balinalar dâhil olmak üzere, en az 267 tür, söz konusu plastik kirliliğinden zarar gördükleri bilinmektedir (Gürbüz, 2017). İnsanlar tarafından sürekli solunması veya yutulması durumunda, MP'ler bağışıklık sistemini uyararak yerel parçacık toksisitesi gösterebilmektedirler. MP'lere kronik maruziyet, zamanla oluşabilecek birikimden dolayı, daha büyük problem oluşturur (Yurtsever, 2018). Mikroskobik plastik parça ve liflerin yutulması, bağırsak tıkanması veya bağırsak yırtılması gibi fiziksel hasara neden olabilmekte veya organizmaya kalıcı organik zararlı kirleticiler veya toksik katkıların transferini kolaylaştırmaktadırlar (Cole ve Galloway, 2015). Organizmalarda MP'lerin toksisitesi ve birikiminin insanlar için potansiyel sağlık riskleri vardır. Bir dereceye kadar, plastik yutulmuş balık ve diğer deniz ürünleri insanlar tarafından tüketilmektedir (Yu ve ark., 2018). Ancak, balıkların gastrointestinal kanalında MP'lerin oluşumu insanlar için maruz kalmaya doğrudan kanıt sağlamaz, çünkü bu organ genellikle insanlar tarafından tüketilmez. MP yutulduktan sonra kimyasal kirleticilerin

yenilebilir dokulara süzülmesi ve birikmesi potansiyeli vardır. Gıda yoluyla MP alımı balıklar tarafından yutulan MP'lerin gastrointestinal kanal boyunca yer değiştirebilmesi veya solungaçlar vasıtasıyla transselüler alım veya paraselüler difüzyon yoluyla dolaşım sıvısına geçmesi ile olabilir (Wright ve Kelly, 2017).

Fiziksel tehlikeye ek olarak plastiklerin hidrofobik olması ağır metaller, plastikleştiriciler, kalıcı organik kirleticiler gibi birçok organik ve inorganik kirleticilerin plastiklerin yüzeyine yapışarak kimyasal toksiteye sebep olabilmektedir (Rose ve Webber, 2019). MP'lerin soğurma davranışı MP ve kirleticilerin özellikleri ile ilgilidir. PE'nin diğer MP'lerden daha fazla organik kirletici madde soğururlar ve uzun yıllar beklemiş MP'ler yeni olanlardan daha fazla kirletici madde soğurmaya meyillidir. Hem MP'lerin hem de kirleticilerin polaritesi soğurulmada rol oynamaktadır (Guo ve Wang, 2019). Hidrofobik yüzeyleri nedeniyle MP'ler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), organoklorin pestisidler ve poliklorlu bifeniller (PCB) gibi hidrofobik organik kirleticileri yoğun olarak adsorbe ve konsantre eder (Wright ve Kelly, 2017). PAH'ların MP'lerle adsorpsiyonu, bazı olumsuz ekotoksikolojik etkilere neden olur, çünkü organizmalar kasıtlı olarak veya kazayla, MP'leri tüketirler ve organizmalarda PAH'ların birikmesine sebep olabilir (Tan ve ark., 2019). Plastikler Bisfenol A, melamin formaldehit, fitalat gibi zararlı kimyasallar içerirler, bunlar deniz hayvanlarının bağırsaklarında çözünürler ve birikirler (Singh ve Devi, 2019). MP'ler yalnızca organizma seviyesindeki türleri etkilemeyebilir; ayrıca nüfus yapısını değiştirme kapasitelerine de sahiptirler. Sert bir zemin eksikliği nedeni ile üremesi sınırlanan deniz böcekleri *H. sericeus* gibi türler MP sayesinde üreyebilmektedirler (Wright v ark., 2013). Havadaki MP'lere maruz kalma derecesi, bulaşma kaynaklarının çevrede geniş dağılımına bağlıdır. Sentetik tekstiller, erozyon, sentetik lastiklerden ve şehir tozu, birincil MP'lerin önemli kaynakları olduğu düşünülmektedir (Prata, 2018).

Sonuç

Oluşumu ve çevreye salınımı devam eden mikroplastikler, çoğunlukla denizlerde bulunan irili ufaklı canlılar tarafından vücutlarına alınmakta ve birikmektedir. Mikroskobik plastik parçaların ve liflerin yutulması, bağırsak tıkanması veya bağırsak yırtılması gibi fiziksel hasara neden olabilmekte veya organizmaya kalıcı organik zararlı kirleticiler veya toksik katkı

maddelerinin transferini kolaylaştırarak kronik zehirlenmelere sebebiyet verebilmektedir. Mikroplastik yutmuş canlıların yenilmesi ve doğrudan alınması ile mikroplastikler besin zincirinde ilerleyerek, insanlar için henüz ciddi olarak dikkate alınmayan sağlık sorunlarına sebep olabilmektedirler. Bu nedenle mikroplastik kirliliği açısından plastik içeren atıkların geri dönüşüme kazandırılması ve üretim ve kullanıma kısıtlama getirilmesi önem arz etmektedir.

Kaynaklar

1. ASLAN, R. (2018). Mikroplastikler:Hayatı Kuşatan Yeni Tehlike, *Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi*, Cilt 6 Sayı:66. 61-67.
2. AVIO, C.G., GORBI, S., MILAN, M., BENEDETTI, M., FATTORINI, D., d'ERRICO, G., PAULETTO, M., BARGELLONI, G., REGOLI, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels *Environmental Pollution* 198.211-222.
3. BARBOZA, L.G.A., VETHAAK, A.D., LAVORANTE, B.R.B.O., LUNDEBYE, A.K., GUILHEMIO, L. (2018). Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health, *Marine Pollution Bulletin* 133.336-348.
4. CAUWENBERGHE, L.V., JANSSEN, C.R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution* 193. 65-70.
5. CEYLAN, B. (2017). Atıksulardaki Mikroplastik Kirliliğinin İncelenmesi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*.
6. COLE, M., GALLOWAY, T.S. (2015). Ingestion of Nanoplastics and Microplastics by Pacific Oyster Larvae, *Environ Sci. Technol* 49.14625-14632.
7. ÇATALBAŞ, F. (2017). Tuz Gölü Tuzlarında Mikroplastik Varlığının İncelenmesi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*.
8. DENG, Y., ZHANG, Y., LEMOS, B., REN, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure, *scientific reports*. DOI: 10.1038/srep46687
9. GUO, X., WANG, J. (2019). The Chemical Behaviours of microplastics in marine environment: A review, *Marine pollution bulletin* 142.1-14.
10. GÜBÜZ, Ö. (2017). Marmara Denizi mikroplastik karakterizasyonu ve dağılımı, *İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri İşletmeciliği Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*.
11. HANVEY, J.S., LEWIS, P.J., LAVERS, J.L., CROSBIE, N.D., POZO, K., CLARKE, B.O. (2017). A Review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments, *The Royal Society of chemistry* 9.1369-1383.
12. LI, J., LUI, H., CHEN, P. (2018). Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection, *water reserch* 137.362-374.
13. PRATA, J.C. (2018). Airborne microplastics: Consequences to human health, *Environmental Pollution* 234.115-126.
14. REZANIA, S., PARK, J., MD DIN, M.F., MAT TAIB, S., TALAIEKHOZANI, A., YADAV, K. K., KAMYAB, H. (2018). Microplastics pollution in different environments and biota: A review of recent studies, *Marine pollution bulletin* 133.191-208.
15. ROSE, D., WEBBER, M. (2019). Characterization of microplastics in the surface waters of Kingston Harbour, *Science of the Total Environment* 664.753-760.

16. SHIM, W.J., THOMPSON, R.C. (2015). Microplastics in the Ocean, *Arch Environ Contam Toxicol* 69:265-268.
17. SINGH, A.P., DEVI, A.S. (2019). Plastic Waste: A Review, *International Journal of Advanced Scientific Research and Management* Vol:3 47-51.
18. SANTOS, R.T., DUARTE, C.A. (2015). A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behaviour of microplastics in the environment, *Trends in Analytic Chemistry* 65:47-53.
19. SUN, X., LI, Q., ZHU, M., LIANG, J., ZHENG, S., ZHAO, Y. (2017). Ingestion of microplastics by natural zooplankton groups in the northern South China Sea, *Marine Pollution Bulletin* 115:217-224.
20. TAN, X., YU, X., CAI, L., WANG, J., PENG, J. (2019). Microplastics and associated PAHs in surface water from the Feilaixia Reservoir in the Beijing River, China, *Chemosphere* 221:834-840.
21. TENG, J., WANG Q., RAN, W., WU, D., LIU, Y., SUN, S., LIU, H., CAO, R., ZHAO, J. (2019). Microplastic in cultured oysters from different coastal areas of China, *Science of the Total Environment* 653:1282-1292.
22. WRIGHT, S.T., THOMPSON, R.C., GALLOWAY, T.S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review, *Environmental pollution* 178:483-492.
23. WRIGHT, S.T., KELLY, F.J. (2017). Plastic and Human Health: A micro issue *Environmental Science and Technology* DOI: 10.1021/acs.est.7b00423.
24. YAO, P., ZHOU, B., LU, Y., YIN, Y., ZONG, Y., CHEN, M., O'DONNELL, Z. (2019). A review of microplastics in sediments: Spatial and temporal occurrences, biological effects and analytic methods, *Quaternary International* <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2019.03.028>.
25. YU, Y., ZHAOU, D., LI, Z., ZHU, C. (2018). Advancement and Challenges of Microplastic Pollution in the Aquatic Environment: A review, *Water Air Soil Pollut.* <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3788-z>
26. YURTSEVER, M. (2015). Mikroplastikler'e genel bir bakış, *Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi* sayı 50 68-83.
27. YURTSEVER, M. (2018). Abiyotik bir su ürünü olan sofrta tuzunda mikroplastik kirliliği tehlikesi, *Su ürünleri dergisi* 35(3): 243-249.
28. ZHU, F., ZHU, C., WANG, C., GU, C. (2019). Occurrence and Ecological Impacts of Microplastics in Soil Systems: A Review, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102:741-749.

***Inula helenium* subsp. *pseudohelenium* Ekstraktlarının Fenolik Madde İçeriği,
Antimikrobiyal ve DNA Koruyucu Aktiviteleri**

Yusuf ALAN¹ Nimet YILMAZ²

¹Temel EĞitim Bölümü, EĞitim Fakültesi, Muğ Alparslan Üniversitesi, 49250, Muğ

²Biyoloji Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğ Alparslan Üniversitesi, 49250, Muğ

zet: Bitkiler, içerdikleri metabolitler sayesinde birçok hastalığın tedavisinde yüzyıllardır alternatif tıpta kullanılmaktadır. Çalışmamızda Muğ ili Çöğürlü köyünde toplanan *Inula helenium* subsp. *pseudohelenium* yaprak etanol ve saf su ekstraktlarının 14 farklı fenolik madde içeriği HPLC ile belirlenerek, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktiviteleri araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, salisilik asit etanol ekstraktında gözlemlenmezken, gallik asit ve vanillin etanol ve saf su ekstraktında tespit edilmedi. Etanol ekstraktı çalışmadaki bütün mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivite gösterirken, saf su ekstraktının ise sadece antifungal aktivite gösterdiği saptandı. Etanol ekstraktı plazmit DNA zerindeki H₂O₂+DMSO'un süpürücü etkisini gidererek kararlı hale getirirken, saf su ekstraktının ise kısmen plazmit DNA'nın kararlı halde kalmasını sağladığı belirlendi. Sonuç olarak etanol ekstraktının biyolojik aktivitelerinin daha güçlü olmasının, içerdiği toplam fenolik madde miktarının su ekstraktına göre daha fazla olmasına bağlı olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, DNA, HPLC, *Inula helenium* subsp. *pseudohelenium*.

Phenolic Content, Antimicrobial and DNA Protective Activities of *Inula helenium* subsp. *pseudohelenium* Extracts

Abstract: Plants have been used in alternative medicine for centuries to treat many diseases thanks to their metabolites. In our study, antimicrobial and DNA preservation activities of 14 different phenolic contents of *Inula helenium* subsp. *pseudohelenium* leaf ethanol and pure water extracts collected in Çöğürlü village of Muş province were investigated. According to the results, salicylic acid was not observed in ethanol extract, while gallic acid and vanillin were not detected in ethanol and pure water extract. Ethanol extract showed antimicrobial activity on all microorganisms in the study, while pure water extract showed only antifungal activity. Ethanol extract was stabilized by removing the scavenging effect of H₂O₂ + DMSO on plasmid DNA, while pure water extract partially stabilized plasmid DNA. As a result, it can be said that the stronger biological activities of ethanol extract are due to the fact that the total amount of phenolic material contained is higher than the water extract.

Keywords: Antimicrobial, DNA, HPLC, *Inula helenium* subsp. *pseudohelenium*.

GİRİŞ

Dünyada yaklaşık 100 tür ile temsil edilen *Inula* cinsi, Avrupa, Asya ve Afrika’ da doğal olarak yetişen bitkilerden oluşmaktadır (Zhao ve ark., 2006; Berk ve ark., 2011; Değerli ve ark., 2012). Türkiye’ de toplam 27 tür ile temsil edilen *Inula* L. cinsinin, 7 taksonu endemiktir (Davis, 1982). *Inula* türleri kimyasal içeriklerinden dolayı çeşitli farmakolojik aktiviteler gösterirler. Bu aktiviteler arasında; sitotoksik, antiproliferatif, antitümöral, antibakteriyal, antifungal, antioksidan ve bitkinin büyümesini düzenleyen aktiviteler sayılabilir. Ayrıca bu bileşiklerin hipotansif, yüksek dozda hiperglisemik, düşük dozda hipoglisemik, antihelmintik, diüretik, antiinflamatuvar ve antipiretik etki gibi çok çeşitli farmakolojik etkilerinin var olduğu rapor edilmiştir (Gonzalez-Romero ve ark., 2000; Manez ve ark., 2007; Xie ve ark., 2007). *Inula* türleri, halk ilacı olarak geleneksel tıpta ve çeşitli farmakolojik aktiviteleri nedeniyle modern tıpta yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (Değerli ve ark., 2012; Hajimehdipoor ve ark., 2014). *Inula helenium* geleneksel tıpta tropikal bölgelerde anti-uyuz olarak yaraların iyileştirilmesinde kullanılır (Akay, 2002). *I. helenium* taksonu gıdalarda, farmasötiklerde ve

kozmetik preparatlarda iyi bir antioksidan ve antimikrobiyal madde kaynağı olabilir (Albayrak ve ark., 2015). Literatürde Türkiye’ de doğal olarak yetişen *I. helenium* üzerinde sınırlı sayıda çalışmalar bulunmaktadır (Gençaslan, 2007; Şengül ve ark., 2009). Bitkilerde bulunan fenolik antimikrobiyal bileşenler, günümüzdeki antimikrobiyal ajanlardan bakteri gelişimindeki farklı mekanizmaları engelleyerek dirençli suşlara bağlı hastalıkların tedavisinde etkili olabilmektedirler (Topal, 2013).

Bu çalışmamızda Muş ilinde yetişen *Inula helenium* subsp. *pseudohelenium* bitkisinden elde edilen saf su ve etanol ekstraktlarının antimikrobiyal ve Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) koruyucu aktiviteleri belirlenmiş ve fenolik madde içerikleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile araştırılmıştır.

Materyal ve Metod

Bitki örneklerinin toplanması ve ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan *I. helenium* bitkisi 2018 yılının vejetasyon döneminde Muş ili Çöğürlü köyünde toplandı (Türkiye). Toplanan bitki örneklerinin teşhisleri Flora of Turkey’e göre Murat Kurşat (Bitlis, Türkiye) tarafından yapıldı. Herbaryum materyali haline getirilen bitki örneği kodlanarak (Y.ALAN: 4949) Muş Alparslan Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde saklandı. Bitki örneklerini ekstraksiyona hazırlamak için yaprak kısımlarından alınarak gölgede kurutulmaya bırakıldı. Ekstraksiyona hazırlanmış olan bitkilerden 50’şer gr alınarak temizlendi ve öğütülerek soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle, 300 ml etanol ve saf su içerisinde ekstrakt elde edildi. Daha sonra evaporatör kullanılarak etanol ve saf su uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstraktların fenolik madde miktar tayini ve biyolojik aktivitelerinin *in vitro* ortamda incelenmesi için koyu renkli cam şişelerde $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ’de saklandı.

HPLC ile fenolik madde analizi

HPLC ile fenolik madde miktarı tayini için; Askorbik asit, gallik asit, mirisetin, absisik asit, Kuersetin, apigenin, kaempferol, curcumin, catechol, vanillin, kaffeik asit, cinnamic asit, rosmarinik asit ve salisilik asit standartlarının son konsantrasyonları 10 mg/ml olacak şekilde tartılıp 50 ml’lik balon jojeler içine konuldu. Daha sonra % 1’lik asetik asit ile asetronitril

sırasıyla (1/9) oranında karıştırılarak standartlar üzerine eklendi ve ardından aynı oranda metanol ilave edilerek stok standartlar hazırlandı. Stok standartlar 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM konsantrasyonlarına seyreltilerek kalibrasyon eğrisi için kullanıldı (Tapan, 2016). *I. helenium* ekstraktlarının konsantrasyonu 20 mg/ml olacak şekilde standartta kullanılan çözeltiler kullanılarak seyreltilti. Ekstraktlar, 0,45 µm'lik membran filtreden geçirilerek HPLC cihazına yüklendi (Alan ve Yılmaz, 2019).

Antimikrobiyal aktivite tayini

Ekstraktların antimikrobiyal aktivite tayini oyuk agar yöntemine göre yapıldı (Sagdic ve ark., 2003). Çalışmada, Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'ndan temin edilen 7 bakteri (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883) ve 3 maya türü (*Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Saccharomyces cerevisiae*) kullanıldı. Ekstraktların antimikrobiyal etkisinin karşılaştırılmasında 5 farklı antibiyotik disk (Eritromisin (E-15), Ampisillin/sulbaktam (SAM-20), Rifampisin (RD-5), Amikasin (AK-30) ve Fluconazol (FCA-25) kullanıldı (Alan ve Yılmaz, 2019).

Bitki ekstraktlarının DNA üzerindeki etkileri

pBR322 plazmid DNA kullanılarak ekstraktların DNA üzerindeki etkisi agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla 200 mg ekstrakt 1 ml DMSO'da çözülerek stok ekstraktlar hazırlandı. Bu stok ekstraktlar seyreltilerek 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarına sahip olacak şekilde kullanıldı. PCR tüplerinde hazırlanan örnekler 37 °C'de 24 saat karanlık ortamda inkübe edildi (Alan ve Yılmaz, 2019). İnkübasyondan sonra ekstrakt DNA karışımının 10 µl'si yükleme tamponu ile karıştırılıp %1'lik agaroz jele yüklenerek TBE tamponu içerisinde 40 V'ta, serbest akımda, 2 saat süre ile elektroforez yapıldı. Elektroforezden sonra jeller etidyum bromid ile boyanarak CemiDoc XRS BIORAD görüntüleme sisteminde jel fotoğrafları görüntülendi.

Bulgular ve Tartışma

Fenolik birleşiklerin HPLC ile analiz miktarları

I. helenium etanol ve saf su ekstraktlarının fenolik madde içeriklerini belirlemek için; Askorbik asit, gallik asit, mirisetin, absisik asit, kuersetin, apigenin, kaempferol, curcumin, catechol, vanillin, kafeik asit, cinnamic asit, rosmarinik asit ve salisilik asit standartlar kullanılarak HPLC ile miktar analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. *I. helenium* ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin miktarları (µg/ml).

Fenolikler	Etanol	Saf su
Askorbik asit	17.492	12.608
Gallik asit	.*	-
Mirisetin	3.378	2.303
Absisik Asit	17.573	6.827
Kuersetin	3.385	2.133
Apigenin	18.227	5.408
Kaempferol	4.318	1.234
Curcumin	14.022	1.952
Catechol	6.631	32.207
Vanillin	-	-
Kafeik asit	5.641	10.257
Cinnamic asit	3.676	12.935
Rosmarinik asit	3.223	1.562
Salisilik asit	-	8.994

* sonuç yok.

I. helenium bitkisinin yaprağından elde edilen ekstraktların HPLC ile analiz miktarlarına bakıldığında etanol ekstraktında en fazla miktarda apigenin (18.227 µg/ml), en az miktarda rosmarinik asit (3.223 µg/ml) varlığı tespit edildi. Saf su ekstraktında en az miktarda kaempferol (1.234 µg/ml), en fazla miktarda ise catechol (32.207 µg/ml) olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarda *Inula* cinsine ait bitkiden HPLC yöntemi ile klorogenic asit, kafeik asit, alantolactone ve isoalantolactone maddelerin miktarlarının çok farklı oranda olduğunu tespit etmişlerdir (Wang ve ark., 2014). *Inula* cinsine ait bitkiden elde edilen metanol ve su ekstraktlarında HPLC ile fenolik madde analizinde 10 farklı standart (gallik asit, kafeik asit, rutin, luteolin, kamferol, rosmarinik asit, mirisetin, kuersetin, kumarin ve apigenin) kullanılmıştır. Metanol ve su ekstraktları en fazla kamferol (sırasıyla 40.87±0.04 mg/g ve 34.36±0.02 mg/g kuru özüt) içermektedir. Aynı zamanda ekstraktlardan gallik asit, rutin, rosmarinik asit, kuersetin ve kumarin tespit edilmiştir. Ayrıca su ekstraktında apigenin de

bulunmaktadır (Özkan ve ark., 2015). Çalışmamızda ise saf su ekstraktında daha az fenolik madde miktarı tespit edildi. Aynı zamanda bütün ekstraktlarımızda ise galik asit ve vanillin varlığı gözlemlenmedi. Yapılan çalışmalar dikkate alındığında çalışmamızla kısmen benzerlik göstermekte olup, her bir bitki ekstraktında analiz edilemeyen bazı fenolik maddelerin de bulunması muhtemeldir.

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaktadır (Dığrak ve ark., 1990). Bu çalışmada *I. helenium*'un yaprak saf su ve etanol ekstraktlarının nasıl bir antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini anlayabilmek için *B. subtilis*, *S. aureus*, *B. megaterium*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *Y. lipolytica*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri mm olarak belirlendi (Tablo 2). Kontrol amaçlı kullandığımız antibiyotiklerin mikroorganizmalar üzerindeki etkileri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 2. *I. helenium* ekstraktlarının test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkisi.

*İnhibisyon zonu yok.

Mikroorganizmalar		Etanol (DMSO 10mg/ml)					Saf Su (DMSO 10mg/ml)				
		5 µl	10 µl	20 µl	40 µl	80 µl	5 µl	10 µl	20 µl	40 µl	80 µl
Gram pozitif	<i>B. subtilis</i>	15±1.00	19±1.52	21±1.00	21±1.00	26±1.08	-*	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	17±1.15	19±1.08	21±1.73	22±0.46	25±0.30	-	-	-	-	-
	<i>B. megaterium</i>	16±0.57	19±1.52	21±1.15	20±0.00	20±0.57	-	-	-	-	-
	<i>E. aerogenes</i>	11±0.00	15±1.00	19±1.73	20±0.00	20±0.57	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	14±1.15	17±1.00	20±0.57	21±1.00	23±0.30	-	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	11±0.00	15±0.51	20±0.00	22±2.00	24±0.00	-	-	-	-	-
Gram negatif	<i>K. pneumonia</i>	15±1.58	17±1.51	19±0.30	22±1.51	22±1.00	-	-	-	-	-
	<i>Y. lipolytica</i>	19±1.08	23±1.64	25±1.73	28±0.57	30±0.57	-	-	15±0.30	19±1.30	25±0.57
	<i>C. albicans</i>	16±1.15	20±1.52	21±1.00	25±1.52	28±1.00	-	-	14±1.08	20±1.51	25±1.00
	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	11±0.00	15±0.46	-	-	-	-	15±0.00

Etanol ekstraktı en yüksek aktiviteyi *Y. lipolytica*'ya karşı 30±0.57 mm çapında inhibisyon zonu oluşturarak gösterirken, en az aktiviteyi ise 15±0.46 mm çapında inhibisyon zonu ile *S. cerevisiae*'ye karşı gösterdi. Saf su ekstraktı en iyi antifungal aktiviteyi *C. albicans* ve *Y. lipolytica*'ya karşı gösterirken, *S. cerevisiae*'ye karşı en az antifungal aktivite gösterdiği belirlendi. Saf su ekstraktının bakterilere karşı herhangi bir antibakteriyal aktivite

göstermediği tespit edildi. Yapılan çalışmalarda *Inula* cinsine ait Çin’ de ticari ürün olan *I. helenium* ekstraktlarının ; *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. carotovora*, *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı, antibakteriyal aktivite gösterdikleri belirtilmiştir (Jiang ve ark., 2011). Başka bir çalışmada ise; *I. helenium* spp. *pseudohelenium* ait etanol ekstraktı sadece *E. coli*, *M. morganii* ve *B. subtilis*’e karşı aktivite göstermiştir. *Y. enterocolitica*’ya karşı sadece metanol ekstraktı gösterirken, su ekstraktı hiçbir antibakteriyal aktivite göstermemiştir. Ayrıca bütün ekstraktların antifungal aktivite göstermedikleri tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2015). Çalışmamızda elde ettiğimiz etanol ekstraktları bakteriler ve funguslar üzerinde etki göstermişken, su ekstraktları sadece antifungal aktivite gösterdi. Çalışmamızda kontrol amaçlı olarak kullandığımız antibiyotikler ile ekstraktlarımızı karşılaştırdığımızda, etanol ekstraktımızın antibiyotiklerden daha iyi antibakteriyal aktivite gösterdi. Ayrıca ekstraktlarımız Flukonazol’dan daha iyi antifungal aktivite gösterdiği belirlendi.

Tablo 3. Antibiyotik disklerinin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkisi.

Mikroorganizmalar		Antibiyotikler				
		Eritromisin	Ampicillin/ sulbactam	Amikasin	Rifampisin	Fluconazole
Gram pozitif	<i>B. subtilis</i>	20±0.00	14±1.15	11±1.00	21±0.00	-
	<i>S. aureus</i>	21±1.00	10±0.00	9±0.00	18±1.15	-
	<i>B. megaterium</i>	25±0.00	-	10±1.00	16±0.00	-
	<i>E. aerogenes</i>	27±1.00	10±1.00	9±0.00	16±1.00	-
Gram negatif	<i>E. coli</i>	19±1.52	13±0.00	13±0.00	18±0.00	-
	<i>P. aeruginosa</i>	19±0.00	-	14±1.15	8±0.00	-
	<i>K. pneumonia</i>	19±1.73	16±0.57	10±0.00	19±1.73	-
	<i>Y. lipolytica</i>	-*	-	-	-	21±0.00
Fungus	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	23±1.52
	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-

*Inhibisyon zonu yok

DNA koruyucu aktivite

I. helenium ekstraktlarının DNA koruyucu aktivitesi, pBR322 plazmit DNA’sı kullanılarak test edildi. Bu yöntemle göre, DNA üzerinde hasara yol açan etkenler olan H₂O₂ ve DMSO varlığında farklı konsantrasyonlarda ekstraktların, DNA hasarına engel olma yeteneği değerlendirildi. Çalışmamızdaki ekstraktlara ait gerçekleştirilen test sonucunda elde edilen görüntü Şekil 1’de verildi.

Elde edilen jel görüntüsüne göre H₂O₂'nin Form I'i parçaladığı ve DMSO ile birlikte DNA'yı tamamen yok ettiği gözlemlenmiştir. DMSO tek başına DNA'ya kısmen etki göstermiştir. Etanol ekstraktımız H₂O₂+DMSO'un süpürücü etkisini bozarak DNA'yı kararlı hale getirdiği gözlemlendi. Saf su ekstraktımızın H₂O₂+DMSO'un DNA üzerindeki süpürücü etkisini kısmen ortadan kaldırarak form II ve form III'ü kararlı hale getirdiği görüldü. Ekstraktlarımız tek başına uygulandığında DNA'nın daha kararlı halde kalmasını sağladığı tespit edildi. Sivas çevresinden toplanan *Inula* cinsine ait bitkinin toprak üstü kısımlarının sulu ekstraktının, H₂O₂ ve UV ışınları uygulanarak hasara uğratan pBR322 DNA plazmiti üzerine, koruyucu etki gösterdiği gözlenmiştir (Berk ve ark., 2011). Elde ettiğimiz sonuçlar literatüre benzerlik gösterdiği belirlendi.



Şekil 1 . *I. helenium* ekstraktlarının DNA koruyucu aktivite görüntüsü.

1. DNA, 2. DNA+ H₂O₂, 3. DNA+ H₂O₂+DMSO, 4. DNA+ DMSO, 5. DNA+ H₂O₂+Etanol ekstraktı (100 mg/ml), 6. DNA+ H₂O₂+ Etanol ekstraktı (50 mg/ml), 7. DNA+ H₂O₂+ Etanol ekstraktı (25 mg/ml), 8. DNA+ Etanol ekstraktı (100 mg/ml), 9. DNA+ Etanol ekstraktı (50 mg/ml), 10. DNA+ Etanol ekstraktı (25 mg/ml), 11. DNA+ H₂O₂+Saf Su ekstraktı (100 mg/ml), 12. DNA+ H₂O₂+ Saf Su ekstraktı (50 mg/ml), 13. DNA+ H₂O₂+ Saf Su ekstraktı (25 mg/ml), 14. DNA+ Saf Su ekstraktı (100 mg/ml), 15. DNA+ Saf Su ekstraktı (50 mg/ml), 16. DNA+ Saf Su ekstraktı (25 mg/ml).

Sonuç

Bu çalışmada *I. helenium* etanol ve saf su ekstraktlarının HPLC ile fenolik madde miktarları, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktiviteleri araştırıldı. *I. helenium* bitkisine ait biyolojik aktivitelerin araştırılmasına ilişkin literatürde çok kısıtlı bulguya ulaşıldı. Elde edilen sonuçlara göre, salisilik asit etanol ekstraktında gözlemlenmezken, gallik asit ve vanillin etanol ve saf su ekstraktında tespit edilmedi. Etanol ekstraktı çalışmadaki bütün mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivite gösterirken, saf su ekstraktının ise sadece antifungal aktivite gösterdiği saptandı. Kontrol amaçlı olarak kullandığımız antibiyotikler ile ekstraktlarımızı karşılaştırdığımızda, etanol ekstraktımızın antibiyotiklerden daha iyi antibakteriyal aktivite gösterdi. Ayrıca ekstraktlarımız Flukonazol'den daha iyi antifungal aktivite gösterdiği belirlendi. Etanol ekstraktımız plazmit DNA üzerine H₂O₂+DMSO'un süpürücü etkisini gidererek kararlı hale gelmesini sağladı. Saf su ekstraktımız ise H₂O₂+DMSO'un DNA

üzerindeki süpürücü etkisini kısmen ortadan kaldırdığı belirlendi. Genel olarak bakıldığında literatürde *I. helenium* türüne ait bu gibi çalışmalar kısıtlı olduğundan elde ettiğimiz verilerin literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Akay, F. 2002. Quantitative and qualitative analysis of *Inula heterolepis* essential oil. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Muğla, Türkiye.
2. Alan, Y., Yılmaz, N. 2019. Phenolic substance contents and biological activities of *Verbascum insulare* boiss. & heldr. extracts. *Farmacia*, 67 (4): 641-647.
3. Albayrak, S., Korkmaz Cınar A.E., Paksoy, M.Y., Aksoy, A. 2015. An investigation on antioxidant and antimicrobial activities of four *Inula helenium* L. taxa. *Iranian Journal of Science & Technology*, 39: 473-483
4. Berk Ş., Bektaş B., Arslan S. 2011. Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of *Inula oculus-christi*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5(14); 1695-1702.
5. Davis P.H. 1982. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. University Press, Edinburgh. 5.
6. Değerli, S., Berk, S., Malatyalı, E., Tepe, B. 2012. Screening of the *in vitro* amoebicidal activities of *Pastinaca armena* (Fisch. & C.A.Mey.) and *Inula oculus-christi* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Res.*, 110: 565-570.
7. Dıǧrak M., Alma M.H., İlçim A., Sen S. 1999. Antibacterial and Antifungal Effects of Various Commercial Plant Extracts, *Pharmaceutical Biology*, 37(3): 216-22.
8. Gençaslan, G. 2007. Screening of some Turkish medicinal plants for antioxidant activity. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Bölümü, Ankara, Türkiye.
9. Gonzalez-Romero, M.A., Villaescusa-Castillo, L., Diaz-Lanza, A.M. 2000. Sesquiterpene lactones from *Inula montana*. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 55: 697-700.
10. Hajimehdipoor, H., Mosaddegh, M., Naghibi, F., Haeri, A., Hamzeloo-Moghadam, M. 2014. Natural sesquiterpene lactones as acetylcholinesterase inhibitors. *An Acad Bras Cienc*. 86(2):801-806.
11. Jiang, H.L., Chen, J., Jin, X.J., Yang, J.L., Li, Y., Yao, X.J., Wu, Q.X. 2011. Sesquiterpenoids, alantolactone analogues, and seco-guaiene from the roots of *Inula helenium*. *Tetrahedron*, 67: 9193-9198.
12. Manez, S., Hernandez, V., Giner, R-M., Rios, J-L., Recio, M.C. 2007. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Fitoterapia*, 78: 329-331.
13. Özkan, E., Karakaş, F.P., Yıldırım, A.B., Taş, İ., Eker, İ., Yavuz, M.Z., Türker, A.U. 2015. *Inula viscosa* (Yapışkan Andız Otu)'nın Antibakteriyel, Antioksidan, Antiproliferatif Etkileri ve Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi, S 166, 2-4 Eylül 2015, Bolu.
14. Sagdic, O., Karahan, A., Ozcan, M., Ozkan, G. 2003. Note: Effect of some spice extracts on bacterial inhibition. *Food Sci Technol Int.*, 9: 353-358.
15. Şengul, M., Yıldız, H., Güngör, N., Çetin, B., Eser, Z., Ercişli, S. 2009. Total Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Medicinal Plants. *Pak J Pharm Sci*. 22(1):102-106.
16. Tapan, S. 2016. Quantitative HPLC Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Ascorbic Acid in Four Different Solvent Extracts of Two Wild Edible Leaves, *Sonchus Arvensis* and *Oenanthe*

- Linearis* of North-Eastern Region in India, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 6 (2): 157-166.
- 17.Topal, Y. 2013. *Alchemilla L.* (Rosaceae) Cinsine Ait Bazı Türlerin Fenolik Bileşiklerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması. Bingöl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 70s, Bingöl.
- 18.Wang, J., Zhao, Y., Zhang, M., Shi, Q. 2014. Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, Alantolactone and Isoalantolactone in *Inula helenium* by HPLC, Journal of Chromatographic Science 2015;53:526–530, doi:10.1093/chromsci/bmu079.
- 19.Xie, H.G., Chen, H., Cao, B., Zhang, H-W., Zou, Z.M. 2007. Cytotoxic germacranolide sesquiterpene from *Inula cappa*. *Chem. Pharm. Bull.*, 55: 1258-1260.
- 20.Zhao, Y.M., Zhang M.L., Shi, Q.W., Kiyota, H.K. 2006. Chemical constituents of plants from the Genus *Inula*. *Chemistry and Biodiversity*, 3: 371-384.

Kayısı Çekirdeği Yağının Myeloma Hücreleri Üzerinde Antiproliferatif Etkisinin Araştırılması

Hidayet TUTUN¹ Sedat SEVİN²

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Burdur, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Ankara, Türkiye

Özet: Kayısının (*Prunus armeniaca* L) çeşitli kanser tiplerinin gelişimini baskılayabildiği bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı kayısı çekirdeği yağının fare myeloma (FO ATCC CRL-1646) hücreleri üzerinde in vitro antiproliferatif aktivitesini araştırmaktır. Çekirdeğin yağı hekzan ile vakumlu döner buharlaştırıcıda elde edildi. Hücre canlılığı, myeloma hücrelerinin 24 ve 48 saatlik çeşitli konsantrasyonlarda (29,3, 58,6 117,2, 234,4, 468,8, 937,5, 1875 ve 3750 ppm) kayısı çekirdeği yağı maruziyeti sonrası MTT testi kullanılarak ölçüldü. 24 saatlik maruziyetten sonra hücrelerin canlılığı sırasıyla %106,51, %100,54, %91,00, %92,23, %72,79, %55,93, %57,55, %47,45 oranlarında bulundu. 48 saatlik maruziyetten sonra hücrelerin canlılık oranları sırasıyla 112,57, %119,62, %122,87, %122,85, %106,24, %55,99, %48,12 ve %47,78 olduğu gözlemlendi. IC50 değeri 24 saat için 2894,62 ppm ve 48 saat için 1390,68 ppm olarak bulundu. Kayısı çekirdeği yağı doza ve zamana bağlı antiproliferatif etkiye sahip olduğu tespit edildi. Ancak, çekirdek yağı düşük dozlarda myeloma hücrelerinin üremesini arttırdı. Yağın myeloma hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisinin olduğu gerçeği, bunun antikarsinogenik aktivite için potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antiproliferatif etki, Miyeloma, MTT, *Prunus armeniaca* L.

Investigation of Antiproliferative Effect of Apricot Seed Oil on Myeloma Cells

Abstract: Apricot (*Prunus armeniaca* L.) is known to suppress the development of various types of cancer. The aim of this study was to investigate in vitro antiproliferative activity of apricot kernel oil on mouse myeloma cells (FO ATCC CRL-1646). Extraction of kernel oil was done with hexane by using a vacuum rotary evaporator. Cell viability was measured using MTT test after exposure of myeloma cells to various concentrations of apricot kernel oil (29.3, 58.6 117.2, 234.4, 468.8, 937.5, 1875 and 3750 ppm) for 24 and 48 hours. After 24 hours of exposure, the viability of the cells was 106.51%, 100.54%, 91.00%, 92.23%, 72.79%, 55.93%, 57.55%, 47.45%, respectively. The viability of the cells after 48 hours of exposure was 112.57, 119.62%, 122.87%, 122.85%, 106.24%, 55.99%, 48.12% and 47.78%, respectively. The IC₅₀ value was 2894.62 ppm for 24 hours and 1390.68 ppm for 48 hours. Cell proliferation was reduced in a dose- and time dependent manner in apricot kernel oil treated myeloma cells. The fact that the oil has antiproliferative effect on myeloma cells suggests that it may be a potential therapeutic agent for anticarcinogenic activity.

Keywords: Antiproliferative effect, Myeloma, MTT, *Prunus armeniaca* L.

Giriş

Miyelom (multipl miyelom, MM), kemik iliğinde yapılan bir tür beyaz kan hücresi olan plazma hücresi proliferasyonu ile karakterize hematolojik bir malignitedir (Grosbois ve ark., 2002). MM insidansı gelişmiş ülkelerde genellikle daha yüksektir. 2017’de Amerika Birleşik Devletleri’nde tahmin edilen MM olayı vakaları, 30.280’dir (17.490 erkek ve 12.790 kadın) ve tüm yeni kanser vakalarının %1,8’ini temsil etmektedir. Avrupa ülkelerinde benzer veya biraz daha düşük yaş standardize edilmiş MM insidans oranları bulunabilir. Buna karşılık, Asya ülkelerinde görülme sıklığı özellikle düşüktür. Nüfusa dayalı kanser kayıtlarının çoğu, son on yılda istikrarlı ya da biraz artan MM insidansı göstermektedir. Popülasyonun yaklaşık %0,8’ine yaşamları boyunca bir noktada MM teşhisi konulmaktadır (Ríos-Tamayo ve ark., 2018).

Tamamlayıcı ve alternatif tıp (TAT), geleneksel tıbbın öğretildiği ve sağlandığı kurumların dışında büyük ölçüde var olan geniş çaplı şifa felsefeleri, yaklaşımları ve tedavileridir (Pal, 2002). Kronik hastalığı olan çocuklar ve ergenler tarafından artan ve yüksek TAT kullanım sıklığı sanayileşmiş ülkelerde (kanseri çocuklar dahil) bildirilmektedir (Gottschling ve ark., 2014). Bitkisel ilaç, homeopati, refleksoloji ve akupunktur en popüler tedaviler arasındadır (Stoneman et al., 2013). TAT kullanımının bu yüksek yaygınlığının nedenleri çeşitlidir ve geleneksel tıptan memnuniyetsizliği ve arkadaşlardan ve aileden gelen olumlu duyumlardan kaynaklanabilir. TAT tedavileri faydalı etkiler sunsa da, zararlı yan etkilerin ve istenmeyen ilaç etkileşimlerinin ortaya çıkması ile ilgili endişeler vardır.

Kayısı (*Prunus armeniaca* L.), Prunoideae alt ailesinin Rosaceae üyesidir. Türkiye 2017/18 üretim sezonunda 1.007 bin ton zerdali dahil kayısı üretimi gerçekleştirmiştir. Kayısı üretiminde önemli bir yere sahip olan Malatya tek başına 676 bin tonluk üretimle Türkiye üretiminin %68,3'sini gerçekleştirmiştir (Tarım ürünleri piyasası, 2019). Kayısı çekirdeği çoğunlukla kozmetik, ilaç ve koku üretiminde kullanılır ve tohumları yakıt olarak kullanılır. Kayısı çekirdeğinin toplam yağ içeriği %40,23 ile %53,19 arasında değişir. Oleik asit, toplam yağ asitlerine %70,83 oranında ardından linoleik (%21,96), palmitik (%4,92) ve stearik (%1,21) asitler katkıda bulunur (Turan ve ark., 2007). Ham lif içeriği %4,06 ile %7,63 arasında değişmiştir. Ek olarak, ham protein içerikleri %15,1 ile %24,2 arasında değişmektedir (Özcan ve ark., 2010). Bununla birlikte yağ asitleri insan sağlığı için büyük öneme sahip olabilir, asansiyel yağ asitleri (EFA) insan vücudunda biyosentezlenmez, ancak birçok fizyolojik işlemin büyümesi, bakımı ve çalışması için gereklidir (Pavlovic ve ark., 2018).

Kayısı çekirdeği tohumlarında da tespit edilen spesifik biyoaktif bileşenlerden biri, amigdalindir (Pavlovic ve ark., 2018). Amigdalın, acı kayısı, laetril, badem olarak da adlandırılır; aromatik siyanojenik glikozid grubuna ait siyanojenik bir bileşiktir. Antikanser aktivitesi, antienflamatuar aktivitesi ve diğer bazı tıbbi kabiliyetleri ile yıllarca geleneksel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Amigdalinin zararlı etkilerinin olduğu gösterilmiş olmasına rağmen hatta oral yoldan alındıktan sonra siyanür zehirlenmesinin ciddi yan etkilerin ortaya çıkmasına rağmen, Amigdalın ve kayısı çekirdeği kanser hastalarında kullanılmaktadır (Milazzo ve ark., 2011). Mevcut çalışmalara dayanarak, son derece saflaştırılmış amigdalın'ın

toksik etkisi olmayan “terapötik” konsantrasyonlarda uygulanabileceği bildirilmektedir (Blaheta ve ark., 2016). Kayısı çekirdeği 5,8 mg 100 g⁻¹ α-tokoferol ve 32,2 mg 100 g⁻¹ δ-tokoferol içerir (Slover ve ark., 1983). Tokoferoller, insanları oksidatif strese karşı korumada ve lipidlerin ve lipit içeren gıda maddelerinin depolanma sırasında oksidasyona karşı korunmalarında raf ömrünü uzatmada önemli bir role sahiptir (Gliszczynska-Swiglo ve ark., 2007).

Kayısı çekirdeği yağının organizma üzerinde olumlu ya da olumsuz bir etkiye sahip olup olmadığı kesin olarak belirlenmemiştir. Bu çalışmanın amacı kayısı çekirdeği yağının myeloma hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisini incelemektir.

Materyal ve Metot

Kayısı çekirdek yağının ekstraksiyonu: Kayıslar, Çanakkale ilinin Kepez beldesinden toplandı. Çekirdekleri etüvde (Mermert-UN55, Almanya) kurutulduktan sonra bir öğütücü (Premium-PRG 259, Premier) yardımıyla parçalandı. Çekirdeğin yağını hekzan (Merk) ile vakumlu döner buharlaştırıcıda (Buchi-Rotavapor-R-2010, İsviçre) ekstrakte edildi. Yağın kimyasal bileşenleri Demir (2019) tarafından yapılan çalışmada Gaz Kromatografi-Alev İyonlaşma Dedektör (GC-FID) kullanılarak belirlenmiştir.

Hücre kültürü: Myeloma (F0 ATCC CRL-1646) hücre hatları %10 FBS (Fötal sıgır serumu), %0,1 gentamisin, %1 sodyum purivat ve %2 L-glutamin içeren DMEM kullanılarak %5 CO₂, %95 bağıl nem ve 37°C koşullarını sağlayan inkübatörde (Steri-Cycle i160, Thermo Scientific) kültüre edildi. Kayısı çekirdeği yağının besi yeri içerisinde homojen olarak çözünebilmesi için Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldı. Bunun için önce %50 oranında DMSO’da çözdürüldükten sonra DMEM ile dilüsyonları yapıldı (Son uygulama hacminde DMSO miktarı %0,5 altındadır).

Hücre canlılık testi: Kayısı çekirdeği yağının myeloma hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2- YL]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi kullanıldı. Hücreler, 96 kuyucuklu plakalara (3x10⁵ hücre/mL) ekildi ve gece boyunca kültürlendi. Hücreler, çeşitli konsantrasyonlarda kayısı çekirdek yağı (DMEM’de 3750, 1875, 937,5, 468,7, 234,3, 117,1, 58,6, 29,3 ppm) ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edildi. Sadece

DMEM ve %0,1 Triton X-100 sırasıyla negatif ve pozitif kontroller olarak kullanıldı. Her konsantrasyon üç tekrar halinde test edildi. 24 ve 48 saat inkübasyon süresinden sonra, son miktarı 0,5 mg/ml olacak şekilde kuyucuklara MTT stok solüsyonu (PBS içerisinde 5 mg/ml) eklendi ve inkübasyon %5 CO² ve 37°C koşullarını hücre kültürü inkübatöründe yaklaşık 3 saat sürdürüldü. Formazan kristallerinin oluştuğu görüldükten sonra MTT solüsyonu kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Mor formazan kristallerinin çözünmesi için her kuyucuğa 150 µl DMSO ilave edildi ve yaklaşık 30 dakika tam çözünmenin sağlanması için plakalar yatay çalkalayıcıda (Thermo scientific) tutuldu. Absorbanslar mikropate spektrofotometre (Multiskan Go, Thermo Scientific) ile 570 nm'de ölçüldü.

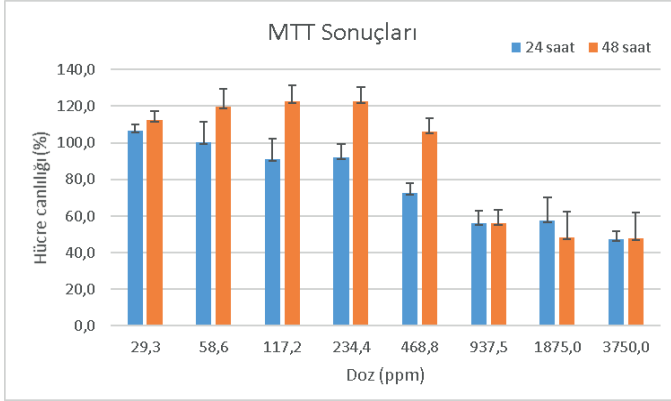
İstatistik: Tüm çalışma verileri üç bağımsız deneyden elde edildi. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. IC₅₀ değerleri Excel programı kullanılarak hesaplandı.

Bulgular ve Tartışma

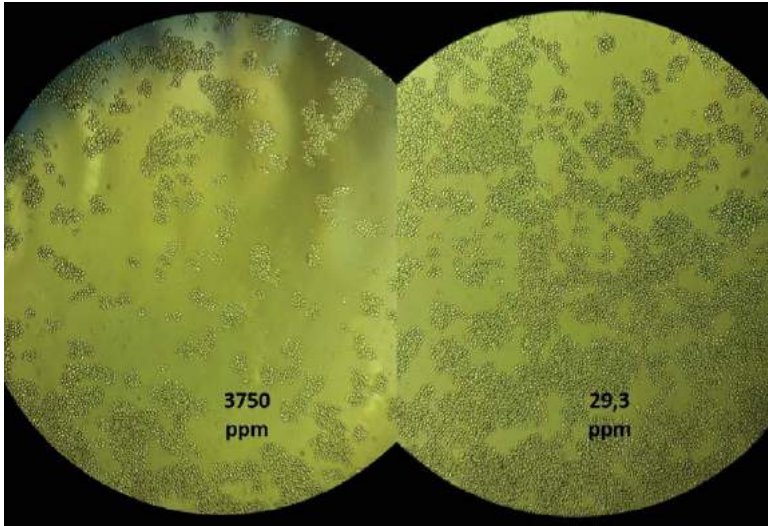
Kanser, kanserin indüksiyonunda ve kötüye gidişinde doğrudan ve / veya dolaylı bir rol oynayan çevresel, kimyasal, fiziksel, metabolik ve genetik faktörleri içeren çok aşamalı bir hastalıktır. Kanser gelişmesine yol açan biyolojik süreçlerin anlaşılması noktasındaki son gelişmelere rağmen, bu hastalığı kontrol altına almak için yeni ve etkili ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Çeşitli kayısı çekirdeği ekstraktlarının ve kayısı çekirdeğinde doğal olarak bulunan Amigdalın maddesinin antikanser etkilerinin olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Cassiem ve Kock, 2019; Saleem ve ark., 2018). Bu çalışmada kullanılan kayısı çekirdek yağının içeriği daha önce yapılan bir çalışmada belirlenmiştir. Yağın kimyasal bileşenleri %45,9 oleik asit, %19,8 linoleik asit, %19,3 lineoleaidik asit, %7,7 linolenik asit, %3,6 undekanoik asit, %1,7 kaprilik asit, %1,2 elaidik asit, %0,6 laurik asit ve %0,2 stearik asit olarak belirlenmiştir (Demir, 2019).

Bu çalışmada yapılan hücre canlılık testi, Çanakkale ilinde yetişen kayısı çekirdek yağının myeloma hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda önemli ölçüde hücre çoğalmasını önlediğini gösterdi. Çeşitli konsantrasyonlarda (29,3, 58,6 117,2, 234,4, 468,8, 937,5, 1875 ve 3750 ppm) yağa 24 saatlik maruziyetten sonra hücrelerin canlılığı sırasıyla %106,51, %100,54, %91,00, %92,23, %72,79, %55,93, %57,55, %47,45 oranlarında ve 48 saatlik maruziyetten

sonra hücrelerin canlılık oranları sırasıyla %112,57, %119,62, %122,87, %122,85, %106,24, %55,99, %48,12 ve %47,78 oranlarında azaldığı gözlemlendi (Şekil 1 ve 2). IC₅₀ değeri 24 saat için 2894,62 ppm ve 48 saat için 1390,68 ppm olarak bulundu.



Şekil 1. Kayısı çekirdeği yağına 24 ve 48 saat maruziyet sonrası myeloma hücrelerinin canlılık yüzdeleri (%).



Şekil 2. Kayısı çekirdeği yağının uygulanan en yüksek ve en küçük dozlarının myeloma hücrelerine etkisinin mikroskopik görüntüleri (48 saat maruziyet).

Başka bir çalışmada, Güney Afrika kayısı çekirdeğinin çeşitli özütləri insan kolon kanser hücrelerinde (HT-29) 24 saat sonra doza bağlı bifazik proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir.

En düşük ve en yüksek konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını uyarırken, 500 µg/mL'de hücre çoğalmasını inhibe ettiği gözlenmiştir. Buna karşılık, 72 saat sonra, düşük konsantrasyon hücre proliferasyonunu inhibe ederken, 500 µg/mL ekstrakt hücre proliferasyonunu uyarmıştır (Cassiem ve Kock, 2019). Diğer çalışmada, hem tatlı kayısının hem de acı badem çekirdeğinin su, metanol ve etanol ekstraktlarının MCF-7 (insan meme kanser hücresi), HCT-116 (insan kolon kanser hücresi) ve HepG2 (insan karaciğer kanser hücresi) hücreleri üzerindeki sitotoksitesi MTT testi kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar, hem tatlı kayısı hem de acı badem çekirdeğinin su, metanol ve etanol özütlerinin, göğüs (MCF-7), kolon (HCT-116) ve karaciğer (HepG2) hücresinin büyümesini hücre hatları arasında farklı hassasiyet ile doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Acı badem çekirdeklerinin metanol ekstraktının, HepG2 hücrelerinde ($IC_{50} = 10,1$ µg) ve ardından aynı çeşidinde su ekstraktının ($IC_{50} = 11,9$ µg) maksimum sitotoksite gösterdiği bildirilmiştir (Goma, 2013). Chen ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada, Kuzey Pakistan'dan (Gilgit-Baltistan) 19 kayısı (AP) çeşidinin çekirdekleri toplanmış ve aseton ile ekstrakte edilmiştir. Metilen mavisi yöntemi kullanılarak yaptıkları hücre canlılığı testinde, HepG2 hücrelerini ekstrakt ile 72 saat maruziyet sonrasında en yüksek inhibisyon Wafu Chuli/AP-9'un çekirdeğinde bulunmuştur ($EC_{50} = 15.70 \pm 3.77$ mg / mL) (Chen ve ark., 2019). Li ve ark. (2016) acı kayısı esansiyel yağı (Semen Armeniacae amarum) insan epidermal keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (IC_{50} : 142,45 µg/mL). Bu çalışma sonuçları kayısının antiproliferatif etkilerinin gösterildiği çalışma sonuçları ile benzerdir. Sonuç olarak, kayısı çekirdeği yağının miyeloma hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı antiproliferatif etkisi vardır.

Teşekkür

Kayısı çekirdek yağını hediye olarak veren Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi) ve Buke DEMİR'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Blaheta RA, Nelson K, Haferkamp A, Juengel E. Amygdalin, quackery or cure? Phytomedicine 2016; 23(4): 367-376.
2. Cassiem W, de Kock M. The anti-proliferative effect of apricot and peach kernel extracts on human colon cancer cells in vitro. BMC complementary and alternative medicine, 2019; 19(1): 32.

3. Chen Y, Al-Ghamdi AA, Elshikh MS, Shah MH, Al-Dosary MA, Abbasi AM. Phytochemical Profiling, Antioxidant and HepG2 Cancer Cells' Antiproliferation Potential in the Kernels of Apricot Cultivars. Saudi Journal of Biological Sciences. 2019; <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.013>
4. Demir B. Kayısı Çekirdeği Yağının Ekstraksiyonu ve Fare 3T3 L1 Hücre Hattının ve İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Davranışları Üzerine Etkisinin Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Çanakkale 2019.
5. Gliszczynska-Swiglo A, Sikorska E, Khmelinskii I, Sikorski M. Tocopherol content in edible plant oils. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2007; 57(4 [A]): 157-161.
6. Gomaa EZ. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antitumor activities of bitter almond and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. Food Science and Biotechnology, 2013; 22(2): 455-463.
7. Gottschling S, Meyer S, Längler A, Scharifi G, Ebinger F, Gronwald B. Differences in use of complementary and alternative medicine between children and adolescents with cancer in Germany: a population based survey. Pediatr Blood Cancer 2014; 61: 488–92
8. Grosbois B, Decaux O, Azais I, Facon T, AvetLoiseau H. Current treatment strategies for multiple myeloma. Eur J Intern Med 2002; 13(2): 85-95.
9. Li K, Yang W, Li Z, Jia W, Li J, Zhang P, Xiao T. Bitter apricot essential oil induces apoptosis of human HaCaT keratinocytes. International immunopharmacology, 2016; 34: 189-198.
10. Milazzo S, Ernst E, Lejeune S, Boehm K, Horneber M. Laetrile treatment for cancer. Cochrane Database of Systematic Reviews 2011, Issue 11. Art. No.: CD005476. DOI: 10.1002/14651858.CD005476.pub3.
11. Özcan MM, Özalp C, Ünver A, Arslan D, Dursun N. Properties of apricot kernel and oils as fruit juice processing waste. Food and Nutrition Sciences, 2010; 1(02); 31.
12. Pal SK. Complementary and alternative medicine: an overview. Current Science-Bangalore 2002; 82(5): 518-524.
13. Pavlović N, Vidović S, Vladić J, Popović L, Moslavac T, Jakobović S, Jokić S. Recovery of Tocopherols, Amygdalin, and Fatty Acids From Apricot Kernel Oil: Cold Pressing Versus Supercritical Carbon Dioxide. European journal of lipid science and technology, 2018; 120(11): 1800043.
14. Ríos-Tamayo R, Rodríguez DS, Chang-Chan YL, Pérez MJS. Epidemiology of Multiple Myeloma. In Multiple Myeloma. IntechOpen. 2018
15. Saleem M, Asif J, Asif M, Saleem U. Amygdalin from Apricot Kernels Induces Apoptosis and Causes Cell Cycle Arrest in Cancer Cells: An Updated Review. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2018; 18(12): 1650-1655.
16. Slover HT, Thompson RH, Merola GV. Determination of tocopherols and sterols by capillary gas chromatography. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1983; 60(8): 1524-1528.
17. Stoneman P, Sturgis P, Allum N. Understanding support for complementary and alternative medicine in general populations: Use and perceived efficacy. Health 2013; 17(5): 512-529.
18. Tarım ürünleri piyasası (2019). Kayısı, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepgge/Belgeler/PDF%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasalar%C4%B1/2019-Ocak%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Raporu/2019-Ocak%20Kay%C4%B1s%C4%B1.pdf>.
19. Turan S, Topcu A, Karabulut I, Vural H, Hayaloglu AA. Fatty acid, triacylglycerol, phytosterol, and tocopherol variations in kernel oil of Malatya apricots from Turkey. Journal of agricultural and food chemistry, 2007; 55(26): 10787-10794.

Şanlıurfa İlinde Bazı Ağır Metal (Cd ve Pb) Kirliliğinin Güvercin Kanlarında Mevsimsel Değerlendirilmesi*

Özlem ÜTME¹ Fusun TEMAMOĞULLARI¹

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD, Şanlıurfa, TÜRKİYE

Özet: İnsan faaliyetlerinin artışı ile birlikte her geçen gün ağır metal kirliliği de artmaktadır. Çevre kirliliğinin belirlenmesinde kuşlar iyi bir biyomonitör canlıdır. Ağır metaller canlı organizmalarda birikerek zehirli ve zararlı etkilere neden olmaktadır. Bu çalışmada, Şanlıurfa ili merkez ilçelerinde (Eyyübiye, Haliliye, Karaköprü ve Suruç) her mevsimde belirlenen aylarda (Kasım 2016, Şubat 2017, Mayıs 2017 ve Ağustos 2017) güvercin yetiştiricilerinden sağlanan 64 adet güvercin (32 dişi, 32 erkek) kan örnekleri alındı. Çalışmada toplanan tüm kan örnekleri laboratuara taşınırken ve analizlere hazırlanmaya kadar soğuk zincir kurallarına dikkat edildi. Toplanan kan örnekleri rulo mikserde 1-2 saat homojenize edildikten sonra homojenatların 1mL'sine 2mL nitrik asit (%67 v/v) ve 0.2 mL hidrojen peroksit (%31 v/v) eklendi. Örnekler porselen kroze içerisine aktarılarak mikrodalga fırında iki farklı basamakta çözüldü. Mikrodalga uygulamaları birinci basamakta 5 dakika boyunca 400 W güç uygulanarak, ikinci basamakta ise 5 dakika boyunca 800 W güç uygulanarak gerçekleştirildi. Çözümleme işlemi sonrası numuneler soğumaya bırakılarak 15 mL'lik polietilen tüplere aktarıldı. Kan örneklerinde kurşun ve kadmiyum düzeyleri İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS) ile analiz edildi. Analiz sonucunda Kurşun: Haliliye 233.1 ± 25.7 ppb, Karaköprü 101.2 ± 29.7 ppb, Eyyübiye 81.3 ± 22.7 ppb, Suruç 48.1 ± 27.1 ppb, Kadmiyum: Haliliye 30.6 ± 12.6 ppb, Karaköprü 35.7 ± 9.2 ppb, Eyyübiye 28.1 ± 8.7 ppb, Suruç 16.8 ± 4.1 ppb olarak ölçüldü. Güvercinlerdeki Kurşun ve Kadmiyum miktarları erkeklerde dişilerden fazladır. Trafik yoğun yaşandığı Haliliye merkez ilçesinde kurşun düzeyi; bilinçsiz yapılaşmanın yaşandığı merkez ilçe Karaköprü'de ise kadmiyum düzeyi yüksek bulundu. Mevsimsel olarak ilkbahar (Mayıs) mevsiminde kurşun, ilkbahar ve Sonbahar mevsiminde kadmiyum düzeylerinin diğer mevsimlerden daha yüksek olduğu belirlendi. Sonuç olarak, Şanlıurfa merkez ilçelerinde hava kirliliğinin belirlenmesine yönelik yapılan bu çalışma sonucunda, toplu taşıma araç kullanımının artırılması, doğaya zarar vermeyen farklı enerji kaynaklarının kullanılmasının teşvik edilmesi, planlı kentleşme yaygınlaştırılması ve ağaçlandırılmanın artırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Güvercin, Kadmiyum, Kan, Kurşun.

*Bu tez Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 16196 proje numarası ile desteklenmiştir.

Seasonal Evaluation of Some Heavy Metals (Cd and Pb) Pollution in Pigeon Blood Samples in Şanlıurfa Province

Abstract: Heavy metal pollution increases day by day parallel to human facilities. Birds are good biomonitoring creatures to determine environmental pollution. Heavy metals lead to toxic and harmful effects by accumulating in living organisms. In this study, we obtained blood samples of 64 pigeons (32 females, 32 males) which were provided from pigeon breeders in particular months of each season (November 2016, February 2017, May 2017 ve August 2017) in central districts of Şanlıurfa (Eyyübiye, Haliliye, Karaköprü, and Suruç). All blood samples collected in the study were carried to laboratory and preserved until analysis time watching out cold-chain rules. Following homogenisation of the collected blood samples for one to two hours in roller mixer, 2 mL nitric acid (67% v/v) and 0.2 mL hydrogen peroxide (31% v/v) was added to each 1 mL of homogenates. Samples were transferred into porcelain crucible to resolve in microwave oven in two different steps. Microwave procedures were realized with a force of 400 W for five minutes in the first step and with a force of 800 W for five minutes in the second step. Samples were cooled and transferred into polyethylene tubes of 15 mL following resolution. Lead and cadmium levels of blood samples were analyzed with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. According the analysis lead levels were measured as 233.1 ± 25.7 ppb in Haliliye, 101.2 ± 29.7 ppb in Karaköprü, 81.3 ± 22.7 ppb in Eyyübiye, 48.1 ± 27.1 ppb in Suruç, whereas cadmium levels were measured as 30.6 ± 12.6 ppb in Haliliye, 35.7 ± 9.2 ppb in Suruç, 28.1 ± 8.7 ppb in Eyyübiye, 16.8 ± 4.1 ppb in Suruç.

Pb and Cd levels in the pigeons were higher in male than in the female. Lead level was high in Haliliye Central District where heavy traffic occurred and cadmium level was high in Karaköprü Central District where unconscious housing is present. In seasonal approach, lead was measured highest in Spring (May), while cadmium was higher in Spring and Autumn compared to other seasons. Conclusively, as a result of this study that is planned to determine air pollution in Şanlıurfa central districts, it is suggested that increase in public transport use, encouraging the use of different energy sources that wouldn't harm the

nature, dissemination of planned urbanization and enhancement of afforestation were required.

Keywords: *Blood, Cadmium, Lead, Pigeon.*

Giriş

Ağır metal ile kirlenme ekosistemin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü bölgesel ve yerel düzeyde etkileyen önemli bir unsurdur (Qadir ve ark., 2009). Metallerin canlı organizması birikmesi patolojik değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir. İmmun sistemin normal fizyolojik işlevinin devam ettirebilmesi için bakır ve çinko ihtiyaç duyulurken, yine aynı sistemde kadmiyum ve kurşun toksik etkiye sahiptir. Aslında elementlerin canlılar üzerinde zehirli etkisi alınan miktarına bağlıdır (Gasparini ve ark., 2014). Kuş popülasyonu insanların neden olduğu çevre kirliliğine duyarlıdır. Kuşların beslenmesi, büyümesi, yaşı, üreme ve tüy dökme gibi fizyolojik ve biyolojik işlemleri metal birikimi ve dağılımından etkilendiği için çevre kirliliğinin belirlenmesinde biyoindikatör olarak kullanılmaktadır (Berglund ve ark., 2011; Abduljaleel ve ark., 2012). Kuşlar genel olarak ağır metallere gıda, içme suyu, toprak, solunum ve deri yoluyla; tüylerini temizlerken maruz kalırlar (Dauwe ve ark., 2004; Malik ve Zeb, 2009; Binkowski ve Meissner, 2013; Carvalho ve ark., 2013). Yüksek miktarda ağır metal maruziyeti kuşlarda yumurta kabuğunu incelmeye, üreme yetersizliğine, bağışıklık sisteminin baskılanmasına, embriyolarda gelişim ve şekil bozukluğuna, ölüme neden olarak popülasyonun azalmasına yol açabileceği belirtilmiştir (Spahn and Sherry 1999; Burger and Gochfeld 2000). Ağır metaller oksidatif strese oluşturarak DNA hasarına sonuç olarak kuşlarda mutasyon görülme oranını artırabilmektedir (Bickham ve ark., 2000; Dahl ve ark., 2001; Eeva ve ark., 2006).

Dünya’da atmosferik hava kirliliğinin değerlendirilmesi için yabani kuşlar ve yarı evcil güvercinlerle ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Schilderman ve ark., 1997; İkemoto ve ark., 2005; Berglund ve ark., 2011; Binkowski ve Meissner, 2013; Kim ve Oh, 2013). Güvercinlerin yaşlarının uzun olması (18+ yıl) insanlarla aynı yaşam koşulları ve atmosferi paylaşmaları nedeniyle çevre kirliliğinin belirlenmesinde kullanılması uygundur. ABD, Bangladeş, Çin, Hollanda ve Kore’ de çevre kirliliğinin belirlenmesi amacıyla güvercinlerin kullanıldığı

araştırmalar yapılmıştır(Cui ve ark., 2013). Bu alışma, şanlıurfa Bykşehrinde farklı ilçelerde, mevsimlerde ve cinsiyette güvercin kan örneklerinde Kadmiyum ve Kurşun miktarları ICP-MS cihazı ile ölçülmesiyle alanında yapılan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Materyal-Metot

Bu çalışmada, hava kirliliğinin mevsimsel ve ilçe bazında değerlendirilmesi yapılarak şanlıurfa ilindeki güvercinlerin hava kirliliğinden ne derece etkilendiklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmasının yapılmasına 22/07/2016 tarihli ve 2016/24 sayılı karar ile Dollvet Hayvan Deneyleri Yerel Kurul Komitesi tarafından izin verildi. Araştırmamızda şanlıurfa ili sınırları içerisinde bulunan nüfusu yoğun olan Suruç, Haliliye, Karaköprü ve Eyyübiye ilçelerindeki güvercin yetiştiricilerinden temin edilen, sıhhi yem ile beslenen 64 adet güvercinin (32 dişi, 32 erkek olmak üzere) her mevsimi temsilen, Ağustos 2016 (Yaz), Kasım 2016 (Sonbahar), şubat 2017 (Kış) ve Mayıs 2017 (Bahar) aylarında olmak üzere 4 farklı mevsimde belirli miktarlarda kan örnekleri toplanmıştır. Bu kan örneklerinde, ICP-MS (İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) lm cihazlarının yardımıyla Kurşun ve Kadmiyum içerikleri tespiti Carneiro ve ark. (2015) kullandığı metotla yapılmıştır.

İstatistiksel Analizler: İstatistiki analizlerde SPSS 21,0 paket programı kullanılarak varyans analizleri yapılmış ve etkisi önemli bulunan özelliklere ait ortalamaların karşılaştırılmasında LSD oklu karşılaştırma testinden yararlanıldı.

Bulgular

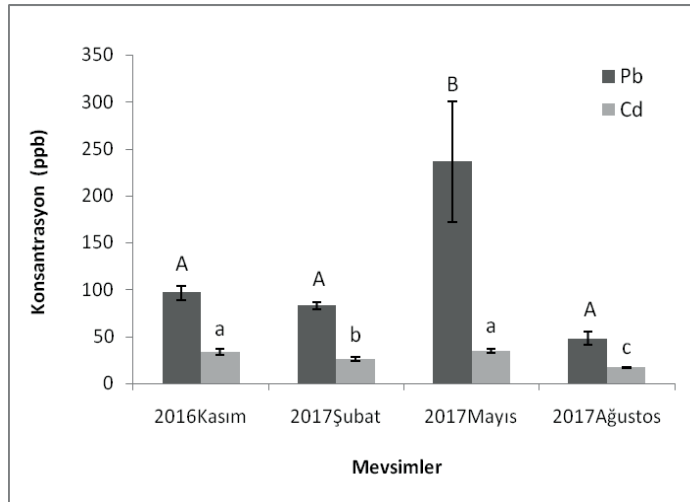
şanlıurfa ilinde; Haliliye, Eyyübiye, Karaköprü ve Suruç ilçelerindeki güvercin yetiştiricilerinden aldığımız 64 adet güvercin kan numunelerinde Kurşun; Haliliye 233.1 ± 25.7 ppb, Karaköprü 101.2 ± 29.7 ppb, Eyyübiye 81.3 ± 22.7 ppb, Suruç 48.1 ± 27.1 ppb, Kadmiyum; Haliliye 30.6 ± 12.6 ppb, Karaköprü 35.7 ± 9.2 ppb, Eyyübiye 28.1 ± 8.7 ppb, Suruç 16.8 ± 4.1 ppb olarak ölçülmüştür. Yapılan lmler sonucunda Haliliye bölgesinde Kurşun miktarı diğer ilçelerden yüksek bulunmuştur. Tablo 1. şanlıurfa Merkez ilçelerine ait Cd ve Pb miktarının cinsiyet göre ortalama ve standart sapmaları ($\pm SS$) göre sırasıyla verilmiştir. Grafik 1. şanlıurfa Merkez ilçelerine ait Cd ve Pb miktarlarının mevsimsel miktarları verilmiştir.

Tablo 1. Şanlıurfa Merkez İlçelerine ait Cd ve Pb miktarının cinsiyet göre ortalama ve standart sapmaları ($\pm$ SS) göre sırasıyla verilmiştir.

CİNSİYET	Dişi	ERKEK
Kurşun (ppb)	100,75 $\pm$ 22,17	128,81 $\pm$ 29,72
Kadmiyum (ppb)	26,64 $\pm$ 1,94	29,35 $\pm$ 2,10

Alınan kan örneklerinde erkek hayvanlarda Cd ve Pb miktarları dişi hayvanlardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Grafik 1. Şanlıurfa Merkez İlçelerine ait Cd ve Pb miktarlarının mevsimsel miktarları.



Şanlıurfa merkez ilçelerde alınan kan örneklerinde Kasım, Şubat ve Ağustos aylarında Pb miktarı benzerdir. Ancak Bahar, mevsiminin temsilcisi olarak seçilen Mayıs ayında diğer aylara istatistiki olarak fark önemlidir. Mayıs ayında toplanan kan örneklerinde kurşun miktarı diğer aylara göre yüksek çıkmıştır. Cd miktarı Kasım ve Mayıs ayında benzer; Şubat ve Ağustos aylarında ise istatistiki olarak fark önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Cd miktarı Kasım ve Mayıs aylarında diğer aylardan yüksek çıkmıştır.

Tartışma

Şanlıurfa merkez ilçeleri arasında yoğun araç trafiğinin yaşandığı Haliliye ilçesinde güvercin kanlarında Pb miktarı (233.1 ± 25.7 ppb) yüksek çıkmıştır. Schilderman ve arkaları (1997)

güvercin kanlarında kurşun miktarını yoğun araç trafiği olan bölgelerde 253 ± 182 ppb, orta dereceli araç trafiği olan bölgelerde 73.3 ± 18.6 ppb, Maastricht 33 ± 30.4 ppb ve Assen de 26.6 ± 17.9 ppb olarak tespit etmişlerdir. Elabi ve ark. (2010), Fas da güvercin kanlarında P miktarını Kamra 16.4 ± 1.60 ppb, şehir merkezinde 22.12 ± 2.56 ppb, Oulja 31.33 ± 2.85 ppb ve Alla Behraoui de 11.17 ± 2.14 ppb; Kouddane ve ark. (2016,) yine Fas da güvercin kanlarında Pb miktarını endüstriyel bölgelerde 206.36 ± 34.97 ppb, şehir merkezinde 167.54 ± 31.65 ppb, orta araç trafiği olan bölgelerde 68.98 ± 22.58 ppb ve daha az kirli bölgelerde 25.14 ± 6.02 ppb olarak tespit etmişlerdir. Scheuhammer ve ark. (1999), kurşun maruziyetinin belirlenmesinde örnek olarak kanın kullanılması ile ilgili yaptıkları çalışmada kanda kurşun miktarının 48 ± 33 ppb olmasının normal, 150 ppb miktarının ise anormal kuşun maruziyetini belirtmediğini ancak kanda 200 ppb miktarında kurşun bulunmasının hafif kurşun maruziyeti olarak değerlendirilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmalarla karşılaştırıldığında Haliliye ilçesindeki güvercin kanlarındaki Pb miktarı Schilderman ve ark. (1997), ve Kouddane ve ark. (2016), tarafından yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Her iki yazarda Pb miktarının bu denli yüksek çıkmasını yoğun araç trafiğinden kayanaktanmış olabileceğini ifade etmişlerdir. Haliliye ilçesi Şanlıurfa ilinin en büyük merkez ilçesi olması yanısıra şehir trafiğinin de en yoğun yaşandığı bölge olması nedeniyle Pb miktarı diğer ilçelerden yüksek çıkmıştır.

Pain (1996), Franson (1996), Friend ve Franson (1999) kan Pb miktarının 0.5-1 ppm (yaklaşık 2.6- 5.2 ppm) olduğunda biyolojik işlevlerin bozulduğu ve klinik belirtilerin ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Beyer ve ark. (2004) bir çalışmada ötücü kuşlarda kanda Pb miktarının artmasıyla ilişkili olarak delta-aminolevulinik asit dehidratazı % 50'den fazla inhibe ettiğini ama Cd maruziyetinin bu olaya etki etmediğini bulmuşlardır. Kanda Pb miktarının 400 ppb üzerine çıkması kuşlarda fizyoloji işlevleri bozduğu (Eiser, 1988) ve 200 ppb üzerinde delta-aminolevulinik asit dehidratazın engellenmesine bağlı subklinik belirtiler ortaya çıktığı belirtilmiştir (Buekers ve ark., 2009).

Kanda kadiyum yoğunluğunu belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Schilderman ve ark. (1997), Amsterdam da 4 farklı bölgesinde yaşayan güvercin kanlarında Cd miktarını bölgelere göre sırasıyla yoğun araç trafiği olan yerde 5.24 ± 2.48 ppb, orta dereceli araç trafiği

olan yerde 6.20 ± 2.96 ppb, Maastricht de 7.58 ± 2.60 ppb ve Assen de 6.67 ± 2.0 ppb olarak tespit etmişlerdir. Elabidi ve ark. (2010), Fas ta güvercin kanlarında yaptıkları bir çalışmada Kamra da 1.58 ± 0.35 ppb, şehir merkezinde 2.24 ± 0.3 ppb, Oulja da 1.13 ± 0.3 ppb ve Allal Behraoui de 0.34 ± 0.04 ppb miktarında Cd belirlemişlerdir. Kouddane ve ark. (2016), güvercin kanlarında Fas ta yaptıkları çalışmada Cd miktarını az kirli bölgelerde 0.89 ± 0.34 ppb, orta dereceli araç kirliği olan yerlerde 2.48 ± 1 ppb, şehir merkezinde 6.2 ± 2.71 ve Endüstriyel bölgelerde 5.97 ± 2.27 ppb tespit etmişlerdir. Bu çalışmada Cd miktarı en fazla Haliliye ilçesinde (35.7 ± 9.2 ppb) ölçülmüştür. Mevcut çalışma ve önceki yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında Haliliye ilçesinde Cd miktarı çok yüksek bulunmuştur.

Farklı kuş türlerine ait kan örneklerinde Cd ve Pb miktarı belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Brumbaugh ve ark. (2010), Aufesi- Alaska bölgesinde yakalanan America dağ serçesi ($n=1$) ve kuzey ketenkuşlarında ($n=3$) yaptıkları çalışmada sırasıyla Cd miktarını 140 ppb ve 4 ppb (iki kuş türünde ortalama 9 ± 6 ppb), Pb miktarını ise sırasıyla 520 ppb ve 60 ppb (iki kuş türünün ortalaması 290 ± 320 ppb), Delong dağ bölgesel ulaşım sisteminde yola yakın yerlerde yakalanan Amerikan ağaç serçelerinde ($n=2$) ve kuzey ketenkuşlarında ($n=6$) Cd miktarını sırasıyla 4 ppb ve 7 ppb, Pb miktarını sırasıyla 3 ppb ve 30 ppb, New heart- Alaska bölgesinde America dağ serçesi ($n=2$) ve Savannah serçelerinde ($n=6$) Cd miktarını sırasıyla 14 ppb ve 20 ± 20 ppb, Pb miktarını sırasıyla 490 ppb ve 380 ± 140 ppb (iki türün ortalaması 18 ± 5 ppb) olarak belirlemişlerdir. Tsipoura ve ark. (2017), Delaware eyaletinde- A.B.D. göç eden kuşların (Büyük kumkuşu, deniz çulluğu ve kızıl bacak) mola yerlerinin erken dönemde kan örneklerinde Büyük kumkuşlarında ($n=15$) Cd miktarı sırasıyla 3.94 ± 1.37 ppb, Pb 75.38 ± 15.52 ppb ve geç dönemde Cd miktarı sırasıyla 1.98 ± 0.41 ppb, Pb 105.40 ± 18.78 ppb; erken dönemde kan örneklerinde deniz çulluğu ($n=15$) Cd miktarı sırasıyla 2.54 ± 1.42 ppb, Pb 145.00 ± 12.56 ppb ve geç dönemde Cd miktarı sırasıyla 1.49 ± 0.41 ppb, Pb 33.60 ± 4.05 ppb; erken dönemde kan örneklerinde kızıl bacak ($n=15$) Cd miktarı sırasıyla 2.01 ± 0.80 ppb, Pb 42.39 ± 8.42 ppb ve geç dönemde Cd miktarı sırasıyla 1.59 ± 0.55 ppb, Pb 77.27 ± 18.57 ppb olara belirlenmiştir. Burger ve Gochfeld (1997) kuzeybatı Minnesota da yaşayan genç ve yaşlı martılardan alınan kan örneklerinde Cd ve Pb miktarlarını analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda genç martılarda ($n=14$) Cd miktarını 99 ± 16 ppb ve Pb miktarını 12 ± 3 ppb, yaşlı martılarda ppb, yaşlı martılarda ($n=14$) Cd miktarını 6 ± 1 ppb ve Pb miktarını 29 ± 10 ppb olarak tespit

etmişlerdir. Newyork körfezinde 1993 yılında yakalanan genç martılarda Cd miktarını 9 ± 1 ppb, Pb miktarını 94 ± 5 ppb; yine 1994 yakalanan genç martılarda Cd miktarını 47 ± 12 ppb, Pb miktarını 176 ± 54 ppb yine aynı yıl yaşlı martılarda Cd miktarı 16 ± 7 ppb Pb miktarı 233 ± 61 ppb olarak tespit edilmiştir (Burger ve Gochfeld,1997).

Kuş türlerinde ağır metal miktarlarının farklı olmasında ağır metallerin kuşlarda emilim oranlarının farklı olması yanısıra farklı çakıl veya kum tercih etmelerinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Beyer ve ark., 1994).Mevsimsel olarak Bahar mevsiminde hem Cd hem de Pb miktarı diğer mevsimlerden yüksek olduğu belirlenmiştir. Cai ve Calısı (2016) Newyork şehrinde farklı mevsimlerde çeşitli mahallelerde yetiştirilen güvercinlerden toplanan kan örneklerinde Pb miktarı yaz mevsiminde diğer mevsimlere göre en fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada kurşun miktarının yaz mevsiminde yüksek çıkmasını güvercinlerde mevsime bağlı aktivasyonlarının artmasına bağlı atmosferdeki kurşuna daha fazla maruz kaldıkları neden olarak gösterilmiştir. Mevcut çalışmada Cd ve Pb miktarı Bahar mevsiminde yüksek çıkmasının nedeni yine mevsimsel aktivasyonların artmasına bağlanabilir.

Sonuç

Trafiğin yoğun yaşandığı Haliliye merkez ilçesinde kurşun miktarı; bilinçsiz yapılaşmanın yaşandığı merkez ilçe Karaköprüde ise Cd miktarı yüksek bulundu. Mevsimsel olarak bahar (Mayıs) mevsiminde Pb; Sonbahar ve bahar mevsiminde Cd miktarının diğer mevsimlerden daha yüksek olduğu belirlendi. Şanlıurfa merkez Karaköprü, Haliliye, Suruç ve Eyyübiye ilçelerinde hava kirliliğinin belirlenmesine yönelik yapılan bu çalışma sonucunda, toplu taşıma araç kullanımının arttırılması, doğaya zarar vermeyen farklı enerji kaynaklarının kullanılmasının teşvik edilmesi, planlı kentleşme yaygınlaştırılması ve ağaçlandırılmanın arttırılması gerekmektedir. Isıtılma amaçlı kullanılan (kömür, odun gibi) yakıtların yerine doğal elde edilen pirina v.b. kullanımı teşvik edilmeli ve yaygınlaştırılmalıdır.

Kaynaklar

1. Abduljaleel S. A., Shuhaimi-Othman M., Babji A. Assessment of trace metals contents in chicken (*Gallus gallus domesticus*) and quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues from Selangor (Malaysia). Environ. Sci. Technol 2012; 5(6): 441-451.

2. Berglund Å. M., Koivula M. J., Eeva T. Species-and age-related variation in metal exposure and accumulation of two passerine bird species. *Environ Pollut* 2011; 159(10): 2368-2374.
3. Beyer W. N., Connor E. E., Gerould S. Estimates of soil ingestion by wildlife. *J Wildl Manag* 1994;58: 375–382.
4. Beyer W. N., Dalgarn J., Dudding S., French J. B., Mateo R., Miesner J., Sileo L., Spann J. Zinc and lead poisoning in wild birds in the tri-state mining district (Oklahoma, Kansas, and Missouri). *Arch Environ Contam Toxicol* 2004; 48, 108–117.
5. Bickham J. W., Sandhu S., Hebert P. D., Chikhi L., Athwal R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res /Rev Mutat* 2000; 463(1): 33-51.
6. Binkowski L. J, Meissner W. Levels of metal in blood samples from Mallards (*Anas platyrhynchos*) from urban ares in Poland. *Environ Pollut* 2013; 178: 336-342.
7. Binkowski Ł. J., Meissner W. Levels of metals in blood samples from Mallards (*Anas platyrhynchos*) from urban areas in Poland. *Environ Pollut* 2013;178: 336-342.
8. Brumbaugh W.G., Mora M.A., May T.W., Phalen D. N. Metal exposure and effects in voles and small birds near a mining haul road in Cape Krusenstern National Monument, Alaska. *Environ Monit Assess* 2010; 170: 73-86.
9. Buekers J, Redeker ES, Smolders E Lead toxicity to wildlife: derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Sci Total Environ* 2009; 407:3431–3438.
10. Burger J., Gochfeld M. Metal levels in feathers of 12 species of seabirds from Midway Atoll in the northern Pacific Ocean. *Sci Total Environ* 2000;257(1): 37-52.
11. Burger J., Gohnfeld M. Heavy metal and selenium levels in birds at agassiz national wildlife refuge, minnasota: food chain differeces. *Environ Monit Assess.* 1996;43(3):267-82.
12. Cai F, Calisi R.M. Seasons and neighborhoods of high lead toxicity in New York City, The feral pigeon as a bioindicator *Chemosphere* 2016; 161: 274-279.
13. Carneiro M., Colaço B., Brandão R., Azorín B., Nicolas O., Colaço J., Pires M.J., Agusti S., Casas-Diaz E., Lavin S., Oliveira P. A. Assessment of the exposure to heavy metals in Griffon vultures (*Gyps fulvus*) from the Iberian Peninsula. *Ecotox Environ Safe* 2015; 113: 295-301.
14. Carvalho P. C., Bugoni L., McGill R. A., Bianchini A. Metal and selenium concentrations in blood and feathers of petrels of the genus *Procellaria*. *Environ Toxicol Chem* 2013; 32(7): 1641-1648.
15. Cui J., Wu B., Halbrook R. S., Zang S. Age-dependent accumulation of heavy metals in liver, kidney and lung tissues of homing pigeons in Beijing, China. *Ecotoxicology* 2013; 22(10): 1490-1497.
16. Dahl C. R. Cytochrome b sequences in black-crowned night-herons (*Nycticorax nycticorax*) from heronries exposed to genotoxic contaminants. *Ecotoxicology* 2001;10(5): 291-297.
17. Dauwe T., Janssens E., Bervoets L., Blust R., Eens M. Relationships between metal concentrations in great tit nestlings and their environment and food. *Environ Pollut* 2004;131(3): 373-380.
18. Eeva T., Belskii E., Kuranov B. Environmental pollution affects genetic diversity in wild bird populations. *Mutat. Res /Rev Mutat* 2006; 608(1): 8-15.
19. Eisler R. Lead hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *Contam Hazards Rev* No. 14. report, 1988.
20. Elabidi A., Fekhaoui M., Ghouli A., Piervittori R., Yahyaoui A Use of pigeon as bioindicators of air pollution from hevzy metals at Rabat-Sale (Morocco). *Centro. Italiano studi ornitologici, Avocetta* 2010;34:29-34.
21. Franson J. C. Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl In: *Environ Contam Wildl: Interpreting Tissue Concentrations*. Beyer, NW, Heinz, GH and Redmon-Norwood, AW." 1996: 265-279.

22. Friend M., Franson J. C. Field manual of wildlife diseases: General field procedures and diseases of birds. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Information and Technology Report 1999–001, 1999; Washington, D.C.
23. Gasparini J., Jacquin L., Laroucau K., Vorimore F., Aubry E., Castrec-Rouëlle M., Frantz A. Relationships between metals exposure and epidemiological parameters of two pathogens in urban pigeons. *Bull Environ Contam Toxicol* 2014; 92(2): 208-212.
24. Ikemoto T., Kunito T., Tanabe S., Tsurumi M., Sato F., Oka N. Non-destructive monitoring of trace element levels in short-tailed albatrosses (*Phoebastria albatrus*) and black-footed albatrosses (*Phoebastria nigripes*) from Torishima Island, Japan using eggs and blood. *Mar Pollut Bull* 2005;51(8-12): 889-895.
25. Kim J., Oh J. M. Assessment of trace metals in four bird species from Korea. *Environ Monit Assess* 2013;185(8): 6847-6854.
26. Kouddane N., Mouhir L. Fekhaoui M., Elabidi A., Benaakame R. Monitoring air pollution at Mohammedia (Morocco): Pb, Cd and Zn in the blood of pigeons (*Columba livia*) *Ecotoxicology* 2016; 25:720-726.
27. Malik R. N., Zeb N. Assessment of environmental contamination using feathers of *Bubulcus ibis* L., as a biomonitor of heavy metal pollution, Pakistan. *Ecotoxicology* 2009; 18(5): 522-536.
28. Pain D. J. Lead in waterfowl. In W. N. Beyer, G. H. Heinz, & A. W. Redmond-Norwood (Eds.), *Environmental contaminants in wildlife: Interpreting tissue concentrations* 1996; (pp. 251–264). Boca Raton: Lewis.
29. Qadir A., Malik R. N. Assessment of an index of biological integrity (IBI) to quantify the quality of two tributaries of river Chenab, Sialkot, Pakistan. *Hydrobiologia* 2009; 621: 127–153.
30. Sceuehammer A., Rogers C., Bond D. Elevated lead exposure in American woodcock (*Scolopax minor*) in eastern Canada. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999;36 (3): 334-340.
31. Schilderman P. A., Hoogewerff J. A., van Schooten F. J., Maas L. M., Moonen E. J., Van Os B. J., van Wijnen J.H, Kleinjans J. C. Possible relevance of pigeons as an indicator species for monitoring air pollution. *Environ Health Perspect* 1997;105(3): 322-330.
32. Schilderman PAEL, Hoogewerff J.A., Schooten F.J., Maas L.M. moonen EJC os BJH Possible relevance of pigeons as an indicator species for monitoring air pollution. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 322-329.
33. Spahn S. A., Sherry T. W. Cadmium and lead exposure associated with reduced growth rates, poorer fledging success of little blue heron chicks (*Egretta caerulea*) in south Louisiana wetlands. *Archives of Environ Contam Toxicol* 1999; 37(3):377-384.
34. Tsipoura N., Burger J., Niles L., Dey A., Gochfeld M., Peck M., Mizrahi D.; Metal levels in shorebird feathers and blood during migration through Delaware bay. *Arch Environ Contam Toxicol* 2017 72: 562-574.

Ratlarda Akut Kadmium Toksikasyonunda Merkezi Sinir Sisteminde GFAP

Ekspresyonlarının Araştırılması

İsmail BOLAT¹ Yavuz Selim SAĞLAM¹ Serkan YILDIRIM¹ Gizem ESER¹ Muhammed Bahaettin

DÖRTBUDAK¹

¹Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE

Özet: Ağır metaller tüm dünyada yaygın görülen geçmişten bugüne kadar süregelen önemli sağlık sorunlarından birisidir. Bu toksik metallerden birisi de kadmiumdur. Bu ağır metal, araç trafiğinin çok yoğun olduğu otoyol kenarlarında, sanayileşmenin fazla olduğu bölgelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Kadmium vücuda sindirim, solunum ve deri yoluyla alınır. Kadmiumun büyük bir kısmı karaciğer ve böbrekte az bir kısmı ise dalakta birikir. Bu organların dışında kadmiumun kan beyin bariyerini geçebilme yeteneği sayesinde beyinde de birikip ciddi nörolojik hasarlara neden olduğu da bildirilmiştir. Bu çalışmada kadmiumun merkezi sinir sisteminde oluşturduğu hasarı ve bu hasarda beyin dokusunda GFAP ekspresyonunun düzeylerinin nasıl etkilendiğini araştırmak amaçlandı. Bu amaçla, on altı adet 200-220 gr ağırlığında Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar rastgele her grupta sekiz adet rat olacak şekilde iki gruba ayrıldı. 1. Grup kontrol grup, adlibitum olarak standart pelet yem, içme suyu ve intra peritoneal olarak serum fizyolojik uygulandı. Cd Grubu: fizyolojik serum uygulamasının gerçekleşmesinden bir saat sonra, bu grup IP enjeksiyonu ile tek bir doz halinde 0.025 mmol/kg Cd uygulandı. Deneme sonunda tüm ratlar ketaminle anesteziye alınarak sakrifiye edildi, beyin dokuları % 10 formalin solusyonuna alındı. Alınan beyin dokuları histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelendi. Histopatolojik bulgularda beyin dokusunda kontrol grup normal histolojik görünümde olduğu tespit edilirken Cd grupta beyinde nöronlarda nekroz ve dejenerasyon, paraneşim ve meningeal damarlarda hiperemi tespit edildi. İmmunhistopatolojik bulgularda beyin dokularında kontrol grubunda çok hafif düzeyde GFAP ekspresyonu gözlenirken Cd grubunda şiddetli düzeyde GFAP ekspresyonu görüldü. Yapılan bu çalışma, GFAP ekspresyonunun artışı Cd toksisitesinin patogenezi anlamada önemli bir çalışma olmuştur, sonra ki yapılacak olan çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: GFAP, Histopatoloji, Kadmium.

Investigation of GFAP Expression in The Central Nervous System in Acute Cadmium Toxication in Rats

Abstract: Heavy metals are one of the most important health problems that are common in the world. One of these toxic metals is cadmium. This heavy metal is present at high concentrations in areas where industrial traffic is high, at highways where vehicle traffic is intense. Cadmium is taken up through the digestive, respiratory and skin of the body. Most of the cadmium accumulates in the liver and kidney and a small part in the spleen. Apart from these organs, it has been reported that cadmium accumulates in the brain and causes serious neurological damage thanks to its ability to cross the blood brain barrier. The aim of this study was to investigate the effects of cadmium on central nervous system damage and the effects of GFAP expression on brain tissue. Sixteen male Wistar albino rats weighing 200-220 g were used for this purpose. Rats were randomly divided into two groups with eight rats in each group. 1.Group control group, as adlibitum, standard pellet feed, drinking water and intra-peritoneal saline was applied. Cd Group: One hour after physiological serum administration, this group received 0.025 mmol / kg Cd as a single dose with IP injection. At the end of the experiment, all rats were anesthetized with ketamine and were sacrificed. Brain tissues were taken to 10% formalin solution. Brain tissues were examined histopathologically and immunohistochemically. In control group, histopathological findings revealed normal histologic appearance in brain tissue. Cd group showed necrosis and degeneration in neurons, hyperemia in parenchymal and meningeal vessels. A very mild level of gfap expression was observed in brain tissue in control group and severe GFAP expression in Cd group. We believe that it will make significant contributions to future studies and increased expression of GFAP has been an important study in understanding the pathogenesis of Cd toxicity.

Keywords: *Cadmium, GFAP, Histopathology.*

GİRİŞ

Gelişen dünyada sanayii endüstrisindeki yenilikler ile hayatımızda pek çok kolaylıklar sağlanmıştır. Fakat bu gelişim beraberinde pek çok sağlık problemini de ortaya çıkarmasına

sebebi olmuştur. Bu sağlık problemlerinin başlıca nedenleri sanayi atıkları olan demir, kurşun, arsenik, bakır ve kadmium gibi ağır toksik metallerdir. Kadmium (Cd) canlı organizmalar üzerinde karsinojenik, mutajenik ve toksik etkileri bulunan ağır bir metaldir. Cd vücuda sindirim, solunum ve deri yoluyla alınır. Sindirim yoluyla alınan Cd hayvan türlerine göre % 0,5-12 oranında sindirim kanalında emilir. Cd buharının neredeyse tamamı akciğerlerden emilir. Bu da bize sigara da bulunan bu elementi önemli kılar. Cd tuzları ise deri vasıtasıyla % 4' e kadar emilebilir (Baldwin ve Marshall, 1999). Cd vücuda girdikten sonra kanda bulunan proteinlere ve kan hücrelerine bağlanarak vücutta taşınır. Cd' nin büyük bir kısmı karaciğer ve böbrekte az bir kısmı ise dalakta birikir (Thévenod, 2003). Bu organların dışında Cd' nin kan beyin bariyerini geçebilme yeteneği sayesinde beyinde de birikip ciddi nörolojik hasarlara neden olduğu da bildirilmiştir (Li, 2016). Kadmium ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda Parkinson (Okuda ve ark., 1997) ve Alzheimer (Panayi ve ark., 2002; Notarache ve ark., 2014) hastalığının meydana gelmesinde önemli bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır.

Merkezi sinir sistemi 2 farklı hücre grubundan oluşur. Birincisi nöronlar, ikincisi ise astrositler, oligodentrositler, ependimal hücreler ve mikrogliaların oluşturduğu glial hücrelerdir. Bu glial hücreler nöronların desteklenmesinde oldukça büyük öneme sahiptirler. Özellikle astrositler kan beyin bariyeri ile nöronlar arasında köprü görevi görerek nöronlara büyük bir destek sağlamaktadırlar (Bacci ve ark., 1999; Terni ve ark., 2016; Dimou ve ark., 2014). Yabancı maddelerinde beyne girişini engellerler. Ayrıca bazı toksik metallerin de sitotoksik etkilerini engellerler (Tiffany-Castiglioni ve ark., 1989). Glial fibril asidik protein (GFAP) olgun astrositlerde ana ara filament olan bir proteindir. Aynı zamanda astrositlerin gelişimi sırasında da astrositlerin iskeletinin oluşmasında ve birçok fonksiyonunda rol alan önemli bir proteindir (Eng ve ark., 2000; Middeldorp ve Hol, 2011). Deneysel çalışmalarda; alerjik ensefalomyelitis, diklorometan, trichloroethane, xylene, dichloromethane, triethyl tin methyl mercury, colchicine, and kainate, 6-hydroxydopamine, 1-methyl- 4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), ethanol ve 3,3' iminodipropionitrile gibi nörotoksik çalışmalarda GFAP ekspresyon düzeyleri hassas bir biomarker olarak saptandığı bildirilmiştir (McLendon ve Bigner, 1994). Scrapie, Alzheimer, Creutzfeldt-Jacob Disease, ratlarda gri maddede 6-hydroxydopamine lezyonlarında, ratlarda cerebral kortekste meydana gelen

mekanik lezyonlarda GFAP miktarında artış olduğu bildirilmiştir (McLendon ve Bigner, 1994) . Yapılan bazı çalışmalarda, Cd, Tl, Zn ve Pb gibi ağır metallere maruz bırakılan hayvanlarda ağır metallerin glialarda biriktiği ve toksik etkileri sonucunda glial hücrelerde morfolojik değişiklikler oluşturduğu bildirilmiştir (Hossain ve ark., 2009, Rai ve ark., 2010).

Kadmiumun kan beyin bariyerini geçebilme yeteneği sayesinde beyinde birikip ciddi nörolojik hasarlara neden olduğu da bildirilmiştir. Yapılan literatür taramalarında. kadmiumun beyinde hücrel ve biyokimyasal etkileri birçok araştırmada ortaya konmasına rağmen, maalesef mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Favorito ve ark., 2017). Bu nedenle Cd toksikasyonunun patogenezi anlamak amacıyla Cd toksikasyonuna bağlı oluşan beyin hasarında immunohistokimyasal olarak GFAP ekspresyon düzeylerinin nasıl etkilendiğini araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Yapılan araştırmada, 200–220 gr canlı ağırlığa sahip, 16 adet Wistar-albino ırkı, erkek ratlar kullanıldı. Ratlar Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) ünitesinden temin edildi ve denemeye alınmadan önce ortama adaptasyonlarının sağlanması amacıyla bir hafta süreyle ratlar bekletildi. Ratlar adaptasyon süresince pelet yem ve su adlibitum beslenmeye tabi tutuldular. Çalışmada Cd kaynağı olarak $CdCl_2 \cdot 5H_2O$ (Kadmiyumklorürpentahidrat, CAS NO: 7790-78-5, Sigma) kullanıldı. Denemeye alınan hayvanlar her grupta n=8 adet olmak üzere toplam 2 gruba ayrıldı.

Grup I: Kontrol grubuna standart pelet yem, içme suyu ve intraperitoneal (İ.P.) olarak serum fizyolojik (SF) verildi. Grup II: Cd 0.025 mmol/kg olacak şekilde İ.P. olarak tek doz verildi (Yildirim ve ark., 2017).

Tüm maddeler SF içinde çözülerek hazırlandı. Grup II'ye 5 gün boyunca SF uygulandı, 5. Gün SF uygulamasından 1 saat sonra Cd İ.P. olarak uygulandı. Son uygulamadan 24 saat sonra doku örnekleri alınmak üzere sonlandırıldı. 6. günde ratlardan beyin doku örnekleri alındı. Beyin doku örnekleri % 10' luk formalin içerisine alınıp histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelendi.

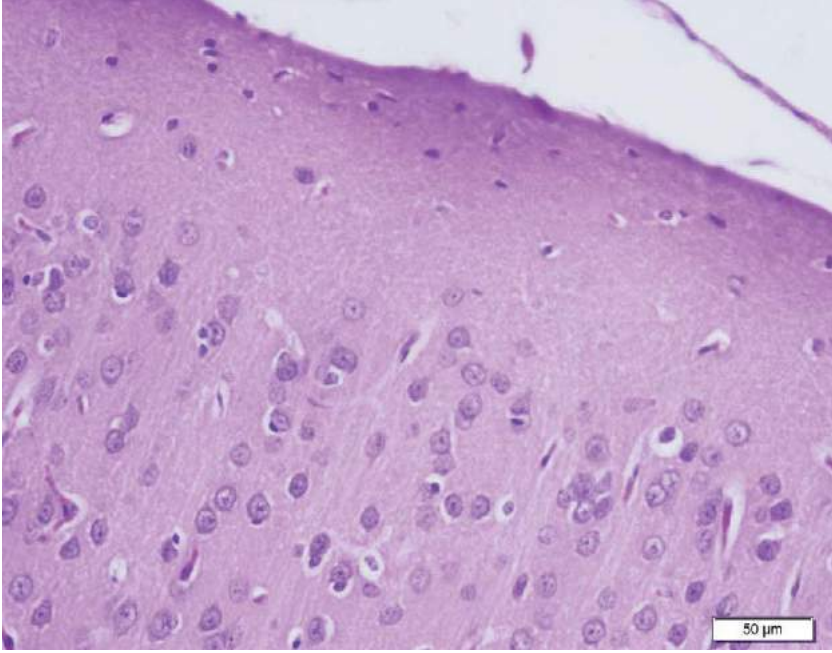
Histopatolojik İnceleme: Yapılan nekropsi sonucu histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildi. Rutin doku takip işlemleri sonucu parafin bloklara gömüldü. Her blokta 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi (Leica DM 1000, Germany). Kesitler immün pozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal İnceleme: İmmünoperoksidaz inceleme amacıyla adezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan tüm kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, deparafinize ve dehidre edildi. Daha sonra distile suda 5 dk yıkandı. Fosfat buffer solüsyonu (PBS, pH 7.2) ile 5dk yıkanıp, % 3'lük H₂O₂ de 10 dk tutularak, endojen peroksidaz inaktive edildi. PBS de 5-10 dk yıkandıktan sonra, nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için tüm primer ve sekonder antikorlarla uyumlu olan Protein blok ile 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda doku kesitleri üzerinde kalan blok solüsyonunun fazlası döküldükten sonra yıkanma yapılmadan primer antikorlar (GFAP) ve kontrol grubunda PBS damlatıldı. Primer antikora uygun olarak 1 saat oda sıcaklığında ya da 1 gece +4°C'de bekletildi. PBS ile 2 kez 5'er dk yıkanıp, biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10-30 dk. inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz da 10-30 dk. bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere 3-3' Diaminobenzidine (DAB) kromojen, damlatılarak kromojeni almasına göre 5-10 dk. bekletildi. Zemin boyanması için Mayer's hematoksilende 1-2 dk. tutulduktan sonra musluk suyunda yıkandı. Daha sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek lamelle kapatıldı ve ışık mikroskobu (Leica DM 1000) ile incelendi. Kesitler immün pozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz: Çalışmalar sonunda elde edilen kantitatif değerler SPSS 20.00 istatistik veri programında iki ve ikiden fazla bağımsız grupların istatistiksel analizinde kullanılan one-way ANOVA sonrası Duncan testi uygulanarak değerlendirildi.

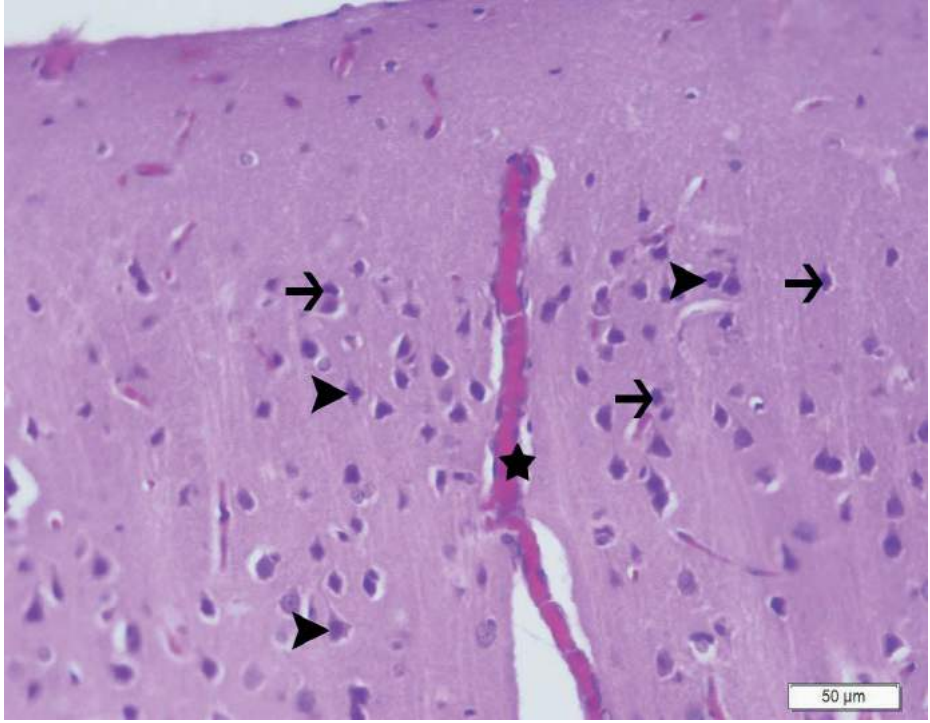
Bulgular

Histopatolojik Bulgular: Kontrol grup; beyin dokularının histopatolojik incelenmesinde, normal histolojik görünümde olduğu tespit edildi (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrol grup, beyin dokusu, normal histolojik görünüm, H&E, Bar:50µm.

Cd grup; beyin dokularının histopatolojik incelenmesinde, nöronlarda dejenerasyon ve nekroz, paraneşim ve meningeal damarlarda hiperemi tespit edildi (Şekil 2). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı fark ($p<0,05$) tespit edildi. Histopatolojik bulgular Tablo 1 de özetlendi.



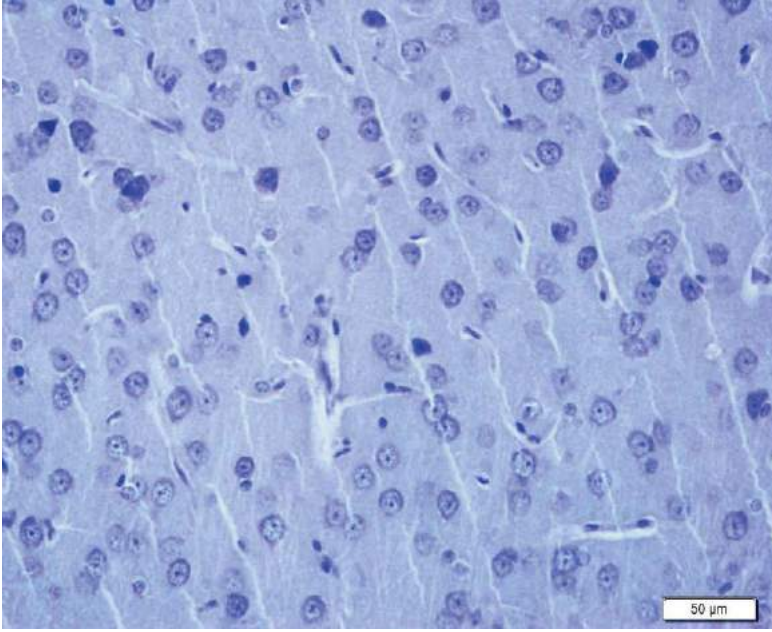
Şekil 2. Cd grup, beyin dokusu, nöronlarda dejenerasyon (ok başları), nekroz (oklar), damarlarda hiperemi (yıldız), H&E, Bar:50µm.

İmmunohistokimyasal Bulgular: Kontrol grup; beyin dokularının immunohistokimyasal incelenmesinde, negatif GFAP ekspresyonu belirlendi (Şekil 3).

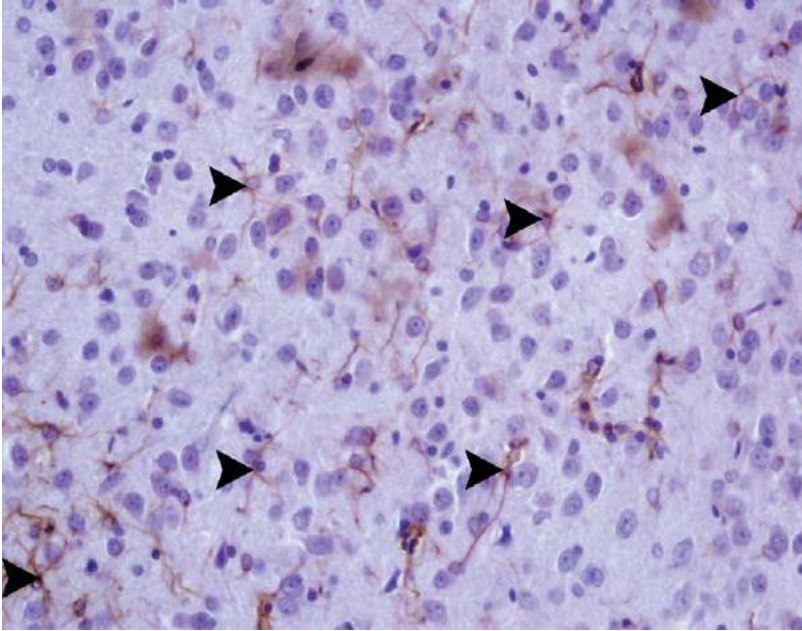
Cd grup; beyin dokularının immunohistokimyasal incelenmesinde, astrositlerde şiddetli düzeyde GFAP ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$) tespit edildi. İmmunohistokimyasal bulgular tablo 1 de özetlendi.

Tablo 1. Beyin dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguların skorlanması.

	Kontrol grup	Cd grup
Nöronlarda dejenerasyon,	-	+++
Nöronlarda nekroz	-	++
Meningeal ve paransim damarlarda hiperemi	-	+++
GFAP	-	+++



Şekil 1. Kontrol grup, beyin dokusu, negatif GFAP ekspresyonu, IHC-P, Bar:50µm.



Şekil 2. Cd grup, beyin dokusu, şiddetli düzeyde GFAP ekspresyonu (ok başları), IHC-P, Bar:50µm.

Tartışma

Cd'un sanayide oldukça yaygın olarak kullanılmasına bağlı olarak çevrede birikip insan sağlığına ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Cd kaynağı olarak en önemli kirleticiler olarak volkanik dağlar olduğu bildirilmektedir. Cd gerek bilerek gerekse istenmeden kontamine yiyecekler, su, toprak, toz veya hava ile de vücuda alınabilir (Meeker ve ark., 2008). Cd vücuda sindirim, solunum ve deri yoluyla alınır (Baldwin ve Marshall, 1999). Cd vücuda girdikten sonra kanda bulunan proteinlere ve kan hücrelerine bağlanarak vücutta taşınır. Cd'nin büyük bir kısmı karaciğer ve böbrekte birikir (Thévenod, 2003). Bu organların dışında Cd'nin kan beyin bariyerini geçebilme yeteneği sayesinde beyinde de birikip ciddi nörolojik hasarlara neden olduğu da bildirilmiştir (Li, 2016).

Cd karaciğerde şiddetli nekrotik hepatitis, damarlarda hiperemi, portal alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonu (Yildirim ve ark., 2017), günlük (1 mg/kg) (CdCl₂) uygulanan hayvanlarda yağ dejenerasyonu, hidropik dejenerasyon ve fibrosiz (Karaca ve ark., 2014) sebep olduğu bildirilmiştir. Böbreklerde medulla ve kortekste şiddetli intertubuler kanamalara ve tubül epitellerinde dejenerasyon ve nekroza sebep olduğu ortaya konmuştur (Yildirim ve ark., 2017). Beyinde ise 5 mg/kg dozunda Cd uygulanan ratlarda, nöronlarda atrofi, dejenerasyon ve nekroz (El-Sokkary ve ark., 2011), *Podarcis siculus*'a 7 gün boyunca günde 2 mg/kg Cd uygulanan beyin dokusunda yaygın ödeme sebep olduğu gösterilmiştir (Favorito ve ark., 2017). Yapılan çalışmada literatürle uyumlu olarak Cd toksisite grubunda nöronlarda dejenerasyon ve nekroz, paranşim ve meningeal damarlarda hiperemi gözlenmiştir.

Glial fibril asidik protein (GFAP) olgun astrositlerde ara filament olan bir proteindir. Aynı zamanda astrositlerin gelişimi sırasında da astrositlerin iskeletinin oluşmasında ve birçok fonksiyonunda rol alan önemli bir proteindir (Eng ve ark., 2000; Middeldorp ve Hol, 2011). Astrogliazise neden olan travma, hastalık, genetik bozukluklar veya kimyasal maddelerin toksik etkileri sonucunda astrositler reaktif hale gelir ve tepki verir. Astrogliazis oluşumu ile birlikte hızlı bir şekilde GFAP ekspresyonu da artmaya başlar (Eddleston ve Mucke, 1993). Deneysel olarak oluşturulan gliosis modellerinde GFAP ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir

(Eng ve Ghirnikar, 1994). Yapılan bu çalışmada, immunhistokimyasal yöntemle belirlenen GFAP ekspresyonları Cd grubunda şiddetli düzeyde arttığı gözlemlendi.

Zebra balıklarında CdCl₂ uygulanarak yapılan bir çalışmada; GFAP salınımının kontrol grubuna oranla daha az olduğunu saptamışlardır (Monaco ve ark., 2016). 10 µM CdCl₂ ratlarda astrositlerden salınan GFAP miktarının kontrol grubuna oranla daha az olduğu bildirilmiştir (Nedzvetsky ve ark., 2018).

Sonuç olarak yapılan çalışmada tek doz 0.025 mmol/kg Cd uygulamanın beyin dokularında şiddetli düzeyde hasar oluşturduğu ve bu oluşan hasar aynı zamanda GFAP ekspresyonunu artırdığı gözlemlenmiştir. GFAP ekspresyonunun artışı Cd toksisitesinin patogenezi anlamada önemli bir çalışma olmuştur, sonra ki yapılacak olan çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

Kaynaklar

1. Cuypers, A., et al., Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 2010. **23**(5): p. 927-940.
2. Karbownik, M., et al., Induction of lipid peroxidation in hamster organs by the carcinogen cadmium: amelioration by melatonin. *Cell biology and toxicology*, 2001. **17**(1): p. 33.
3. Baldwin, D.R. and W.J. Marshall, Heavy metal poisoning and its laboratory investigation. *Annals of clinical biochemistry*, 1999. **36**(3): p. 267-300.
4. Goyer, R.A. and T.W. Clarkson, Toxic effects of metals. Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, Fifth Edition, Klaassen, CD [Ed]. McGraw-Hill Health Professions Division, 1996.
5. Aydoğdu, N., et al., Kadmiuma bağlı karaciğer hasarında taurin, melatonin ve asetilsisteinin nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidanlar üzerindeki etkileri. *Erciyes Tıp Dergisi*, 2007. **29**(2): p. 89-96.
6. Jackson, A.P. and B.J. Alloway, The transfer of cadmium from agricultural soils to the human food chain. 1992.
7. Thévenod, F., Nephrotoxicity and the proximal tubule. *Nephron Physiology*, 2003. **93**(4): p. p87-p93.
8. Li, M., et al., Melatonin antagonizes cadmium-induced neurotoxicity by activating the transcription factor EB-dependent autophagy-lysosome machinery in mouse neuroblastoma cells. *Journal of pineal research*, 2016. **61**(3): p. 353-369.
9. Middeldorp, J. and E. Hol, GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*, 2011. **93**(3): p. 421-443.
10. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., & Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192 (2–3), 95–117.

11. Dimou L, Götz M. Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain. *Physiol Rev* 2014;94:709-37.
12. Bacci A, Verderio C, Pravettoni E, Matteoli M. The role of glial cells in synaptic function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354:403-9.
13. Terni B, López-Murcia FJ, Llobet A. Role of neuron-glia interactions in developmental synapse elimination. *Brain Res Bull* 2016; 16:30231-3.
14. Tiffany-Castiglioni E, Sierra EM, Wu JN, Rowles TK. Lead toxicity in neuroglia. *Neurotoxicology* 1989;10:417-43.
15. Hossain S, Liu H.N, Nguyen M, Shore G, Almazan G. Cadmium exposure induces mitochondria-dependent apoptosis in Oligodendrocytes. *NeuroToxicology* 2009;30:544-54.
16. Rai A, Maurya SK, Khare P, Srivastava A, Bandyopadhyay S. Characterization of developmental neurotoxicity of As, Cd, and Pb Mixture: synergistic action of metal mixture in glial and neuronal functions. *Toxicol Sci* 2010;118:586- 601.
17. Favorito R, Monaco A, Grimaldi MC, Ferrandino I. Effects of cadmium on the glial architecture in lizard brain. *Eur J Histochem* 2017;61:2734.
18. Eng, L. F, Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochemical Research*, 25(9–10), 1439–1451.
19. Okuda B, Iwamoto Y, Tachibana H, Sugita M. 1997. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 99: 263–265.
20. Notarachille G, Arnesano F, Calò V, Meleleo D. 2014. Heavy metals toxicity: effect of cadmium ions on amyloid beta protein 1-42. Possible implications for Alzheimer's disease. *Biometals* 27: 371–388.
21. Panayi AE, Spyrou NM, Iversen BS, White MA, Part P. 2002. Determination of cadmium and zinc in Alzheimer brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Neurol. Sci.* 195: 1–10.
22. Meeker JD, Rossano MG, Protas B, Diamond MP, Puscheck E, Daly D, Paneth N, Wirth JJ (2008) Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence formolybdenum as a male reproductive toxicant. *Environ Health Perspect* 116: 1473–1479.
23. Yildirim S, Celikezen FC, Oto G, Sengul E, Bulduk M, Tasdemir M, Cinar DA. (2017). An investigation of protective effects of lithium borate on blood and histopathological parameters in acute cadmium-induced rats. *Biol Trace Elem Res*:1–8.
24. Karaca Ö., Sunay FB., Kuş MA., Gülcen B., Özcan E., Ögetürk M., Kuş İ., Kadmiyum ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarına karşı melatoninin etkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik düzeylerde incelenmesi. *Firat Tıp Derg.*, 19 (3), 110-115, 2014.
25. El-Sokkary GH, Awadalla EA. The protective role of vitamin C against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium chloride in male adult albino rat. *Open Neuroendocrinol J.* 2011;4:1–8.
26. Favorito R, Chiarelli G, Grimaldi MC, De Bonis S, Lancieri M, Ferrandino I. Bioaccumulation of cadmium and its cytotoxic effect on zebrafish brain. *Chem Ecol* 2011;27(Suppl.2):39-46.
27. Eddleston, M. and Mucke, L. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes; implications for their role in neurologic diseases. *Neurosci.* 54:15 –36.
28. Eng, L. F. and Ghirnikar, R. S. 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 4:229 –237.

29. Monaco A, Grimaldi MC, Ferrandino I. Neuroglial alterations in the zebrafish brain exposed to cadmium chloride. *J Appl Toxicol* 2016;36:1629-38.
30. Nedzvetsky, V. S., Sukharenko, E. V., Kyrychenko, S. V., & Baydas, G. (2018). Soluble curcumin prevents cadmium cytotoxicity in primary rat astrocytes by improving a lack of GFAP and glucose-6-phosphate-dehydrogenase. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(4), 501–507. doi:10.15421/021875
31. McLendon, R.E. and D.D. Bigner, Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathology*, 1994. 4(3): p. 221-228.

**Model Organizma *Drosophila Melanogaster*'de Bisfenol A Uygulamasý Sonucu DNA ve
Üreme Performansýnda Meydana Gelen Deęiřimlere Karřý Resveratrolün Etkilerinin
Belirlenmesi**

Ulaş ACARÖZ¹ Damla ARSLAN-ACARÖZ² Fahriye ZEMHERİ-NAVRUZ³ Sinan İNCE⁴

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi AD, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Bayat Meslek Yüksek Okulu, 03780, Afyonkarahisar, Türkiye

³Bartın Üniversitesi Fen Fakóltesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 74100 Bartın, Türkiye

⁴Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

Özet: Bisfenol A (BPA) gıda ambalajlarında özellikle reçine ve plastiklerin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir kimyasal maddedir. Bu madde oksidatif strese yol açmakta ve insanlarda kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Resveratrol, üzümderde ve diğer gıdalarda bulunan polifenolik bir bileşiktir. Bu çalışmada model organizma olarak *Drosophila melanogaster* kullanıldı ve BPA ile oluşturulan DNA hasarı ve üreme performansı üzerindeki resveratrolün olası koruyucu etkisi araştırıldı. Bu amaçla, *Drosophila melanogaster*'in besi yerlerine BPA ve resveratrol sırasıyla 25mM ve 0,08 mM dozlarında eklendi. DNA hasarı Comet yöntemi ile belirlendi. BPA uygulamasının DNA hasarında artışa ve üreme performansında azalmaya neden olduğu belirlenirken resveratrol uygulamasının oluşan DNA hasarını azalttığı ve üreme performansını arttırdığı saptandı. Sonuç olarak *Drosophila melanogaster*'lerde BPA uygulamasının sebep olduğu olumsuz etkilere karşı resveratrolün koruyucu özellik gösterdiği saptandı.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol-A, Comet Analizi, DNA hasarı, *Drosophila melanogaster*, Resveratrol.

Determination of the Effects of Resveratrol Against Bisphenol A-induced DNA and Reproductive Performance Alterations in Model Organism *Drosophila Melanogasters*

Abstract: Bisphenol A (BPA) is a chemical substance commonly used in food packaging, especially in the production of resins and plastics. This substance induces oxidative stress and causes a variety of diseases, including cancer in humans. Resveratrol is a polyphenolic compound found in grapes and other foods. In this study, *Drosophila melanogaster* was used as a model organism and the possible protective effect of resveratrol on BPA-induced DNA damage and reproductive performance was investigated. For this purpose, BPA and resveratrol were added to *Drosophila melanogaster* in 25mM and 0.08 mM doses, respectively. DNA damage was determined by Comet method. It was determined that BPA application caused an increase in DNA damage and a decrease in reproductive performance while resveratrol application decreased DNA damage and increased reproductive performance. Consequently, it was determined that resveratrol exhibited protective properties against BPA- induced negative effects in *Drosophila melanogasters*.

Keywords: *Bisphenol-A, Comet Analysis, DNA damage, Drosophila melanogaster, Resveratrol.*

Giriş

Bisfenol A (BPA) plastik biberonlarda, yiyecek ve içecek kaplarında sıkça kullanılan potansiyel bir endokrin bozucu kimyasaldır (Rubin, 2011), BPA polimerlerden sızarak yiyecek ve su kaynaklarına girebileceği için insanların bu kimyasala maruz kalma riski gittikçe artmaktadır (Poormoosavi ve ark., 2018). BPA'nın insan vücudunda yaygın bir şekilde biriktiği bildirilmektedir (Tzatzarakis ve ark., 2015). BPA maruziyeti kanser, endokrin, immünolojik ve nörolojik bozukluklar ile ilişkilendirilmektedir (Kanwal ve ark., 2018).

Resveratrol, üzüm kabuğu da dahil olmak üzere, çilek, yerkıstığı gibi bir çok bitkisel üründe bulunan stilben tipi bir fitoaleksindir ve bu madde bitkiler tarafından çevresel strese karşı üretilmektedir (Howitz ve ark., 2003; Alturfan ve ark., 2012). Özellikle, birçok bitki tarafından bakteri ve mantar gibi patojenlerin ataklarından dolayı koruyucu olarak stilben sentaz enzimi

enzimi aracılığıyla üretilmektedir (Kalin, 2009). *Polygonum cuspidatum* köklerinden sentezlenen resveratrol uzun zamandır geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Frémont, 2000). Bu bileşik, antioksidan, antikoagülan ve antikarsinogenik özellikler göstermektedir (Mizutani ve ark., 2001; Bass ve ark., 2007). Sıçanlarla yapılan bir çalışmada ise akrilamid ile indüklenen toksisitede resveratrolün oksidatif strese ve DNA hasarına karşı etkisini beyin, akciğer, karaciğer, testis ve böbrek dokularında 8-OHdG, MDA, GSH, serum enzim aktiviteleri, sitokin seviyeleri parametreleri analiz edilerek araştırılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, akrilamid toksitesi ile artan oksidatif strese ve dna hasarına karşı resveratrolün koruyucu etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Alturfan 2012).

Drosophila melanogaster hızlı üreme potansiyeline sahip olan memelilerin fizyolojik ve biyolojik özellikleri ile benzerlik gösteren ökaryotik bir canlıdır (Pandey ve Nichols, 2011; Miguel-Aliaga ve ark., 2018). Model organizma olarak oksidatif stres (Soares ve ark., 2017), ömür uzunluğu (Pletcher ve ark., 2002; Arica ve ark., 2017), genotoksitesite (Mukhopadhyay ve ark., 2004) çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada Bisfenol A'ya maruz bırakılan *Drosophila melanogaster*'lerde resveratrolün koruyucu etkisi araştırıldı. Bu amaçla bisfenol A ve resveratrol uygulamaları sonucu *Drosophila melanogaster*'lerin üreme performansları ve pupa sayıları değerlendirildi ve Comet analizi ile uygulamalar sonucu meydana gelen DNA hasarı belirlendi.

Materyal ve Metod

Drosophila melanogaster kültürleri, 24±1°C sıcaklıkta % 60-70 nemde laboratuvar koşullarında inkübe edildi. Her grupta çiftleşmemiş 10 dişi ve 10 erkek ergin birey 50 ml besi yeri içeren cam kültür şişelerinde Bisfenol A, (Alfa Aesar; Karlsruhe, Germany) ve resveratrol (Resveratrol, Terraternal, Santa Clara, USA) 15 gün yetiştirildi. Besi yeri hazırlanmasında 94 g şeker, 104 g mısır unu, 6 g agar, 9 g bira mayası, 6 ml asit karışımı (7.83 ml ortofosforik asit + 8.36 ml propiyonik asit + 1081 ml distile su) ve 1020 ml distile su, kullanıldı. *Drosophila melanogaster*'ler kontrol, aseton (% 1), DMSO (28 mM), BPA (25 mM; aseton içinde çözödürölen), resveratrol (0.08 mM; DMSO içinde çözödürölen) ve BPA ile resveratrolün birlikte uygulamasının yapıldığı grup olmak üzere 6 deney grubuna ayrıldı. BPA ve resveratrol miktarları sırasıyla Streifel ve ark. (2016) ve Bass ve ark (2007)'nın belirttikleri miktarlar esas

alınarak belirlendi. *Drosophila melanogaster*'lerin pupa sayıları, üreme performansı ve Comet analizi ile de DNA hasarı (Olive ve Banáth, 2006) belirlendi. Ayrıca DNA hasarı değerlendirmesinde tek yönlü varyans analizi (SPSS 20) ile Duncan post-hoc testi uygulandı. $p<0.05$ değeri İstatistiksel açıdan önemli kabul edildi.

Bulgular

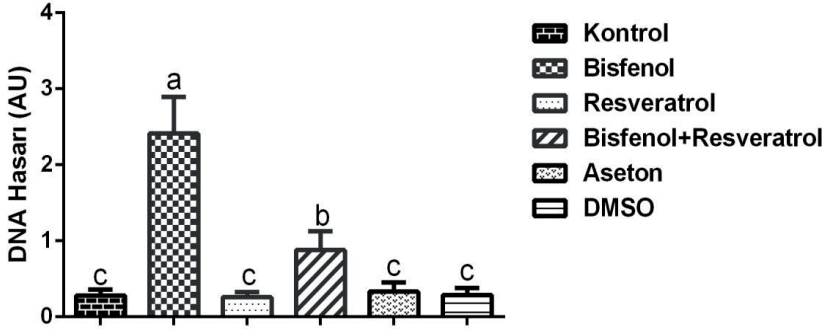
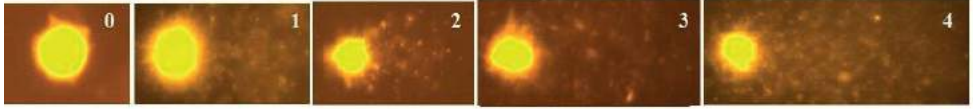
Yapılan çalışmada, 25mM BPA uygulamasının *Drosophila melanogaster*'lerde pupa gelişimini ve üreme performansını azalttığı belirlendi. Buna karşın resveratrol ile birlikte BPA uygulanması sonucu *Drosophila melanogaster*'lerde sadece BPA verilen grupta karşılaştırıldığında pupa gelişiminin ve üreme performansının arttığı belirlendi.

Drosophila melanogaster'lerde DNA hasarının BPA uygulanan grupta kontrol grubuna göre fazla olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Ancak resveratrol uygulamasının BPA ile indüklenen DNA hasarını azalttığı belirlendi ($p<0.05$). Tek başına resveratrol, aseton ile DMSO uygulaması yapılan gruplarda pupa gelişimi, üreme performansı ve DNA hasarının kontrol grubuna yakın olduğu ve uygulanan miktarda resveratrol, aseton ile DMSO uygulamasının olumsuz bir etki göstermediği saptandı.

BPA ve resveratrol'ün *Drosophila melanogaster*'lerde tek başlarına ve beraber uygulamalarının pupa gelişimi ve üreme performansı üzerine etkileri Tablo 1'de ve DNA hasarı bulguları Şekil 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Bisfenol A'ya maruz bırakılan *Drosophila melanogaster*'lerde pupa gelişimi ve üreme performansı üzerine resveratrolün etkisi.

Gruplar	Ergen					Pupa	
	Dişi	%	Erkek	%	Toplam	Gelişim	%
Kontrol	48	100	53	100	101	146	100
Bisfenol	9	18.8	8	15.1	17	41	28.1
Resveratrol	63	131.2	45	84.9	108	164	112.3
Bisfenol+Resveratrol	34	70.8	28	52.8	62	83	56.8
Aseton	45	93.8	46	86.7	91	140	95.9
DMSO	44	91.6	45	84.9	89	139	95.2



Şekil 1. Bisfenol A'ya maruz bırakılan *Drosophila melanogaster*'lerde resveratrolün DNA hasarı üzerine etkisi. Farklı harfler istatistiksel açıdan önemi ifade etmektedir ($p<0.05$).

Tartışma

Yapılan bazı araştırmalarda BPA'nın *Drosophila melanogaster*'lerde BPA uygulamasının etkileri bildirilmiştir (Atlı ve ark., 2012; Atlı 2013; Weiner ve ark., 2014). Weiner ve ark. (2014), BPA'nın farklı konsantrasyonlarının (0.1 mg/l, 1 mg/l or 10 mg/l) *Drosophila melanogaster*'lerin larva gelişimi üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda düşük dozlarda larva gelişimi arttırdığını (endokrin bozucu özelliğinden dolayı) buna karşın BPA'nın uygulanan yüksek dozlarında böyle bir etkinin gözlenmediği bildirilmiştir. Aksine Atlı ve ark. (2012) aynı dozlarda BPA uygulamasının *Drosophila melanogaster* larvalarında larvadan pupaya, pupadan ergine geçiş yüzdelерinde anlamlı bir değişim gözlenmediğini fakat BPA uygulamaları ile hem ortalama pupalaşma hem de ortalama erginleşme sürelerinin geciktiğini bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada 0.1, 1 and 10 mg/l dozlarındaki BPA uygulamasının *Drosophila melanogaster*'lerde doğurganlığı azalttığı rapor edilmiştir (Atlı, 2013). Yapılan bu çalışmada da BPA'nın yüksek dozda verilmesine bağlı olarak *Drosophila melanogaster*'lerde üreme performansını ve pupa gelişimini olumsuz etkilediği ve DNA hasarı meydana getirdiği belirlenmiştir.

Model organizma olarak *Drosophila melanogaster* kullanılan birçok çalışmada kimyasal ajanlar tarafından indüklenen zararlı etkilere karşı antioksidan özellik taşıyan maddelerin

koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Çolak ve ark. (2017) *Drosophila melanogaster*'lerde dioksin bileşiklerinin toksik etkilerine karşı koenzim Q10 ve resveratrolün koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada dioksin (10^{-6} µg/ml) uygulanan gruplarda antioksidan statünün düştüğü ve oksidan seviyenin arttığı buna karşın resveratrol (100 µM) ve koenzim Q10 (150 µg/ml) uygulamasının bu artışları engellediği bildirilmiştir. Costa ve Nepomuceno (2006) *Drosophila melanogaster*'in somatik hücrelerinde multi vitamin (Vitamin C, Vitamin E ve β-karoten) karışımının doksorbisinin (0.125 mg/ml) yol açtığı genotoksik etkilere karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Nagpal ve Abraham (2019) *Drosophila melanogaster*'in germ hücrelerinde siklofosamid (3mM) ile indüklenen genotoksik hasara karşı kahvenin (% 2) etkisini inceledikleri çalışmada kahvenin larva ve ergin sineklerin germ hücrelerindeki mutasyonları azalttığı ve antioksidan aktiviteyi arttırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, antioksidan etkisi bilinen resveratrolün BPA tarafından oluşan olumsuz etkileri azalttığı saptandı.

Sonuç

Sonuç olarak yüksek dozda BPA uygulamasının *Drosophila melanogaster*'lerde üreme performansını olumsuz etkilediği ve DNA hasarına neden olduğu belirlendi. Ancak BPA ve resveratrol uygulamasının yapıldığı *Drosophila melanogaster*'lerde sadece BPA uygulanan gruba gören üreme performansını arttırdığı ve DNA hasarını engellediği saptandı.

Kaynaklar

1. Alturfan, A. A., Tozan-Beceren, A., Şehirli, A. Ö., Demiralp, E., Şener, G., & Omurtag, G. Z. (2012). Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Molecular biology reports*, 39(4), 4589-4596.
2. Atli, E. (2013). The effects of three selected endocrine disrupting chemicals on the fecundity of fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 91(4), 433-437.
3. Atli, E., & Ünlü, H. (2012). Developmental and reproductive effects of bisphenol A (Bpa) in *Drosophila Melanogaster*. *Hacettepe J Biol Chem*, 40, 61-68.
4. Arica Ş. Ç., Demirci S., Özyılmaz A., Öz S., Arslantaş E. (2017). Bazı makroalglerin *Drosophila melanogaster*'in hayatta kalışı üzerine etkileri. *EgeJFAS*. 34(4): 451-454.
5. Bass, T. M., Weinkove, D., Houthoofd, K., Gems, D., & Partridge, L. (2007). Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development*, 128(10), 546-552.

6. Costa, W. F., & Nepomuceno, J. C. (2006). Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and molecular mutagenesis*, 47(1), 18-24.
7. Çolak, D. A., & Uysal, H. (2017). Protective effects of coenzyme Q10 and resveratrol on oxidative stress induced by various dioxins on transheterozigot larvae of *Drosophila melanogaster*. *Toxicology research*, 6(4), 521-525.
8. Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life sciences*, 66(8), 663-673.
9. Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B., Sinclair, D.A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425 (6954), 191–196.
10. Kanwal, Q., Qadir, A., Iqbal, H. H., & Munir, B. (2018). Healing potential of *Adiantum capillsveneris* L. plant extract on bisphenol A-induced hepatic toxicity in male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(12), 11884-11892.
11. Kalin, Ç. (2009). Effects of Acrylamide and Resveratrol On Rabbit Liver And Kidney Antioxidant Enzymes (Doktora Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi).
12. Miguel-Aliaga I., Jasper H., Lemaître B. (2018). Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 210(2): 357-396.
13. Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., Yamori, Y., (2001). Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28 (1–2), 55–59.
14. Mukhopadhyay I., Chowdhuri D. K., Bajpayee M., Dhawan A. (2004). Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 19(2): 85-90.
15. Nagpal, I., & Abraham, S. K. (2019). Coffee mitigates cyclophosphamide-induced genotoxic damage in *Drosophila melanogaster* germ cells. *Drug and chemical toxicology*, 42(5), 502-508.
16. Olive P. L., Banáth J.P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1(1): 23-29,
17. Pandey U. B., Nichols C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63(2): 411-436,
18. Pletcher S. D., Macdonald S. J., Marguerie R., Certa U., Stearns S. C., Goldstein D. B., Partridge L. (2002). Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Current Biol.* 12(9): 712-723,
19. Poormoosavi, S. M., Najafzadehvarzi, H., Behmanesh, M. A., & Amirgholami, R. (2018). Protective effects of *Asparagus officinalis* extract against Bisphenol A-induced toxicity in Wistar rats. *Toxicology reports*, 5, 427-433.
20. Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(1-2), 27-34.
21. Soares J. J., Rodrigues D. T., Gonçalves M. B., Lemos M. C., Gallarreta M. S., Bianchini M. C., Denardin E. L. (2017). Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy. *Biomed. Pharmacother.* 95: 245-251,
22. Streifel, A. M. (2016). Effect of bisphenol-A on neurodevelopment in *Drosophila melanogaster* larvae. All College Thesis Program. Paper 16. http://digitalcommons.csbsju.edu/honors_thesis/16

23. Tzatzarakis, M. N., Vakonaki, E., Kavvalakis, M. P., Barmpas, M., Kokkinakis, E. N., Xenos, K., & Tsatsakis, A. M. (2015). Biomonitoring of bisphenol A in hair of Greek population. *Chemosphere*, 118, 336-341.
24. Weiner, A. K., Ramirez, A., Zintel, T., Rose, R. W., Wolff, E., Parker, A. L., Bennet, K., Johndreau, K., Rachfalski, C., Zhou, J., Smith, S. T. (2014). Bisphenol A affects larval growth and advances the onset of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 101, 7-13.

Ürolitiazisli Bir Kedi ve İki Köpekte Kotervin®'in Etkinliğinin Araştırılması

İlknur Karaca BEKDİK¹ Öznur ASLAN¹ Hanifi EROL² Umut ALPMAN²

¹ERÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD, Kayseri-Türkiye

²ERÜ Veteriner Fakültesi Cerrahi ABD, Kayseri-Türkiye

Özet: Çalışmanın amacı, ürolitiazisli bir kedi ve iki köpeğe idrar kesesi içi uygulanan Kotervin'in tedavideki etkinliğinin belirlenmesidir. Çalışmanın materyalini ERÜ Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerine stranguri, hematüri ve anüri şikâyetleri ile getirilen 5 yaşlı, erkek tekir bir kedi ile 13 yaşlı, erkek Golden Retriever ırkı ve 8 yaşlı, dişi Belçika Malinois ırkı köpekler oluşturdu. Kedinin yapılan idrar muayenesinde sitruvit kristali ve ultrasonografik muayenesinde farklı büyüklüklerde (0,5-1cm) ürolit belirlendi. Golden Retriever ırkı köpeğin idrar muayenesinde amorf fosfat kristalleri, röntgen ve ultrasonografik muayenelerinde farklı çaplarda (0,49-0,93 cm) 4 adet ürolit belirlendi. Belçika Malinois ırkı köpeğin idrar muayenesinde sitruvit ve sistin kristalleri ile ultrasonografik muayenesinde yaklaşık 5 cm çapında ürolit belirlendi. İdrar kesesi boşaltıldıktan sonra, kedi ve Golden Retriever ırkı köpeğe idrar sondası, Belçika Malinois ırkı köpeğe sistosentez yöntemiyle her uygulamada 10 ml olacak şekilde, idrar kesesi içine Kotervin® (Vedavet) gün aşırı üç kez verildi. Kotervin idrar kesesine verildikten sonra kese içinde 4 saat kalması sağlandı. Tedavi sonrası kedinin urolitinin tamamen eridiği ve köpeklerde ürolitin belirgin bir şekilde küçüldüğü belirlendi. Sonuç olarak, farklı tip ürolitiazis problemi olan kedi ve köpeklerde kotervinin tedavide yararlı olabileceği ve konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Kedi, Kotervin, Köpek, Ürolitiazis.

Investigation of The Effectiveness of Kotervin® at Treatment in A Cat and Two Dogs with Urolithiasis

Abstract: In the study was aimed that the effectiveness of Kotervin administration into bladder in a cat and two dogs with urolithiasis is investigation. Tekir cat male, 5 ages, Golden Retriever dog male, 13 ages and Belgian Malinois dog female, 8 ages were referred to stranguria, hematuria and anuria symptoms to ERU Veterinary Faculty clinics. At the urine and ultrasonographic examination of cat, struvite and different size uroliths (0.5 – 1 cm) were determined, respectively. Amorph phosphate at urine examination and four different size uroliths (0.49-0.93 cm) at radiographic and ultrasonographic examination of Golden Retriever dog were observed. At the urine and ultrasonographic examination of Belgian Malinois dog, struvite and cystine crystals and 5 cm size uroliths were determined, respectively. After empty the bladder completely, 10 ml Kotervin® (Vedavet), on alternate days and three times were administered to cat and Golden Retriever dog via catheter and Belgian Malinois dog via cystocentesis. Kotervin stayed four hours in bladder. After the treatment, cat was completely recovered whereas uroliths in dogs were significantly smaller. As a result, it was thought that kotervin at the treatment of different types urolithiasis problems in dogs and cats may be useful and more comprehensive studies must needed in the future.

Keywords: *Cat, Dog, Kotervin, Urolithiasis.*

Giriş

Ürolit, idrar kristalojenik maddelerle aşırı doygun hale geldiğinde kristalin ve matriks malzemelerinin toplanması sonucu bir veya daha fazla mineral tipinden oluşmaktadır (1). Ürolitiazis üriner sistemde ürolit oluşumları ve bunların sonuçlarına verilen isimdir (2). Ürolitler, üriner sistemde bulundukları yerlere göre nefrolit, renolit, üreterolit, ürosistolit, üretrolit olarak isimlendirilirler (3). Kedi, köpek ve insanlarda oluşan ürolitler ürat (amonyum ürat, sodyum ürat ve ürik asit), sistin, magnezyum amonyum fosfat (strüvit) ve kalsiyum (kalsiyum oksalat ve kalsiyum fosfat) olmak üzere dört ana mineral tipinde gruplandırılabilir (1).

Uygun koşulların varlığında, belirli bir taş tipindeki iyonik bileşenlerle idrarın aşırı doygunluğu, kristal oluşumuna, kümelenmeye, büyümeye ve taş oluşumuna yol açar. İdrardaki aşırı doygunluk öncelikle iç hasta faktörlerinden, hastalık durumlarından, su dengesinden, diyetten, idrar pH'sından, kristalleşme inhibitörlerinin varlığından, kümelenmeden, büyümeden ve ayrıca bir iskelet matriksin varlığından etkilenmektedir. Ürolit oluşumunu etkileyen risk faktörleri ise ırk, yaş, cinsiyet, üriner sistemin anatomik ve fonksiyonel anomalileri, metabolik anomaliler, üriner sistem enfeksiyonları, diyet ve idrar pH'sını içermektedir. (4).

Kedi ve köpeklerde ürolit oluşumlarına her iki cinsiyette eşit oranda rastlanmakla birlikte erkeklerde üretranın uzun ve dar olması nedeniyle üretral tıkanmalar daha sık görülmektedir (2,5).

Kedi ve köpeklerde en yaygın görülen ürolitlerin struvit ve kalsiyum oksalat olduğu bildirilmektedir (3). Alkali idrar struvit taşları için risk faktörüdür. Struvit kristalleri, özellikle idrarda pH 6.8'in üzerinde görülmektedir. Bununla birlikte özellikle köpeklerde idrar yollarının bakteriyel enfeksiyonlarında bakterilerin idrar pH'sını arttırması nedeniyle struvit taşlarının oluşumu kolaylaşmaktadır. Enfeksiyon kaynaklı struvit köpeklerde, steril struvit ise kedilerde en sık görülen formdur (6). Asidik idrar ise kalsiyum oksalat kristallerinin oluşumu için zemin hazırlamaktadır (2).

İdrar kesesindeki küçük ürolitler üretraya geçerek çoğunlukla dişilerde dışarı atılırken erkek köpeklerde os penis arkasında kalırlar. Üriner sistem enfeksiyonu varlığında üretranın tam tıkanması, böbrek parankim yıkımlanması ile septisemiye neden olmaktadır. Üriner sistemdeki tam tıkanmalar üremi tablosu gelişmesine yol açmaktadır (3,7).

Ürolitiazisde klinik bulgular ürolitin yerine, boyutuna ve sayısına bağlı olarak değişmektedir. Hematüri, pollaküri, strangüri ve disüri alt üriner sistem hastalıklarının klinik semptomları olmakla birlikte ürolitiazis durumlarında da oluşmaktadır (1,7). Özellikle erkek kedilerde idrar

yolu tıkanıklıkları sık görülmektedir. Buna bağlı olarak idrar kesesinde aşırı dolgunluk ve üriner sistem rupturları meydana gelmektedir (1).

Ürolitiazisin teşhisinde radyografi, ultrasonografi, sistografi ve bilgisayarlı tomografi yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Radyografi, radyopak olan struvit taşlarının tespitinde duyarlı bir testtir. 3 mm'den küçük olan ürolitlerin tespitinde ultasonografi veya çift kontrastlı sistografi radyografiden daha üstündür (1,8). Ürolitler bilgisayarlı tomografi kullanılarak çevre yumuşak dokulardan kolayca ayırt edilebilmektedir (9).

Direkt radyografi ile radyopak taşlar tespit edilerek taşların şekilleri ve sayıları hakkında bilgi edinilebilmektedir. Ancak ürosistolitlerin radyografik olarak belirlenmesinde hatalı negatif sonuçlar da alınabilmektedir. Direkt radyografi ile belirlenemeyen ürolitler kontrast radyografi ile belirlenebilmektedir (2)

Ultrasonografik muayenelerde ürolitler hiperekoik lezyonlar olarak gözlenmekte, distallerinde akustik gölge ile kuvvetli bir yankı oluşturmakta ve ultrasonografik inceleme sırasında mesanede aşağı tarafa doğru düşen ürolitler görülebilmektedir (2).

Üriner sistem hastalığı şüphesi olan hastalarda idrar analizi tanısal değerlendirmenin önemli bir parçasıdır. Ürolitiazisde krisalüri önemli bir bulgu olabilirken her zaman ürolit varlığını göstermez. Aktif ürosistolitlerde kristalüri görülmeyebilir. İdrar alımı ve analizi arasında geçen zaman ve sıcaklık değişimleri de hatalı pozitif sonuçlara neden olmaktadır. Bu nedenle ürolitiazis şüpheli hastalarda yeni toplanan idrarlar değerlendirilmelidir. İdrar özgül ağırlığının yüksek olması, ürolitik prekürsörlerin konsantrasyonundaki artışı işaret eder. Kalsiyum oksalat, pürinler ve sistin ürolitler pH'sı 7.0'den küçük olan idrarda, struvit taşı ise pH'sı 7.0'den büyük olan idrarda oluşmaktadır (6).

Ürolitiazisin tedavisinde medikal yöntem ile taşların çözdürülmesi ya da daha fazla büyümesinin önlenmesi amaçlanmaktadır (3,7). Strüvit ürolitleri medikal tedavi ile çözülebilmektedir. Steril strüvitler asidik idrar oluşturan bir diyetle, enfeksiyon kaynaklı struvitler ise struvit çözünme diyeti ve uygun bir antimikrobiyal ajan ile çözülebilmektedir.

Kalsiyum oksalat ürolitlerin çözünmesini destekleyen tıbbi protokoller mevcut değildir. Bu nedenle ürolitler cerrahi olarak veya minimal invaziv metotodlarla çıkarılmalıdır. Köpek urat ürolitlerinin çözdürülmesi pürin kısıtlı, alkalileştirici, diüretik diyet ve ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol uygulamaları ile sağlanmaktadır. Ancak allopurinol kedilerde değerlendirilmemiştir ve kullanılmamalıdır. Kedilerde urat ürolitleri cerrahi olarak uzaklaştırılmaktadır (6).

İdrar çıkışının engellenmesi, taş sayısının ve boyutunun fazla olması, kalıcı klinik bulgular ve tedaviye cevap alınmadığı durumlarda taşların çıkarılması gerekmektedir. İdrar kesesi ve üretradaki taşlarının alınması için birkaç minimal invaziv tedavi seçeneği vardır. Bu seçenekler arasında ürohidropulsiyon, litotripsi kullanarak veya kullanmadan transüretal sistoskopi ve perkütan sistolitotomi de denilen minilaparotomi destekli sistoskopik taş çıkarma yer almaktadır (6). Ürolitiazisin önlenmesinde köpek ve kedilerde idrar yolu enfeksiyonunun kontrolü ve diyetin düzenlenmesi önemli rol oynamaktadır (1).

Veda Kotervin®, atkuyruğu otu, çobandeğneği otu, tırmık otu kökleri, söğüt otu ve distile su içeren tamamlayıcı bir yemdir. Bu çalışmada farklı tip ürolitiazis problemi olan bir kedi ve iki köpekte kotervinin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Çalışmanın materyalini ERÜ Veteriner Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerine stranguri, hematüri ve anüri şikayetleri ile getirilen 5 yaşlı, erkek tekir bir kedi ile 13 yaşlı, erkek Golden Retriever ırkı ve 8 yaşlı, dişi Belçika Malinois ırkı köpekler oluşturdu.

Kedi ve Golden Retriever ırkı köpeğe idrar muayenesi ile birlikte ultrasonografik ve radyografik muayeneler, Belçika Malinois ırkı köpeğe idrar muayenesi ve ultrasonografik muayene yapıldı.

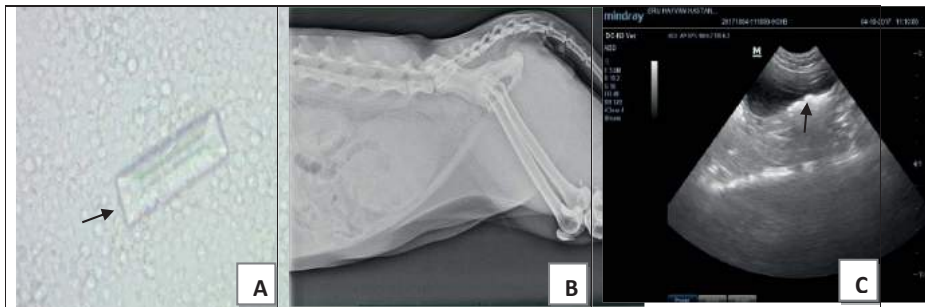
İdrar analizi için Golden Retriever ırkı köpek ve kediden steril idrar katateri ile, Belçika Malinois ırkı köpekten sistosentez yolu ile idrar toplandı. Alınan idrar örneklerinin İç Hastalıkları Anabilim Dalı laboratuvarında idrar stribi ve sediment muayeneleri yapıldı. İdrar

strib ile kan, protein, lökosit, pH ve dansite yönünden değerlendirildi. İdrar sediment muayenesi için idrarlar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra dipteki çökelti oynatılmadan, tüpte yaklaşık 0,5 ml idrar kalacak şekilde boşaltıldı. Kalan idrarla dipteki çökeltinin karışması sağlandı ve bu karışımdan bir damla lam üzerine alınarak mikroskopta incelendi. İdrar sediment muayenesinde idrar eritrosit, lökosit, epitel hücreleri ve kristaller yönünden değerlendirildi.

İdrar kesesi boşaltıldıktan sonra, kedi ve Golden Retriever ırkı köpeğe idrar sondası, Belçika Malinois ırkı köpeğe sistosentez yöntemiyle her uygulamada 10 ml olacak şekilde, idrar kesesi içine Kotervin® (Vedavet) gün aşırı üç kez verildi. Kotervin idrar kesesine verildikten sonra kese içinde 4 saat kalması sağlandı.

Bulgular

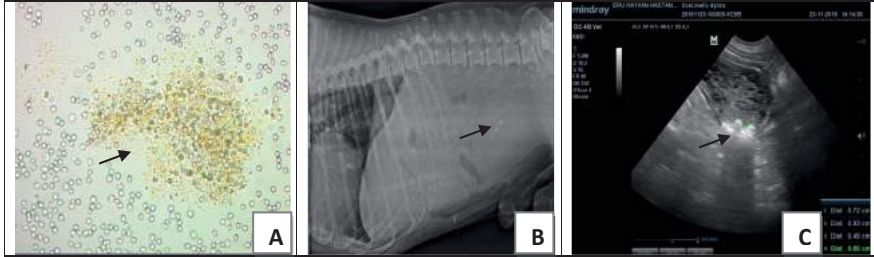
Kedinin muayenesinde üretranın tıkalı olduğu ve idrar kesesinde aşırı dolgunluk belirlendi. Üriner kateter yardımı ile alınan idrarın strib muayenesinde kan +++, protein +++, lökosit +, pH 8.0, dansite 1030 olarak belirlendi. İdrar sediment muayenesinde çok sayıda eritrosit, lökosit ve strüvit kristalleri görüldü (Şekil 1A). Röntgen muayenesinde idrar kesesinin dolu olduğu görüldü ancak ürolitle ilgili bir bulguya rastlanmadı (Şekil 1B). Kedinin yapılan ultrasonografik muayenesinde farklı büyüklüklerde (0,5-1cm) ürolitler tespit edildi (Şekil 1C).



Şekil 1. A. Kedinin idrarında struvit kristali (ok). **B.** Radyografide idrar kesesindeki dolgun görünüm. **C.** Ultrasonografide ürolitlerin görünümü (ok).

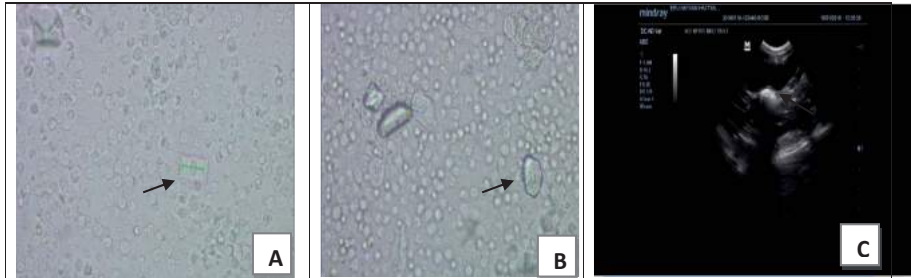
Golden Retriever ırkı köpeğin muayenesinde idrar kesesinde gerginlik ve idrar katateri uygulaması sırasında üretranın tıkalı olduğu tespit edildi. Katater yardımı ile kanal açıldıktan

sonra alınan idrarın strub muayesinde kan +, protein ++, lökosit ++, pH 9.0, dansite 1005 olarak belirlendi. İdrar sediment muayenesinde çok sayıda eritrosit, lökosit ve amorf fosfat kristalleri görüldü (Şekil 2A). Röntgen ve ultrasonografik muayenelerinde farklı çaplarda (0,49-0,93 cm) 4 adet ürolit belirlendi (şekil 2 B,C).



Şekil 2. A. Golden Retriever ırkı köpeğin idrarında amorf fosfat kristalleri (ok). **B.** Radyografide idrar kesesindeki ürolitler (ok) **C.** Ultrasonografide ürolitlerin görünümü (ok).

Belçika Malinois ırkı köpeğin idrar muayenesinde sitruvit (Şekil 3A) ve sistin kristalleri, (Şekil 3B) ile ultrasonografik muayenesinde yaklaşık 5 cm çapında ürolit (Şekil 3C) belirlendi.



Şekil 3. A. Belçika Malinois ırkı köpeğin idrarında struvit kristali (ok). **B.** İdrarda sistin kristali (ok) **C.** Ultrasonografide ürolitlerin görünümü (ok).

Tedavi sonrası kedinin urolitinin tamamen eridiği (Şekil 4A) ve köpeklerdeki ürolitlerin belirgin bir şekilde küçüldüğü tespit edildi (Şekil 4 B,C).



Şekil 4. A. Tedavi sonrası kedinin idrar kesesinin ultrasonografik görünümü **B.** Tedavi sonrası Golden Retriever ırkı köpeğin idrar kesesinin ultrasonografik görünümü **C** Tedavi sonrası Belçika Malinois ırkı köpeğin idrar kesesinin ultrasonografik görünümü

Tartışma ve Sonuç

Ürolitiazisde hematüri, pollaküri, strangüri ve disüri görülen semptomlar arasında yer almaktadır (1,7). Bu çalışmadaki kedi ve köpeklerin anamnezlerinde stranguri, hematüri ve anüri şikayetleri bulunmaktadır. Erkek kedi ve köpeklerde üretranın uzun ve dar olması nedeniyle üretral tıkanmalar daha sık görülmektedir (1,2,5). Buna bağlı olarak idrar kesesinde aşırı dolgunluk ve üriner sistem rupturları meydana gelmektedir (1). Bu çalışmada erkek kedi ve Golden Retriever ırkı köpekte üretral tıkanmalar ve ürinasyonun engellenmesine bağlı idrar kesesi dolgunluğu belirlendi.

Ürosistolitlerin radyografik olarak belirlenmesinde direkt radyografide hatalı negatif sonuçlar elde edilebilmektedir (2). Bu çalışmada direkt radyografide Golden Retriever ırkı köpeğin idrar kesesindeki ürolitler belirlenirken kedide tespit edilemedi. Kedideki ürolitler abdominal ultrasonografi ile saptandı. Kedi ve köpeklerde en yaygın görülen ürolitler struvit ve kalsiyum oksalat ürolitlerinden oluşmaktadır. Ürat veya sistinden oluşan ürolitler köpek ve kedilerde nadiren görülmektedir (1,3). Sunulan çalışmada kedide struvit, Golden Retriever ırkı köpekte amorf fosfat, Belçika Malinois ırkı köpekte sitruvit ve sistin kristalleri belirlendi.

Ürolitiasisin tedavisinde kristallerin çözünürlüğü idrar pH'sından etkilenmektedir. Struvit alkali idrarda; kalsiyum fosfat alkali ila nötr idrarda; kalsiyum oksalat ve silika nötr ila asidik idrarda; ürat, ksantin ve sistin asidik idrarda oluşma olasılığı daha yüksek olan ürolitlerdir (1). Bu çalışmada strüvit kristalleri görülen kedinin idrar pH'sının 8,0, amorf fosfat kristalleri saptanan köpeğin idrar pH'sının 9,0 olduğu belirlendi.

Ürolitiazisin tedavisinde medikal yöntem, minimal invaziv yöntemler ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Ürosistolitler mutlaka cerrahi müdahaleye ihtiyaç duymamakla birlikte, idrar çıkışının tıkanması, ürolitin sayısı ve ebatının fazla olması, kalıcı klinik semptomlar ve tedaviye cevap alınamaması gibi durumlar ürolitin çıkarılmasını gerektirmektedir (6). Ürolitiazisin tedavisinde medikal yöntem ile taşların çözdürülmesi ya da daha fazla büyümesinin önlenmesi amaçlanmaktadır (3). Bu çalışmada ürolitiazisin tedavisinde idrar kesesi içine gün aşırı kotervin uygulamasının kedideki ürolitleri tamamen erittiği, köpeklerde ise önemli ölçüde küçülttüğü belirlendi.

Sonuç olarak, farklı tip ürolitiazis problemi olan kedi ve köpeklerde kotervinin tedavide yaralı olabileceği ve konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği düşünüldü.

Kaynakça

1. Tion MT, Dvorska J, Saganuwan SA. A review on urolithiasis in dogs and cats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 201; 18(1): 1-18.
2. Kamiloğlu A, Kılıçoğlu D. Clinical, Laboratory, Radiographic, Ultrasonographic Diagnosis and Surgical Treatment of Feline Lower Urinary Tract Urolithiasis: Study Carried Out of Ten Cats. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2017; 12(1): 14-21.
3. Albasan H, Osborne CA, Lulich JP, Sancak AA. Köpek ve Kedilerde ürolitiazis. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences* 2013;4(2):39-52.
4. Cléroux A. Minimally Invasive Management of Uroliths in Cats and Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 48; 48(5): 875-889.
5. Sancak İG, Özgencil FE, Sancak AA. Fakülte kliniklerine gelen (2002-2003) kedi ve köpeklerde ürolitiazis olgularının klinik değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2009; 56: 105-111.
6. Bartges JW, Callens AJ. Urolithiasis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2015; 45(4):747-68.
7. Tiruneh D, Abdisa T. Review on Canine Urolithiasis. *American Research Journal of Veterinary Medicine* 2017;1(1): 1-7
8. Palma D, Langston C, Gisselman K, McCue J. Canine struvite urolithiasis. *Compend Contin Educ Vet.*2013; 35(8): E1-E8.
9. Pressler BM, Mohammadian LA, Li E, et al. In vitro prediction of canine urolith mineral composition using computed tomographic mean beam attenuation measurements. *Vet Radiol Ultrasound* 2004; 45(3): 189-197.

Balda Kirletici Maddeler

Ender YARSAN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Özet: Ülkemiz bitki varlığı açısından son derece önemli bir yere sahiptir. Bu türden bitkiler tedavi yönüyle önemli oldukları kadar içerdikleri etkin maddeler aracılığıyla, halk sağlığı yönüyle önemli olan hayvansal ürünlere geçerek kalıntı problemi oluşturabilirler. Bu türden hayvansal ürünler içerisinde bal da ayrı bir yere sahiptir.

Arıcılık etkinliklerinin endüstriyel faaliyetlerin yapıldığı alanlarda veya önemli derecede hava kirliliğinin olduğu yerlerde yapılması, arı ürünlerinde zararlı veya zehirli maddelerle önemli derecede kirliliğe neden olabilmektedir. Diğer yaygın bir kirlilik kaynağı ise tarımda kullanılan ilaçlardır. Kirlilik kaynakları genel olarak çevresel ve arıcılıkla ilgili olarak iki ana başlıkta incelenebilir.

Çevresel kirleticiler;

- Kurşun, kadmiyum ve civa gibi ağır metaller
- Radyoaktif izotoplar
- Organik kirleticiler, poliklorlu bifeniller (PCB'ler)
- Pestisitler (böcek öldürücüler, mantar ilaçları, herbisitler ve bakterisitler)
- Patojen bakteri
- Genetiği değiştirilmiş organizmalar

Arıcılık kirleticileri

- Akarisitler: lipofilik sentetik bileşikler ve toksik olmayan organik asitler ve bileşenleri gibi maddeler uçucu yağlar
- Yavru çürüklüğü hastalıklarında kullanılan antibiyotikler; özellikle tetrasiklinler, streptomisin, sülfonamidler ve kloramfenikol
- Balmumu güvesinin kontrolünde kullanılan Paradichlorobenzene ve kimyasal kovucular

Anahtar Kelimeler: Bal, Kirletici madde.

Pollutants in Honey

Abstract: Our country has a very important place in terms of plant existence. Plants of this kind can be a residual problem by switching to animal products that are important for public health, through the active substances they contain as well as being important in terms of treatment. Honey has a special place among such animal products.

Beekeeping activities in areas where industrial activities or where there is significant air pollution, bee products can cause significant pollution with harmful or toxic substances. Another common source of pollution is drugs used in agriculture. Pollution sources can be examined under two main topics related to environmental and apiculture in general.

Environmental pollutants;

- Heavy metals such as lead, cadmium and mercury
- Radioactive isotopes
- Organic pollutants, polychlorinated biphenyls (PCBs)
- Pesticides (insecticides, fungicides, herbicides and bactericides)
- Pathogenic bacteria
- Genetically modified organisms.

Beekeeping pollutants

- Acaricides: lipophilic synthetic compounds and non-toxic organic acids and components such as essential oils
- Antibiotics used in foul rot diseases; especially tetracycline, streptomycin, sulphonamides and chloramphenicol
- Paradichlorobenzene and chemical repellents used in the control of wax moth.

Keywords: Honey, Pollutants.

Giriş

Bal; “Bitkilerin çiçeklerinde bulunan nektarların veya bitkilerin canlı kısımlarıyla bazı eş kanatlı böceklerin salgıladıkları tatlı maddelerin, bal arıları (*Apis mellifera*, *Apis mellifica*) tarafından toplanması, vücutlarında bileşimlerin değiştirilip petek gözlerinde depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucunda meydana gelen koyu kıvamda tatlı bir üründür” şeklinde tanımlanabilir.

Balın bileşimi bitkisel kaynağına bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Ana bileşenler bütün ballarda aynıdır. Bal, içerdiği maddelerin çeşitliliği nedeniyle oldukça karmaşık bir yapı gösterdiği gibi, çeşitli yörelere ve elde ediliş zamanlarına göre de oldukça farklı yapılar gösterebilmektedir. Aynı tip balların bileşimi her iki üretim sezonu sonunda birbirine çok yakın veya aynı bulunmuştur. Bu belirtilen maddelere ek olarak balda ısı etkisi sonucunda hidroksimetilfurfurol (HMF) oluşmaktadır. Ayrıca balda bazı toksik maddeler, lipidler, karboniller ve esterler bulunmaktadır. Balda mineral miktarı düşük düzeydedir.

Hayvansal bir gıda maddesi olan balda metal düzeyleri bazı faktörlerden etkilenmektedir. Öncelikle çiçek ballarında bitkisel (nektar) kaynağına bağlı olarak mineral düzeyleri farklılıklar gösterir. Her hangi bir bitkideki mineral madde miktarı bitkinin yetiştiği toprağı, topraktaki mineral madde miktarına, bitkinin tipine, gübreleme ve gelişme dönemindeki çevre faktörlerine bağımlılık gösterir. Bununla birlikte toprağın pH'sı, asidik yapısı bitkilerdeki mineral düzeyini etkiler.

Bal arıları iyi bir biyolojik indikatördür. Çevredeki kimyasal bozulmayı yüksek ölümlerle (çevrede yüksek düzeyde pestisitler varlığında olduğu gibi) ve kirleticileri (pestisitler, ağır metaller, radionüklitler gibi) vücutlarında depolayarak veya ürünlerine yansıtarak gösterirler. Uygun laboratuvar analizleriyle arı ve arı ürünlerinde kirlenmeye yol açan kirleticiler belirlenebilmektedir.

Ekolojik bir dedektör olarak kabul edilebilen bal arıları bazı morfolojik ve etiyolojik özelliklere sahiptir. Bu özellikleri arasında şu faktörleri sıralamak mümkündür; yetiştirilmeleri-üretilmeleri kolaydır ve belirli bir yerde yaşayan canlılardır; vücut yüzeylerinin kıllarla kaplı olması statik elektrik oluşmasına neden olur, bu özellik arıların çevredeki (toprak, hava, su ve bitkiler) kirleticiler, biyolojik savaş maddeleri, patlayıcılar gibi kimyasal ve biyolojik partikülleri oldukça etkili bir şekilde toplamalarını sağlar, bitkileri korumaya yönelik kullanılan çeşitli ürünlere karşı oldukça duyarlıdırlar, bu ürünlerin çevreye yayılmaları sırasında (rüzgar gibi faktörlerle) duyarlılıkları daha fazladır; üreme kapasiteleri yüksek ve

ortalama hayat süreleri nispeten kısadır, bu durum koloninin hızlı ve sürekli yenilenmesini sağlar; arılar yüksek hareket yeteneğine ve geniş alanda uçuş kapasitesine sahiptirler.

Sonuçta arı, nektar, polen ve bal analizleri, pestisit, ağır metal ya da gaz kaynaklı kirlilikleri ortaya koyduğu gibi, arı kolonilerinin uygun bir yere yerleştirilmesi ve uygun örneklerin analiziyle çevredeki kimyasal ya da biyolojik materyallerin dağılımını gösteren haritalar çizilebilmektedir. Arılar önemli miktarda zehirli bileşiğin taşıyıcısı olabilmekte ve bu maddeleri bal ve diğer arı ürünlerine yansıtabilmektedir. Balın insan beslenmesindeki önemli yeri, bal arılarının önemini daha da artırmakta ve arıcıların kovanlarına özen göstermeleri, baldaki kirlenme düzeyini azaltabilmektedir; fakat kirlenmekte olan bir çevrede yaşadığımızdan bu türden bir azalma pratik görünmemektedir. Böyle özellik bile arıların çevre kirlenmesinde biyoindikatör canlılar olmalarının ne denli önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Bal ve Diğer Arı Ürünlerinde Bulaşma Kaynakları

Bal ve diğer arı ürünleri temiz, sağlıklı ve doğal bir imaja sahiptir. Buna karşın günümüzde arı ürünleri değişik kaynaklarla kirlenen çevrelerde üretilmektedir. Yakın zaman öncesinde çeşitli maddelerle kirlenmiş ballar kitle iletişim araçlarında tartışılmıştır. En son örnek antibiyotik kalıntısı içeren ballar olmuştur. Bu tür haberler balın imajını olumsuz yönde etkilemektedir. Arı ürünlerine bulaşan kirleticiler halk sağlığını tehdit edebilmekte, balın kalitesini olumsuz yönde etkilemekte ve pazarlamada sorunlara neden olmaktadır.

Arıcılık etkinliklerinin endüstriyel faaliyetlerin yapıldığı alanlarda veya önemli derecede hava kirliliğinin olduğu yerlerde yapılması, arı ürünlerinde zararlı veya zehirli maddelerle önemli derecede kirliliğe neden olabilmektedir. Diğer yaygın bir kirlilik kaynağı ise tarımda kullanılan ilaçlardır. Kirlilik kaynakları genel olarak çevresel ve arıcılıkla ilgili olarak iki ana başlıkta incelenebilir. Bunlar Çizelge 1’de kısaca belirtilmiştir.

Çizelge 1. Arı ve arı ürünlerinde kirleticiler ve kirlenme kaynakları.

Çevre Kaynaklı Kirleticiler	Arıcılık Kaynaklı Kirleticiler
• Pestisitler • Ağır metaller • Organik maddeler • Bakteriler • Genetiği değiştirilmiş organizmalar • Radyoaktivite	• Varroa kontrolünde akarisit kullanımı • Yavru çürüklüğüne karşı antibiyotik kullanımı • Akarların kontrolünde pestisit kullanımı • Bal hasadı sırasında arı kovucular kullanımı • Kovanlarda ahşap koruyucular kullanımı

Çevresel Kaynaklı Kirleticiler

Kirleticiler arı ürünlerinin ham maddesine (nektar, salgı, polen ve bitki salgıları) su, hava, bitkiler ve toprak yoluyla bulaşır ve kovanlara arılar ile taşınır.

Metaller: Hava ve su kaynaklarının metaller ve diğer elementlerle kirlenmesi endüstri, madencilik ve enerji üretimi ve otomobil egzoz gazları etkisiyle olmaktadır. Madencilik faaliyetleri sonucu belirli bir çevre bir veya birkaç metalle kirlenirken endüstri faaliyetleri veya enerji üretimi faaliyetleri sonrası çevrenin kirlenmesi çok sayıda element tarafından olmaktadır. Sadece anayol trafiği düşünüldüğünde alüminyum, kalsiyum, bakır, demir, kurşun, magnezyum, silikon, çinko (eser düzeyde kirleticiler, motor yağı gazlarında), baryum (dizel yakıt katkısı), kadmiyum (egzoz gazları ve araba lastiği), krom, nikel, palladium, platin ve diğer bazı metaller çevre kirlenmesinde önem arz etmektedir.

Kurşun ve kadmiyum zehirli ağır metal olarak düşünülür ve bu nedenle de çok sıklıkla çalışılmaktadır. Kurşun havada tutulur, havayı kirletir ve direkt olarak nektar ve salgılara ulaşır. Kadmiyum metal endüstrisi ve yakma fırınlarından kaynaklanır. Toprakta bitkilere ulaşır, nektar ve salgıları bulaştırır. Düşük düzeyde kadmiyum hava yoluyla bala ulaşabilir. AB tarafından ballarda kurşun ve kadmiyum için maksimum kalıntı limitleri sırasıyla 1 mg/kg ve 0,1 mg/kg olarak belirlenmiştir. AB’nde diğer metallerin ballarda maksimum kalıntı limitleri belirlenmemiştir. Bu durum balda metal kalıntılarının toksikolojik yönden değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Yapılan çalışmalarda kirli ve kirlenmemiş alanlardan elde edilen ballarda kurşun düzeylerinde önemli derecede farklılık görülmemiştir. Buna karşın en yüksek kurşun değerleri kirli alanlarda üretilen ballarda bulunmuştur.

Polen, balmumu ve propoliste ağır metal kirlenmelerini belirlemeye yönelik çalışmalar oldukça azdır.

Radyoaktivite: Şimdilik bal ve diğer arı ürünleri için problem teşkil etmemektedir. Çernobil nükleer reaktör kazasından sonra bütün Avrupa’da nektar ve ballarda radyoaktif kirlilik önemli bir süre devam etmiştir.

Organik Maddeler: Çevredeki organik kimyasal maddelere PCB’ler (poliklorlu bifeniller) örnek olarak verilebilir. Bunlar 1980 yılından önce üretilmiş olup motor yağlarında ve soğutucularda kullanılmıştır. Bu bileşikler halen çevrede bulunmakta, bitkileri kontamine etmekte, böylece arı ve arı ürünlerine de ulaşabilmektedir.

Pestisitler: Gerek ülkemizde gerekse Dünya da bal arıları pestisitlerden etkilenen en önemli böcek türlerinden birisini oluşturmaktadır. Pestisitlerin yoğun ve bilinçsiz kullanılmaları sonucunda her yıl binlerce kovan zarara uğramaktadır. 1967 yılında pamuk tarlalarında toz Carbaryl uygulamasıyla Kaliforniya’daki toplam koloni varlığının % 15’i yani yaklaşık 70.000 arı kolonisinin söndüğü kayıtlıdır. İlaçların arıları etkileme şekli 3 farklı yolla meydana gelmektedir. Bal arıları doğadaki çeşitli bitkilerden polen ve nektar toplarken:

1. Mide zehirlerinden etkilenirler. Besinlerine karışmış tarım ilaçlarını sindirim sistemine alırlar.
2. Kontakt (temas) zehirlerinden etkilenirler. Arıların kutikulasına (derisine) tarım ilacı temas ettiği zaman arılar ölür.
3. Solunum zehirlerinin etkisi ile zehirlenerek ölürler. Bunlar genellikle fümigant ilaçlardır.

Arılar için çok zehirli olan bazı pestisitlerin aktif maddeleri:

Aldrin, Azinphos-Methyl, Bendiocarb, Carbaryl, Clorpyrifos, Cyfluthrin, Diazion, Dichlorvos, Dicrotophos, Dieldrin, Dimethoate, Endosülfan, Ethion, Etrinfos, Fenitrothion, Fenthion, Fenpropathrin, Heptachlor, Lindane, Malathion, Methamidophos, Methomyl, Methidathion, Methiocarb, Methomyl, Mevinphos, Monocrotophos, Omethoate, Parathion, Phoshamidon, Phosmet, Profenofos, Propoxur, Tetrachlorvinphos, Tralomethrin.

Arılar için orta dereceli zehirli olan bazı pestisitlerin aktif maddeleri:

Bromopropylate, Endosülfan, Fluvalinate, Phorate, Primiphos-Methyl, Thiodicarb

Arılar için düşük derecede zehirli olan bazı pestisitlerin aktif maddeleri:

Aldicarb, Amitraz, Benomyl, Bitertanon, Bromophos, Buprofezin, Dicofol, Dioxathion, Glyphosate, Methacrifos, Phosalone, Primicarb, Quinomethionate, Trichlorfon.

Pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri, kimyasalın toksisitesine ve maruziyet süresine bağlıdır. Çocuklar, küçük olmaları ve az gelişmişliklerinden dolayı en duyarlı olanlardır ve pestisitlere karşı son derece hassastır. Pestisitlere maruz kalmanın etkisi hafif cilt tahrişinden doğum kusurlarına, tümörler, genetik değişiklikler, kan ve sinir bozuklukları, endokrin bozukluklar, koma ve ölüme kadar değişmektedir. Aldrin, chlordane, DDT gibi bazı pestisitler, dihedron, endrin, heptaklor, heksaklorobenzen, mireks, toksafen gibi kalıcı organik kirleticiler; endokrin, üreme ve bağışıklık sistemlerini tehlikeye atabilir.

Patojen Bakteriler: *Clostridium botulinum* varlığı sağlık açısından önemlidir. Bu bakterinin sporları balda canlı kalabilir; fakat balda toksin üretemezler.

Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler: Kolza, mısırdan olduğu gibi genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) bazı ülkelerde yetiştirilmekte, arılar ve arıcılar için problem olabilmektedir. Bu tür bitkiler Birleşik Devletler ve Kanada gibi bazı ülkelerde yaygın bir şekilde yetiştirilmekte ve kabul görmekte iken, AB ülkelerinde GDO içeren gıda maddelerinin tüketimine karşı genel bir tepki vardır. AB ülkelerinde % 1 den fazla GDO içeren gıdaların içeriğinde bunun belirtilmesi zorunludur. Polenler önemli derecede kontamine olabilirken % 0,1' den daha az polen içeren ballarda böyle bir problem yoktur.

Arıcılık Faaliyetlerinden Kaynaklanan Kirlilik Etkenleri

En önemli kirlilik kaynağı arı zararlılarına karşı kullanılan bileşiklerdir. Şu anda en önemli pestlerden ikisi varroa ve amerikan yavru çürüklüğüne neden olanlardır.

Akarisitler: Varroaya karşı kullanılan önemli bir kirlilik kaynağıdır. Bunların uzun süre Varroayı kontrol etmek için kullanılmaları gerekmektedir. Varroaya karşı etkinliği onaylanmamış çok sayıda akarisit kullanılmaktadır. Ballarda akarisit düzeyleri genellikle kabul edilebilir düzeylerden daha az miktarda bulunmuştur.

Antibiyotikler: Amerika ve Avrupa yavru çürüklüğü hastalıklarının sağaltımında kullanılırlar ve ballarda bulaşmaya neden olabilirler. Antibiyotiklerle sağaltım çok sayıda ülkede kabul görürken, AB ülkelerinde uygun görülmemektedir. Bu nedenle birçok AB ülkesinde ballarda antibiyotikler için belirlenmiş maksimum kalıntı limitleri yoktur. Bu durum antibiyotik kalıntısı içeren balların satışını yasaklamaktadır. Buna karşın İsviçre, Birleşik Krallık, Belçika gibi bazı Avrupa ülkelerinde en üst kalıntı limitleri belirlenmiştir; antibiyotik grupları için en üst kalıntı limitleri genellikle 0,01-0,05 mg/kg arasındadır.

Yapılan çalışmalarda ballarda sülfonamidler (çok sayıda), aminoglikozitler (streptomisin, dihidrostreptomisin), terasiklinler (tetrasiklin, oksisiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin), kloromfenikol, makrolitler (tilosin, myrosamine), beta laktamlar (penisilinler), nitrofuran metabolitleri (3-amino-2-oxazolidinone, semicarbazide) tespit edilmiştir. Ballardaki antibiyotik kalıntıları toksikolojik yönden fazla bir problem olmamasına rağmen kloramfenikol ve nitrofuranların toksisitesi yüksektir ve pratikte kalıntı limiti olarak sıfır tolerans düşünülür.

Ülkemizde Tarım ve Orman Bakanlığının 2005/74 sayılı genelgesine göre 2006'dan itibaren arılarda antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır. Arı hastalıklarında kullanılan başlıca ilaçlar ve bunların çok yönlü etkileri Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Arı hastalıklarında kullanılan ilaçlar ve çok yönlü etkileri.

Etken madde	Hedef organizma / hastalık	Arılara toksisitesi	Kullanıcıya etkisi	Topraktaki canlı organizmalar a etkisi	Diğer çevresel etkileri	Diğer açıklamalar
Amitraz	Varroa	Düşük toksisiteye sahiptir (LD50 = 12 µg/arı), ancak bu durum son zamanlarda tekrar sorgulanmaktadır. Özellikle larvalardaki ölüm oranını arttırmaktadır	Endokrin bozucu ve potansiyel kanserojendir. Üreme, gelişme ve nörolojik toksisiteye neden olur	Predator akarlar toksisitesi yüksektir	Suda çözünür. Sucul organizmalar ve memeliler için hafif derecede orta derecede toksiktir	Amitrazın, Avrupa Birliği'nde ekotoksitesisi nedeniyle tarımda kullanılması yasaktır. Fransa gibi bazı ülkelerde kısmen de olsa "pazarlama izni" verilmektedir. Amitraz hızla parçalandığı için, bal mumu ve balda birikmez, ancak daha kapsamlı çalışmalarda balmumu ve balda Amitraz ve metabolitlerinin varlığı tespit edilmiştir
Bromopropylate	Varroa	Orta derecede toksik	Düşük derecede toksik, iritant	Predator akarlar için hafif düzeyden orta dereceye toksik	Sudaki organizmalar için toksik, kuşlar için hafif toksik	Balmumunda birikir, balda kalıntı
Coumaphos	Varroa	Hafif toksiktir, ancak 7 günlük tedavilerde yetişkin arıların ölüm oranlarında bir artış gözlenmiştir. Larva besleme jelinde kalıntıları tespit edilirken, olası subletal larva toksisitesi de belirlenmiştir	İritant; çok zehirli. Muhtemel endokrin bozucu. Özellikle buharlaşma uygulamalarında kullanıcı için yüksek risk taşır	-	Sucul canlılar için zehirlidir; gelişmelerini etkiler	Bal ve balmumunda birikir
Cymiazole	Varroa	Orta derecede toksik, erişkin arılarda yüksek ölüm oranı, gıda emilimini etkiler	Orta derecede toksik	-	Sucul canlılar için yüksek toksisite	Balmumunda birikebilir; bal ve propoliste kalıntısı tespit edilmiştir

Flumethrin	Varroa	Hafif toksik	Emilmesi durumunda orta derecede toksik	-	-	Balmumunda birikebilir; propoliste kalıntısı tespit edilmiştir
Fluvalinate, tau-Fluvalinate	Varroa	Fluvalinat orta derecede toksiktir, ancak varroada gelişen direnci yenmek için tau-fluvalinat içeren yeni formülasyonlarla oldukça toksiktir. 7 günden fazla maruz kalma kraliçelerde yüksek mortalite ile sonuçlanır. Erkek arı gelişimini etkiler	Son derece toksik ve iritandır	-	Sucul canlılar için yüksek toksisite	2006'nın sonundan beri İsviçre'de yasaktır. Balmumunda yüksek düzeyde birikir, bal ve propoliste kalıntı oluşturur. Fluvalinat ile tedavide varroa, tüm piretroitlere (flumetrin, amitraz ve akrinatrın gibi) çapraz direnç geliştirir
Fumagillin	Nosema apis, Nosema ceranae	-	Sistemik olarak memelilere uygulandığında toksiktir. Temel toksik etkileri kemik iliği üzerinedir; trombositopeni. Arıcılıkta kullanılan dozlar, ihmal edilebilir bir etkiye sahip olmalıdır	-	-	Nosema ceranae'nın bu antibiyotığe karşı direnç geliştirmesi olasılığı yüksektir. Avrupa'da Fumagillin kullanımı yasaktır
Formik asit	Varroa	Özellikle yavru ve kuluçka aşamasında arı ölümlerini artırır. Bu listede arılar için en ölümcül olan etken madde formik asittir. Farklı dönemlerde yumurtlamayı engeller. Gelişimi etkiler ve erkek arıların yaşam süresini	Çok iritandır, yanıcı	-	Sucul canlılarda popülasyonu, gelişmeyi, dokularını ve ölüm oranını etkiler	Balın organoleptik özelliklerini etkiler; zira balın içinde kolayca çözünür. Bahar tedavisi için kullanılmamalıdır; çünkü kalıntıları hasat için zamanında buharlaşmamış olabilir

		kısaltır				
Laktik asit	Varroa	İşçi arılar, laktik asit uygulamasından sonra kovadaki yumurtaların % 60'ını çıkarmaktadır. Arı ölümleri tedaviden hemen sonra dört kat artar	İrritan	-	Sucul canlılar için toksiktir	Balda gözardı edilebilir kalıntı
Malatyon	Varroa	Orta düzeyde toksik	Orta derecede toksik (Baş dönmesi, terleme, nefes darlığı, karın krampları, ishal, bulantı, kusma). Potansiyel endokrin bozucu ve kanserojen	Predator akarlar karşı hafiften yüksek dereceye toksik, Nematod ve solucanlar için hafif toksik	Sudaki organizmalar, mantarlar, böcekler, yumuşakçalar ve planktonlar için orta dereceden akut seviyeye toksik; gelişim ve davranışları etkiler, endokrin bozucu ve biyobirikim özelliği	Balmumunda birikir, balda kalıntı yapar
Naftalen	Wax moth	Düşük toksisite	Bilinç bulanıklığı. Baş ağrısı. Terleme. Mide bulantısı. Kusma. Sarılık. Koyu idrar, karın ağrısı; kasılmalar. İshal. Baş dönmesi. Bilinç kaybı. Olası kanserojen	Toprak omurgasızları üzerinde kronik etkiler (üreme ve sağlık)	Böcekler ve suda yaşayan organizmalara hafif düzeyden yüksek dereceye toksik: davranış, ölüm, gelişme, üreme ve genetiği etkiler. Biyobirikim yapar	Bal ve balmumunda kalıntı
Oksalik asit	Varroa	Arılarda koloniye göre toksisite değişkendir; soğuk havalarda daha da kötüleşir. Larva gelişimini etkiler ve kraliçe ölüm oranını artırır	İrritan özelliği yüksek, orta düzeyde toksik	-	Sucul canlılarda büyümeyi ve davranışları etkiler, intoksikasyon riski vardır	Balın organoleptik özelliklerini etkiler, çünkü balda kolayca erir

Oksitetrasiklin	Avrupa ve Amerikan Yavru Çürüklüğü, Nosema	Kuluçka gelişiminin her aşamasında yüksek ölüm oranı	Olası alerjik etki; nadiren dişler ve kemikler gibi kalsiyum bakımından zengin organlara zarar verebilir; Arıcılıkta uygulanan dozlar ihmal edilebilir düzey etkili olmalıdır	Potansiyel hasar, yetersiz veri	Memelilerde, suda yaşayan organizmalarda ve bitkilerde düşük toksisite; üreme, gelişme, beslenme davranışı, immünoloji ve mortaliteyi etkiler. Biyobirikim. Çevrede uzun süre kalıcılık	Mevcut uygulama yöntemleriyle balda çok yüksek kalıntı seviyeleri. Hedef organizmalarda direnç gelişir. İlacın kullanımı Avrupa Birliğinde yasaktır
Permetrin	Küçük kovan kurdu	Yüksek toksisite	Orta derecede toksik: İrritan (öksürük, karıncalanma, gözlerde ve deride karıncalanma, uyuşma), İshal, Kusma. Olası kanserojen, şüpheli endokrin bozucu	Predator akarlar için çok toksik, örümcekler için orta derecede toksik	Sudaki organizmalar ve omurgasızlar için çok toksiktir (davranış, gelişme, ölüm oranı, beslenme davranışı, morfoloji, üremeyi etkiler), biyolojik birikim. Faydalı insektler için zehirliden çok zehirliye kadar geniş bir marjı vardır	Lipofiliktir, bu nedenle balmumunda birikir
Timol	Varroa	Toksik; kolonilerin zayıflaması, özellikle düşük sıcaklıklarda daha da etkili. Bazı koloniler timol tedavisi sırasında kış için depo toplamakta zorlandılar	İrritan	-	Sucul organizmalar için hafif dereceden orta dereceye kadar toksiktir: Mortalite, davranış, büyüme, enzimler, hormonlar, immünoloji ve popülasyonu etkiler	Balmumunda birikir. Balın organoleptik özelliklerini kuvvetli bir şekilde etkiler (kekik tadı)
Tylosin (tartrate)	Amerikan yavru çürüklüğü	Önerilen dozlarda uygulanırsa zararsızdır	İrritan, alerjen. İnsanda hiç kullanılmadığında n yetersiz veri. İshal ve gastrointestinal rahatsızlık, deri ağrısı, yangı ve diğer memelilerde gözlenen enjeksiyon bölgesi etrafındaki kaşıntı	Toprak mikroorganizmalarının büyümesini etkiler	Faydalı mikroorganizmalar için toksik	Balda metabolit formları uzun süre kalıcılık gösterir. Hedef organizmalarda direnç gelişmesi. Avrupa'da arıcılıkta kullanımı yasak

Diğer Bileşikler: Bazı arıcılar petek güvelerinin kontrolünde paradiklorobenzen kullanırlar. Bu bileşik balmumu siklusuna girer, ticari balmumunda ve balda kirliliğe yol açar. Diğer daha toksik bir madde de naftalindir. Buda aynı amaçla kullanılır ve balda kalıntısı tespit edilmiştir.

Tahta koruyucular ve boyalar kovanları bozulmaya, yıpranmaya karşı korumak için kullanılır. Bunlar insektisit ve fungisit içermesi durumunda balda kirlenmeye neden olabilirler.

Bal hasadı sırasında arıları uzaklaştırmak için kullanılan kimyasal kovucular da diğer bir kirlilik kaynağıdır. Karboksilik asit, benzaldehit ve nitrobenzende olduğu gibi kullanılan bazı zehirli kimyasal maddeler arı ürünlerinde istenilmeyen koku ve tat oluşumuna ve kalıntıya neden olmaktadır. Genellikle hasat zamanında kimyasal maddelerin kullanılması tavsiye edilmemektedir.

Balların üretimi ve depolanması sırasında uygun olmayan metal kapların kullanılması istenilmeyen metal kirliliğine neden olabilir. Bakır, demir, çelik veya çinkodan yapılmış ekipmanların kullanılması balda toksik seviyelere ulaşabilecek düzeyde metal kalıntılarına, istenilmeyen renk ve koku değişikliklerine neden olabilmektedir. İç yüzeyi boyalı veya korozyona uğramış kaplar inorganik ve organik bileşiklerle bulaşma riskini artıracağından tercih edilmemelidir.

Diğer taraftan bazı bitkisel unsurlarda bala geçerek zehirleyici nitelikte etki oluşturabilir. Bunlar için örnekler de;

- *Rhododendron ponticum* (Azaleapontica) insanlar için zehirli alkaloitler içerir
- Andromeda çiçekleri insanlarda psikoaktif ve toksik olan grayanotoksinler içerir
- *Kalmia latifolia*, alaca çalı, dağ defnesi hastalık veya ölüme yol açar
- Wharangi çalısı, *Melico peternata*, Yeni Zelanda'da, zehirli ölümcül bal üretir
- Datura bitkileri, Meksika ve Macaristan
- *Belladonna* çiçekleri, Macaristan'da henbane (*Hyoscamus niger*) bitkisi
- *Serjanialethalis* Brezilya'da
- *Gelsemium sempervirens* Güneybatı Amerika'da
- *Tutu* (*Coriaria arborea*), Yeni Zelanda'da, pikrotoksin zehir grubundan olan tutin üretir
- Zakkum Akdeniz bölgesinde.

Kaynaklar

1. Anon. 2019. Overview of Pesticides and Antibiotics Used in Beekeeping. Erişim adresi: <https://www.jiventure.info/Overview of Pesticides and Antibiotics Used in Beekeeping>. Erişim tarihi: 11.04.2019.

2. Aslı Elif Sunay 2006. Balda Antibiyotik Kalıntısı Sorunu. Uludağ Arıcılık Dergisi-Kasım 2006: 143-148.
3. Doğanay,A., Aydın,L. 2017. Bal Arısı Yetiştiriciliği Ürünleri Hastalıkları. Dora Basım, Yayın Dağıtım Ltd.Şti., Bursa.
4. TÜİK 2018. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002, Erişim tarihi 07.02.2018. "TÜİK Hayvansal Üretim İstatistikleri",2018.
5. Kilit,G., 2013. Avrupa Birliği ve Türkiye’de Gıda Güvenliği ve Son gelişmeler, İKV Değerlendirme Notu, İktisadi Kalkınma Vakfı, Kasım.
6. Konak, F. 2012. "Türkiye’de arıcılığın gelişimi ve verimlilik çalışmaları", Standart ekonomik ve teknik dergisi. TSE yayını, 51(601), 34-39.
7. Noori Al-Waili, Khelod Salom, Ahmed Al-Ghamdi and Mohammad Javed Ansari 2012. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. The ScientificWorld Journal. Volume 2012, Article ID 930849, doi:10.1100/2012/930849
8. Portakal,P., Yarsan,E 2013. "Investigation Of The Activity Of Different Pharmaceutical Formulations Including Coumaphos Against Varroa Jacobsoni In Naturally Infested Honeybee Colonies And Analysis Of The Residues In Honey". Advances in Food Sciences, 5(4): 177-180.
9. Tayar,M., Yarsan,E. (2014). Veteriner Halk Sağlığı. Dora Yayıncılık. Bursa. ISBN: 978-605-4798-63-6.
- 10.T.C. Başbakanlık Resmi Gazete. 2012. "İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları Ve Bildirimine İlişkin Yönetmelik". 14.01.2012 Tarih ve 28173 Sayılı Resmi Gazete Erişim:<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/01/20120114-11.htm>.Erişim Tarihi: 07.02.2018.
- 11.Uygur, Ö.Ş., Girişgin, O. 2008. "Bal Arısı Hastalık ve Zararlıları". Uludağ Arıcılık Dergisi 8(4): 130-142.
- 12.Yarsan,E. (2018). Veteriner Hekimlikte İlaç Uygulama Yöntemleri. Editör: Prof.Dr. Ender Yarsan. Ankara Nobel Kitabevleri, Ankara. ISBN: 978-605-9215-90-9.
- 13.Yarsan,E. "Arıcılıkta Veteriner İlaçları ve Kalıntı Sorunu" Arıcılıkta sorunlar ve Çözüm Önerileri Paneli. 18 Nisan 2019, Ankara.
- 14.Yarsan,E. "Arıcılıkta Veteriner İlaçları ve Kalıntı Sorunu" Vet-Arı Çalıştayı. 3-4 Mayıs 2019, Burdur.
- 15.Zaneta Bargan’ska, Marek S’lebioda, Jacek Namies’nik 2011. Determination of antibiotic residues in honey. Trends in Analytical Chemistry, 30(7):1035-1041.

Türkiye’de Zehirlenme Şüpheli Arı Ölümleri

Hasan Hüseyin ORUÇ¹, Meltem ÇAYCI²

¹Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Bursa, Türkiye

²Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye

Özet: Türkiye’nin çeşitli bölgelerinde bazen zehirlenme şüpheli arı ölümleri olmakla birlikte, özellikle 2007-2019 yılları arasında, Trakya Bölgesinde, Adana ve Osmaniye’de, Urfa-Harran’da ve Bursa’da, yıllara göre değişkenlik göstermekle birlikte, hızlı ve yoğun arı ölümleri tespit edilmiştir. Trakya Bölgesinde özellikle 2007 ve 2018 yıllarında Haziran ayı sonundan Temmuz ayı sonuna kadar olan ayçiçeği çiçek açma döneminde; Adana ve çevresinde 2013-2018 yılları arasında Şubat başından Mart ayı ortalarına kadar her yıl mısır ekim döneminde; Harran’da 2018 yılında Temmuz ayı sonundan Ağustos ortasında kadar Pamuk nektar döneminde ve Bursa’da ise 2018-2019 yıllarında, Mart ortasından Nisan başına kadar, meyve bahçelerinin çiçeklenme döneminde zehirlenme şüpheli yoğun arı ölümleri görülmüştür. Yapılan gözlemler, araştırmalar ve labortatuvar sonuçları hızlı ve yoğun arı ölümlerinin başlıca nedeninin pestisitler olduğu; pestisitlerden de özellikle neonikotinoid grubu insektisitlerin, nenicotinoid grubundan da clothianidin, imidacloprid ve thiamethoxamın (özellikle clothianidin ve arılara toksisitesi çok yüksektir) bu ölümlerde rol oynadığı, diğer pestisitlerin bu grubu takip ettiği görülmektedir. Türkiye’de arılarda zehirlenmelerin azaltılması ve önlenmesinde, tanı ve korunma konusunda daha fazla uzman toksikolog yetiştirilmesi ve toksikoloji labortatuvarlarının güncel pestisitleri de içerecek şekilde analiz parametrelerini arttırmaları gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bal arısı ölümleri, Neonikotinoidler, Pestisitler, Türkiye.

Honey Bee Deaths with Suspected Poisonings in Turkey

Abstract: In Turkey, however there are honey bee deaths with suspected poisonings in different regions and provinces, especially between 2007 and 2019, there were differences depend on the years, Thrace region, Adana and its neighbour's provinces such as Osmaniye, Harran district of Urfa province and Bursa province rapid and extensive deaths of honey bees were observed. Suspected honey bee deaths were determined during period of blossoming of sunflower from end of June to end of July in Thrace region especially in 2007 and 2018; from at the beginning of February to middle of March during between 2013 and 2018 that this period is maize seeds sowing period in Adana and neighbour areas; from end of July to middle of August that this period is nectar of cotton in 2018 in Harran and from middle of March to at the beginning of April that this period is blossoming of fruits in 2018 and 2019 in Bursa. The main reason of these honey bee deaths was pesticides, especially neonicotinoids such as clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam (especially clothianidin and it is highly toxic to honey bees) according to observations, searches and laboratory results, and other pesticides was following this group. Turkey need more expert veterinary toxicologists and good quality veterinary laboratories that can analyse current pesticides for decrease and prevent of honey bee deaths in Turkey.

Keywords: *Honey bee deaths, Neonicotinoids, Pesticides, Turkey.*

Giriş

Yaygın arı kayıpları pek çok ülkede ortaya çıkmakta ve bu kayıplar yıllara, mevsimlere ve ekim dönemlerine göre değişkenlik gösterebilmektedir (Fletcher ve Barnett, 2003; Rortais ve ark., 2005; Pistorious ve ark., 2009; Ünal, 2010). Arı kayıplarının başlıca nedenleri arasında bitkisel üretimde kullanılan pestisitler, bal arısı parazitleri, patojen mikroorganizmalar, kirli içme suları, arı hastalıklarının tedavisinde bilinçsiz ilaç kullanımı, olumsuz bakım ve beslenme şartları veya bunların birlikte rol oynamaları yer almaktadır (Bacandritsos ve ark., 2010). Türkiye'de Trakya Bölgesi ayçiçek nektar dönemi, Adana ve Osmaniye'de mısır ekim dönemi gibi, Bursa'da ilkbahar meyve çiçeklenme/nektar dönemi gibi ani, yaygın ve dönemsel seyreden arı ölümlerinin en önemli nedeni bitkisel üretimde kullanılan pestisitlerdir. Yüksek

dozda ve ruhsatsız kullanılan arı ilaçları, arı hastalıkları, kötü bakım ve beslenme diğer arı kayıp nedenleridir.

Arılarda zehirlenmeler genellikle hızlı ve büyük kayıplara yol açar. Başlıca zehirlenme nedenleri tarımsal üretimde kullanılan pestisitler ve arı hastalıklarında özellikle varroa tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Son yıllarda bitkisel üretimde tohumlar özellikle de mısır, ayçiçeği ve pamuk tohumları tel kurtlarına karşı pestisitlerle (özellikle neonikotinoidler) kaplanmaktadır (Şekil 1). Mısır ekim dönemlerinde pestisitlerin bir kısmı tohumdan ayrılarak toz halinde havaya karışmaktadır (neonikotinoid grubu gibi). Havada asılı kalan bu ilaçların bulunduğu yerden geçen tarlacı arılar da bu ilaçlarla temas etmekte ve arı kayıpları meydana gelmektedir (Greatti vd., 2003; Tapparo vd., 2012). Çukurova gibi büyük tarım alanlarını içeren mısır ekim dönemlerinde havaya karışan pestisit miktarları nedeniyle arı kayıpları fazla olmaktadır. Havada yoğun olarak bulunan bu tarım ilaçlarının rüzgarla kovanların olduğu diğer bölgelere ulaşması sonucu da arılarda zehirlenmeler ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, ayçiçeği ve pamuk üretiminde, ilkbaharda ise sert çekirdekli meyve ağaçlarının çiçeklenme döneminde nektar ve polen toplarken de bal arıları pestisitlere maruz kalır ve zehirlenirler. Yine belediyelerin sivrisinek mücadelesi, karayolu kenarındaki bitkilerin pestisitlerle yok edilmesi o bölgede bulunan arıları zehirleyebilir. Pestisitlerin arıların su kaynaklarına, nektar dışındaki bitki salgı ve sıvılarına ulaşması da zehirlenmelere neden olur. Arı hastalıkları tedavisinde kullanılan ilaçlar, yüksek dozda verildiğinde veya yine farklı ilaçların karışımları bilinçsiz ve kontrolsüzce hazırlanıp kullanıldığında arılarda zehirlenmelere neden olabilmektedir.



Şekil 1. Neonikotinoidlerle kaplı, kırmızı-morumsu renkte Trakya Bölgesinde ekilen ayçiçeği tohumlarından.

Pestisitler, arılar tarafından temas, solunum ve ağız yoluyla vücuda alınır ve zehirlenmeye neden olur. Pestisitler, tarlacı arılarda pestisit toksisitesine de bağılı olarak dışarıda ve kovan önünde ani ölümlerle seyreden akut zehirlenmelere neden olur. Daha az toksik olan veya daha düşük miktarlarda pestisitlerin arıların vücutlarında birikimi kronik zehirlenmelere (daha küçük miktarlarda pestisit 10 gün ve üzerinde alımında kovan içindeki ve dışındaki tüm arılarda görülebilen, koloniyi zayıf düşüren veya yavaş yavaş öldüren zehirlenmelerdir) neden olur.

Akut zehirlenmelerde etkilenen ve ölen arılar genellikle tarlacı arılardır. Pestisit gurubu ve etkili maddeye bağılı olarak bazı farklılıklar bulunmakla birlikte zehirlenme belirtileri saatler veya gün(ler) içinde, kovanların önünde fazla miktarda ölmüş veya ölmek üzere olan arı bulunur (Şekil 2). Etkilenmiş ancak henüz ölmemiş arılarda anormal hareketler, denge kaybı, düşme, kovan girişini bulmaya çalışma, bulmakta zorlanma, sersemlik, felç, dışarı çıkmış dil ve ölüm görülür (Bortolotti vd., 2009; Pistorius vd., 2015; Kiljanek vd., 2016; FAO, 2018).



Şekil 2. Şanlıurfa, Harran Ovası, pamuk tarlası kenarındaki arılıklarda arı ölümleri.

Bu çalışmada, 2007 ve 2019 yılları arasında Türkiye’de görülen hızlı ve yoğun tarlacı arı ölümleri ve zehirlenme ile bağlantısı ile nedenlerinin tartışılması amaçlanmıştır.

Bildiri İçeriği

Bitkisel üretimde ve evre ilaçlamasında kullanılan pestisitler bal arılarında önemli zehirlenmelere neden olmaktadır (Fletcher ve Barnett, 2003; Rortais ve ark., 2005; Bortolotti ve ark., 2009; Ünal ve ark., 2010; Pistorius ve ark., 2015).

Trakya’da, 2007 yılında, ayieklerin iek açtığı dönemde (Haziran sonu-Temmuz sonu arası) bal arılarında yaygın ölümler görölmüştür (GKGM Raporu, 2013). Yapılan incelemelerde neonikotinoidlerden imidacloprid içeren Gaucho markasının bölgede ayçiçek tohumlarının kaplanmasında o yıllarda kullanılmaya başlandığı gözlenmiştir. 2013 yılında bakanlık yetkililerinin bu tohumları üreten firma yetkilileri ile yaptıkları görüşmeler sonucunda, bu uygulamanın geçici olarak durdurulmasıyla ölümler azalmıştır. Bu amaçla 2012-2016 yılları arasında, “TAGEM/HSYGAD/12/A06/PO3/13” nolu, “Bal arılarında neonicotinoid grubu insektisitlerin toksikasyonlarının araştırılması” adlı projenin sonuç raporunda (Ünal ve ark., 2016); Trakya’da, özellikle de Tekirdağ ve Edirne’de toplanan ayçiçeği tarlalarının toprak örneklerinde %25 ve ayieklerinin çiçeklerinde ise %35 oranında imidacloprid tespit edilmiştir. Ancak 2018 yılı Haziran ayı sonu ile Temmuz ayı sonu arasında bu ölümler yine 2007 yılındaki gibi yaygın bir şekilde Trakya Bölgesi’nde özellikle Keşan, Hayrabolu ve Babaeski ilçelerinde görölmüştür. Bu nedenlerle ayieğine giden arıcıların ve özellikle Trakya’lı sabit ve o bölgeye gelen gezginci arıcıların hem arı hem de bal kaybı ciddi düzeylere ulaşmıştır. Ancak Türkiye pazarında ayçiçeğinde ruhsatlı pek çok ürünü olan neonicotinoid grubu şüpheli olmasına rağmen, 2018 yılında bu grubun rutin analizlerini yurt içinde yapmak mümkün olamamıştır. 2012-2016 yılları arasında, “TAGEM/HSYGAD/12/A06/PO3/13” nolu proje ile neonicotinoid grubu insektisitlerin analizleriyle ilgili altyapı kurulmuşken sonraki yıllarda bu analizlerin yapılamıyor olması da değerlendirilmesi gereken bir durumdur.

Adana’da ölümlerin en fazla görüldüğü 2017 yılında, mısır ekim döneminde ve mısır tarlalarına yakın olan 530 arılıkta özellikle etkilenim olmuş ve bu arılıklardaki 117.556,00 kovan %30’un üzerinde (bu rakam %80’e kadar çıkabilmektedir) ani arı kayıpları meydana gelmiştir (Adana İl Müdürlüğü Raporu, 2017). Ölümler ani ve yaygın olarak seyretmekte, saatler veya gün(ler) içinde, kovanların önünde fazla miktarda (500 ve 1000 arı ve daha

fazlası) ölmüş veya ölmek üzere olan arı bulunmaktadır. Kovan önünde, etkilenmiş ancak henüz ölmemiş arılarda anormal hareketler, denge kaybı, düşme, kovan girişini bulmaya çalışma, bulmakta zorlanma, sersemlik, felç, dışarı çıkmış dil ve ölümler görülmüştür. Bu olaylarda etkilenen ve ölen arılar genellikle tarlacı arılardır.

Adana'da mısır ekimi 89.849,2 hektardan 96.737,0 hektara kadar değişen geniş bir alanda yapılmaktadır (Adana Tarım İl Müdürlüğü Kayıtları, 2018). Adana'daki bu mısır ekim döneminde meydana gelen hızlı ve yoğun arı ölümleri yine benzer bir şekilde, Avrupa'da Fransa (Chauzat ve ark., 2010), Almanya (Pistorius ve ark., 2009), İtalya (Bortolotti ve ark., 2009) ve Slovenya'da (van der Geest, 2012) görülmüştür. Dönem olarak ilkbaharda ve mısır ekim döneminde görülmüş ve zehirlenmeye mısır tohumunda tel kurtlarına karşı kullanılan neonikotinoidlerin özellikle de clothianidin, imidacloprid ve thiamethoxamın neden olduğu belirlenmiştir. Adana'daki saha çalışmalarında ruhsatlı ve clothianidin içeren kaplanmış tohumlarının kullanıldığı bilinmektedir ve dönem, ölümlerin ortaya çıkış şekli ve arı kayıp oranlarının yüksekliği Adana ile Avrupa'daki ülkelerde görülen zehirlenme olgularıyla çok fazla benzerlik göstermektedir. Neonikotinoidlerin ve özellikle bu gruptan clothianidin, imidacloprid ve thiamethoxamın arılar için toksisitesi çok yüksektir ve bu üç neonikotinoid Türkiye'de mısır ve ayçiçeği gibi diğer pek çok bitkilerin üretiminde ruhsatlı olarak ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu konuda Avrupa Birliği, çok arı kaybına neden olduğu için bu üç etkin maddenin seralar ve kış bitkileri dışında kullanımını 2013 yılında yasaklamıştır (EC, 2013). Havanın yağışlı olduğu günlerde ölümlerin durması veya çok azalmasının nedeni havada asılı kalan neonikotinoidler suda çözünebilir yapıdadır (Wood ve Goulson, 2017) ve yağmur suyuyla arıların geçiş bölgelerindeki hava temizlenmektedir, ayrıca yağmurlu havalarda genellikle mısır ekimi yapılmamaktadır. 2017 yılında ölümlerin daha çok olmasının temel nedeni de budur, çünkü 2017 yılı Adana ve çevresinde mısır ekim dönemi genellikle yağmursuz geçmiştir.

Toksikolojik (kimyasal) analizler ve arı hastalıkları kontrolü için 2007 yılında 2013 ile 2018 yılları arasında ölü ve etkilenmiş yetişkin arı numunesi ile mısır tohum numuneleri alınmış ve Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Etlik Merkez Veteriner Kontrol Enstitüsü ve Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsüne gönderilmiştir. 2007

Yılında Trakya Bölgesindeki ayçiçeği nektarı toplayan arılarla ilgili numuneler toplanmış ve proje yapılmış, 2013-2018 yılları arasında Adana'daki ani ve yaygın ölümler için saha incelemeleri ve 2018 yılında çalıştay da yapılmıştır. Gözlemlere göre ölümler ani ve yaygın seyretmekte, Şubat başı ve Mart ortası arasında yaygın olarak ortaya çıkmakta ve bu dönemde en fazla yapılan etkinlik ise mısır ekim dönemi olmasıdır. Mısır ekiminin başlamasıyla ölümler başlamakta, yağmurlu havalarda durmakta veya çok azalmaktadır. Ovada rüzgarlı havalarda ekim yapıldığında ve rüzgarın ova tarafından geldiği zamanlarda ekim yapılan arazilerden 15-25 km uzakta iç kısımda olan arılıklarda da ani ölümler şekillenmiştir.

Pestisit olarak organik klorlu, organik fosforlu, karbamat, piretroid ve bazı diğer pestisit analizleri Adana ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitülerinde, gaz kromatografi kütle dedektörü (GC-MS) ve sıvı kromatografi kütle dedektörleri (LC-MS/MS) ile yapıldı. Neonikotinoid grubu ve arılarda analizi için laboratuvar şartları uygun olmadığından bu analizler yapılamadı. Etkilenen arılarda, arı hastalıklarından Varroa destructor, Nosema ceranae, siyah kraliçe arı virüsü, deforme kanat virusu, Kashmir arı virüsü, kronik arı felç virüsü ve Amerikan yavru çürüklüğü Samsun ve Etlik Veteriner Kontrol Enstitülerinde araştırılmış, 2018 yılında Adana ve ilçelerinden toplanan 6 adet arı numunesi neonikotinoid analizleri için Almanya'da bir laboratuvara Tarım ve Orman Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından gönderilmiştir ve altı numunenin tamamında clothianidin tespit edilmiştir.

2018 yılındaki Harran'da pamuk nektar döneminde ise beyaz sinek, yeşil kurt, yaprak kurdu, örümcek ve yaprak bitine karşı kullanılan ve arılar için zehirliliği yüksek olan ilaçların da kullanıldığı görülmektedir. 2018 ve 2019 yıllarında ilkbahar mevsiminde özellikle Mart ayı ortasından Nisan ayı başına kadar özellikle armut bahçelerine yakın arılıklarda ani ve yoğun arı ölümleri görülmüştür. Bu ölümler ve numune analizleriyle ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Pestisitlerin bitkilere uygulanması sırasında ve sonrasında arılar tarafından temasla alınması, nektar ve polenle kovana taşınması olasılığı yüksektir. Uygulanan bu pestisitlerin arıların

içme sularına bulaşmaları da mümkündür. Arı kayıpları sonucunda yapılan pestisit analizlerinde, arıların birden çok pestisite aynı veya benzer zamanlarda maruz kaldığını göstermektedir. İstanbul'da 2007 yılında, 350 kovanın etkilendiği ve 200 kovanın kaybedildiği olayda arı ve petek numunelerinde dikuat, parakuat, naftalin ve diazinonun birlikte tespit edilmesi arıların birden çok pestisite benzer zamanlarda maruz kalmasına önemli bir örnek oluşturmaktadır (Ünal ve ark., 2010). Türkiye'de 10 farklı zehirlenme olgusunda (Ünal ve ark., 2010), arı ve petek numunelerinde birden fazla (2-4 arası) pestisit tespit edilmiştir. Bu durum, arıların ya karıştırılmış pestisitlere ya da değişik insektisit uygulanmış farklı tarım alanlarında ilaçlama sırasında veya sonrasında temas etmesiyle açıklanabilir. Ayrıca, yerleşim yerlerinde veya yakınlarında yapılan bazı uygulamalarda (kene ve sivrisinek mücadelesi gibi) organik fosforlu, klorlu ve karbamat grubu bileşikler veya pretroid grubu bileşikler karıştırılarak kullanılabilir. Bu ilaçların uygulandığı alanlarda bu pestisitlerle temas eden arılarda zehirlenmeye neden olduğu gibi bu pestisitler arı ve arı ürünleri numunelerinde birlikte tespit edilebilmektedir (Ünal ve ark., 2010). 2008 Yılında İstanbul'da bir zehirlenme olgusunda 450 kovanın tamamı kaybedilmiştir. Konu ile ilgili araştırmalarda kene mücadelesi nedeniyle havadan ilaçlama yapıldığı bilgisine ulaşılmıştır (Ünal ve ark., 2010). Bu olayla ilgili yapılan analizlerde arı ve peteklerde sipermetrin tespit edilmiştir. Adana ve Osmaniye'de 2013-2017 yılları arasında artan yoğun arı ölümleri sonrasında ölü arı ve peteklerde yapılan pestisit analizlerinde, carbendazim, epoxicanazole, tebucanazole, cyprodinil, pyridaben, buprofezin ve acetamiprid gibi pestisitlerin tespit edilmesi arıların aynı dönemde pek çok pestisite maruz kaldığını göstermektedir (Adana İl Müdürlüğü Raporu, 2017).

Pestisitlerle bal arılarında kasıtlı zehirlenmelere de rastlanmaktadır. Afyonkarahisar'da bildirilen bir zehirlenme olgusunda, arıların arasında veya yörede yerleşik çiftçilerle anlaşmazlıklar sonucunda kimliği belirsiz kişilerce arıların kasıtlı olarak endosülfan grubu ile zehirlendiği tespit edilmiştir (Ünal ve ark., 2010).

Sonuç

2007 Yılındaki Trakya'daki ani ve yoğun arı kaybının nedeni olarak ayçiçeği tohumunun neonikotinoid grubu özellikle imidocloprid ile kaplanması sonucu, ilaç topraktan bitkiye ve nektara geçebilmekte ve arılar için çok toksik olduğu için öldürebilmektedir. 2018 yılında da

tekrar ve daha yüksek dozlarda ayçiçeği tohumunda neonikotinoidlerin kullanılmış olma ihtimali yüksektir.

2013-2018 Yılları arası Çukurova Yöresinde (özellikle Adana ve Osmaniye’de), mısır ekim dönemi olan Şubat ayı başı ile Mart ayı ortası arasında, her yıl hızlı ve yoğun arı ölümleri görülmüştür. Ölümler, havanın yağışlı olmasına bağlı olarak ciddi oranda azalmakta veya durmaktadır. Mısır tohumlarında tel kurtlarına karşı kaplanarak kullanılan ve pnömatik ekim mibzeri ile ekim sırasında havaya da karışabilen neonikotinoid grubu insektisitler ve özellikle bu gruptan clothianidin şüpheli olarak görülmüştür ve Almanya’ da analizleri yapılan numunelerin tamamında neonikotinoidlerin ve özellikle clothianidin tespit edilmesi bu yöndeki zehirlenme şüphelerini ortadan kaldırmıştır. Bu gelişmelerden sonra Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından 19 Aralık 2018’de clothianidin, imidacloprid ve thiamethoxamın tarımsal üretimde kullanılmasının kısıtlanması ve yasaklanması oldukça olumlu bir gelişmedir.

Şanlıurfa’nın Harran ve Akçakale ilçeleri arasında (Harran Ovasında), pamuktan nektar toplaması için, bölgeye Adana’dan arılarını getiren gezginci arıların, 2018 Yılı, 2-10 Ağustos arasında yoğun arı ölümleri olmuş ve arılar kayıplarının %30 ile %70 arasında değiştiğini bildirmiştir. Yapılan saha incelemelerinde bu dönemde yoğun pestisit kullanımı olduğu, ancak bu incelemelerin detaylandırılarak devam etmesi gerektiği görülmüştür.

Sonuç olarak, Türkiye’de ani ve yoğun ölümlerin en önemli nedeni tarımda kullanılan ve arılar için aşırı toksik olan pestisitlerdir. Bu pestisitlerin ruhsatlandırılırken ve kullanılırken dikkatli olunması, bilinçli ve kontrollü kullanılmasının sağlanması, bunların analizleriyle ilgili Veteriner Kontrol Enstitüleri laboratuvarlarının altyapılarını geliştirmeleri ve güncellemeleri gerekmektedir.

Kaynakça

1. Adana İl Müdürlüğü Kayıtları, Tarım ve Orman Bakanlığı, 2018. Adana’da 2013-2017 Yılları Arasında Mısır Ekimi Yapılan Tarım Arazisi Alanları.
2. Adana İl Müdürlüğü Raporu, Tarım ve Orman Bakanlığı, 2017. Adana İlinde Yaşanan Arı Ölümlerinin Nedenleri, Yapılan Çalışmalar ve Çözüm Önerileri Raporu.
3. Bacandritsos, N., Granato, A., Budge, G., Papanastasiou, I., Roinioti, E., Caldon, M., Mutinelli, F. 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. J Invert Path 105(3):335-40.
4. Bortolotti, L., Sabatini, A. G., Mutinelli, F., Astuti, M., Lavazza, A., Piro, R., Porrini, C. 2009. Spring honey bee losses in Italy. Julius-Kühn Archiv 423:148-152.
5. Chauzat, M. P., Martel, A. C., Blanchard, P., Clément, M. C., Schurr, F., Lair, C., Faucon, J. P. 2010. A case report of a honey bee colony poisoning incident in France. J Apic Res 49(1):113-115.

6. EC (European Commission), 2013. Commission Implementing Regulation (EU) No 485/2013. Amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances. Off J Eur Union L 139/12-26.
7. FAO, 2018. A. Bee-poisoning symptoms, Chapter 7, pesticides and beekeeping. Retrieved March 26, 2018, from <http://www.fao.org/docrep/x0083e/X0083E09.htm>
8. Fletcher, M., Barnett, L. 2003. Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. Bull Insectol 56:41–145.
9. Greatti, M., Sabatini, A. G., Barbattini, R., Rossi, S., Stravisi, A. 2003. Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results. Bull Insectol 56(1):69–72.
10. GKGM (Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü)-Risk Değerlendirme Daire Başkanlığı Raporu, 2013. Arı Ölümelerini Değerlendirme Çalışma Grubu, Arı Ölümlerinin Nedenleri Hakkında Değerlendirme Raporu.
11. Kiljanek, T., Niewiadomska, A., Posyniak, A. 2016. Pesticide Poisoning of Honeybees: A Review of Symptoms, Incident Classification, and Causes of Poisoning. J Apic Sci 60(2):5-24.
12. Pistorius, J., Bischoff, G., Heimbach, U. ve Stähler, M. 2009. Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize. Julius Kühn Archiv 423:118–126.
13. Pistorius, J., Wehner, A., Kriszan, M., vd., 2015. Application of predefined doses of neonicotinoid containing dusts in field trials and acute effects on honey bees. Bull Insectol, 68(2): 161-172, 2015.
14. Rortais, A., Arnold, G., Halm, M. P. ve Touffet-Briens, F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie 36(1):71–83.
15. Tapparo, A., Marton, D., Giorio, C., Zanella, A., Soldà, L., Marzaro, M., ... ve Girolami, V. 2012. Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. Environ Sci Technol 46(5):2592-9.
16. Ünal, H.H., Oruç, H.H., Sezgin, A. ve Kabil, E. 2010. Determined pesticides after honey bee deaths between 2006 and 2010 in Turkey. U Bee J 10(4):119-125.
17. Ünal, H.H., Sezgin, A., Kabil, E., 2016. TAGEM/HSYGAD/12/A06/PO3/13 nolu, Bal arılarında neonicotinoid grubu insektisitlerin toksikasyonlarının araştırılması projesi sonuç raporu, 2016.
18. van der Geest, B. 2012. Bee poisoning incidents in the Pomurje region of eastern Slovenia in 2011. Julius Kühn Archiv 437:124.
19. Wood, T. J. ve Goulson, D. 2017. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. Environ Sci Pollut Res 24(21):17285–17325.

“*Tarantula cubensis* Ekstraktı” Gerçeği ve Hayvan Sağlığında Önemi

Kutlay GÜRBULAK¹ Murat KANBUR² Tameran MORKOÇ³

¹Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kayseri

³İnterhas, Ankara

Özet: *Tarantula Cubensis* ekstraktı günümüzde hayvan sağlığında geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Olumlu etkileri birçok literatürde bildirilmesine rağmen yan etkisi ile ilgili enjeksiyon yerinde nadiren geçici deri reaksiyonu oluşabileceği şeklinde bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar çalışma prensibi olarak alopantik olarak sınıflandırırken bazı araştırmacılar homeopatik olarak değerlendirmektedirler. *Tarantula Cubensis* ekstraktı içeren Tharenekron D2 ve D6 formatı Ülkemizde sıklıkla kullanım alanı bulmuş, D6 formatı ile homeopati lisansı almış ürünler bulunmaktadır. Evcil hayvanlarda deri yangısı, tırnak hastalıkları, flegmonlar, ülserler, irinli lezyon ve nekrotik dokularda demarkasyon, rejenarasyon ve antiflojistik etki oluşturmak amacıyla uterus ve diğer iç organ yangılarında, mastitislerde, deri hastalıkları ve meme tümörlerinde direkt ya da yardımcı tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Evcil hayvanlarda gebelerde tekrarlayan dozlarda kullanılması Veteriner Hekimler için önemlidir. İnsan hekimliğinde de güncel literatürlerin yayınlanması *Tarantula Cubensis* ekstraktı’na ilgiyi her geçen gün artırmaktadır.

Anahtar Kelime: *Hayvan sağlığı, Önem, Tarantula cubensis ekstraktı.*

The Fact of Tarantula Cubensis Extract and Its Importance in Animal Health

Abstract: Tarantula Cubensis extract is widely used in animal health today. Although its positive effects have been reported in many study, it has been reported that transient skin reactions rarely occur at the injection site associated with its side effects. Some researchers classify it as alopatic as the publication principle, while others consider it as homeopathic. Tharenekron D2 and D6 format containing Tarantula Cubensis extract is widely used in our country. There are products that have been licensed homeopathy with D6 format. It is used for direct or auxiliary treatment in uterine and other internal organ inflammation, mastitis, skin diseases and mammary tumors in order to produce demarcation, regeneration, antiphlogistic and resorptive effect in skin inflammation, inflammatory nail diseases, phlegmons, ulcers, pus lesion and necrotic tissues in domestic animals. It is important for Veterinarians to use repeated doses in pregnant animals. The publication of currentiy publication in human medicine also increases the interest in Tarantula Cubensis Extracts in human medicine also increases the interest in Tarantula Cubensis extracts.

Keywords: Animal Health, Importance, Tarantula cubensis ekstrakt.

Homeopatinin Tarihçesi ve Kullanımı

Yunanca homoeo (benzer) ve pathos (acı çekmek) kelimelerinden oluşan homeopati, benzerlik kanununa dayanan tıbbi bir yöntemdir (Ruddock et al; 2007). Alman fizikçi Samuel Hahnemann (1755–1843) homeopatinin kurucusu ve geliştiricisi olarak kabul edilmektedir. *Similia similibus curantur* “benzer şeyler benzerleriyle tedavi edilebilir” tezinine dayanan homeopati; vücudun kendi kendini tedavi edici yanıtlarının uyarılmasıyla iyileşmenin sağlandığı doğal bir tedavi şeklidir (Turner et al; 1980).

Hayvanlarda homeopatik tedavi 1785 yılında Baron von Boenninghausen tarafından başlatılmıştır. Von Boenninghausen'in birçok türden hayvanı tedavi ettiği ve veteriner homeopatinin prensiplerini ortaya koyduğu bilinmektedir (Day et al; 1998). Hahnemann'ın geliştirdiği klasik homeopatide hastalığın resmine, görünümüne, semptomlara uyan sadece tek ilaç kullanılır, farklı ilaçlar birbirine karıştırılmaz. Referans olarak alınan *Materia*

Medica'larda ilaçların etkileri tek tek açıklanmaktadır. Gerekçe olarak hastanın durumuna ancak bir ilacın benzerlik göstermesidir. Aynı anda kullanılan ilaçlardan hangi ilacın sorumlu olacağı bilinemez. Aynı zamanda birden çok ilacın verilmesi sonucunda toplam etki artmayacağı gibi birbirlerini etkilerini engelleyeceklerdir (Ruddock et al; 2007, Pekmezci ve ark; 2015). Homeopatik tedavide tek ilaç prensibi dışında başarıyı etkileyen faktörlerden biri de minimum doz prensibidir. Bu prensibe göre madde, bedenin iyileştirme gücünü harekete geçirebilecek ve beklenen değişikliği sağlayabilecek en küçük dozda verilir. Bu yaklaşımla hastayı yormadan tedavinin yapılması hedeflenmektedir. Verilecek ilacın minimum ama yeterli etkinlikte olması, ilacın istenmeyen etkilerin azaltılmasını sağlayabilecektir. Her ne kadar homeopatide kalıcı istenmeyen etkilerin görülmeyeceği belirtilse de, oluşabilecek yan etkilerin önlenmesi amacıyla minimum doz prensibi uygulanmalıdır (Kayne et al; 2007, Moore et al; 2007, Kanbur ve Gürbulak; 2017). Minimum doz kuralına göre ilacın tedavi edici özgün etkileri daima en küçük ve etkili dozda verildiğinde ortaya çıkma eğilimindedir; yüksek dozlar iyileştirme gücünü algılama potansiyelinin üstünde etkileyebileceğinden, tedavide başarısızlık ortaya çıkabilmektedir ki bu durum özellikle yaşam gücü azalmış hastalar için daha fazla önem taşımaktadır (Owen et al; 2007, Pekmezci ve ark; 2015). Homeopatik ilaç hazırlanırken kullanılan ham maddenin organik veya inorganik oluşuna göre değişmektedir. Organik maddeler olmasına dikkat edilerek, uygun çözücülerle ekstrakte edilerek ana madde elde edilir. Hazırlanan ana madde farklı oranlarda seyreltilir. Seyreltmeler “D potens (Desimal) seyreltme”, “C potens (Centimal) seyreltme” ve “Q potens (Quinquagiesmillesimal) seyreltme” şeklinde yapılabilir. D potens (Desimal) seyreltme 1/10 olarak hazırlanmaktadır. Bu seyreltmede 1 damla ana madde, 9 damla alkol içinde çalkalanarak seyreltilir. C potens (Centimal) seyreltme ise 1/100 olarak hazırlanmaktadır ve 1 damla ana madde 99 damla alkol içinde seyreltilir. Q potens (Quinquagiesmillesimal) seyreltme ise 1/50000 oranında potentize edilir (Chaterjee et al; 2003). Bahsi geçen her üç potentizasyon şeklinde de ilk seyreltme çözeltisi 1 numaralı çözeltidir (D1, C1, Q1); bu çözeltiler en az 10 ve ideali 100 kez olmak üzere sertçe çalkalanır. Bir numaralı çözeltiden desimal veya sentimal yeni bir seyreltme hazırlanır. Bu seyreltme de en az 10 kez çalkalanarak 2 numaralı çözelti elde edilir. Ardı sıra seyreltmelere devam edilerek 10.000 hatta milyona varan seyreltme sayıları uygulanabilmektedir (Baehr et al; 2004, Ramey et al; 2004, Clausen et al; 2010). İnorganik maddelerde ise potentizasyon, çalkalayarak değil tritürasyon(karıştırarak, ezerek veya

öğütterek hazırlama) ile sağlanır. Bu amaçla bir parça inorganik madde desimal seyreltme için 9 ölçü ve sentimal seyreltme için 99 ölçü süt şekeriyle (laktöz) bir saat boyunca ezilir. Elde edilen potense D1 ya da C1 denilmektedir. Her seyreltilme derecesi için en az bir saat gerekmektedir. İkinci seyretme için 1 ölçü D1 veya C1, 9 veya 99 ölçü laktöz ile yukarıdaki anlatılan şekilde bir saat içerisinde D2 veya C2 haline getirilir. Takip eden seyreltme dereceleri için aynı uygulama tekrarlanmalıdır. Triturasyon 3. veya 6. potense kadar süt şekeriyle yapıldıktan sonra alkolle seyreltmelere geçilir (Baehr et al; 2004, Pekmezci ve ark; 2015) Homeopatik ilaç, yoğunluğu az bile olsa yüksek bir iç enerjiye sahiptir ve bu enerji hastanın vücuttaki birçok biyoenerji sistemlerini harekete geçirmektedir (Kayne et al; 2006, Wolf et al; 1998). Homeopatide ilaç seçim, uygulama dozu ve süresi çok önemlidir. Dolayısıyla homeopatide tanı doğru ilacın bulunmasıdır. Homeopatın detaylı bir anamnez alması, hastayı çok iyi gözlemlemesi ve en doğru ilacı seçmesi bakımından çok önemlidir. Homeopatik ilaç seçilirken hastalıkla ilişkili olmadığı düşünülen belirtiler de dâhil olmak üzere tüm semptomlar dikkate alınır. Homeopatide hastalıklar, konvansiyonel tıpta olduğu gibi organlara veya enfeksiyöz etkenlere göre sınıflandırılmaz. Konvansiyonel tıpta hastalığa özgü semptomlar, homeopatide ise daha çok hastaya özgü belirtiler dikkate alınır (Baehr et al; 2004, Vockeroth et al; 1999). Akut vakalarda ilaç verildikten 24 saat sonra iyileşme belirtileri oluşmuş, ancak tam iyileşme sağlanmamışsa ilaç tekrar edilebilir; ancak kronik hastalıklarda ilacın etkisinin oluşması için sabırla beklemek ve gereksiz doz tekrarlarından kaçınmak gerekmektedir. Kronik hastalıkların tedavisinde hastalığın seyrinde olumlu değişiklik oluşmuş, ancak bir hafta geçtiği halde beklenen etki meydana gelmemişse ilaç haftada iki kez verilebilir. Bir hafta içerisinde hiçbir değişiklik oluşmazsa ilaç değiştirilmelidir. Homeopatik tedavi yapılırken vücudun doğal iyileşme cevabını uyararak sürecin tamamen normal olarak gelişmesini sağlamanın birincil amaç olduğu unutulmamalıdır ve çok hızlı bir iyileşme beklenmemelidir (Stanway et al; 1992).

Homeopatik Tedavinin Avantajları

1. Homeopatik ilaç doğru seçildiğinde etkili ve güvenli bir tedavi sağlanır, hatta gebelerde ve çocuklarda da herhangi bir yan etkisi olmadan kullanılabilir. Ayrıca diğer tedavi yöntemleri ile birlikte kullanıldığı zaman istenmeyen bir etki oluşturmaz.
2. Homeopatik ilaçlar doğal maddelerden elde edilirler.

3. Homeopati immun sistem ve vücudun doğası ile uyum içinde çalışır. Bazı allopatik tedavilerde olduğu gibi vücudun doğal sistemini baskılamazlar ve bağımlılık yapmazlar.
4. Homeopatik tedavide hasta bir bütün olarak değerlendirir. Bu nedenle sadece semptomlara değil asıl sebebe yönelik bir tedavi sağlanır.
5. Homeopatik ilaçlar bedenin kendi iyileştirici gücünü uyuracak en küçük dozlarda verilerek etkinliklerini ortaya çıkarmaktadırlar.
6. Diğer tedavilerle karşılaştırıldığı zaman ekonomik olabilmektedir (Özyurtlu ve Aslan; 2007, Akçay ve ark; 2014).

Tarantula insan sağlığında 1950 yıllarında kullanılmıştır. Özellikle yanık, püstül, apse, ekzema, çiçek vb gibi hastalıklarda kullanılmıştır. Alkolde masere edildikten sonra Alman Homeopatik Farmakopesine göre potensizasyonu yapılan ve enjektabil bir ilaç olan *Tarantula cubensis* (Theranechron) son yıllarda birçok çalışmada yeniden kullanılmıştır.

Tarantula Cubensis Ekstraktının Kullanımı ile ilgili çalışmalar

- Ülkemizde yapılan bir çalışmada *Tarantula cubensis* ekstraktının (Theranechron, 1:100/D2, Richter Pharma, Avusturya) koyunlardaki bazı serum enzimleri, iz elementler ve kardiovasküler sistem üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla 7 koyuna (6 aylık, 35±10 kg) Theranechron 3 ml dozunda subkutan olarak uygulanmışlar, serum üre, kreatinin, ALT, ALP, GGT, LDH, Ca ve P seviyelerinin arttığı ve Total Protein, Mg, Cu, Fe, Zn ve Se seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Threnechronla tedaviden sonra kardiovasküler system üzerine görülen önemli sonuçlar kan basıncının artması ve EKG üzerindeki değişimlerdir. Theranechron tedavisinin koyunlarda yan etkileri olabileceğine ve Theranechronun etkinliği üzerine daha fazla çalışma yapılması gerektiğine karar verilmiştir(Gönül ve ark; 2015).

-Gültiken ve Vural, 2007; Çalışmalarında köpeklerde malign meme tümörlerinde Theranechron® uygulamasıyla meme tümörün sadece sertliğinin azaldığını, postoperatif enjeksiyonda ise tekrar oluşumları engellediklerini tespit etmiş, Theranechron apoptosis artırmakta meme tümöründe hücre proliferasyonunu azatlığını bildirmişlerdir.

-Köpek papillomatozun tedavisi amacıyla İstanbul ve Adana'da yaşları 0.6 ve 16 arasında toplam 30 köpek üzerinde *Tarantula cubensis*, levamisol + azitromisin çalışıldı. Amaç homeopati ve ilaç tedavisi ile izoterapinin klinik sonuçlarını araştırmaktır. Siğillerden 0.2–0.5 cm'lik örnekler kanamadan alındı ve 5 mL de karıştırıldı. Etil alkol (% 96) 4 dakika boyunca ve aralıklı olarak her 2 saatte bir çalkalayarak +4 derecede tutuldu ve içinde bırakıldı. Her biri 10 köpekten oluşan gruplarda izoterapi ve *Tarantula cubensis* zehiri kullanıldı. 6 köpekte levamisol + azitromisin kullanılmıştır. Dört köpekte ise ilaç kullanılmadı. Teşhis amacıyla klinik muayeneye histo-patolojik inceleme ile doğrulandı. Homeopati ile izoterapi sonrası 10 köpekten dokuzu (% 90) tedavi edilirken, *Tarantula cubensis* ile 10 köpekten 3'ü (% 30), levamisol + azitromisinli 6 köpekten 2'si (% 33) 4 kontrol köpeğinin hiçbirisi (% 0) tedavi edilemedi(Tekelioğlu ve ark; 2017).

-Benzer yapılan çalışmada 3 köpekte sadece *Tarantula cubensis* ekstraktı ile 2ml 10 kg canlı ağırlığına hafta 2 kez uygulamışlar 3 köpekte 2. Haftada iyileşme sağlandığını bildirmişlerdir. Diğer köpeklerin ise 3. Haftada iyileştiği bildirilmiştir(Icen ve ark; 2011).

-İneklerde ise Çam ve ark, 2007; çalışmalarında papillomas'un tedavisinde *T. cubensis* venom'u kullanarak lezyonların kuruyarak, küçülerek azaldığını bildirmişlerdir.

-Yapılan bir araştırmada deneysel olarak indüklenen sıçanlarda kolon kanserinde *Tarantula cubensis*'in alkolik ekstrakt (TCAE) ve *Nerium oleander* distilatı (NOD, Zakkum) etkilerini belirlemek amacıyla kolon Anormal Kriptal Odaklar skoru(ACF), serum sytokinaz(Tümör Nekrosiz Faktör(TNF)- α , İnterleukin (IL)-2, IL-6, IL-10), Prostaglandin E2, Oksidatif parametreler(malondialdehit, süperoksit dismutaz, katalaz, glutahin peroksidaz) değerlendirildi. Kontrol grup (n = 8), Kolon Kanser grubu (CC, n = 10), CC + TCAE grubu (n = 10), ve CC + NOD grubu (n = 10). Kontrol grubu hariç, kalan sıçanlar iki hafta boyunca haftada bir kez azoksimetan (15 mg / kg, SC) verilerek kolon kanseri oluşturuldu. TCAE haftada bir kez 0.2 mL / kg (SC) 'de uygulandı ve NOD su içinde verildi. Patolojik ve kan değerleri sonucunda, TCAE ve NOD uygulamalarının kolon kanseri tedavisinde yararlı olabileceği belirtilmiştir(Er ve ark; 2019).

-Sığırlarda mavidil hastalığında oral lezyonların tedavisinde *Tarantula cubensis* ekstratının 1:100/D2 (Theranechron®, Richter Pharma, Austria) etkinliği değerlendirilmiştir. Mavidil hastalığı bulunan 9 holştayn sığır çalışmada kullanıldı. Ateş, iştahsızlık, akut ağrılı ve kanamalı ağız lezyonları ve topallık bulguları vardı. Tedaviye serolojik sonuçlar beklenmeden başlandı. Klinik olarak hasta 6 sığır tetracycline, flunixin meglumin ve *Tarantula cubensis* ekstraktı (Theranechron) ile tedaviye alındı. Diğer hasta 3 sığır ise kontrol olarak Theranechron'suz aynı tedavi kürüne alındı. Yirmidört saat sonra tedavi grubunda kontrol grubuna kıyasla daha hızlı re-epitelizasyon ve vücut ısısında normale dönüş görüldü (Albay ve ark; 2010).

-Düz ve ark; 2012; Şap tedavisinde bir gruba yalnız Theranechron uygulaması, bir gruba klasik tedaviyle günlük olarak flunixin meglumin, oxytetracycline uygulaması, ayak ve ağız lezyonlarının %10 Sodyum bikarbonat ile yıkanması, antibiyotikli sprej uygulanmasını üç gün süreyle uygulamış, üçüncü gruba ise klasik tedavi ve Theranechron uygulamışlardır. Klasik tedavi yanında Theranechron uygulamasında daha hızlı bir iyileşme sağlandığı bildirilmiştir.

-Benzer bir çalışmada Lotfollahzadeh et al, 2012; Şap hastalığına yakalan ineklerde Theranechron® kullanarak vücut sıcaklığının hızla düştüğünü, ağız lezyonlarının hızla iyileştiğini bildirmiştir.

-Retensiyo skundinarum şekillenmiş ineklerde Theranechron ve UT Fort'un etkinliğinin araştırılması amacıyla Kars, Kayseri ve Diyarbakir illerinde normal doğum sonrasında Retensiyo-Secundinarum şekillenmiş 35 inek kullanılmış ve inekler anamnez bilgisi dahilinde doğum sonrasında 24 saat içinde yavru zarlarını atmadıklarını klinik muayene sonrasında tespit ettikten sonra 3 gruba ayrılarak farklı tedavi protokolü uygulanmıştır. Grup A (n=12) Theranechron *Tarantula cubensis* 3 gün, Grup B (n = 11) 3 oblet (UT Forte (Clortetracycline-HCL 500 mg, Vit-A 100,000 IU, Richter Pharma)) intrauterin 3 gün Grup C (n = 12) Theranechron 10 cc sc ve UT Forte Oblet IU, 3 gün uygulanmıştır. Doğum sonrasında 72 saat sonra yavru zarları manuel olarak değerlendirildi. İnvolüsyonun 35 ve 45 günlerinde serviks çapı (küçük, orta ve büyük: 3.5, 3.5-5.0 and > 5.0 cm sırasıyla) kornu uterusinin çapı (küçük, orta and büyük: <3.5, 3.5-5.0 ve > 5.0 cm sırasıyla), ayrıca servikal akıntı miktarı da değerlendirilmiş ve yavru zarlarının atılması takibinde involüsyon periyotunun uzunluğu ve ilk östrus görülme zamanı Grup C den Grup A ve Grup B'ye göre daha kısa ($P < 0.005$, $P < 0.03$),

ve ilk tohumlamayı takiben gebelik oranları Grup A (%33.3) ve Grup B, (%37.1, ve Grup C (%50.0) olarak bildirilmiştir (Gürbulak ve ark; 2010).

-İneklerde postpartum dönemde uygulanan Theranekronun rejenerasyon, rezorpsiyon, antifilojistik ve demarkasyon sağlayıcı etkisinden yararlanılarak retentio secundinarium, vaginal akıntı ve uterus involusyonuna etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 1. gruptaki ineklere (n=23) doğum yaptığı gün (0. gün), postpartum 10 ve 20. günlerde Theranekron, 2. gruba (n=20) ise aynı günlerde plasebo uygulandı. Çalışmada, retentio secundinarium görülme oranı Theranekron uygulanan ineklerde %4.3 ile kontrol grubu ineklere (%20) göre daha düşük düzeyde görülmüştür. İneklerde Theranekronun vaginal akıntı şiddetini azalttığı saptamışlardır. Yapılan ultrasonografik ve rektal muayene sonucunda; Theranekron uygulanan ineklerde postpartum 10. gün ($p<0.01$) ve 20. günlerde ($p<0.001$) uterus involusyonunun kontrol grubu ineklere göre daha hızlı şekillendiği belirlenmiş ve çalışmanın sonucunda Theranekronun postpartum dönemde retentio secundinariumun engellenmesi, patolojik vaginal akıntılarının azaltılması ve uterus involusyonunun hızlandırılması amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (Kaçar ve ark; 2007).

-Subklinik ve klinik mastitisin tedavisinde Theranekron ve Theranekron-intramammal antibiyotik kombinasyonunun iyileşme oranı üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmanın materyali olarak, subklinik (Grup S) ve klinik mastitisli (Grup C) 63 Holstein ırkı ineğe ait 177 meme lobu kullanıldı. Subklinik mastitisli meme lobları; Theranekron (Grup S1) ve kontrol (Grup S2) grubu olarak iki alt gruba, klinik mastitisli meme lobları ise; Theranekron (Grup C1), İntramamamal antibiyotik (Grup C2), Theranekron +İntramammal antibiyotik (Grup C3) ve Theranekron çift doz uygulama (Grup C4) grubu olarak 4 alt gruba ayrıldı. Bütün meme loblarından tedavi öncesi ve tedavi sonrası CMT, SHS ve bakteriyolojik muayene amacıyla süt örnekleri alındı. Tüm gruplarda tedavi öncesi ve sonrası ölçülen CMT skorları Wilcoxon Signed Ranks test ile, SHS değerleri ise Paired Sample T-test ile karşılaştırıldı. Tüm tedavi gruplarında (S2 grubu hariç), CMT skorlarında düşüş belirlendi ($p<0.05$). Tedavi uygulanan klinik mastitisli C1, C2, C3 ve C4 gruplarında SHS değerlerinde düşüş görüldü. C2 grubu hariç SHS değerlerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). Tedavi uygulanan S1 grubunda SHS değerlerinde düşüş ($p>0.05$), S2 (Kontrol) grubunda ise yükseliş belirlendi ($p<0.05$). Çalışmanın sonucunda, klinik ve subklinik mastitislerin tedavisinde, Theranekron

D6 formunun SHS düşürülmesinde etkili olduğu, uygun intramammaral antibiyotik tedavisi ile kombine edildiğinde tedavi başarısının arttığı belirlendi. Ayrıca, Theranekron'un özellikle subklinik mastitislerin tedavisinde sütte kalıntı bırakmaması nedeniyle ekonomik anlamda da öncelikli alternatif bir tedavi olabileceği kanaatine varıldığı bildirilmiştir (Gürbulak ve ark; 2014).

-Mastitis-Theranekron araştırmanın devamında yapılan çalışmada, mastitis tedavisinde meme içi antibiyotik yerine homeopatik bir ilaç (Tarantula cubensis D6) kullanımının finansal etkisine bakılmış, mastitis tedavisinde, SHS değerlerini düşürmesi bakımından homeopatik ilaç ile meme içi antibiyotik uygulamasının etkinliği arasındaki fark istatistiksel olarak önemi vurgulanırken ($P>0.05$) mastitisin toplam tedavi maliyeti homeopatik ilaç grubunda 19 TL/baş; meme içi antibiyotik grubunda ise 119,31 TL/baş olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Homeopatik ilacın SHS'nı düşürmedeki etkinliği yanında finansal açıdan da meme içi antibiyotiklere alternatif olabileceği ve sahada mastitis tedavisinin maliyetini düşürebileceği sonucu aktarılmıştır (Akçay ve ark; 2014).

Sonuç olarak; Tarantula Cubensis ekstraktı ile ilgili çalışmalar ve klinik kullanım alanları çok fazla ve farklı alanlarda da gerek bilimsel olarak gerekse sahada devam etmektedir.

Kaynaklar

1. Ruddock EH. The Pocket Manual of Homeopathic Veterinary Medicine. George Lade (eds). B Jain Publishers Pvt Ltd; reprint 1879 London Hom Pub co edition, 2007; p.134.
2. Turner P. Clinical trials of homoeopathic remedies. Br J Clin Pharmacol 1980; 9(5): 443-4.
3. Day C: Veterinary Homeopathy. Principles and Practice. In, Schoen AM, Wynn SG (Eds): Complementary and Alternative Medicine. 485-513, St. Louis, Missouri, 1998.
4. Kayne SB. Homeopathic Pharmacy: Theory and Practice. Second Edition. Philadelphia: Elsevier, 2006; p. 386.
5. Moore J. Dog Diseases Treated by Homeopathy. 7th Edition. New Delhi, India: B. Jain Publishers (P) Ltd. 2007; p. 175.
6. Kanbur M, Gürbulak K. Organik Hayvancılıkta Mastitis Sorunu ve Sağaltımı. Türkiye Klinikleri 2017;3(1):20-28.
7. Owen D. What is health? Owen D. eds. In: Principles and Practice of Homeopathy. Philadelphia, USA: Elsevier, 2007; pp. 3-19.
8. Pekmezci D, Gültiken N. Homeopatinin Prensipleri ve Veteriner Hekimlikte kullanımı. ERU Fet.Fak.Drg. 2015;12(1):49-56.
9. Baehr B. The Science of Homeopathic Therapeutics. Vol I&II, India: B Jain Pub Pvt Ltd, 2004; p.752.

10. Ramey DW, Rollin, BE. Historical aspects of some CAVM therapies. In: Complementary and Alternative Veterinary Medicine Considered. Iowa State Press, Blackwell Publishing Company, 2004; pp. 17-53.
11. Chatterjee TP. Fundamentals of Homeopathy and Valuable Hints for Practice. New Delhi: B. Jain Publishers, 2003; p.158.
12. Clausen J, Albrecht H. Database on veterinary clinical research in homeopathy. Homeopathy 2010; 99(3): 189-91.
13. Wolff HG. Homoeopathic Medicine for Dogs. UK: C.W. Daniel Company, 1998; p.247.
14. Vockeroth WG. Veterinary homeopathy: An overview. Can Vet J 1999; 40(8): 592-94.
15. Stanway A. Alternative Medicine-a Guide to Natural Therapies, USA: Godfrey Cave Associates Ltd., 1992; p.160.
16. Ozyurtlu N, Aslan S. Homeopati ve veteriner hekimliğinde kullanımı. Vet Hek Der Derg 2007; 7(1): 39-41.
17. Akçay A, Sarıözkan S, Cannoglu E, Gürbulak K, Sütçü ineklerde mastitis tedavisinde homeopatik ilaç (Therane kron D6®) kullanımının finansal analizi Vet Hekim Derg 2014;85(1):1-8.
18. Gönül R, Koenhemi L, Aydın H, Gulyaşar T, Yardibi HD, Or E, Hoştürk T, Uysal A, Barutcu B. Effects of Tarantula cubensis Extract on Electrocardiographic and Trace Element Status in Sheep J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ., 41 (1), 79-83, 2015.
19. Gültiken N, Vural MR The effects of Tarantula Cubensis extract applied in pre postoperative period of canine mammary tumors JIVS 2007; 2; 13-23.
20. Tekelioğlu, B. K., C. Parkan, A. Yılmaz, N. Turan, A. Gürel, K. Berber, D. Haktanir, K. Sonmez, M. Noelle-Issautier & H. Yılmaz, 2017. Canine papillomatosis: clinical outcome after oral isotherapy, subcutaneous Tarantula cubensis venom and oral levamisoleazithromycin treatment. Bulg. J. Vet. Med., 20, Suppl. 1, 248–253.
21. Er A, Özdemir O, Çoşkun D, Dik B, Bahçıvan E, Fakı Eser H, Yazar R. Effects of Tarantula cubensis alcoholic extract and Nerium oleander distillate on experimentally induced colon cancer. Revue Méd. Vét., 2019, 170, 1-3, 15-21.
22. Albay MK, Şahinduran Ş, Kale M, Kararkurum MÇ, Sezer K. Influence of Tarantula cubensis Extract on the Treatment of the Oral Lesions in Cattle with Bluetongue Disease. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2010; 16 (4): 593-596.
23. Düz T, İcen H, Arserim NB, Çakmak B, Bakır B and Uysal E. Comparison of Classic, Therane kron and Classic-Plus Therane kron Treatment on the Foot and Mouth Disease Lesions in Cattle in Van, Diyarbakir and Ankara Regions in Turkey Journal of Animal and Veterinary Advances 11 (18): 3258-3261, 2012.
24. Lotfollahzadeh S, Alizadeh MR, Mohri M, Mokhber Dezfouli MR. (2012) The therapeutic effect of Tarantula cubensis extract (Therane kron®) in foot-and-mouth disease in cattle: a randomised trial in an endemic setting. Homeopathy. 101(3):159-64.
25. İcen, H., S. Sekin, A. Simsek, A. Kochan & S. Tunik, 2011. The efficacy of Tarantula cubensis extract (Therane kron) in treatment of canine oral papillomatosis. Asian Journal of Animal & Veterinary Advances, 6, 744.
26. Çam Y, Kibar M, Atasever A, Atalay Ö, Beyaz L. Efficacy of levamisole and Tarantula Cubensis venom for the treatment of bovine cutaneous papillomatosis. The Veterinary Record. 2007;160:486-488.

- 27.Gürbulak K, Yıldız S, Beytut E, Bademkiran S, Pancarcı SM, Kaçar C, Güngör Ö, Kaya D, Oral H, Investigation of the efficacy of UT Forte and Theranekron for the treatment of retained placenta in cows. Indian Vet J, 2010; 87:1267-1269.
- 28.Tekelioğlu BK, Parkan C, Yılmaz A, Turan N, Gürel A, Berber K, Haktanır D, Sönmez K, Noelle-Issauteiner M. Canine Papillomatosis: Clinical outcome after oral isotheraphy levamisole-Azithomycin Treatment. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2017, 20, Suppl. 1, 248–253.
- 29.Kaçar Ç, Zonturlu AK, Oral H, Yıldız H, AÇ Ar. The Effects of Theranekron® Application on Uterus Involution and Vaginal Efluence in Cows Early Puerperal Period. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 13 (1): 11-15, 2007.
- 30.Gürbulak K, Akçay A, Gümüşsoy KS, Sist B, Steiner S, Abay M, Canooğlu E, Bekyürek T. Investigation of the efficacy of Tarantula cubensis extract (Theranekron D6) in the treatment of subclinical and clinical mastitis in dairy cows. Turk J Vet Anim Sci. 2014; 38:712-718.

Dioksin: Çevremizdeki Tehlike

Gül Banu Çiçek BİDECİ

İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Devrekani, 37700 Kastamonu, Türkiye

Özet: Dioksin terimi ‘kalıcı organik kirleticiler’ sınıfındaki ‘dioksin ve furan’ bileşikleri için kullanılan genel bir terimdir. Dioksinler, poliklordibenzo-p-dioksin (PCDD) ve poliklordibenzofuran (PCDF) grubu bileşikleri içerir. Bu bileşikler yüksek toksisiteye sahip organik klorlu maddelerdir. En zehirli olanı 2,3,7,8 tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)’dir. Çok düşük miktarları bile çevrede tahribata ve insanlarda önemli sağlık problemlerine yol açabilirler. PCDD ve PCDF’ ler analitik standart ve araştırma materyalleri olarak kullanımı hariç, hiçbir zaman ticari amaçla üretilmemişlerdir; bunlar bazı klorlu kimyasal bileşiklerin imali sırasında yan ürün ve organik materyallerin yakılması sonucunda istenmeyen kirleticiler olarak ortaya çıkmaktadırlar.

İnsanlar ve hayvanlar, başlıca günlük besinleri aracılığıyla dioksine maruz kalırlar. Koyun, inek veya tavuk gibi besin değeri olan hayvanlar tarafından, yemlerle birlikte kirlilik halinde alınan dioksinler, hayvanların yağ dokusunda birikirler. Aynı durum, dioksinle bulaşmış sularda yaşayan balıklarda da ortaya çıkar. Bu durumdaki hayvanları tüketen insanlarda, dioksin birikimi, sakıncalı boyutlara değin ulaşabilir. Uzun süre dioksin ve benzeri kimyasallara maruz kalınması, canlılarda önemli sağlık problemlerine sebep olabilir. Zira, dioksinlerin, kanserojen, mutajen ve teratojen etkileri mevcuttur. WHO (dünya sağlık örgütü) dioksinler için günlük tolere edilebilir düzeyi 1-4 pg/kg olarak belirlemişlerdir.

Çevre kirleticilerinden olan, yaşamımızı tehdit eden, toksik olan dioksinlerine karşı gerekli önlemlerin alınması şarttır. Mevcut dioksin kirliliğinin belirlenmesi halk sağlığı açısından bir zorunluluktur. Belirlenen kirliliğe karşı stratejik planlara ve dioksinli bileşiklerin vücuttan atılımının etkisiz hale getirilebilmesi için de yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: *Dioksin, İnsan ve Hayvan Sağlığı, Klorlu Kimyasal Bileşikler, Maruziyet, Yem.*

Dioxin: Danger Around Us

Abstract: The term dioxin is a general term for the 'dioxin and furan' compounds of the class 'persistent organic pollutants'. Dioxins include polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD) and polychlorinated dibenzofuran (PCDF) group compounds. These compounds are organic chlorinated substances with high toxicity. The most toxic is 2, 3, 7, 8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Even very low amounts can cause environmental damage and significant health problems in humans. PCDD and PCDF have never been produced for commercial purposes, except for use as analytical standards and research materials; they are produced as unwanted pollutants by combustion of by-products and organic materials during the manufacture of certain chlorinated chemical compounds.

Humans and animals are mainly exposed to dioxins through their daily diet. Dioxins accumulate in the adipose tissue of animals. Like sheep, cows, chickens. These animals are exposed to toxin by eating food contaminated with dioxin. The same situation occurs in fish living in dioxin-contaminated waters. In humans consuming such animals, the accumulation of dioxins can reach up to unfavorable dimensions. Dioxins and similar chemicals may cause significant health problems in all creatures which are exposed to these for a long time. Because dioxins possess effects carcinogen, mutagen and teratogen. World Health Organization (WHO) determined the daily tolerable level for dioxins as 1-4 pg / kg.

Necessary measure should be taken against dioxins which are environmental pollutants, which are life-threatening and toxic. Determination of available dioxin pollution is a necessity for public health. There is a need for strategic plans against the identified pollution and also new research is needed to neutralize excretion of dioxin compounds from the body.

Keywords: *Animal and Human Health, Chlorinated Chemical Compounds, Dioxin, Exposure, Feed.*

Giriş

Dioksinler genel anlamda organik klorlu bileşiklerdir. Dioksinlerin genel olarak çevresel kirlenici olarak ele alınmalarının nedeni klor ihtiva eden üretim süreçleri veya bunların yakılmasıyla yan ürün olarak ortaya çıkmalarıdır. 2,3,7,8-TCDD olup, adı geçen bileşiklerin, zehirliliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, model olarak kullanılmaktadır. Çevrede dioksinlerin varlığı ve direnci ile kimyasal ve fiziksel özellikleri gıda zincirinde dioksinin birikmesine sebep olur. İnsanlar dioksinlere %90'dan fazla oranda hayvan yağları ihtiva eden gıdaları tüketmek yoluyla maruz kalmaktadırlar. Dioksin ve benzeri bileşiklere maruz kalınması sonucu oluşan etkilerin başında; kanser, gelişme bozuklukları, wasting sendromu, lenfoid ve gonadal atrofi, kloroakne, hepatotoksisite, immunotoksisite, nörotoksisite ve kardiyotoksisitenin geldiği belirlenmiştir.

Bu bildiride dioksinlerin kaynakları, toksik etkilerinden ve toprak, hava, su ve besinlerde ki bu kirleniciyi tespit etme yollarından bahsetmek istiyorum. Çevremizde hemen her yerde bulunabilen dioksin, 1.sınıf karsinojen sınıfındadır. Bende dioksinlere ve dioksinlere maruziyet sonucu şekillenebilecek tehlikenin boyutlarına dikkat çekmek istiyorum.

Bildiri İçeriği

Dioksin olarak adlandırılan Poliklorludibenzo-paradioksinler (PCDD) iken, dioksin ve benzeri grupta poliklorludibenzofuranlar (PCDF, furan) ve poliklorlubifeniller (PCB) yer alır. Bunlar benzer yapıya sahiptir. 2 benzen halkasının 3 farklı şekilde birleşmesi sonucu oluşur. Farklı oranda klor içerirler. Bu kimyasallardan klorun farklı pozisyonlarda olması sonucu 75 farklı dioksin, 135 furan ve 209 farklı PCB çıkar. Dioksinlerin 7 tanesi yüksek derecede zehirlidir. 135 furandan 10 tanesi, 209 pcb den 11' i dioksin benzeri zehirliliğe sahiptir. Dioksin kelimesi kullanılırken genellikle bu 28 çeşit maddenin etkinliği anlaşılır. Bu bileşikler 4 ya da daha fazla klor atomu içerir.

Dioksinlerin Genel Özellikleri:

- Üç halka yapısında.
- Ticari olarak üretilmezler.
- Klorlu kimyasal bileşiklerin imali sırasında yan ürün olarak.
- Organik materyallerin yakılması sonucunda şekillenir.

- Suda çok az çözünür. Yağda iyi çözünen bileşiklerdir.
- Metabolik ve çevresel yıkımlanmalara dayanıklıdır.
- Doğada kararlı durumda bulunurlar.
- Yüksek derecede zehirlidirler.
- Geniş yayılım alanına sahiptirler.
- Çevresel Kirleticilerdir.
- Besin zincirine kolaylık ile girebilir.
- Yarılanma ömrü, insanda 7-8 yıl, sığırdada 4-5 ay, farelerde 12-30 gündür.
- Dünya sağlık örgütü tarafından 1. Sınıf kanserojen sayılmıştır.
- İnsan için günlük tolere edilebilir doz 1-4 pg TEQ/kg.

Dioksin ve benzeri bileşiklerin en zehirlisi dioksin grubunda yer alan, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) olup, dioksin ve benzeri maddelerin zehirliliklerinin belirlenmesinde, model olarak kullanılır. TCDD'ye göre diğer dioksin türevlerinin zehirliliği belirlenir. Buna göre her bir bileşik bir toksisite denklik faktörüne sahiptir. Toksisite denklik faktörü (Toxicity Equivalence Factor, TEF) TCDD'nin değeri 1 esas alınarak hesaplanır. Karışım halinde bulunan bileşiklerin zehirliliklerini ifade etmek için Toplam Dioksin Toksik Eşdeğeri (TEQ) kullanılır.

TCDD'in sentezi ilk olarak 1872 yılında gerçekleşmiştir. 1957 yılında Fabrika kazasında çalışanlarda deri hastalığı şikâyetleri ile (Klorakne) ile bağlantısı kurulmuştur. Bu zamana kadar bir laboratuvar merakı olarak kalmıştır. Bu senelerden itibaren zehirliliği bilinmektedir. Japonya'da ilk olarak varlığı, 1979 yılında belediyenin yakma fırınlarındaki küllerde tespit edilmiştir. Çevredeki dioksin düzeyleri 1940'lı yıllarda belirgin bir artış göstermiştir ve 1970'li yıllarda pik düzeye ulaşmıştır. Bu gelişmeler klor kimyasının işleme sokulması ile paralellik gösterir. 1940 ve 1950'li yıllarda TCDD ile kirlenmiş herbisitleri üreten fabrikalarda çalışan işçiler de dioksin ile meslek gereği maruz kalma yaşamıştır. Vietnam savaşı sırasında sivil ve askerlerin Agent Orange Bileşiğine maruz kalması, Missoussi'de dioksinle bulaşmış artıların çevreye yayılması büyük toplulukları da dioksine maruz bırakmıştır. Bu ve bunun gibi şekillenen olaylar sonucu dioksinler dikkat çekmiştir.

Dioksin ve Benzeri Bileşiklere Maruz Kalma Yolları

1. Yanma Esnasında Oluşanlar: Evsel atıkların, kömür, odun, petrol ürünlerinin sentetik yağlı maddelerle kaplanmış maddelerin, transformatör yağlarının ve klorla beyazlatılan ürünlerin yakılması, demir-çelikte cevherin işlenmesi ve eritilmesi esnasında, yangınlar sonucunda, dioksinler şekillenebilir. Yüksek sıcaklığın etkisi ile klorlu bileşikler oksijenle birleşerek dioksin oluşturur.

2. Endüstriyel İşlemler Sırasında: Klorla beyazlatma işlemleri, (Klorla beyazlatma işlemi), pestisit üretiminde klorofenollerin oluşması esnasında, metalurji ve orman ürünleri üretim fabrikası çalışmalarında oluşur.

3. Hayvansal Gıdalar ve Sularda Dioksin: Dioksin ile kirlenmiş sularda sulara yaşayan balıklara, kaba yemle beslenen hayvanların etine ve sütüne dioksin geçebilir. Toprakta ve organik maddelerde birikirler. En fazla kirlenen gıdalar deniz ürünleri, yüksek oranda yağ içeren et ve et ürünleri, yumurta, süt ve süt ürünleri, sulardır.

4. Polivinil Klorür (PVC) Kaynaklı Dioksinler: Dioksinler en fazla PVC'nin ve PVC ihtiva eden ürünlerin geri dönüşümünde, atık yakma tesislerinde yakıldığında oluşur. Petrol ürünlerinden oluşan çevre kirliliği ile de dioksin oluşabilir.

Maruz Kalma Yolları

İnsanlar dioksin ve benzeri etkinlik gösteren bileşiklere maruz kalmasının %95 oranında besinler yolu ile geri kalanını ise içme suyu, solunum yolu ve kirlenmiş topraklara maruz kalmakla olur. Süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri, balık ve balık ürünleri genel toplumun dioksinlere maruz kalmasında başlıca kaynakları oluşturur.

Riskler:

- Atık fırınların civarında bulunan çiftliklerden beslenen süt sığırlarından elde edilen sütlerde dioksin düzeyine rastlanılmıştır.
- Kağıt kartonlar, sıvı süt ürünlerinin önemli bir dioksinle bulaşma kaynağıdır.
- Balık tüketiminin sıklığı, TCDD düzeyini artırabilir.

- Dioksinle kirlenmiş topraklarda yemlenen tavukların yumurtalarında dioksin oranı yüksektir.

Etki Mekanizması

Dioksinler insan ve hayvanların yağ dokusunda birikirler. Laktasyon, açlık, stres sonucunda kana geçerek zehirli etkilerini oluştururlar. Çok düşük miktarları bile çok zehirlidir. Dioksinler DNA transkripsiyon faktörlerinden, steroid yapılı aril hidrokarbon (Arh reseptörü) aracılığı ile etki gösterir. Kanser (sindirim, karaciğer, göğüs), gelişme bozuklukları, lenfoid ve gonadal atrofi, doğuma ait bozukluklar (kusurlu böbrek oluşumu), klorakne, wasting sendromu, immunotoksosite, nörotoksosite, kardiyotoksosite, üreme bozuklukları, doğumsal anomaliler bu bileşiklere maruz kalmanın yan etkileri olarak sayılabilir. Kanser yapıcı etkileri doğrudan DNA'da mutasyon yapmalarından çok, lipid peroksidasyonunu artırmaları sonucu oluşur. Bu yüzden, kanserin gelişme evresinde, önemli bir etkiye sahiptir.

EPA (United States Environmental Protection Agency) tarafından, hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, insanlarda zararlı olabilecek en düşük vücut dioksin yükü, 14 ng/kg olarak belirlenmiştir. Dioksin alımı, belirtilen düzeylerden ne kadar yüksekse, kanser riski de o kadar fazladır. Farklı türler, dioksine karşı çok farklı şekilde yanıt verirler ve insanlar, en az duyarlı olanlardan biridir. Dioksin, vücuda hangi yolla girse girsin, kan dolaşımına geçer ama sadece çok kısa bir süre dolaşımda kalır. Çünkü dioksin, suda çok iyi çözünmez ama yağlı ortamlarda çok iyi çözünür. Ayrıca karaciğerdeki proteinlere de sıkıca bağlanması nedeniyle dioksin, yağ doku ve karaciğerde de birikerek, dokularda yıllarca kalabilir. Dioksin, insan vücudunda, başlıca karaciğerde metabolize edilerek, suda çözünen metabolitlere çevrildikten sonra idrarla atılır. Dioksin gibi kimyasalları yıkımlama süreci, hem insan, hem de hayvanlarda çok yavaş gerçekleşir. Bu durumda, çok düşük dozlarda ve tekrarlanarak alınan dioksin, kolayca ve sakıncalı boyutlarda vücutta birikebilir. Laktasyon, vücuttan dioksin atılmasını hızlandıran birkaç önemli olaydan birisidir; ama bu durumda da, bebeğin bu zehirli kimyasala maruz kalması ile olumsuz bir etki söz konusudur. Emzirme süresince, anne sütünün yağında bulunan dioksin, anneden çocuğa geçmekte, hatta çocuklar vücutlarında, annelerinden daha yüksek derişimlerde dioksin bulundurabilmektedir.

Tespit Yöntemleri

Analiz seçeneklerinin başında “kromatografik yöntemler” gelmektedir. Hekzan, petrol eteri ve metilen klorür gibi çözücüler kullanılarak, pestisidlerle birlikte, biyolojik örneklerden karışımlar halinde ekstrakte edilirler. PCB çeşitlerinin biyolojik ortamdan ekstrakte edilmesine, kimliklerinin saptanmasına ve diğer pestisid kalıntılarından ayırt edilmesine yarayan başka yöntemler de vardır: İnce tabaka (İTK) ve ters yön kağıt kromatografi yöntemleri kullanılarak, OK’lu pestisidlerle PCB’lerin, ancak bölümsel bir ayrımı sağlanabilir. PCB kalıntı analizlerinde doğrulama testleri, genellikle gaz kromatografi/kütle spektrofotometri (GC/MS) kombine yöntemi ile yapılmaktadır. Analizlerde çok sayıda bileşiğin ayrımı ve tanımlanması için çok sayıda referans standartların kullanılması durumu olduğundan, bu yöntem kombinasyonu ile yeterli duyarlılıkta miktar ölçümü yapılamamaktadır. Yüksek çözülüm sağlayan, kapiller kolonla donatılmış gaz kromatografik yöntemlerle yapılan analizler uygundur.

Yasal Düzenlemeler

Son yıllarda, endüstrinin gelişmesi ile birlikte çevreye yayılan dioksin ve benzeri bileşik düzeylerinde çok önemli artışların gerçekleşebileceği ve bu artışlara bağlı olarak başta kanser olmak üzere insan sağlığı açısından ciddi sağlık riskleri oluşabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 1990 yılında yapılan bir toplantıda 2,3,7,8-TCDD için Tolere Edilebilir Günlük Alım miktarı (TDI); 10 pg/kg olarak belirlenmiştir. Ancak, daha sonra yapılan pek çok araştırma; bu bileşiklerin uzun süreli alınmaları ile vücutta biriktiğini ve belli bir süre sonra zehirli etkilere yol açtığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1998 de, dioksin ve benzeri bileşiklerin Tolere Edilebilir Günlük Alım miktarı; 1-4 pg TEQ/kg olarak yeniden düzenlenmiştir.

Ülkemizde Durum

PCB’ler 1973 yılında sanayide kullanımı kısıtlanmış ve 1 Ocak 1996 tarihinde ise açık sistemlerde kullanımı tamamen yasaklanmıştır. Bunun yanında 29.12. 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksine (Tebliğ no: 2002/63) göre bazı besin maddelerinde bulunmasına izin verilen dioksin, furan ve PCB’lere ait kabul edilebilir en yüksek değerler belirlenmiştir. Buna göre et ve et ürünlerinde dioksinlerin toplamı sığır türü hayvanlar ve koyun, keçi ürünleri için 2,5 pg/g yağ, kanatlı hayvanlar için 1,75 pg/g yağ, domuz ürünleri için 1,0 pg/g yağ olarak belirlenmiştir.

Sonuç

Elazığ ve Çevresinde tüketilen tereyağlarında Dioksin ve Düzeylerinin araştırılması sonucu Osman Çiftçi, 2008) 20 adet tereyağ numunesinde toksik eşdeğer konsantrasyonunu ortalama 0,0128 pg/ TEQ/g olarak hesaplamıştır. Analizi yapılan tereyağından 70 kg olan bir insanın günde 25 g yemesi sonucu, 4,92 pg TEQ/g olarak hesaplanmıştır. Bu değer DSÖ tarafından 1-4 pg TEQ/g dan çok yüksektir. Aynı şekilde yapılan iki araştırmada 0,0011 pg TEQ/g olarak bulunmuş olup, bulunan değerden çok düşüktür. Bakoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da Kocaeli ve Çevresinde hava ve toprakta dioksin düzeyleri yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmalardan yola çıkarak, dioksin kirliliğinin tespit etmek için çevrede ve gıdalarda daha fazla araştırmaya ve rutin kontrollere ihtiyaç olduğu açıktır. Halk sağlığını adına, başta çocuklar olmak üzere dioksin ve benzeri ürünlerin zehirli etkilerinin önlenmesi gerekmektedir. Bu nokta da risk bölgeleri tespit edilmeli, bu bölgelerde bu konuya daha dikkatli yaklaşılmalıdır. Vücuttaki Dioksinlerin atılımını etkisiz hale getirmek için yeni araştırmalar yapılmalıdır.

Kaynakça

1. Baytok, E., & Nuriye, B. T. (2013). Gıdalarımızla Soframıza ve Hayatımıza Giren Toksin: Dioksin. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(1), 45–49.
2. Çiftçi Osman. (2008). Elazığ ve Çevresinde Tüketilen Tereyağlarında, Dioksin ve Benzeri Bileşik Düzeylerinin Araştırılması. *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22(5), 289–292.
3. Daş, Y. K. & Aksoy, A. (2015). Yemlerde Toksikolojik Açıdan Oluşabilecek Doğal Olmayan Risk Faktörleri. *Türkiye Klinikleri J Anim Nutr&Nutr Dis-Special Topics*, 1(1), 44–53.
4. Erkmén, O. (2010). Gıda Kaynaklı Tehlikeler ve Güvenli Gıda Üretimi. *Cocuk Sagligi ve Hastaliklari Dergisi*, 53(3), 220–235.
5. Fatih, T., Ayça, T. N., Ertan, D., & Karademir Aykan. (2006). Dioksin Sağlık Riski Değerlendirmesi Üzerine Bir Çalışma. *Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 3, 56–64.
6. Güvenç, D., & Aksoy, A. (2007). Poliklorlu Bifenillerin Toksikolojisi. *Veteriner Hekimliği Derneği Dergisi*, 78(2), 17–25..
7. Hişmioğulları, Ş. E ., Hişmioğulları, A., & Konaş, T. A (2012). Dioksin ve dioksin benzeri kimyasalların toksik etkileri. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 23–27.
8. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, ; 29.12.2011 tarih ve 28157 Resmi Gazete.
9. USEPA (2000). Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. Draft Final National Center for Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
10. Yavuz, H., & Özdemir, M. (2000). İnsan Ve Hayvan Sağlığı Üzerine Dioksinlerin Etkileri. *Türk Hijyen Derneği Biyoloji Dergisi*, 57(2), 99–108.
11. WHO (1998). Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI). Consultation, May 25-29, Geneva, Switzerland.

Farklı Saklama Koşullarında Muhafaza Edilen A, D, E Vitaminlerini İçeren Bazı Veteriner Müstahzarlarının Etkin Madde Düzeyleri

Ali BİLGİLİ¹ Onur ALAÇIK²

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Tarımsal ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu, Ankara, Türkiye

Özet: Bu çalışma kapsamında, veteriner hekimlerce yaygın şekilde kullanılan A, D₃, E, vitaminlerini içeren benzer kombinasyonlara sahip ilaçların farklı saklama koşullarında etkin madde düzeylerinin değişimleri istatistiksel veriler ışığında değerlendirildi. İlaçların prospektüslerindeki saklama koşulları birbirinden farklılık göstermesinden dolayı bu tür ilaçların prospektüslerinde bulunan farklı bilgilerin ortadan kaldırılması amacıyla en uygun saklama koşulunun bulunması hedeflendi.

Bu amaçla 1 ml’de 500.000 IU vitamin A, 75.000 IU vitamin D₃, 50 mg vitamin E içeren kombinasyonların, A, D, E vitaminlerinin farklı saklama koşullarındaki etkin madde değişimlerinin analizleri gerçekleştirildi. Açılmış ve kapalı spesiyalitelere çalışmada; 25°C’de karanlıkta ve aydınlıkta ayrıca +4°C’de buzdolabında bekletildi, ilaçlar doğrudan tek bir ilaç deposundan temin edildi. İlaçların son kullanma tarihi, seri numarası gibi tanımlayıcı bilgileri kaydedildi. 3 ayrı firmadan alınmış ve her firmaya ait 3 farklı seri numarasına sahip spesiyaliter 0. gün ile birlikte açılarak her bir ortam için 3 ayrı numuneden alınan örneklerin analizi gerçekleştirildi ve bu analizler 7. gün, 14. gün, 28. gün ve 56. günde gerçekleştirildi. Vitamin A, vitamin D₃ ve vitamin E analizleri güncel Amerikan Farmakopesi’nden (USP 32-NF 27, 2009) alınan metotlar ile tek bir metoda indirgenerek modifiye ve valide edilen tek bir yöntem ile YBSK’de ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler miktar tayini hesabına göre hesaplanarak elde edilen bu değerler istatistiksel olarak SPSS ile değerlendirildi. Verilerin dağılımı Kolmogorov Simirnov testi kullanılarak belirlendi. Çarpık dağılım gösteren veriler, logaritmik dönüşüm yöntemi kullanılarak normal dağılım haline getirildi. Vitaminlerin, farklı sıcaklık ve bulundurulma (ortam) şartlarına göre zaman içerisinde gösterdikleri değişim, bağımsız gruplarda tekrarlı ölçümlerde varyans analizi yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Açık şişelerden ve kapalı şişelerden elde edilen sonuçlar iki ayrı başlık altında incelendi. İlk

olarak sabit sıcaklıktaki ortamda, ışığın etkisinin incelenmesi oldu. Bu değerlendirme sırasında oda sıcaklığında bekletilen ürünün ışığa maruz kalmış ve karanlıkta (kutusunda) bekletilmiş olan durumlarının direkt ışığın vitaminler üzerindeki etkisinin zamana göre değişimi incelendi. Diğer durumda ise karanlık ortamda sıcaklığın etkisinin incelenmesi oldu. Bu değerlendirme sırasında ise oda sıcaklığında karanlıkta (kutusunda) bekletilen ve +4°C'de karanlıkta (buzdolabında) bekletilen ürünlerde sıcaklığın vitaminler üzerindeki etkisinin zamana göre değişimi incelendi.

Açık şişelerde yapılan çalışmada A, D₃ ve E vitaminlerindeki kayıpların birbirinden farklılıklar gösterdiği tespit edildi. Işğın A, D₃, E vitaminleri üzerindeki etkisinin etkin madde düzeyindeki değişimi analiz edildiğinde zamana göre % oransal değişimin en fazla E vitamininde en az A vitamininde olduğu tespit edildi. Sıcaklığın A, D₃, E vitaminleri üzerindeki etkisi incelendiğinde; sıcaklık farkına maruz bırakılan vitaminlerde, zamana göre etkin madde düzeyindeki % oransal değişim en fazla E vitamininde en az A vitamininde olduğu tespit edildi. Bununla birlikte 4°C'de bekletilen A ve E vitaminlerinin 25°C'lik ortamda bekletilene oranla etkin madde düzeyindeki % oransal değişimin daha fazla olduğu tespit edildi. Kapalı spesiyaliterde ışğın ve sıcaklık farkına maruz bırakılan vitaminlerde zamana göre değişiminin, açık spesiyaliterdeki A, D₃ ve E vitaminlerin etkin madde düzeyindeki değişimlerine oranla çok az olduğu ve kapalı şişesinde bekletilen ilaçlardaki A, D₃ ve E vitaminlerinin etkin madde düzeyini neredeyse koruduğı tespit edildi. Uygun şartlarda kapalı spesiyaliterlerinde bekletilen A, D₃ ve E vitaminin içeren kombinasyonların etkin madde düzeylerinin değişim oranlarının tespit edebilmesi için uzun dönem stabilite çalışmalarından yararlanılması değerlendirildi. Sonuç olarak farklı firmalardan temin edilen ve farklı ortamlarda bekletilen örneklerle yapılan çalışmalar sonucunda, ilk kullanımı takiben ilaçların saklanabileceğı en uygun ortamın oda sıcaklığı ve güneş ışığına maruz bırakılmadan kendi karton kutusunda saklanması daha uygun olacağı tespit edildi. İlk kullanımı takiben ilaçlar buzdolabında bekletilmemeli ve direkt güneş ışığına maruz bırakılmamalıdır.

Anahtar Kelimeler: Farklı saklama koşulları, Vit A, Vit D, Vit E, YBSK.

Active Substances Levels in Some Veterinary Preparations Containing A, D, E Vitamins Stored in Different Conditions

Abstract: In this study, changes of the active ingredient level in different storage conditions evaluated whereby statistical data in the drugs containing vitamin A, D₃, E, which have similar combinations, used veterinarians widely. In order to find the optimum storage conditions have been targeted because of the eliminate of the different information in the prospectus of such drugs due to storage conditions informations in the prospectus differ from each other.

Aimed to investigate the active substances levels under different storage conditions for the medicines with similar combinations containing 500,000 IU of vitamin A, 75,000 IU of vitamin D₃, and 50 mg vitamin E in 1 ml. In studies opened and closed specialties stayed at 25°C in the dark and light; +4°C refrigerated, the drugs were directly obtained from a single drug store. Identifying information was recorded as drug expiration date, serial number. The preparations, obtained from three different companies and bearing three different batch numbers for each company, the first three samples of each were opened together on day zero (0) and products analyses performed on day 7th, day 14th, day 28th and day 56th. The analyses for vitamin A, vitamin D₃ and vitamin E were performed via a single method modified and validate by reducing the methods taken from the current US Pharmacopoeia (USP 32NF 27, 2009) to a single method and the measurements were thus conducted via HPLC. The obtained data are calculated according to the amount of account determination values and this obtained values were evaluated statistically. The values are obtained, calculated on account of the resulting assay data were analyzed by SPSS statistical analysis. The distribution of data was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Showing skewed distribution datas, has become the normal distribution method using a logarithmic transformation. Vitamins, showed that change according to in time, different temperatures and keep (media) the circumstances, independent groups were assessed using repeated measures analysis of variance method. The results obtained from open bottles and closed bottled and examined under two separate headings. First, the media in a constant temperature, was to examine the effect of light. During this evaluation, impact of the direct

light over the changes of the vitamins in time were analyzed exposed to light and stayed in dark (box) which stand at room temperature. The other case was to examine the effect of temperature in the dark. This assessment examined change over time the impact of the vitamin products heat stored in at room temperature (in its own box) and kept in the dark at +4°C (in its own box refrigerator).

In studies performed in opened bottles, found in losses of vitamin A, D₃ and E vary from each other. When the light effect on active ingredient level of exchange was analyzed in vitamins A, D₃, E, it was found that relative change over time as percentage % in most vitamin E and at least vitamin A. When the heat effect on active ingredient level of exchange was analyzed in vitamins A, D₃, E, it was found that relative change over time as percent % in most vitamin E and at least vitamin A. However relative change in the level of the substance was found more held in +4°C vitamins A and E than held in +25°C. When we examined the variation of the effect of the light and temperature on the vitamins A, D₃ and E in closed bottles in terms of active substances level, we found that the variation with time in the vitamins subjected to temperature difference is much lower than the variations in the active substances levels of the vitamins A, D₃ and E in open bottles and that the active substances levels of the vitamins A, D₃ and E in the medicines kept in their closed bottles were almost completely preserved. It was concluded that it was necessary to make use of the long-term stability studies in order to determine the rates of change in the active substances levels of the combinations comprising the vitamins A, D₃ and E, which are kept in the closed bottles under suitable conditions.

As a result, according to studies with obtained from different companies and with samples placed stayed in different environments, the most suitable environment detected following the first use of the drug would be as stored at room temperature and stored in its cardboard box without being exposed to the solar light.

Giriş

Vitamin, normal metabolik olayların sürdürülmesi için gerekli olan ama genellikle vücutta sentezlenemeyen ve bu sebeple dışarıdan alınması gereken madde olarak tanımlanır.

Vitaminler hem beşeri hem de veteriner hekimlikte en fazla suistimal edilen maddeler arasındadır. Hücre metabolizmasındaki görevleri sebebiyle gerekli veya gereksiz olarak koruyucu ve sağaltıcı olarak reçetelere yazılabilmektedir. Ancak hastalığın tanısı yapılmaksızın, aşırı ve gereksiz vitamin tüketimi bazen zehirlenmelere (vitamin A ve D'de gibi) yol açabileceği gibi, ekonomik yönden önemli bir yükü de beraberinde getirdiği belirtilmiştir (Kaya ve ark, 2002). Canlıların değişen beslenme şekilleriyle, ihtiyaçları olan vitamin düzeyleri, besinlerinden karşılanamamaktadır. Bu nedenle vitaminlerin sentetik formları kullanımı her geçen gün artmaktadır. Vitaminlerin ısı, ışık gibi fiziki etmenlerden etkilendiğini ve etkinliklerinde değişimler yaşanabileceğini çalışmalarda bildirilmektedir. Ancak bu etkinlik değişiminin ne sürede ne kadar olduğu hakkında net bir bilgi mevcut değildir. Yüzde yüz güvenli veya başka bir değişle hiç yan etkisi olmayan bir ilacın olmadığı bilinmektedir. Bu durumdan ötürü ilaçların, yakından izlenmesinin ve olası olumsuz etkilerine karşı uyanık olunmasının gerektiği bildirilmiştir (Pekmezci, 2008).

Stabilite çalışması: Raf ömrü boyunca etkin maddenin veya farmasötik ürünün kimyasal, fiziksel, mikrobiyolojik ve biyolojik kontrolleri olarak tanımlanmaktadır.

Hızlandırılmış Stabilite Testleri: Stabilite programının abartılı saklama koşullarının (yüksek sıcaklık ve yüksek nem gibi) uygulanmasıyla kimyasal bozunma ve fiziksel değişim hızının artması ile yapılan çalışmalar olarak nitelendirilmiştir (Saghei, 2014). Çalışmamız kapsamında hızlandırılmış stabilite testleri kapsamında ısı ve ışığın etkileri incelenecektir.

Çalışmanın Amacı

Piyasada değişik ambalaj formları halinde satışa sunulmakta olan vitamin spesiyalitelerinin ekonomik olması sebebiyle büyük ambalaj formları veteriner hekimler tarafından tercih edilmektedir. İlk kullanımı takiben aynı şişeden gerekli miktarlarda ilaç, farklı zamanlarda kullanılmaktadır. Belirli bir zaman sonra, ilaçların tavsiye edilen sürelerde ve saklama koşullarında muhafaza edilmemesi sebebiyle, etkinliklerinde değişimler şekillenebilmektedir. Ayrıca vitaminlerin prospektüslerinde belirtilen saklama koşulu önerileri arasında farklılıklar görülmesi en uygun saklama koşulunun, nerde ve nasıl olacağı hakkında net bir bilgi olmaması karışıklıklara neden olabilmektedir. ki; 3 ayrı firmadan alınan ürünlerin

prospektüslerde belirtilen saklama koşulları hakkındaki bilgiler birbirinden farklılıklar göstermektedir. Muhafaza şartları ışıktan koruyunuz, serin ve kuru yerde, oda sıcaklığında (20-25 C) saklayınız. Açılmış flakonlar kısa zamanda kullanılmalıdır. Raf ömrü imal tarihinden itibaren 3 yıldır. Çalışmamızda Veteriner hekimlerce yaygın şekilde kullanılan A, D3, E, vitaminlerini içeren benzer kombinasyonlara sahip ilaçların farklı saklama koşullarındaki etkin madde düzeylerinin değişimleri istatistiksel veriler ışığında değerlendirilerek, bu tür ilaçların prospektüslerinde bulunan saklama koşulu önerileri arasında en uygun olan saklama koşulu tespit edilerek birbirinden farklı bilgilerin ortadan kaldırılması hedeflendi.

Gereç ve Yöntem

İlaç Müstahzarları: Bu çalışma dâhilinde A, D, E vitaminlerinin etkin madde analizleri gerçekleştirildi. Piyasada en çok kullanılan 3 ayrı firmadan, yakın üretim tarihli, En çok kullanılan formülasyon olan: 1 ml’de 500.000 IU vitamin A, 75.000 IU vitamin D₃, 50 mg vitamin E içeren vitamin kombinasyonlarının, Farklı numaralı serileri seçildi. İlaçlar doğrudan tek bir ilaç deposundan temin edildi. İlaçların son kullanma tarihi, seri numarası gibi tanımlayıcı bilgileri kaydedildi.

Açık Şişeler: Önceden belirli bir süre kapalı halde, karanlıkta ve aydınlıkta oda ısısında ayrıca +4°C’de buzdolabında bekletilen, 3 ayrı firmadan alınmış, Her firmaya ait 3 farklı seri numarasına sahip spesiyaliteler, 0. gün ile birlikte açılarak. Her bir ortam için 3 ayrı numuneden alınan örneklerin analizi gerçekleştirildi. Aynı ürünlerin analizleri oda ısısında karanlıkta, aydınlıkta ve +4°C’de buzdolabında bekletilerek 7. gün, 14. gün, 28. gün ve 56. günde tekrarlandı.

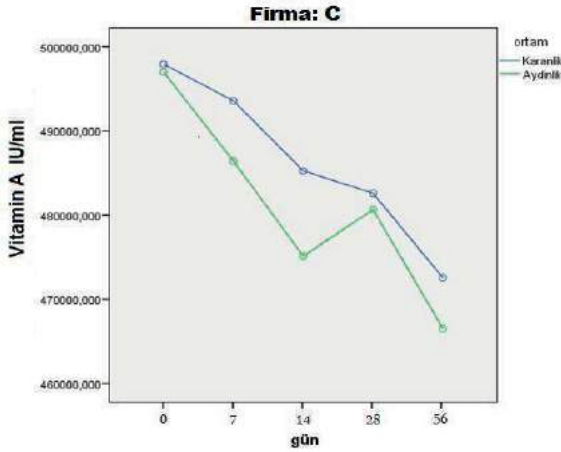
Kapalı Şişeler: Kapalı spesiyalitelerdeki çalışmada ise, önceden belirli bir süre kapalı halde, karanlıkta ve aydınlıkta oda ısısında ayrıca +4°C’de buzdolabında bekletilen, 3 ayrı firmadan alınmış, her firmaya ait 3 farklı seri numarasına sahip spesiyalitelerin ilk 3’er numuneleri 0. gün ile birlikte ilk numuneler açıldı. Her bir ortam için analizi gerçekleştirildi. Kalan ürünler oda ısısında karanlıkta, aydınlıkta ve +4°C’de buzdolabında bekletilmeye devam edildi 7. günde, 14. gün, 28. gün ve 56. günde açılarak analizleri gerçekleştirildi. Açık ve kapalı spesiyalitelerden elde edilen sonuçlar 2 ayrı başlık altında analiz edildi. Bu değerlendirme

sırasında oda ısısında bekletilen ürünlerin ışığa maruz bırakılan ve karanlıkta (kutusunda) bekletilen hallerinin direkt ışığın vitaminler üzerindeki etkisinin zamana göre değişimi analiz edildi. Bu değerlendirme sırasında ise oda ısısında karanlıkta (kutusunda) bekletilen ve karanlıkta +4°C'de (buzdolabında) bekletilen ürünlerde ısının vitaminler üzerindeki etkisinin zamana göre değişimi analiz edildi. Elde edilen veriler ışığında hesaplamalar yapıldı. Hesaplamalar sonucunda elde edilen değerlerin 0. güne göre etkin madde düzeylerindeki değişimleri istatistiksel olarak değerlendirildi. Vitamin A, vitamin D₃ ve vitamin E analizleri güncel Amerikan Farmakopesi'nden (USP 32-NF 27, 2009) alınan metotlar ile tek bir metoda indirgenerek modifiye ve valide edilmiş tek bir yöntem ile YBSK'de ölçümleri gerçekleştirildi.

İstatistiksel Hesaplamalar: A, D ve E vitaminlerine ilişkin elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri istatistik paket programı SPSS (Ver. 20) ile yapıldı. Verilerin dağılımı Kolmogorov Simirnov testi kullanılarak belirlendi. Çarpık dağılım gösteren veriler, logaritmik dönüşüm yöntemi kullanılarak normal dağılım haline getirildi. Vitaminlerin, farklı sıcaklık ve bulundurulma (ortam) şartlarına göre zamana göre gösterdikleri değişim, genelleştirilmiş doğrusal modeller (GLM) kullanılarak değerlendirildi. Bağımsız grup ortalamaları arasındaki farklılıklara Bonferroni düzelmesi kullanılarak bakıldı. İncelenen değişkenlerin açık şişelerden ve kapalı şişelerden elde edilen ortalamalarının zaman göre gösterdikleri farklılıklar bağımsız gruplarda tekrarlı ölçümlerin varyans analizi yöntemi ile incelendi.

Bulgular

Sıcaklığın A, D₃, E vitaminleri üzerindeki etkisi analiz edildiğinde; sıcaklık farkına maruz bırakılan vitaminlerde, % oransal değişimin en fazla E vitamininde olduğu tespit edildi. Bununla birlikte 4°C'de bekletilen E vitaminin etkin madde düzeyindeki değişimin 25°C'lik ortamda bekletilene oranla daha fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca B firmasındaki etkin madde düzeyindeki değişimin diğer firmalara oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. A vitaminin +4°C ve 25°C'de bekletilerek analiz edilmesi sonucunda, etkin madde düzeyinde % oransal olarak en az etkilenen vitamin olduğu tespit edildi. Ancak yine de +4°C (buzdolabında) bekletilen vitamin A'nın etkin madde düzeyi değişimi % oransal olarak 25°C'lik ortamda bekletilene oranla daha fazla olduğu tespit edildi.



Tablolardaki istatistikler, aritmetik ortalama ve standart sapma ile gösterildi.

Tablo 1. Açık Şişelerdeki Çalışma

Sabit Sıcaklıkta Işığın Etkisinin Araştırılması		A (%)	B (%)	C (%)
Işığın A Vitaminine Etkileri	KARANLIK	7,23	4,65	3,85
	AYDINLIK	6,82	5,40	6,13
Işığın D ₃ Vitaminine Etkileri	KARANLIK	12,00	9,00	8,73
	AYDINLIK	10,23	11,67	9,07
Işığın E Vitaminine Etkileri	KARANLIK	10,67	12,76	8,72
	AYDINLIK	10,47	13,66	6,70

Firmalar arasındaki A vitaminin % oransal değişimi analiz edildiğinde C firmasında değişimin A ve B firmalarına oranla daha fazla olduğu tespit edildi. D₃ vitamin 2 farklı ortamda bekletilmesiyle birlikte zamana göre % oransal değişiminin vitamin A ya oranla daha fazla ancak vitamin E'ye oranla daha az olduğu tespit edildi. Bunun yanı sıra +4°C (buzdolabında) bekletilenlerin 25°C bekletilenlere oranla etkin madde düzeyindeki değişimin daha fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca A firmasının +4°C (buzdolabında) bekletilenlerinde vitamin D₃'ün etkin madde düzeyindeki değişimin B ve C firmalarına oranla daha fazla olduğu görüldü.

Tablo 2. Açık Şişelerdeki Çalışma

Sıcaklığın Etkisinin Araştırılması		A (%)	B (%)	C (%)
Sıcaklığın A Vitaminine Etkileri	25 °C	7,23	4,65	3,58
	4 °C	7,58	5,70	6,60
Sıcaklığın D ₃ Vitaminine Etkileri	25 °C	12,00	8,99	8,73
	4 °C	12,60	10,42	6,89
Sıcaklığın E Vitaminine Etkileri	25 °C	10,66	12,75	8,71
	4 °C	11,49	16,03	9,03

Kapalı Spesiyalitelerdeki Çalışmalar

Kapalı spesiyalitelerde ışığın ve sıcaklığın A, D₃ ve E vitaminleri üzerindeki etkisinin etkin madde düzeyindeki değişimini analiz ettiğimizde; ısıhta ve karanlıkta bekletilen ve sıcaklık farkına maruz bırakılan vitaminlerde zamana göre değişimin, açık spesiyaltelerdeki A, D₃ ve E vitaminlerin etkin madde düzeyindeki değişimlerine oranla çok az olduğu ve kapalı şişesinde bekletilen ilaçlardaki A, D₃ ve E vitaminlerinin etkin madde düzeyini neredeyse koruduğu tespit edildi.

Tablo 3. Kapalı Şişelerdeki Çalışma

Sabit Sıcaklıkta Işığın Etkisinin Araştırılması		A (%)	B (%)	C (%)
Işığın A Vitaminine Etkileri	KARANLIK	0,92	0,54	1,41
	AYDINLIK	0,98	0,73	1,15
Işığın D ₃ Vitaminine Etkileri	KARANLIK	1,50	1,31	1,56
	AYDINLIK	0,84	1,41	1,62
Işığın E Vitaminine Etkileri	KARANLIK	0,43	0,75	0,54
	AYDINLIK	0,26	1,39	0,58
Sıcaklığın Etkisinin Araştırılması		A (%)	B (%)	C (%)
Sıcaklığın A Vitaminine Etkileri	25 °C	0,94	0,54	1,41
	4 °C	0,56	0,82	0,70
Sıcaklığın D ₃ Vitaminine Etkileri	25 °C	1,50	1,31	1,56
	4 °C	1,55	1,35	1,10
Sıcaklığın E Vitaminine Etkileri	25 °C	0,43	0,75	0,54
	4 °C	1,63	1,49	0,08

Tartışma

Vitaminlerin etkin madde düzeyindeki değişimlerini incelediğimiz bu çalışmaya benzer herhangi bir çalışma bulunmadığı ve bilimsel anlamda değerlendirildiğinde sınırlı sayıda araştırmının olduğu tespit edildi. Ottaway ve ark. (2008), tarafından yapılan çalışmada 4 vitaminli bir vitamin kombinasyonu içeren tabletin 24,85°C ve %75 nispi nemde polietilen plastik kaplar (LDPE) içinde 6 ay boyunca etkin maddelerindeki değişimi incelenmiş ve plastik kaplar içinde 6 ay sonra multivitamin tablet içindeki kayıpların vitamin A'da (%44), vitamin

C'de (%23), vitamin B₁₂'de (%7,7), folik asitte (%10,5) olduğu tespit edilmiştir (Berry Ottaway P. 2008). Arshad, Riasat ve arkadaşlarının (2011) ve Tavčar-Kalcher ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmalarda sıcaklığın vitaminler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Tavčar-Kalcher ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada E vitaminin, A vitaminden daha kararlı olduğu bilgisi verilmiştir. Ancak hem sıcaklığın hem de ışığın etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda bulunan sonuçların bu çalışmalardan farklılıklar gösterdiği tespit edildi. Sıcaklığın ve ışığın E vitaminine etkisinin A vitamininden daha fazla olduğu tarafımızca bulundu. Gerald F. ve ark.'larınca (1992) E vitaminin soğukta saklanması önerilmektedir. Ancak çalışmamızda bu bilgiden farklı nitelikte bilgilere ulaşılmış olup, sıcaklık farkına maruz bırakılan vitaminlerde değişimin en fazla E vitamininde olduğu tespit edildi. Tekelioğlu ve ark.'ların (2011), vitamin-mineral karışımlarındaki farklı süreler ile inorganik ve organik minerallerin vitamin stabilitesi üzerine etkisini tespit etmek amacıyla yapılan araştırmasında, vitamin konsantrasyonlarındaki düşüşlerin, vitamin K için 2'nci, vitamin A, tiamin ve vitamin C için 4'üncü, vitamin E ve niasin için 9'uncu aydan itibaren istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) değişimler olduğu tespit edilmiştir. Depolama süresinin vitaminlerin stabilitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada vitamin E için kayıp oranın diğer vitaminlere oranla daha düşük (%6) olduğu, vitamin A da ise bu değişimin %48 civarında olduğu tespit edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda E vitaminindeki etkin madde düzeyindeki kayıpların diğer vitaminlere (A ve D₃) oranla daha fazla olduğu tespit edildi. Nguyen Kim Hoa (2013), tarafından 400 IU vitamin E içeren tabletlerin sabit oda sıcaklığında, ışığa maruz bırakılarak ve karanlıkta bekletilen numunelerde, ışığın etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma ile ışığın E vitaminin etkin madde düzeyinin azalmasında önemli bir yıkıcı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda Nguyen Kim Hoa'nun çalışmasını destekler nitelikte sonuçlar elde edildi; ışığa maruz bırakılan ve karanlıkta bekletilen vitaminlerde, etkin maddenin zamana göre % oransal değişimin en fazla E vitamininde olduğu tespit edildi.

Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda kombinasyonların prospektüslerindeki saklama koşulu önerilerindeki sıcaklık ve ışık ortamları oluşturularak, bu ortamlarda bekletilen ilaçlarda etkin madde düzeyindeki değişimleri incelenerek en doğru saklama ortamı tespit edilmeye çalışıldı. A, D₃ ve E vitaminlerini içeren kombinasyonların sabit sıcaklıkta karanlıkta bekletilen numunelerin direk

ışığa maruz bırakılanlara göre daha iyi sonuçlar verdiği tespit edildi. Sıcaklığın vitaminler üzerinde etkisini araştırdığımız çalışmada ise oda sıcaklığında bekletilen ürünlerdeki etkin madde düzeyinin buzdolabında bekletilen ürünlere göre daha iyi sonuçlar verdiği tespit edildi. Sonuç olarak farklı firmalardan temin edilen ve farklı ortamlarda bekletilen örneklerle yapılan çalışmalar sonucunda, ilk kullanımı takiben ilaçların saklanabileceği en uygun ortamın oda sıcaklığı ve güneş ışığına maruz bırakılmadan kendi karton kutusunda saklanması daha uygun olacağı tespit edildi. İlk kullanımı takiben ilaçlar buzdolabında bekletilmemeli ve direkt güneş ışığına maruz bırakılmamalıdır.

Kaynaklar

1. ACARTÜRK F, (2009). Reaksiyon Kinetiği ve Stabilité. TEB Eczacılık Akademisi Yayını-Modern Farmasötik Teknoloji Kitabı 2. Baskı 01.01.2009. 141-82.
2. AKSOY A, DAŞ YK (2012). Vitaminlerin Veteriner Sağaltımda Kullanımı. *Türkiye Klinikleri J Vet. Sci* **3(3)**:65-76
3. WADE A. ve WELLER P. J. (1994). Handbook of Pharmaceutical Excipients.14-13.
4. ANDERSON, J.S, SUNDERLAND R. (2002). Effect of extruder moisture and dryer processing temperature on vitamin C and E and astaxanthin stability. *Aquaculture* 207, 137-149.
5. ANONİM, (2010). ADE-vit prospektüsü- (Interhas). Erişim Adresi: [<http://www.interhas.com/tr/urun.asp?sayfa=ADE-Vit>] Erişim Tarihi:20.01.2013.
6. ANONİM, (2012a). Adevilin Erişim Adresi: [<http://www.vilsan.com.tr/index.php?page=product>] Erişim Tarihi:14.01.2013.
7. ANONİM, 2012b, Vil-ADE Erişim Adresi: [<http://www.vilsan.com.tr/index.php?page=product>] Erişim Tarihi:21.01.2013.
8. ARSHAD A, RİASAT M, MAHMOOD K. (2011). Drug Storage Conditions in Different Hospitals in Lahore. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* Vol. 3 (1), 543-547.
9. ATASOY, F. (1998). Veteriner ilaçlarında son kullanma tarihi geçen bazı kemoterapötiklerin etkin madde düzeylerinin araştırılması. Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, Bursa.
10. BERRY OTTAWAY P. (2008). "The stability of vitamins in fortified foods and supplements". In "Food Fortification and Supplementation" Ed. Peter Berry Ottaway. CRC Press Ltd., USA.
11. BLOOD D.C, RADOSTİTS O.M. (1989). Diseases caused by nutritional deficiencies Veterinary Medicine, 7th Ed. London: Baillière Tindall&Cox. 1187-1224.
12. BENOWİEEZ, (1981). Vitamins & You. Berklett books, New York. BORTON, (1978). Human Nutrition. McGraw-Hill, New York.
13. BOSCO, (1980). The People's Guide to Vitamins & Minerals. Contemporary Books, Chicago.
14. BOZKIR, A. (1989). Türkiye'de üretilen katı formdaki ilaç şekillerinin memleketimiz coğrafi ve iklim özelliklerine bağlı olarak stabiliteilerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
15. CRİCHTON B. (2004). Keep In A Cool Place: Exposure Of Medicines To High Temperatures In General Practice During A British Heatwave. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 3: 328-329.
16. DAHL, GB, SVENSSON L, KINNANDER NJ, ZANDER M, BERGSTRÖM UK, (1994). Stability of vitamins in soybean oil emulsion under conditions simulating intravenous feeding of neonates and children. *J. Parenter. Enteral Nutr.* **18**: 234-239.
17. DEĞİM Z, (1994). Noizometral Stabilité test ile bazı ilaçların dayanıklılıklarının incelenmesi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.

18. DEMAN JM, DEMAN L, WYGERDE T, (1986). Stability of vitamin A in nonfat dry milk. *Milchwissenschaft* **41**: 468–469.
19. DOVE CR, EWAN RC, (1990). Effect of excess dietary copper, iron or zinc on the tocopherol and selenium status of growing pigs. *J. Anim. Sci.* **68**: 2407–2413.
20. DOVE CR, EWAN RC, (1991). Effect of trace minerals on the stability of vitamin E in swine grower diets. *J. Anim. Sci.* **69**: 1994–2000.
21. DOZIER W A, (2002). Mash conditioning and vitamin stability. *Feed Inter* **23**: 20-4.
22. EKİCİ H, (2011). Florfenikol ihtiva eden Preparatların Broylerde Biyoeşdeğerliği, Farklı Saklama Şartlarının Etkileri ile Farmakovijilans Taramaları. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi.
23. FETTMAN, MARTİN J, (2001). Nutritional Pharmacology-Fat-Soluble Vitamins, Adams, H. Richard, ed., *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 8th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 683-701.
24. FRIAS J, VIDAL V C, (2001). Stability of thiamine and vitamins E and A during storage of enteral feeding formula. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2313–2317.
25. FUNG H. (1990). "Chemical kinetics and drug stability", Modern Pharmaceutics, (Ed: GS Banker, CT Rhodes), 2nd Ed, Marcel Dekker Inc., New York, 209-237.
26. GADIANT M, FENSTER R, (1994). Stability of ascorbic acid and other vitamins in extruded fish feeds. *Aquaculture* **124**: 207–211.
27. GERALD F, COMBS JR (1992) The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health 4th Ed. 57-59.
28. GKGM, (2015). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Ruhsatlı Veteriner Tıbbi Ürünler. Erişim Adresi: <http://www.gkgm.gov.tr/vtu/>. Erişim Tarihi: 07.05.2015.
29. IADSA (2013). The International Alliance of Dietary / Food Supplement Associations- Final Draft 27.11.13 Shelf-life Recommendations for Supplements Guidelines for Manufacturers Erişim tarihi: 07.06.2016 Erişim Adresi: http://www.iadsa.org/publications/1474972849_Stability_Testing_for_Shelf_L.
30. JASKIEWICZ T, MATYKA S, KOROL W, (1998). Influence of storage conditions on vitamin A and E stability in premixes with the share of isolated microelemental fraction. *Biul. Nauk. Przem. Pasz.* **37**: 5–13.
31. BAUERNFEIND J C (1972). Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* **20** (3): 456–473 176-180.
32. KAYA S, PİRİNÇCİ İ, BİLGİLİ A (2002). Vitaminler-Beslenme Farmakolojisi. Veteriner Farmakoloji, Cilt:2 Baskı:3 Medisan Yayınevi. Ankara.192-208.
33. KAYA S, PİRİNÇCİ İ, BİLGİLİ A (2007). Kemoterapötikler (Antibiyotikler) Veteriner Farmakoloji, Cilt:2 Baskı:4 Medisan Yayınevi. Ankara. 329-488.
34. LATHERS CM (2001). Role of Veterinary Medicine in Public Health: Antibiotic use in food animals and humans and effect on evolution of antibacterial resistance. *J. Clin. Pharmacol* **41**: 595-599.
35. LATHERS CM (2002). Clinical pharmacology of antimicrobial use in humans and animals, *J. Clin. Pharmacol* **42**: 587-600.
36. LEERBECK E, HJARDE W (1975). Stability of vitamin K3 in vitaminized mixed feeds. *Acta Agric. Scand.* **25**: 313-319.
37. LEWIS B (2000). Update for nurse anesthetists refrigerated anesthesia related medications. *AANA Journal Course*. **68**: 265-268.
38. MARTİN A (1993). Physical Pharmacy, 4th Ed., Lea & Febiger, Philadelphia ve London, 284-323.
39. MATYKA S, SAGAN A, JASKIEWICZ T (1996). Stability of vitamins A and E in feed premixes containing isolated fractions of trace elements. *Biul. Nauk. Przem. Pasz* **35**: 17–26.
40. DOWELL Mc, RUSSELL LEE (1989a). Vitamins in Animal Nutrition: Comparative Aspects to Human Nutrition, 2nd Part 20-48.
41. DOWELL Mc, RUSSELL LEE (1989b). Vitamins in Animal Nutrition: Comparative Aspects to Human Nutrition, 3rd Part 60-75.
42. DOWELL Mc, RUSSELL LEE (1989c). Vitamins in Animal Nutrition: Comparative Aspects to Human Nutrition, 3rd Part 97-107.

43. NGUYEN KİM HOA (2013). Effect of Light and Storage Time on Vitamin E in Pharmaceutical Products. *British Journal of Pharmacology and Toxicology* **4(5)**: 176-180.
44. NRC (1987). Vitamin Tolerance of Animals. Washington DC: National Academy of Sciences-National Research Council.
45. PARRISH DB, PATTERSON K (1983). Effects of grinding and storage for one month on retention of vitamin A in premixes and mineral supplements. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**: 1306-1308.
46. PLUMB, DONALD C (2005). Vitamin E/Selenium- Veterinary Drug Handbook 6th Ed. Distributed By Blackwell Publishing 798-800
47. SAGHAEI S (2014). Farklı saklama şartlarında muhafaza edilen Oksitetrasiklin, Enrofloksasin, Sülfonamid-Trimetoprim ve Levamizol içeren veteriner müstahzarlarının orijinal ve açılmış şekillerindeki etkin madde düzeyi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
48. SCHRÖDER MJA, SCOTT KJ, BLAND MA, BISHOP DR (1985). Flavour and vitamin stability in pasteurized milk in polyethylene-coated cartons and in polyethylene bottles. *J. Soc. Dairy Technol.* **38**: 48-52.
49. SHURSON J, SALZER T, KOEHLER D (1996). Metal-specific amino acid complexes, inorganic trace minerals effect on vitamin stability examined. *Feedstuffs* **68**: 13-23.
50. TAVCAR-KALCHER G, ANTON VENGUST (2007). Stability of vitamins in premixes, *Animal Feed Science and Technology* **Vol:132**, Issues 1-2, 148-154.
51. TEKELİOĞLU S, GÜRBÜZ E, ÇOŞKUN B, İNAL F (2011). Farklı Mineral formlarının ve depolama süresinin vitamin stabilitesi üzerine etkileri. *Eurasian J Vet. Sci*, **27: 3**: 155-159.
52. USP 26 (2003). 11th Ed., The United States Pharmacopeial Con. Inc., Twinbrook Parkway, Rockville.
53. USP 32-NF 27 (2009). In United States Pharmacopeia and National Formulary; The United States Pharmacopeial Convention, Inc: Rockville, MD.
54. VADAS EB (2002). "Stability of Pharmaceutical Products", Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Ed: AR Gennaro), 20th Ed., Lippincott Williams &Wilkins, 986-994.
55. ZHUGE Q, KLOPFENSTEIN CF (1986). Factors affecting storage stability of vitamin A, riboflavin, and niacin in a broiler diet premix. *Poultry Sci.* **65**: 987-994.

Sisteamin'in Toksik Etkilerinin Araştırılması
A. Sisteamin'in Farelerde LD₅₀ Düzeyinin Belirlenmesi

Ali Nazmi Can DOĞAN¹ Dinçer ERDAĞ²

¹Göle Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, Ardahan

²Kafkas Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Kars

Özet: Bu çalışmada sisteaminin farelerde LD₅₀ düzeyinin hesaplanması amaçlandı. Sisteamin, sistein amünoasitinin dekarboksilasyonu ile oluşur. Ölümünden sonra bağırsaklarda bakteriler tarafından sentezlenir. Sentetik olarak da elde edilebilir. Coenzim-A ile bir transmitter madde prokürsörü olan hipotaurin sentezinde görev alır. Sistinozis tedavisinde kullanılır. Sisteamin, orfans grubu ilaçlar içerisinde yer alır. Fazla kullanılması zehirlenmelere neden olabilir. Bu çalışmada Mus musculus albino ırkına ait 20±2 g ağırlığında erkek fareler kullanıldı. Fareler, her grupta 10 adet olacak şekilde toplam 14 gruba ayrıldı ve deney süresince ad libitum olarak standart diyet ve çeşme suyuyla beslendi. Sisteamin'in sırasıyla 100, 200, 300, 400, 500, 600 ve 700 mg/5 ml ticari serum fizyolojikle çözeltileri hazırlandı. Her gruba sırasıyla 300, 600, 900, 1200, 1500, 1800 ve 2100 mg/kg dozda sisteamin verilmesi için hazırlanan çözeltilerden 0,3 ml hacimde im veya ip yolla uygulandı. Hayvanlar takip edildi ve 14 gün içerisinde ölen hayvanlar gruplara göre not edildi. Gruplarda ölen hayvan sayıları göz önüne LD₅₀, Behrens-Kerber yöntemi kullanılarak hesaplandı. Araştırma sonucunda sisteaminin farelerde LD₅₀, intramusküler uygulamada 1110 mg/kg, intraperitoneal uygulamada ise 1230 mg/kg olarak belirlendi. Bu bulguların sisteamin ile yapılan çalışmalarında göz önüne alınması gerektiği önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Fare, LD₅₀, Sisteamin.

Investigation of Toxic Effects of Cysteamine

A. Determination of LD₅₀ Level of Cysteamine

Abstract: In this study, we aimed to determine the LD₅₀ level of cysteamine in mice. Cysteamine is formed by decarboxylation of cysteine amino acid. It is synthesized by bacteria in the intestines after death. It can also be obtained synthetically. Coenzyme-A is involved in the synthesis of hypotaurin, a promoter of precursors. It is used in the treatment of cystinosis. Cysteamine is included in the orphans group. Excessive use may cause intoxication. In this study, 20±2 g male mice of *Mus musculus albino* were used. The rats were divided into 14 groups, each containing 10 in each group and fed with standard diet and tap water as ad libitum during the experiment. Solutions of cysteamine 100, 200, 300, 400, 500, 600 and 700 mg/5 ml saline were prepared respectively. In each group, 0.3 ml volume im or ip solutions were prepared for cysteamine administration at doses of 300, 600, 900, 1200, 1500, 1800 and 2100 mg/kg, respectively. Animals were followed and animals died within 14 days were recorded according to groups. LD₅₀ was calculated by using the Behrens-Kerber method. As a result of study, LD₅₀ dose of cysteamine in mice was determined as 1110 mg/kg in intramuscular administration and 1230 mg/kg in intraperitoneal administration. It may be suggested that these findings should be taken into consideration in studies with cysteamine.

Keywords: *Cysteamine, LD₅₀, Mouse.*

Giriş

Sisteamin (sisteinden oluşur, sistamin ise sistinden) ve putresin önemli ptamainlerdendir. Sisteamin, 2-aminoetanetiöl, beta-merkaptöetilamin, tioetanolamin, markaptamin vb isimlerle bilinir. Ergime noktası 70-71 °C'dir. Beyaz renkli bir toz olup suda çözünür. Sisteaminin hidroklorür, fosfat ve yavaş salınan hidrojentartarat tuzları sentezlenmiştir (4,12).

Coenzim-A, sisteamin, pantotenik asit ve adenzin trifosfattan oluşur. Pantotenik asit vücutta pentonetat kinaz enzimiyle 4-fosforilasyona tabi tutulur. 4-fosfopantotenik asit, 4-

fosfopantotenoilsistein sentataz enzimi yardımıyla sisteinle birleştirilip önce 4-fosfopantotenoilsisteine, sonra fosfopantotenoil sistein dekarboksilasyon enzimiyle 4-fosfopantoteine dönüştürülür. 4-fosfopantoteine adenil grubu aktarılarak defosfo-Coenzim A'ya, bu madde de fosforile edilerek Coenzim-A'ya çevrilir. Sisteamin, hipotaurin üretimine de katılır. Hipotaurin, bir nöromediatör olan taurinin ön maddesidir (12).

Sisteamin, vücutta sisteine çevrilebilir. Sistein, bazı ksenobiotik ve ilaçların konjugasyonunda rol oynayan glutasyonun yapısına girer (12,15). Bu nedenle sisteaminin antioksidan etkili olduğu ileri sürülmektedir (15).

Sistinozis, iki sistein molekülünden oluşan sistin adlı proteinin vücutta depolanması ile karakterize genetik kökenli otozomal resesif bir lizozomal hastalıktır. Hastalık, 17. (17p13) kromozomun kısa kolunda yer alan CTNS genindeki mutasyona bağlı olarak ortaya çıkar (4,17). Bu gen 12 ekzon taşır. Bunlardan son 10 ekzon sistinosini oluşturan 367 aminoasidi kodlar (16). Mutasyon sonucu sistini lizozomdan sitozole taşıyan sistinosin adlı protein sentezlenemez (2,10). Sonuçta hücrelerde lizozomlar içerisinde sisteinden disülfid bağları ile oluşan sistein kristalleri toplanır (4). Sistinin çözünürlük limiti 0,1 mg/ml'dir. Bunun üzerindeki miktarları dışarı atılamaz ve lizozomlarda birikerek hücrelere zarar verir (4,12). Sistinozisli hastalar dünyaya normal gelirler. Yaşları ilerledikçe gastrointestinal semptomlar (örneğin, kusma, iştahsızlık ve beslenme güçlüğü gibi), şiddetli büyüme geriliği görülür. Hastalık göz, tiroid bezi, gonadlar, pankreas, kaslar, kemik iliği, karaciğer, sinir sistemi (beyin), akciğer ve kemikler gibi diğer organları etkileyebilir (2,10). Nefropatik sistinoziste poliüri, polidipsi, dehidratasyon, kilo kaybı, raşitizm (D vitamini dirençli) ve asidoz gelişir. Kalıtsal Fanconi sendromunun en sık görülen nedenidir (2,10,14). Eğer hastalık geç teşhis edilir ve tedavi uygulanmazsa, 6-12 aylık bebeklerde böbrek yetmezliği başlar ve 10-12 yaşına kadar ileri derecede böbrek yetmezliğine dönüşür (1,2,4,17).

Sistin kristalleri kornea ve konjunktivada biriktiği için hastalığın erken döneminde fotofobi görülür (10). Sistinozis hastalarda oküler semptomlar 16 aylıktan görülmeye başlar ve giderek ilerler (4). Keza hastaların derisinde pigmentasyon yetersiz olup, derinin rengi açık,

sarı ve soluktur. Sistinoziste ölüm nedeni böbrek yetersizliği veya elektrolit denge bozukluklarıdır (10).

Hastalık, sistin kristallerinin kemik iliği, lenf düğümleri, konjunktiva ve rektal mukozada gösterilmesiyle teşhis edilir (2,10,14,). Korneada sistin birikimi hastalığın ayırt edilmesinde kullanılır (2). İleri derecedeki böbrek yetmezliğini önlemek için hatalığa erkenden tanı konarak sisteamin tedavisine başlanmak büyük önem arz eder (1,2,14,17).

Sisteamin, sistinozis tedavisinde kullanılan ve FDA tarafından onaylanan orfans bir ilaçtır. Tedavide oral veya göze damlatılarak uygulanır. Maksimum dozu 1,95 g/metrekaare/gündür. Hastalara 1,05 g dozda oral yolla uygulanan baz sisteamin, 1,4 saatte plazmada pig konsantrasyonuna (4 mikrogram/ml) ulaşır (11). Lizozomlara girer. Sistini, sistein ve bir disülfid olan sistein-sisteamine çevirir (12). Bunlar hasarsız taşınma sistemleri ile lizozomlar dışına çıkarılırlar (4).

Sisteamin uygulanan hastaların önemli bir kısmında (% 30-40) ciddi yan etkiler görülür. Bu yan etkiler arasında uygulama yerlerinde tahriş, ağız kokusu, kusma, bulantı, mide ağrısı, ishal, iştahsızlık, dispepsi, gastro-enterit, gastro-intestinal ülser ve kanama, lökopeni, alkalemi, fosfata enzim düzeyinde yükselme, baş ağrısı, kulak çınlaması, çift ve bulanık görme, idiyopatik intrakranial hipertansiyon, letarji, asteni, ensefalopati, konvülsiyon, halüsinasyon, nefrotik sendrom, deri döküntüleri, saçta renk değişikliği, kemiklerde kırılma, skolioz, anafilaktik reaksiyonlar, pireksi sayılabilir. Ayrıca göze lokal uygulandığında hiperemi, göz ve baş ağrısına sebep olabilir. Sisteamin, hipersensitiviteli, penisilin allerjisi olanlar ile gebelerde kullanılmaz (11,12). Yüksek dozlarda letarji ve kardio-respiratuvar bozukluk ve ölüme sebep olur. Antidodu bilinmemektedir. Zehirlenmelerde hemodializ önerilir (11).

Sisteaminin oral ve lokal yolla kullanımının yanında, özellikle araştırmalarda kas ve periton içi yolla da kullanılabileceği dikkat çekmektedir. Bu yollarla uygulandığında letal ve toksik düzeyiyle ilgili veri ve çalışmalar yeterli değildir. Bu araştırmada kas ve periton içi yolla uygulamada sisteaminin LD₅₀'ünün hesaplanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmanın yapılması, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (KAÜ-HAYEK) 24.08.2017 tarih ve 2017/82 sayılı kararı ile uygun görüldü. Sisteamin Fluka (CAS:156-57-0) firmasından temin edildi. Eczaneden alınan serum fizyolojik kullanılarak her gruba göre yoğunluğu sırasıyla 100, 200, 300, 400, 500, 600 ve 700 mg/5 ml olacak şekilde sisteaminin uygulama çözeltileri hazırlandı.

Araştırmada Mus musculus albino ırkına ait 20 ± 2 g ağırlığında erkek fareler kullanıldı. Fareler, her grupta 10 adet olacak şekilde toplam 14 gruba ayrıldı ve deney süresince standart diyet ve çeşme suyuyla ad libitum olarak beslendi.

1. gruba 100 mg/5 ml'lik çözeltiden (300 mg/kg), 2. gruba 200 mg/5 ml'lik çözeltiden (600 mg/kg), 3. gruba 300 mg/5 ml'lik çözeltiden (900 mg/kg), 4. gruba 400 mg/5 ml'lik çözeltiden (1200 mg/kg), 5. gruba 500 mg/5 ml'lik çözeltiden (1500 mg/kg), 6. gruba 600 mg/5 ml'lik çözeltiden (1800 mg/kg), 7. gruba 700 mg/5 ml'lik çözeltiden (2100 mg/kg) im yolla 0,3 ml injekte edildi. Diğer 7 gruba (8-14. gruplara) sırasıyla im yoldaki çözeltiler ve dozlar ip yolla 0,3 ml hacimde verildi.

Hayvanlar takip edildi ve 14 gün içerisinde ölenler gruplara göre kayıt altına alındı. Gruplarda ölen hayvan sayıları göz önüne alınarak LD₅₀ düzeyleri Behrens-Kerber yöntemi (8) kullanılarak hesaplandı.

Bulgular

Diğer deney gruplarında ölen hayvan sayıları tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 1 ve Tablo 2'de görülmektedir. Ölüm sayıları dikkate alınarak Behrens-Kerber yöntemi ile LD₅₀ düzeyleri uygulanan yola göre ayrı ayrı hesaplandı.

Tablo 1.1. Behrens-Kerber yöntemine göre im yolla uygulanan sisteaminin LD₅₀'sinin hesaplanması

Hayvan sayısı	Doz (mg/kg)	Ölen hayvan sayısı	A	B	A x B
10	2100	10	9	300	2700
10	1800	8	7,5	300	2250
10	1500	7	7,5	300	2250
10	1200	8	4,5	300	1350
10	900	1	2	300	600
10	600	3	2	300	600
10	300	1	0,5	300	150

Tablo 1.2. Behrens-Kerber yöntemine göre ip yolla uygulanan sisteaminin LD₅₀'sinin hesaplanması

Hayvan sayısı	Doz (mg/kg)	Ölen hayvan sayısı	A	B	A x B
10	2100	10	8	300	2400
10	1800	6	5,5	300	1650
10	1500	5	4,5	300	1350
10	1200	4	4	300	1200
10	900	4	4	300	1200
10	600	4	2,5	300	750
10	300	1	0,5	300	150

Yönteme göre LD₅₀'nin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

A: Birbirini izleyen iki gruptaki ölen hayvanların aritmetik ortalaması

B: Birbirini izleyen iki grup arasındaki dozların farkı

N: Gruptaki hayvan sayısı

LD₁₀₀: Bütün hayvanları öldüren doz

(A x B) Toplamı

$$LD_{50} = LD_{100} - \frac{(A \times B) \text{ Toplamı}}{N}$$

Tablo 1'deki değerler formüle uygulandığında sisteaminin kas içi yolla LD₅₀'si:

A x B'nin toplamı olan 9985, 10 bölündüğünde 998,5 değeri elde edildi. LD₅₀; 2100-998,5 = 1101 mg/kg olarak hesaplandı.

Tablo 2'deki değerler formüle uygulandığında sisteaminin periton içi yolla LD₅₀'si:

A x B'nin toplamı olan 8700, 10'a bölündüğünde 870 elde edildi. 2100-870 = 1230 mg/kg rakamı sisteaminin ip yolla LD₅₀ 'si olarak hesaplandı.

Tartışma ve Sonuç

Sistinozis insanlarda nadir görülen genetik hastalıklardan biridir. Hastalık her 100.000–200.000 canlı doğumda yaklaşık bir olarak görülür (2). Sisteinin disülfid bağıyla birleşmesi sonucu oluşan sistin, genetik hasar sonucu lizozom dışına çıkarılamamaktadır (1). Gende, Kuzey Avrupa ve Amerika'da en sık görülen mutasyonun 57 kb'lik delesyon olduğu bilinmektedir, Türkiyede ise en sık mutasyonun c.681G> A (p.Glu227Glu) olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur (10,17). Çözünürlüğünün üzerinde oluşan sistin kristalleri hücrelerde birikmeye başlar (4). Bu kristaller hücre ve dokulara zarar verir. Hastalıktan farklı yaşlarda çok sayıda doku ve organ (böbrek, kornea, sindirim sistemi, pankreas, kas, kemik, karaciğer, akciğer kemikler vb) etkilenir (1,2). Sistinozisli bebekler normal doğarlar, ancak 6 aydan sonra büyüme geriliği dikkati çeker (14).

İnfanıl veya erken başlangıçlı nefropatik sistinoz, genç veya geç başlangıçlı nefropatik sistinoz ve yetişkin veya oküler sistinoz diye üç klinik tipi bildirilmiştir (2). İnfanıl nefropatik sistinoz (İNS), genç yaşlardan itibaren böbrek ve korneada sistin kristalleri birikir (3). Kristaller böbrek tubuluslarında hasara sebep olur. Buna bağlı olarak poliüri, polidipsi, dehidrasyon, kilo kaybı, ateş, büyüme ve gelişme geriliği görülür. Böbrek yetmezliği giderek ağırlaşır (10). Tanısı gecikmiş ve tedavi uygulanmamış hastalar genelde 10-12 yaşına kadar son dönem böbrek yetmezliğine ulaşırlar (17). Erken tanı ve tedavi uygulama, organlarda hasarı önlemek, hafifletmek ve prognozu iyileştirmek için gereklidir (2).

Sistinozis tedavisinde sisteaminin oral preparatları ABD'de 1994, yavaş salınımlı kapsülleri ise 2013 yılında ilaç olarak onaylanmıştır (2,12). Şimdilik tek spesifik ilaç olup, kornea tutulumunda oral yola ilaveten göz damlası şeklinde de kullanılır (2). Baz ilacın dozu 12 yaşa kadar olanlarda 1,3 g/m²/metrekare/gün, 12 yaş üzeri ve 50 kg üstü hastalara ise 2 g/gündür. Günlük doz dörde bölünerek eşit aralıklarla uygulanır. Başlangıç dozu idame dozun ¼-1/6'sı oranında olmalıdır. Bu doz 4-6 hafta sürdürülmelidir. İlacın maksimum dozu 1.95 g/m²/gündür (2,11). Sisteaminin etkisiyle ortaya çıkan sistein ve sistein-sisteamin bileşiği hasarsız taşınma sistemleri ile lizozomlar dışına çıkarılır (4). Bu ürünlerin taşınmasında sistein ve sırasıyla lizin/arginin (PQLC2) taşıyıcı yapılar etkili olur (2). Sisteamin uygulanarak lökosit sistin düzeyini 1 nmol hemicystine/mg protein düzeyinin altında tutulur (11).

Sisteamin renal Fanconi'yi anlamlı şekilde etkilemese de tedaviye erken başlamak ve uzun süre sürdürmek glomerüler fonksiyon bozulmalarının ilerlemesini geciktirir. Sisteamin tedavisinin tanıdan sonra küçük bebeklerde bile mümkün olduğunca erken başlatılması ve uzun sürdürülmesi böbrek yetmezliğini geciktirmesi açısından yararlıdır. Sistinozlu hastalara, özellikle erken yaşlarda ve uzun süreli sisteamin tedavisi verildiğinde ölüm oranının düştüğü görülmüştür (2).

Korneadaki sistein kristalleri 100-500 mikron uzunluğunda olup hücre dışında stromal kollajene paralel bulunur. İğne, dikdörtgen veya altıgen şeklinde olduğu belirlenmiştir (4). Oral yoldan verilen sisteaminin kornea sistin kristalleri üzerinde bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle sisteamin, oral dozun yanında aynı zamanda göze damla şeklinde de uygulanır. Hücre içi sistin kristallerinin korneanın yanında arka oküler yapılarda da ortaya çıkıp retina, koroid ve optik sinirlere hasar verdiğine bağlanmıştır (2). Sisteaminin korneadaki etkinliğinin düşük bulunması, kristallerin hücrelerin dışında olmasından da kaynaklandığı ileri sürülmektedir (4) Biswas ve ark (3) tarafından yapılan çalışmada yetişkin nefrotik sistinozslı hastalarda göze damla olarak uygulanan sisteaminin fotofobi gibi kornea bulgularının ortadan kaldırmadığı tespit edilmiştir. Bu durum tedaviye başlama zamanına ve ilacın saklama şartlarından kaynaklanabileceğine bağlanmıştır.

Sisteaminin oral yolla uzun süre verilmesi, büyüme geriliği ve diğer endokrin bozukluklarında belirgin iyileşmeler söz konusudur. Erken ve uzun süreli (8 yıl) sisteamin tedavisi, sistinozlu erişkinlerde hipotiroidizm ve diyabet insidansını azaltmış, yapısal beyin hasarlarını önlenemediği gösterilmiştir. Tedaviye erken başlama (<2 yaş), görsel-motor becerileri önemli derecede etkilenmese de, sözel ve IQ puanları ve görsel-mekaniksel beceriler önemli ölçüde gelişmeye sebep olmuştur. İki veya üç yaşından sonra sisteamin tedavisine başladığında ise hastalarda serebellar semptomlar, zihinsel veya merkezi sinir sistemi bozuklukları görülmektedir. Sistinoziste ortaya çıkan miyopati ve müsküler atrofi, uzun süreli siteamin tedavisiyle azalma göstermektedir. Yetişkinlere 20 yıldan daha uzun süre sisteamin verildiğinde miyopati ortaya çıkaz. Uzun süreli sisteamin tedavisi sonucu hasta yetişkinlerde

aspiasyon pnömonisine bağlı olarak gelişen pulmoner hastalık insidansını düşer. Ortalama yaşam süresi uzar (2).

Sisteaminin sistinoz üzerindeki tedavi edici etkilerinin yanında, in vitro hayvan modellerinde radyasyon, orak hücre anemisi, bağışıklık, büyüme, HIV inhibitörü yeteneği, Parkinson hastalığı, sıtma, nörodejeneratif bozukluklar, nöropsikiyatrik bozukluklar ve kanser, keza alkole bağlı olmayan pediatrik yağlı karaciğer hastalığındaki etkinliği üzerine klinik araştırmalar yapıldığı görülmektedir (12). Sisteamin % 0,1 oranında suya katılarak verildiğinde farelerde 3-MC ile oluşturulan fibrosarkom sayısını azalttığı belirlenmiştir. Bu durumun Co-enzim A ve glutasyon senteziyle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (5,6). Pantetheini pantotenat (B5 vitamini, CoA biyosentetik prekürsörü) ve sisteamine indirgeyen bir enzim olan Vnn1 pantetheinaz'ın tümör büyümesindeki etkisini araştırılmıştır. Vnn1 verilen grupta tümörlerin (sarkomların) yavaş büyüdüğü gösterilmiştir (9). Doğan ve ark (7), tarafından yapılan çalışmada sisteamin ve putresininin bazı bakteriler üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Sistinotik renal tübüler epitel hücrelerinden hazırlanan kültür çalışmalarında sisteamin glutasyon düzeyinde etkili olduğu bildirilmiştir. İlaç oksidatif stresi azaltıp, spermatogenezi stimüle eder (2). Sueishi ve ark (15) tarafından yapılan çalışmada mentolün antioksidan etkileri (radikal temizleyici) sisteamin ve amifostin ile kıyaslanabilecek ölçülerde olduğu belirlenmiştir. Linaloolün ise böyle etkilerinin olmadığı gösterilmiştir.

Sisteamin + altın organometalik nanopartiküllerin kontrast ajanı olarak kullanılabilirliği üzerine çalışılmıştır. Au çekirdek büyüklüğü ~ 15 nm olan FA-Cys-AuNP'ler 80 kVp'de 2000 µg/ml konsantrasyonunda, iyota göre birim kütle başına 1,77 kat daha fazla kontrast sağladığı ve bu nedenle kontrast olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (13).

Sisteaminin önemli yan etkileri vardır. Bunlar lokal ve sistemik olarak ayrılabilir. Oral uygulandığında arasında cilt, sindirim sistemi, kan, sinir sistemi, karaciğer, göz, gibi organlarda ciddi yan etkiler görülür (11,12). Uçucu kükürt bileşiklerine (yani, dimetil sülfid ve metanetil) metabolize edildiğinden tedavi alanlarda nefes kötü kokar. Bu etkilerin dozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle düşük dozlarda başlanıp, artırıldığında iyi tolere edilir. Toksik etkilerin dozun yanında şelat yaparak atılmasını hızlandırdığı bakır eksikliği ile ilişkili

olabileceği de ileri sürülmektedir. Hastalara bakır takviyesi yapma önerilmektedir (2). Yaşın küçük olması ilaç toksisitesinde artışa sebep olur. Etkisi uzatılmış salınma kapsüllerinin proton pompası inhibitörleri gibi mide asitini etkileyen ilaçlarla veya alkolle alındığında ilacın salınmasında artışa neden olabileceği unutulmamalıdır (12). Sisteamin, duyarlı ve penisiline alerjik olanlarda kontrendikedir. Gebeliğin ilk trimesterinde açık olmamakla birlikte teratojen etkilidir. Preklinik çalışmalarda ratlarda 100 mg/kg/günde dozları (Aynı zamanda teratojen), tavşanlarda 50 mg/kg/gün dozları embriyo-fötotoksik etkilidir (11,12).

Sisteaminin olumsuz etkileri hiç kuşkusuz doz ile yakından ilişkilidir. Yan ve toksik etkilerinin bulunması ve yeni alanlarda etkilerinin çalışılması nedeniyle sisteaminin terapötik, toksik ve letal dozlarının iyi araştırılmış olması gerekir. Bu araştırma sonucunda sisteaminin farelerde LD₅₀ dozu intramusküler uygulamada 1110 mg/kg, intraperitoneal uygulamada ise 1230 mg/kg olarak belirlenmiştir. Biyolojik yapıların değişkenliği, ilacın ve zehirlenmelerin önemi göz önüne alındığında tespit edilen miktarların daha fazla hayvan kullanılarak doğrulanması gereklidir. Ayrıca bulunan bu dozun sisteaminle yapılacak çalışmalarda göz önüne alınması sonuç olarak önerilebilir.

Kaynaklar

1. Anon: Nefrotiksistinozis. <http://www.cystinosisfoundation.org/Documents/TurkishGuide.pdf>.
2. Ariceta1, G., Giordano, V., Santos, F. Effects of long-term cysteamine treatment in patients with cystinosis. *Pediatric Nephrology*. 34 (2019):571–578.
3. Biswas, S., Sornalingam, K. The Ocular Status of Cystinosis Patients Receiving a Hospital Pharmacy-Made Preparation of Cysteamine Eye Drops: A Case Series. *Ophthalmol Ther* 8 (2019):125–136.
4. Dixon,P., Christopher,K., Chauhan, A. Potential role of stromal collagen in cystine crystallization in cystinosis patients. *International Journal of Pharmaceutics* 551 (2018): 232–240.
5. Doğan, A., Aksu, P., Erdağ, D., Bayezit, M., Doğan, E. Özcan, K. Farelerde 3-metilkolantrenle indüklenen fibroarkoma üzerine sisteaminin etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (1): 7-12, 2013.
6. Doğan, A., Kılıç Aksu, P., Erdağ, D., Doğan, A.N.C., Özcan, K and Doğan, E. The protective effects of cysteamine, putrescine, and the combination of cysteamine and putrescine on fibrosarcoma induced in mice with 3-methylcholanthrene. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 40 (5): 575-582, 2016.
7. Doğan, A., Otlı, S., Büyük, F., Aksu, P., Tazegül, E., Erdağ, D. Sisteamin, putresin ve sisteamin-putresin kombinasyonunun bazı bakteriler üzerine etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18 (6): 1015-1019, 2012.
8. Doğan, A. Veteriner Toksikoloji. Eser Basım Yayın Dağıtım ve Matbaacılık. Erzurum, 2016.

9. Giessner, C. et. all. Vnn1 pantetheinase limits the Warburg effect and sarcoma growth by rescuing mitochondrial activity. LifeScience Alliance. S 1-16, 2018. life-science-alliance.org, <http://doi.org/10.26508/lsa.201800073>.
10. Güneş, F., Ekmekçioğlu, Y.A. Özgüner A., Şanlı A. Sistinozis (Lignac Sendromu). Kartal Eğitim ve Araştırma Klinikleri. 4 (1-4):553-556, 1995.
11. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cystagon-epar-product-information_en.pdf.
12. <https://www.wikipedia.org>. 27.05.2019.
13. Khademia, S., Sarkarb, S., Shakeri-Zadehd, A., Attarane, N., Kharrazif S., Reza Ayb, M.R., Ghadirib, H. Folic acid-cysteamine modified gold nanoparticle as a nanoprobe for targeted computed tomography imaging of cancer cells. Materials Science & Engineering C. 89 (2018):182–193.
14. Sipahi, T., Şahin., Öner, A. Nefropatik Sistinozis: Olgu Sunumu. Türkiye Klinikleri J Pediatr. 10(4):219-22. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-nefropatik-sistinozis-olgu-sunumu-34606.html>, 27.05.2019.
15. Sueishi, Y., Nii, R. Monoterpene's multiple free radical scavenging capacity as compared with the radioprotective agent cysteamine and amifostine. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 28 (2018): 3031–3033.
16. Sumayao, R., Newsholme, P., McMorrow, T. The Role of Cystinosin in the Intermediary Thiol Metabolism and Redox Homeostasis in Kidney Proximal Tubular Cells. Antnitoixoiadnnts. 7 (179): 1-17.
17. Topaloğlu R. Sistinozis: Tanı, Tedavi ve Yönetim. Erten Y, editör. Hereditör Böbrek Hastalıkları. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018. p. 24-30. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-sistinozis-tani-tedavi-ve-yonetim-83361.html>, 27.05.2019.

Intracellular Drug Delivery by Exosomes: Present Condition and Future Perspective

Md Mahmodul Hasan Sohel

Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
38039 Melikgazi, Kayseri, Turkey

Abstract: Nanotechnology plays a crucial part in the detection, diagnosis, and treatment of a wide variety of human diseases including cancer. The recent decades have witnessed a rapid development of nanocarriers as drug delivery system. Using nanocarriers have several pharmacokinetics and safety profiles in addition to the increased bioavailability of the entrapped molecules. However, there are several obstacles in attaining the goal of successful clinical translation of nanocarrier-based drug delivery system because of the safety, stability and delivery efficiency of nanocarriers. In this scenario, exosome could be an excellent alternative to conventional drug delivery agents. Exosomes are bi-layered nanovesicles of 40-100 nm diameter and contain different bioactive molecules including microRNAs, mRNAs, DNA fragments, and proteins. Exosomes are actively released by healthy cells in the extracellular matrix and can be taken up by the surrounding or distant cells. Due to their inherent ability to carry bioactive molecules, exosomes emerged as a versatile drug vehicle and have attracted the attention of many researchers. The most impressive characteristics of exosomes are nanosized, non-immunogenic due to similar composition as body's own cells, high biocompatibility, readily bioavailable, ability to penetrate biological barriers, and encapsulation of various cargo which significantly distinguish them from other conventional nanocarriers. It is important to note that recently exosome-based nanocarriers containing small drug molecules and bioactive macromolecules have been developed for the treatment of several prevalent diseases such as cancer, central nervous system disorders, and other degenerative diseases. Nanocarriers based on exosomes have enormous prospects in overcoming several difficulties faced in gene and drug delivery. This article will briefly highlight the advancement as well as the challenges of exosome-based nanocarriers as drug delivery system. In addition, it will also discuss the future perspectives of exosome-based drug delivery system. Special attention will be placed on the exosomal biogenesis, release mechanisms, and advantages of using exosomes

containing special cargo, as a drug delivery system, in treating obstinate diseases. The aim is to offer new insights for exploring exosomes in the emerging field of drug delivery.

Keywords: *Drug delivery, Exosomes, Pharmacokinetics.*

Exosomes and their biogenesis

Exosomes are small nano-sized (40–100 nm) extracellular vesicles and they correspond to the internal vesicles of multivesicular bodies (MVBs) and are released in the extracellular environment upon fusion of MVBs with the plasma membrane (Sohel 2018). Exosomes were first discovered in the process of eliminating transferrin receptors during reticulocyte (immature red blood cells) maturation and thought to function as cellular waste products, thus received little attention and remained understudied. This “cellular waste” hypothesis was challenged in the '90s, when exosomes were shown to have an immunoregulatory effect, with the demonstration that B cell-derived exosomes could stimulate T cells (Raposo et al. 1996). The results of the subsequent studies provide the basis for the hypothesis that exosomes could play an active role in intercellular communication (Théry 2011). Today, exosomes have been found in all most all type of body fluids (Sohel 2016). Exosomes can be distinguished from other classes of cell-secreted vesicles such as microvesicles (MVs) and apoptotic bodies by several classification features including size, biological content, and most markedly, by biogenesis and mode of release from the cell. Exosomes range in size from 100 nm or less while MVs are typically larger at 100 to 1000 nm in diameter (Théry 2011). The secretion of exosomes can be spontaneous or induced depending on the cell type.

Exosome formation begins with the initiation of the endocytotic pathway as material, such as protein, is engulfed by the cell at its surface. This process may be clathrin-dependent, as is true in the case of the transferrin receptor, or maybe clathrin-independent, as is the case with glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, caveolae, or lipid raft mechanisms (Mayor and Riezman 2004). Once internalized, the endocytotic vesicles are delivered to early endosomes in which the mildly acidic pH (~6.2) causes an uncoupling of housekeeping receptors from their ligands, and then recycled back to the plasma membrane

or transported to late endosomes together with other proteins and lipids (Maxfield and McGraw 2004). In late endosomes, which is spherical in shape and acidic in nature (pH 5.0 to 5.5), two sequential steps have been recognized for sorting of protein during MVBs formation. The first step includes the lateral sorting or selection of proteins at the limiting membrane of endosomal lumen and the second step is the formation of inwardly budding vesicles, commonly known as intraluminal vesicles (ILV), with the concomitant incorporation of selected proteins, lipids, mRNAs and miRNAs. Once MVBs formed they can either fuse with lysosomes for degradation of proteins or direct interaction with the plasma membrane, resulting in the release of the ILVs as exosomes. Since two membrane inversion occurs during the formation of an exosome from a membrane patch on the plasma membrane, it allows exosomes to present trans membrane cargo in the same orientation relative to the cell cytoplasm and with the same membrane protein on the outside as at the plasma membrane (Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008).

Exosomal contents

Exosomes carry a wide variety of bioactive molecules including fragments of DNA, proteins, RNA, and miRNAs. Among the molecules present in the exosomes, miRNAs were studied extensively (Sohel 2016). The primary reason for this perhaps the size of the miRNAs. Due to their tiny size, miRNAs are loaded with ease during the biogenesis of exosomes. On the other hand, molecules like DNA are huge in size and cannot have regulatory functions outside the nucleus. Therefore, DNA fragments transported from one cell to another via exosomes may exert no significant function at all. On the other hand, miRNAs carried by exosomes showed to have regulatory impacts on the expression of genes in recipient cells (Sohel et al. 2013).

Usage of exosomes

The function of exosomes most probably depends on the cells from and conditions under which they are produced, as this provides them with their characteristic composition. When exosomes were first discovered from reticulocytes, they were shown to function as a way to discard proteins, such as the transferrin receptor during the maturation process of reticulocytes into erythrocytes (Johnstone 2006). Reticulocytes lack lysosomes, and it seems

as if exosome release is an alternative to lysosome degradation. Another function of exosomes that was later described is as cell-free messengers, which can be released from one cell and have an effect on another. This communication with other cells may occur either in the microenvironment or over a distance (Février and Raposo 2004). Therefore, the central hypothesis is that since exosomes have been found in blood plasma, they may be transported between organs via the systemic circulation. How this interaction occurs between exosomes and cells is not fully known. However, several mechanisms describing the interactions of exosomes and cells have been hypothesized. Exosomes can bind to cells through receptor-ligand interactions, similar to cell to cell communication, mediating for example antigen presentation (Admyre et al. 2006). There are several functions that exosomes can perform. The glimpse of these potential functions is given below.

Functional delivery of genetic information: A recent breakthrough in exosome biology is that RNA molecules, in particular, miRNAs, are present in these vesicles. To date, studies have demonstrated that miRNAs in exosomes can influence target cell function (Sohel et al. 2013). The transport of nucleic acids inside the exosomes can play an important role in the functioning of a multicellular organism; moreover, the supposed specificity of this process can, on necessity, contribute to the directed transfection of an exogenous material (Mittelbrunn et al. 2011). In early 2008, Hunter et al. identified miRNAs that differentially expressed in circulating plasma microvesicles from diseased and normal subjects, creating the platform for future work for examination of the predictive role of peripheral blood miRNA signatures in human disease, as well as defining the biological processes regulated by particular miRNAs (Hunter et al. 2008). Advances in miRNA array techniques have provided significant advances in miRNA profiling of exosomes. Koh et al. demonstrated that miRNAs are also found in the extracellular environment of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells (hES-MSC). It has been well documented that exosomes contain a substantial amount of small RNAs, but little or no ribosomal RNA compared to the levels observed in the donor cells (Valadi et al. 2007). Moreover, selective packaging of miRNAs into exosomes appears to occur, as the miRNA profiles in exosomes do not reflect the miRNA profiles observed in the parental cells (Valadi et al. 2007; Mittelbrunn et al. 2011).

Transfer of infectious agents: Exosomes have not only been shown to be involved in the metastasis of cancers but have also been implicated in the spread of infectious agents. Prior to the knowledge about exosomes, HIV particles were demonstrated to accumulate in late endosomes of macrophages (Pelchen-Matthews et al. 2003) and the fact that retroviruses and exosomes had biochemical similarities led to the “The Trojan exosome hypothesis”. “The Trojan exosome hypothesis” proposes that retroviruses can hi-jack the exosomal biogenesis pathway for their replication and release, and consequently escape the host’s immune system (Gould et al. 2003). Contentiously, despite the similarities between retroviruses and exosomes, differences between the two have been demonstrated that argue against the “The Trojan exosome hypothesis”. Furthermore, exosomes have been suggested to transfer the infectious prion proteins and β -amyloid peptides between cells (Gould et al. 2003; Février and Raposo 2004).

Cell to cell communication: Exosomes have many different functions, which depend on both their cellular origin as well as the current state of that cell, as it influences the cargo of the released exosomes. However, these functions have primarily been associated with exosomal proteins. The novel finding that exosomes contain RNA (Valadi et al. 2007) has prompted many researchers to address the biological role of exosomal RNA, which further increases the complexity of the understanding of cell-to-cell communication. Valadi et al. did not only demonstrate the presence of RNA in exosomes but also demonstrated that the exosomal RNA could be transferred to recipient cells. This was demonstrated by culturing mouse mast cells with radioactive uridine prior to exosome isolation, thus incorporating radioactive RNA into the exosomes released by these cells. Radioactive RNA could be measured in recipient cells following co-culture with the exosomes, demonstrating RNA transfer from exosome to cell. Since exosomes themselves do not contain the complete machinery to produce proteins, the functionality of the RNA content was shown by using an in vitro translation assay, where mouse mast cell-derived exosomes were used as templates. Subsequently, after adding mouse mast cell-derived exosomes to human mast cells, newly produced mouse proteins could be identified in the human cells. These proteins were shown to be present only as mRNA, not as proteins, in the mouse mast cell-derived exosomes. Thus, this translation demonstrated the functionality of the exosomal mRNA (Valadi et al. 2007). The

fact that exosomal mRNA can travel a long distance to recipient cells, subsequently affect the protein production of recipient cells (Valadi et al. 2007), and that it has been well documented that a single miRNA can interfere with 100-200 mRNA (Hossain et al. 2012), suggests a potential biological role for exosomal miRNA.

Exosomes in the physiological process: Because exosomes are readily released by different cell types, they are likely involved in many physiological processes such as antigen presentation (Théry 2011), tissue repair or transfer of RNAs (Valadi et al. 2007). Later Lai et al. demonstrated that exosomes are the active components of conditioned medium from human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells and the injection of these exosomes into swine and murine models of ischemia/reperfusion injury reduced the infarct size (Lai et al. 2010). Because most of the exosome studies were performed in vitro culture conditions or from different biological fluids, therefore, it is not perfectly assessed if the quantities of exosomes used to see effects in vitro are comparable to physiological amounts of exosomes secreted in vivo. It has also been shown that the expression of certain miRNAs in exosomes deviated based on the physiological changes induced by hormonal treatment (Noferesti et al. 2015).

Exosomes in the pathological process: Exosomes have been associated with the progression of disease conditions including neurodegenerative disease, cardiovascular diseases, and cancer (Théry 2011). It was in 1983 when Tailor revealed for the first time the secretion of tumor-derived microvesicles in ovarian cancer patients. Exosomes from cancer cells can transfer tumor antigens to dendritic cells and present tumor antigens, which induce immune responses (Théry 2011). In contrast, tumor exosomes can also suppress the function of immune cells by inducing apoptosis of activated cytotoxic T cells or promoting differentiation of regulatory T lymphocytes. Other reports suggest that tumor exosomes can promote tumor growth by suppressing antitumor immune responses or by promoting neoangiogenesis or migration to other cells resulting in metastasis (Valadi et al. 2007). A recent study revealed that exosomes/microvesicles secreted from tumor-associated macrophages can transport miRNAs into breast cancer cells promoting the invasiveness of breast cancer cells (Yang et al. 2011).

Potential of using exosomes as drug delivery agents

Compare to other nanocarriers, exosomes are less toxic and the use of exosomes as drug carrier has many advantages including the ability to load specialized cargo, long half-life in the circulation, low immunogenicity, nano size, and the ability to penetrate the impermeable biological membranes. It has already been shown that exosomes are able to deliver a wide variety of cargo including small molecules, miRNAs, mRNAs, siRNAs, DNA, and proteins. Interestingly, exosomes possess enormous therapeutic prospects in treating the less treatable diseases like cancer, central nervous system disorder, and other degenerative diseases. The prospects of using exosomes as an effective drug delivery agent in different diseases are discussed below.

Exosome-based vehicles for tumor cell targeting: Over the last few years, there was a significant advancement in cancer treatment due to the progress in target-based therapies. Various nanocarriers including polymer micelles, solid lipid nanoparticles, and liposomes were extensively studied for target-based treatment in cancer primarily because of their improved solubility for hydrophobic molecules, enhanced existence in the plasma circulation, and low systemic toxicity. However, the major obstacle using nanocarriers for cancer therapy in the clinical setting is the toxicity. It has been shown that all the nanocarriers exert some degree of toxicity (Hossen et al. 2019). Another limitation is that most of the nanocarriers are rapidly cleared by immune cells and less chance to uptake by the cancer cell, hence exert limited anti-cancer effects. Under these circumstances, exosomes could be the best alternative because of two major reasons. First, exosomes are stable in biological fluids and their small size enables exosomes to escape from lung clearance, pass through biological barriers and penetrate deep in solid tumor tissue. Second, exosomes can be loaded with various tumor therapeutic cargoes including anti-cancer drugs and cancer gene suppressors in order to kill cancer cells in a more efficient manner (Zhang et al. 2019).

Exosomes as chemotherapeutic drugs vehicles: Chemotherapeutic drugs including curcumin, celastrol, paclitaxel (PTX), and doxorubicin (DOX) have been reported to be

encapsulated into exosomes. Research has shown that specific drug-loaded exosomes are able to improve the efficiency of chemotherapy (Smyth et al. 2014; Tian et al. 2014). Due to specific receptor-legand interaction with the recipient cell, exosomes have 10 fold higher ability to target cancer cells compare to the liposomes of equivalent size (Smyth et al. 2014). Curcumin has shown promising anticancer effects in vitro, but poor solubility has limited its clinical application. After encapsulated into exosomes, curcumin showed enhanced bioavailability and thus improved antitumor efficiency. A Phase I study is ongoing to test the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin-loaded exosomes (NCT01294072) (Tian et al. 2014).

Exosomes loading protein for cancer therapy: In addition to chemotherapeutic drugs, exosomes are reported to delivering functional proteins to target cancer cells. The bioactivity and the stability in the circulation is the major problem of protein treatment which can be ameliorated by using exosomes as a delivery agent. Once the protein molecules are encapsulated in exosomes, the protein/peptide-based drugs exhibited elevated pharmacokinetic properties including penetrating target tissue and increased the bioavailability (Sterzenbach et al. 2017). In addition to protecting encapsulated proteins in their hydrophilic region, exosome is also found to have the ability to deliver membrane proteins for the treatment of cancer (Koh et al. 2017).

Exosomes as a carrier for gene therapy: Gene therapy, including a variety of small RNA and plasmid DNA (pDNA), is a promising and attractive strategy for the treatment of cancer. However, these molecules are highly susceptible to endogenous nuclease activity. The conventional nanocarriers used in gene therapy are far from clinical expectations due to their transfection efficiency, stability, and overall safety. However, use of exosomes can eliminate these disadvantages of conventional nanocarriers. For instance, it has been reported that the siRNAs loaded into exosome-based vectors can silence the polo-like kinase 1 gene more efficiently in bladder cancer cells in vitro (Greco et al. 2016).

Conclusion

Finally, it is clear that exosomes are comparatively non-toxic and more efficient compared to the conventional nanocarriers for drug delivery. Exosome-based nanocarriers have shown significant potential delivering miRNA, siRNA, DNA, proteins, and oligonucleotides as drug delivery agents in experimental settings. However, this new nanocarrier should walk long way to become a trusted nanocarrier in the clinical settings.

References

1. Admyre C, Johansson SM, Paulie S, Gabrielsson S (2006) Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol* 36:1772–1781. doi: 10.1002/eji.200535615
2. Février B, Raposo G (2004) Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:415–421
3. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JEK (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:10592–10597
4. Greco KA, Franzen CA, Foreman KE, et al (2016) PLK-1 Silencing in Bladder Cancer by siRNA Delivered with Exosomes. *Urology* 91:241.e1-241.e7. doi: 10.1016/j.urology.2016.01.028
5. Hossain MM, Sohail MMH, Schellander K, Tesfaye D (2012) Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res.* doi: 10.1007/s00441-012-1469-6
6. Hossen S, Hossain MK, Basher MK, et al (2019) Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *J. Adv. Res.* 15:1–18
7. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3:e3694. doi: 10.1371/journal.pone.0003694
8. Johnstone RM (2006) Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells Mol Dis* 36:315–21. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.12.001
9. Koh E, Lee EJ, Nam GH, et al (2017) Exosome-SIRP α , a CD47 blockade increases cancer cell phagocytosis. *Biomaterials* 121:121–129. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.004
10. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al (2010) Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 4:214–222. doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003
11. Lakkaraju A, Rodriguez-Boulton E (2008) Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* 18:199–209
12. Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:121–132
13. Mayor S, Riezman H (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:110–120
14. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltrí C, et al (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2:. doi: 10.1038/ncomms1285
15. Noferesti SS, Sohail MMH, Hoelker M, et al (2015) Controlled ovarian hyperstimulation induced changes in the expression of circulatory miRNA in bovine follicular fluid and blood plasma. *J Ovarian Res.* doi: 10.1186/s13048-015-0208-5

16. Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M (2003) Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162:443–455. doi: 10.1083/jcb.200304008
17. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161–1172. doi: 10.1084/jem.183.3.1161
18. Smyth TJ, Redzic JS, Graner MW, Anchordoquy TJ (2014) Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells in vitro. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1838:2954–2965. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.07.026
19. Sohel MMH (2018) Choice of samples in extracellular microRNA research: Which fraction is better- exosomal or nonexosomal? *J Adv Biotechnol Exp Ther* 1:11–16. doi: 10.5455/jabet.d3
20. Sohel MMH (2016) Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achiev Life Sci* 10:175–186. doi: 10.1016/j.als.2016.11.007
21. Sohel MMH, Hoelker M, Noferesti SS, et al (2013) Exosomal and non-exosomal transport of extracellular microRNAs in follicular fluid: Implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS One* 8:. doi: 10.1371/journal.pone.0078505
22. Sterzenbach U, Putz U, Low LH, et al (2017) Engineered Exosomes as Vehicles for Biologically Active Proteins. *Mol Ther* 25:1269–1278. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.030
23. Théry C (2011) Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* 3
24. Tian Y, Li S, Song J, et al (2014) A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 35:2383–2390. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.083
25. Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654–9. doi: 10.1038/ncb1596
26. Yang M, Chen J, Su F, et al (2011) Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer* 10:. doi: 10.1186/1476-4598-10-117
27. Zhang M, Zang X, Wang M, et al (2019) Exosome-based nanocarriers as bio-inspired and versatile vehicles for drug delivery: recent advances and challenges. *J. Mater. Chem. B* 7:2421–2433

Monensinin Cıvciv Karaciğer Doku Kültürü Hücrelerinde Hepatotoksik Etkileri

Muhammet Yasin TEKELİ¹ Murat KANBUR¹

¹Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Kayseri, Türkiye

Özet: Bu çalışma ile monensinin perfüze cıvciv karaciğer dokusundan izole edilen hepatositlerde olası sitotoksik etkileri ile etki mekanizmalarının araştırılması amaçlandı. Çalışmada perfüze cıvciv karaciğerinden izole edilen hepatosit hücreleri farklı dozlarda monensinle muamele edilerek her birine ait canlılık analizleri ile toksik ve toksik olmayan dozlar belirlendi. İzole karaciğer hepatositlerinde western blot tekniği ile p53, kaspaz 3, kaspaz 9 ve beta aktin proteinleri; PCR tekniği ile BCL-XL, BCL-2, survivin ve beta aktin gen ekspresyonları araştırılarak olası sitotoksik etkisi değerlendirildi. Çalışmanın sonunda primer tavuk hepatositlerinde monensinin artan zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı; toksik konsantrasyonda (10 µmol/ml) apoptotik kaspaz-3, kaspaz-9 ve p53'ün proteinlerinin ifadenmelerini artırırken anti apoptotik BCL-2, BCL-XL ve survivin'in mRNA düzeyinde ifadenmelerini azalttığı görüldü. Sonuç olarak monensinin primer hepatositlerde apoptozu indükleyerek sitotoksositeye neden olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Cıvciv, Hepatoksiste, Monensin.

Hepatotoxic Effects of Monensin on Chick Liver Tissue Culture Cells

Abstract: In this study, it was aimed to investigate the possible hepatotoxic effects and mode of action of monensin on hepatocytes isolated from chicks perfused liver tissues. In the study hepatocyte cells isolated from the chick liver were treated with monensin at different doses, toxic and non-toxic doses were determined by the cell viability analyzes. In isolated liver hepatocytes and liver tissues; p53, caspase 3, caspase 9 and beta actin proteins were evaluated with western blot technique while BCL-XL, BCL-2, survivin and beta actin gene expressions were evaluated with PCR techniques. Also possible cytotoxic effects were evaluated with western blot and PCR technique. In the end of the study, monensin in primary chicken hepatocytes decreased cell viability due to increased time and dose; at 10 μ M concentration of monensin increased expression of apoptotic proteins caspase-3, caspase-9 and p53 while reducing the expressions of mRNA level of anti-apoptotic BCL-2, BCL-XL and survivin. Consequently, monensin was determined to cause cytotoxicity by inducing apoptosis in primary hepatocytes.

Key words: Chick, Hepatotoxicity, Monensin.

GİRİŞ

Monensin (MON), *Streptomyces cinnamonensis* mantarları tarafından üretilen monovalent karboksilik iyonofor polimer antibiyotiktir (Butaye et al., 2003). Moleküler formülü $C_{36}H_{62}O_{11}$ olan (Chapman et al., 2010) MON, sodyum iyonuna (Na^+) karşı olan eğilimi diğer iyonlara kıyasla oldukça fazla olduğu için bir sodyum iyonoforu olarak kabul edilir (Meral, 1996). MON, besi sığırlarda yemden yararlanmayı artırmak ve koksidiyozun kontrolü; laktasyondaki süt sığırlarında vücut kayıplarını en aza indirmek, süt proteinini arttırmak ve süt yağı azaltmak; bıldırcın, tavuk, hindi ve keçi de ise koksidiyozun kontrolü için yemlere katılmaktadır (Dowling, 2013).

MON, tedavi dozlarında kullanıldığında güvenli bir ilaç olarak kabul edilmesine rağmen, özellikle doz aşımı halinde zehirleyici etki göstermektedir. Metal iyonlarına yönelik etkileri hayvanlarda zehirli/zararlı etkilerinin temelini oluşturur (Kaya, 2013). MON, konakta ve

parazitte hücre içine Na^+ iyonu girişini kolaylaştırır. Hücre içi Na^+ iyon konsantrasyonunun yükselmesi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ değiş-tokuşunu uyararak hücre dışı Ca^{++} iyonlarının hücre içi konsantrasyonunun artmasına neden olur (Kant et al., 2013). Na^+ ve Ca^{++} iyonlarının aşırı yükselmesi, hücre içinde pH değişimine, kalsiyum aşırı yüklenmesine, kateşolamin salınımına ve lipid peroksidasyonuna yol açarak sitotoksositeye neden olur (Novilla, 2012).

Daha önce yapılan *in vitro* çalışmalar farklı tipteki kanser hücreleriyle sınırlı olup MON'un primer hepatositler üzerindeki etkilerine yönelik bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmayla özellikle kümes hayvanları sektöründe yaygın bir şekilde kullanılan MON'un civciv hepatositlerindeki olası sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Method

Civciv Hepatosit İzolasyonu ve Primer Kültürü: Civciv hepatosit izolasyonunda ilk olarak Berry ve Friend (1969) tarafından geliştirilen daha sonra Seglen (1976) tarafından modifiye edilen iki aşamalı kollejenaz perfüzyon tekniği kullanılmıştır. Perfüzyon işlemi tamamlandıktan sonra steril bir şekilde çıkarılan karaciğerden laminar akımlı kabinde (SafeFast Elite) hepatosit izole edildi. Elde edilen hepatositlerden Codex-XS (Innovatis) cihazında hücre sayımı yapıldı. MON'un toksik ve toksik olmayan konsantrasyonunu belirlemek için 96'lık kültür plağına kuyucuk başı 2×10^4 , protein ve RNA izolasyonu için ise 6 kuyulu kültür plağına kuyucuk başı 2×10^6 hepatosit hücresi DMEM (Sigma) besiyerinde % 5 CO_2 ve % 95 nem bulunan 37°C 'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

MTS Sitotoksiste Testi: MON'un sitotoksik etkisinin belirlenmesinde MTS testi kullanıldı. 0-40 μM konsantrasyonlarda monensin sodyum (Sigma, M5273) ile muamele edilen hepatositlere MTS çözeltisi eklenerek % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren 37°C 'lik etüvde 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda oluşan formazon bileşiğinin optik dansitesi 490 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda (BioTek Synergy H1) ölçüldü. Maddelerin eklenmediği kuyucukların (kontrol grubu) optik dansitelerinin ortalaması alındıktan sonra elde edilen değerde canlılık % 100 kabul edildi. Diğer gruplarda canlılık yarı-kantitatif olarak analiz edildi. Tüm konsantrasyonlardaki canlılık oranları dikkate alınarak toksik (10 μM) ve toksik olmayan (1 μM) konsantrasyonlar belirlendi.

Gen ekspresyon analizi: 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda MON ile muamele edilen hepatositlerden RNA izolasyonu için RNAzol, CDNA sentezi için EvoScript Universal cDNA Master (Roche 7912374001), kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi için LightCycler® 480 Probes Master Kit (Roche 04707494001) kullanıldı. Anti apoptotik genler Bcl-2, Bcl-xl ve survivin ifadenmeleri qRT-PCR ile Roche Nano Lightcycler cihazında belirlendi. Ölçülen CT değerleri kaydedilerek $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar beta aktin ile normalize edildi. Genler tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Gen tablosu.

Gen	Sağ Primer	Sol Primer	Prob Katalog No
Beta Aktin	acgagcgcagcaatatcat	gctctgactgaccgcgta	04688996001
BCL-2	actatctcgcggtgtcgtag	cttccctcggaaccat	04685059001
BCL-XL	gagctgcgtggtggtatgt	aagtgaccccatggtgtgt	04688066001
Survivin	ggtggagacgaggttagacca	aaaatggcgcctatgct	04688040001

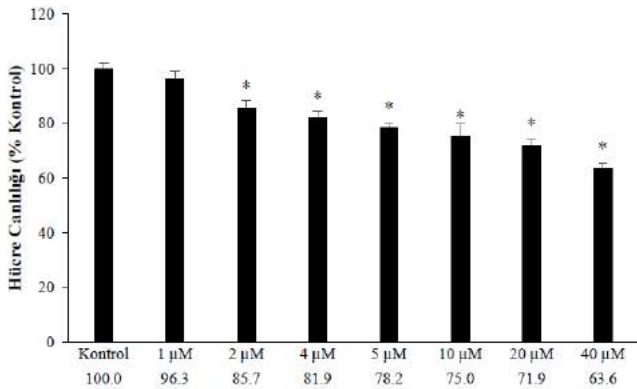
Western Blot Analizi: Western blot analizi Towbin ve ark’nın (1979) geliştirdiği metoda göre yapıldı. 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda MON ile muamele edilen hepatositlerden protein izolasyonu için RIPA buffer (Thermo) kullanılırken miktar tayini için Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo) kullanıldı. Toplam 40 µg protein içeren numuneler % 5-10’luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) işlemine tabi tutulduktan sonra, poliviniliden diflorür (PVDF) membrana (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) transfer edildi. Membranlar % 5’lik süt tozu içinde bloklama yapıldıktan sonra anti p53 (1:1000; Abcam), anti-kaspaz-3 (1:1000; Abcam), anti-kaspaz-9 (1:1000; Abcam) ve anti-beta aktin (1:500; Cell Signaling) primer antikorları +4 °C’de gece boyu çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranlar anti rabbit (1:5000; Cell Signaling) sekonder antikor ile karanlıkta 2 saat boyunca inkübe edildikten sonra bantlar kemilüminesans görüntüleme reaktifi (Thermo, 34080) kullanılarak Bio-Rad ChemiDoc cihazında görselleştirildi. Her bandın yoğunluğunu ImageJ programında densitometrik olarak ölçüldükten sonra β-aktin ile normalize edilerek kontrole ve MON’a göre değişimleri hesaplandı.

İstatistiksel Analiz: Çalışmamızda kullanılan tüm analizlerden elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS Statistics 21 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Hücre canlılık analizinin sonuçları tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile test edilirken gruplar

arasındaki farklılığın tespit edilmesinde Tamhane testi kullanıldı. Western Blot ve qRT-PCR deneylerinin verileri tek örneklem t testi (One Simple T Test) kullanılarak analiz edilirken sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde belirtildi. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi $p<0,05$ kabul edildi.

Bulgular

1. Monensinin Tavuk Primer Hepatosit Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi



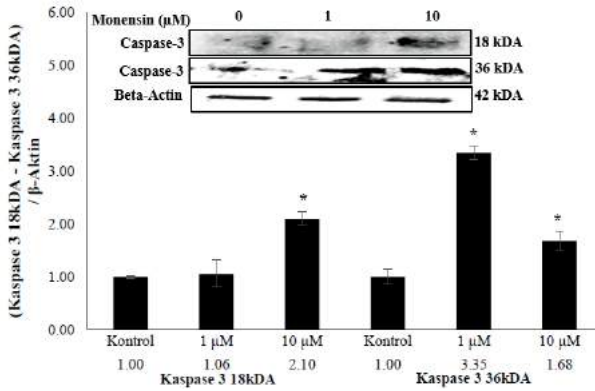
Şekil 1. Monensinin kontrole göre tavuk primer hepatositlerindeki sitotoksik etkisi (* $p<0,05$).

Kontrol grubu ile kıyaslandığında 2 $\mu\text{mol/l}$ (μM) ve üzeri konsantrasyonlarda MON'un hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı; bununla birlikte 1 μM MON uygulamasının hücre canlılığını azaltmasına rağmen bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı belirlenmiştir (Şekil 1).

2. Monensinin Tavuk Primer Hepatositlerde Apoptotik Proteinler Üzerine Etkisi

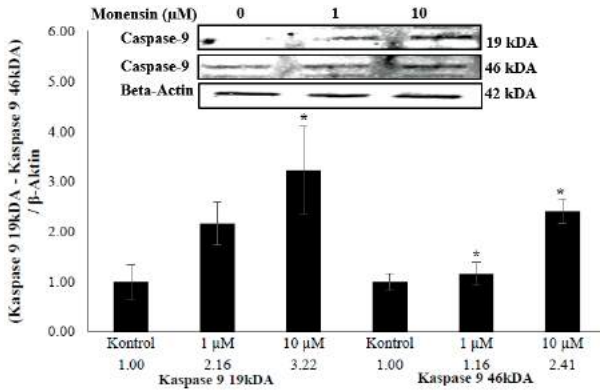
2.1. Monensin' in Kaspaz 3 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi

Kontrol grubu ile kıyaslandığında kaspaz 3 (18 kDA)'ün protein ifadenme düzeyi 1 μM konsantrasyonda MON uygulanan hücrelerde istatistiksel olarak önemli bir artış (1.06 kat) görülmezken 10 μM konsantrasyondaki artış (2.1 kat) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 2). Kaspaz 3 (36 kDA)'ün protein ifadenme düzeyinde kontrol grubuna kıyasla hem 1 μM (3,35 kat) hem de 10 μM (1,68) konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Monensin uygulanan primer tavuk hepatosit hücrelerinde kontrol grubuna göre kaspaz 3 (18 kDa) ve kaspaz 3 (36 kDa) protein ifadenme düzeyleri ile western blot görüntüsü (*p<0,05).

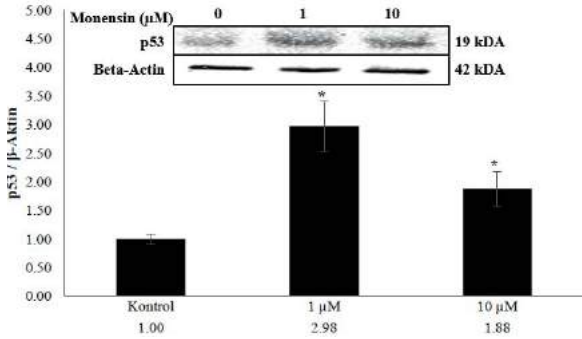
2.2. Monensin' in Kaspaz 9 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi



Şekil 3. Monensin uygulanan primer tavuk hepatosit hücrelerinde kontrol grubuna göre kaspaz 9 (19 kDa) ve kaspaz 9 (46 kDa) protein ifadenme düzeyleri ile western blot görüntüsü (*p<0,05).

Kontrol grubu ile kıyaslandığında kaspaz 9 (19 kDa)'un protein ifadenme düzeyinin 1 μM (2.16 kat) ve 10 μM (3.22 kat) konsantrasyonda MON uygulanan hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). kaspaz 9 (46 kDa)'un protein ifadenme düzeyinin 1 μM konsantrasyonda MON uygulanan hücrelerde istatistiksel olarak önemli bir artış (1.16 kat) tespit edilemezken 10 μM konsantrasyonda ise istatistiksel olarak önemli bir artış (2.41 kat) görülmüştür (Şekil 3).

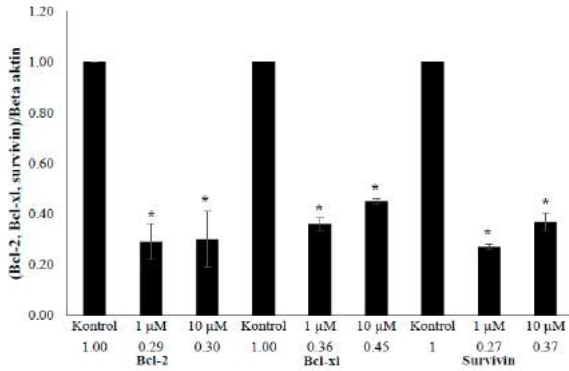
2.3. Monensin' in p53 protein ifadenleme düzeyi üzerine etkisi



Şekil 4. Monensin uygulanan primer tavuk hepatosit hücrelerinde kontrole göre p53 (43 kDA) protein ifadenleme düzeyleri (* $p<0,05$).

Kontrol grubu ile kıyaslandığında 1 μ M (2.98 kat) ve 10 μ M (1.88) konsantrasyonda MON uygulanan hücrelerde p53 (43 kDA)'ün protein ifadenleme düzeyinin katına çıktığı görülmüş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4).

3. Monensinin Tavuk Primer Hepatositlerde Anti Apoptotik Genler Üzerine Etkisi



Şekil 5. Monensin uygulanan primer tavuk hepatosit hücrelerinde kontrole göre BCL-2, BCL-XL ve survivin'in mRNA ifadenleme düzeyleri (* $p<0,05$).

3.1. Monensin'in BCL-2 mRNA ifadenleme düzeyi üzerine etkisi

Kontrol grubu ile kıyaslandığında BCL-2'nin mRNA düzeyinde ifadenlenmesinin 1 μ M (0,29 kat) ve 10 μ M (0,30 kat) konsantrasyonda MON uygulanan hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görülmüştür (Şekil 5).

3.2. Monensin'in BCL-XL mRNA ifadenleme düzeyi üzerine etkisi

Kontrol grubu ile kıyaslandığında BCL-XL'nin mRNA düzeyinde ifadenmesinin 1 μ M (0.36 kat) ve 10 μ M (0.45 kat) konsantrasyonda MON uygulanan hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5).

3.3. Monensin'in Survivin mRNA ifadenleme düzeyi üzerine etkisi

Survivin'in mRNA ifadenleme düzeyindeki azalışların kontrol grubu ile kıyaslandığında 1 μ M (0.27 kat) ve 10 Mm (0.37 kat) konsantrasyonda monensin uygulanan hücrelerde istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenmiştir (Şekil 5).

Tartışma

İyonofor antikoksidyal olan MON kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde önemli bir problem olan koksidiyozdan korunma ve sağaltım amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Dowling, 2013). Tedavi dozlarında kullanıldığında güvenli bir ilaç olarak kabul edilmesine rağmen, özellikle doz aşımı halinde zehirleyici etki göstermektedir (Kaya, 2013). Konakta ve parazitte Na^+ iyonunun taşınmasını kolaylaştıran MON hücre içi Na^+ iyon konsantrasyonunu yükselterek substrat oksidasyonu ve ATP hidrolizi gibi bazı mitokondriyal fonksiyonları inhibe eder. Bunun yanında MON hücrede $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ değiş-tokuşunu uyararak hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu artışına ve bunun sonucu olarak sitotoksositeye yol açar (Kant et al., 2013). MON için başlıca hedef organların kalp ve iskelet kasları olduğu (Novilla, 2012) bildirilmekle beraber ilacın karaciğer üzerine toksik etkilerin kanıtlar nitelikte çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda MON'un doz artışına bağlı olarak karaciğerin ağırlığını azalttığı, biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklere sebep olduğu ortaya konmuştur (Horovitz et al., 1988; Yarsan, 1998; Wagner et al., 1983; Silva et al., 2016). Bu çalışmada MON ile ilgili kısıtlı bilgilerden hareketle MON'un civcivlerden elde edilen primer hepatosit hücreleri üzerine olası sitotoksik etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi amaçlandı.

MON'un primer hepatositler üzerinde etkilerine yönelik herhangi bir araştırma bulunmamakla birlikte, farklı tipteki kanser hücrelerinde MON'un proliferasyon ve hücre ölümü üzerine etkilerinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur. Yapılan bu çalışmalarda MON'un

konsantrasyon artışına ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Ergin et al., 2011; Park et al., 2002a; Park et al., 2002b; Park et al., 2003a; Park et al., 2003b; Park et al., 2003c). Bizim çalışmamızda da MON'un hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak azalttığını göstermektedir (Şekil 1).

1 μ M konsantrasyonda MON uygulanan hepatositlerde pro-kaspaz 3 (36 kDA), aktif kaspaz 9 (19 kDA) ve p53 (43 kDA)'ün protein ifadenmesindeki artışlar (Şekil 2, 3, 4) ile BCL-2, BCL-XL ve survivin'in mRNA ifadenme düzeylerindeki azalışlar (Şekil 5, 6, 7) anlamlı bulunmuştur. 10 μ M konsantrasyonda MON uygulamasında ise hem pro- hem de aktif kaspaz 3 ve 9 ile p53'ün protein ifadenmelerindeki artışlar (Şekil 2, 3, 4) ile BCL-2, BCL-XL ve survivin'in mRNA ifadenme düzeylerindeki azalışlar (Şekil 5, 6, 7) anlam ifade etmektedir. Bu sonuçlara göre MON'un her iki konsantrasyonda hepatositlerde apoptozu uyardığı gözlemlenmiştir. Apoptozun mekanizması çeşitli olabilmekle beraber elde ettiğimiz veriler apoptozun mitokondriyal yolak üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. p53'ün düşük oksidatif strese antioksidan aktivite gösterirken yüksek düzeyde oksidatif strese pro-oksidatif aktivite sergileyerek hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir (Liu and Xu, 2011). Ayrıca MON'a maruziyetin hücre içi kalsiyum seviyelerini arttırarak lipid peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (Mollenhauer et al., 1990). Çalışmamızda da hepatositlerde p53 düzeyinde meydana gelen artışın monensin tarafından uyarılan oksidatif stresle ilişkili olduğu düşünülmektedir. BCL-2 ve BCL-XL'nin pro-apoptotik proteinler bağlanarak onların mitokondriyal membranda bütünlüğünü bozucu etkilerine, sitokrom c salınmasına ve böylece apoptozu engel olduğu bildirilmektedir (Kowaltowski and Fiskum, 2005). Çalışmamızda p53 ekspresyon düzeyindeki yükselmenin, anti-apoptotik BCL-2, BCL-XL ve survivini baskılayarak pro-apoptotik proteinlerin serbestleşmesine, dolayısıyla mitokondriyal membranın geçirgenliğinin artmasına neden olduğu tahmin edilmektedir. Mitokondriyal membranın dayanıklılığının azalmasına bağlı olarak sitokrom c sitoplazmaya geçer. Sitoplazmada sitokrom c, apaf-1 ve pro-kaspaz 9'dan oluşan ve kaspaz 9'un aktivasyonu ile sonuçlanan bir apoptozom oluşturur. Kaspaz 9 ise apoptoz sürecini yürütmek için pro-kaspaz-3 de dahil olmak üzere efektör pro-kaspazları aktive eder. Ayrıca kaspaz inhibitörü olan survivin düzeyindeki azalmanın da kaspaz-3 ve -9 üzerindeki baskıyı kaldırarak bunların düzeylerini artırabilir (Elmore, 2007; Cohen, 1997). Bu durum çalışmamızdaki BCL-2 ve BCL-

XL ifadelenmesinin azalmasının bir sonucu olarak kaspaz 3 ve kaspaz 9'un uyarılmış olabileceğini; yine p53 seviyesinde görülen yükselmenin survivin miktarını düşürüp kaspazlar üzerindeki baskıyı kaldırarak kaspaz-3 ve -9 düzeylerini artırmış olabileceğini düşündürmektedir.

Her ne kadar tavuk hepatositlerinde MON ile ilgili olarak daha önce yapılan çalışma bulunmasa da kanser hücre hatlarına yönelik etkilerinin incelendiği araştırmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda farklı kanser hücrelerinde MON hücrelerde anti-apoptotik BCL-2 proteininin seviyesini azaltırken (Park et al., 2003a; Park et al., 2003b; Park et al., 2003c) apoptotik kaspaz-3 (Park et al., 2002b; Park et al., 2003a; Park et al., 2003b; Park et al., 2003c) ve kaspaz-9 (Park et al., 2003c) proteininin seviyelerinin ise arttırmıştır. Bizim çalışmamızdan elde edilen bulgularda bu çalışmalara benzerlik göstermektedir.

Sonuç

Çalışmanın in vitro sonuçlarına göre deneme gruplarında p53, kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteinlerinin ifadelenme düzeylerindeki artışlar ile BCL-2, BCL-XL ile survivin'in mRNA ifadelenme düzeylerindeki azalışların primer hepatositlerde toksik konsantrasyonda MON ile indüklenen apoptozda kritik bir adım olabileceği düşüncesini desteklemektedir. MON ile ilgili bugüne kadar yapılan in vitro çalışmalar kanser hücreleri ile sınırlı olup bu çalışmalardan elde edilen bulgular çalışmamızı destekler niteliktedir. Ayrıca elde edilen bu veriler MON'un civcivlerde apoptoz üzerine etkisi ile ilgili yapılan ilk çalışma niteliğinde olup literatüre katkı sağlaması açısından önemli bulunmuştur. Çalışmamızda her ne kadar MON'un hepatositlerde sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiş, bu etkilerin oluşan apoptoz ile ilişkili olduğu ortaya konulmuş ve belirtilen etkilerin serbest radikal kaynaklı olabileceği düşünülmüş olsa bile, son derece karmaşık ve pek çok faktörün etkisiyle şekillenen sitotoksik etki mekanizmalarının daha detaylı çalışmalarla ortaya konmasının yararlı olacağına inanılmaktadır.

Kaynaklar

1. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. J Cell Biol 1969; 43: 506–520.
2. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. Clin Microbiol Rev 2003; 16(2): 175-88.

3. Chapman HD, Jeffers TK, Williams RB. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poult Sci* 2010; 89(9): 1788-801.
4. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 1): 1-16.
5. Dowling PM. Miscellaneous Antimicrobials: Ionophores, Nitrofurans, Nitroimidazoles, Rifamycins, and Others. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM (eds), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5 th ed. Wiley-Blackwell, New Jersey, 2013: p 315-332.
6. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.
7. Ergin V, Doğan İ, Cumaoğlu A, Yar AS, Arıcıoğlu A, Ekmekçi A, Menevşe S, Menevşe A. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Doksorubisin ve Monensinin Hücre Çoğalması ve Sağ Kalım ile İlişkili Gen İfadeleme Düzeyleri Üzerine Etkisi. *J Exp Clin Med* 2011; 28: 59-63.
8. Horovitz CT, Avidar Y, Bogin E, Shlosberg A, Shkap I, Weisman Y, Egyed MN. Enzyme profile in blood and tissues of chickens fed various levels of monensin. *Journal of Veterinary Medicine* 1988; 35: 473-480.
9. Kant V, Singh P, Verma PK, Bais I, Parmar MS, Gopal A, Gupta V. Anticoccidial Drugs Used in the Poultry: An Overview. *Sci Int (Lahore)* 2013; 1: 261-265.
10. Kaya S. Protozoonları Etkileyen İlaçlar. In: Kaya S (eds), *Veteriner Farmakoloji Cilt:1*. 5. Baskı. Medisan, Ankara, 2013; sy 527-53.
11. Kowaltowski AJ, Fiskum G. Redox mechanisms of cytoprotection by Bcl-2. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(3-4): 508-14.
12. Liu D, Xu Y. p53, oxidative stress, and aging. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(6): 1669-78.
13. Meral I. Monensin Etkisinin Hücresel Mekanizması. *YYO Vet Fak Derg* 1996; 7(1-2): 102-105.
14. Mollenhauer HH, Morre DJ, Rowe LD. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1031: 225-46.
15. Novilla MN. Ionophores. In: Gupta RC (eds), *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles*. 2 nd ed. Elsevier, San Diego, USA, 2012: p 1281-1299.
16. Park WH, Jung CW, Park JO, Kim K, Kim WS, Im YH, Lee MH, Kang WK, Park K. Monensin inhibits the growth of renal cell carcinoma cells via cell cycle arrest or apoptosis. *Int J Oncol* 2003c; 22(4): 855-60.
17. Park WH, Kim ES, Jung CW, Kim BK, Lee YY. Monensin-mediated growth inhibition of SNU-C1 colon cancer cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Oncol* 2003b; 22(2): 377-82.
18. Park WH, Kim ES, Kim BK, Lee YY. Monensin-mediated growth inhibition in NCI-H929 myeloma cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Oncol* 2003a; 23(1): 197-204.
19. Park WH, Lee MS, Park K, Kim ES, Kim BK, Lee YY. Monensin-mediated growth inhibition in acute myelogenous leukemia cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Cancer* 2002b; 101(3): 235-42.
20. Park WH, Seol JG, Kim ES, Kang WK, Im YH, Jung CW, Kim BK, Lee YY. Monensin-mediated growth inhibition in human lymphoma cells through cell cycle arrest and apoptosis. *Br J Haematol* 2002a; 119(2): 400-7.
21. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13: 29-83.
22. Silva LF, Barbosa EFG, Novaes EPF, Borges JRJ, Lima EMM, Castro MB. Clinical and Pathological Changes in Sheep During a Monensin Toxicity Outbreak in Brasília, Brazil. *Asian J Anim Vet Adv* 2016; 11: 73-78.

23. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(9): 4350-4.
24. Wagner DD, Furrow RD, Bradley BD. Subchronic toxicity of monensin in broiler chickens. *Vet Pathol* 1983; 20(3): 353-9.
25. Yarsan E. Monensin ile Vitamin E ve Selenyumun Birlikte veya Ayrı Ayrı Verilmesinin Etlik Piliçlerde Enzim Etkinlikleri ve Histopatolojik Parametrelere Etkileri. *Turk J Vet Anim Sci.* 1998; (22): 53-63.

Köpek Mastositom Hücre Serisinde c-KIT Geninin siRNA Aracılı Susturulması*

M. Yenal AKKURT¹ Recep UYAR² Nüket BİLGİN¹ Begüm YURDAKÖK-DİKMEN² Bengi ÇINAR KUL¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı, Altındağ/Ankara

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Altındağ/Ankara

Özet: Köpekler, insanlar ile arasındaki yüksek genetik ve çevresel homolojiden dolayı tümöral olgulardaki ilaç keşfi ve geliştirme çalışmalarında kullanılan en yaygın model organizma konumundadır. MHT, köpekte görülen tüm tümör tiplerinin %6'sını oluşturmakla beraber, deri kanserlerinde de %13-21 aracılığıyla insidansa sahiptir. İnsanda gözlenen gastrointestinal tümörlerden birçoğunun kökeni, köpek MHT olgularının ortaya çıkmasına neden olan *c-Kit* geni mutasyonlarına dayanmaktadır. MHT'nin etiolojisinde en iyi tanımlanmış olan mekanizma, proto-onkogen olan tirozin protein kinaz - Kit ya da CD117 (*c-KIT*) geni tarafından kodlanan Mast/kök hücre büyüme faktörü reseptörü (Mast/stem cell growth factor receptor, SCFR) üzerinden olmaktadır. Köpek MHT olgularında en sık gözlenen ve *c-KIT* geninin 11. ekzonunda belirlenmiş 48 baz çiftlik dublikasyonun, tümör malignitesi ile ilişkisi kesin olarak belirlenmiştir. Mevcut literatür göz önünde bulundurulduğunda MHT tedavisinde farklı c-KIT reseptör inhibitörlerine (imatinib, masitinib, toceranib) karşı gelişen direnç mekanizmaları ile tümör gelişimi devam etmektedir. Bu nedenle, MHT'nin tedavisine yönelik yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Sunulan çalışmada Mastositom C2 hücre hattında siRNA ile ligand bağımsız faal olan mutant genin susturulması ve masitinib ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Mastinib etken maddesinin IC50 dozunun belirlenmesi için yapılan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) testlerinde taranan literatürden farklı olarak (100nM) IC50 dozu 56nM olarak belirlenmiştir. Ardından, mutant *c-KIT* geninin ifadesinin ölçülmesi ile transfeksiyonun başarısı test edilmiştir. Mastositom C2 hücre hattında, *c-Kit* geni ifadesinin lipofektamin aracılı transfeksiyon sonrası düştüğü belirlenmiştir. Bu çalışma, henüz sadece bir siRNA denemesi üzerine elde edilen ön verileri içermektedir. Bununla birlikte, ilerleyen çalışmalarda, gen susturma etkinliği tarafımızdan yapılan ve aynı mRNA'yı hedefleyen ilave siRNA'lar ile beraber değerlendirilecektir.

Anahtar Kelimeler: *c-kit* geni, Gen susturma, Köpek, Mastositom, siRNA, Tümör.

*Sunulan çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (Proje no: 16L0239016) desteklenmiştir.

Silencing of The C-KIT Gene Through Sirna in Canine Mastocytoma Cell Line*

Abstract: Dogs are the most common model organisms used in drug discovery and development studies in tumor cases due to their high genetic and environmental homology with humans. The incidence of MCT is %6 in all tumor types in dogs, while the incidence of MCT is %13-21 in skin cancers. The majority of human gastrointestinal tumors originate from mutations in the c-Kit gene, leading to the emergence of canine MHT cases. The best-described mechanism in the etiology of MCT is via the Mast/stem cell growth factor receptor (SCFR) encoded by the proto-oncogene tyrosine-protein kinase - Kit or CD117 (c-KIT) gene. Mutations in this gene have been reported to cause mast cell tumors. The relationship between 48 base duplication identified in 11th exon of the c-KIT gene, which is most commonly observed in MCT cases, and tumor malignancy has been precisely determined. In the treatment of MCT, different c-KIT inhibitors (imatinib, masitinib, toceranib) are used. However, the side and/or adverse effects of these ingredients and developed drug resistance cause the progression of tumors. Therefore, the new treatment methods need to be developed. The aim of the study was to silence the ligand-independent active mutant gene by treating siRNA and to compare with masitinib in Mastocytom C2 cell line. This application was performed in 24-well plates for 4 different experimental groups. Contrary to the literature, IC50 dose (100nm) was determined as 56nM in MTT (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) tests performed to determine the IC50 dose of Masitinib active substance. In mastocytoma C2 cell line, expression of the c-Kit gene was found decreased after lipofectamine-mediated siRNA transfection. This study includes preliminary data obtained only after one siRNA targeting the mutant c-KIT gene. However, in further studies, the efficiency of gene silencing will be evaluated by targeting the same mRNA via additionally siRNAs designed by us.

*This study has been supported by Ankara University, Scientific Research Projects Coordination Unit (Project Number: 16L0239016).

Giriş

Mast hücreleri (mastositler); mezodermden köken alan ve bağ doku içerisinde yerleşen hücrelerdir. Kemik iliğinden vücuda yayılan mast hücre öncülleri, periferde olgunlaşarak mastositleri meydana getirmektedir (Jamur ve Oliver, 2011). Olgun mast hücrelerinin sitoplazmaları irili ufaklı granüllerle doludur (Sağlam ve ark., 2008). Bu granüller mast hücresinin bulunduğu bölgeye göre birbirinden farklı bioaktif maddeler içerebilmektedir. Bu granüllerde heparin, histamin, serotonin, kemokinler (chemokine C-C motif ligand-2, CCL2; chemokine C-X-C motif ligand-1, CXCL1), sitokinler (tumour necrosis factor, TNF-alfa, interleukin-6), proteazlar (şimaz, triptaz) büyüme faktörleri (vasküler endotelial büyüme faktörü, VEGF, temel fibroblast büyüme faktörleri, bFGF) ve lipid mediatörleri (prostaglandin D2, PGD2; Leukotriene C4, LTC4), anafilaksinin yavaş etkileyen faktörü (Slow-reacting substance of anaphylaxis, SRS-A) gibi maddeler bulunmaktadır (Kumar ve Sharma, 2010; Şimşek ve ark., 2012). Dolayısıyla mastositler; yara iyileşmesi, doğal bağışıklık sistemi, paraziter enfestasyonlar gibi birçok farklı alanda görev alabilmektedir (Withrow ve ark., 2013). Mast hücre tümörleri (MHT) çoğunlukla deride ortaya çıkmalarından dolayı bazı kaynaklarda deri tümörleri arasında sınıflandırılırken (Goldschmidt ve Hendrick, 2002), Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation, WHO) bülteninde, köken aldığı doku olan yumuşak (mezenkimal) doku tümörleri arasında sınıflandırılmaktadır (Weiss, 1974). Mastositomlar deri dışında; bağırsaklar, karaciğer ve dalakta da ortaya çıkabilmektedir (Goldschmidt ve Hendrick, 2002). Mast hücre tümörleri, türler arasında en sık köpeklerde gözlenmektedir (Urman ve ark., 1960). Bunun yanında köpeklerdeki kadar sık olmamakla beraber kedi (Wilcock ve ark., 1986), sığır (Head, 1958), fare, at, domuz (Goldschmidt ve Hendrick, 2002) ve insanda da (Bloom ve ark., 2009) MHT olguları meydana gelmektedir. MHT'ler köpeklerde görülen tüm tümörlerin %6'sını ve deri tümörlerinin %13-20'sini oluşturmaktadır (Erer ve Kıran, 2009; Garrett, 2014). Gülçubuk ve Gürel (2003), 1995-2000 yılları arasında İstanbul'da saptanan 182 köpek tümörünün 7'sinin kMHT olduğunu bildirmiştir.

Mast hücre tümörleri sıklıkla boxer, boston terrier, bulldog, pug, beagle, bull mastif, golden retriever, labrador retriever ve rodesian ridgeback ırkları olmak üzere tüm köpek ırklarında görülen ve genellikle malign karakterde ortaya çıkması sebebiyle hayat tehdidi oluşturabilen

bir hastalıktır. Mevcut literatüre bakıldığında hastalığın tedavisi için çeşitli kemoterapötik ve cerrahi yaklaşımların olduğu görülmektedir. Ancak kullanılan ilaçların yan etkileri, bu ilaçlara karşı gelişen direnç, metastaz oluşumu ve 3. derece tümörlerde cerrahi müdahalelerin yetersizliği göz önüne alındığında, tüm tümör tiplerinde olduğu gibi gelişmiş tedavilere ihtiyacın olduğu görülmektedir. Güncel literatür incelendiğinde insan MHT olgularına yönelik olarak siRNA aracılı susturma ve alfa-tocopherol succinate (alfa –TOS) kombine tedavisi uygulanarak yüksek etkinlik sağlandığı gösterilmiştir (Ruano ve ark., 2009). Ancak bu çalışmada insan mast hücre tümör serisi kullanılmış ve *c-KIT* geninde D816V mutasyonu hedef alınmıştır. Sunulan çalışmada ise köpek mast hücre tümörü C2 hücre serisi kullanılmış ve köpeklerde sıklıkla belirlenen farklı bir mutasyon (48bp duplikasyon) taşıyan genin susturulması hedeflenmiştir. Elders ve ark., (2011) mutant *c-KIT* geni aktarılmış hamster ovaryumu hücre kültüründe bu mutasyona yönelik gen susturma denemeleri yapmışlardır. Ancak bu çalışma da köpek mast hücre tümöründe *c-KIT* geni susturulmasına bağlı olarak köpek mutant mast hücrelerinin viabilitesi ve masitinib ile karşılaştırılması konusunda bilgi vermemektedir. Mevcut literatür göz önünde bulundurulduğunda MHT tedavisinde farklı *c-KIT* reseptör inhibitörlerine (imatinib, masitinib, toceranib) karşı gelişen direnç mekanizmaları ile tümör gelişimi devam etmektedir. Bu nedenle, MHT'nin tedavisine yönelik yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Sunulan çalışmada Mastositom C2 hücre hattında siRNA ile ligand bağımsız faal olan mutant genin susturulması ve masitinib ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Hücre kültürü: Çalışmanın materyalini Fransa Inserm Enstitüsü'nden Dr. Patrice Dubreuil tarafından soğuk zincirde gönderilen köpek mastositom C2 hücre serisi oluşturmaktadır. Hücre serisinde 48 baz çiftlik duplikasyon içeren *c-KIT* mutasyonunun varlığı PCR ve DNA dizileme yöntemi ile kontrol edilmiştir. Hücre kültürünün yeni seriler şeklinde pasajlanarak saklanması ve deneyler boyunca kullanılacak kısmının kültür işlemleri Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Hücreler, 2mM L-glutamine, %10 FBS, 100g/mL streptomisin ve 100U/mL penisilin ile desteklenmiş RPMI 1640 içerisine yayılarak, etüv içerisinde nemli bir atmosferde, 37C° ve %5 CO² konsantrasyonunda 75 cm² flask içerisinde

inkübe edilmiştir. C2 hücre serisi 4. pasajında 24 kuyucuklu (2cm²) plate'e: 1) Kontrol grubu 2) Masitinib uygulama grubu, 3) c-KIT siRNA susturma grubu ve 4) GAPDH siRNA grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Her grup 3'er kuyucukta kültüre edilerek kantitatif eş zamanlı PCR (Quantitative PCR, qPCR) ile değerlendirilmiştir.

IC50 Dozun Belirlenmesi: Masitinib uygulamasında uygun miktarın belirlenmesi için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında IC50 değeri belirlenmiştir. MTT testi uygulaması için 96'lık plate içerisinde her bir kuyucukta 10 X 10⁶ hücre yoğunluğu olacak şekilde hücreler yetiştirilmiş olup, 24 saat boyunca 0,1mM Masitinib mesilat konsantrasyonunda başlanarak log10 tabanında ve log2 tabanında sulandırmalar ile 10'ar sulandırma yapılarak 37°C ve %5 CO² konsantrasyonunda inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) ile muamele edilmiş hücreler kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından plate SpectraMax MiniMax Imaging Cytometer cihaz ile değerlendirilmiştir.

siRNA Transfeksiyonu: c-KIT geni için Çizelge 1'de belirtilen 48 baz çiftlik duplikasyon mutasyonu içeren mutant diziyi özgü siRNA dizileri kullanılmıştır. Belirlenen siRNA dizilerinin hedef mRNA üzerinde AA dinükleotidiyle başlayıp, takip eden 19 bazı içeren bir bölgelerden seçilmesine ve bu bölgelerin %30-50 GC içeriğini geçmeyen bölgelerden olmasına dikkat edilerek tasarlanmıştır. Bu amaçla Genescript siRNA Target Finder (GeneScript; <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>) ve IDT siRNA Design yazılımı (<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/RNAi/RNAi.aspx?source=menu>) kullanılmıştır. Belirlenen diziler BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) veri tabanında köpek genomunda homoloji açısından kontrol edilmiş, sadece mutant c-KIT genine özgü olanlar seçilmiştir.

Çizelge 1. Susturulan gen ve kullanılan siRNA dizisi.

siRNA Bölgesi	Hedeflenen Gen	Hedef Dizi	Ref
c-KIT, ekzon11 mutant		agaacataccaacacagc	Sunulan çalışma
GAPDH, Ekzon2B		ccactttgtcaagctcatt	Elders ve ark., 2011

siRNA transfeksiyonu için hücreler 24 kuyucuklu plate'te uygulamanın bir gün öncesinde antibiyotik ve serum içermeyen 500ul RPMI1640 medium'u içerisinde %70 confluent olacak

şekilde yetiştirilmiştir. Her bir kuyucukta $0,5-2 \times 10^5$ adet hücre yoğunluğu sağlanmıştır. Her bir kuyucuk için 2 µl (10pmol/ul) siRNA primeri 48µl Optimem içerisinde çözündürülmüştür. Ayrıca 1 µl Lipofektamin (Lipofectamine 3000 Transfection Reagent, Thermo Fisher) 59 µl Optimem içerisinde çözündürülerek 5dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda iki solüsyon 1-1 oranında karıştırılarak her bir kuyucuğa 50µl hacimde dağıtılmıştır. Bu aşama pipet ile her bir kuyucuğun içerisinde yıldız çizer gibi farklı noktalara enjekte edilerek özenle gerçekleştirilmiştir. Hücreler 37C°'de CO² inkübatörde 36 saat inkübasyonun ardından PBS ile yıkanıp kazıyarak yapışıkları yüzeyden kaldırılmıştır. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji anabilim Dalı'nda bulunan NanoEntek marka JuLI™ FL hücre sayım cihazında Tripan mavisi ile sayılarak 5000 hücre/µl konsantrasyonda PBS (Phosphate Buffered Saline) ile süspanse edilmiştir.

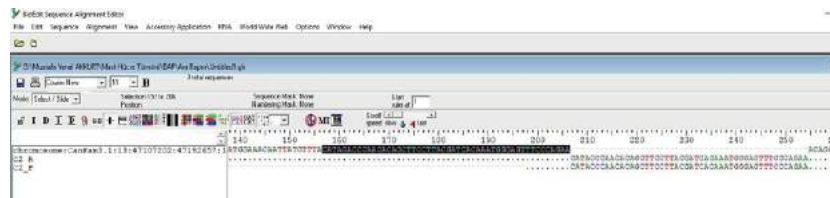
RNA İzolasyonu: Hücre süspanasyonu iScript™ RT-qPCR Sample Preparation Reagent ile 1000 hücre/ul, 200 hücre/ul, 40 hücre/ul, 8 hücre/µl ve 1,6 hücre/µl konsantrasyonlarında sulandırılmıştır. Bu işlemin kullanılan iScript™ RT-qPCR Sample Preparation Reagent'ın muhtemel inhibitör etkisinden sakınmak amaçlı yapılması gerektiği bildirilmektedir. Süspanasyonlar 2000rcf'de 4dk 4C°'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan pelet üzerine 100µl iScript™ RT-qPCR Sample Preparation Reagent eklenerek 20sn vorteks uygulanmıştır. Arkasından 15 000rcf'de 2dk santrifüj edilerek süpernatant cDNA sentezi için -80C°'de muhafaza edilmiştir.

cDNA eldesi ve Kantitatif PZR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q-PCR) uygulamaları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu iScript™ RT-qPCR Sample Preparation Reagent ile yapılmıştır. Elde edilen RNA solüsyonlarının içerisinde kalıntı DNA bulunması ve analizleri olumsuz etkilemesi olasılığına karşı Dnase-I uygulaması yapılmış ve ortamdaki DNA'lar yıkılmıştır. Total RNA kalite ve kantitesi NanoDrop ND2000 spektrofotometri ile 260/280 nm dalga boylarındaki oranlarına bakılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen RNA'lar üretici firmanın önerileri doğrultusunda, reverse transkripsiyon (RT) işlemi ile cDNA eldesinde (iScript™ cDNA Synthesis Kit) kullanılmıştır. İncelenecek olan genlerin ifade seviyelerinin ölçümünde kullanılan primerlerin bağlanma sıcaklıkları gradient özelliğe sahip eş zamanlı ısı döngü cihazında SyberGreen temelli kantitatif eş zamanlı PCR (qRT-PCR) tekniği kullanılarak (Biorad CFX Connect) belirlenmiştir. Sunulan çalışmada housekeeping gen olarak GAPDH geni

kullanılmıştır. Ayrıca incelenecek gen bölgelerinde erime eğrisi (melt curve) analizi yapılmıştır. Çalışmada kullanılan gen bölgeleri, elde edilen amplikon büyüklüğü ve kullanılan primer dizileri Çizelge 2’de listelenmiştir. cDNA sentezi ticari bir kit olan iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad) kullanılarak ve üreticinin yönergelerine uyularak yapılmıştır. Ürün protokolüne göre; 5x iScript Reaksiyon Mixi 4 µl, iScript revers transkriptaz enzimi 1µl, nükleazdan arı su 13 µl ve RNA lizati 2 µl olmak üzere toplam 20 µl hacimde, 5dk 25 °C , 30dk 42°C, 5 dk 85°C protokolü ile kurulmuştur. kPZR analizleri SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Biorad) kullanarak yapılmıştır. Ürün protokolüne uygun şekilde SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (2X) 5µl, ileri Primer 1µl, geri Primer 1µl, nükleazdan arı su 1µl ve cDNA 2 µl olmak üzere toplam 10 µl hacimde reaksiyon kurulmuştur. 30sn 95°C , (5sn 95°C , 15sn 50°C 40 döngü) 2 aşamalı protokol kullanılmıştır. Erime eğrisi analizi; 65°C-95°C arasında her 5sn’de 0,5°C’lik sıcaklık artışı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

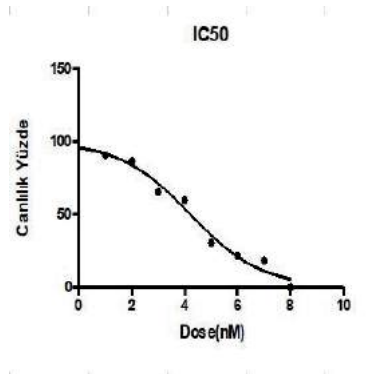
Gen Bölgesi	Amplikon, (baz çifti)	Primer Dizisi
GAPDH	452	F: 5'-ACCACGTCATGCCATCAC-3' R: 5'-TCCACCACCCGGTTGCTGTA-3'
c-KIT mutant	400	F:5'-CCTGTTACACCTTTGCTGA-3' R:5'-TAGGGCTTCTCGTTCGGTTA-3'

C2 mastositom hücre hattında c-KIT geni ekzon 11’de yer alan 48 baz çiftlik duplikasyon mutasyonunun varlığı DNA dizi analizi ile teyit edilmiştir (Şekil 1). %85 konfluent olduğu aşamada 24 kuyucuklu plakelere aktarılarak transfeksiyon çalışmalarına başlanılmıştır.



belirlenmiştir. Log10 tabanında belirlenen grafik uyarınca IC50 dozunun 56nM olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).

Transfeksiyon işleminin ardından hücreler iScript™ RT-qPCR Sample Preparation Reagent ile muamele edilerek RNA'nın korunması ve izolasyonu sağlanmıştır. Akabinde cDNA sentezi gerçekleştirilen izolatlar ile gradient qPCR reaksiyonları kurularak optimum primer bağlanma koşulları belirlenmiştir. Ancak Ct değerlerinin 30. döngüden önceye çekilmesi başarılı olamadığından bağlı bir değerlendirilmenin yapılması istatistiksel açıdan mümkün olamamıştır.



Şekil 2. IC50 Doz Grafiği, log10 tabanında değerlendirilmiştir.

Sonuç

Mastositom C2 hücre serisinin temini, pasajlanması ve saklanması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. İleriye yönelik gen susturma, gen ekleme ve çıkarma (crispr) gibi öngörülen çalışmalar için Kırıkkale Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarlarında dondurularak saklanmaktadır.

Masitinib etken maddesinin uygulanmasında mevcut literatürler göz önünde bulundurulduğunda 100nM konsantrasyonda bir konsensus olduğu görülmüştür. Ancak çalışmamızda yapılan MTT testi sonuçlarına göre bu değerin 56nM olduğu belirlenmiştir. Bu

durumun laboratuvarlar arası pasajlama gibi uygulama farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür ve sonraki çalışmalarda göz önüne alınması gerektiği belirlenmiştir.

Deney grupları içerisinde, masitinib ve siRNA uygulaması yapılan gruplar ile kontrol grupları arasında gen ifadesinde farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Ancak rakamsal ve yüzdesel bir değerin hesaplanabilmesi için Ct değerlerinin 30. döngüden önce alınması gerektiğinden PCR etkinliğinin artırılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Gen ifadesinde meydana gelen değişikliklerin bağlı değerlendirilmesinin yanı sıra western blotting gibi protein düzeyinde de araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır. mRNA seviyesinde meydana gelen ifade değişikliklerin her zaman protein seviyesinde değişikliğe neden olmadığı bilinmektedir. Bu bağlamda ileri analizlerin gerekliliği söz konusudur.

Bu çalışmada köpek mast hücre tümörü C2 hücre hattında ilk kez siRNA aracılı gen susturma metodu kullanılmıştır. Çalışma kapsamında tek bir transfeksiyon metodu ve tek bir siRNA kullanılmıştır. Bu çalışma, henüz sadece bir siRNA denemesi üzerine elde edilen ön verileri içermektedir. Bununla birlikte, ilerleyen çalışmalarda, gen susturma etkinliği tarafımızdan yapılan ve aynı mRNA'yı hedefleyen ilave siRNA'lar ile beraber değerlendirilecektir. İlerleyen çalışmalarda ise lusiferaz tahlili gibi yöntemlerle transfeksiyon başarısının ölçülmesi gerektiği görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan lipofektamin transfeksiyon metodunun düşük etkili olduğunun belirlenmesi durumunda ise alternatif transfeksiyon metodları ile karşılaştırma yapılma imkanı sağlanmış olacaktır. Metodolojinin geliştirilmesinin domino etkisi olarak tekniğin köpek mast hücre tümörü hastası bireylerde in-vivo kullanımına ilişkin gelecek vadettiği düşünülmektedir. Köpek ve insan türünde tümör vakalarının ortak ve spontan olarak gelişmesi nedeniyle köpek, insan çalışmaları için ideal model organizma olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla, köpeklerde bu tekniğin in-vitro ve in-vivo kullanımının başarılı olması durumunda, insanlarda bireysel tedavilerin önü açılarak kemoterapötiklerin olası yan etkilerinin ve tümör hücrelerinin kemoterapötiklere karşı direnç kazanmasının önüne geçilebileceği öngörülmektedir.

Kaynakça

1. DOWNING, S., CHIEN, M. B., KASS, P. H., MOORE, P. E. , LONDON, C. A. 2002. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am J Vet Res*, 63, 1718-23.
2. ELDERS, R. C., et al. 2011. Targeted knockdown of canine KIT (stem cell factor receptor) using RNA interference. *Veterinary immunology and immunopathology* 141(1): 151-156.

3. ERER H. , KIRAN M. M. 1993. Konya'da 1985-1992 Yılları Arasında Köpeklerde Görülen Tümörler. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 9, 87-89.
4. GARRETT, L. D. 2014. Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. Veterinary Medicine: Research and Reports, 49.
5. GENESCRİPT SIRNA TARGET FINDER. 2016. Erişim: [<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>]. Erişim Tarihi: 20.05.2016.
6. GOLDSCHMIDT, M. H. , HENDRICK, M. J. 2002. Tumors of the Skin and Soft Tissues: Tumors in Domestic Animals.
7. GÜLÇUBUK, A. , GÜREL, A. 2003. 1995-2000 Yılları Arasında İstanbul'da Saptanan Köpek Tümörleri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 29, 83-91.
8. HEAD, K. W. 1958. Cutaneous mast-cell tumours in the dog, cat and ox. Br J Dermatol, 70, 399-408.
9. JAMUR, M. C. , OLIVER, C. 2011. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. Front Biosci (Schol Ed), 3, 1390-406.
10. KUMAR, V. , SHARMA, A. 2010. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. Mol Immunol, 48, 14-25.
11. LIVAK, K.J., SCHMITTGEN T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PZR and the 2Delta DeltaCT method. Methods, 25 (4): 402-408.
12. RUANO, I., GARGINI, R., IZQUIERDO, M. 2009. Combination of KIT gene silencing and tocopherol succinate may offer improved therapeutic approaches for human mastocytosis. British Journal of Hematology, 148, 59-68.
13. SAĞLAM, M., AŞTI, R. N. , ÖZER, A. 2008. Genel Histoloji, Ankara, Yorum Matbaacılık.
14. ŞİMŞEK, N., BAYRAKTAROĞLU, A. G. , ERGÜN, E. 2012. Histoloji Atlası, Ankara, Fenomen Yayıncılık.
15. URMAN, K., GIRGIN, H. , ERTÜRK, E. 1960. Bir Köpekte Mastocytom Olayı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 7, 45-54.
16. WEISS, E. 1974. Tumors of the soft (mesenchymal) tissues: Bulletin of The World Health Organization. Geneve.
17. WILCOCK, B. P., YAGER, J. A. , ZINK, M. C. 1986. The morphology and behavior of feline cutaneous mastocytomas. Vet Pathol, 23, 320-4.
18. WITHROW, S. J., VAIL, D. M., ve PAGE, R. (2013). Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. Mast Cell Tumors 5, 335-355. Elsevier Health Sciences.
19. ZHANG Z., SCHWARTZ S., WAGNER L., & MILLER W. (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences" J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

MCF7 Hücrelerinin BPA ve DEHP Varlığında Vincristin'e Tepkisi

Recep UYAR¹ Begüm Yurdakök DİKMEN¹ Yagmur TURGUT¹ Ayhan FİLAZİ¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Özet: Fitalar arasında DEHP (Bis (2-etilheksil) fitalat) ve BPA (Bisfenol A) östrojen aktif bileşiklerdendir. Oyuncak ve kateter gibi plastic içerikli ürünlerde yasak olmasına rağmen, birçok maruziyet senaryoları mümkündür. Östrojen reseptörü (ER) pozitif meme kanserlerinde, çevresel östrojen aktif bileşikleri belirgin tedavi için bir risk oluşturmaktadır. Bu çalışmada, vinkristin ve tamoksifenin, endokrin aktif bileşikler DEHP ve BPA varlığında ER + meme tümör kanseri hücre dizisi MCF7'deki (insan meme adenokarsinomu) etkinliğini araştırdık.

DEHP ve BPA, tek başına 0.1-100 nM konsantrasyonlarında ve Tamoksifen (9 nM sitotoksik konsantrasyonunda) ve Estradiol (E2) (1 nM proliferatif konsantrasyonunda) ile kombinasyon halinde MCF7 hücrelerine uygulandı. Vinkristin, sitotoksik konsantrasyonunda (IC₅₀ = 5.45 nM), ön testten sonra (4 saat) test edilen östrojen aktif bileşiklerin aynı protokolü ile uygulandı ve ardından hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirildi.

1 nM'de DEHP ve BPA ile ön inkübasyonun Vincristine sitotoksitesini 18,71 (± 5,43) ve %31,63 (±1,93) azalttığı bulundu. Bu östrojen aktif bileşiklerin, Tamoksifenin sitotoksitesini DEHP için %34.27 (± 3.53) ve BPA için %39.94 (±1.55) azalttığı görüldü; Tamoksifen-Vincristine kombinasyonun ise sırayla %8.43 (± 2.65) ve %14.92 (± 0.56) oranında azalttığı saptandı. Standart proliferatif ligand E2'nin varlığında, vinkristinin sitotoksik etkisinin DEHP için %59.42 (± 6.32) ve BPA için %60.20 (± 4.87) azaldığı görülmüştür.

Sonuçlar, tamoksifen ile kombinasyon halinde metastatik meme kanseri kemoterapi tedavilerinde kullanılan bir vinca alkaloid ilacı olan vincristinin sitotoksik etkisinin, in vitro ortamda çevresel kirletici östrojen aktif bileşikler, DEHP ve BPA varlığında azaldığı tespit edildi. Ön sonuçlar, bu kirleticilere düşük dozda maruz kalmanın varlığının kemoterapötiklerin sitotoksik potansiyelinde bir azalmaya yol açabileceğini; gerçek hayatta maruz kalma dozlarında ve karışımlarda başka östrojen aktif bileşiklerle çalışmalar yapılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A, di-2-etilheksil fitalat, Kemoterapötik, Sitotoksiste, Tamoksifen.

Response of MCF7 Cells to Vincristin in Presence of BPA and DEHP

Abstract: Among phthalates DEHP (Bis(2-ethylhexyl) phthalate) and Bisphenol A (BPA) are estrogen active compounds. Eventhough its ban in toys and catheters, there are still various possible exposure scenarios. In estrogen receptor (ER)-positive breast cancers, environmental estrogen active compounds pose a risk for prominent treatment. In this study, we searched the efficacy of vincristin and tamoxifen, in presence of the endocrine active compounds DEHP and BPA, in ER+ mammary tumor cancer cell line MCF7 (human breast adenocarcinoma).

DEHP and BPA at 0.1-100 nM concentrations alone and in combination with Tamoxifen (at cytotoxic concentration of 9 nM) and Estradiol (E2) (at proliferative concentration of 1 nM) were applied to MCF7 cells. Vincristine was applied at its cytotoxic concentration ($IC_{50}=5.45$ nM) following preincubation (4 hrs) with the same protocol of the tested estrogen active compounds. Cell viabilities were evaluated by MTT assay.

Preincubation with DEHP and BPA at 1 nM were found to decrease the cytotoxicity of Vincristine by 18.71 (± 5.43) and 31.63% (± 1.93). These estrogen active compounds were found to decrease the cytotoxicity of Tamoxifen by 34.27% (± 3.53) for DEHP and 39.94% (± 1.55) for BPA; while Tamoxifen-Vincristine combination were decreased by 8.43% (± 2.65) and 14.92% (± 0.56). In presence of the standart proliferative ligand E2, the cytotoxic effect of vincristine were also decreased by 59.42% (± 6.32) for DEHP and 60.20% (± 4.87) for BPA. The results indicate that the cytotoxic effect of vincristine, a vinca alkaloid drug used in metastatic breast cancer chemotherapy regimes in combination with tamoxifen were found to have decreased in presence of the environmental contaminant estrogen active compounds, DEHP and BPA, in *in vitro*. The preliminary results indicate that presence of low-dose exposure to these pollutants, might lead a decrease of the cytotoxic potency of the chemotherapeutics; where studies should be repeated with more other estrogen active compounds in real life exposure doses and in mixtures.

Keywords: Bisphenol A, Chemotherapeutic, Cytotoxicity, dehp diethylhexyl phthalate, Tamoxifen.

Giriş

Kanser, kontrolsüz büyüme, yayılma ve de anormal hücreler ile karakterize bir hastalık grubudur (1). Popülasyonlar arasında ölüme neden olan en tehdit edici sağlık sorunlarından biri olarak bildirilen kansere dış etkenler (sigara, kimyasallar, radyasyon ve bulaşıcı organizmalar) veya iç faktörler (kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, immün koşullar ve mutasyonlar)'ın neden olduğu bilinmektedir (1). Meydana gelen bu kanser yapısı büyümeye devam ettikçe, tümör hücreleri çevresindeki dokuları istila eder ve vasküler sisteme erişir, tümör hücrelerinin uzak organlara ve metastaza yayılmasına neden olur (2).

Kanser hücreleri, DNA'daki hasar nedeniyle gelişir. Hasar gören DNA'nın çoğu zaman hücresel tamir mekanizmaları tarafından tamir edebilir. Tamir edilemeyen hasarlı DNA'ya sahip hücreler kanser hücrelere dönüşmektedir. Meme kanseri, meme dokusunun terminal dukto-lobüler ünitesinden kaynaklanmaktadır. Meme bazal membranı istila etmemiş olan kanser in situ karsinom olarak adlandırılır. Diğer taraftan, bazal membranı istila eden meme kanserleri; istilacı kanserler olarak aldandırılmakta ve istilacı tipte uzak organ metastazlarına yol açmaktadır. Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanser tipidir. Ölüm oranları düşse de, meme kanserinin kadınlardaki ölüm oranlarının halen ikinci sırada olduğu bildirilmiştir. Mortalitenin azaltılması, risk faktörlerinin belirlenmesi, erken tanı ile tedavi stratejilerinin iyileştirilmesi mümkündür (2).

Eströjen reseptörü pozitif kanserlerde ve buna bağlı olarak östrojen üretiminden sorumlu olan overal fonksiyonun etkinliği göz önüne alındığında; bu kanser türünün oluşum riskini arttırmaktadır (3). 17 β -estradiol (E2) ana östrojenik hormondur ve östrojen reseptörleri (ER) vasıtasıyla farklı biyolojik çeşitliliği düzenlenmesi; meme bezlerinin farklılaşması, hücre çoğalması, ergenlikte ve cinsel olgunluktaki gelişim gibi birçok etkinliktir sorumludur. E2 ER aracılı hücreyi indükleyerek prokanserojenik etki gösterebilmesinin yanı sıra, proliferasyon, gen mutasyonları ve sitokrom P450-aracılı metabolik aktivasyonlarda değişikliklere yol açabilmektedir (4). Önemli epidemiyolojik ve klinik kanıtlar östrojenlere yada östrojenik etkilere sahip maddelerle kümülatif ve sürekli suprafizyolojik dozlara maruz kalarak uyarılması yüksek oranda meme adenokarsinomuna, u zun süreler boyunca maruz kalınan düşük dozlar ise fibroadenomlara neden olmaktadır (5).

Kanser hücrelerini yok etmek için kullanılan ve genellikle antikanser ilaçlar olarak adlandırılan kemoterapik ilaçlar, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve büyümesini engelleyerek öldürürler (6). Kemoterapi ilaçları, kanser hücrelerini nasıl etkilediğine, hücresel aktivitelerin veya ilacın etkileşime girme sürecine ve hangi hücre döngüsüne nasıl etki ettiklerini temel alarak çeşitli kategorilere ayrılır (6). Antimitotik ajanlar ise bu kemoterapik ilaçların bir kısmını oluşturan, bitki alkaloidleri ve doğal ürünlerden elde edilen bileşiklerdir. Mitozu inhibe ederek veya hücrenin çoğaltılması için gereken proteinlerin yapılmasında sorumlu enzimleri inhibe eder. Bunlar, hücre döngüsünün M fazı boyunca çalışmaktadır ve bu mitotik inhibitörlerine örnek olarak paclitaksel, docetaksel, etoposide (VP-16), vinblastin, vincristine ve vinorelbine verilebilir (7).

Tamoksifen ve benzeri hormon reseptörünü hedefleyen ilaçlar, östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hastalarının tedavisinde kullanılan sentetik bir steroidal olmayan anti-östrojendir (8). Tamoksifen şu anda hem erken hem de ileri düzey ER + (östrojen reseptörü pozitif) meme kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır ve ayrıca FDA tarafından hastalığa yakalanma riski yüksek olan kadınlarda meme kanserinin önlenmesi için de kullanımı onaylanmıştır.

Vincristine, bitki (vinca) alkaloidleri olarak bilinen genel kemoterapi ilaç grubuna aittir. Vinca alkaloidleri, Madagaskar salyangozu *Catharanthus roseus*'ta (eski *Vinca rosea* olarak sınıflandırılmış) bulunur (9). Vincristine, tubuline bağlanarak ve mikrotübüllerin oluşumunu engelleyerek etki eder. Bu inhibisyon, mitozun metafazda, özellikle M ve S fazları sırasında, mitoz mili oluşumunun bozulması yoluyla tutuklanmasına neden olur. Vincristinin başka bir etki mekanizması, glutamik asit kullanımını bloke ederek nükleik asit ve protein sentezine müdahale etmeyi içerir (9) (10). Ortamdaki birçok doğal ve sentetik kimyasal, steroid hormonların etkisini taklit ederek veya inhibe ederek endokrin sistemlerini bozabilir, böylece üreme ve gelişimsel bozukluklar ortaya çıkabilir (11) Çevresel östrojenler, endojen östrojen 17 β -estradiölün (E2) fonksiyonunu veya aktivitesini taklit edebilen bir bileşikler sınıfını temsil eder. Bu çevresel östrojenler, hem vahşi yaşamda hem de insanda endokrin bozucular olarak işlev görebilir.

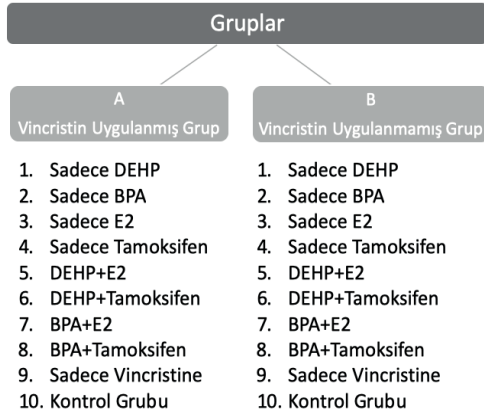
Bisfenol A (BPA) ve Bütil benzil fi talat (BBP), di (n-bütil) fitalat (DBP) ve di (2-etilheksil) fitalat (DEHP) içeren fitalatlar, yiyecek ambalajları, tıbbi ürünler, oyuncaklar, yapıştırıcılar, plastik kaplama ve tırnak cilası, saç spreyi ve parfüm gibi kozmetik formülasyonlar da dahil olmak üzere plastikleştirici olarak yaygın şekilde kullanılırlar. Bu kimyasallar, sperm sayısındaki azalma, üreme ve gelişimsel bozukluklar ve davranışsal tehlikeler dahil olmak üzere çeşitli ters etkiler yaratır (11) (12).

DEHP (13)(14)(15) ve BPA'nın östrojeni taklit ettiği ve östrojen reseptörüne (ER) bağlanarak vücutta östrojenik etkiye sahip çok önemli bir EDC (Endokrin Bozucu Kimyasallar) olma potansiyeli ve yaygın şekilde maruz kalınması nedeniyle kronik durumlarla ilişkili olarak kanser riskini artırma potansiyeline sahip olduğu bildirildi (16) (17).

Materyal ve Metod

MCF-7 hücreleri, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC, Rockville, MD, ABD) satın alındı. MCF-7 hücreleri, % 5 FBS, 100 U/ml penisilin-streptomisin ile birlikte DMEM High Glucose'de büyütüldü ve muhafaza edildi. Hücreler %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemli ortamda 37°C'da büyütülmüştür.

Uygulama grupları iki ana grup içerisinde on farklı alt grup olarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 1). (A) bu gruba ait alt grupların her biri vincristine (IC₅₀ = 5.45 nM) ile muamele edilmiştir ve alt grupları şu şekildedir: (i) sadece DEHP (0.1-100 nM dört farklı konsantrasyonda), (ii) sadece BPA (0.1-100 nM dört farklı konsantrasyonda), Sadece E2 (1nM proliferatif konsantrasyonunda), (iii) sadece tamoksifen (9 nM sitotoksik konsantrasyonunda), aynı dozlarda (iv) DEHP ve (v) Tamoksifen kombinasyonu, (vi) BPA ve Tamoksifen kombinasyonu, (vii) DEHP ve E2 kombinasyonu, (viii) BPA ve E2 kombinasyonu, sadece vincristin ve control grubu olmak üzere uygulanmıştır. Bir diğer grup (B) ise yukarıda belirtilen gruplandırmaların aynısı ancak vincristin olmaksızın gerçekleştirilmiştir.



*Alt Grupların Herbirine Vincristin Uygulanmıştır!

*Alt Grupların Hiçbirine Vincristin Uygulanmamıştır!

Tablo 1. Uygulama Grupları.

DEHP ve BPA, tek başına 0.1-100 nM konsantrasyonlarında ve Tamoksifen (9 nM sitotoksik konsantrasyonunda) ve Estradiol (E2) (1 nM proliferatif konsantrasyonunda) ile kombinasyon halinde MCF7 hücrelerine uygulandı. Vincristine, sitotoksik konsantrasyonunda (IC50 = 5.45 nM), ön testten sonra (4 saat) test edilen östrojen aktif bileşiklerin aynı protokolü ile uygulandı ve ardından hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirildi.

MTT testi için, platelerde (96 kuyucuklu) üretilen ve uygulama gruplarına göre ayrılan hücrelere 25 µl ilaç/numune uygulanacak ve 24 saat inkübasyonu takiben üzerindeki vasat boşaltılarak 15 µl MTT çalışma solüsyonu (5 mg/ml PBS) eklenmiştir. Formazan oluşumunun mikroskopik görüldüğü iki saatlik inkübasyondan sonra 100 µl %1'lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ilave edilmiştir. Işığa duyarlı bir yöntem olmasından dolayı çalışmanın tamamı karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Plateler, horizontal karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra (100 rpm, 10 dakika), optik dansiteleri microplate okuyucuda (SpectraMax i3 Multi-Mode Platform, Molecular Devices, ABD) 540 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Bulgular

1 nM'de DEHP ve BPA ile ön inkübasyonun Vincristine sitotoksitesini 18,71 (± 5,43) ve % 31,63 (±1,93) azalttığı bulunmuştur. Bu östrojen aktif bileşiklerin, Tamoksifenin sitotoksitesini DEHP için % 34.27 (±3.53) ve BPA için % 39.94 (±1.55) azalttığı görülmüş;

Tamoksifen-Vincristine kombinasyonun ise sırayla % 8.43 (± 2.65) ve % 14.92 (± 0.56) oranında azalttığı saptanmıştır. Standart proliferatif ligand E2'nin varlığında, vinkristinin sitotoksik etkisinin DEHP için % 59.42 (± 6.32) ve BPA için % 60.20 (± 4.87) azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak tamoksifen ile kombinasyon halinde metastatik meme kanseri kemoterapi tedavilerinde kullanılan bir vinca alkaloid ilacı olan vincristinin sitotoksik etkisinin, in vitro ortamda çevresel kirlenici östrojen aktif bileşikler, DEHP ve BPA varlığında azaldığı tespit edildi. Ön sonuçlar, bu kirlenicilere düşük dozda maruziyetin kemoterapötiklerin sitotoksik potansiyelinde bir azalmaya yol açabileceğini; gerçek hayatta maruz kalan dozlarda ve karışımlarda başka östrojen aktif bileşiklerle çalışmalar yapılabileceğini göstermiştir.

Tartışma

Son araştırmalara göre, östrojenik etkiye sahip EDC'ler, meme, yumurtalık ve uterus gibi östrojene duyarlı organların kanserlerinin gelişimi ve ilerlemesi ile ilgilidir. Örneğin, BPA'nın, ER'lere bağlanarak bazı östrojenik özelliklere sahip bir EDC olarak rol oynadığı ve meme ve prostat bezinin neoplastik lezyonlarını indüklemesi veya yatkın olması muhtemel olduğu belirlenmiştir (18)(18). Düşük BPA ve DEHP dozunun, insan meme kanserinde hücrelerinin hücre proliferasyonunu uyardığı ve düşük BPA ve DEHP dozunun fizyolojik E2 konsantrasyonu ile kombine etkisinin, Vincristine kemoterapik ajanın sitotoksik etki oranının azalmasına yol açtığı bulundu. Bu sonuçlar ışığında çevresel kirlenici ve endokrin bozucu kimyasallar olan BPA ve DEHP'in proliferatif etkinliği bilinen bu maddelerin düşük dozlardaki maruziyetinin kemoterapik ajanlara karşı duyarlılığı azaltabildiğini düşündürmektedir. Ayrıca bu kirlenicilerin maruziyetinde, bu ajanlara karşı gelişen direnç seviyelerinde değişikliklere sebebiyet vereceğini düşündürmekte ve bu yönüyle yeni çalışmalara ışık tutabilmektedir.

Kaynaklar

1. Facts C. Cancer Facts&Figures 2007 [Internet]. 2007;
2. American Cancer Society Cancer Action Network | Home[date unknown]; [cited 2019 Aug 21] Available from: <https://www.fightcancer.org/>.
3. Dorgan JF, Longcope C, Stephenson HE, et al. Serum sex hormone levels are related to breast cancer risk in postmenopausal women. Environ Health Perspect. 1997;105(SUPPL. 3):583–5.
4. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2006;102(1-5 SPEC. ISS.):89–96.

5. Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect.* 1996;104(9):938–67.
6. Hirsch J. An Anniversary for Cancer Chemotherapy. *JAMA.* 2006;296(12):1518.
7. McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2008;1785(2):96–132.
8. Love RR. Tamoxifen therapy in primary breast cancer: biology, efficacy, and side effects. *J Clin Oncol.* 1989;7(6):803–15.
9. Martino E, Casamassima G, Castiglione S, et al. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018;28(17):2816–26.
10. Below J, M Das J. Vincristine. StatPearls Publishing; 2019. [cited 2019 Aug 19] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30725807>.
11. Choi SM, Lee BM. AN ALTERNATIVE MODE OF ACTION OF ENDOCRINE-DISRUPTING CHEMICALS AND CHEMOPREVENTION. *J Toxicol Environ Heal Part B.* 2004;7(6):451–63.
12. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect.* 1993;101(5):378–84.
13. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* 1995;103(suppl 7):113–22.
14. Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect.* 1997;105(8):802–11.
15. Ahlborg UG, Lipworth L, Titus-Ernstoff L, et al. Organochlorine Compounds in Relation to Breast Cancer, Endometrial Cancer, and Endometriosis: An Assessment of the Biological and Epidemiological Evidence. *Crit Rev Toxicol.* 1995;25(6):463–531.
16. Soto AM, Sonnenschein C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat Rev Endocrinol.* 2010;6(7):363–70.
17. Kim J-Y, Choi H-G, Lee H-M, Lee G-A, Hwang K-A, Choi K-C. Effects of bisphenol compounds on the growth and epithelial mesenchymal transition of MCF-7 CV human breast cancer cells. *J Biomed Res.* 2017;31(4):358–69.
18. Keri RA, Ho S-M, Hunt PA, Knudsen KE, Soto AM, Prins GS. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod Toxicol.* 2007;24(2):240–52.
19. Cancer Research UK's News & Resources. UK cancer incidence statistics by age, 2007. <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/incidence/age,18/09/2008>.

Adli Veteriner Toksikoloji Yönüyle Hayvan İstismarı

Begüm Yurdakök DİKMEN^{1,3} H. Sinan SÜZEN^{2,3}

¹ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara

² Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı, Tandoğan, Ankara

³ Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Toksikoloji Anabilim Dalı, Dikimevi, Ankara

Özet: Adli veteriner toksikoloji, hayvanlarda görülen zehirlenme vakalarını adli yönüyle inceleyen bilimdir. Bu kapsamda çalışmalar özellikle, hayvan istismarı (kasti zehirlenme, suistimal edilen ilaçlar, Münchausen by Proxy sendromu), yasal durumlar (adli yönüyle yem kontaminasyonu, hayvansal gıdaların kontaminasyonu), yaban hayvanları (endüstriyel, antropojenik kirleticiler, tuzaklar, çeşitli çıkarlar için toplu ve bireysel ölümler) ve iatrojenik (veteriner hekim uygulama hataları) zehirlenme durumları üzerine yoğunlaşmıştır. Kliniklerde çalışan veteriner hekimlerin özellikle suistimal edilen maddeler ve Münchausen by Proxy sendromuna ilişkin yeterli düzeyde bilgi sahibi olmamaları, bu vakaların kayıt edilememesine ve hatta yanlış tedavi uygulamalarına neden olabilmektedir. Atlarda farklı grup ilaç ve maddeleri içeren doping maddelerinin analizinin yapıldığı doping laboratuvarı ve gıda/yemlerde mikotoksin/pestisit ve diğer kirleticiler gibi istenmeyen maddelerin analizlerini yapan laboratuvarların dışında ülkemizde hayvanlarda suistimal maddelerin ve veteriner hekimlikte kullanılan ilaçların analizini yapan bir veteriner toksikoloji laboratuvarı bulunmamaktadır. Bu durum özellikle istismar vakalarının adli yönüyle değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca bu vakalarda numune toplanması, taşınması ve ilgili toksikolojik analizlerinin titizlikle ve adli yönüyle önem taşımaktadır. Veteriner hekimler, hasta sahibinin de gösterdiği klinik bulgular ve anamnezi göz önünde bulundurarak teşhis ve tedavi için gerekli uygulamaları yapmalıdır. Adli veteriner toksikoloji yönüyle hayvan istismarı kapsamında bu derlemede; hastalık semptom ve belirtilerinin hayvan sahiplerinin kendisi tarafından oluşturulan ve farklı motivasyonlar (işten kaçma, finansal kaynak, tazminat, ilgi arama, anabolik steroid, semptomimetik, kas gevşetici, nöroleptik, tranklizan madde gibi ilaç temini) için kullanıldığı Münchausen by Proxy sendromu (MPS), Veteriner hekim tarafından farklı gerekçelerle yapılan kötü uygulamalar (malpractice), suistimal edici maddelere bağımlı hayvanlar (eğitim sırasında- uyuşturucu/patlayıcı madde arama köpekleri, araştırma sırasında-toksiste/bağımlılık araştırmaları, hayvan sahibinin kasti ve bilinçli taksir uygulamaları-raver hayvanlar), paket vücut sendromu (maddelerin yasadışı kaçakçılığı ya da transport için hayvanların kullanılması) bahsedilecektir. Hayvan istismarına ilişkin, artan adli toksikoloji vakaların sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi ve sonuçlandırılabilmesi için; veteriner hekimliği eğitimi kapsamında öğrencilerin bu konuda yeterli donanımına sahip olacak eğitimi alması, suistimal edilen ve hekimlikte kullanılan ilaç ve maddelerin analizinin yapıldığı veteriner toksikoloji laboratuvarlarının kurulması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adli veteriner toksikoloji, Hayvan istismarı, Münchausen by Proxy sendromu, Suistimal edilen maddeler.

Animal Abuse and Veterinary Forensic Toxicology

Abstract: Veterinary forensic toxicology is the science that focus on toxicology cases of animals within legal perspective. In this context, studies on veterinary forensic toxicology are mainly directed to animal abuse (deliberate poisoning, abused drugs, Munchausen by Proxy syndrome), legal situations (forensic aspects of feed-animal origin food contamination), wild animal (industrial, anthropogenic pollutants, traps, flock and/or individual death cases for various interests) and iatrogenic (veterinary practice errors) poisonings. Inadequate knowledge of the abusive substances and Munchausen by Proxy syndrome by veterinarians working in clinics may lead to the failure to register these cases and even to treat them incorrectly. Besides the doping laboratory that analyzes the doping substances containing different groups of drugs and substances in horses, and toxicology laboratories that only analyze undesirable substances (such as mycotoxins / pesticides and other pollutants in food / feed); there is no veterinary toxicology laboratory in Turkey that analyze drugs of abuse or veterinar drugs in companion animals for forensic purposes. This makes it particularly difficult to evaluate judicial aspects of abuse cases. In addition, the collection, transport and related toxicological analysis of these cases is of particular importance within legal context. In particular to these cases, veterinarians should consider the clinical symptoms and the intention of animal owner for accurate diagnosis and treatment. In the scope of animal abuse, this review focus on forensic veterinary toxicology; where cases of Munchausen by Proxy syndrome (MPS), in which the disease signs and symptoms are created by the animal owners themselves and used for different motivations (avoidance of work, financial resources, compensation, psychological interest and drug request such as anabolic steroid, sympathomimetic, muscle relaxant, neuroleptic, trancizant substances); malpractice performed by the veterinary surgeons for different purposes, animals addicted to/poisoned by abusive substances (during training - drug / explosive search dogs, during research - toxicity / addiction studies, deliberate and deliberate practices of the animal owner - raver animals), pack mule syndrome (illegal trafficking of substances or the use of animals for transport). In order to better evaluate and finalize the increasing forensic toxicology cases related to animal abuse; it is recommended that the students receive adequate training veterinary forensic toxicology focusing on animal abuse in the veterinary curriculum and establish veterinary toxicology laboratories that analyze the abused substances and drugs used in veterinary medicine.

Keywords: *Abusive substances, Animal abuse, Forensic veterinary toxicology, Munchausen by Proxy syndrome.*

Giriş

Organismaya belli bir miktarda alındığında; farklı moleküler yollar üzerinden biyolojik sistem üzerinde morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal etkileri sonucu istenmeyen ve/veya zararlı etkiler oluşturan her türlü madde zehir olarak tanımlanır. Toksikoloji kapsamında belirtilen zehir ve toksikanların vücuda alınmasını takiben oluşan istenmeyen/zararlı etkiler kalitatif ve kantitatif yönüyle araştırılırken; bu olguların hukuksal boyutta incelenmesi Adli Toksikoloji'nin, hayvanlarda görülen adli zehirlenme olgularının incelenmesi ise Veteriner Adli Toksikoloji'nin konusudur. Klinik veteriner toksikolojiden ayrı olarak, tedaviye alınan yanıttan ziyade şüphelenilen maddenin analitik olarak tespit edilmesi ön plana çıkmaktadır (1). Hayvanlarda, adli toksikolojinin konusunu oluşturan maddelere maruziyet pasif (çevresel), kazara ya da kasıtlı olabilmektedir. Kesin olarak bilinmemekle birlikte, ABD'de zehirlenmelerin büyük bir kısmının (>%99) kazara maruziyete bağlı ve çok daha azının kasıtlı olduğu (<%1); diğer evcil hayvan türlerine göre kedi-köpeklerde daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Kasıtlı hayvan zehirlenmeleri kapsamında herhangi bir zarar niyeti olmadan yapılan uygulamalar/tedavi (kedilere ağrı kesici için asetominofen uygulanması gibi) ve zarar vermek amacıyla yapılan uygulamalar (zehirleme) (<%0.5) bulunur (2). Ülkemizde veteriner hekimlik yönüyle zehirlenme olgularının kaydedildiği merkezi bir kayıt sisteminin bulunmaması nedeniyle bu rakamların farklı olabileceği düşünülmektedir. Gıda için beslenen hayvanlarda kasıtlı zehirleme olayları her ne kadar az görülse de, çok daha fazla hayvanın (sürünün) etkilenmesi söz konusudur. Benzer durum vahşi yaşam hayvanları için de geçerlidir (göçmen kuşların hedef alınması; ya da hazırlanan tuzak yemlerin hedef hayvan dışındaki diğerleri tarafından yenilmesi gibi). Günümüzde medyanın yönlendirmesi ile bu olaylar özellikle toplum tarafından araştırılması zorunlu hale getirilmekte, ancak yeterli finansal desteğin ve altyapının bulunmaması nedeniyle çoğunlukla sonuçlandırılmayan adli vakalara dönüşmektedir. Veteriner adli toksikoloji vakaları; hayvanların kasıtlı olarak zarar verme, yaralama ya da ölümüyle sonuçlanan hayvan istismarı olgularını inceler. Bu olgulardaki süjeler ise, sosyoekonomik ve psikolojik yönleriyle çocuk istismarı ile aile içi şiddet ile de ilişkilendirilmektedir (3). Hayvan istismarına yönelik soruşturmalarda, her zaman neyin delil olarak kabul edileceği belli olamayabilmektedir. Adli durumlarda veteriner hekim, istismara yönelik delil sağlayan bilgileri toplamak ve delil toplama zincirinin bütünlüğünü devam ettirmekle yükümlüdür. Suçun aydınlatılmasına yardım edecek maddi delillerin bulunması

amacıyla gerektiğinde olay yeri incelemesini savcı kontrolünde yapar. İstismar vakalarında olay yeri incelemesinde kilit nokta doğru bilgi alınması (anamnez)dir. Bilinçli hayvan zehirlenmelerinde genellikle zehirleyen kişi dışında gören olmadığından, veteriner hekimin dikkatli anemnezi ipuçlarının görünmesinde önemlidir. Veteriner adli toksikoloji vakalarda, patoloğa sonuç gönderilmeden iyi bir anemnez tamamlanmış olması beklenmektedir (4). Hastanın türü, ırkı, yaşı, reproduktif durumu, önceki hastalıkları, aşılama ve ilaç uygulamaları ya da destekleyici (vitamin, mineral gibi) uygulamalar, bakım/besleme koşulları, sürü ya da çok fazla hayvanın etkilenmesi durumunda etkilenen/ölen hayvan sayısı, klinik bulgular (başlangıç, ani/artarak mı devam etti, şiddeti) anamnez içerisinde değerlendirilir. Bu kapsamda maruziyete ilişkin bilgiler (maruziyetin olduğu yer, ilk belirtiler maruziyet sonrasında ne zaman ortaya çıktı, maruziyete ilişkin tanık bulunuyor mu) alınır. Zirai ve büyük çaplı işletmelerde çevre (hayvanat bahçeleri, hayvan barınakları vb) standart bakım koşulları (yem, su, ilaçlar, destekler, altlık, mera kalitesi, sanitasyon vb) kontrol edilmelidir. Kayıt sistemlerine (yeni hayvanların, yem, destekleyici maddeler, ilaç uygulamaları) girişin tam ve düzgün yapıldığı kontrol edilmelidir. Çevredeki yetkili/yetkili olmayan kişilerin (bakıcı, çalışan, temizlik görevlisi, veteriner hekim) hareketleri kaydedilmelidir. İşten çıkarılan kişiler, şüpheli durumlarda dikkatle incelenir. Özellikle tehlike altında olan türler ve vahşi hayvanlar için yapılan çalışmalarda TC. Orman ve Su İşleri Bakanlığı izni alınmalı; Milli Parktaysa Milli Park Korucuları ve diğer bakıcılarla birlikte çalışılmalıdır. Sahadaki personelle görüşmeler (görüşme sırasında hem etkilenen hem de etkilenmemiş hayvanlar hakkında bilgi alınır), hayvanların yaşadığı alan/barınak hakkında, yemlerin hazırlandığı/hayvanların otladığı bölge hakkında, su kaynakları ve diğer maruziyetler (zehirli bitkiler, ilaçlama, sanayi..vb) hakkındaki bilgiler kaydedilir. Olay yeri inceleme, maruziyetin iç mekan (gıda, ilaç, suistimal edilen maddeler, çöp içerikleri, temizleme ürünleri, sağlık ve kozmetik ürünler, alkalın batarya/piller, nikotin/sigara/tütün, bitkiler, pestisitler gibi) ve dış mekan (Dış mekana erişimi sınırlı ve sınırsız olan hayvanlar arasında maruz kalınabilecek maddeler arasında farklılık bulunmaktadır. Peyzaj bitkileri, çim/bitki bakım ürünleri, kompost yığınları, havuz ürünleri, antifrizler, ızgara ürünleri, ortamdaki mantar, pestisitler) olmasına göre değişir. Bu kapsamda depolama alanları, kapı/çitlerinin açık olması, gıdaların renk ve bütünlüğündeki bozulmalar, suya karışabilecek maddeler kontrol edilmelidir. Fail-mağdur-olay arasındaki ilişkinin tespitinde yarayacak, mahkemede delil olarak kullanılabilecek canlı veya cansız nesneleri

ifade eden maddi delillerin (beyan, belge, belirti) toplanması önemlidir. Adli veteriner hekimlik yönüyle, detaylı çevre analizi ile birlikte olay yerinin fotoğraf/videoya çekilmesi, çevre ile ilgili notlar (ısı, yağış, nem vs), barındığı yerin özellikleri (yem/su kaplarının durumu, ulaşılabilirliği), etrafta kusma, idrar, dışkılama izlerinin bulunması durumları titizlikle kaydedilmelidir. Analitik değerlendirmelerin sonuçlarını yorumlarken ise bazı maddelerin bazı dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunabileceği (ör, bromethalin vücut yağında dağılır) göz önünde bulundurulmalı, kandaki konsantrasyonun tespit limitinin altına inebileceği düşünülmeli ve numune değerlendirilmesi dikkatli yapılmalıdır. Ana bileşik/metabolitin biyotransformasyon ve atılma yolları göz önünde bulundurularak (idrar, feçes, süt, yumurta gibi) maruziyetten birkaç saat içerisinde/ birkaç haftaya kadar analiz edilebileceği (maddenin yarı ömrüne bağlı olarak) değerlendirilmelidir (5, 6). Emilmeyen ksenobiyotikler, gastrointestinal kanaldan mediastinal damarlara ve kardiyak dokuya gelerek, antemortem sistemik kan konsantrasyonlarından daha yüksek düzeyde ilaç bulunmasına neden olabilir.

Ölüm sonrasında antemortem rezervuarlardan, ilaçların kana karışmasıyla ilaç konsantrasyonunda oluşabilecek değişiklikleri kapsayan **post mortem redistribusyon** (PMR-postmortem yeniden dağılım fenomeni) kapsamında da ilaç konsantrasyonlarında değişiklikler olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (7). Bu kapsamda emilmemiş ksenobiyotik içeren mide ve rumen içerikleri (geviş getirilen), agonal aşamada perimortem olarak inhale edilerek ya da post mortem muayene sırasında manipülasyon hatası ile hava yolları be akciğere geçebilmekte, kardiyak kana aktarılabilir. Akciğerler bazı ksenobiyotikler için rezervuar görevi görebilmekte (makrolid antibiyotikler), karaciğerdeki ilaçlar da hepatik venler ya da vena cava ile kardiyak kana karışabilmektedir. Canlı hayvanda digoksin ve morfin miyokarda birikirken, postmortem difüzyon ile kardiyak kanda yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmektedir. PMR'yi etkileyen ilacın dağılım hacmi, lipofilitesi, pKa değeri, metabolizması gibi pek çok faktör beşeri hekimlikte detaylı olarak çalışılmış ancak veteriner hekimlikte genellikle göz ardı edilmiştir. İnsan ve hayvanlarda morfolojik ve moleküler farklılıkların PMR farklılıklarına neden olabileceği göz önünde bulundurulmalı ve karar aşamasında değerlendirmelidir (8). Bu derlemede, Munchausen by Proxy sendromu (MPS), Veteriner hekim tarafından farklı gerekçelerle yapılan kötü uygulamalar (malpractice),

suistimal edici maddelere bağımlı hayvanlar (eğitim sırasında- uyuşturucu/patlayıcı madde arama köpekleri, araştırma sırasında- toksisite/bağımlılık araştırmaları, hayvan sahibinin kasti ve bilinçli taksir uygulamaları-raver hayvanlar), paket vücut sendromu (maddelerin yasadışı kaçakçılığı ya da transport için hayvanların kullanılması) özetlenecektir.

1. Veteriner Hekimlik Yönüyle Munchausen by Proxy (Vekaleten hastalık) Sendromu

İstismarın gizli nedenleri arasında yer alan ve insanlarda görülen psikolojik bir rahatsızlık olan Münchausen Sendromu adını, 18 yy'da yaşayan Alman Baron Karl von Munchausen'den almaktadır. Katıldığı Rus-Osmanlı savaşında yaşadıklarını çevresine abartılı bir şekilde anlatan ve kendini yaşananların merkezine koyan Munchausen'in hikayelerinin yalan olarak ortaya çıkması onu ünlü yapmış ve kendi adıyla anılacak bir sendromun literatüre girmesine neden olmuştur. Hastanelerde dolaşıp gereksiz yere tedavi almak isteyen hastaları tanımlamak için ilk kez 1951 yılında Richard Alan John Asher tarafından bu isim ile kullanılmıştır. (9). Munchausen sendromunda kişi kendisine yönelik ilgi için hareket eder, "by proxy" (MBP) de ise kendi otoritesi altındakiler (çocuk, hayvan) üzerinden ilgi çekmek ister. Bu kişilik bozukluğu çocuklarda ve hayvanlarda ölümle sonuçlanabilir. Hastalık semptom ve belirtileri, hayvan sahiplerinin kendisi tarafından oluşturulan ve farklı motivasyonlar (işten kaçma, finansal kaynak, tazminat, ilgi arama, anabolik steroid, sempatomimetik, kas gevşetici, nöroleptik, tranklizan madde gibi ilaç temini) için kullanılabilir. İlaç elde etme motivasyonu ile bağımlı hayvan sahibinin kliniğe gelerek veteriner hekime köpeğinde ses fobisi (şimşek ve benzeri gürültülerde garip davranıyor) olduğunu belirterek tranklizan ilaç reçetelendirmesi istenmesi, köpekte öksürük şikayetiyle gelen bir opiyat bağımlısı hayvan sahibinin hidrokodon ya da butorfanol talebi, köpekte zayıflık şikayetiyle gelen hayvan sahibinin anabolik steroid talebi gibi, huzursuz davrandığını iddia ettiği köpeği için sahibinin antidepresan yazdırılmasının istemesi gibi örneklerde hayvanlar genellikle pasif katılımcı olarak bulunmaktadır. MBP hastalarının genellikle kadın olduğu, ilaç konusunda bilgili ve tıbbi konuşmaları ile veteriner hekimi etkilediği tespit edilmiştir (10). Veteriner hekimler, internetin bulgu/senaryoları oluşturmada önemli bir kaynak olduğunu, hayvana uygulanan ilaçların dozlarının titizlikle kontrol edilmesi ile vaka takibinin yapılması ve hayvan sahiplerinin semptomlarını (sinirlilik, diğer fiziki belirtiler gibi) değerlendirmesi gerekliliğini mutlaka göz önünde bulundurmalıdır (11). Veteriner hekimler tarafından farklı gerekçelerle

ve farklı senaryolar kapsamında, özellikle finansal getiri amacıyla yapılan kötü ilaç/tedavi uygulamaları (malpractice) da yine MBP kapsamında değerlendirilebilir (12).

2. Suistimal Edilen Maddeler

Suistimal edici maddelere hayvanların maruziyeti; eğitim sırasında (uyuşturucu/patlayıcı madde arama köpekleri), araştırmalar sırasında (toksikite, bağımlılık araştırmaları); psikososyal bozuklukları olan hayvan sahibi nedeniyle ya da kazara (dikkatsizlik nedeniyle unutma, açıkta bırakma gibi) olabilmektedir(13). Madde istismarına yönelik çeşitli hayvan modelleri bulunmakla birlikte yaygın kullanılan türler sıçan ve köpeklerdir, uygulama yolu ise hayvan türü ve araştırılan maddeye göre değişir (alkol-oral, eroin-damar içi, nikotin-inhalasyon gibi) ve ödül yolağı ise genellikle dopaminerjik yollardır (kronik uygulamalarda diğer yollar da değerlendirilebilir). Araştırma amacıyla kullanılan tüm hayvan modellerinde olduğu gibi bu araştırmalar da 4 R prensibini (Reduction, Refinement, Replacement, Responsibility) izlemektedir (14, 15). Psikolojik bozuklukları olan hayvan sahipleri hayvanlara alkol veya diğer suistimal edilebilen ilaçları, hayvanların bu maddelerden keyif alacağını düşünerek ya da hayvana uyguladıktan sonraki halini izlemekten keyif aldığı için verebilmektedir (13). Suistimal edilen maddeler için veteriner hekimin kliniğe gelen hayvan sahibini de gözlemlemesi gerekir. Genel klinik bulguların içerisinde genişlemiş/daralmış pupil, sık burun çekme/burun akıntısı, kırmızı gözler, iğne izleri, öfori, hiperaktivite, klinik odasını sık terketme, burun çevresinde beyaz toz gibi bulgular dikkati çekerse, mutlaka hayvanın bulguları da dikkatle suistimal edici madde olasılığı yönünden değerlendirilmelidir. Ancak hayvanlar ve insanlardaki klinik bulguların tamamen birbirinden farklı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (opiyatlarda insanda pupil daralması ve sedasyon görülürken kedilerde pupil genişlemesi ve MSS uyarımı görülür gibi). Bu maddelerin analizini yapan bir laboratuvar pet hayvanları için bulunmamaktadır, doping kontrolde ise sadece atlar için değerlendirme yapılabilmektedir. Dolayısıyla beşeri laboratuvara (her laboratuvar kabul etmeyebilir), gönderildikten sonra alınacak sonuçların yorumlanması (kinetik parametrelerin, metabolitlerin farklı olması nedeniyle sonuçlar değişebilir) aşamasında yasal yaptırımı bulunmamaktadır. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada çoklu uyuşturucu insan idrar test kitinin köpeklerde de aynı ilaç grupları için (barbitüratlar, opiyatlar, benzodiyazepinler, amfetamin ve metamfetaminler) duyarlı sonuç verdiği, GC-MS kullanılarak onaylanmış ve

sahada hızlı ve güvenilir olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Aynı çalışmada kullanılan test kiti köpeklerde marijuana (kannabinoid) ve metadon (sentetik opiyat) için duyarlı bulunmamıştır (16). Veteriner hekim, suistimal edilen maddelerle istismarı şüpheli olan durumları mutlaka ilgili emniyet birimiyle temas ederek bildirmelidir. En yaygın suistimal edilen maddeler arasında kokain, esrar, Ecstasy (MDMA or 3,4-Methylenedioxymethamphetamine), opiyatlar, amfetamin benzeri ilaçlar, bulunmaktadır(13, 17–19). Bu maddelerin toksisitesine ilişkin değerlendirme çok detaylı bir konu olması gereği ile bu bildiri kapsamında sunulmamıştır. Birleşmiş Milletler raporuna göre, Afganistan’da nüfusun %8 i (global ortalamanın iki katından fazla) eroin, opiyat ve diğer ilaçlara bağımlı durumdadır ve başta opiyat olmak üzere üretim yapılmaktadır (20), buna paralel şekilde buradaki köpeklerde de bağımlılık oranı oldukça yüksektir (21) . Suistimal edilen maddeler ve petler arasındaki ilişki kapsamında “**raver hayvanlar**” olarak sınıflandırılacak bir grup da değerlendirilebilir. Bu grup içerisinde özellikle elektronik müzik festivallerinde ve kapalı alanlarda yine hayvan sahiplerinin hayvanların keyif alabileceğini düşünerek uyguladıkları yeni nesil psikoaktif maddelere (sentetik katinonlar, sentetik kannabinoidler, feniletilaminler, piperazinler, ketamine, kratom, khat, Salvia divinorum gibi bitkisel maddeler vb.) (22) maruziyet durumu söz konusu olabilmektedir. Hayvanlarda yüksek müzik ve ilacın etkisiyle saldırganlık hali artabilmektedir. Özellikle narkotik köpeklerinin bu gibi mekanlara gitmesi sonucunda yine hayvanlar toksisiteler görülebilmektedir (23).

Hayvan istismarına ilişkin, artan adli toksikoloji vakaların sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi ve sonuçlandırılabilmesi için; veteriner hekimliği eğitimi kapsamında öğrencilerin bu konuda yeterli donanıma sahip olacak eğitimi alması, suistimal edilen ve hekimlikte kullanılan ilaç ve maddelerin analizinin yapıldığı veteriner toksikoloji laboratuvarlarının kurulması önerilmektedir.

3. Paket vücut sendromu- PVS (Body packers- Pack mules)

PVS, maddelerin gastrointestinal yollarına (ağızdan, anüse dek tüm sindirim sistemi), dışı genital organa (vajina) ya da diğer organlara (periton, kulak vb) özellikle yasadışı kaçakçılık (transport) amacıyla konularak taşınması işlemidir. Bu yöntemle kaçakçılığı en sık yapılan yasadışı maddeler arasında ise kokain birinci sırayı almaktadır. Kokaini eroin izlemektedir.

Bazı ender olgularda kaçakçılığı yapılan madde esrardır. Vücut içerisinde bu tür maddeleri muhafaza edebilmek için genellikle prezervatif, lateks eldiven ya da oyuncak balonlar tercih edilmektedir. Sindirim sistemden doğal yolla çıkması hayvan türüne göre değişebilmekte; ancak bu sürenin uzatılabilmesi için antikolinerjik ilaçlar (bağırsak hareketleri yavaşlatılarak) uygulanabilmektedir. Paketi teslim edecekleri noktaya vardığında vücuttan bir an önce çıkartabilmek maksadı ile dışkılamayı arttırıcı ilaçlardan ve lavmanlardan yararlanmaktadırlar. Hayvanlar ise genellikle öldürülmektedir. Teşhis genellikle radyografi ile konulur. Özellikle köpeklerde ilaç/maddeler cerrahi olarak peritona yerleştirildiklerinden, uygulama sırasında aseptik tekniklerin uygulanamaması sonucu enfeksiyon görülebilmektedir. Ayrıca paketlerin patlaması, düzgün paketlenememesi sonucu paketlenen maddenin emilimiyle birlikte akut zehirlenmeler ve ölüm görülebilmektedir(24, 25). Örnek vakalar arasında 1993 yılında Miami'de 1.5 metre Boa yılanı içerisinde 36 kg kokain, 2004 yılında Peru'da dev kalamamlar içerisinde toplam 700 kg kokain, 2005 yılında Kolombiya'da 6 köpek yavrusunda eroin, 2007 yılında Amsterdam'dan Perudan gelen 100 ölü böcek içerisinde 300 g kokain verilebilir. PVS dışında dışarıdan bağlanarak da hayvanlar kurye olarak kullanılabilir. 2011 yılında Bukaramanga hapishanesinde, 2013 yılında Moldova'da Pruncul hapishanesinde kedi üzerinde esrar, Rusya Tatristanda hapishanedeki eroin taşımacılığı örnek olarak verilebilir.

Sonuç

İyi veteriner hekim uygulamaları kapsamında veteriner toksikolojide “mükemmel üçleme”; iyi anamnez, klinik semptomların doğru okunması, laboratuvar bulgularıyla doğrulanan maddeye yönelik en uygun tedavi uygulamaları iken; veteriner adli toksikolojide “mükemmel koordinasyon”; hayvan bakıcısı/sahibi, veteriner hekim, veteriner patoloğ ve veteriner toksikoloğ koordinasyonudur. Hayvan istismarına ilişkin, artan adli toksikoloji vakalarının sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi ve sonuçlandırılabilmesi için; veteriner hekimliği eğitimi kapsamında öğrencilerin bu konuda yeterli donanıma sahip olacak eğitimi alması, suiistimal edilen ve hekimlikte kullanılan ilaç ve maddelerin analizinin yapıldığı veteriner toksikoloji laboratuvarlarının kurulması önerilmektedir.

Kaynaklar

1. Rogers E. Forensic toxicology. In: Bailey D, editor. Practical veterinary forensics. Wallingford: CABI; 2016. p. 146–58. [cited 2019 Aug 15] Available from: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20163206702>.
2. Gwaltney-Brant SM. Epidemiology of Animal Poisonings in the United States. *Vet Toxicol*. 2018;37–44.
3. Gallagher B, Allen M, Jones B. Animal abuse and intimate partner violence: researching the link and its significance in Ireland - a veterinary perspective. *Ir Vet J*. 2008;61(10):658–67.
4. Gerdin JA, McDonough SP. Forensic Pathology of Companion Animal Abuse and Neglect. *Vet Pathol*. 2013;50(6):994–1006.
5. Merck MD. ANIMAL CSI: AN INTRODUCTION TO VETERINARY FORENSICS IN THE INVESTIGATION OF ANIMAL CRUELTY. Gainesville, FL, USA: 2019. 12 p. [cited 2019 Aug 15] Available from: https://c.ymcdn.com/sites/wsvma.site-ym.com/resource/resmgr/imported/Animal_CSI_Merck.pdf.
6. McDonough SP, McEwen BJ. Veterinary Forensic Pathology. *Vet Pathol*. 2016;53(5):875–7.
7. Efeoglu Özşeker P, Dağlıoğlu N, Gülmen MK. Postmortem Redistribution of Drugs Toxicological Sampling Data Assessment and Interpretation. *Bull Leg Med*. 2015;20(2):123–123.
8. Rogers E, Stern AW. Veterinary Forensics: Investigation, Evidence Collection, and Expert Testimony - Google Books. 1st ed. CRC Press, USA; 2017. 419 p. [cited 2019 Aug 15] Available from: https://books.google.com.tr/books?id=sCtEDwAAQBAJ&pg=PT453&lpg=PT453&dq=postmortem+redistribution+veterinary&source=bl&ots=FL3JU059TP&sig=ACfU3U34gSpvFMD-OpeTyhUWrl1IZmmEAQ&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwju6pud_4TkAhUit4sKHYkFCqAQ6AEwBXoEC_AkQAQ#v=onepage&q=postmor.
9. Tunc T. Münchausen by proxy sendromu. *Ankara Barosu Derg*. 2018;6:18–24.
10. Milani M. Problematic client-animal relationships: Münchausen by proxy. *Can Vet J*. 2006;47(12):1161.
11. Oxley JA, Feldman MD. Münchausen by proxy by internet and pets. *Vet Rec*. 2016;178(26):663–4.
12. Schaffner J, Fershtman J. Litigating Animal Law Disputes: A Complete Guide for Lawyers - Joan Schaffner - Google Books. American Bar Association; 2009. 584 p. [cited 2019 Aug 15] Available from: https://books.google.com.tr/books?id=e1gyn_OJKIsC&pg=PA168&lpg=PA168&dq=munchausen+by+proxy+in+which+the+veterinarian+injected+horses+with+substance&source=bl&ots=hMCKqzM048&sig=ACfU3U338IHmUTqEreCz67G7EW_DYZYe_Q&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwj3gKr0iYXkAhVCwsQBH.
13. Khan S. Toxicities from Illicit and Abused Drugs - Toxicology - Veterinary Manual. MSD Man. 2019; [cited 2019 Aug 16] Available from: <https://www.msdsvetmanual.com/toxicology/toxicities-from-human-drugs/toxicities-from-illicit-and-abused-drugs>.
14. Lynch WJ, Nicholson KL, Dance ME, Morgan RW, Foley PL. Animal models of substance abuse and addiction: implications for science, animal welfare, and society. *Comp Med*. 2010;60(3):177–88.
15. Spanagel R. Animal models of addiction. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(3):247–58.
16. Teitler JB. Evaluation of a Human On-site Urine Multidrug Test for Emergency Use With Dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2009;45(2):59–66.
17. Fitzgerald KT, Bronstein AC, Newquist KL. Marijuana Poisoning. *Top Companion Anim Med*. 2013;28(1):8–12.

- 18.Meola SD, Tearney CC, Haas SA, Hackett TB, Mazzaferro EM. Evaluation of trends in marijuana toxicosis in dogs living in a state with legalized medical marijuana: 125 dogs (2005-2010). *J Vet Emerg Crit Care*. 2012;22(6):690–6.
- 19.Castellani S, Ellinwood EH, Kilbey MM. Behavioral analysis of chronic cocaine intoxication in the cat. *Biol Psychiatry*. 1978;13(2):203–15.
- 20.United Nations. World Drug Report 2018-1 Executive Summary and Policy Implications. Vienna: 2018. 34 p. [cited 2019 Aug 16] Available from: <https://www.unodc.org/wdr2018>.
- 21.Ghubar G. Kabul Addicts Using Drugged Dogs To Keep Warm | TOLONews. Tolonews. 2017; [cited 2019 Aug 16] Available from: <https://www.tolonews.com/afghanistan/kabul-addicts-using-drugged-dogs-keep-warm>.
- 22.Daş M. Yeni Nesil Psikoaktif Ajanlar ile Zehirlenmeler Dr. Murat DAŞ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Acil Tıp Anabilim Dalı. 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi. Antalya: 2017 [cited 2019 Aug 16] Available from: http://file.atuder.org.tr/_atuder.org/fileUpload/nzrc9xlXdycl.pdf.
- 23.Geanous J. Police dog went to rave and got high on ecstasy | Metro News. Metro news. 2019; Available from: <https://metro.co.uk/2019/01/11/police-dog-went-to-rave-and-got-high-on-ecstasy-8334714/>.
- 24.Hovda LR, Brutlag AG, Poppenga RH, Peterson KL. Blackwell's five-minute veterinary consult clinical companion. Small animal toxicology. 2016. 962 p. [cited 2019 Aug 16] Available from: https://books.google.es/books?hl=tr&lr=&id=hxKACgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA286&dq=packed+mule+syndrome+dogs&ots=iRE1z8u4Ca&sig=NyBjVaqqUxf2KV45AcuALwNef_U#v=onepage&q&f=false.
- 25.Koehler SA, Ladham S, Rozin L, et al. The risk of body packing: a case of a fatal cocaine overdose. *Forensic Sci Int*. 2005;151(1):81–4.

Geleneksel Veteriner Farmakoloji Eğitime Alternatif Yöntemler: Ankara Üniversitesi'ne Bir Öneri

Aytaç Ünsal ADACA

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı, 06110,
Dışkapı, Ankara

Özet: Türkiye’de bilimsel veteriner hekimliği eğitiminin 1842 yılında İstanbul’da doğmasıyla birlikte, veteriner hekimliğinde farmakoloji eğitiminin temelleri de atılmıştır. Günümüzde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesindeki Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’nda dört farklı ders Türkçe ve İngilizce olmak üzere teorik ve uygulamalı olarak verilmektedir.

Çalışmada farklı uluslararası bilimsel veritabanları kullanılarak dünyada paramedikal mesleklerde verilen alternatif farmakoloji eğitim yöntemleri araştırılmıştır. Dünyada farmakoloji eğitimi için aktif öğrenmeyi ve öğrenci merkezli öğrenmeyi teşvik edici birçok yöntemin kullanıldığı tespit edilmiştir.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi farmakoloji eğitimi için vaka temelli öğrenme, senaryo temelli öğrenme, probleme dayalı öğrenme, küçük grup tartışmaları, simülasyon temelli öğrenme (oyunlaştırma- standart hasta ile görüşmeler- ciddi oyunlar-sanal hastalar), ters yüz edilmiş sınıf, bilgisayar destekli öğrenme, elektronik öğrenme, web tabanlı öğrenme gibi alternatif yöntemlerin seçilerek müfredata eklenmesinin eğitim sisteminde büyük bir yenilik olacağı öngörülebilir.

Yeni eğitim öğretim döneminde teorik eğitimi desteklemek üzere senaryo temelli öğretim, vaka temelli öğretim, probleme dayalı öğretim gibi yöntemlerin kullanılmasının başarıyı arttırıcı etkisi olacağı tahmin edilmektedir. Reçete yazma gibi veteriner hekim-hasta sahibi etkileşiminde gerekli olan konuların öğretilmesinde oyunlaştırma, standart hasta ve sanal hasta simülasyonlarının kullanılmasının öğrenciler tarafından ilgi çekici olarak görülebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Alternatif eğitim yöntemleri, Farmakoloji eğitimi, Veteriner hekimliği eğitimi.*

Alternative Methods for Traditional Veterinary Pharmacology Education: A Proposal for Ankara University

Abstract: When the scientific veterinary education in Turkey was born in 1842 in İstanbul, veterinary pharmacology education has also started. Today, the Department of Pharmacology and Toxicology at the Faculty of Veterinary Medicine of Ankara University gives four different courses in Turkish and in English via theoretical and practical learning methods.

In this study, alternative pharmacology education methods of paramedical professions have been examined by searching in different international scientific databases. It has been determined that many alternative methods are used to promote active learning and student-centered learning for pharmacology education.

Addition of alternative veterinary pharmacology training methods for University of Ankara such as case-based learning, scenario-based learning, problem-based learning, small group discussions, simulation based learning (role play, standardized patients, serious games, virtual patients), flipped classroom, computer assisted learning, e-learning, and web based learning to the pharmacology curriculum may be a major innovation in the veterinary education system.

It is estimated that the use of methods such as case-based learning, scenario-based learning, and problem-based learning to support theoretical education will improve the students' success in pharmacology. Teaching of the some issues essential for veterinarian-client interaction such as prescribing drugs, the use of role play, standardized patient and virtual patient simulations may be found interesting by the students.

Keywords: *Alternative training methods, Pharmacology education, Veterinary education.*

Giriş

Türkiye’de bilimsel veteriner hekimliği eğitiminin 1842 yılında İstanbul’da doğmasıyla birlikte; en önemli ilaçların öğrencilere gösterilmesine dayanan farmakoloji eğitiminin temelleri de atılmaya başlanmıştır. Dersler, ilk yıllarda (1842-1848) okulun kurucusu Godlewsky tarafından, 1849 yılından itibaren ise sırasıyla Dubroca, dönemin Tıp Mektebi muallimleri, Muallim Minas, Dr. Nuri, Besim Paşa, Ali Rıza Uğur, Muallim İsmail (Giritli) tarafından verilmiştir. Yüksek Ziraat Enstitüsü’nün (YZE) Ankara’da 1933 yılında kurulmasıyla birlikte ilgili dersler İç Hastalıkları Enstitüsü bünyesinde, 1938 yılından itibaren Fizyoloji-Farmakoloji Enstitüsü’nde verilmiştir. Müstakil bir Farmakoloji ve Toksikoloji Enstitüsü’nün kurulması ancak 1939 yılında gerçekleşmiş, Enstitünün müdürlüğüne Ord. Prof. Dr. Fazlı Faik Yeğül getirilmiştir (Erk ve Dinçer, 1970). Bu Enstitü; Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (AÜVF) bünyesindeki Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü (1952), Farmakoloji ve Toksikoloji Bilim Dalı (1981) ve günümüzdeki adıyla Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’nın (1988) köklerini oluşturmuştur (Anonim, 2019a).

Türkiye’de Ağustos 2019 tarihi itibarıyla aktif eğitim-öğretim faaliyetlerini sürdüren 30 veteriner fakültesinin (Kırgızistan-Türkiye Manas ve Yakın Doğu Üniversiteleri dahil) 29’unda Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’nın mevcut olduğu ve/veya ilgili derslerin verildiği görülmektedir¹. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’nın lisans derslerinin (*Medikal Botanik, Farmakoloji I ve Reçete Bilgisi, Farmakoloji II, Toksikoloji ve Çevre Koruma*) Türkçe ve İngilizce olarak teorik eğitim ve/veya uygulama yöntemlerinin birleşimi şeklinde verildiği anlaşılmaktadır (Anonim, 2019b). Teorik derslerin dersi alan tüm öğrenciler ile ve bir öğretim üyesi liderliğinde geleneksel yöntemle; uygulama derslerinin ise tüm sınıf iki gruba ayrılarak ve bir öğretim elemanı liderliğinde işlendiği tespit edilmiştir². Ancak, Anabilim Dalı bünyesinde geleneksel yöntemle alternatif olarak, 2016-2017 Eğitim-Öğretim yılında Toksikoloji ve Çevre Koruma dersi kapsamında alternatif bir eğitim yöntemi olan vaka temelli öğretimin deneyimlendiği bilinmektedir³.

¹ Söz konusu bilgiye, her fakültenin resmi internet sayfası aracılığıyla adı geçen Anabilim Dalı sorgulanarak ulaşılmıştır. Tek istisna olan ve 2019 yılında ilk kez öğrenci kabul eden Dokuz Eylül Üniversitesi Veteriner Fakültesi için ilgili bilgiye ulaşılamamıştır.

² Söz konusu bilgiye, Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Begüm Yurdakök Dikmen ile 20.08.2019 tarihinde yapılan yüz yüze görüşmede ulaşılmıştır.

³ Söz konusu uygulama Doç. Dr. Begüm Yurdakök Dikmen’in sorumluluğunda hayata geçirilmiş, uygulama sırasında bu makalenin yazarı da derse davet edilmiş ve uygulamayı takip etme fırsatı bulmuştur.

Yapılan bu araştırma ile, özelde AÜVF, genelde ise Türkiye’de eğitim-öğretim faaliyetlerini sürdüren tüm veteriner fakültelerinin Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı bünyesinde verilen lisans ve/veya lisansüstü derslerde uygulanmak üzere farklı eğitim yöntemleri tanımlamak ve alan akademisyenlerinin dikkatini çekmek amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma, dünyada paramedikal mesleklerde klinik farmakoloji/farmakoloji ve toksikoloji eğitiminin güncel öğretim modellerini araştırmak ve AÜVF için yeni yöntemlerin uygulanacağı bir yöntem önermek üzere kurgulanmıştır. Bu amaçla ScienceDirect, EBSCO, PubMed, Web of Science, Scopus başta olmak üzere çeşitli veri tabanlarından ulaşılabilen alan dergileri Türkçe “*farmakoloji eğitimi, veteriner farmakoloji eğitimi*”, İngilizce “*pharmacology education, veterinary pharmacology education*” anahtar kelimeleriyle 1979- Ağustos 2019 tarih aralığı çerçevesinde taranmıştır. Ulaşılan makaleler incelenmiş, AÜVF için uygun olabileceği düşünülen eğitim yöntemlerine çalışmanın bulgular kısmında yer verilmiştir.

Bulgular

Günümüzde veteriner hekimliğinde farmakoloji eğitiminde laboratuvar uygulamalarında gerçek hayvan kullanımı yerine sanal laboratuvar (Dewhurst, 2008) uygulamalarına rastlanmaktadır. Çevresel toksikoloji dersi için ilgili kurumların veri tabanlarından yararlanılarak vaka temelli öğretim ve yerinde öğrenme yöntemlerinin (Keck, 2006) tercih edilebileceği, derslerde öğreticinin liderlik edeceği tartışma oturumlarının ve bilgisayar destekli öğretim modelinin kurulabileceği, kanıta dayalı eğitimin ve aktif öğrenme sürecinin (Lanusse, 2006) teşvik edilebileceği tespit edilmiştir.

Birleşik Krallık’taki tıp fakültelerinde, 1990lı yılların başında verilen farmakoloji eğitiminin çoğunlukla teorik olduğu, problem çözmeye dayalı eğitimin daha az tercih edilen bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (Walley ve ark., 1994). İkininli yılların sonunda, 30 tıp okulundan 23’ünde öz yönetimli öğrenme, 21’inde klinik temelli öğrenme, 20’sinde küçük grup tartışması, 19’unda ise problem temelli öğrenme yönteminin kullanıldığı bilinmektedir. Bu okullarda klinik uygulamalar, problem temelli öğrenme yöntemi, küçük grup tartışmaları,

çevrimiçi öğrenme metotları, seminerler ve reçete yazma uygulamalarının yapıldığı bilgisine ulaşılmıştır (O'Shaughnessy ve ark., 2010).

Simülasyon temelli öğretim kapsamında öğrencilerin bilgisayarda çevrimiçi öğrenme faaliyetlerine katılabildikleri, gerçeğe yakın ancak sanal ortamları keşfedebilecekleri, öğrencilerin birbirleriyle oyunlaştırma yaparak hasta ve sağlık personeli etkileşimini yaşayabilecekleri, hasta rolü yapan aktörlerle (standart hastalar) ve/veya hasta simülatörleriyle görüşme yapabilecekleri ve bilgisayar ortamında hazırlanan olan ciddi oyunları (*serious games*) oynayarak eğitim alabilecekleri bilinmektedir (Meyer ve ark., 2017). Gerçeğe çok yakın/yüksek duyarlılıklı simülasyonlar ile öğrencilerin etkili öğrenme kapasiteleri ve öğrendiklerini uzun süre akılda tutmaları pozitif ilişkili bulunmuştur (Arcoraci ve ark., 2018). Gerçeğe yakın/sanal hasta (*virtual patient*) senaryoları kullanılarak, öğrenciler güvenli bir ortamda, hata yapma olasılığından endişe duymadan eğitim alma şansına sahip olabilmektedir (Nicolaou ve ark., 2019).

Yapılan bir araştırmanın sonuçları, klinik farmakoloji vakalarına yönelik yazılan senaryolarla verilen eğitimin, öğrencilerin kendi iradeleriyle öğrenmeleri ve teorik bilgiyi daha iyi algılayabilmeleri açısından yararlı bulunduğu dair kanıtlar sunmaktadır (Britto ve Subash, 2017).

Öğrencilerin derse gelmeden önce ders hakkında hazırlık yapması, sınıfta aktif öğrenme ile edineceği bilgilere ders öncesinde hâkim olması esasına dayanan ters yüz edilmiş sınıf yönteminin; öğrencinin problemi tanımlayabilmesi ve çözüm üretebilmesi, bilgiye ulaşabilmek için araştırma yapabilmesi, değişkenler arasında ilişki kurabilmesi gibi birçok avantajı bulunmaktadır (White ve ark., 2017).

Probleme dayalı öğrenme yöntemi; grup arkadaşları arasında işbirliği yapma, birebir etkileşim içinde olma, takım ruhu kazanma, iletişim kurabilme gibi sosyal becerileri geliştirmekle birlikte (Gill ve ark., 2019); kendi kendine öğrenme, problem çözebilme, bilgiyi kullanabilme, analitik düşünebilme, eleştirel düşünebilme gibi birçok becerinin de öğrenme sürecine dâhil edilmesine olanak sağlamaktadır (Liu ve ark., 2019, Hasamnis ve ark., 2019).

Vaka temelli öğretimi destekleyen (Vare ve ark., 2017; Mukku ve ark., 2018) ve teorik bilgilerin bu yöntem vasıtasıyla klinik uygulamalara yansıtılabileceğini savunan bilgiler literatürde yer almaktadır (Preston ve ark., 2019, Meyer ve ark, 2017, Hasamnis ve ark., 2019).

Hindistan’da birçok ilaç örneğinin sergilendiği farmakoloji müzesi yardımıyla eğitimin etkinliğinin değerlendirildiği ve 173 öğrencinin katıldığı bir araştırmada, katılımcıların %75’inden fazlası müzeyi ilgi çekici bulmuş, %50’sinden fazlası ise müzenin çeşitli ilaç formlarının hatırlanmasında yardımcı olduğunu ifade etmiştir. Ancak, öğrencilerin müzeyi kısmen eğitim-öğretim aracı olarak gördükleri bildirilmelerinin ardından araştırmacılar, müzelerin daha ilgi çekici hale getirilebileceği ve web üzerinden ulaşılabilecek e-müzelerin oluşturulabileceği konusuna dikkat çekmiştir (Parmar ve ark., 2018).

Hemşirelik öğrencilerin, uygulama derslerini canlı izlemeleri ve video kayıtları üzerinden incelemeleri arasında yapılan değerlendirmede, video kaydıyla öğrenen öğrencilerin diğerlerine göre daha başarılı oldukları ve tercihlerini video kayıtlarından yana kullandıkları görülmektedir (Devi ve ark., 2013).

Dış hekimliği öğrencileriyle yürütülen bir araştırmada, geleneksel yöntemden farklı olarak web tabanlı öğretim yöntemini tercih eden öğrencilerin azınlıkta olduğu dikkat çekmektedir. Aynı çalışmada, dersin interaktif olarak işlenmesinin ve öğrencinin öğretici ile birebir çalışmasının en ilgi çekici öğrenme yöntemi olduğu da belirtilmiştir (Patel ve Katlam, 2017).

Teknoloji ve sosyal medyanın kullanıldığı bir çalışmada, öğrenciler Youtube’da yayımlanmak üzere eğitimleriyle ilgili 4-6 dakikalık videolar çekmeleri konusunda görevlendirilmiştir. Bu uygulama, farmakoloji alanında başarı getirmesinin yanı sıra grup çalışmasını teşvik etme, yaratıcı olma, eğlenirken öğrenme/öğrenirken eğlenme ve özgüven kazanma gibi birçok olumlu çıktıya da olanak sağlamaktadır (Zamora ve ark., 2017).

Başka bir çalışmada; hemşirelik öğrencileri için QR (*quick response*) kodlarıyla eğitim yöntemin kullanıldığı ve bu yeni eğitim yönteminin etkinliği literatürde yer almıştır. QR kodlarının hızlı okunabilirliği, düşük maliyetli oluşu, istenilen zamanda ulaşılabilirliği, öğrencinin öğrenme yöntemini kişiselleştirebilmesi gibi kriterler bu yenilikçi yöntemin avantajları arasında yer almaktadır (Lin ve ark., 2017).

Elektronik öğrenme yöntemine farklı bir örnek olarak medikal amaçlı kullanılan akıllı telefon uygulamaları verilebilir. Bu amaçla, içinde Google Play Store ve iOS Appstore gibi popüler merkezlerin de yer aldığı altı farklı akıllı telefon uygulama yükleme merkezinin toplam 306 farklı uygulaması olduğu saptanmıştır (Haffey ve ark., 2013).

Birleşik Krallık'ta klinik farmakoloji eğitimini elektronik öğrenme ile vermek üzere iki farklı program geliştirilmiştir. "*Prescribe*" adı verilen ilk yazılım, klinik farmakolojinin temel ilkeleri, sık kullanılan ilaçlar, terapötik sorunlar ve reçete yazma becerilerini geliştirmek üzere kurgulanmıştır. "*Prescribing Skills Assessment*" olarak adlandırılan ikinci yazılım ise daha önceden yazılmış olan reçetelerin gözden geçirilmesi, yeni reçetelerin yazılması, ilaç dozlarının hesaplanması, ters etki prensibiyle çalışan ilaçların reçetelenmesinden kaçınma gibi konuları ele almaktadır (Maxwell, 2012). Benzer olarak elektronik öğrenme ve web tabanlı öğrenme yöntemi kapsamında, ücretsiz ve tüm dünyadan çevrimiçi olarak ulaşabilen, Farmakoloji Eğitim Projesi adı verilen web uygulaması, tüm paramedikal meslek gruplarının hizmetine sunulan bir eğitim stratejisi olarak dikkat çekmektedir (Faccenda ve ark., 2019).

Tartışma ve Sonuç

Geçmişte birçok veteriner okulunda ders içeriğinin Materia Medica aracılığıyla öğrenci merkezli ve didaktik olarak sağlandığı farmakoloji ve toksikoloji eğitiminin (Van Miert, 2006), günümüzde teknolojinin ilerlemesiyle birlikte elektronik öğrenme ve öğrenci merkezli öğrenme üzerine evrildiği/evrileceği söylenebilir.

Öğrencilerin, öğrenme sürecinde aktif olarak yer almasının daha kolay öğrenmelerine katkı sağladığı (Ghazala ve ark., 2019) gerçeğinden yola çıkılarak; farmakoloji eğitiminde iyileştirme yapılması gerekliliği göz önüne alınmalıdır. Yapılan iyileştirmenin teknolojik

tabanlı olması, elektronik öğrenmeye hizmet etmesi ve öğrenci merkezi olması (Haffey ve ark., 2013) hassasiyetine önem verilmelidir.

Alternatif eğitim yöntemleri olarak vaka temelli öğrenme, teknik gezi/yerinde ziyaret, senaryo temelli öğrenme, probleme dayalı öğrenme, küçük grup tartışmaları, simülasyon temelli öğrenme (oyunlaştırma- standart hasta ile görüşmeler- ciddi oyunlar-sanal hastalar), hasta başında/klinikte öğrenme, bilgisayar destekli öğrenme, elektronik öğrenme, çevrimiçi öğrenme, web tabanlı öğrenme gibi aktif öğrenme ve öz yönetimli öğrenme yöntemlerinin seçilerek müfredata eklenmesinin eğitim sisteminde büyük bir yenilik olacağı söylenebilir. Bahsedilen alternatif eğitim yöntemlerinden birçoğunun özelde AÜVF, genelde ise Türkiye’deki tüm veteriner fakültelerinin farmakoloji eğitiminde kullanılmasının olanaklar dahilinde olduğu düşünülmektedir. Özellikle dersi alan öğrenci sayısı sınırlandırıldığı takdirde, ters yüz edilmiş sınıf yönteminin öğrenciler arasında ilgi çekici ve öğrencinin derse olan ilgisini artırıcı etkisi olabileceği tahmin edilmektedir.

Vaka temelli, problem temelli ve senaryo temelli öğretim yöntemlerinin dünyada öğrenciler tarafından tercih edildiği (Antepohl ve Herzig, 1999; Hasamnis ve ark., 2019; Liu ve ark., 2019) bilgisine dayanarak, Türkiye için kurgulanan yeni eğitim yönteminde reçete yazma, terapötiklerin kullanımı, klinik farmakoloji, ilaç etkileşimleri gibi alt başlıklarda bu yöntemlerin ön plana alınmasının dersin anlaşılabilirliği, kliniğe uygulanabilirliği ve kolay hatırlanabilirliğine katkı sunması beklenmektedir. Yine reçete yazma gibi kliniğe yönelik veteriner hekim-hasta sahibi iletişimde gerekli olan konularda, oyunlaştırma ve standart hasta uygulamaları gibi kişilerarası etkileşim ve iletişime dayalı simülasyonların ve bilgisayar ortamında hazırlanan sanal hasta uygulamalarının öğrenciler tarafından ilgi çekici olarak görülebileceği düşünülmektedir.

Dünyadaki farmakoloji eğitim yöntemleri incelenerek, Türkiye için önerilmek üzere seçilen alternatif yöntemlerin deneme aşamalarında pilot uygulamalar olacak şekilde geleneksel yöntemle kombine olarak yer aldığı; eğitim-öğretim materyali ve elemanları açısından gerekli altyapı ve tecrübe sağlandıktan sonra ise bu yöntemlerin geleneksel yöntemin yerine kullanıldığı uygulamalarda başarı elde edilebileceği öngörülmektedir.

Kaynaklar

1. Anonim 2019a. Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Tarihçesi. <http://www.veterinary.ankara.edu.tr/farmakoloji-ve-toksikoloji-anabilim-dali/>, Accessed Date: 30.07.2019.
2. Anonim. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Programı. Erişim Adresi: <http://www.veterinary.ankara.edu.tr/ders-programi/>, 2019b. Accessed Date: 30.07.2019.
3. Antepohl W, Herzig S. Problem-based learning versus lecture-based learning in a course of basic pharmacology: a controlled, randomized study. *Medical Education* 1999; 33:106-13.
4. Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A, Minutoli L, Penna O, Amato A, Bruno R, Tripodi VF, Alibrandi A, Ingrassia PL, Santalucia P, Fodale V. Medical simulation in pharmacology learning and retention: A comparison study with traditional teaching in undergraduate medical students. *Pharmacol Res Perspect* 2018; e449.
5. Britto GF, Subash KR. The effect of student centered pharmacology teaching in the form of clinical case scenario among M.B.B.S. students. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2014; 6(2):458-61.
6. Devi ES, Mayya SS, Bairy KL, George A, Mohan MK. Comparative analysis of the outcome of two teaching-learning approaches adopted for teaching pharmacology. *International Journal of Nursing Education* 2013; 5(2):66-71.
7. Dewhurst D. Is it possible to meet the learning objectives of undergraduate pharmacology classes with non-animal models? *AATEX 14, Special Issue*, 2008; 207-12.
8. Erk N, Dinçer F. Türkiye’de Veteriner Hekimlik Öğretimi ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Tarihi. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1970; s.113-115.
9. Faccenda E, Maxwell S, Szarek JL. The IUPHAR Pharmacology education project. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2019; 105(1):45-8.
10. Ghazala Z, Kalshetty P, Vardhamane S. Evaluation of teaching methodologies in pharmacology for undergraduates: a cross-sectional analysis in a medical college of South India. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2019; 8(2):187-92.
11. Gill M, Andersen E, Hilsmann N. Best practices for teaching pharmacology to undergraduate nursing students: A systematic review of the literature. *Nurse Education Today* 2019; 74:15–24.
12. Haffey F, Brady RRW, Maxwell S. Smartphone apps to support hospital prescribing and pharmacology education: a review of current provision. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 77(1):33-8.
13. Hasamnis AA, Arya A, Patil SS. Case-based learning: Our experience in clinical pharmacology teaching. *J Pharm Bioall Sci* 2019; 11:187-9.
14. Keck G. Teaching environmental toxicology for veterinary students and veterinarians: some new trends. *J vet Pharmacol Therap* 2006; 29 (Suppl.1):15-6.
15. Lanusse C. Challenges in teaching veterinary pharmacology and toxicology: some insights from cost-free and open access public universities in Argentina. *J vet Pharmacol Therap* 2006; 29(Suppl.1):14–5.
16. Lin KY, Yang YC, Lai CY. The Use of Quick Response Codes for Teaching Pharmacology to College Nursing Students in Taiwan. *CIN: Computers, Informatics, Nursing* 2017; 35(3):152-7.
17. Liu L, Du X, Zhang Z, Zhou J. Effect of problem-based learning in pharmacology education: A meta-analysis. *Studies in Educational Evaluation* 2019; 60:43–58.

18. Maxwell SRJ. An agenda for UK clinical pharmacology: How should teaching of undergraduates in clinical pharmacology and therapeutics be delivered and assessed? *Br J Clin Pharmacol* 2012; 73(6):893–9.
19. Meyer BA, Seefeldt TM, Ngorsuraches S, Hendrickx LD, Lubeck PM, Farver DK, Heins JR. Interprofessional education in pharmacology using high-fidelity simulation. *Currents in Pharmacy Teaching and Learning* 2017; 9:1055–62.
20. Mukku LS, Alla J, Rachamanti R. Medical student's perception on teaching-learning methods of pharmacology in a medical college. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2018; 7(4):665-8.
21. Nicolaou P, McCrorie P, Nicolaou SA. Using virtual patients to integrate physiology, pathophysiology, and pharmacology in preclinical teaching. *Adv Physiol Educ* 2019; 43:277–81.
22. O'Shaughnessy L, Haq I, Maxwell S, Llewelyn M. Teaching of clinical pharmacology and therapeutics in UK medical schools: current status in 2009. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 70(1):143-8.
23. Parmar UI, Tripathi RK, Gajbhiye SV, Rege NN. Development and implementation of pharmacology museum as a teaching-learning tool: a prospective, interventional study. *J Pharmacol Pharmacother* 2018; 9:147-52.
24. Patel AP, Katlam S. Dental students' perceptions and feedback on teaching and learning pharmacology. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2017; 6(9):2250-3.
25. Preston P, Leone-Sheehan D, Keys B. Nursing student perceptions of pharmacology education and safe medication administration: A qualitative research study. *Nurse Education Today* 2019; 74:76–81.
26. Van Miert ASJPAM. The roles of EAVPT, ECVPT and the EAVPT Congresses in the advancement of veterinary pharmacological and toxicological sciences. *J vet Pharmacol Therap* 2006; 29(Suppl.1):8-9.
27. Vare VA, Kurle DG, Bagle TR, Hire RC, Shukla AO. Evaluation of teaching methods in pharmacology among MBBS students. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2017; 6(6):1352-7.
28. Walley T, Bligh J, Orme M, Breckenridge A. I. Clinical pharmacology and therapeutics in undergraduate medical education in the UK: current status. *Br J clin Pharmac* 1994; 37:129-35.
29. White PJ, Naidu S, Yuriev E, Short JL, McLaughlin JE, Larson IC. Student engagement with a flipped classroom teaching design affects pharmacology examination performance in a manner dependent on question type. *American Journal of Pharmaceutical Education* 2017; 81(9):10-23.
30. Zamora Z, Sarpy N, Kittipha P. Using YouTube in teaching pharmacology to nursing students. *Nursing Education Perspectives* 2017; 38(4):218-9.

Parazitlerde İlaç Dirençliliği ve Dirençlilik Analizleri

Arif ÇİLOĞLU

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri

Özet: Günümüzde kullanılan aşıların yetersiz olması nedeniyle, parazitler enfeksiyonlarda kullanılan ilaçla tedavi yöntemi, bu hastalıklara karşı mücadele ve korunmada sıklıkla kullanılan etkin bir metot olarak ön plana çıkmaktadır. Ancak son yıllarda özellikle bilinçsiz ilaç kullanımı, bu enfeksiyonlara neden olan parazitlerde direnç gelişimine yol açmıştır. Parazitlerde ilaç dirençliliği mekanizmaları, parazitlerin biyolojisine göre farklılık gösterebilmektedir. Parazitlerdeki ilaç direnci mekanizmaları temel anlamda; arttırılmış ilaç akışı, azaltılmış ilaç alımı, hedeflenen enzimlerdeki mutasyon olayları, metabolik düzenleme ve antiparaziter ilaçlar için hedef alanların eksikliğini içeren çeşitli olgulara dayanmaktadır. Bunun yanında, gen silme ve gen mutasyonları gibi çeşitli genetik farklılaşmalar da ilaca karşı geliştirilen direnç mekanizmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu bildiride, ilaç dirençliliğini etkileyen bu mekanizmaların yanı sıra parazitlerde meydana gelen direncin ileri teknolojik metotlarda nasıl tespit edilebildiği hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, konuyla ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar derlenerek, özellikle Türkiye’de yapılan araştırmalar ve parazitlerde ilaç dirençliliğinde meydana gelen son gelişmeler hakkında bilgi verilmiştir.

Drug Resistance in Parasites and Analyses of the Resistance

Abstract: Due to lack of effective vaccines, chemotherapy as an effective method is frequently used for control and defense against parasitic diseases. However, in recent years, resistance has developed in the parasites because of uncontrolled drug use. Drug resistance mechanisms in parasites are very inconsistent according to the biology of parasites. In general, mechanisms of drug resistance in pathogenic parasites depend on a variety of mechanisms consisting of augmented drug efflux, reduced drug uptake, mutation events in targeted enzymes, metabolic upregulation, and deficiency of the target sites for antiparasitic drugs, etc. In addition to this, various genetic mechanisms including gene deletions and gene mutations also play a crucial role in drug resistance mechanisms. Besides the mechanisms that affecting drug resistance, the aim of this paper is to give information about how resistance of parasites can be determined by advanced technological methods. In this scope, the studies in recent years were reviewed and recent advances in the drug resistance in parasites were also explained along with the studies in Turkey.

Giriş

Parazitler, kozmopolit bir yayılış gösteren, konaklarında şaşırtıcı derece çoğalabilme ve beslenebilme yeteneğine sahip mikroorganizmalardır. Parazitlerin hayatta kalma mücadelesi, konaklarında büyüme ve çoğalabilmesi ile ilişkili olmakla beraber bu davranışları, çeşitli hastalıkların meydana gelmesine sebebiyet vermektedir. Bu hastalıklar, insan ve hayvanlarda önemli derecede verim kaybına yol açabilmekte ve hatta ölümlere neden olabilmektedir (25). Günümüzde parazitlere ve sebep oldukları hastalıklara karşı en önemli korunma metodu olarak aşı ön plana çıkmaktadır. Ancak, şu ana kadar yapılmış birçok önemli çalışmaya rağmen, klinik açıdan önemli parazitlere karşı pratikte uygulanabilen az sayıda aşı bulunmakla birlikte bu aşılardan etkinliğinin de yeterli derecede olmadığı bildirilmektedir (25, 28). Bu nedenle de parazitler hastalıklarına karşı mücadele ve korunmada en etkin metot olarak antiparaziter ilaç kullanımı ortaya çıkmaktadır (12, 25).

Parazitler, konaklarıyla birçok hücresel organel ve metabolik sistemi ortak bir şekilde kullanabilmekle beraber bu organizmalar esasen kendilerine ait benzersiz bir biyokimyasal

sisteme sahiptirler. Antiparaziter ilaçlar, genellikle parazite özgü bu sistemleri hedef alacak şekilde, spesifik olarak geliştirilmektedir. Örneğin, sıtmanın tedavisinde kullanılan chloroquine ve onchocerciasis'in tedavisinde kullanılan ivermectin bu temelde geliştirilmiş başarılı ilaçlar arasındadır (25). Buna karşın genelde parazitlere karşı kullanılan birçok ilacın, düşük terapötik endekse sahip ve konakçı toksisitesini sınırlayan optimal farmakolojik özelliklerden uzak özellikte olduğu bildirilmektedir (25). Bu nedenle de etkin antiparaziter ilaçların sayısının oldukça sınırlı olduğu ifade edilmektedir. Bu ilaçlara karşı direnç gelişmesi durumunda ise parazitlere karşı tedavi, korunma ve mücadelenin neredeyse imkansız hale geleceği belirtilmektedir (25, 28). Bu kapsamda, antiparaziter ilaç dirençliliğini etkileyen mekanizmaların anlaşılabilmesi ve bu direncin ileri teknolojik metotlarla nasıl teşhis edilebileceğinin bilinmesi, gelecekte paraziter hastalıklara karşı geliştirilebilecek yeni mücadele yöntemleri ve alınabilecek önlemler açısından büyük önem arz etmektedir.

Bildiri İçeriği

Antiparaziter direnç genel anlamıyla, önerilen dozda kullanıldığında konaktaki parazit popülasyonuna etki edebilen antiparaziter ilaçların, söz konusu parazit popülasyonunda meydana gelen birtakım değişiklikler sonucu zamanla etkisini kaybetmesi olarak tanımlanmaktadır (38). Ancak bu noktada önemli olan parazitin ilaca karşı kendinde şekillendirdiği bu değişiklikleri bir sonraki nesle kalıtsal olarak aktarabilme özelliğini taşıyabiliyor olmasıdır (29, 38). Bu olayda, parazitte, ilaç dirençliliği ile ilişkili genler önemli bir rol oynamaktadır. Ancak günümüzde, çoğu parazitte ilaca karşı direnç gelişiminden sorumlu olan bu genlerin, parazitlerin ve vektörlerin karmaşık yaşam döngüleri ve vektör-parazit etkileşimlerinin tam olarak çözümlenememesi nedeniyle henüz net bir şekilde tanımlanamadığı belirtilmektedir (28). Bu nedenle de antiparaziter ilaç dirençliliğinin gelecekte hangi boyutlara ulaşabileceği şu an için ön görülememekle birlikte bu alandaki çalışmaların, yeni direnç genlerinin tespit edilmesiyle birlikte umut verici bir şekilde devam ettiği bildirilmektedir (28).

Antiparaziter ilaçlara karşı meydana gelen direnç mekanizmaları temelde patojen, ilaç ve çevre ile ilgili faktörler tarafından oluşturulmaktadır. Genel olarak; popülasyondaki genetik polimorfizm, direnç bağımlı allellerin sıklığı, katılan genlerin sayısı, direnç mekanizmalarının

karmaşıklığı, parazitin biyolojisi, direnç fenotipinde dirençli genlerin dominant veya resesif olup olmaması, tedavi kapsamı, antiparaziter ilaç varlığında veya yokluğunda duyarlı ve dirençli genotiplerin üreme formu, tedavi sıklığı, parazit taşınımı ve ilaç dozunu etkileyebilecek diğer uygulamalar gibi faktörler bu mekanizmalara etki etmektedir (17). Genetik bir temele dayanan direnç mekanizmalarının meydana gelmesinde ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının da (ATP-binding cassette transporters) önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (28). Özellikle son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalar söz konusu taşıyıcıların direnç mekanizmalarına etkisini anlamaya yönelik olarak dizayn edilmiştir.

Parazitler de dahil olmak üzere tüm ökaryot ve prokaryot hücrelerde hayati fonksiyonların sürdürülebilmesinde vazgeçilmez bir bileşen olan, organizmada ilaç ve ilaç metabolitlerinin taşınmasından sorumlu ABC taşıyıcı proteinleri, üzerinde en fazla araştırmanın yapıldığı popüler bir üst familyadır. Bu taşıyıcılar, bağırsak segmentleri, karaciğer, beyin ve böbrek gibi ilaç emilimi, metabolizması, dağılımı ve atılımından sorumlu organlarda bulunmaktadır (16). ABC taşıyıcı proteinleri çeşitli alt familyalara ayrılmaktadır (28). İlaç direnci ile ilişkili ABC proteinlerinin çoğunun ise, çoklu ilaç direnci (multidrug resistance, MDR) proteinleri ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler (multidrug resistance-associated proteins MRPs) familyasında yer aldığı bildirilmiştir (23). Bu familyalarda yer alan P-glikoprotein ve MRPs'nin sağlıklı dokularda ilaçların hücre içinden uzaklaştırılması fonksiyonuna sahip olduğu ifade edilmektedir (16). ABC taşıyıcıları, parazitlerin fizyolojik işlevlerinde de görev almalarına rağmen, günümüzde bu taşıyıcıların ve ilgili proteinlerin epidemiyolojik ve klinik açıdan önemli parazitlerin ilaç direnç mekanizmalarındaki rolü henüz tam olarak çözümlenememiştir. Ancak ABC taşıyıcılarının insan ve diğer canlılarda ilacın farmakokinetiğine gösterdiği etkiler, bu taşıyıcıların aynı zamanda parazitlerde direnç şekillenmesinde de kritik bir rol oynayabileceği ortaya koymaktadır (28). Nitekim son yıllarda yapılan çalışmalarda ABC taşıyıcılarının, klinik olarak izole edilmiş *Leishmania donovani*'nin amphotericin B'ye direnç geliştirmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (30). Diğer bir çalışmada ise bu taşıyıcıların benzer şekilde *Trypanosoma cruzi*'de meydana gelen ilaç direncinde kilit bir rol oynadığı bildirilmiş ve prolin taşıyıcı TcAAP609'nın nifurtimox ve benzimidazole karşı direnç sağladığı rapor edilmiştir (35).

Antiparaziter ilaçlara karşı gelişen direncin tespiti, parazite karşı uygulanması planlanan tedavi, korunma ve mücadele programlarının geliştirilmesinde ve yönlendirilmesinde büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda çeşitli metotlar geliştirilmekle birlikte bunlar parazit cinsine göre farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle direnç tespitine yönelik metotlar; helmintler, protozoonlar ve arthropodlarda ilaç direncinin belirlenmesi şeklinde üç ayrı ana başlık altında incelenmiştir.

Helmintlerde ilaç direncinin belirlenmesi: Antelmantik direncin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmakla birlikte uygulanan testler Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'ne göre *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. *In vitro* testler başlıca; yumurtadan çıkış testi (egg hatch assay), larval paraliz ve motilite testi, tubulin bağlanma testi, larval gelişim testi (LDA) ve ergin gelişim testi olarak belirtilmektedir (13). Ancak bu testler, antelmantik direncin belirlenmesinde pratikte fazla kullanılmamaktadır. Bu nedenle bu bildiride, gerek sahada gerekse laboratuvarında sıklıkla kullanılan *in vivo* testler ile günümüzde konuyla ilgili birçok bilimsel araştırmanın temelini oluşturan moleküler yöntemler hakkında bilgi verilmiştir.

Antelmantik direncin belirlenmesinde kullanılan *in vivo* testler:

a) Dışkıda yumurta sayısı azalım testi [Faecal egg count reduction test (FECRT)]: Antelmantik direnç belirleme çalışmalarında yaygın kullanılan bu testte ilaç uygulama öncesi ve sonrasında tedavi ve kontrol gruplarındaki hayvanların rektumundan bireysel olarak alınan dışkı örneklerindeki yumurta sayıları modifiye McMaster tekniği kullanılarak belirlenmektedir. Daha sonra elde edilen sayım sonuçları, ilaç prospektüsünde ifade edilen ilaç etki süresi göz önüne alınarak tedavi öncesi yapılan sayım sonuçları ile karşılaştırılmakta ve böylece antelmantiklerin etkinliği belirlenebilmektedir (13). Yapılan analizler sonucunda, önerilen dozda uygulanan ilacın yumurta sayısında %95 üzerinde bir azalma sağlaması durumunda genellikle hedef parazitte herhangi bir direnç oluşmadığı kanaatine varılmaktadır (7). Ancak bu testte, dışkı ile atılan yumurta sayısının parazit yükü ile ilişkili olmadığı ve ilaçların olgun parazitleri elemine etmeden sadece yumurtlamayı azaltabileceği durumu da mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır (38).

FECRT, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle antelmantik dirençliliğinin belirlenmesinde günümüzde hala sıklıkla kullanılmaktadır. Nitekim, Collins ve ark., (8) 2019 yılında Amerika Birleşik Devletleri'ndeki hindilerde *Ascaridia dissimilis*'in fenbendazole dirençliliğini araştırdıkları çalışmalarında bu metodu uygulamışlar ve parazite ait 4 farklı suşun birinde dirençlilik saptamışlardır. Yine 2019 yılında yapılan bir diğer çalışmada Macrelli ve ark., (21) Birleşik Krallık'taki domuzlarda *Oesophagostomum dentatum*'un ivermectine karşı dirençliliğini bu metodu kullanarak tespit etmişlerdir.

FECRT, Dünya'daki direnç çalışmalarında sıklıkla kullanılmakla birlikte, Türkiye'de yapılan antelmantik direnç araştırmalarında da genellikle bu yöntemin kullanıldığı görülmektedir. Bu kapsamda Çırak ve ark., (9) Marmara Bölgesi'nde yer alan at çiftliklerinde yaptıkları çalışmalarında cyathostomin popülasyonlarında (atların küçük strongylleri) antelmantik dirençliliğini FECRT ile araştırmışlar ve bu nematodların benzimidazole karşı direnç gösterdiğini ancak pyrantel embonate ve macrocyclic lactonlara (ivermectin, moxidectin) karşı hala duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Tınar ve ark., (37) Marmara Bölgesi'ndeki koyunlarda FECRT metodunu kullanarak yaptıkları çalışmalarında strongyl enfeksiyonlarına karşı kullanılan benzimidazole, ivermectin ve tetramisole karşı meydana gelebilecek antelmantik dirençliliği araştırmışlar ve bu helmintlerin tetramisole karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Öte yandan, Köse ve ark., (19) Ege Bölgesi'nde koyunlar üzerinde yürüttükleri çalışmalarında koyunların gastro-intestinal nematodlarında albendazole, oxfendazole-oxyclosanide ve ivermectin dirençliliğini araştırmışlar ve bu parazitlerin ivermectine karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Yine bir diğer çalışmada Çırak ve ark., (10) Marmara Bölgesi'nde yer alan at çiftliklerinde imidazotiyazol-pirimidin ve makrosiklik lakton (ML) grubu antelmantiklere karşı at strongylidleri ve *Parascaris equorum*'da anthelmantik direnci FECRT metodu ile araştırmışlar ve çalışmalarının sonucunda ML grubu antelmantiklerin çiftlik atlarındaki *Parascaris* türlerine karşı tamamen etkisiz kaldıklarını, Strongylidae enfeksiyonlarında ise ivermectin veya pirantel ile ilgili herhangi bir direnç oluşumu gözlenmediğini bildirmişlerdir.

b) Kontrollü test: Bu testte enfekte hayvanlar ilaç verilen ve verilmeyen şeklinde gruplara ayrılmakta ve tedavi grubuna denenecek ilacın önerilen dozda ve sürede verilmesinin ardından tüm hayvanlar nekropsi yapılmaktadır. Takiben, tedavi ve kontrol grubundaki hayvanlardaki parazitler makroskopik olarak identifiye edilmekte ve sayılmaktadır. Test sonucunda tedavi edilen ve edilmeyen hayvanlardaki parazit sayısı karşılaştırılarak antelmantiklerin etkisi ve parazitlerde herhangi bir direnç gelişip gelişmediği belirlenmektedir. Direnç tespitine yönelik en geçerli testlerden biri olan bu test, masraflı olması ve uzun bir zamana gereksinim duyması nedeniyle çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır (13, 31, 38).

Antelmantik direncin belirlenmesinde kullanılan moleküler/genetik testler: Moleküler teknikler, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olmaları nedeniyle hem hastalık etkenlerinin teşhisinde hem de dirençliliğin belirlenmesinde özellikle son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temeline dayanmakla birlikte duyarlı ve dirençli parazitlerdeki genetik değişiklikleri hassas bir şekilde saptayarak dirençliliği tespit etmektedir (13). Antelmantik dirençliliğin saptanmasında allel-spesifik PCR (AS-PCR), restriction fragment length polymorphism PCR (RFLP PCR), tandem competitive PCR (TC-PCR) gibi birçok PCR çeşidi kullanılabilir (13, 38). Bu yöntemler, dirençlilik tespitinde oldukça duyarlı olmalarına karşın uygulamada standardizasyonlarının zor olduğu ve kantitasyona olanak verilmediği bildirilmektedir (27, 36, 39). Bu nedenle birçok helmint türünün, özellikle de trichostrongil DNA'sının kantitatif analizi için daha kolay, hızlı ve güvenilir olan moleküler tabanlı farklı metotlar kullanılmaya başlanmıştır. Bu kapsamda real-time PCR (qPCR) son zamanlarda en fazla kullanılan metot olarak ön plana çıkmaktadır. Bu teknikte, floresan işaretli probalar kullanılarak PCR çoğaltımını görünür hale getirilmekte ve duyarlı/dirençli alleller tespit edilebilmektedir (22, 26).

qPCR son zamanlarda özellikle küçük ruminantların trichostrongil enfeksiyonlarında benzimidazol direncini belirlemeye yönelik olarak kullanılmaya başlanmıştır (2, 22, 24, 26). Benzimidazoller, mikrotubul dinamiklerini inhibe etmeleri sonucunda dirençliliğin sebebi olarak bilinen β -tubulin geninde nokta mutasyonlarına neden olmaktadır (14). Bu kapsamda yapılan qPCR temelli dirençlilik tespit çalışmalarında, β -tubulin izotip 1 genindeki

167, 198 ve 200. kodonlardaki üç tek nükleotid polimorfizmi (SNPs) saptanmaya çalışılmaktadır (3, 20, 32). qPCR analizlerinin sonucunda elde edilen kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmakta, takiben duyarlı ve dirençli popülasyonlardaki allel sıklıkları hesaplanarak antelmantik direnç belirlenmektedir (2).

Türkiye’de antelmantik direnç tespitinde moleküler tekniklerin kullanıldığı sadece bir çalışma bulunmaktadır. Önder ve ark., (26) qPCR tekniğini kullandıkları bu çalışmalarında, *Haemonchus contortus*’un moleküler prevalansı ve karakterizasyonu ile benzimidazol (BZ) dirençliliği araştırmışlar ve *H. contortus* popülasyonlarında BZ duyarlı ve dirençli allel sıklıklarını sırasıyla %87,1±16,2 ve %12,9±16,2 olarak belirleyerek dirençli allele ait izolatların sekans analizlerinde yalnızca 200. kodonda SNPs saptadıklarını bildirmişlerdir. Böylece araştırmacılar (26) elde ettikleri bu bulgular ile Türkiye’de *H. contortus* popülasyonlarında BZ dirençliliğini ilk kez moleküler testler ile ortaya koymuşlardır.

Protozoonlarda ilaç direncinin belirlenmesi: Protozoonlarda ilaç dirençliliğinin belirlenmesinde helmintlerde olduğu gibi *in vivo* ve *in vitro* testler kullanılmaktadır. *In vivo* testlerde genellikle hedef protozoonun konağı olan canlılardan gruplar oluşturularak parazitin dirençli olduğundan şüpheli suşuyla, duyarlı suşu bu gruplara ayrı ayrı uygulanmakta ve böylece konak grupları enfekte edilmektedir. Takiben, enfekte canlılar direnç geliştiği düşünülen ilacın önerilen dozuyla tedavi edilmekte ve belirli sürelerde gruplar incelenerek parazitin oluşturabileceği fizyolojik ve patolojik değişikliklerle birlikte etkenin hayat siklusuna göre dışkı veya kandaki parazit formları araştırılarak direnç tespit edilmektedir (38). *In vitro* testler ise, laboratuvar ortamında oluşturulan protozoon hatlarında, protozoonun çoğalmasının engellendiği en düşük ilaç konsantrasyonu, yani minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ile parazit proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerlerinin hesaplanmasıyla uygulanmaktadır. Bu konsantrasyonlar, protozoon türü ve suşuna göre değişiklik göstermekle birlikte testlerde genellikle referans bir MIC ve IC₅₀ değeri kullanılmaktadır (34).

Protozoonlarda direnç gelişimi PCR gibi DNA tabanlı teşhis metotları kullanılarak da yapılabilmektedir. Bu kapsamda ilaç direnç mekanizması çözümlenmiş protozoonlarda dirençlilik genleri veya dirençli ve duyarlı protozoonların genlerinde meydana gelen polimorfizmler moleküler teşhis metotlarıyla spesifik bir şekilde tespit edilmekte ve böylece protozoonun uygulanan ilaca karşı dirençli olup olmadığı belirlenebilmektedir. Bu kapsamda, Kessl ve ark., (18) *Toxoplasma gondii*'de atovaquone direncini araştırdıkları çalışmalarında duyarlı ve dirençli *T. gondii* suşlarının sitokrom b geninde, 129. ve 254. kodonlarda iki farklı mutasyon saptamışlardır. Takiben, araştırmacılar bu mutasyonların ilaçla olan bağlantısını konfirme etmek amacıyla ilgili geni, *Saccharomyces cerevisiae*'ye nakletmişler ve laboratuvar şartlarında *S. cerevisiae* suşlarının ilaç toleransında büyük bir artış saptayarak söz konusu mutasyonları dirençle ilişkili bulunmuşlardır. Türkiye'de *Theileria annulata* üzerinde yapılan bir çalışmada, bu türün sitokrom b geninde belirlenen mutasyonlarının buparvaquone direnciyle ilişkisi araştırılmış ve bu kapsamda kullanılan moleküler teknikler ile duyarlı ve dirençli suşlarda altı sinonim ve altı non-sinonim mutasyon saptanarak söz konusu non-sinonim mutasyonlardan ikisinin buparvaquone'un sitokrom b geni üzerindeki muhtemel bağlanma bölgelerinde olduğu ve dolayısıyla bu iki mutasyonun buparvaquone direnciyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (15). Diğer bir çalışmada ise dirençli, duyarlı ve kontrol grubuna ayrılmış protozoonlarda dirençlilik mekanizmasında rol oynayan proteinlerin ekspresyonunun qPCR ile kantitatif olarak belirlenmesiyle de ilaç direncinin tespit edilebildiği belirtilmiştir (6). Bunun yanında 2019 yılında Chahar ve ark., (5) *P. falciparum*'da pyrimethamine dirençliliğini, yeni geliştirdikleri, hydroxynaphthol blue (HNB) indikatörü tabanlı, single nucleotide polymorphism loop-mediated isothermal amplification (SNP-LAMP) metoduyla daha kolay ve hızlı teşhis edebildiklerini bildirmişlerdir.

Arthropodlarda ilaç direncinin belirlenmesi: Dünya Sağlık Örgütü (WHO) insektler için uygulanması kolay bir direnç tespit yöntemi standardize etmiştir. Bu yöntemde, WHO tarafından standart olarak hazırlanmış olan insektisit emdirilmiş test kağıtları kullanılmakta ve bu kağıtlar kontrol ve deney gruplarının yer aldığı tüplerin içerisine konularak etki ve direnç faktörleri belirlenmektedir (40). Pratikte kolay uygulanabilir olan bu yöntemin yanında araştırmacılar direnç belirlemede biyokimyasal ve moleküler metotlardan da yararlanmaktadırlar (38). Bu metotlar içerisinde moleküler tabanlı teknikler son yıllarda en

fazla kullanılan metot olarak ön plana çıkmaktadır. Bu teknikler ile direnç belirleme, direnç metabolizmasında rol oynayan hedef proteinin tespit edilmesi veya duyarlı ve duyarsız insektlerin genetik yapısında meydana gelen değişikliklerin saptanmasıyla yapılmaktadır. Bu noktada, özellikle sivrisineklerde insektisitlere karşı direnç gelişiminde rol oynayan “knock-down resistance (kdr)” in oldukça önemli olduğu ve bu mekanizmada görev alan genlerdeki mutasyonların moleküler yöntemlerle tespit edilmesiyle dirençliliğin belirlenebileceği bildirilmiştir (4, 11, 33). Bununla birlikte *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*’un deltamethrine karşı dirençliliğinin araştırıldığı bir çalışmada ise piretroid direncinin sodyum channel geninde meydana gelen mutasyonlarla ilişkili olabileceğini ortaya konmuştur (1). Bu kapsamda, mevcut araştırmalar incelendiğinde, arthropodlarda ilaç direncinin belirlenmesinde direnç gelişiminde rol oynayan mekanizmanın arthropod türlerine göre değişkenlik gösterebildiği görülmekte ve mutasyonların araştırılacağı hedef genlerin referans kaynaklar dikkate alınarak iyi belirlenmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Sonuç

Bilinçsiz ilaç kullanımı Dünya genelinde olduğu gibi Türkiye’de de dirençli parazit popülasyonlarının oluşumuna sebebiyet vermektedir. Günümüzde direnç mekanizmasının hala bazı parazitler için çözümlenememiş olması bu parazit popülasyonlarının gün geçtikçe artmasına neden olmaktadır. Bu noktada, ülke çapında geniş kapsamlı ve özellikle yüksek duyarlılıktaki tekniklerle dirençlilik analiz çalışmalarına ihtiyaç olduğu görülmektedir. Sonuç olarak bu bildiride, son yıllarda yayınlanmış çalışmalar derlenerek, parazitlerde ilaçlara karşı gelişen dirençlilik mekanizmaları ve meydana gelen direncin güncel metotlarda teşhisi hakkında bilgi verilmiştir.

Kaynaklar

1. Aboelhadid SM, Arafa WM, Mahrous LN, Fahmy MM, Kamel AA. Molecular detection of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* resistance against deltamethrin in middle Egypt. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 2018; 13: 198-204.
2. Atanásio-Nhacumbe A, Lambert SM, da Silva Souza BMP, Ayres MCC. Molecular detection of benzimidazole resistance levels associated with F167Y and F200Y polymorphisms in *Haemonchus contortus* of goats from Mozambique. *Parasitol Res* 2019; 118(1): 245-53.
3. Barrere V, Falzon LC, Shakya KP, Menzies PI, Peregrine AS, Prichard RK. Assessment of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in sheep flocks in Ontario, Canada: comparison of detection methods for drug resistance. *Vet Parasitol* 2013; 198: 159-65.

4. Bursalı F. Akdeniz ve Ege Bölgelerinde *Anopheles maculipennis* kompleksinde kdr mutasyonuna dayalı insektisit direncinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniv Fen Bil Ens, Aydın 2013.
5. Chahar M, Anvikar A, Valecha N. Development and evaluation of a novel hnb based isothermal amplification assay for fast detection of pyrimethamine resistance (s108n) in *Plasmodium falciparum*. *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16(9): 1-13.
6. Chen T, Huang B, Zhao Q, Dong H, Zhu S, Zhao Z, Lv L, Yan M, Han H. Molecular characterization and functional analysis of *Eimeria tenella* malate dehydrogenase. *Parasitol Res* 2018; 117: 2053-63.
7. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods, for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992; 44: 35-44.
8. Collins JB, Jordan B, Baldwin L, Hebron C, Paras K, Vidyashankar AN, Kaplan RM. Resistance to fenbendazole in *Ascaridia dissimilis*, an important nematode parasite of turkeys. *Poult Sci* 2019; Baskıda.
9. Çırak VY, Güleğen E, Bauer C. Benzimidazole resistance in cyathostomin populations on horse farms in western Anatolia, Turkey. *Parasitol Res* 2004; 93: 392-5.
10. Çırak VY, Kar S, Girişgin O. İvermektin ve pirantele karşı at Strongylidae'lerinde antelmintik direnç araştırılması ve *Parascaris equorum*'da makrosiklik lakton direnci. *Türkiye Parazitol Derg* 2010; 34(1): 35-9.
11. de Araújo AP, Paiva MHS, Cabral AM, Cavalcanti AEHD, Pessoa LFF, Diniz DFA, Helvecio E, da Silva EVG, da Silva NM, Anastácio DB, Pontes C, Nunes V, de Souza MFM, Magalhães FJR, de Melo Santos MAV, Ayres CFJ. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Pernambuco, Brazil for resistance to temephos, diflubenzuron, and cypermethrin and characterization of potential resistance mechanisms. *J Insect Sci* 2019; 19(3): 1-15.
12. Fairlamb AH, Gow NA, Matthews KR, Waters AP. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Nat Microbiol* 2016; 1(7): 16092.
13. FAO. Helminths: Anthelmintic resistance, diagnosis, management and prevention. Guidelines Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants. Module 2. Roma: FAO, 2004; pp. 78-118.
14. Ghisi M, Kaminsky R, Maser P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematode. *Vet Parasitol* 2007; 144: 313-20.
15. Hacılarlıoğlu S. *Theileria annulata* sitokrom b geninde mutasyonların belirlenerek buparvaquone direnciyle ilişkisinin araştırılması ve Aydın çevresindeki enfekte sığırlarda direncin yaygınlığının saptanması, Doktora tezi, Adnan Menderes Üniv Sağ Bil Ens, Aydın 2013.
16. Kara ZP, Öztürk N, Öztürk D, Okyar A. ABC taşıyıcı proteinleri: Sirkadiyan ritimler ve cinsiyete bağlı farklılıklar. *Clin Exp Health Sci* 2013; 3(1): 1-13.
17. Kerboeuf D, Blackhall W, Kaminsky R, von Samson-Himmelstjerna G. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *Int J Antimic* 2003; 22: 332-46.
18. Kessl JJ, Ha KH, Merritt AK, Meshnick SR, Trumpower BL. Molecular basis of *Toxoplasma gondii* atovaquone resistance modeled in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 146(2): 255-8.

19. Köse M, Kozan E, Sevimli FK, Eser M. The resistance of nematode parasites in sheep against anthelmintic drugs widely used in Western Turkey. *Parasitol Res* 2007; 101: 563-7.
20. Kwa MS, Veenstra JG, Roos MH. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 63: 299-303.
21. Macrelli M, Williamson S, Mitchell S, Pearson R, Andrews L, Morrison AA, Nevel M, Smith R, Bartley DJ. First detection of ivermectin resistance in *Oesophagostomum dentatum* in pigs. *Vet Parasitol* 2019; 270: 1-6.
22. Milhes M, Guillerm M, Robin M, Eichstadt M, Roy C, Grisez C, Prévot F, Liénard E, Bouhsira E, Franc M, Jacquet P. A real-time PCR approach to identify anthelmintic-resistant nematodes in sheep farms. *Parasitol Res* 2017; 116(3): 909-20.
23. Mordvinov VA, Ershov NI, Pirozhkova DS, Pakharukov YV, Pakharukova MY. ABC transporters in the liver fluke *Opisthorchis felineus*. *Mol Biochem Parasitol* 2017; 216: 60-8.
24. Munguía B, Teixeira R, Veroli MV, Marín M, Domínguez L. Molecular analysis of benzimidazole-resistance associated SNPs in *Haemonchus contortus* populations of Uruguay. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 2018; 13: 110-4.
25. Ouellette M, Ward SA. Drug resistance in parasites. *Mol Med Parasitol* 2003; 397-432.
26. Önder Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö, Çiloğlu A. Molecular prevalence, phylogenetic characterization and benzimidazole resistance of *Haemonchus contortus* from sheep. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2016; 22(1): 93-9.
27. Pape M, Posedi J, Failing K, Schnieder T, von Samson-Himmelstjerna G. Analysis of the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-susceptible and resistant cyathostome population. *Parasitol* 2003; 127: 53-9.
28. Pramanik PK, Alam MN, Roy Chowdhury D, Chakraborti T. Drug Resistance in protozoan parasites: An incessant wrestle for survival. *J Glob Antimicrob Resist* 2019; 18: 1-11.
29. Prichard RK, Hall CA, Kelly JD, Martin ICA, Donald AD. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust Vet J* 1980; 56: 239-50.
30. Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, Pandey K, Ravidas V, Kumar M, De T, Singh D, Das P. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1031-41.
31. Reinecke RK, Louw JP. Overberg research projects. XVI. First-stage larval reduction test versus the controlled anthelmintic test to assess the efficacy of anthelmintics against nematode parasites of sheep. *J S Afr Vet Assoc* 1994; 65: 108-12.
32. Robinson M, Trudgett A, Fairweather I, McFerran N. Benzimidazole binding to *Haemonchus contortus* tubulin: a question of structure. *Trends Parasitol* 2002; 18: 153-4.
33. Safi NHZ, Ahmadi AA, Nahzat S, Warusavithana S, Safi N, Valadan R, Shemshadian A, Sharifi M, Enayati A, Hemingway J. Status of insecticide resistance and its biochemical and molecular mechanisms in *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) from Afghanistan. *Malar J* 2019; 18(1): 249.
34. Sangster N, Batterham P, Chapman HD, Duraisingh M, Le Jambre L, Shirley M, Upcroft J, Upcroft P. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int J Parasitol* 2002; 32(5): 637-53.
35. Saye M, Miranda MR, di Girolamo F, de los Milagros Cámara M, Pereira CA. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. *PLoS One* 2014; 9: e92028.

36. Silvestre A, Humbert JF. A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Exp Parasitol* 2000; 95: 271-6.
37. Tınar R, Akyol ÇV, Çırak VY, Şenlik B, Bauer C. Investigations on the seasonal patterns of Strongyle infections in grazing lambs, and the occurrence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in western Anatolia, Turkey. *Parasitol Res* 2005; 96: 18-23.
38. Tınar R, Çırak VY, Şenlik B, Diker Aİ. Antiparaziter ilaçlara karşı direnç. Burgu A. Karaer Z. eds. In: *Parazit Hastalıklarında Tedavi*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No: 19, 2005; pp. 433-53.
39. von Samson-Himmelstjerna G, Harder A, Schnieder T. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. *Int J Parasitol* 2002; 32: 1529-35.
40. World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Second Edition. WHO Library Cataloguing in Publication Data, 2018.

Laboratuvar Hayvanlarında İlaç Kullanımı

Levent ALTINTAŞ

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı,
ANKARA

Özet: Günümüzde yapılan çalışmalarda, her ne kadar alternatif yöntemler geliştirilse de, deney hayvanları halen önemli bir yere sahiptir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda dikkat edilmesi gereken bazı önemli hususlar vardır. Hazırlanan bu bildiride; çoğu zaman göz ardı edilen, ama çalışma sonuçlarının güvenilirliği üzerinde önemli değişikliklere sebep olan, bazı küçük detaylara değinilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İlaç, Laboratuvar hayvanı.

Drug Use in Laboratory Animals

Abstract: In the current studies, although alternative methods are developed, experimental animals have an important role. There are some important issues to be considered in studies with experimental animals. In this presentation; some minor statements have been tried to address, which are often overlooked, but can make significant changes to the reliability of the study results.

Keywords: *Drug, Laboratory Animals.*

Giriş

Ülkemizde Deney Hayvanları ile çalışmalarda yasal düzenlemeler; 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” kapsamında, Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu (HADMEK) tarafından yapılmaktadır. Deney Hayvanlarının kullanılacağı çalışmalara başlamadan önce; konuya ilişkin dikkat edilmesi gereken bazı önemli hususlar ve çalışma öncesi yapılması gereken ön hazırlıklar vardır. Öncelikle, deney hayvanları ile çalışacak olan personel deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olmalı ve çalışacağı deney hayvanına karşı bir fobisi bulunmamalıdır. Yine; çalışma sonuçlarının güvenilirliği de göz önüne alındığında, deney hayvanlarına ilaç uygularken veya hayvanlardan kan ya da diğer vücut sıvılarını alma işlemi esnasında, hayvanda en az düzeyde strese yol açılmalıdır. Stres ve ağrı vücudun normal değerlerini değiştirdiğinden, yapılacak işlemlerde bilimsel teknikler kullanılmalı ve araştırmacı kendine güvenerek uygulamaları hassas bir şekilde gerçekleştirmelidir. Deney hayvanları ile çalışmaya başlanmadan önce yapılması gereken ön hazırlıklara ilişkin kısa hatırlatma çizelgesi Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Deney hayvanları ile çalışmaya başlanmadan önce yapılması gereken ön hazırlıklar.

Deneyin amacı	Bilimsel olarak ne elde edilmek isteniyor? Uygulama yolu deneyin amacını karşılıyor mu? İlgili uygulamanın daha “iyi” şekilde yapılma olanağı var mı?
Uygulama yolu	Uygulanacak madde(ilâç) için uygulama yolu uygun mu? Uygulama yolu hayvanda yüksek strese neden olan bir yol mu? Daha az acı çeğtiren uygulama ile araştırma hedefine ulaşılabilir mi? Tekrarlayan uygulamalar için uygulama yolu uygun mu?
Madde	Uygulayacağınız maddenin içeriğı hakkında yeterli bilginiz bulunuyor mu? Uygulayacağınız maddenin hayvanlar üzerinde istenmeyen etkileri bulunuyor mu? Eğer bulunuyorsa, buna karşın ilgili ön hazırlıklarınız neler? Formülasyon şekli, beklenen etkiyi karşılayabilir mi? Uygulanacak maddenin taze olarak mı hazırlanması gerekiyor? Konsantrasyon ve doz hacmi, beklenen etkiyi bozabilir mi? Uygulanacak maddenin ya da taşıt maddelerin fiziko-kimyasal özelliklerine yönelik ek problemler var mı? (ozmolarite vb) Hacim azaltılabilir mi? Uygulama sıklığı azaltılabilir mi? Eğer madde toksik ise, doz azaltılabilir mi? Uygulanacak madde irritan özelliğıne sahip mi? Tolere edilebilen/etkili dozun tespit edilebilmesi için ön çalışmalar gerekiyor mu?
Hayvan	Hayvan tür, ırk, hattına özgü ilaca karşı duyarlılık bulunuyor mu? İlgili hayvan türü tutma ile kolayca strese giriyor mu? Bu durumda çalışılacak hayvan en uygun tür mü? Hayvanı uygulama prosedürleri için eğitebilir misiniz? Prosedüre alışması için ek süre gerekir mi? Anestezi, sedatif ya da analjezik madde uygulanması gerekiyor mu? Deneyin stresi için bu uygulamalar yeterli mi? İlgili türde tolere edilebilir ve etkili dozların belirlenmesi için pilot çalışma /ön deney yapıldı mı?
Teknik	İlaça özgü bilimsel sorunlar (Ör. oral ya da ip uygulama sonrası ilk geçiş etkisi, emilme hızı ya da miktarı, yerel etkiler) neler? Teknik problemler neler? (en az stres oluşturan şekilde gavaj tüpünü yerleştirmek için uygun tutma yolu hangisidir?) Hayvana uygulama tekniğinin her hangi bir etkisi bulunuyor mu? Acı verme düzeyi/insancıl deney sonlandırma kısımları açık şekilde ifade edilmiş mi? İstenmeyen etkileri azaltmak amacıyla hangi iyileştirmeler yapılabilir? Diğer kurumlardaki referans ve uzmanlıkları kontrol ettiniz mi? (Daha uygun koşullarda deneyin yapılabileceğı bir kuruluş var mı?)
Çalışan	Uygulama yapan personelin deney hayvanları sertifika belgesi bulunuyor mu? Uygulamayı yapacak personel, uygulama tekniğı ve oluşabilecek etkilere müdahale için deneyimli mi?

Deneye başlamadan önce, konuya ilişkin literatür taraması yapılmalıdır: Çalışmada kullanılacak madde; sadece tek bir uygulama yolunda kullanılmak için uygun olabilir veya türler arasında maddeye karşı bir duyarlılık bulunabilir. Bu sebeple; hem çalışmada kullanılacak olan etken madde, hem de taşıtın ilgili uygulama yolu ve ilgili hayvan türü için uygunluğundan emin olunmalıdır. Bu amaçla; çalışmada kullanılacak olan kimyasal maddelere ilişkin literatür taraması yapılmalı ve uygun hayvan türü, uygun doz-uygulama yolu ve uygulama sıklığı belirlenmelidir. Bu aşamada “En İyi Uygulama” hedeflenmelidir. En iyi uygulama ise; istenmeyen etkilerin en aza indirilmesi, kullanılan hayvan sayısının azaltılması, sonuçların kalite ya da uygulanabilirliğinin en yükseğı çıkarılabilmesi ile mümkündür. Böylece olası hatalar önceden önlenir, kullanılmayacak (deneye dahil

edilemeyecek) hayvan sayısı en aza indirilir ve gereksiz ağrı/acının olmasının da önüne geçilir. Ayrıca; son yıllarda deney hayvanlarının yerini alan alternatif yöntemlerinin de kullanılmaya başlaması sebebiyle; deney hayvanları ile çalışılmadan önce, bu tür alternatif yöntemlerinin kullanılabilirliği de mutlaka kontrol edilmelidir.

Uygulanacak maddeye ilişkin bilinmesi gerekenler: Çalışmada kullanılacak olan kimyasal maddelerin adı, kimyasal özellikleri, kullanılacak doz aralığı, uygulama yolu, uygulanacak ilaç hacmi bilinmelidir. Yine uygulama ile ne amaçlandığı da önemlidir. Hazırlanan ilacın hangi formda (solüsyon, emülsiyon, süspansiyon) olması gerektiği; çözücü kullanılacaksa, hangi çözücüde çözündürülmesi gerektiği ve kullanılan yardımcı/taşıyıcı maddeler hakkında da bilgi sahibi olunmalıdır. Çalışmada kullanılacak bu maddelerin oluşturacağı etkiler ve olası yan etkileri hakkında da bilgi sahibi olunmalıdır.

Çözelti ve çözücüler: Çalışmada kullanılacak olan maddeler çözelti halinde uygulanacaksa; maddeye özgü en ideal çözücü seçilmeli ve seçilen çözücünün çalışma sonuçlarını etkilemeyeceğinden emin olunulmalıdır. Suda çözünebilir maddeler için tercih edilen en yaygın çözücü; su ve fizyolojik tuzlu su'dur. Suda çözünmeyen maddeler için ise; uygun organik çözücüler kullanılabilir (özellikle DMSO). Çözünmeyen katı maddeler ya da karışmayan kimyasallar için ise; süspansiyon ya da asılı maddeler ile emülsiyon formülasyonları tercih edilebilir. Hazırlanan formülasyonların stabilite ve kalitesinin sağlanabileceği süre koşulları da dikkate alınmalı ve mümkünse taze olarak hazırlanmalıdır. Ayrıca; yüksek viskoziteye sahip maddeler, rahatsızlığa neden olabilir bu sebeple mümkün olduğunca akışkan olmayan maddelerin kullanımından kaçınılmalıdır.

Emilme hızı: Beklenen farmakolojik ya da toksikolojik etki Emilme hızına bağlı olarak değişir. Bu da ilacın; fizikokimyasal özelliklerine, uygulama yoluna, çevresel faktörlere, hayvan türü ya da ırkına göre değişir.

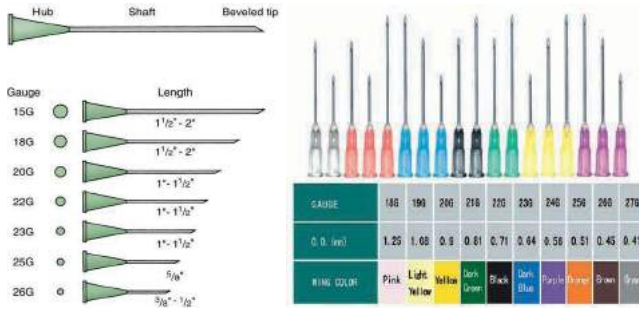
Alıştırma ve eğitim: Çalışma öncesi hayvanların deney veya uygulama yapılacak olan kafeslere veya odalara alıştırılması gerekir. Bu hem uygulama esnasında oluşabilecek stresi en aza indirmeye olanak sağlayacak hem de hayvanların ortama uyum sağlamalarını

hızlandıracaktır. Bu durum özellikle köpek ve primatlar için daha fazla önem taşır. Ayrıca; yine hayvanlar ilaç uygulanmadan elde tutulmaya alıştırıldığında, deney sırasında daha az strese girerler. Alışma ve eğitimde kullanılabilen yöntemlerden biri de “Ödüllendirme”dir. Ödüllendirme; iyi olan davranışların pekiştirilmesidir. Yine uygulama yoluna göre uygun sedasyon/anestezi yapılması da önerilir. Ancak burada seçilen sedatif/anesteziğin; çalışılma sonuçlarını etkilemediğinden emin olunmalıdır.

Kalite-standardizasyon-stabilite: Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin saflığından emin olunmalıdır. Yine; bu maddelerin hem diğer yabancı maddeler hem de mikrobiyal kontaminasyon yönüyle kontrolü önemlidir. Çalışma için hazırlanan batch’lerde (tuzları değişebilir) yapılan farklılıklar, kullanılan kimyasal maddelerin fiziko-kimyasal özelliklerini de değiştirebilir. Bu sebeple referans için maddenin batch numarası mutlaka belirtilmelidir.

Enjeksiyon ısısı: Soğuk maddelerin enjeksiyonu (direk buzdolabından alıp uygulanması gibi) rahatsızlık veya şoka neden olabilir. Bu sebeple; çalışmada kullanılacak maddeler mutlaka oda ısısına getirilmeli, hatta mümkünse uygulamadan hemen önce vücut ısısına kadar, el ile ısıtılmalıdır.

Enjeksiyon uygulaması: Genel olarak tüm enjeksiyonlar özellikle damar içi enjeksiyonlar yavaş yapılmalıdır. Enjeksiyon yapılacak iğnelerin çapı hayvanın bünyesine, uygulanacak ilaca ve yoğunluğuna uygun seçilmelidir. İğnenin çapı büyük olursa gerekli doz tam uygulanamaz. Büyük iğneler ağrı verici olabilmekte ve doku hasarına neden olabilmektedir. Uygulama öncesi yerel anestezi maddelerin uygulanması iğneye bağlı ağrıyı azaltır (yaklaşık 30±45 dk öncesinde kullanım). Genel olarak akışkanlığı hızlı olan sulu çözeltiler için 25 veya daha küçük numaralı iğneler kullanmak gerekirken, acııcılığı az olan veya yapışkan sıvılar için 21 veya daha büyük numaralı iğnelerin seçilmesi uygundur. Enjeksiyonu zor sıvılar verilirken pistonu geriden kilitlenebilir özel enjektörlerin seçilmesi önerilir. İğne çapı, formülasyonun vizkozitesine, uygulama hızına bağlı değişirken, iğne uzunluğu uygulanacak enjeksiyonun derinliğine bağlı değişir. Son zamanlarda iğnesiz enjektörlerin kullanımı giderek artmıştır. Enjeksiyona neden olmaması için her uygulamada iğneler değiştirilmeli ve her zaman ucu düzgün iğne kullanılmalıdır. Bu amaçla kullanılabilecek iğneler Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Enjeksiyon için tercih edilebilecek iğneler.

Hayvan türü ve uygulama yoluna ilişkin olarak iğne seçimine ilişkin faydalanılabilecek; enjeksiyon klavuzu, Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Enjeksiyon klavuzu.

	Intradermal (ID)		Subkutan (SC)		Kas içi (IM)		Periton içi (IP)		Damar içi (IV)		Kemik içi (IO)	
	İğne uzunluğu: 1/5-8"		İğne uzunluğu: 5/8-1"		İğne uzunluğu: 1/5-8"		İğne uzunluğu: 1/5-8"		İğne uzunluğu: 1/5-8"		İğne uzunluğu: 1/5-8"	
	Uygulanacak yer başına en yüksek hacim (ml)	İğne büyüklüğü (gauge)	Hacim arası (ml)	İğne büyüklüğü (gauge)	Uygulanacak yer başına en yüksek hacim (ml)	İğne büyüklüğü (gauge)	Hacim arası (ml)	İğne büyüklüğü (gauge)	En yüksek hacim (ml)	İğne büyüklüğü (gauge)	En yüksek hacim (ml)	İğne büyüklüğü (gauge)
Fare	0.05	27-30	2-3	25-27	0.05	25-27	2-3	23-27	0.20	26-30	0.20	25-27
Sıçan	0.05	25-27	5-10	23-25	0.30	25-27	5-10	23-25	0.50	21-23	0.50	23-26
Gerbil	0.05	27-30	1-3	25-27	0.05	25-27	2-3	23-25	0.10	27-30	0.10	23-25
Hamster	0.05	25-27	3-4	25-27	0.10	25-27	3-4	23-25	0.30	25-27	0.30	23-25
Kobay	0.05	25-27	5-10	23-25	0.30	25-27	10-15	23-25	0.50	25-27	0.50	22-25
Tavşan	0.05	25-27	30-50	21-25	0.50-1.0	23-25	50-100	21-23	1-5	23-25	1-5	20-22

İlaçların Veriliş Yolları

Genellikle deney hayvanlarında *ağız yolu*, *damar içi*, *deri altı*, *kas içi* ve *periton içi* yol tercih edilir. Özel durumlarda rektum içi ve intraserebroventriküler yollar da kullanılabilir. İlacın veriliş yolu; verilecek ilaç türü, miktarı ve formu göz önüne alınarak ayarlanmalıdır. Kasların innervasyonunda herhangi bir problem yoksa ilaçların verilmesinde uygun yol *kas içi* olarak verilmesidir. Bununla birlikte çok miktarda ilaç uygulanması kasların aşırı gerilmesi ve ağrı oluşmasına yol açar. Verilecek ilacın pH'sı farklı ve solüsyon ırlkiltici özellikte ise kas içi yol tercih edilmemelidir. Bu gibi durumlarda ilacın damar içi yolla verilmesi daha uygundur.

Teorik olarak enjekte edilecek solüsyonlar steril olmalıdır. Aksi takdirde enfeksiyon oluşumuna yol açar ve hayvanda ateş yükselir. Pratik olarak kemiriciler, tavşan, kuş ve diğer memelilerde kontaminasyondan kaçınmak şartıyla steril olmayan ilaçlar da uygulanabilir. Bu sebeple insan ve büyük hayvanlarda enjeksiyon yapılırken kullanılan asepti ve antisepti kurallarına laboratuvar hayvanlarında nadiren başvurulur.

Emilmenin geciktirilmesi: Bu amaçla; damar daraltıcıların (adrenalin, NA) kullanılması; ilacın tuz-esterlerinin hazırlanması (Penisilin G prokain; enantat, pamoat); ilacın fiziki durumunun değiştirilmesi (yağ, alüminyum, pirrolidon) veya deri altı tablet şeklinde uygulanmasına (steroid maddeler) başvurulabilir.

Sonuç

Sonuç olarak; deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, deneysel işlemlere başlanmadan önce, çalışmada kullanılacak olan kimyasal maddeler ve seçilecek olan deney hayvanına ilişkin bir ön hazırlığın yapılması, çalışma sonuçlarının güvenilirliği bakımından da son derece önemlidir. Yine deney hayvanları ile yapılacak olan çalışmalarda, hayvan hakları ve hayvan refahı da göz önünde bulundurulmalıdır.

Kaynaklar

1. Ünsaldı S (2015). Anestezi Sırası ve Sonrasında Görülen Kaza ve Komplikasyonlar ve Bunların Sağaltımları. F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg. 29(3):199-204.
2. Altıntaş (2017). Deney Hayvanlarında Anestezi ve Ötenazi Teknikleri. ANKÜSEM Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Programı.
3. Kaya S (2014). Veteriner Farmakoloji Cilt I Baskı 6. Medisan Yayınevi.
4. Durgut R, Yarsan E (2007). Laboratuvar Hayvanları Hastalıkları ve Sağaltımı. Medisan Yayınevi.
5. Arslan A (2019). Deney Hayvanlarında Anestezi, Analjezi ve Ötenazi. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü.
6. Pekcan Z (2009). Deney Hayvanlarında Anestezi, Analjezi ve Ötenazi.
7. Yarsan E (2014). Deney Hayvanlarında İlaç Kullanımı.

Türkiye’de Laboratuvar Hayvanlarında Anestezi, Analjezi ve Ötanazi

Zeyno NUHOĞLU¹ Abdurrahman AKSOY¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi AD, Samsun

Özet: Laboratuvar hayvanlarında, cerrahi işlemler nedeniyle ağrı ve stresi önlemek veya teknik olarak zor bir işlemi kolaylaştırmak ve operasyon sonrası bakımı sağlamak amacıyla anestezi/analjezik maddeler kullanılmaktadır. Hem hayvan refahı hem de deneylerden elde edilecek verilerin homojenliği ve doğruluğu için anestezi, analjezi ve ötanazi yönteminin doğru seçilmesi önemlidir. Bu derlemede, bilimsel araştırmalarda kullanılan laboratuvar hayvanlarına uygulanan anestezi ve analjeziklerin doğru bir şekilde uygulanıp/uygulanmadıkları, uygulama sıklıkları ve bu maddelerin kullanımlarını ortaya koymak için bir literatür taraması yapılmıştır. Ayrıca, bu taramayla laboratuvar hayvanlarında cerrahi işlemler sonucunda uygulanan ötanazi yöntemleri hakkında da bilgi verilmiştir. Türkiye adresli ve Science Citation Index (SCI)’te taranan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (2008-18), Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, TÜBİTAK tarafından yayınlanan, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences ve Turkish Journal of Medical Sciences olmak üzere toplam dört dergide yayınlanan çalışmalar iki dönemde (2000-07 ve 2008–18) sistematik olarak tanımlamak için kullanılmış, her bir döneme ait 51 ve 150 çalışma olmak üzere toplam 201 çalışma incelemeye dahil edilmiştir. Her bir çalışma için cerrahi işlemin uygulandığı hayvan türü ve sayıları, cerrahi işlemin niteliği, anestezi/analjezik maddeler, analjezik uygulamalar ve ilaç kombinasyonları incelenmiştir. Bu derlemenin bulguları, laboratuvar hayvanlarında anestezi/analjeziklerin cerrahi girişimlerde doğru ve etkili kullanımının önemini vurgulamakla birlikte hayvan refahına olan katkısını da ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Analjezi, Anestezi, Hayvan refahı, Laboratuvar hayvanları, Ötanazi.

Anesthesia, Analgesia and Euthanasia in Laboratory Animals in Turkey

Abstract: Anesthetic and analgesic agents are used to prevent pain and stress in laboratory animals due to surgical procedures, or to facilitate a technically difficult procedure and provide post-operative care. Both for animal welfare and for the homogeneity and accuracy of the experimental results, proper selection of anesthetic, analgesic and euthanasia methods is crucial. In this review, it is examined whether anesthetics and analgesics administered correctly, the frequency of administration and the use of these substances. In addition, this screening provides information about euthanasia methods performed as a result of surgical procedures in laboratory animals. Four peer-reviewed journals that are indexed in Science Citation Index (SCI) and published in Turkey have been selected to systematically identify two periods (2000-07 and 2008-2018). These journals are Veterinary Journal of Ankara University (2008-18), Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences and Turkish Journal of Medical Sciences. A total of 201 studies were included in the review, of which 51 and 150 studies belong to the periods 2000-07 and 2008-2018 respectively. For each study, the species and number of animals, the types of surgery, anesthetic agent(s), analgesic agent(s) and combinations of drugs were indicated. The findings of this review emphasize the importance of the correct and effective use of anesthetics and analgesics in laboratory animals and their contribution to the animal welfare.

Keywords: *Analgesia, Animal welfare, Anesthesia, Euthanasia, Laboratory animals.*

Giriş

Dünya genelinde yapılan bilimsel çalışmalarda her yıl yüz milyondan fazla deney hayvanı kullanılmaktadır (1). Bilimsel çalışmalarda laboratuvar hayvanlarına duyulan ihtiyaç, tüm dünyada önem kazanmakta olup, daha uzun bir süre deney hayvanlarına olan ihtiyaç devam edecektir. Bu durum, hayvanların bilimsel çalışmalarda kullanımına yönelik tartışmaları da beraberinde getirmektedir. Bu tartışmalar, bilimsel çalışmalarda deney hayvanı kullanılmaması, kullanılan hayvanların haklarının korunması ve hayvan refahının iyileştirilmesine yöneliktir. Laboratuvar hayvanlarının bilimsel araştırma ve testlerde kullanımıyla ilgili temel sorun; bilimsel prosedürlerin ağrı, acı ve strese neden olma

potansiyelidir (2). Russell ve Burch 1959 yılında, İngilizce “yerine koyma”, “azaltma” ve “iyileştirme” kelimelerinin baş harfinden köken alan ‘3R’ kuralını (Replacement, Reduction, Refinement) öne sürmüşlerdir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) de dahil olmak üzere uluslararası kuruluşlar ve Avrupa Komisyonu (1986) gibi düzenleyici otoriteler tarafından 3R’nin önemi kabul görmüştür. Bu kural, birçok ülkede hayvan çalışmalarını düzenleyen mevzuatın temelini oluşturmaktadır. Ayrıca, 3R kuralı bazı ülkelerde zorunlu etik inceleme sürecinin altında yatan çalışmaların da temel unsurudur (2,3). Biyomedikal araştırmalarda laboratuvar hayvanlarına yapılan uygulamalar; hayvanlarda acı, ağrı ve strese neden olmaktadır. Bu durum hayvan refahını olumsuz etkilemekte ve araştırma sonuçları üzerinde de önemli değişikliklere neden olabilmektedir. Anestezik ve analjezik maddelerin doğru ve etkin kullanılmasıyla belirtilen olumsuzlukların önüne geçilebilir. Anestezik ve analjezik maddeler, araştırmanın sonuçlarını etkilememeli, hayvanlarda fizyolojik değişikliklere neden olmamalı ve kalıcı hasarlar oluşturmamalıdır. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli uygulamalar sonucu oluşan acı, ağrı ve stresin azaltılması hayvan refahının korunmasına yönelik önemli yasalar ile güvence altına alınmıştır. Bu yasalara İngiltere Laboratuvar Hayvanları Yasası (1986), Avrupa Konseyi Sözleşmesi, ETS 123, deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan omurgalı hayvanların korunması ile ilgili ABD Hayvan Refahı Yasası örnek verilebilir (2,4,5). Avrupa Konseyinin bilimsel çalışmalarda kullanılan laboratuvar hayvanlarına yönelik 86/609/EEC sayılı direktifi, 2010/63/EU olarak güncellenerek son halini almıştır. Türkiye’de bilimsel çalışmalarda kullanılan hayvanlara yönelik hukuksal yapılandırma, Avrupa Birliği standartlarına bağlı olarak gerçekleştirilmektedir. Bu yapılandırmanın, Çevre ve Şehircilik Bakanlığı tarafından 2004 yılında yayınlanan 5199 sayılı “Hayvanları Koruma Kanunu” ile temeli oluşturulmuştur. Ayrıca; Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 2011 yılında yayınlanan “Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Hayvanların Refahı ve Korunmasına Dair Yönetmelik” ve 2014 yılında yayımlanan “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” ile son güncellemeler yapılmıştır (6,7). Laboratuvar hayvanlarıyla yapılan bilimsel çalışmalarda preanestezik medikasyonla cerrahi işlemler sonrası oluşacak ağrı engellenmektedir. Bilimsel çalışmalardan elde edilecek sonuçların doğru, etkili ve tekrarlanabilir olması uygun anesteziklerin ve operasyon öncesi bakımın iyileştirilmesine bağlıdır. Dünya genelinde yapılan çalışmalarda; cerrahi girişimler veya diğer ağrılı prosedürlerden sonra laboratuvar hayvanlarında anestezik ve analjeziklerin kullanımı hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (1). Cerrahi prosedürlerle meydana gelen acı, ağrı ve stres sonucu hayvanlarda oluşabilecek komplikasyonların hayati tehlike düzeyine çıkması durumunda, ötanazi uygulanması gerekir (8,9). Hawkins (2002)

tarafından, İngiltere’de bilimsel kuruluşlarda bulunan laboratuvar hayvanlarındaki ağrı, acı ve stresin nasıl gözlemlendiği ve değerlendirildiğini belirlemek için, bir anket çalışması yapılmış ve sonuçlar paylaşılmıştır (10). Anestezik ve analjezik maddenin seçimi, laboratuvar hayvanlarında yapılan preklinik çalışmalarda önemli bir rol oynadığından, hayvanların fizyolojik değişkenleri üzerindeki etkileri dikkate alınarak yapılmalıdır. Ayrıca, seçilen anestezik madde; yapılan cerrahi işlemin niteliğine, süresine ve bilimsel çalışmanın amacına uygun olmalıdır (11). American College of Laboratory Animals Medicine (ACLAM) “Hafif ya da anlık bir ağrıdan daha fazlasına neden olması beklenen prosedürler, analjeziklerin kullanımını gerektirir.” açıklamasıyla ağrı yönetiminin bilimsel çalışmalardaki önemini belirtmiştir (12). Ağrı yönetimi, yalnızca hayvan refahı açısından değil, bilimsel çalışmaların tasarlanması ve elde edilen verilerin doğruluğu için de son derece önemlidir. Tedavi edilmeyen ağrı, verileri ve çalışma sonuçlarını değiştirmektedir. Bu durum, çalışma sonuçlarının tekrarlanabilirliğini de engeller. Ağrı yönetimi, çalışmanın her aşamasında bütün hayvanlar için ağrının gözlemlenmesi ve cerrahi işlemler sonucu oluşan ağrıya müdahaleyi gerektirir. Ağrı yönetimi ayrıca, anestezik ve analjezik madde seçimi, doz ve doz aralığının tayini, uygulama şekli ve hayvan davranışlarının gözlemlenmesini de kapsar. Ağrı yönetimi, laboratuvar hayvan çalışmalarında önceden planlanıp, ayrıntılı bir şekilde belirlenmelidir (13). Bu derlemede, Türkiye’de laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalarda kullanılan anestezik ve analjezik maddeler ile ötanazi yöntemlerinin değerlendirmesi amaçlanmıştır. Anestezik ve analjezikler, laboratuvar hayvan çalışmalarının ayrılmaz bir parçası olmakla birlikte, bu maddelerin çalışmalar üzerindeki etkisi de son derece önemlidir. Kullanılan anestezik ve analjezikler; çalışmanın niteliğine göre seçilmeli ve çalışma sonuçlarını en az düzeyde etkilemesi sağlanmalıdır. Ayrıca, çalışmalarda operasyon öncesi, esnası ve sonrasında analjezik kullanımı değerlendirilerek hayvan fizyolojisine olan etkileri göz önünde bulundurulmalıdır. Taranan literatürlerde, ötanazi yöntemleri ve seçilen ötanazi yönteminin hayvan refahı üzerine etkileri de incelenmektedir. Bu derlemede, Türkiye adresli ve Science Citation Index (SCI) tarafından taranan 4 dergide laboratuvar hayvanlarında yapılan 201 çalışmada yer alan; pre-anestezi, intra ve post operatif analjezi, hayvan sayıları ve türü, çalışma türü, ötanazi yöntemleri ve hayvan refahı kavramı hakkında bilgi verilmiştir.

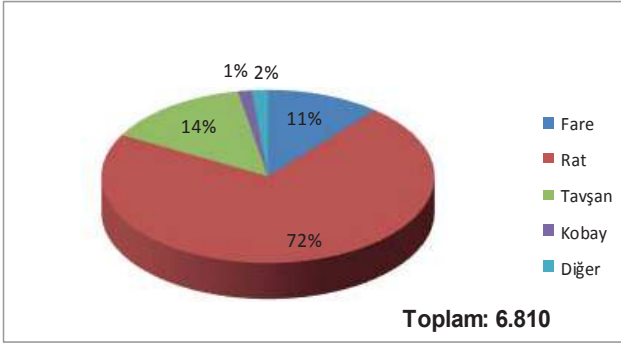
Materyal ve Metot

Bu derlemede yapılan literatür taraması iki aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalardan ilki dergilerin seçilmesi; ikincisi ise belirlenen iki dönemde yayınlanan laboratuvar hayvanı

alışmalarının incelenmesidir. Birinci aşama; Türkiye’de veteriner hekimlik alanında ve uluslararası indeksler kapsamında taranan (SCI) üç, tıp alanında yayınlanan bir olmak üzere toplam dört dergi seçilmiştir. Bu dergiler; Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, Turkish Journal of Medical Sciences ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi’dir. Bu dergilerin her biri SCI-E (Science Citation Index- Expanded) kapsamında taranmaktadır.

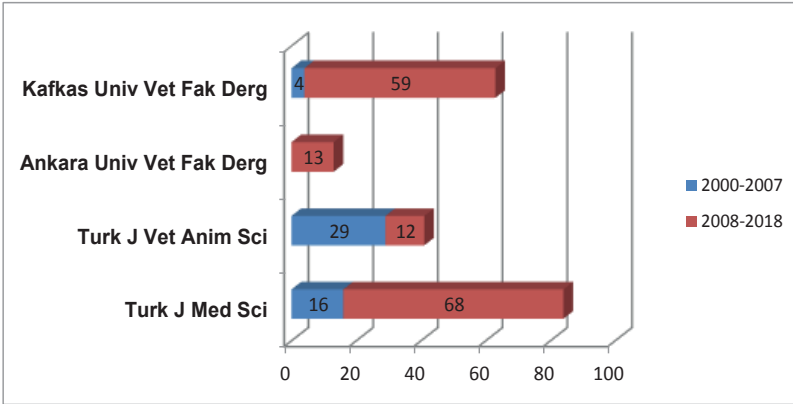
İkinci aşama; bu dergilerin online arşivlerinde (14,15,16,17) yapılan tarama sonucu; laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalar 2000-2007 ve 2008-2018 olmak üzere iki dönemde incelenmiştir. Ancak, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi arşivinde bulunan 2008-2018 yıllarında yayınlanan çalışmalar literatür taramasına dahil edilmiştir. Bu dergilerin arşivindeki laboratuvar hayvanı çalışmalarını belirlemek için; "fare", "rat", "tavşan", "anestezi", "analjezi" anahtar kelimeleri kullanılmıştır. Literatürlerin belirlenmesinde kullanılan kriterler; 1) Hayvanlar: Laboratuvar hayvanları; 2) Müdahale: Herhangi bir anestezi, analjezi ve/veya ötanazi yöntemi; 3) Karşılaştırma: İki dönem aralığının belirlenmesi; 4) Birincil sonuç: anestezi tipi, anestezik ajanlar ve ötanazi yöntemi; 5) İkincil sonuç: post-operatif ağrı tedavisi, cerrahi girişimler, cerrahi modellerdir.

Sonuç olarak, seçilen dergi arşivlerinde belirlenen; 201 laboratuvar hayvanı çalışması incelenmiştir. Bu çalışmaların 51’i 2000-2007 yılları arasında yayınlanmış iken, 150’si 2008-2018 yıllarında yayınlanmıştır. Belirlenen dört dergideki; laboratuvar hayvanlarında kullanılan anestezik ve analjezik maddeler, bu maddelerin kombinasyonları ve ötanazi yöntemleri sunulmuştur. Ayrıca, yapılan çalışmalarda kullanılan hayvan türü, sayısı Şekil 1’de verilirken, çalışmaların sayısının dergilere göre dağılımı Tablo1’ de gösterilmiştir.



Şekil 1. İncelenen makalelerde kullanılan laboratuvar hayvanlarının türlere göre dağılımı.

Tablo 1. Dergilerde yayınlanan laboratuvar hayvanı çalışmalarının yıllara göre dağılımı.



Tablo 2. Taranan literatürlerdeki modelleri tür, çalışma sayısı, cerrahi işlem ve zaman aralığının incelenmesi.

Model Adı	Zaman aralığı	Çalışma Sayısı	Tür	Cerrahi işlem
Laparotomi	2008-18 2000-07 2000-07 2008-18 2000-07 2008-18 2008-18	18 6 1 5 1 1 1	Rat Rat Kobay Tavşan Tavşan Tavşan ve kobay Hamster	Karın boşluğunun açılması / Operatif laparotomi
Kan örneklerinin alınması ve incelenmesi	2008-18 2000-07 2008-18 2008-18 2000-07 2000-07 2008-18	21 6 1 7 1 2 1	Rat Rat Kobay Fare Fare Tavşan Domuz	Histolojik /patolojik muayene
Ortopedi	2000-07 2008-18 2008-18 2008-18	3 6 2 1	Tavşan Tavşan Rat Fare	Eklem, kemik, tendon, kas hasarının oluşturulması
Laminektomi	2008-18	2	Rat	Omur laminasının bir kısmının cerrahi olarak çıkarılması
Doku örneklerinin alınması ve incelenmesi	2000-07 2008-18 2000-07 2008-18 2000-07 2008-18 2000-07 2000-07	2 3 1 17 7 1 1 1	Kaz Tavşan Tavşan Rat Rat Kobay Kobay Fare	
Gonadektomi	2000-07	1	Tavşan	Üreme organlarının çıkarılarak morfolojik olarak incelenmesi
Makroanatomik inceleme	2000-07 2000-07 2008-18	2 1 1	Tavşan Rat Rat	Morfolojik inceleme
Anestezik maddelerin etkinlik incelemesi	2008-18 2008-18 2000-07 2000-07 2000-07	2 1 1 1 1	Rat Tavşan Tavşan Domuz Güvercin	Farklı anesteziklerin hayvanlar üzerinde etkinlik denemesi
Göz modelinin oluşturulması/göz cerrahisi	2008-18 2000-07 2000-07	9 1 1	Tavşan Tavşan Rat	Kimyasal yanık modeli oluşturulması

Üç boyutlu görüntüleme teknikleri uygulaması	2008-18 2008-18 2008-18	3 2 1	Tavşan Rat Domuz	Damar içi sıvıların verilerek görüntüleme teknikleri
Adrenalektomi	2008-18	1	Rat	Adrenal bezin çıkarılması
Yara modeli oluşturulması	2008-18 2000-07 2008-18 2000-07 2008-18 2008-18	5 1 3 1 1 1	Rat Rat Tavşan Tavşan Kobay Fare	Deri ensizyonu Oluşturulan yara modelinin iyileşme süreci Yara modelinden örnek alınması
Ovariektomi ve Ovariohisterektomi	2008-18 2008-18 2000-07	7 1 1	Rat Tavşan Rat	Ovaryumun cerrahi yöntemle alınması
Nörolojik model oluşturma	2008-18 2000-07 2008-18	5 1 1	Rat Rat Fare	Mikrocerrahi Siyatik siniri hasarı
Tiroidektomi	2008-18 2000-07	1 2	Rat Rat	Tiroid bezinin bir kısmının yada tamamının çıkarılması
Kraniyotomi	2008-18 2008-18	5 1	Rat Fare	Sterotaksik frame'e yerleştirilip beyne prob uygulaması
Trakeotomi	2000-07 2000-07 2008-18	1 1 3	Rat Rat Rat	Trakeyada cerrahi olarak ventilasyon amaçlı açıklık oluşturulması
Osteotomi	2000-07 2008-18	1 1	Tavşan Rat	Ortopedi / deneysel artrit model
Torakotomi	2000-07 2008-18 2008-18	2 4 2	Rat Rat Fare	Kateter yerleştirilmesi
Pinealektomi	2008-18	1	Rat	Epifiz bezinin cerrahi operasyonla çıkarılması

Laboratuvar Hayvanlarında Anestezi

Anestezi farmakolojik olarak; amnezi, analjezi, bilinç ve iskelet kas reflekslerinin kaybı, çevreden gelen tepkilere verilen yanıtın azalmasıdır (18). Anestezi ve analjeziklerin laboratuvar hayvanlarında kullanımı; kan alma, görüntüleme tekniklerinin uygulanması, enjeksiyon gibi küçük prosedürlerden büyük cerrahi operasyonlara kadar geniş bir alanı kapsar. Anestezik ve analjezik maddeler, laboratuvar hayvanlarıyla yapılan bilimsel çalışmalarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Analjezikler, laboratuvar hayvanlarında uygulanan cerrahi operasyonlar öncesi, esnası ve sonrasında temel görev görmektedirler. Laboratuvar hayvanlarında anestezik ve analjezik maddelerin kullanımı sadece mesleki ve

etik bir zorunluluk değil, aynı zamanda araştırma sonuçlarının başarısında da son derece önemlidir. Acı ve ağrının hekim tarafından başarıyla engellenmesi, hayvanlarda oluşabilecek komplikasyonları ve bu komplikasyonlara erken müdahaleyi içeren iyi düşünülmüş bir plana dayanmaktadır (19). Bu derleme kapsamında incelenen çalışmalarda, laboratuvar hayvanlarında anestezi/ötanazi için kullanılmaları uygun olmayan ve yasaklanmış maddelerin kullanımına rastlanmıştır. Bu çalışmaların %14,9 (30)'unda eter kullanılmıştır. Eter, mukozalarda tahrişe neden olmasının yanında; hava ve oksijenle patlama riski taşımaktadır. Bazı ülkelerde 1990'ların sonlarında anestezik madde olarak eter kullanımı sağlık ve güvenlik endişeleri nedeniyle yasaklanmıştır. Ayrıca, ötanazi için de yasaklı bir maddedir (18, 20). Üretan mutajenik ve karsinojenik bir maddedir; bu nedenle uygulayıcı personel açısından son derece tehlikelidir. İzofluran ve halotan, laboratuvar hayvanlarında yaygın kullanılan anestezikler olmakla birlikte; önlem alınmadığında bu maddelerin ortama sızması sonucu uygulayıcı personel zarar görebilmektedir. İnhalasyon anesteziklerin kullanımından kaynaklanan bu dezavantajlar, uygulayıcı personelin katı anesteziklere yönelmesine neden olmaktadır. Katı anestezikler genellikle kombinasyon şeklinde uygulanmaktadır. Katı anesteziklerden olan sodyum pentobarbitalin kullanımı gittikçe azalmakta; İngiltere ve ABD'de kullanılmamaktadır. Pentobarbitalin, özellikle kemirgenlerde dar bir sağaltım indeksine sahip olması ve analjezik etkisinin bulunmaması nedeniyle tercih edilmemektedir. Ayrıca, pentobarbital hayvanlarda iyileşme sürecinin uzamasına neden olmaktadır. Dissosiyatif bir anestezik olan ketamin, sedasyon ve hareketsizliğe neden olur. Ayrıca, ketamin; kas tonusu, kan basıncı ve tükürük salgısını artırır. Ketamin, özellikle kemirgenlerde şiddetli solunum depresyonu ve apneye neden olmaktadır. Bu nedenle ketaminin tek başına kullanımı önerilmemektedir. Ancak, bu derlemedeki literatürlerin, %14 (29)'ünde ketamin tek başına anestezik madde olarak kullanılmıştır. Ketamin, ksilazin ve diazepam ile birlikte laboratuvar hayvanlarında kullanılmalıdır (19, 21). Aşağıda yer alan Tablo 3'de çalışmalarda kullanılan anestezik madde ve kombinasyonlarının iki ayrı dönemdeki sayıları verilmektedir.

Tablo 3. Laboratuvar hayvanlarında kullanılan anesteziklerin değerlendirilmesi.

ANESTEZİKLER	Zaman aralığı	
	2000-07 Çalışma sayısı	2008-18 Çalışma sayısı
İnhalasyon Anestezikler		
Sevofluran		2
İzofluran		5
Üretan	2	6
Halotan	1	
Kloroform	1	1
Eter	13	17
Enjektabl Anestezikler		
Sodyum Pentobarbital	2	5
Kloralhidrat		3
Tribromoetanöl	1	1
Tiyopental		7
Dissosiyatif Anestezikler		
Ketamin	8	21
Anesteziik ilaç kombinasyonları		
Ketamin/Ksilazin	18	65
Ketamin/ Pentobarbital		1
Ketamin/ Ksilazin/ Sevofluran		1
Ketamin/ Ksilazin/ İzofluran		2
Ketamin/Ksilazin/Medetomidin	1	
ketamin/Ksilazin/Tiyopental		2
Ketamin/Propofol		1
Asepromazin/Ketamin		2
Atipamezol/Ksilazin		1
Ketamin/Medetomidin		2
Ketamin/ Desfluran		1
Ketamin/ Klorpromazin	1	
Ketamin/Diazepam		2
Ketamin/İzofluran		1
Tiyopental/Fentanil/Pentobarbital	1	

Zolezepam/Tilatamin		1
Üretan/Klorhidrat/Pentobarbital	1	

Laboratuvar Hayvanlarında Analjezi

“Ağrı” Latince “poena” kelimesinden türetilmiştir. Uluslararası Ağrı İnceleme Derneği Taksonomi Komitesi tarafından “Gerçek veya potansiyel doku hasarına bağlı hoş olmayan, duyuşsal ve duygusal deneyim” olarak tanımlanmıştır. Laboratuvar hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda, hayvanların da insanlar gibi acı duyusuna sahip oldukları gözlemlenmektedir. Ağrı duyusunun, hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda azaltılması veya engellenmesi gerektiği tüm dünyada kabul edilmektedir. Ağrının algılamasına neden olan anatomik yapılar ve nörofizyolojik mekanizmalar insan ve hayvanlarda benzerdir. Bu nedenle, bilimsel çalışmalardaki uygulamalar hayvanlarda; ağrı, acı, stres, kaçış, tepki, fizyolojik değişiklikler meydana getirmektedir (22).

Araştırmalarda kullanılan hayvanlarda ağrıyı kontrol etme ihtiyacı sadece etik açıdan değil, aynı zamanda ağrının araştırma sonuçları üzerinde önemli değişikliklere yol açmasından dolayıdır. Cerrahi girişimin neden olduğu stres ile birlikte oluşan ağrı; endokrin değişiklikler, bağırsak hareketliliğinin azalması, solunum fonksiyonlarının bozulması hem insan hem de hayvanlarda merkezi sinir sisteminde değişiklikler meydana getirmektedir. Ayrıca, ağrı hayvanların beslenme ve su tüketimi üzerine de olumsuz etkilidir (23, 24).

Laboratuvar hayvanlarında ağrının belirlenmesi, hayvan davranışlarının dikkatlice gözlemlenmesi ve değerlendirilmesini gerektirir. Araştırmacılar ve hayvan bakımında görevli personel, hayvanlarda oluşan ağrı ve acıyı gözlemleyebilmek için hayvan davranışları konusunda eğitilmelidir. Ağrı yönetimi, laboratuvar hayvanlarında yapılan bilimsel çalışmaların ayrılmaz bir unsurudur. Bu derlemede yer alan hayvan çalışmalarında, anestezinin devamında analjezik madde kullanımı sadece % 4,9’dur. Yetersiz ve uygun olmayan analjezik madde kullanımı; hayvanlarda hemodinamik, metabolik ve hormonal değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle, operasyon sonrası uygun olmayan analjezik maddelerin kullanımı, deney sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu olumsuzluklara örnek olarak; opoidlerle ilişkili solunum depresyonu, steroid yapıda olmayan yangı giderici ve ağrı kesici ilaç (non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID) kullanımıyla meydana gelen mide ve bağırsak ülseri örnek verilebilir. Sonuç olarak, analjezik ve anestezi ilaçlarının

kullanımı hekim tarafından çalışmaya uygun şekilde seçilmeli ve uygulanmalıdır. Ağrılı müdahalelerden sonra, analjezik tedavinin ameliyat sonrası döneme yayılması ve hekim tarafından takibinin yapılması son derece önemlidir. Post-operatif ağrı yönetimi, hayvanlarda acı çekmeyi en aza indirmek ve ameliyat sonrası stresi azaltmak için oldukça önemlidir. Bu derlemede, yapılan çalışmaların yalnızca % 3,48’inde analjezik maddelerle ameliyat sonrası tedavi bildirilmiştir. Çalışmaların incelenmesi sonucunda, intra ve post-operatif analjezi uygulamalarının yetersiz olduğu anlaşılmaktadır (25, 26, 27, 28).

Tablo 4. Literatürlerdeki analjezik madde uygulamaların sınıflandırılması.

Çalışmalarda İntra-operatif ve Post-operatif Analjezik Kullanımı									
2000-2007						2008-2018			
Analjezik Sınıfı	Analjezik	Rat	Fare	Tavşan	Kobay	Rat	Fare	Tavşan	Kobay
Opidler	Butorfanol	0	0	0	0	0	0	2	0
NSAID (Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar)	Karprofen	0	0	0	0	2	0	1	0
	Flunixin meglumin	0	0	0	0	0	0	1	0
	Metamizol	0	0	0	0	0	0	1	0
	Meloksikam	0	0	0	0	3	0	1	1
Toplam		0	0	0	0	5	0	6	1

Bu derlemede, 2000-07 yılları arasında taranan makalelerde intra-operatif ve post-operatif analjezik kullanımına rastlanmamıştır. Diğer yıl aralığında (2008-2018) ise toplam 150 makaleden yalnızca 12 (%8)’sinde analjezik kullanımına rastlanmaktadır. Bu sonuç, dört dergide yayınlanan laboratuvar hayvanı çalışmalarında kullanılan analjezik maddelerin yetersiz olduğunu göstermektedir. Ayrıca belirtilen periyotlarda yapılmış olan laboratuvar hayvanlarında yapılan araştırmalar ile ilgili uluslararası yazım ve bilgilendirme (Animal Research: Reporting of In vivo experiments (ARRIVE) guideline vb) kurallarına uyulmadığı tespit edilmiştir.

Laboratuvar Hayvanlarında Ötenazi

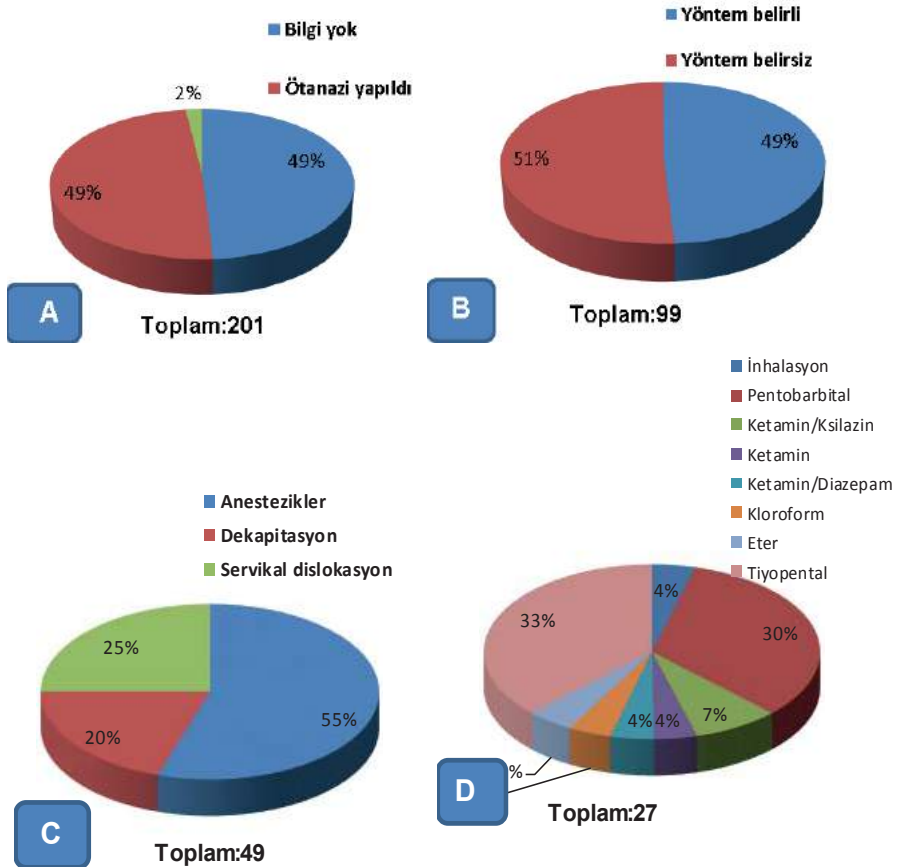
Ötenazi, hayvanlarda acı, korku ve stresin en aza indirgenmesiyle şekillenen insancıl bir ölüm şeklidir. Ötenazide hayvan refahı açısından temel kriterler; ağrısız, acısız, hızlı bir bilinç kaybı ve ani ölümün şekillenmesidir. Seçilen ötenazi yöntemi; hayvanlarda minimum kısıtlama gerektirmeli ve heyecan yaratmamalıdır. Bu yöntem; çalışmada kullanılan hayvanın yaşı, türü ve fizyolojisine uygun olmalıdır. Ayrıca, uygulayıcı için güvenli ve mümkün olduğunca kolay uygulanabilir, estetik bir yöntem olmalıdır. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan bilimsel çalışmalarda çeşitli nedenlerle ötenaziye ihtiyaç duyulur. Bu nedenler deneyin devamında veya sonunda hayvanda oluşan ciddi komplikasyonlar; kan ve diğer doku örneklerinin alınması; ağrı, stres ve acı seviyelerinin belirtilen seviyeyi aşması; hayvan sağlığı ve refahının tehlikeye düşmesi; hayvanların ıslah için uygun olmamasıdır (29, 30). Laboratuvar hayvanlarında kullanılan ötenazi yöntemleri fiziksel ve kimyasal olarak ikiye ayrılmaktadır (9).

Fiziksel yöntemler; servikal dislokasyon, dekapitasyon, beyin sarsıntısı (concussion) ve mikrodalgadır. Bu yöntemler, beyne uygulanan fiziksel travma sonucu hayvanlarda ani bilinç kaybına neden olmaktadır. Fiziksel yöntemlerle gerçekleştiren ötenazide, farmakolojik maddelerin kullanılması (kimyasal yöntem); yöntemin daha güçlü ve etkili olmasını sağlamaktadır. Fiziksel yöntemler, uygulayıcılar açısından zorlu ve estetik olmamasına rağmen; etkili, hızlı ve deney sonuçları üzerinde en az değişikliğe sebep olurlar. Fiziksel yöntemin uygulanmasında, bilinçli ve eğitilmiş personele ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemler hayvan hareketlerin sınırlandırılmasını ve sabit tutulmasını gerektirmektedir. Yöntemler uygulanırken, hayvanlar mümkün olduğunca diğerlerinden ayrılmalıdır. Ötenazi uygulanan hayvanın ses, hareket, koku ve istenmeyen görüntüsü diğer hayvanları etkilememelidir (31,29).

Kimyasal yöntemler; uçucu bileşikler (CO_2 , CO ve uçucu anestezikler) ve katı anesteziklerdir. Anesteziklerin yüksek dozda verilmesi ötenazide yaygın kullanılan kimyasal yöntemlerdir (29).

Bu literatür taramasında ötenazide kullanılan fiziksel yöntemler dekapitasyon ve servikal dislokasyondur. Kimyasal yöntemlerde ise anestezik maddelerin; sodyum pentobarbital, eter, kloroform, sodyum tiyopental, ketamin/ksilazin, izofluranın yüksek dozda

uygulanmaları görülmektedir. Bu uygulamalar aşağıda Şekil 2’de A, B, C ve D grafikleriyle gösterilmiştir.



Şekil 2. Ötanazi uygulamaları ve uygulama yöntemleri: Değerler, toplam sayıya göre yüzde olarak verilmiştir (Pasta diyagramının altında). A: Ötanazinin uygulanıp/uygulanmadığı: 201 makalenin %48,75(98) bilgi yok + %49,25 (99)’u ötanazi uygulaması var + % 1,99 (4) ötanazi uygulaması yok. B: Ötanazinin yöntemi hakkında bilgi var/yok: %51 (50) yöntem belirsiz + %49 (49) yöntem belirli. C: Ötanazi yöntemi: % 55,10 (27) anestezikler + % 20,40 (10) dekapitasyon + %24,48 (12) servikal dislokasyon. D: Yüksek doz uygulanan anestezi maddeleri: %3,70(1) inhalasyon (izofluran) +%29,62 (8) pentobarbital + % 7,4 (2) ketamin/ksilazin + %3,70(1) ketamin + %3,70(1) ketamin/diazepam + %33,33(9) tiyopental + %14,81 eter + %3,7 (1) kloroform.

Çalışmalarda ötanazi için uygun olmayan eter, kloroform ve ketamin kullanımına rastlanmaktadır. Eter, yüksek konsantrasyonlarda mukozaları tahriş edici ve katekolamin

seviyelerini yükseltirken hayvanlarda stresin artmasına da neden olmaktadır. Eter, patlayıcı özelliğinden dolayı uygulayıcı için ciddi risk taşımaktadır. Kloroform, merkezi sinir sistemi depresyonu, kalp ve solunum yetmezliğine neden olur. Ayrıca, bu madde operatör ve hayvanlarda nefrotoksik, hepatotoksik ve kansorejen etkiler yaratabilmektedir. Kloroformun kullanımına bağlı olarak; hayvanlarda aşırı çarpınma, stres ve heyecan görülmektedir. Ketamin, çok yüksek dozlarda kullanıldığında ölüme neden olabilmektedir. Ketaminin yüksek dozda uygulanması ise hayvanlarda (özellikle tavşanlarda) acı, stres ve istenmeyen durumlara neden olabilmektedir. Ancak, ketamin ksilazin ile birlikte kullanıldığında ötanazi yöntemi olarak kabul edilebilir (29, 31, 32).

Çeşitli ötanazi yöntemleri, cerrahi işlemin farklı aşamalarında (operasyon öncesi, sırası veya sonrasında) hayvan refahını etkileyen riskler taşır. Bu riskler; korku, ağrı, solunumun etkilenmesi, hareketlerin kısıtlanması ve strestir. Ötanazi yönteminin uygulayıcı tarafından belirlenmesinde hayvan refahı kriterleri dikkatli bir şekilde düşünülerek seçilmelidir (30). Tablo 5’de literatürlerde kullanılan yöntemler (izofluran, barbitüratlar, dekapitasyon ve servikal dislokasyon) hayvan refahı kriterleri dikkate alınarak karşılaştırılmaktadır.

Tablo 5. Ötanazi Yönteminin Seçiminde Hayvan Refahı Kriterleri (28, 29).

Laboratuvar Ötanazi Kriterleri	Hayvanlarında	İzofluran	Barbitüratlar	Dekapitasyon	Servikal Dislokasyon	Ketamin
Hayvanlarda hareketlerin kısıtlanmasına bağlı oluşan stres			++	++	++	++
Ötanazi öncesi indüksiyon kabininde oluşan stres		++				
Diğer hayvanların ses veya feromonlarından etkilenme		+	+	+	+	+
Metot uygulandıktan sonra kalıcı olarak kortikal aktivitenin son bulması				+	+	
Operatör hatası oluşma olasılığı			+	++	++	+
Operatör hatalarının sonuçları				++	++	
Uyanma, geri dönme durumu		++	++		+	++
Bilinçsiz uygulamardan kaynaklanan ağrı			++	++	++	++
Bilinçsiz uygulamalardan kaynaklanan stres		++				

+: olasılığı düşük ; ++: olasılığı yüksek

Sonuç

Bu derlemede, Türkiye’de laboratuvar hayvanlarında yapılan bilimsel çalışmalarda yer alan; anestezi, analjezi ve ötanazi yöntemleri incelenmiştir. İncelenen literatürlerde kullanıma uygun olmayan anestezik maddeler ve ötanazi yöntemlerine rastlanmıştır. Ayrıca, operasyon öncesi ve sonrası, laboratuvar hayvanlarında oluşabilecek ağrı, acı ve stresin önlenmesine yönelik analjeziklerin kullanımda eksiklikler belirlenmiştir. Ağrı yönetimi, laboratuvar hayvanı çalışmalarında önceden planlanarak, uygulanmalı ve bilimsel çalışma sonrasında da devam ettirilmelidir. Analjezik ve anestezik maddelerin seçiminin hem hayvan refahı hem de çalışma sonuçları üzerinde önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca, bu derleme, laboratuvar hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda konuyla ilgili kılavuz ve literatürlere duyulan ihtiyaca dikkat çekmektedir. Kılavuzlarda belirtilen doz ve uygulama şekilleri çalışılan hayvan modeline göre dikkatlice seçilmeli ve uygulanmalıdır. Anestezi, analjezi ve ötanazi

uygulamaları için geliştirilen özel kılavuzlar; hayvan deneylerinin kalitesinin yanı sıra hayvan refahı, hayvan haklarının korunması ve gelecekteki bilimsel çalışmalara da kaynak olacaktır.

Kaynaklar

1. Flecknell PA, Thomas A. Comparative Anesthesia and Analgesia of Laboratory Animals. Veterinary Anesthesia and Analgesia. The Fifth Edition of Lumb and Jones Ed: Kurt A. Grimm, Leigh A. Lamont, William J. Tranquilli, Stephen A. Chapter 39 (2015), 754-763. John Wiley & Sons, Inc.
2. Carlsson HE., Hagelin J., HAU J. Implementation of the 'Three Rs' in biomedical research, Veterinary Record (2004) 154, 467-470.
3. Penny Hawkins. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations (2002) 36(4),378-395.
4. Claire A. Richardson, Paul A. Flecknell. Anaesthesia and Post-operative Analgesia Following Experimental Surgery in Laboratory Rodents: Are We Making Progress? (2005) Atla 33, 119–127.
5. Carbone L. Austin J. Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare Plos One (2016) 11(5), 1-24. doi:10.1371/journal.pone.0155001.
6. Resmi Gazete (01.07.2004, Sayı:25509) 5199 sayılı Hayvanları Koruma Kanunu (2004).
7. Melikoğlu G., Aksoy A. Avrupa Birliği ve Türkiye’de Deney Hayvanları Mevzuatına Genel Bir Bakış (2016) 1(1), 56-62. doi:10.5336/jlabanim.2016-52876.
8. Flecknell, P.A. Anaesthesia of animals for biomedical research. British Journal of Anaesthesia (1993). 71, 885–894.
9. Gökmen S., Pehlivan A., Aksoy A. Laboratuvar Hayvanlarında Ötanazi Yöntemleri. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi (2019) 30 (1), 87-94.
10. Hawkins, P. Recognising and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. Laboratory Animals (2002) 36, 378–395.
11. Gargiulo S., Greco A., Gramanzini M. Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part I: Anesthetic Considerations in Preclinical Research. Ilar Journal (2012);53(1):55-69. doi: 10.1093/ilar.53.1.55.
12. Kohn DF., Martin T. Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science (2007);46(2): 97–108.
13. Jirkof P. Side effects of pain and analgesia in animal experimentation. Lab Anim (NY). (2017) 22;46(4):123-128. doi: 10.1038/labanim.1216.
14. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. Erişim: <http://vetjournal.ankara.edu.tr/archive>. Erişim tarihi: 25.07.2019
15. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. Erişim: <http://vetdergikafkas.org/archive.php>. Erişim tarihi: 25.07.2019
16. Turkish Journal of Medical Sciences. Erişim: <https://journals.tubitak.gov.tr/medical/archive.htm>. Erişim Tarihi: 25.07.2019
17. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. Erişim: <http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/archive.htm>;jsessionid=C482FE99069EC664869445F3DD86C2EA. Erişim tarihi: 25.07.2019.

18. Hein M., Roehl A.B., Tolba R.H. (2017). Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. *Small Animal Imaging* (2017) 117–126. doi:10.1007/978-3-319-42202-2_7.
19. Sedation/Tranquilization, Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals and Veterinarian Recommended Formularies 1-14. Erişim: <https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/ucar/policies/documents/Anesthesia-and-Analgesia-in-Laboratory-Animals>. Erişim tarihi: 06.07.2019.
20. Flecknell P., Lofgren J. *Laboratory Animal Medicine Preanesthesia, Anesthesia, Analgesia and Euthanasia, Laboratory Animal Medicine*. Ed: Flecknell P, Lofgren JLS, Dyson MC, Marini RR, Michael Swindle M, Wilson RP. Third edition. Chapter 24 (2015), 1135-1200 Elsevier Inc. ISBN 9780124095274.
21. Guidelines on Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. *Animal Care and Use Committee* (2016). University of California, Berkeley. Erişim: <https://www.usf.edu/research-innovation/comparative-medicine/documents/cmdc/c086-guidelines-anesthesia-analgesia-lab-animals.pdf>. Erişim tarihi: 02.08.2019.
22. Carbone L. Pain in Laboratory Animals: The Ethical and Regulatory Imperatives. *Plus One* (2012) 6(9), 1-6.
23. CCAC (1993). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, 2nd edn, (1993) 1, 115. Ottawa, ON, Canada: Canadian Council on Animal Care. ISBN 0-919087-18-3.
24. OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, (2000), 12. Paris, France: OECD.
25. Haljamae, H. & Stomberg, M.W. Post-operative pain management: clinical practice is still not optimal. *Current Anaesthesia and Critical Care* (2004) 14, 207–210.
26. Close, Banister, Keith (1997). *Euthanasia of experimental animals*. EU publications. 1997-03-21. ISBN: 92-827-9694-9.
27. Carbone L. Pain Management Standards in the Eighth Edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. (2012) 52(3), 322-28.
28. Uhlig C, Krause H, Koch T, Gama de Abreu M, Spieth PM. Anesthesia and Monitoring in Small Laboratory Mammals Used in Anesthesiology, Respiratory and Critical Care Research: A Systematic Review on the Current Reporting in Top-10 Impact Factor Ranked Journals. *PLoS ONE* (2015) 10(8): e0134205. doi:10.1371/journal.pone.0134205.
29. Close B., Banister K. Baumans V. *Euthanasia of experimental animals*. European Commission (1997), 1-89. ISBN 92-827-9694-9.
30. Carbone L. Euthanasia and Laboratory Animal Welfare. *Laboratory Animal Welfare*. Ed: Turner PV., Bayne LA. American College of Laboratory Animal Medicine Series. Chapter 11 Elsevier (2014), 157-169.
31. Mrs Bryony Close (Chair), Dr Keith Banister, Dr Vera Baumans. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1 *Laboratory Animals* (1996) 30, 293-316 ISSN 0378-6978.
32. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition American Veterinary Medical Association 1931 N. Meacham Road Schaumburg, IL 60173. ISBN 978-1-882691-21-0.

Nanopartiküller ve Sucul Ortam Üzerindeki Toksik Etkileri

Özgür KUZUKIRAN¹ Ayhan FİLAZİ²

¹Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü,
Çankırı, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara, Türkiye

Özet: Sahip oldukları benzersiz özellikler sayesinde nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen nanopartiküllerin, kullanım alanları büyük bir hızla artmaktadır. Nanopartiküller günümüzde ilaç, savunma, tıbbi görüntüleme, kozmetik, kimya, enerji, boya sanayi gibi endüstrinin pek çok alanında kullanılmaktadırlar. Kullanım amacına göre çok çeşitli yapılarda üretilen nanopartiküller genel olarak karbon ve metal temelli materyaller, dendrimerler ve kompozitler olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadırlar. Yaygın kullanımlarına bağlı olarak doğaya salınan miktarlarında da kayda değer artışlar görülmektedir. Endüstriyel tesislerdeki üretimleri sırasında, tıbbi uygulamaları sonucunda ve bulundukları kişisel bakım ürünlerinin kullanımları sonucunda atmosfer ve drenaj sistemleri aracılığıyla çevreye yayılmaktadırlar. Çevreye salınan nanopartiküllerin bozunma hızı ortam koşullarına göre değişmektedir. Bu nanopartiküller veya onların bozunma ürünleri zamanla sucul ortamda yoğunlaşarak ortamdaki canlıların vücuduna girmekte ve birikmektedirler. Vücuduna girdikleri canlılarda sitotoksik etkiler, metabolizma rahatsızlıkları, üreme bozuklukları, oksidatif stres artışına bağlı bozukluklar ve DNA hasarına bağlı değişiklikler gibi toksik etkiler göstermektedirler. Vücuttan elimine edilmelerinin genel olarak zor olduğu belirlenen özellikle metalik yapıdaki nanopartiküller biyomagnifikasyona uğramakta besin piramidinde üstlerde yer alan canlılar için de sağlık riskleri oluşturmaktadırlar. Bu yazıda nanopartiküllerin kullanımları ve buna bağlı olarak sucul ortam canlıları üzerinde gösterdikleri toksik etkileri incelenecektir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, Nanopartikül toksisitesi, Sucul çevre, Sucul canlılar, Toksik etkiler.

Nanoparticles and Their Toxic Effects on Aquatic Environment

Abstract: Owing to the nanoparticles with unique properties developed by nanotechnology, whom application areas in different fields are rapidly increasing. Nowadays nanoparticles are used in many fields of industry such as pharmaceutical, defense, medical imaging, cosmetics, chemistry, energy and paint industry. Nanoparticles, which can be produced in various structures according to usage purpose, are generally divided into 4 groups as carbon and metal based materials, dendrimers and composites. Due to their widespread use, significant increases are also observed in the amount of release to nature. During their production in the industrial facilities, as a result of their medical applications and the use of personal care products that have nanoparticles, they are spread to the environment through atmosphere and drainage systems. The rate of degradation of nanoparticles released into the environment varies according to the ambient conditions. These nanoparticles or their degradation products condense in the aquatic environment and accumulate in the living organisms via entering to their body. They show toxic effects in these life forms, such as cytotoxic effects, metabolic disorders, reproductive disorders, disorders due to increased oxidative stress and changes due to DNA damage. Metallic nanoparticles, which are determined to be difficult to eliminate from the body in general, undergo biomagnification and pose health risks for the organisms that are located in the food pyramid. In this review, the use of nanoparticles and their toxic effects on aquatic organisms will be examined.

Keywords: *Aquatic animals, Aquatic environment, Nanoparticle, Nanoparticle toxicity, Toxic effects.*

Giriş

Yaklaşık olarak 1-100 nanometre (1 nanometre 1 metrenin milyarda biri) uzunluk ölçeğindeki herhangi bir boyutta atomik, moleküler veya makromoleküler seviyelerde araştırma ve teknoloji geliştirme, küçük boyutlarından dolayı yeni özelliklere ve fonksiyonlara sahip yapılar, cihazlar ve sistemler yaratılması ve kullanılmasına, bir atom ölçeğinde maddeyi kontrol etme veya manipüle etmeye nanoteknoloji adı verilmektedir. Günümüzde sıkça

karşılaşılan bir terim olan nanopartikül (NP) ise atomların manipüle edilmesiyle oluşturulan 1-100 nm boyutlarındaki parçacıklardır. Nanoteknoloji sayesinde istenilen özelliklere sahip yeni NP'ler geliştirilmekte, bu materyaller yüksek katalitik verim ve elektriksel iletkenlik, daha fazla sertlik ve dayanıklılığa sahip olabilmektedirler. Nanopartiküller genel olarak karbon ve metal temelli materyaller, dendrimerler ve kompozitler olmak üzere 4 grup altında incelenebilmektedir (USEPA, 2007). Günümüzde NP'lerin inşaat, kozmetik, boya sanayi, ilaç, gıda, elektronik, optik, tekstil, enerji ve tarımda kullanılmaya başlandığı görülmektedir. Artan materyal ve uygulamalarla birlikte NP'lerin çevre ve insan sağlığı üzerine olan etkileriyle ilgili kaygılar da artmaktadır. NP sayısında yaşanan hızlı artış bu materyallerin çevre ve insan sağlığı üzerine olan etkilerinin araştırılmasını gerekli kılmaktadır (Sajid ve ark., 2015). Bu yazıda NP'lerin kullanım amaçları, toksisitelerini etkileyen faktörler ve sucul ortam üzerindeki toksik etkileri incelenecektir.

Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Sahip oldukları benzersiz özellikler NP'lerin pek çok alanda kullanılmalarını sağlamaktadır. Karbon temelli NP'lerden karbon nanotüplerin (carbon nanotubes – CNT) elektronik aletlerde (ince film transistör yapımında), hassas gaz (azot oksit, amonyak, hidrojen, karbondioksit, helyum, argon, oksijen, karbonmonoksit v.b.) sensörlerinin yapımında, özel proteinlerin tespitine yönelik geliştirilen biyosensörlerde, kompozit materyallerin üretiminde, adsorban olarak analitik kimya uygulamalarında (inorganik ve organik analitlerin ekstraksiyonunda), içme sularının kirleticilerden arındırılmasında (metal kirlilikleri, polisiklik aromatik hidrokarbon, pestisit, ilaç, fenolik bileşik, antibiyotik ve bisfenol kirliliği), tıbbi uygulamalarda (ilaç taşıyıcı yapıların üretiminde, kanser aşılarda) ve medikal görüntülemelerde kullanıldığı bildirilmiştir (Trojanowicz, 2016; Socas-Rodriguez ve ark., 2014).

Metal temelli NP'lerden kuantum noktalarının (quantum dot – QT) yarı iletken üretiminde (Kouhnaward ve ark., 2014), kanser teşhisi amaçlı görüntülemelerde (Zao ve Zeng, 2015), peptit ve antikor gibi biyomoleküllerle konjuge halde kanser tedavisinde (Zhang ve ark., 2008) kullanıldığı belirtilmektedir. Paladyum ve platin oksit NP'lerinin hidrojen depolanmasında, gümüş oksit (Ag_2O) ve nikel (II) oksit (NiO) karışımlarının gazların ayrıştırılmasında, alüminyum oksit (Al_2O_3) NP'lerinin parlattıcı aşındırıcıların yapısında, silikon dioksitin (SiO_2)

seramik, deterjan, ateşe dayanıklı cam imalatında, gümüş (Ag) NP'lerinin tıbbi cihazların kaplanması, boya ve tekstil ürünleri ile antibakteriyel ajanların yapısında, altın (Au) NP'lerinin ilaç taşıma sistemlerinde, titanyum dioksit (TiO₂) gıda boyası, pigmentler, kozmetik ürünler, UV koruyucular, cam kaplamalarında ve ilaç katkısı olarak kullanıldıkları bildirilmektedir (Falcato ve ark., 2016; Biswas ve Wu, 2005; Motaung ve Luyt, 2010; Song ve ark., 2009; Burlibaşa ve ark., 2019; Madkaur, 2019).

Dendrimerler nano boyutta homojen, simetrik polimer yapılarıdır. Dendrimer kelimesinin bir bileşiği değil yapısal motifi tanımladığı, bu makromolekülde istenilen özelliğe göre seçilen farklı aktif fonksiyonel grupların bulunduğu, bu nedenle ideal taşıyıcı yapılar olarak değerlendirildikleri bildirilmektedir. Özellikle kanser tedavisinde ve görüntülenmesinde, ilaç ve gen taşıyıcı olarak ve kozmetik ürünlerin toksik metallerden arındırılarak saflaştırılmasında kullanıldıkları bildirilmiştir (Bhargat ve Roberts, 2000; Abbasi ve ark., 2014).

Kompozitler NP'ler, NP'lerin birbirleriyle veya yığın halindeki materyallerle birleştirilmesiyle elde edilmektedirler (USEPA, 2007). Nanoselüloz-çitosan kompozitinin kanalizasyon sularındaki boya ve ağır metallerin temizlenmesinde, titanyum dioksit-selüloz kompozitinin katalitik degradasyon ve adsorbsiyon yoluyla endüstriyel faaliyetler sonucu kirlenen su ve topraktaki kirleticilerin azaltılmasında, kadmiyum (Cd) sülfid-çitosanın Kongo kırmızısını, bakır (Cu) -resinin karbontetraklorürü, Cu-çitosanın toksik kromu temizlemek için kullanıldığı bildirilmiştir (Olivera ve ark., 2016).

Nanopartiküllerin Toksisitesini Etkileyen Faktörler

Ebat, şekil, reaktivite, stabilite, yüzey kimyası ve yük, aglomerülasyon ve agregasyon özelliklerine göre NP'lerin toksisitesinin de değiştiği bildirilmektedir. Ebat küçüldükçe yüzey alanının arttığı, buna paralel olarak hücreye penetrasyonun ve böylece genel olarak toksisitenin de arttığı bildirilmektedir (Shang ve ark., 2014). Aynı NP'nin farklı şekilleri arasında toksisite farkı olduğu, elektriksel yüke ve yüzey kimyasına bağlı olarak NP'nin hücre içine taşınımının ve dolayısıyla toksisitesinin değiştiği belirtilmektedir. (Cabellero ve ark., 2013). Örnek olarak Au NP'lerinin katyonik olanlarının toksik anyonik olanlarının ise toksik olmadığı gösterilmiştir (Goodman ve ark., 2004). Suda çözünürlük, ortam pH'sı ve güneş ışığı

gibi faktörlerin stabiliteyi ve dolayısıyla da toksisiteyi etkilediği TiO_2 NP'lerinin güneş ışığı etkisiyle daha toksik oldukları bildirilmiştir (Ma ve ark., 2012).

Nanopartiküllerin Sucul Ortam Üzerine Toksik Etkileri

Katalizör olarak, sensörlerde ve ticari ürünlerde kullanılan metal oksit NP'lerin artan kullanımı, çevreye daha yüksek miktarda salınmalarına neden olmaktadır. Kozmetik ve antimikrobiyal ürünlerde yaygın olarak kullanılan TiO_2 , demir (III) oksit (Fe_2O_3), çinko oksit (ZnO) ve Cu (II) oksit (CuO) nanoparçacıklarının atık su deşarjları yoluyla sucul ekosistemlere girdiği, endüstriyel üretim tesislerinin deşarjlarındaki ve medikal uygulamalarla vücuda giren bir kısım NP'lerin de kanalizasyon sistemleri aracılığıyla sucul ekosistemlere taşındığı belirtilmektedir. Partiküllerin büyüklüğü, elektriksel yükü ve bozunma ürünlerinin sucul ortamdaki toksisiteyi etkileyen en önemli unsurlar olduğu belirtilmiştir. Özellikle yüzey alanı büyük NP'lerin hücre zarları, DNA ve protein yapılar için çok zararlı olduğu tespit edilmiştir (Reijnders, 2006). Ni, Cu, Ag ve Al NP'lerinin algler, yunuslar ve zebra balıkları (ZB) üzerine olan toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada özellikle Ag ve Cu NP'lerinin toksik etkili olduğu gösterilmiştir (Sharifi ve ark., 2012). Silica NP'lerinin ZB'lerin embriyoları için toksik olmadığı gösterilmiştir (Bar-Ilan ve ark., 2009). Fakat gümüş NP'lerin ZB hepatositlerinde hücresel peroksidasyonu arttırdığı ve hücre zarının yapısını bozarak apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir (Choi ve ark., 2010). ZB'lerin TiO_2 'ye uzun dönem maruziyetinin karaciğer, beyin, solungaç ve büyümeyi etkilediği, yumurta üretimini azalttığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2011). *Daphnia magna* ile yapılan akut ve kronik toksisite çalışmalarında TiO_2 'ye maruziyetin büyümeyi yavaşlattığı ve yüksek mortaliteye neden olduğu görülmüştür (Wiench ve ark., 2009). Güneşten gelen UV ışınlarının TiO_2 'nin Japon pirinç balıklarında mortaliteyi laboratuvar ışığına göre 100 kat, *D. magna*'da ise 4 kat arttırdığı gösterilmiştir (Ma ve ark., 2012). Grafen- TiO_2 nanokompozitinin TiO_2 'e göre 2,3 kat daha toksik olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2014). TiO_2 'nin *Artemia* larvalarında erişkinlerine göre daha toksik olduğu, sindirim kanalına alındıktan sonra larva ve erişkinlerde etkili bir şekilde elimine edilemedikleri belirlenmiştir (Ates ve ark., 2013). Ates ve ark., 2014, *Artemia salina*'ları CuO ve ZnO NP'lerine maruz bırakmışlar ve bunlarla altın balıklarını beslemişlerdir. NP'lerin özellikle balıkların bağırsaklarında birikim gösterdiğini, ZnO'nun toksik etkinlik göstermediğini, karaciğerde ve solungaçlarda nispeten daha az birikmesine rağmen CuO'nun

belirgin bir şekilde malondialdehit artışına neden olduğunu tespit etmişlerdir. Fullerene maruz kalan *D. magna*'nın kabuk değiştirmesinde ve yavru üretiminde gecikme gözlemlenmiştir (Oberdörster ve ark., 2006). Gökkuşluğu alabağının TiO₂'ye maruziyetinin Na⁺-K⁺-ATPase enziminin aktivitesini azalttığı, karaciğerde yağ birikimine neden olduğu tespit edilmiştir (Federici ve ark., 2007). ZnO, CuO ve TiO₂'nin algler için toksik etkili olduğu tespit edilmiştir (Aruoja ve ark., 2009). Ag NP'lerinin *Artemia* larvaları ve erişkinlerinde artan derişime paralel olarak mortalite, bağırsakta birikme, apoptotik hücre oluşumu ve DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Arulvasu ve ark., 2014). Cheng ve ark., 2007, yaptıkları çalışmada CNT'lerin ZB embriyolarında yumurtadan çıkmayı geciktirdiğini göstermişlerdir.

Sonuç

Çeşitlilikleri ve kullanım alanları giderek genişleyen NP'lerin çevre ve insan sağlığı açısından oluşturdukları tehlikeler konusuna olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Büyüklük, elektriksel yük ve türe göre değişmekle birlikte sucul canlılar için değişik seviyelerde toksik etki gösteren NP'ler canlıların farklı organlarını etkilemekte ve birikmektedirler. Oluşturdukları olumsuz etkiler nedeniyle canlıların yaşamsal faaliyetlerini bozmaktadırlar. Canlıların vücudundaki birikim ise NP'lerin besin zinciri boyunca ilerleyerek insan sağlığı açısından da risk oluşturabileceğini göstermektedir. Bu nedenle NP'lerin canlılar üzerine olan toksik etkileri yanında dağılımları ve degradasyonlarıyla ilgili çalışmalara duyulan ihtiyaç da artmaktadır.

Kaynakça

1. Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W. and Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale research letters*, 9(1), 247.
2. Arulvasu, C., Jennifer, S. M., Prabhu, D. and Chandhirasekar, D. (2014). Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp *Artemia*. *The Scientific World Journal*, 2014.
3. Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K. and Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the total environment*, 407(4), 1461-1468.
4. Ates, M., Arslan, Z., Demir, V., Daniels, J. and Farah, I. O. (2015). Accumulation and toxicity of CuO and ZnO nanoparticles through waterborne and dietary exposure of goldfish (*Carassius auratus*). *Environmental toxicology*, 30(1), 119-128.
5. Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z. and Farah, I. O. (2013). Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environmental monitoring and assessment*, 185(4), 3339-3348.
6. Bar-Ilan, O., Albrecht, R. M., Fako, V. E. and Furgeson, D. Y. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small*, 5(16), 1897-1910.

7. Bhalgat, M. K. Roberts, J. C. (2000). Molecular modeling of polyamidoamine (PAMAM) Starburst™ dendrimers. *European polymer journal*, 36(3), 647-651.
8. Biswas, P. and Wu, C. Y. (2005). Nanoparticles and the environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 55(6), 708-746.
9. Burlibaşa, L., Chifiriuc, M. C., Lungu, M. V., Lungulescu, E. M., Mitrea, S., Sbarcea, G. And Hermenean, A. (2019). Synthesis, physico-chemical characterization, antimicrobial activity and toxicological features of AgZnO nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*.
10. Caballero-Díaz, E., Pfeiffer, C., Kastl, L., Rivera-Gil, P., Simonet, B., Valcárcel, M. and Parak, W. J. (2013). The toxicity of silver nanoparticles depends on their uptake by cells and thus on their surface chemistry. *Particle & Particle Systems Characterization*, 30(12), 1079-1085.
11. Chen, J., Dong, X., Xin, Y. and Zhao, M. (2011). Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquatic Toxicology*, 101(3-4), 493-499.
12. Cheng, J., Flahaut, E. and Cheng, S. H. (2007). Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(4), 708-716.
13. Choi, J. E., Kim, S., Ahn, J. H., Youn, P., Kang, J. S., Park, K. and Ryu, D. Y. (2010). Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 100(2), 151-159.
14. Falcaro, P., Ricco, R., Yazdi, A., Imaz, I., Furukawa, S., Maspoch, D. and Doonan, C. J. (2016). Application of metal and metal oxide nanoparticles@ MOFs. *Coordination Chemistry Reviews*, 307, 237-254.
15. Federici, G., Shaw, B. J. and Handy, R. D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic toxicology*, 84(4), 415-430.
16. Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T., & Rotello, V. M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry*, 15(4), 897-900.
17. Kouhnavard, M., Ikeda, S., Ludin, N. A., Khairudin, N. A., Ghaffari, B. V., Mat-Teridi, M. A., Sopian, K. (2014). A review of semiconductor materials as sensitizers for quantum dot-sensitized solar cells. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 37, 397-407.
18. Li, S., Pan, X., Wallis, L. K., Fan, Z., Chen, Z. and Diamond, S. A. (2014). Comparison of TiO2 nanoparticle and graphene-TiO2 nanoparticle composite phototoxicity to *Daphnia magna* and *Oryzias latipes*. *Chemosphere*, 112, 62-69.
19. Ma, H., Brennan, A. and Diamond, S. A. (2012). Phototoxicity of TiO2 nanoparticles under solar radiation to two aquatic species: *Daphnia magna* and Japanese medaka. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(7), 1621-1629.
20. Madkour, L. H. (2019). Applications of Nanomaterials and Nanoparticles. In *Nanoelectronic Materials* (pp. 565-603). Springer, Cham.
21. Motaung, T. E. and Luyt, A. S. (2010). Effect of maleic anhydride grafting and the presence of oxidized wax on the thermal and mechanical behaviour of LDPE/silica nanocomposites. *Materials Science and Engineering: A*, 527(3), 761-768.
22. Oberdörster, E., Zhu, S., Bickley, T. M., McClellan-Green, P. and Haasch, M. L. (2006). Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms. *Carbon*, 44(6), 1112-1120.

- 23.Olivera, S., Muralidhara, H. B., Venkatesh, K., Guna, V. K., Gopalakrishna, K. and Kumar, Y. (2016). Potential applications of cellulose and chitosan nanoparticles/composites in wastewater treatment: a review. *Carbohydrate polymers*, 153, 600-618.
- 24.Reijnders, L. (2006). Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. *Journal of Cleaner Production*, 14(2), 124-133.
- 25.Sajid, M., Ilyas, M., Basheer, C., Tariq, M., Daud, M., Baig, N., Shehzad, F. (2015). Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4122-4143.
- 26.Shang, L., Nienhaus, K. and Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of nanobiotechnology*, 12(1), 5.
- 27.Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M. L., Stroeve, P. and Mahmoudi, M. (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2323-2343.
- 28.Socas-Rodriguez, B., Herrera-Herrera, A. V., Asensio-Ramos, M., & Hernandez-Borges, J. (2014). Recent applications of carbon nanotube sorbents in analytical chemistry. *Journal of Chromatography A*, 1357, 110-146.
- 29.Song, J. Y., Jang, H. K. and Kim, B. S. (2009). Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochemistry*, 44(10), 1133-1138.
- 30.Trojanowicz, M. (2006). Analytical applications of carbon nanotubes: a review. *TrAC trends in analytical chemistry*, 25(5), 480-489.
- 31.USEPA. 2007. U.S. Environmental Protection Agency Nanotechnology White Paper https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-01/documents/nanotechnology_whitepaper.pdf. Erişim tarihi: 06.08.2019.
- 32.Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S. and Landsiedel, R. (2009). Acute and chronic effects of nano-and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 76(10), 1356-1365.
- 33.Yang, W., Peters, J. I., Williams, R. O. III. (2008). Inhaled nanoparticles-a current review. *International journal of pharmaceutics*, 356(1-2), 239-247.
- 34.Zhang, H., Yee, D. and Wang, C. (2008). Quantum dots for cancer diagnosis and therapy: biological and clinical perspectives.
- 35.Zhao, M. X. and Zeng, E. Z. (2015). Application of functional quantum dot nanoparticles as fluorescence probes in cell labeling and tumor diagnostic imaging. *Nanoscale research letters*, 10(1), 171.

Nanoteknoloji İle Birlikte Gelen Yeni Bir Çalışma Alanı: Nanotoksikoloji

Muhammet Haydar UYSAL¹ Ali BİLGİLİ¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ziraat Mahallesi, Şehit Ömer Halisdemir Bulvarı, 06110 Altındağ/ANKARA

Özet: Nano kelimesi teknik bir ölçü birimi olarak kullanılarak herhangi bir birimin milyarda biri anlamını taşımaktadır. Nanoteknolojinin yapı taşı olan nanopartiküller, yüksek penetrasyon yeteneği, eşsiz fizikokimyasal özellikler, yüzey alanının geniş olması ve kimyasal aktivite gibi özelliklere sahiptir. Bu özellikler teknolojik açıdan endüstriyel ve tıp alanlarının ilgisini çekmiştir. Nanoteknolojik ürünlerin endüstri, bilim, eczacılık, tıp, elektronik, iletişim ve tüketici ürünlerinde kullanımı giderek artmaktadır. Bu teknoloji hava, su ve toprakta var olan kirleticileri belirleme, kalitesini iyileştirme aynı zamanda özellikle tıp alanında hastalıkların teşhisi veya daha az maliyetli, hızlı tedavi imkanları gibi konularda büyük potansiyele sahiptir. Nanoteknoloji çevresel kaliteyi geliştirme potansiyeline sahip olmasına rağmen, insan sağlığına ve çevreye istenmeyen etkileri olabileceği nedeniyle yeni bir tehlike unsuru olarak endişe taşımaktadır. Nanotoksikoloji, üretilen nanomateryallerin canlı organizmalar ve ekosistem üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkileri inceleyen bilim dalıdır. Genel toksikolojide canlılar üzerinde olumsuz etkiler oluşturan dozdan bahsedilirken zehir ifade edilir. Ancak bu bakış açısı nanotoksikolojide değiştirilmelidir. Nanotoksikoloji, toksikoloji için yeni ve önemli bir araştırma alanıdır. Malzemenin boyutu, şekli, birikme derecesi toksisiteyi etkileyen ana faktörlerdir. Nanopartiküllerin biyoyararlanımı ve toksisitesi yaygın şekilde bilinmemektedir. Bu bildiri kapsamında nanopartiküllerin oluşumunda katkısı olan doğal ve biyolojik kaynaklardan bahsedildi. Nanopartiküllerin insan ve çevre sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerine değinildi. Bu yapıların insan vücuduna hangi yollarla alınabileceği ve alındığında vücutta oluşturabileceği olumsuz etkiler hakkında bilgiler verildi.

Anahtar Kelimeler: Çevre ve halk sağlığı, Nanoteknoloji, Nanotoksikoloji.

A New Study Area Coming Together with Nanotechnology: Nanotoxicology

Abstract: Nano word means one billionth of any unit using as a technical unit of measurement. Nanoparticles, building block of nanotechnology, have properties such as the capability of high penetration, unique physicochemical features, wide surface area, and chemical activity. These properties have attracted the attention of industrial and medical areas in terms of technology. Use in industry, science, pharmacy, medicine, electronics, communication and consumer products of nanotechnology products is increasing. This technology has high potential on points such as identifying the pollutants present in air, water, and soil, improvement of its quality as well as diagnosis of diseases in medicine area, or cost effective and rapid treatment opportunities. Although nanotechnology has potential in improving the environmental quality, there may be a concern as a new threat risk as it may have adverse effects to human health and environment. Nanotoxicology is a science assessing adverse effects that the produced nanomaterials bring about on living things and ecosystem. In general toxicology, while mentioned about dose bringing about adverse effects on living things, poison term is used. However, this point of view should be changed in nanotoxicology. Nanotoxicology is a new and important research area for toxicology. Material size, its shape, its accumulation degree are main factors that affect toxicity. Bioavailability of nanoparticles and their toxicities are not widely known. In the context of this report, it is mentioned from natural and biological sources contributing in the formation of nanoparticles. It is mentioned from their adverse effects on human and environmental health of nanoparticles. Knowledge was given about adverse effects that in what ways can these materials be taken to human body and they can cause in the body when taken.

Keywords: *Environmental and human healthy, Nanotechnology, Nanotoxicology.*

Giriş

Nanoteknoloji bilimi, nano boyutta üstün özellikler (farklı optik, mekanik ve termal özellikler) kazanan maddeleri araştıran bilim dalıdır (Benli, 2009). Maddelerin atomik, moleküler, çok moleküllü boyutlarda kullanıldığında üstün nitelik, performans kazandıkları bilinmektedir (Shukla ve Tewari, 2018). Nanometre ölçeğinde 1-100 nm düzeyindeki boyutlara sahip maddeler nanomateryal olarak sınıflandırılmaktadır. Nanoteknolojinin yapı taşı

nanopartiküllerdir. Nanopartiküller, eşsiz fizikokimyasal özellikler, yüksek penetrasyon yeteneği, geniş yüzey alanı ve kimyasal aktivite gibi özelliklere sahiptir. Nanoteknoloji ile üretilen ürünlerin endüstri, bilim, eczacılık, tıp, elektronik, iletişim ve tüketici ürünlerinde kullanımı giderek artmaktadır. Bu ürünlerin kullanım alanlarının artmasıyla insan sağlığına ve çevreye istenmeyen etkileri olabileceğine dair endişeleri de artırmıştır. Nanomaddelerin kullanımının günden güne artması, bu maddelerin toksik özelliği ile ilgili yapılan çalışmaları daha da önemli hale getirmektedir. Donaldson (Donaldson ve ark., 2004) ve arkadaşları nanoteknolojinin daimi ve güvenli bir şekilde gelişebilmesi için nanotoksikoloji alanının oluşturulmasına destek vermiştir. Hava kirliliği (Dockery ve ark., 1993) ve asbest (Kane ve Hurt, 2008) gibi yaşanan kötü tecrübeler nanotoksikoloji konusunda her geçen gün daha fazla endişe uyandırmaktadır (Bacanlı ve ark., 2014). Nanotoksikoloji, üretilen nanomateriyallerin canlı organizmalar ve ekosistem üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkileri inceleyen bilim dalıdır. Genel toksikolojide dozdan bahsedilirken zehir ifade edilir (Merwe ve Pickrell, 2012). Maddenin boyutu, şekli, birikme derecesi toksisiteyi etkileyen ana faktörlerdir (Marambio-Jones ve Hoek, 2010; Sharifi ve ark., 2012). Nanomaddeler yanma, jeolojik ya da biyolojik süreçlerin sonucunda doğada bulunabileceği gibi istenen özelliklerin elde edilmesi için özel olarak da üretilebilir. Üretilen nanomaddelere toplu üretim ve geniş uygulama alanına sahip oldukları için istemeden maruz kalınabilir ancak bu maruziyet kontrol edilebilir (Buzea ve ark., 2007; Merwe ve Pickrell, 2012). Kaynağına göre nanomateriyaller rastlantısal ya da özel üretime bağlı olmak üzere ikiye ayrılır. Özel olarak üretilen nanopartiküller nanoboyutta kendine özgü özelliklerinin (iletkenlik) kullanımı için üretilmektedir. Rastlantısal nanopartiküller ise doğadan (orman yangını) ya da antropojenik (taşıt motorları) kaynaklardan gelen istenmeyen partiküller olarak tanımlanır (Bacanlı ve ark., 2014). Nanomaddelerin boyutu, hücre içerisine alınımını ve nanomaddelere karşı oluşan yanıtını, dağılımını ve vücuttan atılmasını etkiler. Pek çok organizma, özel olarak üretilen nanomaddeyi detoksifiye ve metabolize edemez. Bu nedenle insan hayatına faydalarının yanı sıra, nanomaddeler dünya için de en tehlikeli kirleticilerden biri olarak görülmektedir (Merwe ve Pickrell, 2012).

Nanopartiküllerin Biyolojik Sistemlere Giriş Yolları

Nanotoksik partiküller genellikle yeterli bilgi donanımına sahip olunmadığından insan vücuduna hava yolu, cilt, sindirim yolu ve diğer yollarla girebilir. Bu durum nanotoksik partiküllerle kontamine havayı soluma, deri yoluyla vücut içerisine girerek, nanotoksik partiküllerle kontamine gıdaları tüketerek, nanopartiküllerle kontamine içecekleri içerek meydana gelebilir (Ryman ve ark., 2007; Stem ve McNeil 2008;Vandhana ve ark., 2015). Nanomaddelerin deriye maruziyeti bölgesel krem uygulanması, ilaç tedavisi ya da istenmeden meydana gelebilir (Hagens ve ark., 2007;Oberdorster ve ark., 2005). Çok küçük boyuttaki partiküller için başlıca giriş yolu solunum sistemidir (Donaldson ve ark., 2002). Karaciğer ilk geçiş etkisinin meydana geldiği yerdir ve özellikle nanomaddelerin toksisitesine karşı duyarlıdır. Silika nanopartiküllerin hepatotoksik potansiyeli olması hepatosit nekrozu ile beraber portal bölgede tek çekirdekli yangı hücrelerinin infiltrasyonuna yol açabilir (Yildinmer ve ark., 2011). Nanomaddeler burun bölgesinden solunum yolu aracılığıyla mukosiliyer açıklıktan veya doğrudan yiyecek, su, kozmetik, ilaçlar ve ilaç taşıma sistemleri ile gastrointestinal sisteme ulaşabilir (Hagens ve ark., 2007; Oberdorster ve ark., 2005). Nanomaddelerin birçok çeşidi mide-bağırsak yoluyla vücuda girerek hızlı bir şekilde dışkı ve idrar ile ortadan kaldırılabilir. Ancak bazı nanomaddeler ilk geçiş etkisi sırasında karaciğerde toplanabilir (Oberdorster ve ark., 2005). Nano boyutlardaki bakırın karaciğer, böbrek ve dalağa zarar verdiği bildirilmektedir. Özellikle enjeksiyon uygulamaları ve implantlar maruziyetin başka olası yollarıdır. Bu yüzden nanoboyuttaki partiküller vücuda giriş yollarının yanı sıra boyut ve özelliklerine bağlı vücudun farklı bölgelerine ulaşabilir (Arora ve ark., 2012).

Nanopartiküllerin Canlılar Üzerine Etkileri

Nanopartiküller boyut, yüzey alanı, fiziko-kimyasal yapı, şekil ve yapısındaki yük gibi benzersiz özelliklerinden dolayı kütlece farklı olan malzemelerden toksite açısından farklı olabilir. Özel olarak üretilen nanopartiküllerin toksisitesi hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Nanopartiküllerin toksisitesi hakkında ciddi anlamda bilgi eksikliği vardır. Nanopartiküllerin küçük boyutlarda olması insan sağlığına zararlı etkiler oluşturabilecek ana faktörlerden birisidir (El-Ansary ve Al-Daihan, 2009). Zehirleyici etkiye sahip olan en yaygın metal nanopartiküller alüminyum oksit, titanyum dioksit, gümüş ve bakır oksit olarak ayrılabilir. Alüminyum oksit nanopartiküller diğer metal kökenli nanomaddelerden daha az toksiktir.

Nanopartiküller biyolojik bariyerleri aşabilme ve hücreler içerisine girebilme yeteneğine sahiptir. Çekirdek içerisine girebilir ve biyolojik sistemlerle zararlı etkileşimlere yol açabilirler (Oberdorster ve ark., 2005). Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), insan sağlığına olası riskleri olan çok çeşitli endüstriyel ve tıbbi uygulamalar için kullanılan nanomalzemelerin önemli bir parçasıdır (Ahamed ve ark., 2010). Antibakteriyel, güveye karşı koruyucu ve antistatik özellikleri nedeniyle gümüş nanopartiküller tekstil endüstrisinde kullanılır (Yan ve ark., 2012). Gümüş nanopartiküller bakteri, mantar ve virüslere karşı etkili biyositlerdir (Mahendra ve ar., 2009). Gümüş nanopartiküller zehirleyici olmalarına rağmen diğer metallere kıyaslandığında gümüşün memeli hücrelerinde zehirliliği daha düşük olmasının yanı sıra mikroorganizmalar için daha yüksek toksisiteye sahip olduğu bilinmektedir (Li ve ark., 2010). Ahamed ve arkadaşları, gümüş nanopartiküllerin akciğer, karaciğer, beyin, damar sistemi ve üreme organları dahil olmak üzere çeşitli organlarda toksisiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Gümüş nanopartiküller reaktif oksijen türlerinin oluşumu, oksidatif stres, DNA hasarı ve apoptozise neden olabilir (Ahamed ve ark., 2010). Asharani ve arkadaşları gümüş nanopartiküllerin konsantrasyonunun toksisite üzerine etkisini değerlendirmek için gümüş nanopartiküllerin embriyolara eklenmesi işlemini gerçekleştirmiştir. Daha sonra nanopartiküllerin embriyoların yüzeyinde hasara neden olduğu belirlemişlerdir. Bunun ise hücrelerin çekirdeğinde nanoparçacıkların birikimiyle DNA hasarına ve kromozomal sapmalara neden olabileceği düşünülmektedir. Nanopartiküllerin merkezi sinir sisteminde birikmesiyle kalp ritmi, solunum ve vücut hareketlerinin kontrol edilmesinde olumsuz etkilere yol açmaktadır. Aynı zamanda gümüş nanopartiküllere maruziyet sonucu vücudun farklı bölümlerinde hiperemi ile beraber ödem ve nekroz meydana gelebilir (Asharani ve ark., 2008). Bakır oksit nanopartiküller yarı iletkenlerde, antimikrobiyal ayıraçlarda, ısı transfer akışkanlarında ve intrauterin kontraseptif cihazlarda kullanılır (Auroja ve ark., 2009). Ahamed ve arkadaşları bakır oksit nanoparçacıklarının sitotoksiste, oksidatif stres, DNA hasarı gibi olumsuz etkilerini inceleyerek lipid peroksidasyonunun ve oksidatif stresin insan akciğer epitel hücrelerinde DNA hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir (Ahamed ve ark., 2010). Nanomaddeler için ileri sürülen toksikolojik mekanizmalar oksidatif stres, sitotoksiste, genotoksiste ve enflamasyon yanıtlarından oluşur (Nel ve ark., 2006).

Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

Nanomaddeler oksidatif stresi tetikleyerek hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması ve antioksidanların azalmasının bir sonucu olarak hücreler içinde redoks mekanizmasında dengesizlik meydana getirir (Singh ve ark., 2009). Genel olarak, reaktif oksijen türlerinde küçük ve geçici artışlar çoğu hücre tipinde tolere edilebilirken, bu durum devam ettiğinde daha yüksek seviyelerinin hücre hasarına neden olma olasılığı yüksektir (Soenen ve ark., 2011). Reaktif oksijen türleri DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel makromoleküller ile etkileşime girebilen yüksek reaktif moleküllerdir (Singh ve ark., 2009). Nanomaddelerin bileşimi ve yüksek yüzey alanları bu maddelerin reaktif oksijen türlerinin üretimi ile ilişkilidir. Nanopartiküller ne kadar küçükse oksidatif stres o kadar yüksek olur (Brown ve ark., 2001; Rnaapen ve ark., 2004).

Sitotoksosite

Nanopartiküller membran bütünlüğünü doğrudan fiziksel hasar veya dolaylı olarak hücre ölümüne neden olabilecek oksidasyon aracılığıyla etkileyebilir. Nanopartiküllerin membranlarla etkileşimi yüzey özelliklerine bağlıdır (Vasir ve Labhasetwar, 2008). Nanopartiküllerin memeli gamet kök hücre hattına yönelik sitotoksitesinin belirlenmesi, nanomaddelerin biyogüvenliği üzerinde büyük endişe uyandırmıştır. Gümüş nanopartiküllerin mitokondriyal fonksiyonun şiddetli bir şekilde azalmasına, membranda sızıntının artmasına, nekroz ve apoptoz indüksiyonu gibi durumlara neden olduğundan en zehirli nanopartikül olduğu bildirilmiştir (Braydich-Stolle ve ark., 2005).

Genotoksosite

Nanopartiküller boyutlarının küçük olması ve yüzey alanlarının geniş olmasından dolayı tahmin edilemeyen genotoksik etkilere sahip olabilir. Çoğunluğu genotoksik etki ile mutajenez ve karsinogenez etkilere neden olabilen DNA hasarını tetikleyebilir. Nanomaddeler boyutlarından dolayı hücre membranlarını geçerek doğrudan DNA ile etkileşime geçebilirler. Oksidatif stres ve enflamasyonu tetiklediklerinde, dolaylı olarak DNA ile de etkileşime girebilirler (Singh ve ark., 2009). Nanopartiküller DNA'da tek iplikte meydana gelen kopmalar, çift iplikli meydana gelen kopmalar, DNA delesyonları ve 8-hidroksi-2-

deoksiguanozin (8-OHdG) seviyelerinde artış şeklinde genomik dayanıksızlık gibi DNA'da pekçok hasara neden olur (Song ve ark., 2012).

Enflamasyona Bağlı Gelişen Durumlar

Nanopartiküller tarafından oluşturulan oksidatif stresin nükleer faktör kappa B (NFkB), aktive edici protein 1 (AP-1), hücre dışı sinyali düzenleyen kinazlar (ERK) c-Jun, N-terminal kinazlar gibi redoksa hassas transkripsiyon faktörlerini etkileyerek enflamasyonu arttırdığı bildirilmektedir (Curtis ve ark., 2006; Kabanov, 2006; Vega-Villa ve ark., 2008). TNF- α seviyelerinin artışı hücre membranında hasara ve apoptozise neden olabilir (Aydin ve ark., 2012). Kronik enflamasyon karsinogenez ile ilişkilendirilmiştir (Federico ve ark., 2007). Nanopartiküller aynı kimyasal özelliklere sahip büyük boyutlardaki partiküllerden daha toksik olarak bilinmektedir. Nanopartiküllerin, küçük boyutlarından dolayı, protein yapılarını değiştirmek için haptenler gibi davranabildiği ileri sürülmektedir (Klimuk ve ark., 2000). Titanyum dioksit nanopartikülleri ve çok küçük yapıdaki ince karbon karası nanopartikülleri, intratrakeal aşılama sonrası sıçanların akciğerlerinde enflamasyona yol açtığı bildirilmiştir (Li ve ark., 1996; Singh ve ark., 2009). Ayrıca bazı çalışmalar titanyum dioksit nanopartiküllerin pulmoner inflamasyon, pulmoner ödem, makrofajların bir bölgede toplanması ve pnömonosit apoptozisine yol açtığı bildirmiştir (Aydin ve ark., 2012).

Sonuç

Nanopartiküller ile canlı organizmalar arasındaki olası etkileşimler ve bunların uzun süreli maruziyetlerinin sonuçları henüz tam olarak bilinmemektedir. Nanopartiküllerin toksisitesi hakkında hala ciddi bir bilgi eksikliği vardır. Nanomaddelerin toksisitesini belirlemede önemli olan nanopartiküllerin karakterizasyonu ve in vivo ile epidemiyolojik çalışmalarda maruz kalma konsantrasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Doğada var olan, özel olarak üretilen ve çevresel araştırmalardan elde edilen toksikolojik verilere göre nanomaddelerin boyutları, şekilleri, kullanılan element çeşidi ve yüzey fonksiyonel gruplarına bağlı olarak hücreler üzerinde çeşitli zararlı etkileri olduğu düşünülmektedir. Nanomaddeler büyüklük, şekil, elementler ve yüzey fonksiyonel grupları oksidatif stresi tetikleyerek (nano) toksisite ve genotoksisiteye neden olmaktadır. Günümüzde nanopartiküller yaygın olarak kullanıldıklarından maruziyet kaçınılmazdır ve güvenilirlikleri konusunda toksisitelerini

öğrenmek, vücuttaki mekanizmalarını ve yollarını anlamak için yapılan çalışmaların artırılması gerekmektedir. Nanoteknolojik uygulamaların gelişimi devam ettikçe, ilerleyen zamanlarda güvenlik ve risk değerlendirme çalışmalarına olan talep artacaktır. Nanomaddelerin kendilerine has özelliklerini ele almak için de yeni analitik yöntemlerinin de araştırılması gerekmektedir.

Kaynakça

1. Ahamed, M., AlSalhi, M. S., & Siddiqui, M. K. J. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica chimica acta*, 411(23-24), 1841-1848.
2. Ahamed, M., Siddiqui, M. A., Akhtar, M. J., Ahmad, I., Pant, A. B., & Alhadlaq, H. A. (2010). Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(2), 578-583.
3. Arora, S., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicology and applied pharmacology*, 258(2), 151-165.
4. Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the total environment*, 407(4), 1461-1468.
5. Asharani, P. V., Wu, Y. L., Gong, Z., & Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19(25), 255102.
6. Aydın, A., Sipahi, H., & Charehsaz, M. (2012). Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*.
7. BACANLI, M., & BAŞARAN, N. (2014). Nanotoxicology-New Research Area in Toxicology. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(2).
8. BENLİ, B. (2009). Nanoteknoloji ve antik çağlara uzanan killi nanoyapılar. *Journal of Clay Science and Technology*, 3, 143-162.
9. Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J. J., & Hofmann, M. C. (2005). In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological sciences*, 88(2), 412-419.
10. Brown, D. M., Wilson, M. R., MacNee, W., Stone, V., & Donaldson, K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and applied pharmacology*, 175(3), 191-199.
11. Buzzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
12. Clichici, S., & Filip, A. (2015). In vivo Assessment of Nanomaterials Toxicity, Nanomaterials–Toxicity and Risk Assessment. *Vienna: InTech*, 92-120.
13. Colognato, R., Bonelli, A., Ponti, J., Farina, M., Bergamaschi, E., Sabbioni, E., & Migliore, L. (2008). Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes in vitro. *Mutagenesis*, 23(5), 377-382.
14. Dockery, D. W., Pope, C. A., Xu, X., Spengler, J. D., Ware, J. H., Fay, M. E., ... & Speizer, F. E. (1993). An association between air pollution and mortality in six US cities. *New England journal of medicine*, 329(24), 1753-1759.
15. Donaldson, K., Brown, D., Clouter, A., Duffin, R., MacNee, W., Renwick, L., ... & Stone, V. (2002). The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *Journal of aerosol medicine*, 15(2), 213-220.

16. Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., & Borm, P. J. (2004). Nanotoxicology.
17. El-Ansary, A., & Al-Daihan, S. (2009). On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview. *Journal of Toxicology*, 2009.
18. Enis, İ. Y., Öztürk, M. K., Sezgin, H., & Ismar, E. AN OVERVIEW OF NANOTOXICOLOGY)
19. Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., & Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 121(11), 2381-2386.
20. Hagens, W. I., Oomen, A. G., de Jong, W. H., Cassee, F. R., & Sips, A. J. (2007). What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 49(3), 217-229.
21. Jain, T. K., Reddy, M. K., Morales, M. A., Leslie-Pelecky, D. L., & Labhasetwar, V. (2008). Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Molecular pharmaceutics*, 5(2), 316-327.
22. Kabanov, A. V. (2006). Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. *Advanced drug delivery reviews*, 58(15), 1597-1621.50.
23. Kane, A. B., & Hurt, R. H. (2008). Nanotoxicology: the asbestos analogy revisited. *Nature Nanotechnology*, 3(7), 378.
24. Klimuk, S. K., Semple, S. C., Nahirney, P. N., Mullen, M. C., Bennett, C. F., Scherrer, P., & Hope, M. J. (2000). Enhanced anti-inflammatory activity of a liposomal intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotide in an acute model of contact hypersensitivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(2), 480-488.
25. Knaapen, A. M., Borm, P. J., Albrecht, C., & Schins, R. P. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *International Journal of Cancer*, 109(6), 799-809.
26. Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., You-Sheng, O. Y., & Chen, Y. B. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(4), 1115-1122.
27. Li, X. Y., Gilmour, P. S., Donaldson, K., & MacNee, W. (1996). Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax*, 51(12), 1216-1222.
28. Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531-1551.
29. Merwe, D. V. D., & Pickrell, J. A. (2012). Toxicity of Nanomaterials. In "Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles", Eds. Ramesh C. Gupta.
30. Mroz, R. M., Schins, R. P. F., Li, H., Jimenez, L. A., Drost, E. M., Holownia, A., ... & Donaldson, K. (2008). Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. *European Respiratory Journal*, 31(2), 241-251.
31. Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *science*, 311(5761), 622-627.
32. Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., ... & Olin, S. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology*, 2(1), 8.
33. Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823-839.
34. Pisanic II, T. R., Blackwell, J. D., Shubayev, V. I., Finones, R. R., & Jin, S. (2007). Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*, 28(16), 2572-2581.

35. Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.
36. Ryman-Rasmussen, J. P., Riviere, J. E., & Monteiro-Riviere, N. A. (2007). Variables influencing interactions of untargeted quantum dot nanoparticles with skin cells and identification of biochemical modulators. *Nano Letters*, 7(5), 1344-1348.
37. Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M. L., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. (2012). Toxicity of nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2323-2343.
38. SHUKLA, A., & TEWARI, S. N. (2018). A Brief Review of Nanotechnology. *Journal of Nanoscience Nanoengineering and Applications*, 8(1), 5-8.
39. Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G., ... & Doak, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(23-24), 3891-3914.
40. Soenen, S. J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J. M., Parak, W. J., De Smedt, S. C., & Braeckmans, K. (2011). Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano today*, 6(5), 446-465.
41. Song, M. F., Li, Y. S., Kasai, H., & Kawai, K. (2011). Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 1202080139-1202080139.
42. Stern, S. T., & McNeil, S. E. (2007). Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicological sciences*, 101(1), 4-21.
43. Stroh, A., Zimmer, C., Gutzeit, C., Jakstadt, M., Marschink, F., Jung, T., ... & Grune, T. (2004). Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(8), 976-984.
44. Vandhana, S., Nithya, M., & Deepak, A. (2015). Review on nano toxic effects in living organisms (mice and zebra fish). *Int. J. Innov. Res. Sci. Technol*, 1(8), 134-137.
45. Vasir, J. K., & Labhasetwar, V. (2008). Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. *Biomaterials*, 29(31), 4244-4252.
46. Skocaj, M. (2008). Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Advanced drug delivery reviews*, 60(8), 929-938.
47. Xu, A., Chai, Y., Nohmi, T., & Hei, T. K. (2009). Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in gpt delta transgenic MEF cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), 3.
48. Yan, Y., Yang, H., Li, J., Lu, X., & Wang, C. (2012). Release behavior of nano-silver textiles in simulated perspiration fluids. *Textile Research Journal*, 82(14), 1422-1429.
49. Yildirim, L., Thanh, N. T., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano today*, 6(6), 585-607.
50. Yildirim, L., Thanh, N. T., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano today*, 6(6), 585-607.



**ÖZET SÖZLÜ
BİLDİRİLER**

**ABSTRACT ORAL
PRESENTATIONS**

**I. INTERNATIONAL
VI. VETERINARY
PHARMACOLOGY
and TOXICOLOGY
CONGRESS**

04 | 07 SEPTEMBER 2019

Erciyes University Sabancı Cultural Center

KAYSERİ - TURKEY

www.vetfarmatoks2019.com



Sperma Dilüsyon Solüsyonlarına İlave Edilen Eritropoietinin Spermatolojik Parametreler ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisi *

Muharrem SATILMIŞ¹ Ali BİLGİLİ²

¹Tarım Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, Türkiye

Eritropoietin (EPO), eritroit progenitor (olgunlaşmamış hücreler) hücrelerin spesifik hücre yüzeyi reseptörü ile bağlanarak eritrosit üretimini düzenleyen glikoprotein yapısında yerel bir hormondur. Birincil olarak böbrekler tarafından salgılanan EPO karaciğer, makrofajlar ve salgı bezleri gibi birçok doku ve hücrede varlığı tespit edilmiştir. Böbrekler tarafından üretilen EPO eritrosit üretiminin kontrolünden sorumludur. Bununla birlikte yapılan çeşitli klinik çalışmalar hücre hasara neden olan oksidatif stresi azaltarak hücreleri koruduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, boğa spermasının dondurulmasında kullanılan dilüsyon solüsyonlarına ilave edilen eritropoietinin antioksidan etkinliği incelendi. Boğalardan alınan spermaların dondurulması esnasında eritropoietinin farklı dozları (6.25, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 IU eritropoietin /ml) ilave edilerek oluşturulmuş 6 deneme ve eritropoietin ilave edilmemiş (antioksidansız) kontrol gruplarıyla sulandırılarak donduruldu. Çözüm sonu biyokimyasal parametreler (oksidatif stres) ve spermatolojik parametreler incelendi. Dondurma-çözdürme sonrası 6.25 IU eritropoietin /ml içeren dilüsyon solüsyonu grubu progresif motilite oranı (%31,81±3,74), 200 IU eritropoietin/ml içeren dilüsyon solüsyonu grubuna göre (%22,26±2,01) anlamlı ölçüde yüksek bulundu (p< 0,05). SYBR/PI sonuçları bakımından 6,25 IU eritropoietin/ml içeren dilüsyon solüsyonu grubu 12,5 IU eritropoietin /ml içeren dilüsyon solüsyonu grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu (p < 0,05). Gruplar arası biyokimyasal (TGSH, AOP, LPO) parametreler ise önemsiz bulundu (P > 0.05). Sonuç olarak, elde edilen tüm sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen özellikle 6.25 U eritropoietin / ml içeren grupta diğer gruplara göre progresif motilite ve ölü- canlı spermatozoon oranının yüksek bulunmuş olması önemli olarak değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Eritropoietin, Oksidatif stres, Sperma.

*Bu çalışma, TAGEM (TAGEM/HAYSUD/13/A-02/P-01/0) tarafından doktora projesi olarak desteklenmiştir.

Effects of erythropoietin which is added to semen dilution solutions on spermatological parameters and oxidative stress

Muharrem SATILMIŞ¹ Ali BİLGİLİ²

¹General Directorate of Agricultural Research and Policies, Ankara, Turkey

²Ankara University Faculty of Veterinary, Ankara, Turkey

Erythropoietin (EPO) is a local hormone in the glycoprotein structure that regulates erythrocyte production by binding erythroid progenitor (immature cells) cells with specific cell surface receptor. EPO, which is primarily secreted by the kidneys, has been found in many tissues and cells, such as the liver, macrophages and glands. EPO produced by the kidneys is responsible for controlling erythrocyte production. However, several clinical studies have reported that it protects cells by reducing oxidative stress that causes cellular damage. In this study, effectiveness of erythropoietin addition to sperm dilution solutions and in vitro culture mediums on spermatological parameters, oxidative stress and embryo development was investigated. In freezing stage, bull sperm was frozen using 6 trial group by adding several doses of erythropoietin (6,25 IU, 12,5 IU, 25 IU, 50 IU, 100 IU and 200 U erythropoietin/ml) to dilution solutions and 1 control group without erythropoietin (no antioxidant). After thawing, spermatological and biochemical parameters (oxidative stress) were examined. The progressive motility ratio of the solution group containing 6,25 IU erythropoietin/mL (%31,81±3,74) was significantly higher ($P < 0,05$) comparing to the solution group containing 200 U erythropoietin/mL (%22,26±2,01). As for SYBR/PI, the 6,25 IU erythropoietin/ml group was significantly high ($p<0,05$) comparing to the group of 12.5U erythropoietin/ml. Intergroup biochemical (TGSH, AOP, LPO) parameters were found to be insignificant. ($P > 0.05$). In conclusion, although not all the results were statistically significant, it was important that the rate of progressive motility and dead-live spermatozoon were found to be high, especially in the group containing 6.25 U erythropoietin / ml compared to the other groups.

Keywords: Antioxidant, Erythropoietin, Oxidative stress, Semen.

*This study was supported by TAGEM (TAGEM/HAYSUD/13/A-02/P-01/0) as a PhD project.

Alüminyumun Yüksek Isı Etkisi ile Suyu Geçiş ve Bu Suyun Koçlarda İn Vitro Sperm Parametrelerine Etkisi

Ömer VARIŞLI¹ Abdulkadir KAYA¹ Hüsamettin EKİCİ²

¹Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, Türkiye

²Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, Türkiye

Alüminyum gibi ağır metallerin yüksek dozlarda gıda ile alınması hayvanlarda sağlık ve reproduktif açıdan zararlı olduğu bilinmektedir. Gıda muhafazası ve pişirmek amacı ile alüminyum folyo ve kaplar kullanılmaktadır. Bu çalışmada alüminyum; doğal kullanım koşulları taklit edilerek, 180 °C de etüv içerisinde 1 lt distile su içerisinde 10 gr Alüminyum folyonun 2 saat süreyle tutulması ile elde edilmiştir. Daha sonra su direk, %50 ve 75 oranında buharlaştırılarak değişik dozda alüminyumlu su elde edilmiştir. Elde edilen bu sulardaki alüminyum oranı ICP-OES ile belirlendi ve PBS eklenerek kullanım solüsyonları hazırlandı. Çalışma grupları; PBS-Kontrol (G-1), alüminyumlu su (G-2), %50 yoğunlaştırılmış alüminyumlu su (G-3) ve %75 yoğunlaştırılmış alüminyumlu su (G-4). Koçlardan elektro-ejakülatör ile alınan sperma 50 X10⁶/ml spermatozoa olacak şekilde sulandırıldı. Gruplar benmari içerisinde 37 °C 4 saat süreyle inkübe edildi ve 0.,2. 4. ve 6. saatlerde motilite, membran bütünlüğü ve mitokondriyal membran potansiyeli yönünden değerlendirildi. Düşük dozlarda alüminyum doğrudan etkisi olmasa da uzun zaman boyunca alınan alüminyum dokularda birikerek toksik etkiye sebep olabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alüminyum, Isı etkisi, Koç, Sperm, Üreme.

Transition of Aluminum to Water by High Heat Effect and the Effect of Aluminum on In Vitro Parameters in Ram Semen

Ömer VARIŞLI¹ Abdulkadir KAYA¹ Hüsamettin EKİCİ²

¹Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, Turkey

²Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, Turkey

It is known that intake of heavy metals such as aluminum with high doses in food is harmful in health and reproductive aspects in animals. Aluminum foil and cooker are used for food preservation and cooking. In this study, aluminum; it was obtained by keeping 10 gr Aluminum foil in 1 L distilled water in oven at 180 °C for 2 hours by simulating natural usage conditions. Then, the water was evaporated by 50% and 75% to obtain aluminum in different doses in water. The proportion of aluminum in the waters was determined by ICP-OES and then PBS was added the water to prepare the usage solutions. Working groups; PBS-Control (G-1), aluminum water (G-2), 50% condensed aluminum water (G-3) and 75% condensed aluminum water (G-4). Semen taken from the rams with electro-ejaculator was diluted to 50 X10⁶ / ml spermatozoa. The groups were incubated in in water bath at 37 °C for 2, 4 hours and 6 hours. At the 0th, 2th, 4th and 6th hours, specimens were evaluated as motility, membrane integrity and mitochondrial membrane potential. Although aluminum has no direct effect at low doses, it has been evaluated that it can accumulate in the tissues of aluminum taken for a long time and cause toxic effect.

Keywords: *Aluminum, Heat effect, In vitro, Ram, Sperm.*

Samsun Bölgesinde Üretilen Sığır Sütlerinde Tetrasiklin Antibiyotik Kalıntıları

Yavuz Kürşad DAŞ Oğuzhan YAVUZ Enes ATMACA Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, 55139, Kurupelit, SAMSUN

Geniş etki spektrumları ve maliyet etkinliğinden dolayı, tetrasiklin grubu antibiyotikler dünya çapında en yaygın kullanılan antibiyotiklerdendir. Bu çalışmada Samsun bölgesi halk pazarlarından toplanan 100 inek sütü örneğinde tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklin kalıntısı araştırılmıştır. Dokuz örnekte oksitetrasiklin ($11.62-45.56 \mu\text{g L}^{-1}$), 35 örnekte tetrasiklin ($2.21-135.32 \mu\text{g L}^{-1}$) ve 40 örnekte klortetrasiklin ($20.06-98.30 \mu\text{g L}^{-1}$) kalıntısı tespit edilmiştir. Kalıntı seviyeleri, bir örnek (tetrasiklin; $135.32 \mu\text{g L}^{-1}$) haricinde, yasal sınır değerin ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) altında bulunmuştur. Bu çalışmanın genel bulguları dikkate alındığında, birçok numunede tetrasiklin antibiyotik tespit edilmesi nedeni ile süt ve diğer hayvansal gıdalarda kalıntıların daha sık izlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca tetrasiklin antibiyotik kalıntılarının insan sağlığı üzerindeki olası riskleri daha fazla değerlendirilmeli ve üreticiler ve tüketiciler bilgilendirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: İnek sütü, Kalıntı, Klortetrasiklin, Oksitetrasiklin, Tetrasiklin.

Tetracycline antibiotics in raw cow's milk produced in Samsun province, Turkey

Yavuz Kürşad DAŞ Oğuzhan YAVUZ Enes ATMACA Abdurrahman AKSOY

Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, TURKEY

Due to their broad spectrum of activity and cost effectiveness, tetracyclines are among the most commonly used antibiotics used in worldwide. In this study, the levels of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline residues in 100 raw milk samples collected in public markets in Samsun Province were investigated. Oxytetracycline was detected in nine samples ($11.62\text{--}45.56\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$), tetracycline in 35 samples ($2.21\text{--}135.32\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) and chlortetracycline in 40 samples ($20.06\text{--}98.30\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$). The residue level was above the legal limit ($100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) in only in one sample (tetracycline; $135.32\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$). Given the overall results of this study, it is concluded that due to the detection of tetracycline antibiotics in many samples, they should be frequently monitored in milk and also in other foods of animal origin. In addition, the possible risks to human health of tetracycline residues should be further assessed and producers and consumers should be better informed.

Keywords: *Chlortetracycline, Cow's milk, Oxytetracycline, Residue, Tetracycline.*

Gaziantep Bölgesinden Toplanan Çiğ Süt ve Yöresel Peynir Örneklerinde HPLC Vasıtasıyla Aflatoksin Kalıntılarının Araştırılması*

Sükran ERKAC¹ İbrahim Ozan TEKELİ² Mustafa YİPEL³

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 31060 Hatay, Türkiye

²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,, 31060 Hatay, Türkiye

³Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 59030 Tekirdağ, Türkiye

Bazı küf mantarları uygun çevre koşulları altında mikotoksin olarak adlandırılan sekonder metabolitleri üretirler. Günümüzde bilinen 400'den fazla mikotoksin bulunmakla birlikte aflatoksinler (AF) en toksik ve yaygın görülen grubu oluşturmurlar ve Uluslararası Kanser Ajansı tarafından insan karsinogeni olarak grup 1'de katagorize edilmişlerdir. Aflatoksinler arasında en toksik tür AFB₁ olmakla birlikte, süt ve süt ürünleri açısından en riskli grubu AFM₁ oluşturmaktadır. Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Komisyonu tarafından çiğ süt, ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan sütlerde bulunabilecek maksimum AFM₁ miktarı 0.05 µg/kg olarak belirlenmiştir. Süt ve süt ürünlerinde AF miktarlarının kontrol altında tutulabilmesi için çok sayıda Ulusal/Uluslararası yasa bulunsa da, özellikle yöresel/geleneksel ürünlerdeki düşük sanitasyon şartları kontrolsüz mikotoksin üremesine neden olmaktadır. Bu bağlamda, çalışma kapsamında Gaziantep yöresinden çiğ süt (n=30) ve yöresel peynir (Antep peyniri) örnekleri (n=30) toplanmıştır. Örneklerin katı faz ekstraksiyonu yapıldıktan sonra HPLC-FD cihazı ile AFM₁ kalıntı düzeyleri belirlenmiş ve insan sağlığı açısından risk oluşturup oluşturmadıkları değerlendirilmiştir. Validasyon bulguları incelendiğinde R²=0.999, geri kazanım değerleri süt ve peynir için sırasıyla % 97.9 ve % 95.4, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.002/0.007 ve 0.001/0.003 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Süt numunelerinde <LOD-0.338 (0.050) ve peynir numunelerinde 0,004-0.738 (0.141) aralığında (µg/kg) AFM₁ kalıntısına rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde sütlerde AFM₁ kalıntı seviyelerinin MRL değerlerinin altında olduğu görülmektedir. Peynir numunelerinde ise AFM₁ kalıntılarının süt numunelerine göre 3 katından daha fazla yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Yöresel peynirlerde mevsimsel etki de göz önünde bulundurularak üretim prosesleri ve depolama şartlarının daha sık kontrol ve denetlemeye tabi tutulması yanında belli periyotlarla mikotoksin taraması ve risk değerlendirmesi yapılması insan ve hayvan sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin M₁, Gaziantep, HPLC-FD, Peynir, Süt.

* Bu çalışma bir Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir ve Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (18.YL.073).

Investigation of Aflatoxin Residues by HPLC of Raw Milk and Local Cheese Samples Collected from Gaziantep Region

Sukran ERKAC¹ Ibrahim Ozan TEKELI² Mustafa YIPEL³

¹Hatay Mustafa Kemal University, Health Sciences Institute, Department of Pharmacology and Toxicology, 31060 Hatay, Turkey

²Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, 31060 Hatay, Turkey

³Tekirdağ Namik Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, 59030 Tekirdağ, Turkey

Some molds produce secondary metabolites called mycotoxins under appropriate environmental conditions. Nowadays, although there are more than 400 known mycotoxins, aflatoxins (AF) are the most toxic and common mycotoxin group and are classified as group 1 human carcinogens by the International Cancer Agency. AFB₁ is the most toxic species among aflatoxins, but the most dangerous mycotoxin type for milk and milk products is Aflatoxin M₁. The maximum residue limit (MRL) of AFM₁ that can be found in raw milk, heat-treated milk and milk used for the production of milk-based products by the Turkish Food Codex and the European Commission is determined as 0.05 µg/kg. In spite of there are many national/international laws to control AF production in dairy products, low sanitation conditions promote mycotoxin growth in local/traditional products. In this context, raw milk (n=30) and local/traditional cheese (Antep cheese) (n=30) samples collected from Gaziantep region in these project. After solid phase extraction of samples, AFM₁ residues were determined by HPLC-FD and it was evaluated whether they posed a risk to human health. When the validation findings were examined, R²=0.999, recovery values for milk and cheese were 97.9% and 95.4%, LOD and LOQ values were 0.002/0.007 and 0.001/0.003 µg/kg, respectively. AFM₁ residues (µg/kg) were found in the range of LOD-0.338 (0.050) in milk samples and 0.004-0.738 (0.141) in the cheese samples. When the obtained results are evaluated, it is seen that AFM₁ residue levels in the milk samples are below MRL values. In cheese samples, AFM₁ residues were found to be more than 3 times more concentrated than milk samples. Periodic mycotoxin screening and risk assessment are important for human and animal health beside more frequent control and inspection of production processes and storage conditions in local cheeses also considering the seasonal impact.

Keywords: Aflatoxin M₁, Cheese, Gaziantep, HPLC-FD, Milk.

Acknowledgements: This study is summarized from a Master's thesis and supported by Hatay Mustafa Kemal Univ. Coord. of Sci. Research project with project number 18.YL.073.

Deneyssel Olarak Tip II Diyabet Oluşturulmuş Ratlardaki Yara Modelinde Kudret Narı (Momordica charantia) Meyvesi Yağının Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

Ebru EKİZCE¹ Hüsamettin EKİCİ² Begüm YURDAKÖK-DİKMEN³

¹Ankara İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

²Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD. Kırıkkale, Türkiye

³Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD. Ankara, Türkiye

Alternatif tıp tedavilerinde kullanılan bitkilerin yararlarını tespit etmek amacıyla günümüzde birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır. Geleneksel olarak faydaları görölen kudret narı (*Momordica charantia*) meyvesinin ve tohumlarının da antidiyabetik, antioksidan, antihelmintik, peptik ülser ve pek çok kanser türündeki etkileri konusunda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, kudret meyvesi yağının yara üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla streptozotosin ile oluşturulan diyabet modelinde kudret narının deride oluşturulan yaralarda etkisi incelenmiştir.

Çalışmada, 28 adet sağlıklı ergin erkek wistar albino rat kullanıldı. Deneyssel olarak diabetes mellitus (DM) oluşturulacak gruplara 2 hafta süre ile yüksek yağ oranlı diyet uygulandı. Kan glikoz seviyeleri ve ağırlıkları ölçölen ratlara 2. hafta sonunda Streptozotosin (STZ) çözeltisi (50 mg/kg) uygulandı ve 72 saat sonrasında ratların tekrar kan glukoz seviyesi ölçöldü. Kan glikoz seviyesi 200 mg/dL'nin üzerinde olan ratlar DM olarak kabul edildi. Tüm deneklere gerekli antisepsi sağlandıktan sonra 12 mm çaplı punch biopsi aleti ile tam katman (dermis+epidermis) defekt (yara) oluşturuldu. Müdahale sonrasında 14 gün boyunca ayrı kafeslerde tutulan ratlar günlük olarak lokal uygulama şeklinde kontrol gruplarına sadece serum fizyolojik, kudret narı ve kudret narı + diyabet gruplarına, kudret narı yağı uygulanarak bu bitkinin yara üzerine etkisi incelendi. Çalışma süresinin sonunda tüm gruplardan EDTA'lı tüplere alınan kan numuneleri santrifüj edilerek ayrılan plazmadan; malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon redöktaz (GRx) analizleri yapıldı. Oluşturulan yara dokusunun 1. ve 10. günlerinde yapılan ölçömlerinden yüzde (%) iyileşme oranları belirlendi. Gözlenen yüzde iyileşme miktarlarına göre hazırlanan kudret narı meyvesi yağının yara dokusunda klinik iyileşmeyi anlamlı bir şekilde hızlandırdığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Diyabet, Kudret narı, Rat, Yara.

Effects of Bitter Melon (*Momordica charantia*) oil on Wound Healing in an Experimental Type II Diabetic Wound Model

Ebru EKİZCE¹, Husamettin EKICI², Begum Yurdakok DIKMEN³

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

²Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Kırıkkale, Turkey

³Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Ankara, Turkey

Many scientific studies are being carried out today in order to determine the benefits of plants used in alternative medicine treatments. There have been studies over the benefits of the bitter melon (*Momordica charantia*) fruit and seeds, which are traditionally used in ethnomedicine; where its antidiabetic, antioxidant and antihelmintic, peptic ulcer disease and many types of cancer are being studied. The aim of this study is to investigate the effects of bitter melon (BM) oil on wound healing. For this purpose, the effect of the bitterlemon oil on wounds created in the skin of streptozotocin induced diabetes model rats In the current study, 28 healthy adult male wistar albino rats were used. A high-fat diet was applied for 2 weeks long to the groups with diabetes mellitus (DM) Streptozotosin (STZ) solution (50 mg/kg) was applied to the rats, whose fasting blood glucose levels and weights were measured, and the blood glucose level of these rats were measured again after 72 hours. Rats with blood glucose levels above 200 mg/dL were considered as DM. After the necessary antiseptis was provided, and a full layer (dermis + epidermis) defect (wound) was created to all subjects with a 12 mm punch biopsy tool. Following this intervention the rats were kept in separate cages for 14 days long, while applying (locally) only saline, bitter melon to the control groups and bitter melon + diabetes groups bitter melon oil on a daily basis to examine the effect of this plant on the wound. At the end of the study period, blood samples, which were taken from all groups into EDTA tubes, were centrifuged to analyse malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GRx). The percentage (%) recovery rates were determined from the measurements of the scar tissue on 1st and 10th days. According to the percentage recovery rates, the oil of the bitter melon fruit was found to accelerate clinical healing in wounds significantly.

Keywords: Antioxidant, Bitter melon, Diabetes, Rat, Wound.

Kişniş'in (*Coriandrum sativum* L.) Sitotoksik Etkinliğinin İn Vitro Araştırılması

Semra GÜRBÜZ¹ Farah Gönül AYDIN² Sinem PEHLİVAN² Cansu Öncü ALGAN² Özge AVCI² Begüm Yurdakök DİKMEN²

¹Mardin Artuklu Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Mardin, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Ankara, Türkiye.

Kişniş, geçmişten günümüze, alternatif tıp uygulamalarında, hastalıkların sağaltımında yararlanılan tıbbi bir bitkidir. Bitkinin meyve, yaprak ve tohum kısımlarından bu amaçla yararlanılmakta, özellikle tohum kısmında bulunan; yağ asitleri, steroller, tokofenoller, ve uçucu maddeler gibi biyoaktif bileşenler sağaltım amacıyla kullanılmaktadır. Linalool başta olmak üzere tohumda bulunan esansiyel yağların sitotoksik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Linalool ökaryotik hücrelerin mitokondriyal membranlarında; zar potansiyelini düşürerek, Ca döngüsüne etkilerken, iyon kanallarını ve proton pompasını da hücrede pH düşüşüne neden olacak şekilde etkilemektedir. Böylece hücre membran potansiyelini; sitokrom c, kalsiyum, radikaller ve proteinlerin, hücreden dışarıya sızmasına sebep olacak şekilde değiştirerek sitotoksik etkinlik oluşturabilmektedir. Bu çalışmada, kişnişin sitotoksik etkinliğinin insan epitelyal kolorektal adenokarsinom (Caco-2), insan prostat adenokarsinoma (PC-3) ve insan prostat kanseri (DU145) hücre hatlarında çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan kişnişler, 2017 ve 2018 yıllarında Mardin' in Savur ilçesinin farklı satış yerlerinden toplanmış ve Harran Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbariumuna (No:5991) kaydedilmiştir. Yapılan sulu ekstraktlar hücre hatlarına uygulanmış ve sitotoksik etkinlik MTT ve Nötral Kırmızı (NK) testleri ile değerlendirilmiştir. En yüksek sitotoksik etkinlik DU145 için tespit edilirken bunu PC-3 ve Caco-2 takip etmiştir. Prostat kanser hücrelerinde MTT ile tespit edilen IC50 değerlerinin NK' dan daha düşük olması, olası sitotoksik yolağın mitokondriyal olabileceğini göstermektedir. Araştırmada tespit edilen IC50 değerleri diğer çalışmalara benzemektedir. Hücreler arasındaki duyarlılık farkı, hücrelerin östrojen reseptörlerini farklı düzeylerde ifade etmelerinden (PC3' de hem ER β ve α ' nın, DU145' de ise ER β) ve bu yüzden bitkinin içerdiği izoflavanların olası östrojenik reseptörlere bağlanarak hücre koruyucu özelliğini göstermesinden veya diğer farklı moleküler yollara bağlı olarak değişebilmektedir. Farklı araştırmalarda apoptotik ve oksidatif stres yolları üzerinden in vitro antikanser etkinliği gösterilen kişniş, araştırmamızda da benzer şekilde prostat ve kolon kanser hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. Ancak bu sitotoksik etkinlik Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından, bitkilerin antikarsinojenik etkinliği için in vitro testlerde önerilen (IC50<30 μ g/ml) IC50 değerinin üzerindedir. İlerleyen çalışmalarda farklı kanser kemoterapötikleriyle kombinasyonunun, in vivo olarak etkinliği ve diğer moleküler çalışmalarının yapılmasıyla, kişnişin potansiyel antikarsinojenik etkinliği daha detaylı olarak değerlendirilebilecek ve klinik kullanım için temel oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antikarsinojenik etkinlik, Hücre canlılığı, Kişniş.

In Vitro Cytotoxic Activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.)

Semra GÜRBÜZ¹ Farah Gönül AYDIN² Sinem PEHLİVAN² Cansu Öncü ALGAN² Özge AVCI² Begüm Yurdakök DİKMEN²

¹Mardin Artuklu University, Faculty of Tourism, Department of Gastronomy and Culinary Arts, Mardin, Türkiye.

²Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Ankara, Türkiye.

Coriander is a medicinal plant used in the treatment of diseases from past to present, in alternative medicine applications. Fruit, leaves and seed parts of the plant are used for medicinal purposes, especially in the part of seeds; bioactive components such as fatty acids, sterols, tocopherols, and volatile substances are used for the treatment. It is known that essential oils found in seed, especially linalool, have cytotoxic effects. Linalool, reduces the membrane potential in mitochondrial membranes of eukaryotic cells and it affects the Ca cycle and the ion channels, proton pump in the way that causes a pH decrease in the cell. Thus, it can produce cytotoxic activity by altering cell membrane potential to cause cytochrome c, calcium, radicals and proteins to leak out of the cell. In this study, the cytotoxic activity of coriander was studied in human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2), human prostate adenocarcinoma (PC-3) and human prostate cancer (DU145) cell lines. The coriander used in the study was collected from different sales shop in Savur district of Mardin in 2017 and 2018 and recorded in Harran University Biology Department Herbarium (No: 5991). Aqueous extracts were applied to cell lines and cytotoxic activity was evaluated by MTT and Neutral Red (NK) tests. The highest cytotoxic activity was detected for DU145, followed by PC-3 and Caco-2. IC₅₀ values detected by MTT in prostate carcinoma cells were lower than NK, indicating that the possible cytotoxic pathway may be mitochondrial. IC₅₀ values determined in the study are similar to other studies. The difference in sensitivity between cells is due to the fact that the cells express estrogen receptors at different levels (both ER β and α in PC3 and Er β in DU145), and thus the isoflavans contained in the plant bind to possible estrogenic receptors or show cell protective properties by binding to other different molecular pathways. In vitro anticancer activity demonstrated by apoptotic and oxidative stress pathways by different studies, coriander showed similar cytotoxic effect in prostate and colon cancer cells in our study. However, this cytotoxic activity exceeds the IC₅₀ value recommended by the American National Cancer Institute (NCI) in in vitro tests for the anticarcinogenic activity of plants (IC₅₀ <30 μ g / ml). In future studies, the combination of different cancer chemotherapeutics, in vivo efficacy and other molecular studies, the potential anticarcinogenic activity of coriander can be evaluated in more detail and will form the basis for clinical use.

Keywords: Anticarcinogenic activity, Cell viability, Coriander.

Broyles Yemine (42 Gn Boyunca) AFB1 Katılarak Oluşturulan Deneysel Aflatoksikozisde Isırgan Otu Tohumu (*Urtica dioica* L Seed) Ekstraktının Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması

Erhan AYNA¹ Zbeyir HUYUT² Zabit YENER¹

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Sunulan bu çalışmada, broyles yemine (42 gün boyunca) AFB1 katılarak oluşturulan deneyssel aflatoksikozisde ısırgan otu tohumu (*Urtica dioica* L seed) ekstraktının koruyucu etkinliği, histopatolojik ve biyokimyasal olarak araştırıldı. Bu amaçla, toplam 32 broyles civciv, her biri 8'erli 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (A); normal broyles yemi, IT grubu (B); 30 ml/kg yeme ısırgan otu tohumu ekstresi, AF grubu (C); 1mg/kg AF, AF+IT grubu (D); 1mg/kg AF + 30 ml/kg dozda ısırgan otu tohumu ekstresi ilaveli yemler ile beslendi. Kırk iki günlük deneme sonunda nekropsileri yapılan broyleslerden biyokimyasal ve histopatolojik analizler için örnekler alındı. Biyokimyasal olarak aflatoksin grubunda (C); karaciğer ve serum SOD, GSH-Px, CAT, TAS ve Bcl-2 düzeyleri kontrol grubuna göre düşük iken TOS ve caspase 3 seviyeleri ise yüksekti (p<0.001). Ancak AF+IT grubunda karaciğer GSH-Px ve serum SOD değerleri aflatoksin grubuna göre oldukça yüksekti (p<0.001). AF+IT grubunda ayrıca hem karaciğer hem de serum örneklerinde aflatoksin grubuna göre SOD, CAT, TAS ve Bcl-2 düzeylerinde artış olmasına rağmen anlamlı değildi (p>0.05). Ek olarak AF+IT grubunda serum Bcl-2 düzeyleri AF grubuna göre düşüktü (p<0.001). D grubunda hem karaciğerde hem de serumda AF grubuna göre TOS ve caspase-3 düzeyleri düşük, Bcl-2 düzeyleri ise oldukça yüksekti. Fakat bu artışlar anlamlı değildi. Patolojik olarak AF grubunda karaciğerde büyüme ve solgunluk; histopatolojik olarak ise yaygın hidropik dejenerasyon, periportal fibrozis ve perisinüzoidal myofibroblastik hücrelerde aktivasyon görüldü. Bu morfolojik değişikliklerin AF+IT grubunda çok anlamlı olarak azaldığı gözlendi. Bu bulgulara göre; IT ekstraktının güçlü antioksidan kapasitesi sayesinde doku hasarını önemli ölçüde engelleyerek broyles aflatoksikozisde koruyucu etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksikozis, Biyokimya, Broyles, Isırgan otu tohumu ekstresi, Histopatoloji.

Investigation of the Protective Efficacy of Nettle Seed (*Urtica Dioica* L Seed) Extract in Experimental Aflatoxicosis Formed by Adding AFB1 to Broiler Feed for 42 Days

Erhan AYNA¹ Zübeyir HUYUT² Zabit YENER¹

¹Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology

¹Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry

The aim of this study was to investigate the protective and antioxidant properties of *Urtica dioica* seeds (UDS) extract against aflatoxin (AF) exposure in broiler chickens (from 1 to 42 days of age). The preventive potential and antioxidant capacity of the UDS extract was evaluated by liver histopathological changes, measuring antioxidant defense systems in liver and serum of broiler. Thirty two broiler chickens were randomly divided into four experimental groups: control, UDS extract treated, AF treated and AF+UDS extract treated. Broilers in control and UDS extract treated groups were fed with a diet without AF. AF treated group and AF+UDS extract treated group received approximately 1 mg of AF/broiler/total. AF+UDS extract groups also received of 30 ml/kg UDS extract as supplementation diet for 42 days. liver and serum SOD, GSH-Px, CAT, TAS and Bcl-2 levels were lower than control group, whereas TOS and caspase 3 levels were higher ($p < 0.001$). However, liver GSH-Px and serum SOD levels were significantly higher in AF + IT group compared to aflatoxin group ($p < 0.001$). In the AF + IT group, although there was an increase in SOD, CAT, TAS and Bcl-2 levels in both liver and serum samples compared to aflatoxin group, it was not significant ($p > 0.05$). In addition, serum Bcl-2 levels were lower in the AF + IT group compared to the AF group ($p < 0.001$). In group D, TOS and caspase-3 levels were low and Bcl-2 levels were significantly higher in both liver and serum compared to AF group. But these increases were not significant. Pathologically, the liver was large and pale in the AF group, Histopathologically, diffuse hydropic degeneration, periportal fibrosis and activation of perisinusoidal myofibroblastic cells were observed. These morphological changes were significantly reduced in the AF + IT group. According to these findings; due to the strong antioxidant capacity of IT extract, it can be said to have a protective effect on broiler aflatoxicosis by preventing tissue damage significantly.

Keywords: Aflatoxicosis, Biochemistry, Broiler, Histopathology, *Urtica dioica* seed extract.

Balık Yetiştiriciliğinde Bitkilerin Bağışıklık ve Büyüme Uyarıcı Olarak Kullanım Potansiyeli

Ataman Bilge SARI

İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 34320

Avcılar, İstanbul, Türkiye

Balıklerde görülen enfektif hastalıklarının tedavisinde kimyasalların aşırı kullanılmasının çevre sorunları, dokularda kalıntı birikimi, antibiyotiklere direnç ve etkinlik azalması gibi potansiyel riskleri taşıdığı ortaya konulmuştur. Bu problemler, araştırmacıların ve balık üreticilerinin, kültür balıkçılığı üretiminin artmasına izin verirken çevresel zararı en aza indirecek bitkilerden elde edilen alternatif doğal kaynakları dikkate almalarına neden olmuştur.

Su ürünleri yetiştiriciliğinin temel problemlerinden biri; yüksek stok yoğunluğu ve bunun sonucunda su kalitesindeki düşüş, stres ve enfeksiyon riskinin artmasıdır. Suda yaşayan canlılarda içinde bulundaki çevresel faktörlerin fiziksel, biyolojik ve kimyasal değişimi büyümede gerilemeyi ve hastalıkların meydana gelme riskini diğer türlere kıyasla artırmaktadır. Etkin bir tedaviye rağmen hastalıklar, ortaya çıktıktan sonra toplu ölümlere ve ekonomik kayıplara yol açar. Mevcut tedavi zorlukları nedeniyle aşılama veya bağışıklık uyarıcılar gibi önleyici tedavi yöntemleri balık sağlığının korunmasında önem kazanmıştır. Önleyici tedavi yöntemleri içerisinde bağışıklık uyarıcıların kullanımının, balıkların hastalıklara karşı direnci arttırmada etkili bir araç olabileceği gösterilmiştir.

Bitkisel kaynaklı bağışıklık uyarıcıları, tıbbi spesifik olmayan bağışıklık mekanizmalarını uyandırdığı gibi iştah uyarıcı etki göstererek yem tüketimini ve canlı ağırlığı artırması gibi ek etkileri olduğu bildirilmiştir. İçerdikleri fenolik bileşikler, alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler ve saponin gibi maddeler nedeniyle antibakteriyel, antifungal, antiviral, antistres özelliklerinin de bulunduğu rapor edilmiştir.

Bu sunumun amacı balıklarda tıbbi bitkilerin bağışıklık sistemi ve büyüme üzerine etkilerini araştırılan çalışmaların umut verici sonuçlarını gözden geçirmek ve tıbbi bitkiler, bitki özütleri, uygulama yöntemleri ve balıklara spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerindeki etki şekli hakkında güncel bilgi vermektir.

Anahtar Kelimeler: Balık, Büyüme uyarıcı, İmmunostimulant, Tıbbi bitkiler, Su ürünleri.

The Potential Use of Plants as Immunostimulants and Growth Promoter in Fish Farming

Ataman Bilge SARI

Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa, 34320 Avcilar, Istanbul, Turkey

The overuse of chemicals in the treatment of infective diseases of fish has been shown to carry potential risks such as environmental problems, residual accumulation in tissues, resistance to antibiotics, and reduction of the efficiency. These problems have led some researchers and fish farmers to consider alternative natural resources from plants that would minimize environmental harm while allowing increased aquaculture production.

Main problems of aquaculture are high stock density and consequently, the decrease in water quality, increased risk of stress and infection. The physical, biological, and chemical changes of the environmental factors in aquatic organisms decrease the growth rate and increase the risk of disease occurrence compared to other species. Despite effective treatment, diseases cause mass deaths and economic losses after they occur. Because of the difficulties in treatment, prophylactic methods like vaccination or immunostimulants have gained importance in the protection of fish health. It has been shown that the use of immunostimulants can be an effective tool for increasing the resistance of fish against disease.

Plant-derived immunostimulants have been reported to stimulate non-specific immune mechanisms also have additional effects, such as appetite-stimulating effects, increasing feed intake and live weight. Antibacterial, antifungal, antiviral, antistress properties have been reported due to phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, terpenoids and saponins they contain.

This presentation aims to review the promising results of studies investigating the effects of medicinal plants on the immune system and growth of fish and to provide up-to-date information on medicinal plants, plant extracts, application methods and the mode of action on the non-specific immune system of fish.

Keywords: *Aquaculture, Fish, Growth stimulant, Immunostimulant, Medicinal plants.*

Anöstrustaki Koyunlarda Letrozolün Farmakokinetiği ve Gonodotropinler Üzerine Etkisi*

Mehmet Buğra KIVRAK¹ Orhan ÇORUM² Hasan ALKAN³ Orkun ATİK⁴ İbrahim AYDIN³ Kamil ÜNEY⁵

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji AD, Sivas, Türkiye

²Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Kastamonu, Türkiye

³Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji AD, Konya, Türkiye

⁴Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Afyonkarahisar, Türkiye

⁵Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Konya, Türkiye

Bu araştırmanın amacı anöstrustaki koyunlarda 1 mg/kg dozda damar içi (IV), kas içi (IM) ve deri altı (SC) uygulamasını takiben letrozolün farmakokinetiği ve biyoyararlanımını belirlemektir. Ayrıca letrozolün IV uygulaması sonrası FSH ve LH üzerine etkisi belirlendi. Araştırmada klinik olarak sağlıklı, anöstrus dönemde 12 adet Akkaraman koyun kullanıldı. Koyunlar çalışma grubu ve kontrol grubu olarak rastgele iki eşit gruba ayrıldı. Çalışma grubundaki koyunlara, 21 günlük ilaç arınma süresini takiben letrozol IV, IM ve SC uygulandı. Kontrol grubundaki koyunlarda ise letrozolün çözücüsünün (%95'lik benzil alkol) FSH ve LH üzerine etkisi belirlendi. Plazma letrozol konsantrasyonu yüksek performanslı sıvı kromatografi-UV kullanılarak ölçüldü ve farmakokinetik parametreler nonkompartman analizle hesaplandı. FSH ve LH düzeyleri ise ELISA'da ölçüldü. Kontrol grubu ile kıyaslandığında letrozol FSH düzeyini artırırken ($P<0.05$) LH düzeyinde herhangi farklılığa neden olmadı ($P>0.05$). Ortalama eliminasyon yarılanma ömrü IV, IM ve SC uygulama için sırasıyla 9.93, 37.24, and 41.00 saat idi. IV uygulama için total klirens ve kararlı durum dağılım hacmi sırasıyla 0.11 L/saat/kg ve 1.51 L/kg idi. IM ve SC uygulama için maksimum plazma konsantrasyonu sırasıyla 0.11 µg/mL ve 0.14 µg/mL idi. IM ve SC uygulama için biyoyararlanım sırasıyla 55.60% ve 75.58% idi. Anöstrustaki koyunlarda tek doz letrozol FSH düzeyini belirgin şekilde artırdı ve ekstrasvasküler uygulamayı takiben uzun eliminasyon yarılanma ömrü gösterdi. Bu nedenle Letrozolün reproduktif amaçla kullanılabilmesi amacıyla tek ve tekrarlı doz uygulamaların ovaryum aktivitesi üzerine etkilerini konu alan daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Farmakokinetik, FSH, Letrozol, LH, Koyun.

*Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetimi Koordinatörlüğü tarafından desteklendi (Proje No. 18401040).

Pharmacokinetic And Effect Of Letrozole On Gonadotropins In Anestrous Sheep*

Mehmet Bugra KIVRAK¹ Orhan CORUM² Hasan ALKAN³ Orkun ATIK⁴ Ibrahim AYDIN³ Kamil UNEY⁵

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, Turkey

²Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Kastamonu University, Kastamonu, Turkey

³Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Konya Selcuk University, Konya, Turkey

⁴Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey

⁵Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Konya Selcuk University, Konya, Turkey

The aim of this study is to determine pharmacokinetic and bioavailability of letrozole following 1mg/kg intravenous (IV), intramuscular (IM), and subcutaneous (SC) administration in anestrous sheep. Additionally, the effect of intravenous letrozole on FSH and LH level was determined. Clinically healthy 12 Akkaraman sheep in anestrous was used in the study. Sheep were randomly divided into two groups as control and experimental. In experimental group letrozole was administered IV, IM and SC following 21 days washout period. As for control group, the effect of solvent of letrozole (95 % benzyl alcohol) on FSH and LH was determined. Plasma concentration of letrozole was measured with high performance liquid chromatography and pharmacokinetic parameters were calculated by non-compartmental analysis. FSH and LH levels were detected by using ELISA. In experimental group letrozole increased the FSH level ($p<0,05$) whereas it didn't effect the LH level ($p>0,05$) in comparison to control group. The mean elimination half-life was 9.93, 37.24, and 41.00 h for IV, IM, and SC routes, respectively. The total clearance and volume of distribution at steady state for the IV route were 0.11 L/h/kg and 1.51 L/kg, respectively. For the IM and SC routes, the peak plasma concentration was 0.11 µg/mL and 0.14 µg/mL, respectively. The bioavailability was 55.60% and 75.58% for the IM and SC routes, respectively. A single dose of letrozole significantly increased FSH levels and showed a long elimination half-life following extravascular administration in anoestrus sheep, it is, therefore, concluded that there is a need for further studies on the effects of single and repeated dosages of letrozole on ovarian activity in order to use for reproductive purposes.

Keywords: FSH, Letrozole, LH, Pharmacokinetics, Sheep.

*Acknowledgment: This study was supported by The Coordination Unit of Scientific Research Projects, University of Selcuk, (Project No. 18401040).

Varroa destructor*'e Karşı Sentetik Piretroid, Organik Asit ve Esansiyel Yağ Asit Etkinliğinin Araştırılması

Yusuf Yavuz DEMİREZEN¹ Cavit KUM² Ali SORUCU³ Murat BOYACIOĞLU² Serkan BAKIRCI⁴

¹Milas İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD

³Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Milas Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD

⁴Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD

Varroa destructor, arı sağlığına doğrudan ve dolaylı olarak etki eden ve koloni kayıplarına yol açan önemli bir arı ektoparazitidir. Bu ektoparazite karşı, kimyasal, biyolojik, genetik ve hormonal mücadele yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler içerisinde en etkili olanı kimyasal mücadeledir. Fakat kimyasal mücadele yöntemlerinin arı ürünlerinde kalıntı bırakması ve akarların bu ilaçlara direnç geliştirmesinden dolayı alternatif çözümler aranmaya başlanmıştır. Okzalik asit ile timol kalıntı bırakmaması ve *Varroa* üzerinde yüksek etkinliğe sahip olmalarından dolayı en sık kullanılan alternatif yöntemlerdir. Bu çalışmada her grupta (flumethrin, okzalik asit, timol ve kontrol) 9 koloni olacak şekilde toplam 36 adet kolonide çalışıldı. Çalışma sonuçlarında; ilaçlar arasında ilkbahar ve sonbahar dönemlerine göre, günlere göre, aynı sezon içerisindeki günlere göre düşen varroa sayıları arasında önemli istatistiksel farklılıklar tespit edilmiştir. Yüzde değişim formülüne göre ilaç etkinlikleri; sonbahar döneminde flumethrin %85, okzalik asit %80, Timol %87 ve ilkbahar döneminde flumethrin %75, okzalik asit %68, timol %84 olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları flumethrin uzun süreli, okzalik asit ve timol kısa süreli varroa mücadelesinde başarılı olduğu göstermektedir. Timol'un kullanımında ise sıcaklık faktörünün önemli olduğu, kontrolsüz kullanımında koloni çökmesi gibi istenmeyen etkiler oluşturduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak araştırmamız, bu ilaçların birbirlerinin alternatifi olarak değil koloniye göre birlikte varroa mücadelesinde kullanılması gerektiği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Apis mellifera*, Bal arısı, Flumethrin, Okzalik asit, Timol, *Varroa destructor*.

*Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi BAP-VTF-15036 projesi ile desteklenmiştir.

Investigation of The Effectiveness of Synthetic Pyrethroid, Organic Acid and Essential Fat Acid Against *Varroa destructor**

Yusuf Yavuz DEMİREZEN¹ Cavit KUM² Ali SORUCU³ Murat BOYACIOĞLU² Serkan BAKIRCI⁴

¹Milas Directorate of Agriculture and Forestry

²Aydın Adnan Menderes University, Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology

³Muğla Sıtkı Koçman University, Milas Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology

⁴Aydın Adnan Menderes University, Veterinary Medicine, Department of Parasitology

Varroa destructor is an important honey bee ectoparasite which directly and indirectly affects bee health and leads to colony losses. There are many struggle methods against the ectoparasite which chemical, biological, genetic and hormonal. The most effective of these methods is chemical control. However, alternative solutions have triggered to be sought because chemical control methods lead to residue in bee products and the mites develop resistance to the chemical. Oxalic acid and thymol are used the most common alternative methods owing to the not lead to residues and have high effectivity on the varroa. In the present study, four groups (flumethrin, oxalic acid, thymol, and control) of the 36 colonies were conducted which in each group 9 colonies. Significant statistical differences were found out according to the number of varroa falling in the study results which between spring and autumn, among days and in days of the same season. According to percentage change formula of drug efficacy were found as flumethrin 85%, oxalic acid 80% and thymol 87% in the autumn and flumethrin 75%, oxalic acid 68% and thymol 84% in the spring. The present study indicates that flumethrin was successfully in the fight against varroa in the long-term while oxalic acid and thymol were short-term. Besides, it was determined that the temperature factor was important in the use of thymol and uncontrolled using effects on undesirable results like as colony collapse. In conclusion, the study revealed that these preparations should not be used as alternatives to each other and should be used together according to the colony for the fight against varroa.

Keywords: *Apis mellifera*, *Flumethrin*, *Honey bee*, *Oxalic acid*, *Thymol*, *Varroa destructor*.

*The study was funded by Adnan Menderes University BAP-VTF-15036 project.

Deneyisel Tip 2 Diyabetik Sıçanlarda Benzimidazol Türevi Albendazol ve Lansoprazolun Farklı Dozlarda Potansiyel Antidiyabetik Aktivitesi

Burak DİK Emre BAĞÇIVAN Devran COSKUN Kamil UNEY

Selçuk Üniversitesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Adenozin monofosfatla aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonu, tip 2 diyabette glikoz metabolizmasını ve insülin duyarlılığını düzenlemede etkilidir. Benzimidazol türevli kimyasalların tip 2 diyabet tedavisinde direk AMPK aktivasyonu sağlayarak etkili olabileceği hipoteze edildi. Bu araştırmanın amacı benzimidazol türevi olan albendazol ve lansoprazolün farklı konsantrasyonlarının deneyisel tip 2 diyabetik sıçanlarda endokrinolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerini belirlemektir. Bu çalışmada 46 adet erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar sağlıklı kontrol (0.1 ml / sıçan / gün salin, sc, n = 6), diyabet kontrol (0.1 ml / sıçan / gün salin, sc, n = 8), diyabet + albendazol (5 mg / kg, po, n = 8), diyabet + albendazol (10 mg / kg, po, n = 8), diyabet + lansoprazol (15 mg / kg, sc, n = 8) ve diyabet + lansoprazol (30 mg / kg, sc, n = 8) olarak ayrıldı. Sekiz hafta sonra, anestezi altındaki hayvanlardan kan örnekleri toplandı ve sonra ötenazi edildi. Toplanan kan örneklerinden biyokimyasal ve endokrinolojik parametreler otoanalizör ve ELISA kitleri aracılığıyla analiz edildi. Diyabetik sıçanlarda glukoz, HOMA-IR ve HbA1c düzeyleri kontrol grubuna göre artmıştı. Glukoz ve HbA1c seviyeleri düşük doz albendazol tedavisi ile düzelirken, yüksek doz lansoprazol ve albendazol gruplarında kısmi değişiklikler tespit edildi. Sonuç olarak, düşük doz albendazolün tip 2 diyabet tedavisi için potansiyel bir ilaç olabileceği ve etkili bir tedavi stratejisi oluşturmak için benzimidazol halkasına sahip daha spesifik maddelerin geliştirilmesi faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Albendazol, Benzimidazol, Diyabet, Lansoprazol, Sıçan.

Potential Antidiabetic Activity of Benzimidazole Derivative Albendazole and Lansoprazole Drugs in Different Doses in Experimental Type 2 Diabetic Rats

Burak DIK Emre BAHCIVAN Devran COSKUN Kamil UNEY

Department of Pharmacology and Toxicology, Veterinary Faculty, University of Selcuk, Konya, Turkey

The activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) is effective in regulating glucose metabolism and insulin sensitivity in type 2 diabetes (T2D). It was hypothesized that that AMPK activated benzimidazole-derived chemicals may be effective in T2D treatments. The aim of this research is to determine the effects of different concentrations of benzimidazole derivatives albendazole and lansoprazole on endocrinologic and biochemical parameters in experimental type 2 diabetic rats. In this study, 46 male Wistar Albino rats were used. Animals were divided as healthy control (0.1 ml / rat / day saline, s.c, n=6), diabetes control (0.1 ml / rat / day saline, s.c, n=8), diabetes + albendazole (5 mg / kg, po, n=8), diabetes + albendazole (10 mg / kg, po n=8), diabetes + lansoprazole (15 mg / kg, subcutaneous, n=8) and diabetes + lansoprazole (30 mg / kg, subcutaneous, n=8). After eight weeks, blood samples were collected from the animals under anesthesia and then euthanized. Collected blood samples were analyzed by autoanalyzer and ELISA kits for biochemical and endocrinological parameters. Glucose, HOMA-IR and HbA1c levels increased and insulin level decreased in diabetic group compared to control group. Glucose and HbA1c levels were improved by low-dose albendazole treatment while partial changes were found in the high-dose lansoprazole and albendazole groups. In conclusion, it can be concluded that low-dose albendazole can a potential drug on T2D treatment and it may be beneficial to create an effective treatment strategy by developing more specific substances with benzimidazole ring.

Keywords: *Albendazole, Benzimidazole, Diabetes, Lansoprazole, Rat.*

**Streptozotosin ile diyabet oluşumu indüklenen ratlarda meydana gelen testis hasarı
üzerine Çakşır (Ferula L) ekstraktının iyileştirici etkisi: Histopatolojik ve
immünohistokimyasal bir inceleme**

Ahmet UYAR¹ Turan YAMAN²

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanların testislerinde meydana gelen hasarlara karşı Çakşır (Ferula L) ekstresinin (FE) iyileştirici etkisi histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi. Toplam 40 sağlıklı yetişkin Wistar albino erkek sıçan rastgele beş gruba ayrıldı. Gruplar C (Kontrol), DM (diyabet), DM+AC (diyabet + akarboz 20mg / kg), DM+FE (diyabet + Ferula ekstraktı) ve Ferula ekstraktı (FE) olarak oluşturulmuştur. Deneysel diyabet STZ ile oluşturuldu [70 mg / kg, periton içi (i.p.)]. FE ekstresi ve akarboz, 28 gün boyunca oral yoldan gavaj ile verildi. Deneme sonunda tüm ratların nekropsileri yapılarak testis dokuları alındı. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda germ hücrelerinin dejenerasyonu ve tubulusların yapısal bozuklukları gibi histopatolojik değişiklikler yönünden karşılaştırıldığında FE ekstraktı uygulamasıyla DM+FE grubunda iyileşme görüldü. İmmünohistokimyasal incelemede kontrol grubunun en yüksek glutatyon peroksidaz 1 (GPx1) immünoreaktivite seviyesinde, Grup DM'nin en düşük GPx1 immünoreaktivite seviyede olduğu ortaya konuldu. Bununla birlikte GPx1 immünoreaktivitesi, Grup DM ile karşılaştırıldığında Grup DM+FE de daha yüksekti. Sonuç olarak, FE ekstraktının uygulamasının, güçlü antioksidan aktivitesine bağlı olarak testislerde meydana gelen hasarı önlediği histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Çakşır (Ferula L), Diabetes mellitus, İmmünohistokimya, Testis.

Ameliorative effect of *Ferula L* extract against testicular damages of streptozotocin-induced diabetic rats: A Histopathological and immunohistochemical investigation

Ahmet UYAR¹ Turan YAMAN²

¹Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Hatay, Turkey

²Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Van, Turkey

The ameliorative effect of *Ferula L.* extract (FE) was investigated using histopathological and immunohistochemical methods in testes tissues against streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. A total of forty healthy adult Wistar albino male rats were divided randomly into five groups. Groups were formed as C (Control), DM (diabetes), DM+AC (diabetes + acarbose 20mg/kg), DM+FE (diabetes + Ferula extract) and Ferula extract (FE). Experimental diabetes was induced with STZ [70 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)]. FE and acarbose were applied with gastric gavage for 28 day. At the end of experiment the samples of testes tissues were taken after the necropsy. Compared to degenerative changes such as degeneration of germ cells and structural disorders of tubuli in STZ-induced diabetic rats, improvement of DM + FE group was observed with FE extract application. Immunohistochemical examination revealed that the control group had the highest level of glutathione peroxidase 1 (GPx1) immunoreactivity, while Group STZ had the lowest level. However, GPx1 immunoreaction was higher in the Group DM+FE, compared to the Group DM. In conclusion, our study results showed that FE administration prevented damages in testes due to antioxidant effect based on the histopathological and immunohistochemical findings.

Keywords: *Diabetes mellitus, Ferula L, Immunohistochemistry, Testes.*

Di-(2-etilheksil) Fitalat (DEHP)'a Maruz Kalan Kedi Uterusunun Kasılma Aktivitesindeki Değişiklikler

Ruhi KABAKÇI¹ Hasan Ceyhun MACUN² İbrahim Mert POLAT² Ebru YILDIRIM³ Taha Burak ELİFOĞLU²

¹Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji ABD, Kırıkkale

²Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji ABD, Kırıkkale

³Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD, Kırıkkale

Di-(2-etilheksil) Fitalat (DEHP), PVC türü plastik ürünler, oyuncak, ambalaj malzemeleri, kozmetik ve ilaç sanayi gibi çeşitli ürünlerde plastikleştirici olarak yaygın kullanılmaktadır. Bu çalışmada DEHP'in kedilerde uterusun in vitro ortamdaki spontan kasılmaları üzerine etkisini araştırmak amaçlandı. Yetişkin kedilerden ovariohisterektomi sonrası alınan uterus dokularından hazırlanan 1 cm'lik tubal örnekler, 39±1 °C'de karbojen (%95 O₂, %5 CO₂) ile havalandırılan Krebs solüsyonu içerisinde izole organ banyosuna asıldı ve 1g ön gerim uygulandı. On beş dakikada aralıklarla Krebs solüsyonu tazelenen dokuların 1 saatlik ekilibrasyonunu takiben kontrol için 10 dakikalık spontan kasılma kaydı alındı. Ardından, çözücü (DMSO) ve DEHP'in (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM) spontan kasılmalar üzerine etkisi frekans ve ortalama amplitüd parametreleri bakımından değerlendirildi. Üreme dönemi açısından vaginal sitoloji ve serum hormon düzeyine göre sınıflandırılan kedilerden interöstrus dönemindekilerin uterus kasılmaları üzerine DEHP'in çalışmada kullanılan dozlarının etkisinin olmadığı gözlemlendi. Bununla birlikte, DEHP, uterus kasılmalarının ortalama amplitüdünü östrus ve diöstrus döneminde sırasıyla 1 µM ve 10 µM üzeri konsantrasyonlarda doza bağlı olarak önemli oranda artırdı (p<0.05). DEHP'in östrus ve diöstrus dönemindeki kasılmaların frekansında meydana getirdiği azalmaların ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (p>0.05). Yapılan bu çalışma ile DEHP'in uterus kasılmaları üzerine uyarıcı bir etkisinin olduğunu ortaya konulmuştur. Ancak, düzenli östrus siklusu, sperm ve zigotun taşınması, implantasyon ve gebeliğin devamlılığı gibi fizyolojik üreme süreçleri için önem arz eden uterus kasılmalarının herhangi bir sebeple dengesinin bozulması beraberinde birçok üreme problemini de beraberinde getirebilir.

Anahtar Kelimeler: DEHP, Kasılma aktivitesi, Kedi, Uterus, Üreme.

Alterations in the Contractile Activity of Cat Uterus Exposed to Di (2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)

Ruhi KABAKCI¹ Hasan Ceyhun MACUN² İbrahim Mert POLAT² Ebru YILDIRIM³ Taha Burak ELİFOĞLU²

¹Kirikkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Kirikkale

²Kirikkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Kirikkale

³Kirikkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Kirikkale

Di- (2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) is widely used as a plasticizer in various products such as PVC derived plastics, toys, packaging materials, cosmetics, and pharmaceutical industries. This study aimed to investigate the effect of DEHP on spontaneous contractions of the uterus in vitro. Tubal 1 cm-uterine samples prepared from uterine tissues obtained from adult cats after ovariectomy were suspended in an isolated organ bath in a Krebs solution aerated with carbo-gen (95% O₂, 5% CO₂) at 39 ± 1 ° C and an initial 1 g tension was given. After 1 h equilibration of tissues in Krebs solution refreshed at intervals of 15 min, the spontaneous contractions were recorded for 10 min as control. Then, the effect of solvent (DMSO) and DEHP (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM) on spontaneous contractions were evaluated in terms of frequency and mean amplitude parameters. It was observed that the doses of DEHP used in the study had no effect on uterine contractions of cats in the period of oestrus, which were classified according to vaginal cytology and serum hormone level in terms of the reproductive period. However, DEHP significantly increased the mean amplitude of uterine contractions during the estrus and diestrus periods at the concentrations of 1 µM and 10 µM, respectively, depending on the dose (p <0.05). Decreases in the frequency of the contractions in the oestrus and diestrus period were not statistically significant (p > 0.05). This study showed that DEHP has a stimulatory effect on uterine contractions. But disruption of the uterine contractions, which are essential for physiological reproductive processes such as regular oestrus cycles, sperm and zygote transport, implantation and continuity of pregnancy, may cause many reproductive problems.

Keywords: DEHP, Cat, Contractile Activity, Reproduction Uterus.

Amoksisilin Nanopartiküllerinin Toksikite Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Enes GÜNCÜM¹ Tülay BAKİREL² Ceren ANLAŞ² Mohammad CHAREHSAZ³ Nuran IŞIKLAN⁴

¹Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Yahşihan, Kırıkkale

²İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Avcılar, İstanbul

³Yeditepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji AD, Ataşehir, İstanbul

⁴Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya AD, Yahşihan, Kırıkkale

Günümüzde; direnç gelişimi, yüksek yan etki potansiyeli, düşük biyoyararlanım antimikrobiyal tedavide başarısızlığın temel nedenleri arasında kabul edilmektedir. Son yıllarda nanoteknoloji alanında gelişmelere paralel şekilde konvansiyonel antimikrobiyel ilaçların nano taşıyıcı sistemlere yüklenmesiyle hazırlanan yeni formülasyonlar ise enfeksiyöz hastalıklarla mücadelede etkin seçenekler olarak gösterilmektedir. Bu kapsamda; özellikle polimer bazlı taşıyıcılara yüklenen antimikrobiyellerin yan etki potansiyellerinde azalmanın yanı sıra biyoyararlanım düzeyinde ve farmakodinamik etkisinde artışın şekillendiği çeşitli araştırmalar ile kanıtlanmıştır. Ancak bu bileşiklerin güvenilirlik boyutlarının yeterince değerlendirilmemesi rasyonel olarak kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu çalışmada; kanatlılarda konvansiyonel forma göre oral biyoyararlanımı yüksek bulunan amoksisilin nanopartiküllerinin güvenilirlik potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda; amoksisilin nanopartiküllerinin mutajenik veya karsinojen olma potansiyeli *in vitro* sistemde incelendi. Bu amaçla nanopartiküllerin mutajenitesi ilaçların geliştirilmesinde önemli bir mutajenite testi olarak kabul edilen Ames testi ile değerlendirildi. Ames testi, *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 bakteri suşları kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen bulgulara göre metabolik (S9) aktivasyon varlığında ve yokluğunda test edilen tüm konsantrasyonların (0.1, 1, 10 ve 100 µg/plate) geri mutasyona uğrayan TA98 ve TA100 suşlarının sayısında anlamlı bir artışa yol açmadığı tespit edildi ($p > 0.05$). Bu sonuç, amoksisilin nanopartiküllerinin test edilen suşlara mutajenik etkisinin olmadığını ortaya koydu.

Anahtar Kelimeler: Ames testi, Amoksisilin, Genotoksikite, Nanopartikül.

Screening The Toxicity Potential of Amoxicillin Nanoparticles

Enes GÜNCÜM¹ Tülay BAKIREL² Ceren ANLAŞ² Mohammad CHAREHSAZ³ Nuran IŞIKLAN⁴

¹Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Yahşihan, Kırıkkale

²Kırıkkale University-Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Avcılar, İstanbul

³Kırıkkale Yeditepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology, Ataşehir, İstanbul

⁴Kırıkkale University, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry, Yahşihan, Kırıkkale

Nowadays; resistance development, high side-effect potential, low bioavailability are accepted as the main reasons of failure in antimicrobial therapy. In recent years, parallel with the developments in the field of nanotechnology, the new formulations prepared with loading conventional antimicrobial drugs into nano-carrier systems are shown as effective options to fight against infectious diseases. In this context, it has been proved by various studies that the decrease in side effect potentials of antimicrobials that loaded in the polymer-based carriers as well as increase in bioavailability and pharmacodynamic effects of these drugs. However, the insufficiency of safety aspects of these compounds limits their rational use. In the present study, it was aimed to investigate the safety potential of amoxicillin nanoparticles that have higher oral bioavailability compared to the conventional form in poultry. Within this context, the potential of amoxicillin nanoparticles to be mutagenic or carcinogenic was investigated in *in vitro* system. For this purpose, the mutagenicity of the nanoparticles was evaluated with the Ames test, which is considered to be an important mutagenicity test in the development of drugs. Ames test was carried out using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 bacterial strains. According to the results, all concentrations tested (0.1, 1, 10 and 100 µg/plate) did not induce a significant increase ($p > 0.05$) in the revertant number of TA98 and TA100 strains with or without metabolic activation (S9). This result revealed that amoxicillin nanoparticles had no mutagenic effect on the strains tested.

Keywords: Ames test, Amoxicillin, Genotoxicity, Nanoparticle.

GG4 (GXXXG) Motif Açısından Fare, Sıçan, İnsan ve Sığır Alfa-1A Adrenerjik Reseptörleri Arasındaki Farklılıkların Araştırılması

Ayça ÇAKMAK¹ Süleyman AYDIN²

¹Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Yozgat, Türkiye

²Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskisehir, Türkiye

Protein yapısında olan reseptör, enzim ve iyon kanallarının etkilerinde, protein-protein etkileşimi önemlidir. Protein-protein etkileşmesinde GxxxG (GG4) motifinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Hayvan türleri arasında reseptörlerin işlevlerinde ve ilaçlara olan duyarlılıklarında birçok farklılıklar bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, sıçan, sığır, fare ve insan alfa-1A adrenerjik reseptörlerinin GG4 motif açısından farklılıklarını araştırmaktır.

Bu çalışmada fare, sıçan, sığır ve insana ait alfa-1A adrenoseptör yapısına ait bilgiler UniProt web server kullanılarak elde edilmiş, GNU/Linux işletim sistemi (çekirdek 4.4.147) ve ClustalW programı ile bilgiler işlenmiştir.

Bu çalışmada incelenen türlere ait alfa-1A adrenoseptörlerin hepsinin yapısında GG4 motiflerinin var olduğu bulunmuştur. Sığır, sıçan ve insana ait alfa-1A adrenoseptörlerinin üzerinde dört adet GG4 motifinin var olduğu, ancak farede bulunan reseptörde bir adet fazla GG4 motifinin bulunduğu görülmüştür. Fare alfa-1A adrenoseptör üzerinde bulunan bu GG4 motifinin GQHRG (Glisin-Glutamin-Histidin-Glisin) yapısında ve reseptörün sitoplazmik kısmında bulunduğu saptanmıştır.

Adrenerjik reseptörler birçok ilacın etki yöresidir ve sonuçlarımız fare ile insan, sıçan ve sığır alfa-1A adrenoseptörleri arasında GG4 motifi açısından farklılık bulunduğunu göstermiştir. Bu nedenle alfa-1A adrenoseptör ile ilgili deneysel çalışmalarda sıçan ya da sığır doku ve hücrelerinin kullanılmasının daha güvenilir sonuçlar vereceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alfa-1A adrenerjik reseptör, Biyoinformatik, GG4 motif.

GG4 (GxxxG) motif based differences between bovine, rat, mouse and human alpha-1A adrenergic receptors

Ayça ÇAKMAK¹ Süleyman AYDIN²

¹Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Yozgat, Turkey

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Eskisehir, Turkey

Protein-protein interactions are crucial for the actions of receptors, enzymes and ion channels which are in protein structure. GxxxG (GG4) motif was shown to play role on the protein-protein interactions. There are many differences between animal species including sensitivity to drugs and function of receptors. The aim of this study was to investigate differences of GG4 motifs between the alpha-1A adrenergic receptors of bovine, rat, mouse and human.

The protein information and structures of alpha-1A adrenergic receptors were downloaded from the UniProt ftp servers and further processed using GNU/Linux operating system (kernel 4.4.147) and ClustalW programme.

Alpha-1A adrenergic receptors of all of the species investigated in this study was found to possess GG4 motifs. There were four GG4 motifs on the alpha-1A adrenoceptors of bovine, rat and human but additional one more GG4 motif was found on only mouse alpha-1A adrenoceptor structure. This additional GG4 motif was GQHRG (Glycine-Glutamine-Histidine-Arginine-Glycine) which was located on the cytoplasmic part of the receptor.

Since adrenergic receptors are one of the important sites of many drugs, results of the our study show the presence of GG4 motif based differences between alpha-1A adrenoceptors of mouse and of human, rat and bovine.

It was concluded that rat and bovine tissues and cells will give much more reliable results on the alpha-1A adrenoceptor related experimental studies.

Keywords: *Alpha-1A adrenergic receptor, Bioinformatics, GG4 motif.*

Japon Bildircinlarında Danofloksasin ve Marbofloksasinin Kalıntı Düzeylerinin Belirlenmesi

Erdoğan TÜRK¹ İbrahim Ozan TEKELİ¹ Orhan ÇORUM² Duygu Durna ÇORUM² Fatma Ceren

KIRGIZ³ Fatih SAKİN¹ Kamil ÜNEY⁴

¹Hatay Mustafa Kemal Üniv., Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Hatay, Türkiye

²Kastamonu Üniv., Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Kastamonu, Türkiye

³Hatay Mustafa Kemal Üniv., Sağlık Bilimleri Ens., Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Hatay, Türkiye

⁴Selçuk Üniv., Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Konya, Türkiye

Kanatlılarda bakteriyel hastalıklarda antibiyotikler yaygın olarak kullanılır. Ancak kullanılan antibiyotiklerin kalıntı düzeylerinin bilinmemesi bu dokuları tüketen canlılarda antimikrobiyal direnç gelişimi, gastrointestinal mikrobiyotiklerde değişiklik, alerji ve toksisite gibi istenmeyen durumlara yol açabilir. Danofloksasin ve marbofloksasin sadece veteriner sahada kullanımı onaylanmış florokinolon grubu antibiyotiklerdir. Kanatlılarda *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp. ve *Mycoplasma* kaynaklı respiratör ve enterik enfeksiyonlarda kullanımı önerilir. Bu çalışmada, japon bildircinlerinde danofloksasin ve marbofloksasinin tekrarlayan oral uygulamasını takiben doku kalıntı düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada toplam 108 adet bildircin rastgele iki gruba ayrıldı. Birinci gruba danofloksasin ve ikinci gruba marbofloksasin oral yolla 10 mg/kg/gün dozda 5 gün uygulandı. Her iki grupta ilaç uygulama öncesi (0.saat) ve son ilaç uygulamasını takiben 1., 12., 24., 48., 72., 96., 120. ve 144. saatlerde kan, karaciğer, böbrek, kas ve deri+yağ dokusu örnekleri alındı. Plazma ve doku örneklerinde danofloksasin ve marbofloksasin tayini HPLC-UV vasıtasıyla gerçekleştirildi. Kanatlılarda danofloksasinin maksimum kalıntı düzeyi (MRL) Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından karaciğer, kas, deri+yağ, ve böbrek için sırasıyla 400 µg/kg, 200 µg/kg, 100 µg/kg ve 400 µg/kg olarak bildirilmiştir. Marbofloksasinin ise kanatlılarda MRL, EMA tarafından belirtilmemesine rağmen bazı ülkelerde kas, karaciğer ve böbrek için sırasıyla 150 µg/kg, 50 µg/kg ve 50 µg/kg olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmada danofloksasin 72. saatte karaciğer (340 µg/kg), kas (140 µg/kg), deri+yağ (90 µg/kg) ve böbrek (290 µg/kg) dokularında MRL'in altında belirlendi. Marbofloksasin ise kas (50 µg/kg) dokusunda 72. saatte, karaciğer ve böbrek dokularında (< 40 µg/kg, hesaplanabilir limit) ise 144. saatte MRL'in altında tespit edildi. Sonuç olarak Japon bildircinlerinde danofloksasin ve marbofloksasin için MRL'in altında bir kalıntı düzeyi için sırasıyla en az 3 ve 6 günlük bir kalıntı arınma süresi gerektiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bildircin, Danofloksasin, Kalıntı, Marbofloksasin.

Determination of Danofloxacin and Marbofloxacin Residue Levels in Japanese Quail

Erdinc TURK¹ İbrahim Ozan TEKELİ¹ Orhan CORUM² Duygu Durna CORUM² Fatma Ceren

KIRGIZ³ Fatih SAKIN¹ Kamil UNEY⁴

¹Hatay Mustafa Kemal Univ., Fac. of Vet. Med., Dept. of Pharmacology-Toxicology, Hatay, Turkey

²Kastamonu Üniv., Fac. of Vet. Med., Dept. of Pharmacology-Toxicology, Kastamonu, Turkey

³Hatay Mustafa Kemal Univ., Health Sciences Institute, Dept. of Pharmacology-Toxicology, Hatay, Turkey

⁴Selçuk Üniv., Fac. of Vet. Med., Dept. of Pharmacology-Toxicology, Konya, Turkey

Antibiotics are widely used in bacterial diseases in poultry. However, the lack of knowledge of the residual levels of the antibiotics used may lead to undesirable conditions such as the development of antimicrobial resistance, changes in the gastrointestinal microflora, allergies and toxicity in humans and animals consuming these tissues. Danofloxacin and marbofloxacin are fluoroquinolone antibiotics approved for veterinary use only. It is recommended for use in respiratory and enteric infections caused by *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp. and *Mycoplasma* in poultry. In this study, it was aimed to determine tissue residual levels following repeated oral administration of danofloxacin and marbofloxacin in Japanese quails. A total of 108 quails were randomly divided into two groups. The first group received danofloxacin and the second group received marbofloxacin orally at a dose of 10 mg/kg/day for 5 days. Blood, liver, kidney, muscle and skin+fat tissue samples were taken in both groups before drug administration (control) and after the last drug administration at the 1, 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours. Determination of danofloxacin and marbofloxacin in plasma and tissue samples was performed by HPLC-UV. The maximum residual level (MRL) of danofloxacin in poultry has been reported by the European Drug Agency (EMA) to be 400 µg/kg, 200 µg/kg, 100 µg/kg and 400 µg/kg for liver, muscle, skin+fat and kidney, respectively. Although marbofloxacin MRL values in poultry have not been specified by EMA, some countries has been reported to be 150 µg/kg, 50 µg/kg and 50 µg/kg for muscle, liver and kidney, respectively. In this study, danofloxacin was detected under MRL in liver (340 µg/kg), muscle (140 µg/kg), skin+fat (90 µg/kg) and kidney (290 µg/kg) tissues at 72 hours. Marbofloxacin in muscle (50 µg/kg) tissue at 72 hours and in liver and kidney tissues (<40 µg/kg, LOQ) at 144 hours were detected under MRL. In conclusion, it was determined that a residue withdrawal period of at least 3 and 6 days, respectively is required for a residual level below MRL for danofloxacin and marbofloxacin in Japanese quails.

Keywords: Danofloxacin, Marbofloxacin, Quail, Residue.

Acil Servise Gelen Zehirlenme Vakalarının Değerlendirilmesi

Yavuz Osman Birdane Selen Büyükçavuşoğlu

Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji ABD

2015-2017 yılları arasında zehirlenme tanısıyla Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma Hastanesi Acil Servisine başvuran 1027 hastanın; yaş, cinsiyet, başvurdıkları ay, mevsim, yerleşim yerleri, zehirlenme tipi, alınan ilaç türü, uygulanan tedavi yöntemleri, hastanede yatış süreleri, antidot kullanıp kullanılmadığı gibi demografik özellikleri bakımından değerlendirildi. Acil servise başvuran hastaların, 583'ü kadın (%56,8), 444'ünün (%43,2) erkek olduğu görülmüştür. En sık zehirlenme vakasına 21-30 yaş grubunda rastlanmıştır. Zehirlenme vakaları en çok ilkbahar mevsiminde görülmüştür. Mayıs ayında %10,9, nisan ayında %9,4 oranında başvuru olmuştur. Vakaların 673'ü il merkezinden (%65,5), 205'i köyden (%20) ve 149 hasta da ilçeden (%14,5) başvurmuştur. En çok başvurunun 19.00-24.00 saatleri arasında olduğu görülmüştür. Zehirlenmelerin %58,4'ü ilaç kaynaklı görülmüştür. Olguların %40'ı kaza, %60'ı intihardır. Tüm intihar olgularının %61,9'u kadın ve %38,1'i erkektir. Küçük çocuklarda ve yaşlılarda genel olarak kazara zehirlenme görülürken, genç yaşlarda özellikle intihar amaçlı ilaç alımı görülmektedir. Zehirlenmelerin önlenmesi ve tedavisi için toplumlarda bu tarz çalışmaların yapılarak her toplumun epidemiyolojik verilerinin tanımlanması önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Acil servis, Tedavi, Zehirlenme.

Evaluation Of Poisoning Cases in The Emergency Department

Yavuz Osman Birdane Selen Büyükçavuşoğlu

Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Afyonkarahisar, Turkey

Between 2015-2017, 1027 patients admitted to Uşak University Medical Faculty Training and Research Hospital Emergency Department with the diagnosis of poisoning were evaluated in the terms of age, gender, the month they applied, season, place of residence, type of poisoning, type of medication, treatment methods, duration of hospital stay whether or not antidots were used. Of the 1027 patients, 583 were female (56.8%) and 444 were male (43.2%). The most common cases of poisoning were found in the 21-30 age group. Most cases of poisoning occurred in spring. In May, 10.9% and in April, 9.4% respectively. Of the 1027 cases, 673 were referred from the city center (65.5%), 205 from the village (20%) and 149 from the district (14.5%). Most applications were observed between 19:00-24:00. 58.4% of poisonings were caused by drugs. 40% of the cases were accidents and 60% were suicides. 61.9% of all suicide cases were female and 38.1% were male. In young children and the elderly, accidental poisoning is observed, but at young ages, especially suicidal drugs are seen. In order to prevent and treat intoxication, it is important to define the epidemiological data of each community by making such studies in societies.

Keywords: *Emergency department, Intoxication, Treatment.*

Glifosat-Bazlı Herbisite Akut Maruziyet Sonrası Sıçanlarda DNA Hasarı, Oksidan/Antioksidan Denge ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Ruhi TÜRKMEN¹ Yavuz Osman BİRDANE¹ Orkun ATİK¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,
Afyonkarahisar, Türkiye

Bu çalışmada, iki oral herbisit glifosat dozunun (1/10 ve 1/2 LD50 glifosatzopropilamin tuzu) akut maruziyet sonrası sıçan kan, beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve testis dokularında oksidan/antioksidan denge, DNA hasarı ve bazı biyokimyasal parametreler üzerindeki akut etkisi değerlendirildi. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinin (8-OHdG) seviyeleri, özellikle herbisit in daha yüksek dozuna maruz kalan hayvanlarda, kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha yüksekti. Malondialdehit (MDA) düzeyleri de kanda ve kalp dokusu dışındaki tüm organlarda özellikle herbisit in daha yüksek dozuna maruz kalan hayvanlarda kontrol grubundaki hayvanlara göre daha yüksekti. Bu MDA sonucu aynı yüksek doz gruplarındaki hayvanlarda oldukça düşük glutatyon (GSH) seviyeleri olarak yansıtıldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında, ANOVA analizi hem eritrositlerde hem de tüm organlarda, özellikle de daha yüksek herbisit dozlarına maruz kalan hayvanlarda, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde önemli artışlar olduğunu ortaya koydu. Biyokimyasal analiz sonuçları, herbisite akut maruz kalmanın serum üre, alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP) ve albümin seviyelerinde önemli bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, gruplar arasında serum kreatinin, aspartat aminotransferaz (AST), gama-glutamintransferaz (GGT), total protein (Tp) ve kreatin kinaz-MB (CK-MB) seviyelerinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu sonuçlar, glifosat bazlı formülasyonların özellikle yüksek dozlarına maruz kalan sıçanlarda oksidatif stresi indükleyerek, 8-OHdG aktivitesinde bir artış ve bazı biyokimyasal parametrelerde değişiklik yaparak toksik olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Akut maruziyet, Glifosat, Sıçan.

Evaluation of DNA Damage, Oxidant/Antioxidant Balance and Some Biochemical Parameters in Rat Following Acute Exposure to Glyphosate-Based Herbicide

Ruhi TURKMEN¹ Yavuz Osman BIRDANE¹ Orkun ATIK¹

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Afyonkarahisar, Turkey

The present study evaluated the acute effect of two oral doses of the herbicide glyphosate (1/10 and 1/2 LD50 of glyphosate isopropylamine salt) on DNA damage, oxidant/antioxidant balance and some biochemical parameters in the blood, brain, heart, liver, kidney, and testis of rat after acute exposure. Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) were significantly greater in exposed animals compared to controls, especially in the animals exposed to the higher dose of the herbicide. Malondialdehyde (MDA) levels were also higher in the blood and all organs except for heart tissue than in controls, especially in animals exposed to a higher dose of herbicides. This result was reflected at significantly lower glutathione (GSH) levels at the same high dose. Comparing with the control, ANOVA analysis revealed that there were significant increases in the activities of the antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in both erythrocytes and all organs, especially in animals exposed to a higher dose of herbicides. The biochemical assays results showed that acute exposure to herbicide induced a significant increase in serum urea, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and albumin levels. However, there were no significant changes in serum creatinine, aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), total protein (Tp), and creatine kinase-MB (CK-MB) levels among groups. The present findings demonstrate that glyphosate-based formulations may be toxic by inducing oxidative stress, by an increase in 8-OHdG activity and by altering some biochemical parameters, particularly in rats exposed to high doses.

Keywords: *Acute exposure, Glyphosate, Rat.*

Trabecular Meshwork Hücrelerine Kök Hücre Farklılaştırılması

Emine Kübra BİLİR Xiaochen FAN Stephnie KENNEDY Carl SHERIDAN Rachel OLDERSHAW

Institute of Ageing & Chronic Disease, University of Liverpool

Korneanın arka yüzeyi, avasküler korneaya besin sağlayan ve göz küresinin göz içi basıncını koruyan göz içi sıvısı (aqueous humor) ile yıkanır. Aqueous humor için ana çıkış yolu, kollektör episkleral venöz sisteme kanallı olan trabeküler ağ örgüsü (TM) hücrelerini, Schlemm kanalını (SC) içeren ön kamaradadır. Körlüğün önde gelen nedenlerinden biri olan glokom, göz içi sıvı artışı ile karakterize edilir. Yaşın artması ve glokomla birlikte TM hücrelerinin selularitesinde azalma oluşur. TM hücreleri üzerine hücre yenileme tedavi seçenekleri, glokom hastalarına tedavisel umut oluşturmaktadır. İnsan TM hücrelerinden başlayan primer kültürler muhtemel yerleşik bir kök hücre popülasyonu içerir. Bu farklılaşmamış multipotent progenitör hücreler, küresel kümeler veya serbest yüzen küreler şeklindedir. Sunulan çalışma, bazı yöntem optimizasyonlarının yanı sıra bugüne kadar elde edilen sonuçları gösterecektir.

Anahtar Kelimeler: Kök hücre, Trabecular meshwork hücreleri.

Stem Cell Differentiation into Functioning Trabecular Meshwork Cells

Emine Kubra BILIR Xiaochen FAN Stephnie KENNEDY Carl SHERIDAN Rachel OLDERSHAW

Institute of Ageing & Chronic Disease, University of Liverpool

The posterior lining of the cornea is bathed in aqueous humour, which provides nutrients to the avascular cornea and maintains the intraocular pressure (IOP) of the eyeball. The main outflow pathway for aqueous humor in the eye is through the angle of the anterior chamber comprising the trabecular meshwork (TM) cells, Schlemm's canal (SC), the collector channels through to the episcleral venous system. Glaucoma, a leading cause of blindness, is characterised by an increase IOP. In increasing age and more so in glaucoma, the cellularity of the TM cells is decreased, and, as a result cell replacement therapies for the TM represent a potential therapeutic option for restoring TM function and treating glaucoma patients. It is likely a resident stem/progenitor population exists and primary cultures initiated from human TM contain relatively undifferentiated or progenitor cells which are capable of forming spherical clusters or free-floating spheres that contain undifferentiated multipotent progenitor cells. The study presented will demonstrate some of the method optimisations as well as results obtained to date.

Keywords: *Stem cell, Trabecular meshwork cells.*

Türkiye'de Yetiştirilen Gökkuşluğu Alabalıklarından İzole Edilen *Chrysobacterium* Türlerinde Plazmid Aracılı Kinolon Direnç Genlerinin Belirlenmesi*

Izzet B. SATICIOGLU¹ Muhammed DUMAN² Soner ALTUN² Erdal YILMAZ¹ Emrah ŞİMŞEK¹

Feride KOÇ³

¹Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri

²Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa

³Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri

Sucul ortam, hem antibiyotik direnç genlerinin doğal bir rezervuarı hem de bakteri ve antimikrobiyal direnç genlerinin çevreye yayılması açısından öneme sahiptir. Plazmid aracılı kinolon direnci (PMQR) insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde kinolonların etkinliğini sınırlandıran önemli bir faktördür. Bu çalışmada, Türkiye'deki gökkuşluğu alabalığı çiftliklerinden izole edilen 70 *Chrysobacterium* spp. izolatında PMQR genleri analiz edilmiştir. *Chrysobacterium* spp. izolatları 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanmıştır. İzolatların kinolon duyarlılığı oksolinik aside karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) yöntemi kullanılarak belirlendi ve PMQR genlerinin (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) varlığı ise PCR ile incelenmiştir. Deri renginin koyulaşması ve egzozalmus gibi klinik belirtiler gösteren gökkuşluğu alabalıklarından izole edilen izolatlar *C. aquaticum* olarak tanımlandı. Yapılan MİK testi ile izolatların %89'unun oksolinik asite duyarlılığının azaldığı belirlenmiştir. *qnrA* geni barındıran 28 (% 40) izolat, *qnrS* barındırılan 23 izolat (% 32) ve hem *qnrA* hem de *qnrS* barındıran 17 izolat (% 24) tespit edilmiştir. Hiçbir izolatın *qnrB* geni barındırmadığı tespit edilmiştir. Bulgularımız, *C. aquaticum* izolatlarında yüksek oranda kinolon direnci (% 89) ve PMQR genleri bulunduğunu göstermiştir. Çalışmamız PMQR genleri açısından *C. aquaticum*'un potansiyel olarak su ortamında rezervuar görevi yapabileceğini ve sudaki diğer bakteriyel türler arasında horizontal gen transferinin olası olduğunu vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal direnç, *C. aquaticum*, Gökkuşluğu alabalığı, PMQR.

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu tarafından TCD-2018-8586 proje no ile desteklenmiştir.

**Determination of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Chrysobacterium*
Species Isolated from Farmed Rainbow Trout in Turkey***

Izzet B. SATICIOGLU¹ Muhammed DUMAN² Soner ALTUN² Erdal YILMAZ¹ Emrah ŞİMŞEK¹

Feride KOÇ³

¹Aquatic Animal Disease Department, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey;

²Aquatic Animal Disease Department, Faculty of Veterinary Medicine, Bursa Uludağ University, Bursa, Turkey

³Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey

The aquatic environment can serve both as a natural reservoir of antibiotic resistance genes and the spreading of bacteria and antimicrobial resistance genes to environment. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes represent an important challenge to the effectiveness of quinolones in the treatment of human and animal infections. In this study, 70 *Chrysobacterium* spp. isolates recovered from farmed rainbow trout in Turkey were analyzed for PMQR genes. *Chrysobacterium* spp. strains were identified with 16S rRNA sequence analysis. Quinolone susceptibility among the strains was determined using minimum inhibitory concentration method against oxolinic acid, and the frequency of PMQR genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) was investigated by PCR. The isolates recovered from farmed rainbow trout exhibiting clinical signs such as darkening of skin color, exophthalmia were identified as *C. aquaticum*. The rates of reduced susceptibility in phenotypically were determined for oxolinic acid (89%). Of the 70 isolates, 28 (40%) isolates harbored *qnrA*, 23 isolates (32%) harbored *qnrS* and 17 isolates (24%) have both *qnrA* and *qnrS*. None of the isolates harbored *qnrB*. Our findings showed high rates of quinolone resistance (89%) and *qnr* genes, underlining the importance of aquatic environment as reservoirs for the dissemination of potentially possible *C. aquaticum* and horizontal gene transfer between other waterborne bacterial species.

Keywords: Antimicrobial resistance, *C. aquaticum*, PMQR, Rainbow trout.

*This research was supported by The Research Fund of Erciyes University. Project Number: TCD-2018-8586.

Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus Mykiss*) Farklı Soğukta Saklama Modellemelerinde Biyojen Amin Düzeyleri ve Kimyasal Kalite İndeksi

Enes ATMACA Aylin PEHLİVAN Yavuz Kürşad DAŞ Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim
Dalı, Samsun, TÜRKİYE

Bu araştırmada, Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) 0 °C ve üzeri farklı soğukta saklama modellemelerinin (0 °C'de 14 gün, 2 °C'de 10 gün, 4 °C'de 7 gün ve 6 °C'de 5 gün) biyojen amin (metilamin triptamin, pütresin, kadaverin, histamin, tiramin, spermidin ve spermin) düzeyleri üzerine etkisi araştırıldı. Günlük olarak ekstraksiyonu yapılan örneklerdeki (n=3) biyojen amin düzeylerinin analizi HPLC-PDA (254 nm) sistemi ile gerçekleştirildi. Analizlerden elde edilen sonuçlara göre her bir örneğe ait biyojen amin indeksi (BAI) hesaplandı, ayrıca günlük pH ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre, gökkuşağı alabalığı kas dokusunda biyojen aminlerden triptamin ve histamin hiçbir örnekte tespit edilmezken; metilamin, pütresin, tiramin, spermidin ve sperminin gruplar ve günler arası düzeylerinde anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.01$). 0 °C ile diğer saklama koşulları arasında ölçülen pH değerleri arasında da anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.01$). Bununla beraber, kimyasal kalite indeksi ((histamin+pütresin+kadaverin) / (1+spermidin+spermin)) tüm saklama koşullarında kabul edilebilir değerlerde ($1<$) tespit edildi. Sonuç olarak, gökkuşağı alabalığı kas dokusunda biyojen aminler yönünden kimyasal kalitenin belirlenmesinde pH ölçümleri ile birlikte metilamin, pütresin, tiramin, spermidin ve sperminin indikatör olarak kullanılabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Biyojenik amin, Gökkuşağı alabalığı, Kimyasal kalite indeksi.

The Biogenic Amine Levels and Chemical Quality Index in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) at Various Storage Modellings

Enes ATMACA Aylin PEHLIVAN Yavuz Kursad DAS Abdurrahman AKSOY

Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, TURKEY

In this study, the effects of ice-cold and various storage modellings (at 0 °C, 2 °C, 4 °C and 6 °C degrees for 14, 10, 7 and 6 days, respectively) on the biogenic amine (methylamine, tryptamine, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine and spermine) levels in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were investigated. The samples (n=3) were extracted daily and analyses of the biogenic amine levels were performed by HPLC-PDA (254 nm) system. Biogenic amine index (BAI) of each sample was calculated according to the results obtained from the analyses, and daily pH measurements were performed. According to the results, tryptamine and histamine were not detected in any sample of Rainbow trout muscle, whereas significant differences were found in the levels of methylamine, putrescine, tyramine, spermidine and spermine between the groups and between the days ($p<0.01$). Significant differences were also found in pH levels between storage at 0 °C and other refrigeration temperatures ($p<0.01$). Furthermore, the chemical quality index $((\text{histamine} + \text{putrescine} + \text{cadaverine}) / (1 + \text{spermidine} + \text{spermine}))$ was determined to be acceptable levels ($1<$) at all storage conditions. As a result, it came to the conclusion that methylamine, putrescine, tyramine, spermidine and spermine together with pH measurements can be used as indicators to determine the chemical quality in the sense of biogenic amines in the rainbow trout.

Keywords: *Biogenic amine, Chemical quality index, Rainbow trout.*

Antimikrobiyal Dirençle Mücadelede Yükselen Yıldız: Tek Sağlık Yaklaşımı

Pınar řAHİNTRK¹ Erdem ARSLAN¹

¹Uludaė Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Nilüfer, Bursa

Antimikrobiyal direnç, insan ve hayvan sağlığını ulusal ve küresel boyutta tehdit eden, küresel ekonomiyi olumsuz yönde etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. Tedavi ve profilaksi amacıyla antimikrobiyallerin aşırı kullanımı direnç gelişimine neden olan faktörlerdendir. Dirençten sorumlu genetik determinantları bulunduran kanalizasyon kaynakları, ilaç endüstrisi atıkları ve çiftliklerden gelen gübreler; antimikrobiyal direnç gelişiminde rezervuar olan hastane ve diğer toplu yaşam alanlarının yanı sıra hayvan çiftlikleri, su ürünleri yetiştiriciliği ortamları, su, toprak, yaban hayatı ve diğer birçok ekolojik ortamda direncin yaygınlaşmasına neden olur. Halk sağlığını tehdit eden antimikrobiyal direncin önlenmesi için, antimikrobiyal direnç ile ilgili izleme programlarını içeren küresel eylem planlarının oluşturulması önemli ve gereklidir. Bu kapsamda, Amerika Birleşik Devletleri tarafından uluslararası işbirliği ve kapasiteye sahip; insanlar, hayvanlar ve çevreyi kapsayan “Tek Sağlık” yaklaşımı olarak nitelendirilen izleme programlarının güçlendirilmesi önerilmiştir. Tek Sağlık yaklaşımı, antimikrobiyal direnci kıtalar ötesi bir sağlık problemi olarak değerlendirerek, antimikrobiyal direnç gelişimi ve yaygınlaşmasında rol oynayan faktörlerin küresel olarak analiz edilmesini sağlar. Antimikrobiyal direncin önlenmesi konusunda kapsamlı ve bütünleştirici önlemler geliştirmek için, 2015 yılında Küresel Antimikrobiyal Direnç İzleme Programı (Global AMR Surveillance System: GLASS) olarak adlandırılan Tek Sağlık yaklaşımını benimseyen eylem planı, Türkiye’nin de dahil olduğu kırk ülke tarafından kabul edilmiştir. Bu izleme programının amacı, küresel düzeyde yıllık raporlamalar yaparak antimikrobiyal direnç gelişimini önlemek, kontrol etmek ve izlemek için ülkeler tarafından alınması gereken kilit aksiyonların belirlenmesidir. İzleme programının 2016-2017 ve 2017-2018 olmak üzere iki yıllık çıkarımları sonucu belirlenen aksiyonlar; antimikrobiyal ilaç kullanım kurallarının belirlenmesi ve takibi, ilaç politikalarının geliştirilmesi, enfeksiyon kontrolünün sağlanması, sanitasyon kurallarına uyulması, hayvansal üretim süreçlerinin etkin kontrolü ve antimikrobiyallere alternatif oluşturacak mlerin belirlenmesini içermektedir. İzleme programlarının olumlu etkilerinin görülmesi için, belirlenen aksiyon planlarının etkin biçimde ve uzun yıllar kullanılması gerekliliğine rağmen antimikrobiyal dirençle mücadelede Tek Sağlık yaklaşımını temel alan küresel programların geliştirilmesi; insan ve hayvan sağlığının korunması, ekosistemin devamlılığı ve antimikrobiyal direncin neden olduğu ekonomik kayıpların önlenmesi için önemli bir basamaktır.

The Rising Star in Combating Antimicrobial Resistance: One Health Approach

Pinar SAHINTURK¹ Erdem ARSLAN¹

1Uludag University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Nilüfer, Bursa

Antimicrobial resistance (AMR) is a complex, multifaceted problem that threatens human and animal health, the global economy, and national and global security. Antimicrobial use and overuse are important drivers of the resistance phenomenon; the other main drivers are factors that promote the spread of resistant bacteria and their genes locally and globally. Wherever antimicrobials are used, there are reservoirs of resistance, including within humans and the local environments of hospitals and the community, as well as in animals and the farm and aquaculture environments, but also in water, soil, wildlife, and many other ecological niches, due to pollution by sewage, pharmaceutical industry waste, and manure runoff from farms. Tackling the public health threat posed by antimicrobial resistance requires global action plan including effective antimicrobial resistance surveillance programmes. The US National Action Plan proposed the strengthening of a 'One Health' national surveillance system (for humans, animals and the environment) with improved international collaboration and capacity. While the One Health approach to AMR mainly focuses on drawing attention to interconnectedness between domains— whether sectoral, disciplinary or countries—it also has allowed for analyses of reasons for the emergence of AMR, drawing attention to the ways we connect with each other and with nature. In this scope, the One Health approach is essential for developing comprehensive and integrative measures to ensure sufficient action on antimicrobial resistance. Forty countries including Turkey agreed to have a national action plan on AMR that is consistent with the Global AMR Surveillance System (GLASS). The purpose of this monitoring exercise is to review and summarise country progress in implementing key actions to address to prevent, control and monitor AMR, for reporting annually at global level. Necessary actions include improvements in antimicrobial use regulation and policy, surveillance, stewardship, infection control, sanitation, animal husbandry, and alternatives to antimicrobials. Although benefits of surveillance may take years to realise and are dependent on effective and accepted interventions, One Health approach to AMR surveillance provides improved human and animal health outcomes, quantifiable financial efficiencies, society benefits (open trade and travel), animal welfare, ecosystem health.

Türkiye’de Toksikolojik ve Güvenlikle İlgili Değerlendirmelerde Kullanılan Deney Hayvanları Üzerine Bir Araştırma

Çağrı Çağlar SİNMEZ¹ Aşkın YAŞAR²

¹Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kayseri, Türkiye

²Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Konya, Türkiye.

Çalışmada, Türkiye’de 2009-2018 yıllarında deneysel amaçlı toksikolojik ve güvenlikle ilgili diğer değerlendirmelerde kullanılan hayvan verilerinin uluslararası istatistiki raporlarla karşılaştırmalı analizi ve etik açıdan değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmanın materyalini, konuyla ilgili Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu Başkanlığı’ndan temin edilen istatistiki veriler oluşturdu. Ulusal mevzuat ışığında toksikolojik ve güvenlikle ilgili diğer değerlendirmelerde hayvan kullanımına ilişkin istatistiki veriler, başta Avrupa Birliği ülkeleri ve hayvan kullanımında üst sıralarda yer alan ülkelerin yıllık istatistiki verileriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Çalışmada, 2009-18 yılları arasında toksikolojik ve güvenlikle ilgili yapılan araştırmalar içinde en fazla diş hekimliği, tıp ve veteriner hekimlik için ürün/madde veya cihazların geliştirilmesi (n=185.644; %38.4) ile hayvan tüketimine yönelik gıda katkısı olarak kullanılan ya da kullanılması öngörülen ürün/maddelerin geliştirilmesi (n=111.893; %23.1) amacıyla deney hayvanlarının kullanıldığı belirlendi. Çalışmada, 2009 ve 2018 yılları karşılaştırıldığında, diş hekimliği, tıp ve veteriner hekimlik için ürün/madde veya cihazlar (20.615’den 11.990’a) ve sanayi alanında kullanılan ya da kullanılması öngörülen ürün/maddelerin geliştirilmesi için toksikolojik testlerde kullanılan hayvan sayısında (388’den 35’e) önemli oranda azalış olduğu; hayvan tüketimine yönelik gıda katkısı olarak kullanılan ya da kullanılması öngörülen ürün/maddeler (3.512’den 7.520’ye) ve diğer toksikolojik ve güvenliğe ilişkin değerlendirme (337’den 13.900’e) çalışmaları için kullanılan hayvan sayılarında önemli oranda artış olduğu tespit edildi. 2009-2018 yılları arasında toksikolojik ve güvenlikle ilgili diğer değerlendirme çalışmalarında uygulanan testlerde sırasıyla en çok fare (n=79.618; %35.8), balık (n=54.162; %24.3), sıçan (n=37.349; %16.8) ve diğer kanatlıların (n=33.064; %14.9) kullanıldığı belirlendi. Uygulanan testlerin en büyük yüzdesi sırasıyla “diğer toksikolojik ve güvenlik değerlendirme” testleri (%74.2) ile akut ve subakut toksisite testleri (%12.8) olduğu belirlendi. Avrupa Birliği üye ülkelerinde, toksikoloji ve güvenliğe ilişkin diğer değerlendirmeler amacıyla kullanılan hayvanların oranı 2008 yılında %8.7 ve 2011 yılında %8.8 olarak gösterilirken, bu oran Türkiye’de 2009 yılında %4.3, 2011 yılında %9.8 ve 2018 yılında %1.9 olarak belirlendi (2009-2018 yılları arasında ortalama %6.6). Türkiye’de toksikolojik ve güvenlikle ilgili diğer değerlendirme çalışmalarında kullanılan hayvan sayılarının AB üye ülkeleri, ABD ve Kanada gibi gelişmiş ülkelere göre düşük miktarda olmasının hayvan kullanım etiği açısından pozitif bir yaklaşım olarak değerlendirilebileceği gibi, bu seviyenin nedenleri arasında Türkiye’de genetiği değiştirilmiş hayvanların bu ülkelerde olduğu gibi biyolojik araştırmalarda yaygın kullanılmaması, biyomedikal araştırma faaliyetlerindeki değişiklikler ve yeni teknolojiler ile daha az hayvan temelli araştırmaların yapılması sayılabilir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel hayvan kullanımı, İstatistiksel raporlar, Toksikolojik ve güvenlik araştırmaları, Türkiye.

An Inquiry on Experimental Animals Used in Toxicological or Other Safety Evaluations in Turkey

Çağrı Çağlar SİNMEZ¹, Aşkın YAŞAR²

¹Department of History of Veterinary Medicine and Deontology, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey

²Department of History of Veterinary Medicine and Deontology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya, Turkey

The present study was aimed to compare experimental animal data used for toxicological or other safety evaluations in Turkey during 2009–2018 with the corresponding statistical international reports as well as to evaluate ethical perspectives of the works. The material of the study consisted of related statistical data obtained from the Central Ethics Committee of Animal Experiments of Turkey. The annual Turkish data in accord with the legislation for toxicological or other safety evaluations were comparatively with similar data mainly from European Countries and selected countries which have been at the top using experimental animals. The experimental animals in Turkey between 2009 and 2018 were mostly utilized for toxicological or other safety evaluations of products or devices in the field of human medicine, veterinary medicine and dentistry (n=185.644; 38.4%), and were second mostly utilized for products/substances used or intended to be used mainly as additives in food for animal consumption (n=111.893; 23.1%). A significant decrease from the year 2009 to 2018 has been observed in the number of animals used for products/substances or devices (from 20.615 to 11.990) as well as the number of animals used in toxicological tests in developing products/substances used or intended to be used mainly in industry (from 388 to 35). However, in the same period the number of animals for products/substances used or intended to be used mainly as additives in food for animal consumption increased (from 3.512 to 7.520), and similar increases were also evident for other toxicological or other safety evaluations of products or devices (from 337 to 13.900). The animal species mostly used for toxicological and other safety evaluations researches in Turkey from 2009 to 2018 were in the order of mice (n=79.618; 35.8%), fish (n=54.162; 24.3%), rats (n=37.349; 16.8%) and other birds excluding quails (n=33.064; 14.9%). The majority of tests applied were “other toxicological and safety evaluations” (74.2%) followed by acute and sub-acute toxicity test (12.8%). The percentage of laboratory animals used for toxicological and other safety evaluations across the European Countries was 8.7% and 8.8% in 2008 and in 2011, respectively. In Turkey, however, the percentage of the animals used for the same purpose were 4.3% in 2009, %9.8 in 2011, and %1.9 in 2018 with an average of 6.6% within the years of 2009 to 2018. Compared with the European countries, Canada and the USA, the numbers of animals used in toxicological and other safety evaluations in Turkey are much lower, which could reflect a positive approach to animal ethics. However, the reason for the results could have been due to the fact that genetically modified experimental animals are not commonly used in Turkey and also the fact that less animals are utilized because of integrating the new technologies as well as reduced animal numbered-studies conducted.

Keywords: *Experimental animal use, statistical reports, toxicological and safety researches, Turkey.*

Bir Molekülün Yolculuğu

Arslan E¹ Sorucu A² Sahintürk P²

¹Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Laboratuvarı 16059 Nilüfer, Bursa

²Muğla Sıtkı Kocaman Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Muğla

Tüm dünyada ilaç sanayi bir ilacı pazara sunmadan önce ilgili otoritelerden onay ve ruhsat almak zorundadır. İlaç ruhsatlandırma sürecinin amacı ilaç uygulamalarında tüketici, hayvan, çevre ve kullanıcı güvenliğini sağlamak ve yeni ürünün güvenilirlik, etkinlik ve kalite özelliklerinin belirlenmiş kriterlere uygunluğunu denetlemek ve ürün kullanımda iken bu özelliklerin takip ve kontrolünü gerçekleştirmektir.

1960'ların başında özellikle avrupa ülkelerinde yaşanan talidomid faciasından sonra ilaç ruhsatlandırma ve takip süreci ciddi anlamda yenilenmiştir ve farmakovijilans kavramı ilk kez 1966'da ruhsatlandırma mevzuatlarında yerini almıştır.

Bu değişiklikler kapsamında yeni ürün içeriğinde bulunan farmakolojik aktif maddenin farmakokinetik, farmakodinamik, etki mekanizması ve etkinlik çalışmalarının her bir hedef tür ve alt populasyon (gebe, laktasyon veya gelişme döneminde olan veya predispose ırklar) için ayrıntılı bir biçimde sunulması istenmektedir. Ayrıca aktif maddenin ayrıntılı toksikolojik profilinin (tek doz, tekrarlayan doz, üreme ve gelişim toksikolojisi, genotoksisite, karsinojenite, insan ve hayvan gastrointestinal florası üzerindeki etkiler kullanıcı güvenliği ve çevresel toksikolojik özelliklerinin) valide edilmiş methodlar ile İyi Klinik Uygulamaları (GCP) ve İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) standartlarını sağlayan tesislerde çalışılmış olması gereklidir.

Özellikle gıda değeri olan hayvanlarda kullanılan Veteriner Tıbbi Ürünler için ayrıntılı kalıntı karakterizasyonu yapılması gerekmektedir. Kalıntı çalışmaları kapsamında kalıntıların fiziko-kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri, analiz methodları, farmakokinetik ve farmakodinamik karakterleri metabolizasyon, atılım ve arınma süreleri gibi özelliklere ek olarak kalıntıların gıda üretiminde kullanılan mikroorganizmalar ve mikrofloralar üzerindeki etkileri gibi toksikolojik karakterlerinin ortaya konması gerekmektedir.

Farmakolojik etken madde ile ilgili testlerin ardından üretim metodu ve hammadde ile ilgili olan impurite, üretim metodu, stabilite, stress, yardımcı ve ürün ile temas halinde olan primer paket materyallerinin istenen kriterlere uygunluğunu gösteren test sonuçlarının sunulması gereklidir. Tüm bu aşamalardan sonra pazara sunulan ürünün periyodik olarak kontrolü hem sağlık otoritelerinin denetlemeleri hem de ürün sahibi tarafından sunulan Periyodik Güvenlik Güncelleme Raporlarının kontrolü ile sağlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Farmakovijilans, Ruhsatlandırma prosedürü, Veteriner tıbbi ürün mevzuatı.

The Journey of a Molecule

Arslan E¹ Sorucu A² Sahintürk P²

¹Uludağ University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pharmacology and Toxicology Molecular Pharmacology Laboratory 16059 Nilüfer, Bursa

²Muğla Sıtkı Kocaman University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pharmacology and Toxicology, Muğla

Globally the pharmaceutical industry must obtain marketing authorization from the relevant authorities before presenting a drug on the market. The aim of this marketing authorization process is to ensure the safety of consumers, animals, environment and users in pharmaceutical applications and to control the reliability, efficiency and quality of the new product in compliance with the specified criteria and to monitor and control these features while the product is in use. After the thalidomide disaster in European countries in the early 1960s, the process of marketing authorization and follow-up procedures was dramatically renewed, and the concept of pharmacovigilance was first introduced in 1966 in regulatory legislation.

Within the scope of these changes; pharmacokinetic, pharmacodynamic, mechanism of action and efficacy studies of the active substance of the new product must be presented extensively for each target species and subpopulations (pregnant, lactating or developmental or predisposing races). In addition, detailed toxicological profile of the active substance (single dose, repetitive dose, reproductive and developmental toxicology, genotoxicity, carcinogenicity, effects on human and animal gastrointestinal flora, user safety and environmental toxicological properties) is required to be studied with validated methods; in facilities that provide standards of Good Clinical Practice (GCP) and Good Laboratory Practice (GLP).

Detailed residue characterization is required for veterinary medicinal products used in food producing animals. In addition, overall physical, chemical and microbiological properties, analysis methods, pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics and toxicological characteristics of the residues on the microorganisms used in food production and different microflorae should be demonstrated extensively.

Following the tests on the pharmacological active substance, it is necessary to present the test results of the production methods, raw materials, impurities, stability and stress tests, excipients and primary packaging materials in contact with the product are within the required criteria. After all these stages, periodic control of the product should be ensured by both the health authorities' inspections and the Periodic Safety Update Reports submitted by the sponsor.

Keywords: *Marketing authorization procedure, Pharmacovigilance, Veterinary medicinal product legislation.*

Assessment of Marbofloxacin Pharmacokinetics and Tissue Depletion Profiles in Bilgorajska Geese

I. Sartini¹ B. Łebkowska-Wieruszewska² A. Lisowski² A. Poapolathep³ H. Owen⁴ M. Giorgi⁵

¹University of Sassari, Sassari, Italy

²University of Life Sciences, Lublin, Poland

³Kasetsart University, Bangkok, Thailand

⁴University of Queensland, Brisbane, Australia

⁵University of Pisa, Pisa, Italy

Marbofloxacin (MRB) is a veterinary antibacterial drug used off label in the goose industry to control bacterial infections. Goose breeding is still considered a niche production in several European countries, but in many regions of globe their breed and production are wide. The aim of this study was two-fold: I) to provide the pharmacokinetics and tissue depletion of 2 mg/kg MRB in geese after intravenous (IV) and oral (PO) administrations; II) to compare the effective daily dosage extrapolated from the experimental data with that calculated by allometric scaling. Ten clinically normal females of Bilgorajska Geese underwent a 3-phase parallel study with 3-week washout period. Each phase corresponded to different routes of administration of MRB: IV, PO for plasma collections and PO for tissue (liver, kidney, lung, muscle, heart) collections. Samples of plasma and organ extracts were analysed in HPLC-FL for MRB quantification following a validate analytical method. The MRB plasma concentrations were quantifiable up to 24 h after IV and PO administrations. The oral bioavailability was low (27%) and the PO formulation might not be recommended for treatment of bacteria in geese. The maintenance doses calculated with predicted data are 59% (IV) and 57% (PO) of the doses calculated with observed data. MRB concentrations were quantifiable in all organs tested. They decreased constantly up to 48 h and were higher in the kidney. The preliminary withdrawal times found in this study matched with those reported in chickens (2 days for liver and kidney).

Keywords: *Antibacterial; In vivo; Observed clearance; Pharmacokinetics, Predicted clearance.*



**POSTER
SUNUMLAR**

**POSTER
PRESENTATIONS**

**I. INTERNATIONAL
VI. VETERINARY
PHARMACOLOGY
and TOXICOLOGY
CONGRESS**

04 | 07 SEPTEMBER 2019

Erciyes University Sabancı Cultural Center

KAYSERİ - TURKEY

www.vetfarmatoks2019.com



Rekombinant DNA Teknolojisi ile Aşı Üretimi*

Büşra MALAS¹, Hüsamettin EKİCİ²

¹Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, KIRIKKALE

²Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KIRIKKALE

*Aynı başlıklı tezli yüksek lisans seminerinden özetlenmiştir.

Hastalıkların eradikasyonunda ve kontrolünde aşılama çalışmaları en etkili yöntemlerden birisidir. Klasik aşılarda dezavantajlarını ortadan kaldırabilmek ve daha güvenilir, ucuz, etkili aşılarda üretebilmek adına rekombinant DNA teknolojisi önemli bir strateji olmuştur. Gerek insan hekimliği gerekse veteriner hekimlik alanlarında rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen aşılarda geniş bir yer tutmaya başlamıştır. Bu derlemede rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen ve üretime aday aşı çalışmalarına yer verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aşı, DNA, rekombinant Aşı, rekombinant DNA teknolojisi.

Vaccine Production with Recombinant DNA Technology

Büşra MALAS¹, Hüsamettin EKİCİ²

¹Kırıkkale University, Institute of Health Sciences, KIRIKKALE

²Kırıkkale University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pharmacology and Toxicology,
KIRIKKALE

Vaccination studies are one of the most effective methods in eradication and control of diseases. Recombinant DNA technology has become an important strategy to eliminate the disadvantages of conventional vaccines and to produce more reliable, inexpensive, effective vaccines. Vaccines produced with recombinant DNA technology have started to occupy a wide place in the fields of human medicine and veterinary medicine. In this review, vaccine studies which are produced by using recombinant DNA technology and are candidate for production are given.

Keywords: *DNA, recombinant vaccine, recombinant DNA technology, vaccine.*

Olgu Sunumu: Sincap Maymunu(*Saimiri sciureus*) Akut Fipronil Toksikasyonu

Onur DEMİR¹, Özgen ÖZDEMİR, Asiye TOY KOÇAK¹, Zeynel ARSLAN¹, Sedat SEVİN²

¹Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, İSTANBUL

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Bir hayvanat bahçesinde barındırılan Sincap Maymunu (*Saimiri sciureus*) türü on üç primatin yaşam alanında haşere mücadelesi amaçlı % 0.05 fipronil etkin maddesi içeren jel formunda biyosidal ürün kullanılmıştır. Uygulanmanın ardından üç primatta ani ölüm şekillenmiş ve bir primatta depresyon, inapatens, letarji ve canlı ağırlık kaybı ile seyreden klinik belirtilerin azalarak kaybolduğu ve iyileşmenin gerçekleştiği bildirilmiştir. Ölüm sebebinin araştırılması için ölen primatlardan bir tanesinin kadavrası ile Kurumumuza başvurulmuştur. Kadavrada yapılan nekropsi ve akabinde alınan doku numunelerinde rutin bakteriyolojik, histopatolojik, toksikolojik analizler sonucu patojen etken, patognomik bulgu ve pestisite rastlanılmamıştır. Fipronil toksikasyonu biyomarkerları olarak bilinen fipronil ve fipronil sülfon maddelerinin varlığı araştırılması için alınan dokulara ekstraksiyon işlemleri uygulanmış ve UHPLC Q-Orbitrap Kütle Spektrometresi ile fipronil ve fipronil sülfon sırasıyla deri dokusunda 27,1 – 3,5 µg / kg ve beyin dokusunda 13,8 – 47,02 µg / kg düzeyinde tespit edilmiştir. Anamnez, nekropsi, mikrobiyoloji ve histopatoloji bulguları ışığında, doku fipronil - fipronil sülfon varlığı değerlendirildiğinde türe özgü etkin madde hassasiyeti olabileceği düşünülerek akut fipronil toksikasyonu sonucu ölüm şekillendiği kanaatine varılmıştır. Bu olgu sunumu ile Sincap Maymunu (*Saimiri sciureus*) türü bir primatta gerçekleşen toksikasyondan yola çıkılarak; ilaç, ilaç metabolitleri ve degradasyon ürünlerinin çevresel döngülerinin ekosistem üzerindeki etkilerine dikkat çekmek, fipronilin primatlarda etiket dışı kullanımı için farmakovijilans verisi sağlamak, fipronil toksikasyonu biyomarkerlarının tespiti için geliştirilen analitik metot ile literatüre katkı sağlanması adına paylaşım yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Biyosidal, farmakovijilans, fipronil, primat, toksikasyon.*

Case Report: Squirrel Monkey's (*Saimiri sciureus*) Acute Fipronil Toxication

Onur DEMİR¹, Özgen ÖZDEMİR, Asiye TOY KOÇAK¹, Zeynel ARSLAN¹, Sedat SEVİN²

¹Pendik Veterinary Control Institute, ISTANBUL

² Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pharmacology and Toxicology, ANKARA

The biocidal product in the form of gel containing 0.05% Fipronil active substance was used for pest control in the habitats of thirteen primates of the Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*) in a zoo. After the application, sudden death had been formed in three primates. In one primate have been, depression, inappetence, lethargy and loss of body weight but then its clinical signs decrease and recovery has been reported. In order to investigate cause of death one of the primate cadaver's was referred with to our institution. There were no pathogenic agents, pathognomic findings and pesticides as a result of routine bacteriological, histopathological and toxicological analyzes in cadaver necropsy and subsequent tissue samples. Fipronil intoxication biomarkers known as fipronil and fipronil sulfone substances, applied extraction processes to tissue taken to investigate the presence and the UHPLC Q-Orbitrap Mass Spectrometer with fipronil and fipronil sulfone, respectively cutaneous tissue 27,1 – 3,5 µg / kg brain tissue for 13,8 – 47,02 µg / kg level detection It was. In the light of the anamnesis, necropsy, microbiology and histopathology findings, when the presence of tissue fipronil - fipronyl sulfone was evaluated, it was thought that death could be formed as a result of acute fipronil toxicity due to species specific active substance susceptibility. In this case report, we have started with the toxicity of a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*) primate. In order to draw attention to the effects of environmental cycles of drugs, drug metabolites and degradation products on ecosystem, to provide pharmacovigilance data for extra label use of fipronil in primates, to contribute to the literature with analytical method developed for the detection of fipronil toxicity biomarkers.

Keywords: *Biocidal, fipronil, pharmacovigilance, primate, toxication.*

Kanatlı İşletmelerinde Ektoparazit Enfestasyonları ve Mücadele Programları

Yavuz ALTUN, Ender YARSAN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Ticari kanatlı hayvan üretimi, artan Dünya nüfusunun ihtiyaçlarını karşılamak için uluslararası ölçekte hızla gelişmekte ve Türkiye’de bu gelişmelere en kısa sürede uyum göstermektedir. Böylesine geniş ölçekli işletmelerde özellikle ektoparazitler doğrudan veya vektör olarak çok büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu kayıpları önlemenin en rasyonel yolu ise biyogüvenlik talimatlarına eksiksiz uyulması ve bunla birlikte etkili ve güncel dezenfeksiyon programlarının uygulanmasıdır.

Kanatlı hayvan işletmelerinde pest kontrol yöntemleri üç kategoriye ayrılabilir: Kültürel, biyolojik ve kimyasal. Kültürel yöntemler mücadele programlarının temelini oluşturur. Biyogüvenlik, atık yönetimi, ekipman yönetimi ve barınak yönetimi (öncelikle nem ve hava akımı kontrolü) şeklinde değerlendirilebilir. Biyolojik kontrolde iki temel yaklaşım vardır: zaten mevcut olan doğal düşman popülasyonlarının teşvik edilmesi veya periyodik uygulamalar ile bunların artırılması. Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde haşere, pest ve kemirgen zararlılarının kontrolü için kimyasalların kullanımı, alternatif uygulamaların olmaması durumunda tercih edilir ve sıklıkla yapılan uygulamalardır. Barınak/kümes, gübre, çöp ve kuşlara yönelik yaygın olarak kullanılan pestisitler/böcek öldürücüler şunlardır: karbaril, tetraklorinfos, diklorvos, sifulutrin, fenvalerat, lambda-sihalothrin, klorpirifos ve ciromazin. Metomil yaygın olarak sineklerle mücadelede kullanılır. Hastalık kontrolü için dezenfektanların kullanımı da sürüler için standart bir uygulamadır. Pestisitlerin ve dezenfektanların kombine şekilde kullanımı çoğu zaman uygulama kolaylığı sağlaması için ve işçilik maliyetlerini azaltmak için tercih edilir.

Anahtar kelimeler: Ektoparazit, enfestasyon, kanatlı, kümes, mücadele.

Ectoparasite Infestations and Control Programs In Poultry Companies

Yavuz ALTUN, Ender YARSAN

Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pharmacology and Toxicology,
ANKARA

Commercial poultry production is rapidly growing on an international scale to meet the needs of the growing world population and Turkey are in agreement as soon as possible to these developments. In such large-scale enterprises, especially ectoparasites cause enormous economic losses, either directly or as vectors. The most rational way to prevent these losses is to follow the biosafety instructions in full and to implement effective and up-to-date disinfection programs.

Methods for controlling pests in poultry production may be categorized into three categories: Cultural, biological, and chemical. Cultural methods are basic to any control program. Included are biosecurity, waste management, equipment management, and housing management (primarily control of moisture and airflow). There are two basic approaches to biological control: the encouragement of the populations of natural enemies already present or augmentation through periodic releases. Applications of chemicals for control of arthropod and rodent pests in poultry production systems is common and often necessary in the absence of alternatives. Insecticides commonly used for applications to the structure, manure, litter and birds (depending on label registrations) are carbaryl, tetrachlorvinphos, dichlorvos, cyfluthrin, fenvalerate, lambda-cyhalothrin, chlorpyrifos, and cyromazine. Methomyl is commonly used in fly baits. Use of disinfectants for disease control is a standard procedure between flocks. Mixing insecticides and disinfectants in one application is often done for convenience and to reduce labour costs.

Keywords: *Control, ectoparasite, infestation, poultry, poultry house.*

Asetilkolinin Glioblastoma Hücrelerinde Hücre Canlılığına Etkisi

Yeliz KAYA, Gökem KISMALI, Soner CENGİZ, Tevhide SEL

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA

Asetilkolin, kolin ve asetilkoenzim A'dan sentezlenmektedir ve sinapslarda nörotransmitter olarak görev alır. Bunun dışında önemli bir fonksiyonu da embriyonal dönemde morfogeneizde rol oynamasıdır. Asetilkolin inaktivasyonu kolinesterazlarca sağlanmaktadır. Bazı kanser türlerinde embriyonal kolinerjik sistemin aktive olduğu ve anormal hücre çoğalmasının bir göstergesi olduğu bildirilmiştir. Çoğu kanser türlerindeki yüksek kolinesteraz aktivitesi tümör hücrelerinin diferensiyasyonuna bağlanmıştır. Bu çalışmada asetilkolinin glioblastoma hücrelerinde canlılığa etkisi araştırılmıştır. Glioblastoma hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) tahlili ile değerlendirilmiştir. F98 glioblastoma hücre hattı 100 µl DMEM ortamı içinde 96 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına 50.000 hücre/ml yoğunluğunda ekilmiştir. Hücreler asetilkolin klorid ile muamele edilmiştir (0.1, 1, 10, 100 ve 200 µM) ve 24, 48 ve 72 saatlik inkubasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkubasyondan sonra ACh, glioblastoma hücre büyümesini doza bağlı olarak inhibe etmektedir. 24 saatte görülen antiproliferatif etki 48 ve 72. saatlerde gözlenmemiştir. 48 ve 72 saatlik inkübasyonlardan sonra, düşük ACh konsantrasyonlarında F98 hücrelerinin hücre proliferasyonunu azaltmaktadır. Ancak yüksek ACh konsantrasyonları, F98 hücrelerinin hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Bu sonuçlar, asetilkolinin, glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, söz konusu yolları belirlemek için daha fazla çalışma gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolin, glioblastoma, hücre canlılığı

The effects of Acetylcolin on the Cell Viability in Glioblastoma Cells

Yeliz KAYA, Gökem KISMALI, Soner CENGİZ, Tevhide SEL

Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, ANKARA

Acetylcolin (ACh) is synthesized from colin and acetylcoA, serves as a neurotransmitter in synaps and also has an important function in morphogenesis in embryonic period. Acetylcholine inactivation in the synapses are provided by cholinesterases. It has been reported that the embryonal cholinergic system is activated in some types of cancer and is an indicator of abnormal cell proliferation. The high cholinesterase activity in many cancer types has been linked to the differentiation of tumor cells. In this study, the effect of acetylcolin on the cell viability in glioblastoma cells were investigated. Glioblastoma cell viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. F-98 glioblastoma cell line was seeded at a density of 50.000 cell/ml per well in 96 well plates in 100 µL medium DMEM. The cells were treated with acetylcolin chloride (0.1, 1, 10, 100, 200 µM) and incubated for 24, 48 and 72 hours. After 24h incubation, ACh inhibits glioblastoma cell growth in a dose dependent manner. The antiproliferative effect seen at 24 h was not observed at 48 and 72 h. After 48 and 72 h incubations, at low concentrations of ACh decrease cell proliferation of F98 cells. But high concentrations of Ach increase cell proliferation of F98 cells. These results suggest that acetylcolin can inhibit the proliferation of glioblastoma cells. However, further study is necessary to identify the pathways involved.

Keywords: Acetylcolin, cell viability, glioblastoma.

L-Karnitin ve Magnezyumun Deneysel Diyabet Oluşturulan Ratların Dokularında Oksidatif Stres ile Sitokinler Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Meryem ŞENTÜRK¹, Meryem EREN¹, Zeynep SOYER SARICA²

¹Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, KAYSERİ

²Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hakan Çetinsaya Deneysel Ve Klinik Araştırma Merkezi, KAYSERİ

Bu çalışmada, deneysel diyabet oluşturulmuş ratlarda L-karnitin ve magnezyumun (Mg) doku malondialdehit (MDA), 8-OHdG ve sitokin (TNF α , IL-6) düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Seksen adet Wistar albino erkek rattan elde edilen karaciğer ve böbrek dokuları kullanılmıştır. Hayvanlar, her biri 10'ar adetten oluşan 8 çalışma grubuna ayrılmıştır: 1. grup kontrol olarak; 2. grup 50 mg/kg (canlı ağırlık) i.p. olarak STZ verilen; 3. grup 125 mg/kg (canlı ağırlık)/gün MgSO₄ şeklinde Mg verilen; 4. grup 300 mg/kg (canlı ağırlık)/gün L-karnitin verilen; 5. grup; 125 mg/kg (canlı ağırlık)/gün Mg + 300 mg/kg (canlı ağırlık)/gün L-karnitin verilen; 6. grup 50 mg/kg i.p. olarak STZ + 125 mg/kg (canlı ağırlık)/gün Mg verilen; 7. grup 50 mg/kg i.p. olarak STZ + 300 mg/kg (canlı ağırlık)/gün Lkarnitin verilen; 8. grup 50 mg/kg i.p. olarak STZ + 125 mg/kg (canlı ağırlık)/gün Mg + 300 mg/kg (canlı ağırlık)/gün L-karnitin dört hafta verilmiştir. Karaciğer ve böbrek MDA, 8- OHdG, TNF- α ve IL-6 düzeyleri yönünden kontrol grubu ile Mg, karnitin ve Mg+karnitin grupları arasında istatistiki önemde bir fark belirlenmemiştir. En yüksek MDA, 8-OHdG, TNF- α ve IL-6 düzeyleri sadece diyabet oluşturulan grupta saptanmıştır. Diyabetli hayvanlara hem Mg'un hem de karnitin'in ayrı ayrı veya kombine verilmesi ile diyabete bağlı artan lipid peroksidasyonu, DNA harabiyeti ve sitokin düzeyleri istatistiki önemde azalma göstermiştir. Sonuç olarak Mg ve karnitin, özellikle kombine şekilde, antidiyabetik etkilere sahip olabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, L-karnitin, magnezyum, oksidatif stres, sitokinler

The Effects of L-Carnitine and Magnesium on Oxidative Stress and Cytokines in Experimental Diabetic Rats

Meryem ŞENTÜRK¹, Meryem EREN¹, Zeynep SOYER SARICA²

¹Erciyes University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, KAYSERİ

²Erciyes University Experimental Research and Application Center, KAYSERİ

In this study evaluated the effects of L-carnitine and magnesium (Mg) on tissue malondialdehyde (MDA), 8-OHdG and cytokines (TNF α , IL-6) levels in experimental diabetes in rats. Eighty Wistar albino rats were divided into eight groups of ten. The groups received the following treatment: group 1: control group; 2 ml distilled water (by gavage), group 2: 50 mg/kg (b.w.) i.p. STZ, group 3: 125 mg/kg (b.w.) Mg, group 4: 300 mg/kg (b.w.) L-carnitine, group 5: 125 mg/kg (b.w.) Mg +300 mg/kg (b.w.) L-carnitine, group 6: 50 mg/kg (b.w.) STZ +125 mg/kg (b.w.) Mg, group 7: 50 mg/kg (b.w.) STZ +300 mg/kg (b.w.) L-carnitine and group 8: 50 mg/kg (b.w.) STZ +125 mg/kg (b.w.) Mg+300 mg/kg (b.w.) L-carnitine was administered for four weeks. There was no statistically significant difference between control group and Mg, carnitine and Mg + carnitine groups in terms of liver and kidney MDA, 8- OHdG, TNF- α and IL-6 levels. The highest levels of MDA, 8-OHdG, TNF- α and IL-6 were detected only in the diabetic group. Increased lipid peroxidation, DNA damage and cytokine levels due to diabetes, both individually or in combination with both Mg and carnitine, were significantly reduced in diabetic animals. As a result, it has been concluded that Mg and Lcarnitine may have antidiabetic effects, especially in combination.

Keywords: Cytokines, diabetes, L-carnitine, magnesium, oxidative stress

Tuz Yardımlı Sıvı-Sıvı Özütleme Yöntemi Kullanılarak Sütte Makrosiklik Lakton Grubu Antihelmintik İlaçların Çoklu Kalıntılarının Belirlenmesi İçin Hızlı ve Duyarlı Bir HPLC Analiz Yöntemi

Cengiz GÖKBULUT, Büşra ASLAN, Oğuzhan KORKUT, Elif AKSÖZ

Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji A.D.

Makrosiklik lakton grubu antiparaziter ilaçlar (abamektin, doramektin, eprinomectin, ivermectin ve moksidektin) düşük dozlarda iç ve dış parazitlere etkili olmaları, geniş sağaltım endeksleri ve uzun süreli etkileri nedeniyle hayvanlarda paraziter enfeksiyonların tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardır. Bu bileşikler yüksek lipofilik özellikleri nedeniyle hayvan vücudunda uzun süre kalarak süt gibi hayvansal ürünlerde laktasyon döneminde yüksek yoğunluklara ulaşmaktadır. Bu araştırmanın amacı, makrosiklik laktonların sütteki çoklu kalıntılarının belirlenmesi için HPLC kullanılarak hızlı, kolay ve duyarlı bir kromatografik analiz yöntemi geliştirmektir. 1 gr süt 15 ml kapaklı plastik tüplere (6 adet) konularak yoğunlukları 0, 0,5, 1, 5, 10 ve 50 ppb olacak şekilde 50 µl, ivermectin, doramektin, abamektin, moksidektin ve eprinomectin içeren analitik standart karışımı ilave edilerek çoklu kalıntı oluşturuldu. Sonrasında her tüpe 2 ml ACN ilave edilerek 1 dak. vortekslenildi ve proteinlerin çökmesi için 5000 rpm’de 5 dak. santrifüj edildi. Üstteki sıvı kısım alınarak her birine 0,4 gr anhidroz sodyum sülfat ve 0,2 gr sodyum klorür eklenerek 1 dak. vortekslenildi ve 5000 rpm’de 5 dak. santrifüj edildi. Üst kısımda oluşan organik faz vakum yoğunlaştırıcıda uçuruldu. Sonrasında tüplere 0,1 ml ACN eklenerek 15 saniye vortekslenildi. Türevlendirmek amacı ile üzerine 0,1 ml N-metilimidazol eklenerek 15 saniye vortekslenildi. Sonrasında üzerine 0,15 ml trifloroasetik asit anhidrit ve 0,05 ml glasiyal asetik asit konulup karıştırıldıktan sonra 60°C’lik etüvde 20 dak. bekletildi. Soğutmayı takiben 50 µl analiz için HPLC’ye uygulandı. HPLC analizlerinde C18 kolon, mobil faz olarak asetonitril-metanol-H₂O (59:39:2), akış hızı 1 ml/dak. (izokratik), kolon ısı 60°C’de flüoresans detektör kullanılarak analiz 12 dak. tamamlandı. Analiz tespit limitleri, 0,05-0,07 ppb, belirleme limitleri de 0,15-0,21 ppb arasında belirlendi. Analizi yapılan tüm ilaçlar için geri alım oranları %78-104, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik varyasyon katsayıları da %1,05-8,16 arasında hesaplandı. Geliştirilen ve geçerli kılınan bu yöntem hızlı, ucuz ve duyarlı olup sütte makrosiklik lakton grubu antihelmintiklerin çoklu kalıntı analizi için kullanılabilir niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Endektositler, HPLC, kalıntı, makrosiklik laktonlar, süt.

A Fast and Sensitive HPLC Method for Determination of Multiple Residues of Macrocytic Lactone Anthelmintic Drugs in Milk Using Salt Assisted Liquid-Liquid Extraction

Cengiz GÖKBULUT, Büşra ASLAN, Oğuzhan KORKUT, Elif AKSÖZ

Balıkesir University Institute of Health Sciences, Department of Pharmacology and Toxicology,
BALIKESİR

Macrocytic lactones (abamectin, doramectin, eprinomectin, ivermectin and moxidectin) are the most commonly used for the treatment of parasitic infections in animals because of their low mammalian toxicity and higher efficacy against internal and external parasites at low dose levels. Furthermore, due to their high lipophilic properties, these compounds remain in the animal body for a long time and reach high levels during lactation in animal products such as milk. The aim of this study was to develop a fast, easy and sensitive chromatographic method using an HPLC for the determination of multiple residues of macrocytic lactones in milk. 1 g milk was added in 15 ml plastic tubes (6 tubes) and spiked with 50 µl standard mixture of abamectin, doramectin, eprinomectin, ivermectin and moxidectin to reach the following final concentrations: 0, 0,5, 1, 5, 10, 50 ppb. Subsequently, 2 ml ACN was added, vortexed for 1 min. and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to another tube. 0,4 g of anhydrous sodium sulphate and 0,2 g of sodium chloride were added and vortexed for 1 min and then centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The upper organic phase was transferred to a glass tube and evaporated in a vacuum concentrator. Then, 0,1 ml ACN was added to the tubes and vortexed for 15 sec. 0,1 ml N-methylimidazole was added and vortexed 15 sec. Then 0,15 ml trifluoroacetic acid and 0,05 ml glacial acetic acid were added and vortexed for derivatization. The mixture was incubated at 60°C in an oven for 20 min. After cooling, 50 µl was injected into the HPLC system. The mobile phase was a mixture of acetonitrile-methanol-H₂O (59:39:2) and pumped through the C18 column at 1 ml/min flow rate. The samples were processed on a computerized HPLC system comprising a fluorescence detector. The limits of detection were 0,5-2,0 ppm and limits of quantification were 1,5-6,0 ppm. The limits of detections were 0,05-0,07 ppm and the limits of quantifications were 0,15-0,21 ppm. The recovery rates for all molecules were 78-104% and intra-day and inter-day laboratory reproducibility coefficients were calculated between 1,05-8,16%. This developed and validated method is fast, cheap and sensitive and can be used for multiple residue analysis of macrocytic lactones in milk.

Keywords: Endectocides, HPLC, residue, macrocytic lactones, milk.

**Tuz Yardımlı Sıvı-Sıvı Özütleme Yöntemi Kullanılarak Sütte Benzimidazol Grubu
Antihelmintik İlaçların Çoklu Kalıntılarının Belirlenmesi İçin Hızlı ve Duyarlı Bir HPLC Analiz
Yöntemi**

Cengiz Gökbülüt, Büşra Aslan, Elif Aksöz, Oğuzhan Korkut

Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji A.D.

İlaçların bilinçsiz ve aşırı kullanımı hayvanların yenilebilir dokularında veya ürünlerinde ilaç kalıntısına neden olmakta ve bu durum tüketiciler için potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Dolayısıyla süt gibi hayvansal ürünlerde ilaç kalıntılarının izlenmesi ve gıda güvenliğinin sağlanabilmesi için hızlı ve güvenilir analitik yöntemler gerekmektedir. Bu araştırmanın amacı, benzimidazol grubu antihelmintik ilaçların sütteki çoklu kalıntılarının belirlenmesi için HPLC kullanarak hızlı, kolay, ucuz, etkili ve güvenilir bir kromatografik analiz yöntemi geliştirmektir. Çalışmada, bir inekten elde edilen 500 gr çiğ süt kullanıldı. 1 gr süt 15 ml kapaklı plastik tüplere (6 adet) konularak yoğunlukları 0, 10, 25, 50, 100, 250 ppm olacak şekilde 50 µl, 12 adet benzimidazol grubu antihelmintik ilaç ve metabolitlerini (albendazol, amino albendazol, albendazol sülfon, albendazol sülfoksit, tiabendazol, oksibendazol, oksfendazol, mebendazol, fenbendazol, triklabendazol, triklabendazol sülfon ve triklabendazol sülfoksit) içeren analitik standart karışımı ilave edilerek çoklu kalıntı oluşturuldu. Sonrasında her tüpe 2 ml ACN ilave edilerek 1 dakika boyunca vortekslendi ve proteinlerin çökmesi için 10000 rpm’ de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Sıvı kısım alınarak başka bir 15 ml’lik tüpe aktarıldı. Tüplere 0,4 gr anhidroz sodyum sülfat ve 0,2 gr sodyum klorür eklenerek 1 dakika boyunca vortekslendi ve 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Üst kısımda oluşan organik faz cam tüplere aktararak vakum yoğunlaştırıcıda uçuruldu. Sonrasında tüplere 100 µl dimetilsülfoksit ile 200 µl mobil faz koyularak 1 dakika vortekslendi ve analiz için 50 µl HPLC’ ye enjekte edildi. HPLC analizlerinde C18 kolon, mobil faz olarak metanol: H₂O (25:75), akış hızı 1 ml/dak. (gradient), kolon ısı 60°C’de ve seri bağlanan DAD ile flüoresans detektör kombinasyonu kullanılarak analiz 26 dakikada tamamlandı. Analiz tespit limitleri, 0,5-2,0 ppm, belirleme limitleri de 1,5-6,0 ppm arasında belirlendi. Analizi yapılan tüm ilaçlar ve metabolitleri için geri alım oranları %78-104, gün içi ve günler arası laboratuvar tekrarlanabilirlik varyasyon katsayıları da %1,12-9,35 arasında hesaplandı. Geliştirilen ve validasyonu yapılan bu yöntem hızlı, ucuz ve duyarlı olup sütte benzimidazol antihelmintiklerin çoklu kalıntı analizi için kullanılabilir niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Benzimidazol antihelmintikler, HPLC, kalıntı, süt.

A Fast and Sensitive HPLC Method for Determination of Multiple Residues of Benzimidazole Anthelmintic Drugs in Milk Using Salt Assisted Liquid-Liquid Extraction

Cengiz Gökbulut, Büşra Aslan, Elif Aksöz, Oğuzhan Korkut

Balıkesir University Institute of Health Sciences, Department of Pharmacology and Toxicology,
BALIKESİR

Unconscious and excessive use of drugs causes drug residues in the edible tissues or products of animals and this poses a potential risk to consumers. Therefore, fast and reliable analytical methods are needed to monitor drug residues in animal products such as milk and ensure food safety. The aim of this study was to develop a fast, easy, inexpensive, effective and reliable chromatographic method using an HPLC for the determination of multiple residues of benzimidazole anthelmintics in milk. In this study, 500 g raw milk obtained from a cow was used. 1 g milk was placed in 15 ml plastic tubes (6 pieces) and spiked with 50 μ l standard mixture of 12 benzimidazole anthelmintic drugs and metabolites (albendazole, amino albendazole, albendazole sulfone, albendazole sulfoxide, thiabendazole, oxbendazole, oxfendazole, mebendazole, fenbendazole, triclabendazole, triclabendazole sulfone and triclabendazole sulfoxide) to reach the following final concentrations: 0, 10, 25, 50, 100, 250 ppm. Subsequently, 2 ml ACN was added to each tube and vortexed for 1 minute and centrifuged at 10000 rpm for 5 minutes to allow the proteins to precipitate. The supernatant was transferred to another tube. 0,4 g of anhydrous sodium sulphate and 0,2 g of sodium chloride were added to each tube and vortexed for 1 minute and then centrifuged at 10000 rpm for 5 minutes. The upper organic phase was transferred to glass tube and evaporated in a vacuum concentrator. Dry residue was resuspended with 100 μ l dimethyl sulfoxide and 200 μ l mobile phases and placed in ultrasonic bath for 1 minute. Finally, 50 μ l of this solution was injected into the HPLC system. The mobile phase was a mixture of methanol-H₂O (25:75) and pumped through the C18 column at 1 ml/min flow rate. The samples were processed on a computerized HPLC system comprising a fluorescence detector combination with a DAD detector. The limits of detection were 0,5-2,0 ppm and limits of quantification were 1,5-6,0 ppm. The recovery rates for all molecules were 78-104% and intra-day and inter-day laboratory reproducibility coefficients were calculated between 1,12-9,35%. Good linearity, sensitivity and selectivity were obtained with the proposed method, fulfilling the current legislation for the residue analysis. This method can be used for determination of the multiple residues of benzimidazole anthelmintics in milk.

Keywords: *Benzimidazole anthelmintics, HPLC, residue, milk.*

Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda *Achillea Millefolium* (Civanperçemi)'un DNA Koruyucu Etkisi

¹Kübra Güney KAYA, ²Selim SEKKİN

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, AYDIN

² Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, AYDIN

*Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17036 proje numarası ile desteklenmiştir

Achillea millefolium L. (Civanperçemi) olarak adlandırılan bitki yaraların tedavisi, kan akışının durdurulması, soğuk algınlığı, ateş, böbrek hastalıkları ve menstrual ağrı gibi geniş bir hastalık yelpazesinin tedavisi için kullanılmıştır. CP bitkisinin diyabet üzerine olan etkisine ilişkin çalışmalar yapılmış olmasına rağmen HbA_{1c}, oksidatif stres ve DNA hasarına ilişkin bir çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışmada CP yağının antidiyabetik, antioksidan ve DNA hasarını koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla 35 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Deneysel diyabet oluşturmak için 50 mg/kg streptozotosin periton içi yolla tek doz uygulandı. Sıçanlar diyabet grubu (D, n=9), diyabet-civanperçemi grubu (D-CP, n= 8), kontrol-civanperçemi grubu (K-CP, n=9) ve kontrol grubu (K, n=9) olmak üzere dört gruba ayrıldı. CP ve mısır yağı sıçanlara 400 mg/kg dozda, 28 gün süreyle gavaj ile uygulandı. Sıçanlar çalışmanın 28. gününde anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Kalpten alınan kan örnekleri HbA_{1c} analizi, DNA hasarı (Comet assay) ve glukoz parametresi için kullanıldı. Sıçanlardan oksidan (malondialdehit (MDA)) ve antioksidan (süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH)) parametreleri için karaciğer doku örneği alındı. Diyabetik gruplar arasında vücut ağırlığı, DNA hasarı, plazma glukoz düzeyi, SOD ve GSH değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmezken; HbA_{1c} değeri CP uygulanan diyabetik grupta (D-CP), CP uygulanmayan diyabetik gruba (D) göre düşük (P<0,001); MDA düzeyi ise yüksek (P<0,001) bulundu. Sonuç olarak civanperçemi yağının kan şekeri düzeyi üzerine etkisi tespit edilse de diğer parametreler üzerine etkisi bulunamadı.

Anahtar Kelimeler: *Achillea millefolium*, antioksidan, civanperçemi, comet assay, diyabet, oksidan, streptozotosin.

DNA Protective Effect of *Achillea Millefolium* (Yarrow) in Diabetic Rats Treated by Streptozotocin

¹Kübra Güney KAYA, ²Selim SEKKİN

¹Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Veterinary Pharmacology and Toxicology Department, AYDIN

²Aydın Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pharmacology and Toxicology, AYDIN

* This thesis was supported by Aydın Adnan Menderes University Scientific Research Projects Unit with project number VTF-17036

Plant wounds called *Achillea millefolium* L. have been used to treat a wide range of diseases such as stopping blood flow, colds, fever, kidney diseases and menstrual pain. Although, there have been studies on the effect of CP plant on diabetes, no studies have been found on HbA1c, oxidative stress and DNA damage. The aim of this study was to investigate the antidiabetic, antioxidant and DNA damage protective effects of CP fat. For this purpose, 35 Wistar albino male rats were used. A single dose of 50 mg / kg streptozotocin was administered intraperitoneally to induce experimental diabetes. Rats were diabetes group (D, n = 9), diabetes-yarrow group (D-CP, n = 8), control-yarrow group (K-CP, n = 9) and control group (K, n = 9) were divided into four groups. CP and corn oil were administered to rats at a dose of 400 mg / kg by gavage for 28 days. Rats were sacrificed by cervical dislocation under anaesthesia on the 28th day of the study. Blood samples from the heart were used for HbA1c analysis, DNA damage (Comet assay) and glucose parameter. Liver tissue samples were taken from rats for oxidant (malondialdehyde (MDA)) and antioxidant (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH)) parameters. There was no significant change in body weight, DNA damage, plasma glucose level, SOD and GSH values between diabetic groups. HbA1c value was lower in CP-treated diabetic group (D-CP) than in non-CP-treated diabetic group (D) (P <0.001); MDA level was high (P <0.001). As a result, the effect of yarrow oil on blood sugar level was not found to affect other parameters.

Keywords: *Achillea millefolium*, antioxidant, comet assay, diabetes, oxidant, streptozotocin, yarrow

İndometazin ile Oluşturulan Gastrik Ülser Modelinde Oleuropeinin DNA Hasarı ve Oksidatif Stres Üzerindeki Etkisi

Adem YAVAŞ¹, Selim SEKKİN²

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, AYDIN

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, AYDIN

* Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17035 proje numarası ile desteklenmiştir

Nonsteroid anti-inflamatuar ilaçların (NSAİİ) yaygın kullanımı gastrik ülser ve üst gastrik sistem kanamaları gibi gastrointestinal yan etkilere sahiptir. Oleuropein Akdeniz diyetinde sıklıkla tüketilen antioksidan bir maddedir. Bu çalışmada oleuropeinin gastrik koruyucu etkisini araştırmak için indometazin ile oluşturulan ülser modeli kullanılmıştır. Oleuropein aktivitesinde yer alan mekanizma için büyüme faktörleri (EGF, EGFR, VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2) ve DNA hasarı analiz edilmiştir. Sıçanlar kontrol grubu, ülser grubu (25mg/kg indometazin), oleuropein (12 mg/kg) grubu, ön tedavi lansoprazol (30 mg/kg) alan ülser grubu (referans anti-ülser ilaç), ön tedavi oleuropein (6-12-18 mg/kg) alan ülser grubu olmak üzere yedi gruba ayrıldı. Sonuçlar oleuropeinin (6 mg/kg-12mg/kg-18mg/kg) sırasıyla % 94.33, % 96.09 ve % 96.77 oranında anti-ülser etkisi olduğunu gösterdi. Oleuropein (18 mg/kg) uygulaması, diğer tedavi grupları ile karşılaştırıldığında, gastrik ülser grubunda % Tail DNA ve ortalama kuyruk momentini önemli ölçüde azalttı. Oleuropein (18 mg/kg) EGF, EGFR, VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2'nin mRNA ekspresyon seviyelerini arttırdı. Bulgularımız, oleuropeinin, sıçanlarda indometazinin neden olduğu gastrik ülserle karşı büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin ekspresyon seviyelerini koruyarak etkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Comet assay, Gastrik ülser, Oleuropein.

The Effect of Oleuropein on DNA Damage And Oxidative Stress in Gastric Ulcer Model with Indometazine

Adem YAVAŞ¹, Selim SEKKİN²,

¹Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Veterinary Pharmacology and Toxicology Department, AYDIN

²Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, AYDIN

* This thesis was supported by Aydın Adnan Menderes University Scientific Research Projects Unit with project number VTF-17035

The commonly use of Nonsteroid anti-inflamatuar drugs (NSAIDs) have gastrointestinal (GI) side effects such as gastric ulcer and upper GI bleeding. Oleuropein is an antioxidant compound commonly consumed in Mediterranean diet. In order to evaluate the gastroprotective effect of oleuropein, an indomethacin-induced ulcer model has been applied in this study. Growth factors (EGF, EGFR1, VEGF, VEGFR1 and VEGFR2) and DNA damage have been analyzed for the mechanism involved in oleuropein activity. Rats were allocated into a control group, an ulcer group indomethacin (25 mg/kg), an oleuropein (12 mg/kg) group, an ulcer group pretreated with lansoprazole (30 mg/kg) as a reference anti-ulcer drug, an ulcer group pretreated with different doses oleuropein (6-12-18 mg/kg). The result showed that oleuropein (6mg/kg-12mg/kg-18mg/kg) exhibited significantly anti-ulcer effect 94.33%, 96.09%, 96.77%, respectively. Oleuropein (18mg/kg) administration significantly decreased % Tail DNA and Mean Tail Moment in the gastric ulcer group, compared with the other treatment groups. Oleuropein (18mg/kg) increased mRNA expression levels of EGF, EGFR, VEGF, VEGFR1 and VEGFR2. Our results indicate that oleuropein may be effective against indomethacin-induced gastric ulcer in rats by maintaining expression levels of growth factors and receptors.

Keywords: Comet assay, Gastric ulcer, Oleuropein.

İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Patojen Bakterilerin Varlığının ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması

Selin ÇATIKOĞLU¹, Selim SEKKİN²

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye, selyncat@gmail.com

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye, ssekin@adu.edu.tr

* Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF 15030 proje numarası ile desteklenmiştir.

Üriner sistem enfeksiyonları medikal tedavi gerektirmesi ve çoğu antibiyotiğe direnç geliştirmiş hastane enfeksiyonlarına sebep olmasından dolayı dikkati çekmektedir. Üriner sistem enfeksiyon tedavisinde antibiyotik direnci önemli bir role sahiptir. Bu çalışmada Muğla/Marmaris yöresinde, idrar yolu enfeksiyonlarına (İYE) neden olan bakterileri ve antibiyotiklere olan direnç durumlarını belirlemeyi amaçladık. Çalışmada, Eylül 2015-Aralık 2015 tarihleri arasında çeşitli şikayetlerle hastanelere başvuran ve üriner enfeksiyon ön tanısıyla poliklinik hastalarından alınan 340 idrar örneğinin kültür sonuçları, üreyen bakteri çeşitleri ve duyarlılık testleri değerlendirildi. 134 örnekte bakteri üredi. En sık izole edilen bakteri %61,19 oranında *Escherichia coli* olarak saptandı. İYE'na neden olan *Escherichia coli* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde %63'ü ampisillin-sulbaktam, %59'u trimetoprim-sulfametoksazola, %48'i siprofloksasine, %34'ü seftiriaksona, %28'i gentamisine, %24'ü piperasilin-tazobaktam ve %6'sı ise imipeneme dirençli bulundu. Bölgemizdeki direnç profilinin periyodik olarak takibi önem taşımaktadır. Araştırmamızda elde edilen sonuçlar özellikle bölgemizdeki klinisyenlere tedavi aşamasında önemli ölçüde yol gösterecektir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik duyarlılık, idrar yolu enfeksiyonu, patojen bakteri.

Investigation of The Presence of Pathogenic Bacteria in Urinary Tract Infections and Their Antibiotic Susceptibilities

Selin ÇATIKOĞLU¹, Selim SEKKİN²

¹Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Veterinary Pharmacology and Toxicology Department, Aydın, Turkey, selyncat@gmail.com

²Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey, ssekkin@adu.edu.tr

* This thesis was supported by Aydın Adnan Menderes University Scientific Research Projects Unit with project number VTF 15030

Urinary Tract Infections (UTI) have attracted much attention since they are among the most common causes of nosocomially-acquired infections and require medical treatment. There is antibiotic resistance to most antibacterials which are used in the treatment of the disease. In this study, we aimed to determine the microorganisms that cause UTI and their antibiotic resistance rates in Muğla/Marmaris region. In this study, 340 urine specimen culture results, collected from patients in outpatient clinics who applied with various complaints and referred to the laboratory with preliminary diagnosis of urinary tract infections between September 2015 and December 2015, were evaluated. Antibiotic susceptibilities of 134 isolated bacteria were investigated. The most common bacteria was *Escherichia coli* (61.19%). When antibiotic susceptibilities were examined, *Escherichia coli* was resistant to ampicillin-sulbactam (63%), trimethoprim-sulfamethoxazole (59%), ciprofloxacin (48%), ceftiraxone (34%), Gentamycine (28%), Piperacillin-Tazobactam (24%) and Imipenem (6%). Regional antibiotic resistance patterns are important in treatment. It is important to investigate antibiotic resistance patterns periodically in our region. These results will be very instructive for the relevant clinicians about therapy specially for doctors in our region.

Keywords: Antibiotic Susceptibility, Pathogen Bacteria, Urinary Tract Infection.

Nanoteknoloji ve Veteriner Farmakoloji Alanında Kullanılması

Gül Banu ÇİÇEK BİDEÇİ

İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, KASTAMONU

Nanoteknoloji, hayatımızı birçok alanda etkileyebilecek hatta çığır açabilecek bir gelişmedir. Nano kelimesi, “bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri” olarak tanımlanır. Nanoteknoloji ise, maddenin 1 ile 100 nanometre boyutlarındaki davranışlarını anlama ve kontrol etme bilimidir. Nanoteknoloji birçok alanda kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin kullanıma sağlık, ilaç sanayi, tekstil, elektronik, otomotiv, gıda, boya gibi farklı sahalarda birçok ürünlerden örnekler bulunmaktadır. Sağlıkta kullanım alanı ise, oldukça fazla çeşitlilik göstermektedir. Kolaylaştırıcı bir teknoloji olarak veteriner hekimliğinde devrim potansiyeli taşımaktadır. Bu posterde nanoteknolojinin veteriner hekimlikte ve veteriner farmakolojide potansiyel kullanım alanı olabilecek konulara dikkat çekmek amaçlanmıştır.

Farmakoloji alanında nanoteknoloji; ilaç üretimi aşamalarında, ilaçların istenilen bölgeye etki etmesinde kullanılmaktadır. Araştırmalar sonucunda elde edilen nanotaşıyıcılar hastalıklı yapıya hedeflendirilen ilaçların taşınmasını sağlar. Nanopartikül araştırmalar sayesinde bugün birçok hastalığın teşhis ve tedavisi mümkün olmaktadır. Hayvancılıkta ve veterinerlikteki potansiyel uygulamalara örnek olabilecekler arasında hastalık teşhisi ve tedavisi uygulama sistemleri, üreme için yeni araçlar, hayvansal gıda ürünlerinin güvenliği, hayvan besleme verilebilir.

Araştırmalar, hedef hücrelerin aranması ve yok edilmesi için hayvanlara nanosel ve nanotüpelerin sokulmasının uygulanabilirliğini göstermiştir. Bu sistemlerin veteriner farmakoloji alanında uygulanması yakın gelecekte olabilir ve nanoteknoloji hayvan hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde değişim yaratabilir.

Anahtar kelimeler: Nanoteknoloji, Nanobiyoteknoloji, Veteriner Farmakoloji, Veteriner Hekimlik.

Nanotechnology and Using in Veterinary Pharmacology

Gül Banu ÇİÇEK BİDECI

District Directorate of Agriculture and Forestry, KASTAMONU

Nanotechnology is a development that can affect our lives in many areas, even groundbreaking. The word Nano is described as "one billionth of a physical size." Nanotechnology, on the other hand, is the science of understanding and controlling the behavior of matter in dimensions of 1 to 100 nanometers. Nanotechnology is used in many fields. There are examples of many products of fields such as health, pharmaceutical industry, textiles, electronics, automotive, food and paint. The use area in health is quite diverse. As a facilitator technology, it has the potential to revolutionize Veterinary Medicine. This poster is intended to draw attention to issues that may be potential uses of nanotechnology in veterinary medicine and veterinary pharmacology.

Nanotechnology in the field of Pharmacology, it is used in the production of drugs, the effect of drugs on the desired region. As a result of the research, nanocarriers agents provide the transport of drugs targeted to the diseased structure. Nanoparticle research makes it possible to diagnose and treat many diseases today.

Examples of potential applications in animal husbandry and veterinary medicine include disease diagnosis and treatment application systems, new tools for reproduction, safety of animal food products, animal nutrition.

Studies have demonstrated the feasibility of introducing nanoseles and nanotubes into animals to search and destroy target cells. Implementation of these systems in veterinary pharmacology may be in the near future and nanotechnology can create changes in the prevention and treatment of animal diseases.

Keywords: *Nanotechnology, Nanobiotechnology, Veterinary Pharmacology, Veterinary Medicine.*

Türkiye’de Tıbbi Bitkilerin Etnoveteriner Kullanımları

Ceren ANLAŞ, Ataman Bilge SARI, Tülay BAKIREL, Oya ÜSTÜNER

İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,
İSTANBUL

Yüzyıllardan beri yaygın olarak kullanılan etnoveteriner hekimlik uygulamaları, yüksek tedavi maliyetleri gibi modern tedavilerle ilgili sınırlamaların ortadan kaldırılması ve sağlık hizmetlerine erişimin kolaylaştırılması dahil olmak üzere, birçok hastalığın tedavisi için yeni olanaklar sunabilmektedir. Bu uygulamalar veteriner hekimlikte, geleneksel tıp sistemi kapsamında bitkilerin, mantarların, mikroorganizmaların ve minerallerin kullanımını içermektedir. Bunlar içerisinde, özellikle tıbbi bitkilerin kullanımı, etnoveteriner tıbbın önemli bir parçası olarak kabul edilmekte ve eski zamanlardan beri hayvan hastalıklarının önlenmesi ve kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel kullanımlarına ek olarak, Dünya Sağlık Örgütü de (WHO) etno-botanik ürünlerin hem veteriner hem de beşeri hekimlikte önemli bir rol oynadığını ve bu doğal ürünlerin kullanımının hayvan ve insan hastalıklarının kontrolünde oldukça etkili olduğunu vurgulamıştır. Ekolojik özellikleri ve coğrafi konumunun bir sonucu olarak Türkiye, 11.000'den fazla bitki türü ile oldukça zengin bir bitki örtüsüne sahiptir ve bunlardan yaklaşık 3.000'i endemik olarak kabul edilmektedir. Ülkemizde farklı farmakolojik aktiviteye sahip bitki türlerinin çeşitliliği, tıbbi bitkilerin özellikle geleneksel tıpta birinci basamak sağlık hizmeti olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu amaçla, başta gastrointestinal hastalıklar, cilt lezyonları ve paraziter enfeksiyonlar olmak üzere evcil hayvanlarda birçok hastalığın tedavisinde tıbbi bitkiler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bu bitkilerin, içerdikleri aktif bileşenlerin bireysel veya sinerjik etkilerinin bir sonucu olarak birçok hastalığın tedavisinde etkin rol oynayabilecekleri bilimsel olarak doğrulanmıştır. Bu kapsamda, ilgili çalışmada Türkiye'de hayvan hastalıklarının tedavisinde en sık kullanılan tıbbi bitkilerin gözden geçirilmesi ve geleneksel kullanımları hakkındaki güncel bilgilerin sunulması amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Etnoveteriner hekimlik, geleneksel tedavi, tıbbi bitkiler.

Ethnoveterinary Uses of Medicinal Plants in Turkey

Ceren ANLAS, Ataman Bilge SARI, Tülay BAKIREL, Oya USTUNER

Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-
Cerrahpasa, ISTANBUL

Ethnoveterinary medicine practices, which have been extensively used for centuries, can offer new possibilities for the treatment of many diseases, including eliminating limitations associated with modern therapies such as high treatment costs and facilitating access to the health care. These practices involve the use of plants, fungi, microorganisms and minerals in veterinary medicine, in the context of traditional medical system. Among them, especially the use of medicinal plants are known as an important part of ethnoveterinary medicine and have been extensively used for prevention and control of animal diseases since ancient times. In addition to their traditional uses, also the World Health Organization (WHO) has emphasized that ethno-botanical products have an important role both in veterinary and human medicine and the use of these natural products is very effective in the control of animal and human diseases. As a result of its ecological properties and geographical location, Turkey has very rich flora with more than 11.000 plant species and approximately 3.000 of them were regarded as endemic. In our country, the diversity of plant species which have different pharmacological activity enables the use of medicinal plants as a primary health care, especially in traditional medicine. For this purpose, medicinal plants have been widely used in the treatment of many disorders, mainly gastrointestinal diseases, skin lesions and parasitic infections in domestic animals. It has also been scientifically confirmed that these plants may play an effective role in the treatment of many diseases as a result of the individual or synergistic effects of the active ingredients they contain. In this scope, in the present study it was aimed to review the most commonly used medicinal plants in the treatment of animal diseases in Turkey and present current knowledges on their traditional uses.

Keywords: *Ethnoveterinary medicine, medicinal plants, traditional treatment*

Bazı Propolis Ekstraktlarının Antioksidan ve Antiradikal Aktivitelerinin Araştırılması

Hasan AYDIN

Adıyaman Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, ADIYAMAN

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından üretilen, bitkilerden toplanan balmumu ve reçineden oluşan, flavonoidler ve fenoliklerce zengin bir maddedir. Propolisin, geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı ve antioksidan biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada propolisin, su, etanol ve gliserol çözeltilerinde ekstraktlarının antioksidan ve antiradikal seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Muğla ili Köyceğiz bölgesinden toplanan propolis örneklerinden su, etanol ve gliserol ekstraktları elde edilmiştir. Ekstraktlarda antioksidan aktivite CUPRAC ve antiradikal aktivite 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) metoduyla tespit edilmiştir. Bulgular: Propolis, antioksidan aktivite bakımından etanol, su ve gliserol ekstraktları sırasıyla; $0,825 \pm 0,048$, $0,165 \pm 0,006$, $0,089 \pm 0,008$ mmol TR/ g kuru ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite de olduğu gibi antiradikal aktivite de (% inhibisyon) etanol ekstraktı ($94,224 \pm 0,245$) en yüksek olarak tespit edilmiştir. Su ve gliserol ekstraktlarının antiradikal aktiviteleri sırasıyla; $32,597 \pm 1,081$ ve $23,277 \pm 2,458$ olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada propolisin etanol ekstraktının diğer su ve gliserol ekstraktlarına göre daha yüksek antioksidan ve antiradikal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Antioksidan aktivite, Antiradikal aktivite, CUPRAC, DPPH, Propolis.

Investigation of Antioxidant and Antiradical Activities of Some Propolis Extracts

Hasan AYDIN

Adiyaman University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, ADIYAMAN

Propolis is a substance produced by honey bees (*Apis mellifera*), consisting of wax and resin collected from plants, rich in flavonoids and phenolics. Propolis is known to be used as traditional medicine in various diseases, and its antioxidant activity. The aim of this study was to determine the antioxidant and antiradical levels of propolis extracts in water, ethanol and glycerol solutions. Water, ethanol and glycerol extracts were obtained from propolis samples collected from Köyceğiz region of Muğla province. Antioxidant activity in extracts was determined by CUPRAC and antiradical activity by 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) method. Antioxidant activity of propolis in ethanol, water and glycerol extracts were found 0.825 ± 0.048 , 0.165 ± 0.006 , 0.089 ± 0.008 mmol TR/g as dry extract, respectively. Ethanol extract detected as the highest in both antioxidant and antiradical activities ($94.224 \pm 0.245\%$). Antiradical activity of water and glycerol extracts were identified as $32.597 \pm 1.081\%$ and $23.277 \pm 2.458\%$ respectively. **Conclusion:** In this study, it was found that propolis ethanol extract had higher antioxidant and antiradical activity than other water and glycerol extracts.

Keywords: Antioxidant activity, Antiradical activity, CUPRAC, DPPH, Propolis.

Didesildimetilamonyum kloridin Rat Duodenum, Jejunum ve İleum Düz Kasları Üzerine Etkilerinin Araştırılması*

Yunus Emre UZGUR¹, Ebru YILDIRIM², Begüm YURDAKÖK DİKMEN³

¹Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, KIRIKKALE

²Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KIRIKKALE

³Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

*Bu çalışma "Didesildimetilamonyum kloridin Rat Duodenum, Jejunum ve İleum Düz Kasları Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezden özetlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı DDAK' ın rat duodenum, jejunum ve ileum düz kasları üzerine etkilerini araştırmak; böylece olası oral bir maruziyette sindirim sistemi üzerine olan etkilerini değerlendirmektir. Deneylerde 5-6 aylık, 19 adet erkek Wistar albino sıçandan izole edilen 19' ar adet duodenum, jejunum ve ileum dokusu kullanılmıştır. İzole edilen duodenum, jejunum ve ileum kesitleri, içinde 10 ml tirod çözeltisi bulunan, 37°C' ye ayarlanmış izole organ banyosuna 1 g ön gerim ile asılmıştır. 1. Protokolde DDAK 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M kümülatif (birikimli) derişimlerde 5 dakika ara ile uygulanmıştır. 2. Protokolde 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ ve 10⁻³ M ACh uygulaması yapılmış (Kontrol grubu), daha sonra 3x10⁻⁷ M DDAK ile 15 dakika inkübe edilen dokuların üzerine 10⁻⁹-10⁻³ M ACh derişimleri uygulanmıştır. 3. Protokolde 1,71x10⁻⁵ M ACh (ACh' in EC₈₅ değeri) ile kasılma oluşturulan dokular üzerine 3 dk ara ile 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M DDAK kümülatif (birikimli) derişimlerde uygulanmıştır. Kontrol olarak 1,71x10⁻⁵ M ACh ile kasılma oluşturulan dokular üzerine 3 dk ara ile distile su uygulaması yapılmıştır. İlk protokolden elde edilen bulgular 10⁻⁵ M' dan başlayarak özellikle 10⁻⁴ M DDAK derişimde duodenum, jejunum ve ileumda % kasılmaların azaldığını göstermiştir. 2. Protokol sonuçlarında kontrol ve DDAK uygulamasının ACh derişimlerin % kasılma pD₂ ve E_{max} parametreleri arasında bir fark bulunamamıştır. 3. protolde ise 1,71x10⁻⁵ M ACh ile kasılma oluşturulan dokular üzerine 10⁻⁴ M DDAK' ın duodenum, jejunum ve ileumda oluşturduğu % gevşeme cevapları kontrol grubuna göre jejunum (P<0.01) ve ileumda (P<0.05) istatistiksel olarak önemli derecede yüksek bulunmuştur. Duodenum % gevşeme cevaplarında sayısal bir artış saptanmıştır (P> 0.05). Frekans değerleri ise DDAK verilen grupta kontrol grubuna göre jejunum ve ileumda sayısal olarak daha az olarak ölçülmüştür (P> 0.05). Sonuç olarak DDAK özellikle 10⁻⁴ M derişimde hem spontan kasılmaları hem de ACh ile oluşturulan kasılmaları azaltmıştır. DDAK' ın etkisi derişime bağlı olarak artmıştır ve jejunum ve ileumu daha fazla etkilemiştir.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolin, didesildimetilamonyum klorid, duodenum, ileum, in vitro, jejunum.

The Investigation Of The Effects Of Didecyldimethylammonium Chloride On The Smooth Muscle of Duodenum, Jejunum And Ileum In Rats *

Yunus Emre UZGUR¹, Ebru YILDIRIM², Begüm YURDAKÖK DİKMEN³

¹Kırıkkale University, Health Sciences Institute, KIRIKKALE

²Kırıkkale University, Veterinary Faculty, Department of Pharmacology and Toxicology, KIRIKKALE

³Ankara University, Veterinary Faculty, Department of Pharmacology and Toxicology, ANKARA

* This study is summarized from the thesis titled "The Investigation Of The Effects Of Didecyldimethylammonium Chloride On The Smooth Muscle of Duodenum, Jejunum And Ileum In Rats"

The aim of this study was to investigate the effects of DDAC on rat duodenum, jejunum and ileum smooth muscles; thus to evaluate the effects on the digestive tract in a possible oral exposure. Totally 19 duodenum, jejunal and ileum tissues isolated from 19 male Wistar albino rats, which were 5-6 months old, were used in the experiments. Isolated duodenum, jejunum and ileum sections were suspended with 1 g of pre-tension in an isolated organ bath set at 37 °C with 10 ml thyroid solution. In Protocol 1, DDAC was applied at cumulative concentrations of 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} at 5 minute intervals. In Protocol 2, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} ACh was applied (Control group) in a cumulative manner, then 10^{-9} - 10^{-3} M ACh concentrations were applied on the tissues incubated with 3×10^{-7} M DDAC for 15 minutes. In the protocol 3, cumulative 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M DDAC concentrations were applied at 3 minute intervals on the tissues precontracted with $1,71 \times 10^{-5}$ M ACh (EC_{85} value of ACh). As a control, distilled water was applied at 3 min intervals on the tissues which were contracted with $1,71 \times 10^{-5}$ M ACh. Findings obtained from the first protocol showed that DDAC decreased % contractions in duodenum, jejunal and ileum, starting from 10^{-5} M and especially at 10^{-4} M concentration. No significant difference was found between % contraction, pD₂ and E_{max} parameters of ACh concentrations of control and DDAC application. In the third protocol, % relaxation responses of DDAC in duodenum, jejunum and ileum on tissues precontracted with $1,71 \times 10^{-5}$ M ACh were found to be statistically higher in jejunum ($P < 0.01$) and ileum ($P < 0.05$) compared to control group. There was a numerical increase in duodenum % relaxation responses ($P > 0.05$). Frequency values were measured to be insignificantly less in jejunum and ileum in the DDAC group than in the control group ($P > 0.05$). In conclusion, DDAC decreased both spontaneous contractions and ACh induced contractions, especially at 10^{-4} M concentration. The effect of DDAC increased depending on the concentration used, and DDAC had more effect on jejunum and ileum rather than duodenum.

Keywords: *Acetylcholine, didecyldimethylammonium chloride, duodenum, ileum, in vitro, jejunum*

Gamitromisinin *In Vitro* Rat Uterus Düz Kası Üzerine Etkisi*

Tolga TRAK, Ebru YILDIRIM², Begüm YURDAKÖK DİKMEN³

¹Kalecik İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, ANKARA

²Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KIRIKKALE

³Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

*Bu çalışma “Gamitromisinin *In Vitro* Rat Uterus Düz Kası Üzerine Etkisi” başlıklı tezden özetlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı, gamitromisinin rat uterus düz kasları üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Deneylerde 200-250 gram (g) ağırlığında, 4-5 aylık 16 dişi Wistar sıçandan izole edilen 44 uterus dokusu kullanıldı. Öncelikle anestezi edilen ratların uterusları izole edildi, izole organ banyosu iletilisine bağlandı ve izole uterusu 1 g ön gerim uygulandı. Ön denemelerde gamitromisin 10^{-7} M, 10^{-6} M ve 10^{-5} M derişimlerde denendi ve çalışmada kullanılan derişim 10^{-5} M olarak seçildi. I. grup 10 dk. kontrol kasılması elde edildikten sonra yine 10 dk. 10^{-5} M gamitromisin ile muamele edildi. II. grupta ise 2,5 mlU/mL oksitosin kasılması üzerine 10^{-5} M gamitromisinin etkisi değerlendirildi. III. gruba 10^{-8} M atropin inkübasyonunun üstüne 10 dk. süre ile 10^{-5} M gamitromisin denendi. IV. grupta 0,625µg kloprostenol 10 mL izole organ banyosuna uygulandı 10 dk. ardından, yine 10^{-5} M gamitromisin uygulaması 10 dk. boyunca yapıldı. Gamitromisinin çözücüsü olarak kullanılan dimetilsulfoksit (DMSO) için de aynı protokoller aynı deneme gruplarında uygulandı. Çalışmanın verilerini değerlendirirken oluşan kasılmaların frekans, ortalama amplitüd ve pik amplitüd değerleri karşılaştırıldı. Çalışmanın 1. protokol uygulaması değerlendirildiğinde; gamitromisin (10^{-5} M) uygulamasının frekans değeri istatistiksel olarak kendinden önceki spontan kasılmaların frekans değerinden büyük bulundu ($P \leq 0,01$). Ancak DMSO ve 10^{-5} M gamitromisin uygulamasının frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ($P > 0,05$). Diğer protokol gruplarının verileri de; frekans, ortalama amplitüd ve pik amplitüd yönünden değerlendirildiğinde; istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($P > 0,05$). Alınan sonuçların, gamitromisinin kimyasal formundan ve kullanılan derişiminden kaynaklandığı düşünöldü. Gamitromisinin uterus düz kası üzerine olan etkilerini ve olası mekanizmasını tam olarak değerlendirebilmek için, daha yüksek gamitromisin derişimlerinin çalışılması ve mümkünse farklı agonist ve antagonist maddelerle yapılacak daha ileri çalışmalar gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Gamitromisin, *in vitro*, oksitosin, rat, uterus düz kası

The Effect of Gamithromycin on Smooth Muscle of Rat Uterus *In Vitro*

Tolga TRAK¹, Ebru YILDIRIM², Begüm YURDAKÖK DİKMEN³

¹ Kalecik District Directorate of Agriculture and Forestry, ANKARA

²Kırıkkale University, Veterinary Faculty, Department of Pharmacology and Toxicology, KIRIKKALE

³Ankara University, Veterinary Faculty, Department of Pharmacology and Toxicology, ANKARA

* This study is summarized from the thesis titled "The Effect of Gamithromycin on Smooth Muscle of Rat Uterus *In Vitro*"

The aim of this study is to investigate the effect of gamithromycin on rat uterus smooth muscles. Forty-four uterine tissues isolated from 16 female Wistar rats weighing 200-250 grams were used in the experiments. First of all, the uterus of the anesthetized rats was isolated, and suspended to the isometric transducer of organ bath with a preload of 1 g. In the preliminary experiments, gamithromycin was tested at concentrations of 10^{-7} M, 10^{-6} M and 10^{-5} M, and the concentration used in the study was selected as 10^{-5} M. In the 1st group, the uterus segments were treated for 10 min with 10^{-5} M gamithromycin after 0 min control contractions were obtained. In the 2nd group, the effect of 10^{-5} M gamithromycin on 2.5 mIU / mL oxytocin contraction was evaluated. In the 3rd group the effect of 10^{-5} M gamithromycin for 10 min was evaluated on 10^{-8} M atropine incubation for 10 min. In the 4th group 0.625 µg of cloprostenol was applied to a 10 mL isolated organ, then 10^{-5} M gamithromycin was applied for 10 min. The same protocols were applied in the same experimental groups for dimethylsulfoxide (DMSO) that was used as the solvent of gamithromycin. Frequency, average amplitude and peak amplitude values of the contractions were evaluated when comparing the data of the study. When the data of the first protocol evaluated; the frequency value of gamithromycin (10^{-5} M) was statistically greater than the frequency value of the spontaneous contractions prior to itself ($P \leq 0.01$). However, no statistically significant difference was found when the frequencies of DMSO and 10^{-5} M gamithromycin were compared ($P > 0.05$). There were no statistically important difference among the data of the other protocol groups in terms of frequency, average amplitude and peak amplitude ($P > 0.05$). The results of this study can be attributed to the chemical form of gamithromycin and the concentration used. In order to be able to fully assess the effects and possible mechanism of gamithromycin on the uterine smooth muscle, higher gamithromycin concentrations should be studied and, if possible, further studies should be performed with different agonist and antagonist agents.

Keywords: Gamithromycin, *in vitro*, oxytocin, rat, uterus smooth muscle.

P-glikoprotein'in Antibakteriyel Tedavideki Rolü ve Biyosensör Teknolojisi ile Tespiti

Yağmur TURGUT¹, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN¹, Recep UYAR¹, Mehmet Altay ÜNAL²

¹Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

²Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı, ANKARA

ATP-bağlayıcı kaset (ABC) ailesi birçok endojen ve eksojen substratın taşınmasında görev almaktadır. ABC taşıyıcılardan, kanser direnç proteini (BRCP, ABCG2), P-glikoprotein (P-gp, ABC1) ve MDR-ilişkili protein-1 (MRP1, ABCC1) çoklu ilaç direnciyle ilişkilidir. Günümüzde çoklu ilaç direnci (MDR1), hastalık tedavisinde başarısızlığa sebep olan en önemli faktörlerden biridir. P-gp barsak, beyin, böbrek, testis, karaciğer, adrenal bezler, akciğer, kalp ve gözlerden eksprese edilmektedir. Bu protein ; toksik maddeler ve ksenobiyotiklerin vücuttan atılımını sağlayarak biyolojik bariyer görevi yapmaktadır. P-gp antibakteriyel ilaçların oral emilimini ve hedef organlara penetrasyonunu sınırlandırarak farmakokinetik özelliklerini değiştirebilmektedir. Antibakteriyel ilaç gruplarında ilaç-ilac, ilaç-gıda etkileşimleri, ilaç cevabında tür ve ırk farklılıklarında, enfeksiyöz hastalıkların tedavisindeki mikroorganizmalardaki direnç gelişiminde ve bazı hastalıkların etiyolojisinde p-gp'nin önemli etkiye sahip olduğunu ortaya koyulmuştur. P-gp'in inhibisyonu veya indüksiyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. P-gp substratı ve modülatörü olarak sınıflandırılan antibiyotikler; florokinolonlar, makrolidler ve tetrasiklinler gibi yapı olarak oldukça farklı antibiyotik gruplarıdır. Bu bulgular hastalıklı ve sağlıklı bireylerde antibiyotiklerin farmakokinetik, farmakodinamik ve toksikodinamik özelliklerinin anlaşılmasında bir temel oluşturmaktadır. Hücre yüzeyinde lokalize olmuş p-glikoproteinin önemi göze alındığında, p-gp tanımlama ve tespiti , antibakteriyel tedavinin prognozunda olumlu sonuçlar doğuracaktır. Konvansiyonel yöntemlerden akış sitometrisi, immunohistokimya, ELISA ve floresans metodlar , p-gp aracılığıyla ilaç-dirençli hücrelerin tespitinde sıklıkla kullanılan analitik yöntemlerdir. Bu analiz yöntemleri sağlık bilimlerinin birçok alt alanında kullanılmasına rağmen, genellikle çok basamaklı, zaman gerektiren veya alanında deneyimli personel ve kompleks laboratuvar koşullarına ihtiyaç duyulan yöntemlerdir. Bu nedenle; ilaç direnci araştırmalarında ve sahada, basit ve güvenilir tespit yöntemlerine olan ilgi artmaktadır. Biyosensörler hızlı gelişen endüstriler ve sağlık alanında son zamanlarda kullanımı artan tespit enstrümanlarıdır. Biyosensör teknolojisi, kompleks örnek hazırlama basamaklarına ihtiyaç duyulmadan, düşük maliyet ile hızlı ve güvenilir analiz sağlamaktadır. Bu derlemede, P-gp ve özellikle onun antibakteriyel rolü ve biyosensör teknolojisi ile tespiti hakkında bilgi sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: ABC, biyosensör, ilaç direnci, p-glikoprotein, MDR1.

Role of P-glycoprotein on Antibacterial Therapy and Detection of p-gp with Biosensor Technology

Yağmur TURGUT¹, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN¹, Recep UYAR¹, Mehmet Altay ÜNAL²

¹Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, ANKARA

²Ankara University, Faculty of Engineering, Department of Physics Engineering, ANKARA

The ATP-binding cassette (ABC) transporters participate in the transport of a wide large number of endogenous and exogenous substrates. In all ABC transporters, the breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2), P-glycoprotein (P-gp, ABCB1), and the MDR-associated protein-1 (MRP1, ABCC1) are associated with multidrug resistance. It is expressed in intestines, brain, kidneys, testes, liver, adrenal gland, lungs heart and eyes. This protein functions as a biological barrier by extruding toxic substances and xenobiotics out of cells. P-gp could modulate pharmacokinetics of antibacterial drugs through limitation of their oral absorption and penetration into target organs. It has been shown that P-gp modifications such as inhibition result in changes in pharmacokinetic parameters which can cause clinically significant drug-drug/drug- food interactions. Among the antibiotics recognized as substrates and modulators of P-gp are structurally unrelated compounds as fluoroquinolones, macrolides and tetracyclines. These findings provide a basis for the understanding of the pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics of the antibiotics in healthy and diseased individuals. In view of the importance of cell surface P-glycoprotein, a reliable and convenient method for recognizing drug-resistant cells via P-glycoprotein may help improve the diagnosis and treatment of cancer. Conventional methods such as flow cytometry, immunohistochemistry, ELISA and fluorescence are widely utilized as analytical techniques for P-gp detection. Although these approaches have been used in some specific systems, most of them often have multi steps and are time-consuming or require highly technical skills and relatively sophisticated instrumentation. The development of a simple and convenient approach for cancer cell detection has received more and more interest. This review is focused on discussing p-gp role on antibacterial therapy and detection of p-gp with existing biosensor technology.

Keywords: *Biosensors, drug resistance, MDR1, p-glycoprotein.*

Tıbbi Bitkiler veya Ürünler Ne Kadar Güvenli

Sinem PEHLİVAN¹, Melike Füsün DEMİR ²

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA

Hastalıklardan korunmak, hastalıkların etkisini hafifletmek amacıyla ya da hastalıkların tedavisi için çeşitli bitkiler ve bitkisel tıbbi ürünler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkisel tıp; bitkileri ve/veya bitkisel ürünleri kullanarak hastalıkları tedavi etmek ve önlemek olarak tanımlanmaktadır. Sentetik ilaçlara göre bitkisel maddelerin ve ürünlerin hastalar/hasta sahipleri tarafından kabul edilmeleri daha kolaydır; bu sebeple de, özellikle beşeri hekimlikte bazı amaçlarla (vücut direncini artırmak, dokuların ve/veya organların yıpranmasını yavaşlatmak ve/veya engellemek, yaşlanmayı geciktirmek, uyumu kolaylaştırmak gibi) bitkisel maddeler istismar ölçüsünde kullanılmakta ya da kullanılmaları teşvik edilmektedir. Kullanım sırasında karşılaşılan bazı yan/istenmeyen etkiler; ilaca karşı gelişen allerjik reaksiyon, karsinogenik, teratojenik etkiler, organ bozuklukları, hormonal bozukluklar, vb şeklindedir. Bu sunumda; bazı önemli tıbbi bitkilerin ve/veya tıbbi bitkileri ihtiva eden ürünlerin kullanılması sırasında karşılaşılabilecek veya karşılaşılan istenmeyen etkileri (yan ve zararlı etki) hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Alternatif Tıp, Bitkisel Tedavi, İstenmeyen Etki.

How Safe are Medicinal Plants or Products

Sinem PEHLİVAN¹, Melike Füsün DEMİR ²

¹Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, ANKARA

²Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, ANKARA

The use of various plants and herbal medicinal products have increased in all societies in order to protect against diseases, to decrease in their effects, or by the aim of treatment of diseases. Herbal medicine is defined as the approach to treat and prevent diseases using plants and/or herbal products. Compared to synthetic drugs, it is easier that herbal substances to be accepted by patients or patients owners. Therefore, they are used especially in human medicine for some purposes excessively (increasing body resistance, slowing or preventing the wear of tissues and organs, delaying aging and facilitating compliance) or encouraged consume and use of them. Some side/undesirable effects encountered during use; allergic reaction to the drug, carcinogenic teratogenic effects, organ disorders, hormonal disorders, etc. In this review given some information, about the undesirable effects during the use of encountered selected important medicinal plants.

Key words: *Alternative Medicine, Herbal Treatment, Undesirable Effect.*

Balda Zehirli Etki Oluşturan Bitkiler

Sümeyye Aliye ÜNAL, Ender YARSAN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Ülkemiz bitki varlığı açısından son derece önemli bir yere sahiptir. Bu türden bitkiler tedavi yönüyle önemli oldukları kadar içerdikleri etkin maddeler aracılığıyla, halk sağlığı yönüyle önemli olan hayvansal ürünlere geçerek kalıntı problemi oluşturabilirler. Bu türden hayvansal ürünler içerisinde bal da ayrı bir yere sahiptir. Nektarlar ve zehirli bitkilerin polen taneleri çeşitli toksik maddeler içerir. Bitkilerde bulunan zehirli maddeler arılar tarafından üretilen bal ve diğer ürünlere aktarılabilir. Bu zehirli etkin maddeler arasında pirolizidin alkaloidleri, grayanatoksinler, hiyosiyamin, hiyosin, saponin, strikнин, gelsemin, tutin, hyenanchin, oleandrin ve oleandriğin gibi sekonder metabolitleri sıralamak mümkündür.

Andromeda sp., *Rhododendron ponticum*, *Kalmia* sp., *Lleucothoe* sp., *Lynonia* sp., *Pieris* sp. gibi Ericaceae familyasındaki bitkilerinden toplanan balların oldukça zehirli olduğu ifade edilmiştir. Arılara ve larvalarına zarar vermeyen bu etken maddelerin insanlar için psikoaktif nitelikte olacak şekilde zehirlilik göstermektedir. *Rhododendron ponticum* veya *Azalea pontica* nektarından elde edilen bal (ki deli bal olarak bilinir) insanlara zehirli olan ancak arılara zarar vermeyen GTX'ler gibi alkaloidler içerir. *Nerium oleander* (zakkum) tüm kısımlarında nerrin ve oleandrin alkaloidleri içerir. Bunlar insan ve hayvanlarda zehirli etkilidir. *Coriaria arborea* (tutu) bitkisi tutin içerir. Tutin, pikrotoksin grubunun bir üyesidir ve memelileri etkiler. Tutinin çok kararlı olduğu ve insan sinir sistemi üzerinde ciddi bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

Ballardan kaynaklanacak zehirlenmelerde klinik belirtiler toksinin tipine bağlı olarak değişebilir; bununla birlikte, genellikle baş dönmesi, bulantı, kusma, kasılmalar, baş ağrısı, çarpıntı ve bazı durumlarda ölüm görülür. GTX'ler tarafından oluşturulan zehirlenmelerde, ekstremitelerde ve ağız çevresinde aşırı tükürük salgısı, terleme, kusma, baş dönmesi, halsizlik ve parestezi, kan basıncının düşmesi ve sinüs bradikardi görülebilir. *Andromeda* çiçeklerinin nektarından üretilen bal, ekstremiteleri ve diyaframı felç edip ölümle sonuçlanabilecek nitelikte GTX içerir. *Kalmia latifolia*, alaca çalı, dağ defnesi ya da koyun defnesi (*Kalmia angustifolia*) gibi aynı familyaya bağlı türlerde ballarda toksik olabilecek düzeyde etki oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler: Bal, bitki, zehir.

Toxic Plants in Honey

Sümeyye Aliye ÜNAL, Ender YARSAN

Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Dept. Of Pharmacology and Toxicology, ANKARA

Our country has a very important place in terms of plant existence. Plants of this kind can be a residual problem by switching to animal products that are important for public health, through the active substances they contain as well as being important in terms of treatment. Honey has a special place among such animal products. Nectars and pollen grains of poisonous plants contain various toxic substances. Toxic substances in plants can be transferred to honey and other products produced by bees. Among these toxic active substances, it is possible to list secondary metabolites such as pyrolysidine alkaloids, grayanotoxins, hyocyanamine, hyocine, saponin, strychnine, gelsemin, tutin, hyenanchin, oleandrin and oleandrogenin.

Andromeda sp., *Rhododendron ponticum*, *Kalmia* sp., *Lleucothoe* sp., *Lynonia* sp., *Pieris* sp. as collected from plants in the Ericaceae family of plants are expressed as highly toxic. These active substances, which do not harm bees and larvae, show toxicity to be psychoactive for humans. Honey from *Rhododendron ponticum* or *Azalea pontica* nectar (also known as mad honey) contains alkaloids such as GTXs, which are toxic to humans but do not harm bees. *Nerium oleander* (oleander) contains nerrin and oleandrin alkaloids in all parts. They are toxic in humans and animals. *Coriaria arborea* (tutu) plant contains tutin. Tutin is a member of the picrotoxin group and affects mammals. Tutin is thought to be very stable and has a serious impact on the human nervous system.

Clinical manifestations of poisoning from honey may vary depending on the type of toxin; however, often dizziness, nausea, vomiting, convulsions, headache, palpitations, and in some cases death. Intoxications caused by GTXs, excessive salivation in the extremities and around the mouth, sweating, vomiting, dizziness, fatigue and paresthesia, drop in blood pressure and sinus bradycardia may occur. Produced from the nectar of *Andromeda* flowers, honey contains GTX, which can paralyze extremities and diaphragms and result in death. *Kalmia latifolia* can cause toxic effects on honey in species belonging to the same family such as calico bush, mountain laurel or spoon-wood (*Kalmia angustifolia*).

Keywords: Honey, plant, toxic.

Erkek Reprodüktif Toksikolojide Musk Keton ve Musk Ksilen

Barış ÖTÜN¹, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN²

¹Bitlis Eren Üniversitesi Hizan Meslek Yüksekokulu, BİTLİS

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, ANKARA

Doğal musklar antik çağlardan beri parfümlerin hazırlanmasında koku olarak kullanılmıştır. Doğal musk her zaman çok kıymetli olmuştur, erkek musk geyiklerinin (*Moschus moschiferus*) ekzokrin bezlerinde bulunur. Doğal musk özlerinin kokulu bileşenleri makrosiklik ketonlar, makrosiklik laktonlar, makrosiklik alkoller ve piridin türevleridir. Düşük üretim maliyetleri ve kolay hazırlanabilmeleri nedeniyle muskların sentetik türevleri olan nitro musklar; sabun, kozmetik, çamaşır deterjanı ve yumuşatıcı gibi sayısız ürünün endüstriyel üretiminde yapay koku olarak büyük miktarlarda kullanılmıştır. Musk keton şüpheli bir ko mutajen iken, musk ksilen şüpheli bir ko mutagen ve kanserojendir. Musk ksilen, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından grup 3'te (insanlarda kanserojen olarak sınıflandırılmaz) sınıflandırılmıştır. *In vitro* çalışmalarda ise nitro muskların (musk ksilen ve musk ketonun) muhtemelen östrojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bileşiklere canlılar özellikle inhalasyon ve dermal yol ile maruz kalmaktadır. Bu kirleticiler, çevresel yolla su kaynaklarına bulaşabilmekte ve su canlılarına, çevreye ve organizmalarda sağlığa yönelik istenmeyen etkiler oluşturabilmektedir. Bu bileşiklerin insan sütüne geçişine ilişkin çalışmalar bulunmakla birlikte, inek ya da diğer hayvanların süt ya da dokusuna geçişine ilişkin çalışmalar sınırlıdır veya bulunmamaktadır.

Anahtar kelimeler: Erkek reprodüktif toksisite, musk keton, musk ksilen, nitro musk.

Musk Ketone and Musk Xylene in Male Reproductive Toxicology

Barış ÖTÜN¹, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN²

¹Bitlis Eren University Hizan Vocational School, BITLIS

²Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, ANKARA

Natural musks have been used as fragrance in the preparation of perfumes since antiquity. Natural musk has always been very valuable, which is found in the exocrine glands of male musk deer (*Moschus moschiferus*). Fragrant compounds of natural musk extracts are macrocyclic ketones, macrocyclic lactones, macrocyclic alcohols and pyridine compounds. Nitric musks, which are synthetic compounds of musks due to their low production costs and easy preparation; in industrial production of numerous products such as soap, cosmetics, laundry detergent and softeners, large amounts have been used as artificial fragrance. Musk ketone is a suspected co mutagen, while musk xylene is a suspected co-mutagen and carcinogen. Musk xylene was classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in group 3 (not classifiable as a carcinogen in humans). *In vitro* studies have shown that nitro musks (musk xylene and musk ketone) probably have estrogenic activity. The organisms are exposed to these compounds by inhalation and dermal pathway. These pollutants can infect the water by environmental ways and create adverse health effects to aquatic organisms, the environment and organisms. Although there are studies about the transition of these compounds to human milk, there are limited or no studies on the transfer of cows or other animals to milk or tissue.

Keywords: Male reproductive toxicity, musk ketone, musk xylene, nitro musk.

Hayvan Yem ve Yem Hammaddelerinde Aflatoksin B₁'in Belirlenmesi İçin Analiz Yöntemleri

Saima MUSHTAQ, Yavuz Kürşad DAŞ, Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakolojive Toksikoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

Aflatoxin B₁ (AFB₁) gıdalarda ana kirletici olarak bulunan *Aspergillus* türleri tarafından üretilen ve dünya üzerinde yaşayan bütün türlere belirli derecelerde zehirli olan bir bileşiktir. Karaciğer karsinojeni olması dolayısı ile son yıllarda ilgi odağı olmuştur. Aflatoxin B₁'in çeşitli gıdalar ve hayvan yemlerinden analizinde enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA), ince tabaka kromatografisi (İTK), yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), sıvı kromatografi tandem kütle spektrometrisi (LC- MS/MS) ve elektrokimyasal immünoşansör (EKİ) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Belirtilen yöntemlerin hepsinde örnek alma, ekstraksiyon, temizleme, tespit, doğrulama ve risk değerlendirmesi aşamaları bulunmaktadır. HPLC yüksek doğruluk, kesinlik ve hassasiyetinden dolayı en yaygın kullanılan analiz yöntemidir. Yirminci yüzyılın sonlarından bu yana, Türkiye dahil birçok ülke, tüketiciyi mikotoksinlerin zararlı etkilerinden korumak için gıda ve hayvan yemi ile ilgili sektörlerde özellikle AFB₁ için katı kurallar ve düzenlemeler yürürlüğe koymuştur. Bu sunumda, yem ve yem hammaddelerinde, örneklemeden risk değerlendirme aşamasına kadar, AFB₁ analizinde kullanılan çeşitli yöntemler ve uluslararası düzenlemeler derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin B₁, analiz yöntemleri, örnekleme, örnek hazırlama, risk değerlendirmesi, uluslararası düzenlemeler

Analytical Methods for Determination of Aflatoxin B₁ in Animal Feeds and Feedstuffs

Saima MUSHTAQ, Yavuz Kürşad DAŞ, Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, SAMSUN

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is an *Aspergillus* spp. produced mycotoxins which is identified as one of the key contaminant of food all around the world and toxic to some degree to all species tested to date. Because of its hepatocarcinogenic nature, AFB₁ has obtained significant attention in past few years. A number of analytical, diagnostic and immunological procedures are available for assessment and estimation of AFB₁ in different food products and animal feeds such as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) and electrochemical immunosensors (ECI). All available analytical methods for determination of AFB₁ principally included the same steps like, sampling, sample extraction, clean-up, detection, confirmation, and finally risk assessment of the toxin. HPLC approaches are most commonly used now a days because of their high accuracy, precision and sensitivity. Since late 20th century, many countries including Turkey has imposed strict rules and regulations regarding mycotoxins especially for AFB₁ in food and animal feed related industry to protect the consumer from the detrimental effects of mycotoxins. In this presentation, a number of analytical techniques for determination of AFB₁ in feeds and feedstuffs starting from sampling to risk assessment and international regulations are reviewed.

Key words: *Aflatoxin B₁, analytical methods, international regulations, risk assessment, sampling, sample preparations.*

Tıbbi Bitkilerin Esansiyel Yağ ve Solvent Ekstraktlarının Kimyasal İçeriklerinin Taranması ve Veteriner Fitoterapi Yönünden Karşılaştırılması: *Foeniculum vulgare* Mill. Örneği

Mustafa YİPEL, Nurullah ÖZDEMİR

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,
TEKİRDAĞ

Bu çalışmanın amacı; Trakya florasında da yer alan, etnoveteriner tıpta başlıca iştah açıcı, karminatif, antispazmodik, gaz giderici, antimikrobiyal, antihelmentik, mukolitik, solunum uyarıcı, galaktojen, antipiretik, yatıştırıcı ve diüretik olarak kullanılan rezene (*F. vulgare* Mill.) esansiyel yağı ve solvent ekstraktının içerdiği biyoaktif kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi ve Veteriner Hekimliğinde kullanım potansiyeli doğrultusunda karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla aktardan temin edilen rezene teşhis edilerek kurutuldu, sapları ayıklandı ve öğütüldü. Ardından esansiyel yağ elde etmek amacıyla 50 g balona alındıktan sonra üzerine 200 ml distile su eklenerek clevenger aparatına yerleştirildi ve 3 saat boyunca kaynatıldı. Solvent ekstraktının elde edilmesi amacıyla ise yine öğütülmüş bitkiden 50 g bir balon içerisine alınıp üzerine 125 ml metanol eklenerek manyetik karıştırıcıda 20 saat boyunca ekstraksiyona bırakıldı. Elde edilen yağ ve ekstraktın kimyasal içeriği ve kompozisyonu gaz kromatografisi kütle spektrofotometresi (GC-MS) analiziyle belirlendi. Hidrodistilasyon yöntemi sonunda 1 ml uçucu yağ ve metanol ekstraksiyonu sonucunda 60 ml ekstrakt elde edildi. Kromatografi analizi sonucuna göre esansiyel yağda farklı oranlarda toplam 15 adet biyoaktif kimyasal bileşik tespit edilirken ana bileşik estragol (p-allanlanol, metil kavikol) (% 72.24) olarak belirlendi. Solvent ekstraktında ise yine farklı oranlarda toplam 47 adet biyoaktif kimyasal bileşik tespit edilirken ana bileşik anetol (% 39.34) olarak belirlendi. Çalışmada elde edilen rezene yağının ana bileşiği olan estragol antibakteriyel ve antioksidan etkiler ile antitoksoplasma aktivitesine sahipken, solvent ekstraktının ana bileşiği olan anetol ise antiinflamatuvar aktivitelere sahiptir. Dolayısıyla Veteriner Hekimliğinde rezene yağının başta bakteriyel ve toksoplazmal hastalıklarda, solvent ekstraktının ise inflamatuvar hastalıklarda kullanım potansiyeline sahip olduğu ortaya konuldu. Bu sonuçlara dayanarak bitkilerin yağ ve ekstraktının biyoaktif kimyasal kompozisyonunun değişiklik gösterebileceği, dolayısıyla kullanılacak bitkisel materyalin hedeflenen endikasyon doğrultusunda belirlenmesi ve mümkünse içerik analizinin yapılarak kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Esansiyel yağ; Hidrodistilasyon; Rezene; Solvent ekstraksiyonu; Veteriner fitoterapi

Screening and Comparison of Chemical Contents of Essential Oil and Solvent Extracts of Medicinal Plants in Line With The Potential Use in Veterinary Medicine: A sample - *Foeniculum vulgare* Mill.

Mustafa YİPEL, Nurullah ÖZDEMİR

Tekirdağ Namık Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, TEKIRDAG

The aim of this study was to determinate and comparison of the composition of bioactive chemicals of essential oil and solvent extract of fennel (*F. vulgare* L.) in accordance with potential use in Veterinary Medicine that mainly used as appetizing, carminative, antispasmodic, degassing, antimicrobial, antihelmintic, mucolytic, respiratory stimulating, galactogen, sedative, antipyretic and diuretic in Ethnoveterinary Medicine and also located in the flora of Thrace. The obtained fennel from the local herbal markets was dried, the stalks were separated and then powdered. Then 50 g specimen weighed in a balloon and placed to a Clevenger apparatus by adding 200 ml of distilled water. The essential oil obtained via to boiled plant for 3 hours. 50 g of sample was weighed into a balloon and extracted for 20 hours on a magnetic stirrer after adding 125 ml methanol. The chemical composition of the oil and extract were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. After hydrodistillation, 1 ml of oil and after extraction, 60 ml of extract were obtained. As a result of the chromatography analysis, 15 bioactive chemical compounds were detected in different ratios where estragole (p-allylanisole, methyl chavicol) was the major (72.24%) bioactive compound of oil. 47 bioactive chemical compounds were detected in different ratios where anethole was the major (39.34%) bioactive compound of extract. While the estragole; major component of fennel oil have antibacterial, antioxidant effects and anti-toxoplasma activity. Anethole; major component of fennel extract has anti-inflammatory effect. Therefore, fennel oil has the potential to be used primarily in bacterial and toxoplasma diseases, where solvent extract in inflammatory diseases in Veterinary Medicine. Based on these results, the bioactive chemical composition of plant essential oils and extracts are varied, it is thought that the plant material (essential oil, solvent extract, etc.) to be used should be determined according to the targeted indication and content analysis should be performed if possible.

Keywords: *Essential oil; Fennel; Hydrodistillation; Solvent extraction; Veterinary phytotherapy*

Veteriner Hekimlikte Zehirlenme Şüpheli Örneklerin Sistematiik Toksikolojiik Analizi*

Oğuzhan YAVUZ, Orhan TOKUR, Zeyno NUHOĞLU, Saima MUSHTAQ, Aylin PEHLİVAN, Özge

MARANGOZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

*Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1901.19.001 proje numarası ile desteklenmiştir.

Zehirlenme olgularının laboratuvar teşhisinde birçok zorluk bulunmaktadır ve bu zorlukların aşılabilmesi için zehirlenmeye neden olan veya insanlarda ve hayvanlarda suistimal edilme potansiyeline sahip ilaç ve diğer kimyasal maddelerin çeşitli örneklerde toplu olarak ve belirli bir protokol içerisinde taranma işlemine Sistematiik Toksikolojiik Analiz (STA) adı verilir. Bu çalışmada veteriner hekimlikte zehirlenme şüphesi ile laboratuvara gönderilen örnekler için etkin bir STA protokolü geliştirilmesi amaçlandı. Çalışma kapsamında başlangıç olarak laboratuvarımız tecrübeleri ve literatür taraması esas alınarak ülkemizde ve özelde Samsun Bölgesinde yaşayan hayvanlarda sıklıkla akut zehirlenmeye neden olan maddeler; veteriner ve beşeri ilaçlar, insektisitler, antikoagulan rodentisitler, alkaloidler, siyanür, etilen glikol ve striknin olarak belirlendi. Bunların yanında, Samsun bölgesinde çalışan veteriner hekimlere uygulanmak üzere en sık karşılaştıkları zehirlenmeler ile ilgili sorular içeren bir anket formu hazırlanarak elektronik ortamda uygulandı. İlk etapta 20 veteriner hekimden (18 erkek, 2 kadın) toplanan yanıtlar değerlendirildiğinde son 5 yılda hayvanlarda en fazla görülen zehirlenme nedeninin pestisitler (başta organik fosforlu insektisitler olmak üzere, diğer insektisitler, herbisitler ve rodentisitler) olduğu belirlendi. Bu bulgu başlangıçtaki tahminlerimize ve literatür bilgisine uygun olmakla birlikte, en önemli ikinci zehirlenme nedeninin çalışma kapsamında ilk aşamada değerlendirilmeyen zehirli hayvanlar (yılan, akrep, böcek ısırıkları) olduğu görüldü. Katılımcıların yarısından fazlası (n=11) zehirlenme şüphesi ile laboratuvara hiç numune göndermediğini belirtirken, numune gönderen klinisyenler (n=9) ise anamnez ve klinik bulgular ile koydukları zehirlenme teşhisi ile laboratuvar sonuçlarının genelde uyumsuz olduğunu bildirdi. Hazırlanan anketin daha geniş gruplara uygulanarak elde edilen verilerin değerlendirilmesinin, hayvanlardaki zehirlenme nedenlerinin daha net belirlenerek analiz altyapısının oluşturulması ve ülkemizde veteriner toksikoloji alanında çok fazla uygulaması olmayan, numune alımından raporlamaya kadar yapılacak işlemleri standardize eden bir STA protokolünün uygulamaya konulması açısından önemli olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Sistematiik toksikolojiik analiz, veteriner hekimlik, zehirlenme

Systematic Toxicological Analysis of Poisoning Suspected Samples in Veterinary Medicine*

Oguzhan YAVUZ, Orhan TOKUR, Zeyno NUHOGLU, Saima MUSHTAQ, Aylin PEHLIVAN, Ozge MARANGOZ

Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, SAMSUN

*This study was supported by Ondokuz Mayıs University (Project No: PYO.VET.1901.19.001).

There are various challenges in laboratory diagnosis of poisoning cases and for solving these problems, a comprehensive and systematic screening process, termed systematic toxicological analysis (STA), is performed for poisons and abused drugs in specimens collected from humans and animals. In this study, development of an effective STA protocol for toxicological important specimens in veterinary medicine, was aimed. At the beginning of the study, chemicals, which usually cause acute toxicity in animals in our country and especially in Samsun, was determined as veterinary and human drugs, insecticides, anticoagulant rodenticides, alkaloids, cyanide, ethylene glycol and strychnine based on our experiences and literature data. In addition, an on-line questionnaire, consisting questions about frequent poisonings, was prepared for veterinarians worked in Samsun Province. At the first stage, answers collected from 20 veterinarians (18 men and 2 women) showed that the most observed poisons were pesticides (mainly organophosphate insecticides, other insecticides, herbicides and rodenticides). Although this finding is compatible with our predictions and literature data, animal poisons (snake, scorpion, insect bites), which did not consider in the first stage of the study, were indicated as the second most observed poisons. More than half of participants (n=11) were declared that they have never sent a toxicological sample to the laboratory and clinicians, who sent toxicological samples, were noticed their clinical diagnosis was generally not compatible with laboratory results. It was concluded that evaluation of the survey, applied wider groups was important for exact determination of poisoning causes in animals, development of analytical infrastructure and generation of a STA protocol from sample collection to reporting which is not usual in veterinary medicine in Turkey.

Key words: *Poisoning, systematic toxicological analysis, veterinary medicine*

Kenevirin Sıçanlarda Fertilite Üzerine Etkileri

Serdal KURT¹, M. Mesud HÜRKUL²

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, DİYARBAKIR

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, ANKARA

Bu çalışmanın amacı, sıçanların gebeliği üzerine kenevirin fizyolojik ve patoloji etkilerini araştırarak elde edilen bulguların sonraki yapılacak bilimsel çalışmalara katkı sağlamasıdır. Kenevir (*Cannabis sativa* L.) ticari, farmakolojik ve tıbbi olarak kullanılmaktadır. Kenevirin ana psikotropik bileşiği delta-9 tetrahidrokanabinoldür (THC). Son yıllarda insan ve hayvanların doku sisteminde delta-9 THC'ye yanıt gösteren iki spesifik kanabinoid reseptörü (CB1 ve CB2) tanımlandı ve klonlandı. CB1 reseptörleri sıçanlarda ovaryum, uterus, testis, vas deferens, idrar kesesi ve diğer periferik endokrin ve nörolojik dokulara lokalize olduğu tespit edilmiştir. CB2 reseptörleri ise oldukça sınırlı olduğu ve dominant olarak immün hücrelerde bulunduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda birçok çalışma endokannabinoidlerin sentezi ve metabolizması üzerinde yoğunlaşmıştır. Endokannabinoidler hücrelerin içine girdikten sonra bir membran proteini olan enzim yağ asidi amid hidrolaz tarafından araşidonik aside parçalanmaktadır. Bu hidrolitik metabolizmaya ek olarak, son çalışmalar endokannabinoidlerin siklooksijenazlar, lipoksijenazlar ve sitokrom P450'ler de dahil olmak üzere bir dizi yağ asidi olan oksijenazlar tarafından oksidatif metabolizmaya maruz kaldıklarını gösterilmiştir. Bu nedenle kannabinoid sisteminin modülasyonu kannabinoid reseptörleri, endokannabinoid sentezi ve metabolizma yolları dahil olmak üzere çok çeşitli potansiyel hedeflerle gerçekleştirildiği anlaşılmıştır. Ayrıca, kenevirin dişi sıçanlarda endokronolojik değişimler üzerine etki ettiği bildirilmiştir. Sonuç olarak endokannabinoidlerin, reseptörlerinin ve metabolize edici enzimlerinin rolü gebeliğin fizyolojisi ve pato-fizyolojisine etki ettiği görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Fertilite, kenevir, sıçan.

The Effect of Cannabis on Fertility in Rats

Serdal KURT¹, M.Mesud HÜRKÜL²

¹Dicle University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology,
DIYARBAKIR

²Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, ANKARA

The aim of this study was to investigate the physiological and pathological effects of cannabis on the pregnancy of rats and to contribute to the subsequent scientific studies. Cannabis (*Cannabis sativa* L.), is used commercially, pharmacologically and medicinally. The main psychotropic compound of cannabis is delta-9 tetrahydrocannabinol (THC). In recent years, two specific cannabinoid receptors (CB1 and CB2) have been identified and cloned in the tissue system of humans and animals responsive to delta-9 THC. CB1 receptors have been found to be localized to ovary, uterus, testis, vas deferens, bladder and other peripheral endocrine and neurological tissues in rats. But, CB2 receptors have been reported to be very limited and found to be dominant in immune cells. Recently, several studies have focused on the synthesis and metabolism of endocannabinoids. Once the endocannabinoids have been introduced into the cells, they are broken down into arachidonic acid by the enzyme fatty acid amide hydrolase, a membrane protein. In addition to this hydrolytic metabolism, recent studies have shown that endocannabinoids are exposed to oxidative metabolism by a number of fatty acids, including cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochrome P450s. Thus, it has been found that the modulation of the cannabinoid system is accomplished by a wide variety of potential targets including cannabinoid receptors, endocannabinoid synthesis and metabolic pathways. In addition, cannabis has been reported to affect endochronological changes in female rats. In conclusion, the role of endocannabinoids, receptors and metabolizing enzymes appears to affect the physiology and pathophysiology of pregnancy.

Keywords: *Cannabis, fertility, rat.*

Çiftlik hayvanlarında oksidatif stresin fertilité üzerindeki rolü

Serdal KURT¹, M. Mesud HÜRKÜL²

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, DİYARBAKIR

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, ANKARA

Bu çalışmanın amacı oksidatif stresin hayvanlarda fertilité üzerine etkisini araştırmaktır. Oksidatif stres, vücuttaki oksidan ve antioksidan maddeler arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. RO., RCOO., H₂O₂, HO. gibi oksidanlar, hücresel metabolizma sırasında bir yan ürün olarak ortaya çıkmaktadırlar. Oksidan maddeler kendi kendilerini indirgeye bilme ve diğer molekülleri oksitleyebilme kabiliyetine sahiptirler. Ayrıca, oksidan maddeler sperm ve oositlerde deoksiribonükleik asit, lipit, protein ve membran hasarı oluşturabilmektedirler. Bu nedenlerden dolayı oksidatif stres, oosit gelişimi, oosit maturasyonu, steroid hormonu mekanizması, ovulasyon, ovaryum fonksiyonları, embriyo gelişimi, embriyo implantasyonu, endometriyum ve gebelik üzerinde zararlı etkilere sahiptir. Dahası, oksidatif stres sperm hareketliliğini azaltır ve bu tür spermiler servikal mukus, oosit vitellin membran ve zona pellucida'ya nüfuz etmez ve akrozom reaksiyonları bozulur. Dolayısıyla, çiftlik hayvanlarında antioksidan uygulamalarının fertilité üzerine iyileştirici etkileri bulunmaktadır. Sonuç olarak, antioksidanlar tarafından nötralize edilemeyen oksidan maddelerin sperm, semen, oosit, embriyo ve gebelik gibi fertilité parametreleri üzerinde yıkıcı etkilerinin olduğu belirtildi. Bu nedenlerden dolayı oksidatif stres hayvanlarda fertilité oranında düşüşe veya infertiliteye yol açabilmektedir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, fertilité, hayvan, oksidatif stres.

The role of oxidative stress on fertility in farm animals

Serdal KURT¹, M. Mesud HÜRKÜL²

¹Dicle University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, DIYARBAKIR

²Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, ANKARA

The objective of this study was to research the effect of oxidative stress on fertility in animals. Oxidative stress is defined as an imbalance between oxidant and antioxidant substances in the body. Oxidants substances such as RO₂·, RCOO₂·, H₂O₂, HO· arise as a by-product during cellular metabolism. Oxidants substances have the ability to reduce themselves and oxidize other molecules and also give rise to deoxyribonucleic acid, protein, membrane and lipid damage in oocyte and sperm. Therefore, oxidative stress has detrimental effects on oocyte development, steroid hormone mechanism, oocyte maturation, ovulation, ovary functions, embryo development and implantation, endometrium, and pregnancy. Also, oxidative stress decreases sperm motility, and such spermatozoa do not penetrate into cervical mucus, oocyte vitelline membrane and zona pellucida, and acrosome reactions are impaired. Therefore, antioxidant administrations in farm animals have positive effects on fertility. In conclusion, it was stated oxidant substances that cannot be neutralized by antioxidants have a destructive effect on fertility parameters such as sperm, semen, oocytes, embryos and pregnancy. So, oxidative stress can lead to a decrease in fertility or infertility in animals.

Keywords: *Animal, antioxidant, fertility, oxidative stress.*

Alkalın komet yöntemi kullanılarak diklofenak sodyum genotoksitesinin in vitro incelenmesi

Anıl YILMAZ, Sevtap AYDIN

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Diklofenak sodyum, analjezik, antipiretik ve anti-enflamatuar aktiviteye sahip steroid olmayan anti-enflamatuar bir ilaç (NSAID) olmakla birlikte osteoartrit, romatoid artrit ve alkiloz edici spondilit gibi romatoid hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Aynı zamanda seçici olmayan bir geri dönüşümlü ve rekabetçi bir siklooksijenaz önleyici (COX) olup, araziidonik asidin prostaglandin öncüllerine dönüşümünü engeller. Anti-enflamatuar etki gösteren birçok maddenin, DNA metabolizmasını etkilediği ve bu nedenle genetik materyalde hasara yol açabileceği öne sürülmektedir. Diklofenak sodyum hem kısa süreli hem de uzun süreli tedaviler için önerilmektedir. Genotoksisite testi, ilaçlar ve kimyasallar için güvenlik değerlendirmesinin önemli bir bileşeni haline gelmiştir. Diklofenak sodyumun genotoksik potansiyelleri üzerine çalışmalar olmasına rağmen, genotoksik mekanizmalarının netleştirilmesi gerekir. Bu çalışmanın amacı, diklofenak sodyumun, V79 Çin hamster fibroblast hücrelerinde sitotoksik olmayan dozlarda (1-100 μM) DNA hasarına ve geniş doz aralığında (1-3200 μM) hücre canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmektir. Sitotoksisite, MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Diklofenak sodyumun V79 hücrelerinde genotoksik ve antigenotoksik özellikleri 50 μM H_2O_2 ile muamele olup/olmaksızın alkalın komet yöntemi kullanılarak (tek hücre jel elektroforezi) belirlendi. Hücre canlılığı, 200 μM 'den daha yüksek konsantrasyonlarda diklofenak sodyum ile muamele edilmiş V79 hücrelerinde doza bağlı olarak önemli ölçüde azaldı. IC_{50} dozu 705 μM 'idi. Diklofenak sodyum tek başına kullanıldığında, çalışılan tüm konsantrasyonlarda (1-100 μM) DNA hasarına neden olmamıştır. 1-10 μM arasındaki konsantrasyonlarda, diklofenak sodyum H_2O_2 kaynaklı DNA hasarını önemli ölçüde değiştirmede; Bununla birlikte, 50 μM ve 100 μM konsantrasyonlarında diklofenak sodyum, H_2O_2 kaynaklı DNA hasarını önemli ölçüde arttırdı. Çalışmanın sonuçları, diklofenak sodyumun, daha yüksek dozlarda oksidatif DNA hasarını artırabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, çalışmamızda gözlenen oksidatif stres ile diklofenak sodyumun olası genotoksitesisi, genotoksisite mekanizmasının ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Comet yöntemi, diklofenak sodyum, DNA hasarı, genotoksisite, oksidatif stres.

In vitro investigation of diclofenac sodium genotoxicity using alkaline comet assay

Anıl Yılmaz, Sevtap Aydın

Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, ANKARA

Diclofenac sodium, nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity, is widely used in the treatment of rheumatoid diseases such as osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and ankylosing spondylitis. It is also a non-selective reversible and competitive inhibitor of cyclooxygenase (COX), subsequently blocking the conversion of arachidonic acid into prostaglandin precursors. Many substances with an anti-inflammatory action are suggested to influence DNA metabolism and thus can give rise to damage in the genetic material. Diclofenac sodium is recommended for both short term and the long term treatments. Genotoxicity testing has become a crucial component of safety evaluation for drugs and chemicals. Although there are studies on the genotoxic potentials of diclofenac sodium, its genotoxic mechanisms needs to be clarified. The aim of this study was to evaluate the effects of diclofenac sodium on cell viability in a wide range of doses (1-3200 μM) and DNA damage at non-cytotoxic doses (1-100 μM) in V79 Chinese hamster fibroblast cells. The cytotoxicity was determined using MTT assay. The genotoxic and antigenotoxic properties of diclofenac sodium in V79 cells treated with/without 50 μM H_2O_2 , was determined by the alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis). The cell viability significantly decreased in a dose dependent manner in V79 cells treated with diclofenac sodium at the concentrations higher than 200 μM . IC_{50} dose was 705 μM . When diclofenac sodium is used alone, it did not cause DNA damage at all studied concentrations (1-100 μM). At the concentrations between 1-10 μM , diclofenac sodium did not significantly change H_2O_2 -induced DNA damage; however at the concentrations of 50 μM and 100 μM diclofenac sodium significantly increased H_2O_2 -induced DNA damage. The results of the study show that diclofenac sodium may increase oxidative DNA damage at higher doses. In conclusion, the possible genotoxicity of diclofenac sodium with oxidative stress observed in our study may contribute to reveal its genotoxicity mechanism.

Keywords: *Comet assay, diclofenac sodium, DNA damage, genotoxicity, oxidative stress.*

***Salvia officinalis* L. Esansiyel Yağının Kimyasal İçeriğinin Taranması ve Veteriner Fitoterapi Yönünden Değerlendirilmesi**

MustafaYİPEL, Nurullah ÖZDEMİR

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,
TEKİRDAĞ

Bu çalışmada, başlıca karminatif, antispazmodik, antienflamatuar, antimikrobiyal, etkilere sahip *Salvia officinalis* L. (adaçayı) bitkisinin esansiyel yağındaki biyoaktif maddelerin kimyasal içeriklerinin taranması ve Veteriner fitoterapide potansiyel kullanım endikasyonları (stomatit, gingivit, midede gaz birikmesi, diare, kognitif disfonksiyon) doğrultusunda değerlendirilmesi amaçlandı. Aktarlardan temin edilen bitkinin sap ve yaprakları uygun şartlarda kurutulduktan sonra yaprakları öğütülüp toz hale getirildi. Öğütülmüş bitkiden 50 g tartılarak bir cam balon içerisine alındı. Üzerine 200 ml distile su eklenerek clevenger aparatında 3 saat boyunca kaynatıldı. Üç saatlik hidrodistilasyon işlemi sonucunda 0.8 ml esansiyel yağ elde edildi. İşlem sonunda elde edilen esansiyel yağın kimyasal içerik analizi, gaz kromatografisi kütle spektrofotometresi (GC-MS)'nde gerçekleştirildi. Yapılan GC-MS analizi sonucunda bitki esansiyel yağında 35 kimyasal madde belirlenirken, içerikte % 43.22 ile en yüksek oranda bir monoterpen (1,8-Cineole) belirlendi. Çalışmada elde edilen adaçayı esansiyel yağının yüksek oranda antienflamatuar, antimikrobiyal, antitümoral, analjezik, hipotansif, antioksidan ve akarisit aktiviteye sahip 1,8-sineol (cineole, ökaliptol) içerdiği tespit edildi. Dolayısıyla Veteriner Hekimliğinde adaçayı yağının bazı bakteriyel, tümöral, kardiyovasküler ve paraziter hastalıklarda kullanım potansiyeline sahip olduğu ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Adaçayı, Esansiyel yağ, Hidrodistilasyon, Veteriner Fitoterapi, 1,8-cineol

Screening of the Chemical Composition of *Salvia officinalis* L. Essential Oil and Evaluation in Terms of Veterinary Phytotherapy

MustafaYİPEL, Nurullah ÖZDEMİR

Tekirdağ Namık Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, TEKIRDAG

In this study, screening of the chemical bioactive contents of the sage (*Salvia officinalis* L.) oil which has carminative, antispasmodic, anti-inflammatory, antimicrobial effects and evaluate the potential use in Veterinary Phytotherapy (Stomatitis, gingivitis, flatulence, diarrhea, cognitive dysfunction) was aimed. Plant specimens obtain from local herbal market, after drying under suitable conditions the stems and leaves were milled and powdered. 50 g of sample was weighed into a glass balloon. After adding 200 ml of distilled water, plant material was hidrodiltilated for 3 hours by a Clevenger apparatus system. Over 0.8 ml of essential oil was obtained after 3 hours hidrodiltilation procedure. At the end of procedure the essential oil was sent to the laboratory for chemical content analysis by gas chromatography mass spectrophotometer (GC-MS). As a result of GC-MS analysis, 35 chemical substances were determined with the highest rate 43.22 % of a monoterpene (1,8-cineol). Fennel oil obtained in the study was found to contain 1,8-cineol (cineole, eucalyptol) with a high rate that has an anti-inflammatory, antimicrobial, antitumoral, analgesic, hypotensive effects, antioxidant and acaricidal activity. Therefore, it was revealed that sage oil has the potential to be used in some bacterial, tumoral, cardiovascular and parasiter diseases in Veterinary medicine.

Keywords: *Essential oil, Hidrodiltilation, Sage, Veterinary phytotherapy, 1,8-cineol*

Kırmızı Yanaklı Su Kaplumbağalarında (*Trachemys scripta elegans*) Asiklovirin

Farmakokinetiği Üzerine Benzilpenisilinin Etkisi

Duygu DURNA ÇORUM^{1*}, Orhan ÇORUM¹, Orkun ATİK², Hatice ESER FAKİ³, Feray ALTAN⁴, Kamil ÜNEY³

¹Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KASTAMONU

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, AFYONKARAHİSAR

³Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KONYA

⁴Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, DİYARBAKIR

*Bu araştırma Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetimi Koordinatörlüğü tarafından desteklendi (Proje No. KU-BAP01/2018-66).

Bu araştırmanın amacı, kırmızı yanaklı su kaplumbağalarında asiklovirin farmakokinetiği üzerine benzilpenisilinin etkisini belirlemektir. Araştırmada, sağlıklı, 0.3-0.6 kg canlı ağırlığa sahip 6 adet kırmızı yanaklı su kaplumbağası kullanıldı. Kaplumbağalara asiklovir (40 mg/kg) ve benzilpenisilin (30 mg/kg) damar içi uygulandı. Çalışma uygulamalar arası temizlenme süresi 30 gün olmak üzere, iki aşamada çapraz farmakokinetik dizayna (3 x 3) göre gerçekleştirildi. Kan örnekleri, ilaç uygulaması öncesi (0.saat) ve ilaç uygulamalarını takip eden 0.25., 0.5., 1., 2., 4., 6., 8., 12., 24., 36., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde toplandı. Asiklovirin plazma konsantrasyonu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi - FLD kullanılarak ölçüldü. Farmakokinetik parametreler iki kompartmanlı dışı acık modele göre hesaplandı. Asiklovirin tek uygulamasını takiben eliminasyon yarılanma ömrü ($t_{1/2\beta}$), eğri altında kalan alan (AUC), total vücut klerensi (Cl_T) ve kararlı durum dağılım hacmi (V_{dss}) sırasıyla 20.12 saat, 1372 saat* μ g/mL, 0.03 L/saat/kg ve 0.84 L/kg idi. Benzilpenisilin uygulaması asiklovirin $t_{1/2\beta}$, AUC ve V_{dss} ' ni artırırken Cl_T ' ni azalttı ($P<0.05$). Bu sonuçlar kaplumbağalarda eşzamanlı uygulamayı takiben benzilpenisilin asiklovirin farmakokinetiğini değiştirdiğini ortaya koydu. Ancak etkileşimin moleküler mekanizmasının belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Asiklovir, benzilpenisilin, kaplumbağa, farmakokinetik.

Effect of Benzylpenicillin on Acyclovir Pharmacokinetics in Red-Eared Slider Turtles (*Trachemys scripta elegans*)

Duygu DURNA CORUM^{1*}, Orhan CORUM¹, Orkun ATIK², Hatice ESER FAKI³, Feray ALTAN⁴, Kamil UNEY³

¹University of Kastamonu, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, KASTAMONU

²University of ²Afyon Kocatepe, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, AFYONKARAHİSAR

³University of Selcuk, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, KONYA

⁴University of Dicle, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Diyarbakir,

*This study was supported by The Coordination Unit of Scientific Research Projects, University of Kastamonu, (Project No. KU-BAP01/2018-66).

The aim of this study was to determine the effect of benzylpenicillin on the pharmacokinetics of acyclovir in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). Six clinically healthy red-eared slider turtle weighing 0.3–0.6 kg were used for the study. Acyclovir (40 mg/kg) and benzylpenicillin (30 mg/kg) were administered intravenously to turtles. In the study, the cross-pharmacokinetic design (3 x 3) with a 30-day washout period were performed in two periods. Blood samples were collected prior to treatment (0.h) and at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, ve 120 h after drug administration. Plasma concentrations of acyclovir were assayed using the high performance liquid chromatography - FLD method. Pharmacokinetic parameters were calculated by two-compartment open pharmacokinetic model. Following the administration of acyclovir alone, elimination half-life ($t_{1/2\beta}$), area under the plasma concentration-time curve (AUC), total clearance (Cl_T) and volume of distribution at steady state (V_{dss}) were 20.12 h, 1372 h* μ g/mL, 0.03 L/h/kg ve 0.84 L/kg, respectively. Benzylpenicillin administration increased $t_{1/2\beta}$, AUC and V_{dss} while decreased Cl_T of acyclovir ($P<0.05$). These results showed that benzylpenicillin changed the pharmacokinetics of acyclovir following simultaneous administration in turtles. However, further research is needed to determine molecular mechanism of interaction in turtle.

Keywords: Acyclovir, benzylpenicillin, pharmacokinetics, turtles.

Koyunlarda Levofloksasinin Dağılım Kinetiği Üzerine Tolfenamik Asit ve Fluniksin Megluminin Etkisi

Duygu DURNA ÇORUM^{1*}, Orhan ÇORUM¹, Ramazan YILDIZ², Hatice ESER FAKI³, Merve İDER⁴, Gul
ÇETİN⁵, Kamil ÜNEY³

¹Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KASTAMONU

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, BURDUR

³Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KONYA

⁴Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, KONYA

⁵Erzincan Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, ERZİNCAN

Levofloksasinin farmakokinetiği (4 mg/kg) hem tek başına hem de tolfenamik asit (2 mg/kg) ve fluniksin meglumin (2.2 mg/kg) ile kombine damar içi uygulamasını takiben koyunlarda belirlendi. Çalışmada 6 adet sağlıklı Akkaraman koyun (1.5 - 2.4 yaş ve 48 ± 6 kg canlı ağırlığında) kullanıldı. Araştırma, 15 günlük arınma periyodunu takiben 3 periyotta, 3 tedavi dizaynı ile gerçekleştirildi. Plazma levofloksasin konsantrasyonu yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ölçüldü ve iki kompartmanlı dışa açık model ile analiz edildi. Levofloksasinin tek uygulamasını takiben ortalama dağılım yarılanma ömrü, eliminasyon yarılanma ömrü, total klerens, kararlı durum dağılım hacmi ve eğri altında kalan alan sırasıyla 0.20 saat, 1.82 saat, 0.39 L/saat/kg, 0.96 L/kg ve $10.40 \text{ saat} \cdot \mu\text{g/mL}$ idi. Tolfenamik asit ve fluniksin meglumin ile kombine uygulama, levofloksasinin yavaş eliminasyonuna ve plazma konsantrasyonunun artmasına neden oldu. Dozaj rejiminde yapılacak değişiklik ile levofloksasin, koyunlarda enfeksiyon ve yangı durumlarında terepötik etki için tolfenamik asit ve fluniksin meglumin ile etkili biçimde kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Farmakokinetik, fluniksin meglumin, koyun, Levofloksasin, tolfenamik asit.

Influences of Tolfenamic Acid and Flunixin Meglumine on Disposition Kinetics of Levofloxacin in Sheep

Duygu DURNA CORUM^{1*}, Orhan CORUM¹, Ramazan YILDIZ², Hatice ESER FAKI³, Merve IDER⁴, Gul
CETIN⁵, Kamil UNEY³

¹University of Kastamonu, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and
Toxicology, KASTAMONU

²University of Mehmet Akif Ersoy, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine,
BURDUR

³University of Selcuk, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology,
KONYA

⁴University of Selcuk, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, KONYA

⁵University of Erzincan, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, ERZİNCAN

The pharmacokinetics of levofloxacin (4 mg/kg), administered both alone and in combination with the tolfenamic acid (2 mg/kg) and flunixin meglumine (2.2 mg/kg), was established after intravenous administration in sheep. Six healthy Akkaraman sheep (1.5 - 2.4 years and 48 ± 6 kg of body weight) were used for the study. The study was carried out according to a 3-period, 3-treatment longitudinal design with the washout period of 15 days. Plasma levofloxacin concentrations were assayed by the high performance liquid chromatography method and analysed according to the two-compartment open model. Following the administration of levofloxacin alone, the mean distribution half-life, elimination half-life, total clearance, volume of distribution at steady state and area under the plasma concentration-time curve were 0.20 h, 1.82 h, 0.39 L/h/kg, 0.96 L/kg, and $10.40 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$, respectively. Tolfenamic acid and flunixin meglumine caused the slow elimination and increased plasma concentrations of levofloxacin in combination administration. Levofloxacin with an alteration in dosage regimen can be used effectively with tolfenamic acid and flunixin meglumine for a therapeutic effect in the infections and inflammatory conditions in sheep.

Keywords: *Flunixin meglumine, Levofloxacin, pharmacokinetics, sheep, tolfenamic acid.*

Farklı Balık Türlerinden Elde Edilen Mukusun Ratlarda Karrageninle İndüklenen İnflamatuvar Pençe Ödemine Etkileri

Mustafa HİTİT¹, Orhan ÇORUM^{2*}, Mehmet ÖZBEK³, Kamil ÜNEY⁴, Ertuğrul TERZİ⁵, Gökhan ARSLAN⁶,
Adem Yavuz SÖNMEZ⁵

¹Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, KASTAMONU

²Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KASTAMONU

³Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, BURDUR

⁴Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KONYA

⁵Kastamonu Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, KASTAMONU

⁶Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, ERZURUM

*Bu araştırma Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetimi Koordinatörlüğü tarafından desteklendi (Proje No. KU-BAP01/2018-72).

Bu araştırmanın amacı ratlarda karragenin ile indüklenen akut pençe ödeminde, farklı balık türlerinden elde edilen mukusun antiinflamatuvar etkinliğini belirlemektir. Deneysel aşamada toplam 42 adet rat rastgele ve eşit 7 gruba ayrılarak kullanıldı. Akut pençe ödemi ratlara %1'lik 0.1 mL karragenin uygulanarak indüklendi ve Karragenin uygulamasından 1 saat önce ratlara gastrik gavaj yöntemiyle 25 mg/kg tek doz diklofenak ve gökkuşağı alabalığı, kaynak alabalığı, levrek ve çipura balıklarından elde edilen liyofilize mukus uygulandı. Karragenin uygulaması takiben 4. saatte pençe dokuları alındı. Alınan pençe dokuları, hematoksilen-eozin boyamayla histopatolojik ve RT-q(PZR) ile sitokin (*TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *TGF-β*), antioksidan belirteçler (*Cat* ve *SOD*) ve *COX-2* mRNA ekspresyonu yönünden değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirmede, karragenin neden olduğu ödem ve yangısal hücre infiltrasyonunu tüm balık mukuslarının azalttığı belirlendi. Karragenin neden olduğu *IL-1β* mRNA ekspresyonundaki artışı gökkuşağı alabalığı ve çipura balığı mukusu, *IL-6* mRNA ekspresyonundaki artışı ise gökkuşağı ve kaynak alabalığı ile çipura balığı mukusu önemli oranda düşürdü ($P<0.05$). Gökkuşağı alabalığı mukusu uygulanan grupta *SOD* mRNA ekspresyonu karragenin grubuna göre yükseldi ($P<0.05$). Sonuç olarak farklı balık türlerinden elde edilen mukusun antiinflamatuvar etkisi olabilir.

Anahtar Kelimeler: Balık mukus, karragenin, yangı.

Effects of Mucus From Different Fish Species on Carrageenan Induced Inflammatory Paw Edema in Rats

Mustafa HITIT¹, Orhan CORUM², Mehmet OZBEK³, Kamil UNEY⁴, Ertugrul TERZI⁵, Gokhan ARSLAN⁶, Adem Yavuz SONMEZ⁵

¹Kastamonu University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Genetics, KASTAMONU

²University of Kastamonu, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, KASTAMONU

³University of Mehmet Akif Ersoy, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, BURDUR

⁴University of Selcuk, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, KONYA, 42031

⁵University of Kastamonu, Faculty of Fisheries, KASTAMONU

⁶University of Ataturk, Faculty of Fisheries, ERZURUM

* This study was supported by The Coordination Unit of Scientific Research Projects, University of Kastamonu, (Project No. KU-BAP01/2018-72).

The objective of the current study was to determine the anti-inflammatory effects of mucus collected from different fish species on the acute rat paw edema induced by carrageenan. In the experimental stage, forty-two of rats were randomly grouped into seven groups and tested. Acute paw edema was induced by 1 % of 0.1 mL carrageenan, and a single dose of diclofenac and lyophilized mucus of rainbow trout, brook trout, sea bass, and sea bream (25 mg/kg) was administered through gastric gavage one hour prior to carrageenan treatment. Following four hours, rat paws were harvested. In this study, we investigated expressions of cytokines (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, and *TGF- β*), antioxidant makers (*CAT* and *SOD*), and *COX-2* using q(PCR) and also histopathological evaluation was performed by hematoxylin-eosin staining. In the histopathological evaluation, it was determined that treatment of mucus of all fishes diminished carrageenan-induced edema and inflammatory cell infiltration. While upregulation of *IL-1 β* mRNA induced by carrageenan was decreased by the mucus of rainbow trout and sea bream, increase in expression of *IL-6* mRNA was reduced by the mucus of rainbow trout, brook trout, and sea bream ($P < 0.05$). mRNA expression of *SOD* was higher in the rainbow trout mucus group than the carrageenan-induced group ($P < 0.05$). In conclusion, we may conclude that mucus obtained different fishes may anti-inflammatory effects.

Keywords: Carrageenan, inflammation, fish mucus.

Fare, İnsan ve Kedi Beta-1 Adrenerjik Reseptörlerinde GG4 (GXXXG) Motif Farklılıkları

Süleyman AYDIN¹, Ayça ÇAKMAK²

¹ Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, ESKİŞEHİR

² Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, YOZGAT

Beta-adrenerjik reseptörler, beta-1, beta-2 ve beta-3 alt tiplerine sahiptirler. Beta-adrenerjik reseptörlerin, otonom, kardiyovasküler, solunum ve metabolik işlevler üzerinde önemli rol oynadığı ve her üç reseptör alt tipinin sinyal iletiminde Gq tipinde G-proteini üzerinden hücre içinde cAMP miktarını yükselterek etki ettikleri bilinmektedir. Ortak sinyal iletim sistemine karşın, bu reseptör alt tiplerinin kalp, damarlar ve metabolizma üzerinde farklı etkileri olduğu bilinmektedir. Son yıllarda beta-adrenerjik reseptörlerin potasyum, kalsiyum ve geçici potansiyel reseptör (TRP) iyon kanalları ile etkileştikleri gösterilmiştir. Reseptör ve enzimlerin birbirleri ile etkileşmelerinde GXXXG (GG4) motifinin rol oynadığı gösterilmiştir. Reseptör alt tipleri arasındaki farklılıklara ek olarak, türler arasında da farklılık olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, insan, fare ve kedi beta-1 adrenerjik reseptörleri arasında GG4 motif farklılıklarının araştırılması amaçlanmıştır ve bu amaca yönelik olarak, insan, fare ve kedi beta-1 adrenerjik yapısına ait bilgiler UniProt web server kullanılarak elde edildikten sonra GNU/Linux işletim sistemi ve ClustalW programı ile işlenmiştir. Çalışmada incelenen türlere ait beta-1 adrenerjik reseptörlerin hepsinin yapısında GG4 motifinin var olduğu görülmüştür. Fare ve insan reseptörlerinin her birisinde 2 adet, kedi beta-1 adrenerjik reseptör yapısında ise 4 adet GG4 motifi bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ışığında, beta-1 adrenerjik reseptörler ile ilgili araştırmalarda, deney hayvanı olarak fare kullanılmasının daha doğru olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Beta-1 adrenerjik reseptör, biyoinformatik, GG4 motif

GG4 Motif Based Differences Between Beta-1 Adrenergic Receptors of Human, Mouse and Cat.

Süleyman AYDIN¹, Ayça ÇAKMAK²

¹ Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, ESKİSEHİR

² Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, YOZGAT

Beta-adrenergic receptors are classified as beta-1, beta-2 and beta-3 adrenergic receptors. Beta-adrenergic receptors play role on many physiological functions like autonomic, metabolic, cardiovascular and respiratory systems. Gs type G-proteins relay the signals of all three types of beta-adrenergic receptors via increasing the amount of intracellular cAMP but their actions on heart, vessels and metabolism differ. Interactions of these receptors with the potassium-, calcium- and transient receptor potential (TRP) ion channels are reported recently. The interactions of receptors and/or ion channels are mediated by special regions of proteins like GXXXG (GG4) motif. In addition to the receptor subtype based differences, species-specific differences are known to exist. The aim of our study was to investigate GG4 based differences between beta-1 adrenergic receptors of human, cat and mouse. The structural information of beta-1 adrenergic receptors were downloaded from the UniProt web servers and processed using GNU/Linux operating system and ClustalW programme. GG4 motifs were observed on the beta-1 adrenergic receptors of human, cat and mouse. There were four GG4 motifs on the beta-1 adrenergic receptors of cat but only two GG4 motifs on the mouse and human receptors. As a conclusion, the use of mouse will be better choice rather than cat for the experiments on beta-1 adrenergic receptors.

Keywords: *Beta-1 adrenergic receptor, bioinformatics, GG4 motif.*

Plasental Transport Proteinleri ve Çevresel Kirleticiler

Recep UYAR, Begum YURDAKÖK DİKMEN, Yağmur TURGUT, Ayhan FİLAZİ

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Plasentada bulunan trofoblast hücrelerindeki transport proteinleri, ksenobiyotiklerin transplasental yer değişiminde (hücre içerisine alınması, uzaklaştırılması) görev alarak, fetüsü maternal toksinlerden korumakla görevlidir. Çevresel kirleticiler; bu transport proteinleriyle etkileşime girmekte, ifadelerini arttırıp, azaltabilmekte, toksikokinetik ve toksikodinamik yönden işlevsel bozukluklara neden olabilmektedir. Çevresel kirleticiler maruziyetine bağlı olarak işlevselliği değişen ve bozulan membran transportları nedeniyle, bu maddeler plasental bariyeri geçerek plasental kan dolaşımına geçebilmektedir. Bu kirleticiler, fetüste yapısal anomaliler, fonksiyonel bozukluklar, konjenital neoplazi, büyüme geriliği, erken doğum, vitamin D yetersizliği, sistemik inflamasyon, düşük doğum ağırlığı, preterm doğum, erişkin koroner arter ve diyabet hastalıklarına temel oluşturacak epigenetik ve glukoz metabolizmasında değişiklikler, gestasyonel hipertansiyon, preeklampsi, abortus ve fetüs ölümüne neden olabilmektedir. Çevresel kirleticiler arasında kalıcı organik kirleticiler (KOKlar) uzun mesafelere taşınabilmeleri, çevrede kalıcı olmaları, ekosistemde biyoakümüle ve biyomagnifiye olmaları nedeniyle küresel olarak endişe oluşturan kimyasallar olarak değerlendirilmektedir. Yapılan araştırmaların çoğunluğu, kirleticiler miktarının tespiti, kirleticilerin fetüs üzerine etkileri, sınırlı sayıda plasental membran proteinlerinin ifadelerine yönelik olup, özellikle karışım ve düşük doz maruziyeti değerlendirildiğinde, *bunların arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmanın bulunmaması, bu araştırmaların gerçek yaşam maruziyet senaryoları temelinde olmaması, kimyasalların etkilerinin ayrı ayrı değerlendirilmiş olması bu konunun çalışılması gerektiğini ortaya koymaktadır.* Sağlıklı fetal gelişim için maternal-fötal bariyer etkinliğinin belirlenmesinde transplasental proteinlerin işlevini ortaya çıkarılacaktır. İn utero maruziyet nedeniyle, çevresel kirleticilerden uzaklaşabilme imkanı olmayan; organ sisteminin, detoksifikasyon enzim ve diğer mekanizmaların işlevselliğini kazanamamış fetüs, popülasyon içerisinde en duyarlı gruptur. Bu nedenle plasental koruma mekanizmalarından en önemlisi olarak kabul edilen transport proteinlerinin multidisipliner bakış açısıyla araştırılması, çevresel kirleticilerin fetüse geçmesini engelleyecek mekanizmaların oluşturulması ve desteklenmesinde ileri farmakolojik araştırmaların temelini oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Çevresel Kirleticiler, membrane transport proteinleri, plasenta.

Placental Transport Proteins and Environmental Pollutants

Recep UYAR, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN, Yagmur TURGUT, Ayhan FİLAZİ

Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology,
ANKARA

Transport proteins in the trophoblast cells in the placenta are responsible for the transplacental displacement of the xenobiotics (taking them in and out of cells) and protecting the fetus from maternal toxins. Environmental pollutants; they interact with these transport proteins, increase and decrease their expression, and cause toxicokinetic and toxicodynamically functional disorders. Related to membrane transports whose functionality changes and deteriorates due to environmental pollutant exposure, these substances can pass through the placental barrier and into the placental bloodstream. These pollutants; structural anomalies in the fetus, functional disorders, congenital neoplasia, growth retardation, premature birth, vitamin D deficiency, systemic inflammation, low birth weight, changes in epigenetic and glucose metabolism that will form the basis of adult coronary artery and diabetes diseases, gestational hypertension, preeclampsia, abortion and fetus death. Permanent organic pollutants (POPs) among environmental pollutants are considered to be globally concern because they can be transported over long distances, are persistent in the environment, bioaccumulated and biomagnified in the ecosystem. The majority of studies are aimed at determining the amount of pollutant, the effects of pollutants on the fetus, the expression of a limited number of placental membrane proteins, especially when the mixture and low-dose exposure are evaluated, the absence of a study showing the relationship between them however these studies are not based on real life exposure scenarios. The fact that it was evaluated separately reveals that this issue should be studied. The function of transplacental proteins will be revealed in determining maternal-fetal barrier activity for healthy fetal development. Due to in utero exposure, there is no possibility to move away from environmental pollutants; The fetus is the most susceptible group in the population. Therefore, multidisciplinary investigation of transport proteins, considered to be the most important of placental protection mechanisms, will form the basis of advanced pharmacological research in establishing and supporting mechanisms to prevent the transfer of environmental pollutants to the fetus.

Keywords: *Environmental Pollutants, membrane transport proteins, placenta.*

Kitosan Biyopolimeri ile Birlikte Kullanılan Plateletten Zengin Plazmanın (PRP), İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması

Mustafa TÜRK, Melike ATAMAN

Kırıkkale Üniversitesi Biyomhendislik Ana Bilim Dalı, KIRIKKALE

PRP, otolog kanın santrifüj edilmesiyle trombosit miktarının arttırılmasına dayanır ve içerisinde dokuların yenilenmesinde ve yara iyileşmesinde rol oynayan birçok büyüme faktörü ve sitokinler bulunmaktadır. Ayrıca içerdiği antimikrobiyal moleküller sayesinde yara bölgesindeki enfeksiyonların azaltılmasında da görev almaktadır. PRP'nin enjeksiyon ile uygulaması yapılması hedef bölgeye kan dolaşımı ile taşınabilen birçok trombosit ve büyüme faktörleri ulaşabilmesini sağlamaktadır. PRP'nin bu özelliğine ek olarak biyouyumlu polimer olan kitosan ile birlikte kullanılarak fibroblast hücre çoğalmasını ve antimikrobiyal etkinin artmasını amaçladık. Kitosan biyolojik olarak uyumlu ve yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilere sahip doğal bir polimerdir. L929 fibroblast hücre hattında MTT testi yapılarak hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Ölen hücrelerin apoptotik-nekrotik yollardan hangisini seçtiğinin belirlenmesi için hücreler boyanarak floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir. İn vitro yara iyileşmesi çalışması ile iki boyutlu olarak yara kapanması değerlendirilmiştir. Bu çalışma, kitosan ile birlikte kullanılan PRP'nin yara iyileşmesini arttırabileceğini ileri sürmüştür. Antibakteriyel ve antifungal etkilerini incelemek için mikro dilüsyon testi (MIC) testi, biyofilm oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla kristal viyole ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Antimikrobiyal çalışmalarda *Staphylococcus aureus* (*S.Aureus*), *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), *Metisiline dirençli Staphylococcus aureus* (MRSA), *vankomisine dirençli enterokoklar* (*VRE*), *Escherichia coli* (*E.Coli*), *Candida albicans* mikroorganizmaları kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kitosan biyopolimeri ile birlikte kullandığımız PRP'nin diğer gruba göre hücre canlılığını, yara kapanma oranını daha fazla arttırdığı ve antibakteriyel etki gösterdiği görülürken antifungal etki göstermemiştir. *E.coli*, *S. mutans* ve *S. Aureus* bakterilerinde biyofilm oluşmunun engellendiği ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, hücre kültürü, kitosan, plateletten zengin plazma.

Investigation of In Vitro Efficacy of Platelet Rich Plasma (PRP) Used with Chitosan Biopolymer

Mustafa TÜRK, Melike ATAMAN

Kırıkkale University, Department of Bioengineering, KIRIKKALE

PRP is based on increasing the amount of platelets by centrifuging autologous blood and contains many growth factors and cytokines that play a role in the regeneration of tissues and wound healing. In addition, thanks to the antimicrobial molecules it contains, it also take a part in reducing infections in the wound area. The application of PRP by injection allows many platelets and growth factors to reach the target site by blood circulation. In addition to this feature of PRP, we aimed to increase fibroblast cell proliferation and antimicrobial effect by using with biocompatible polymer chitosan. Chitosan is very biocompatible natural polymer which has positive effect on wound healing. Cell viability was measured by MTT test in L929 fibroblast cell line. In order to determine the apoptotic-necrotic pathway of died cells, staining was done and analyzed by fluorescence microscopy. Two-dimensional wound closure was evaluated with the in vitro wound healing studies. This study suggested that PRP used in combination with chitosan could enhance wound healing. Micro dilution test (MIC) test was used to investigate the antibacterial and antifungal effects, and crystal violet staining method was used to determine whether they form biofilms. *Staphylococcus aureus* (S.Aureus), *Streptococcus mutans* (S.mutans), Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin resistant enterococci (VRE), *Escherichia coli* (E.Coli) and *Candida albicans* microorganisms were used in antimicrobial studies. According to our results, PRP which we used together with chitosan biopolymer increased the cell viability, wound closure rate and antibacterial effect more than the other group, but did not show antifungal effect. Biofilm formation was prevented in E.coli, S. mutans and S. Aureus bacteria.

Keywords: Antimicrobial, cell culture, chitosan, platelet rich plasma.

Hastalıklarda Mitokondriyal Disfonksiyonun Rolü

Hatice ESER FAKI, Bünyamin TRAŞ

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KONYA

Mitokondriler, solunum zinciri veya elektron taşıma zinciri (ETZ) içinde meydana gelen oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla, hücresel enerjinin ana kaynağı olan adenosin trifosfat (ATP) üretiminde rol oynayan sitoplazmik organellerdir. Hücrenin homeostazının sürdürülmesi ve enerji üretiminin sağlanmasında mitokondriler önemlidir. Mitokondriyal disfonksiyonlar genel olarak ATP seviyesi, ETZ enzim aktiviteleri, mitokondriyal DNA (mtDNA), mitokondriyal içerik, mitokondriyal membran potansiyeli, ROS üretimi, bozulmuş apoptoz, laktat seviyesi ve hücre içi kalsiyum içeriği gibi çok sayıda mitokondriyal fonksiyon göstergelerindeki bozukluklarla tanımlanır. Mitokondriyal disfonksiyonun nedenleri mitokondriyal ve genomik DNA mutasyonları, süper kompleks destabilizasyon, mitokondriyal protein birikimleri, endoplazmik retikulum stresi, yaşlanma, statin gibi ksenobiyotiklere maruz kalma ve modern yaşam tarzıdır. Hücre içinde sağlıklı mitokondri varlığı füzyon, fragmentasyon ve mitofaji arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengenin bozulması tüm hücre fonksiyonlarını farklı şekilde etkiler. Bozulan mitokondri dinamiği, mitokondri işlevinin bozulmasına ve hücrede enerji açığının oluşmasına ve bu olayların sonucunda bazı hastalıkların gelişimine neden olur. Mitotik hücrelerde kanser oluşumuna neden olan bu mekanizma, post-mitotik hücrelerde ise nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır. Mitokondriyal disfonksiyonların, karaciğer, kalp, kas, böbrek ve sinir gibi yüksek enerji ihtiyacı olan organların hastalıklarının etiolojisinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu sunum çeşitli hastalıklarda mitokondriyal disfonksiyonun rolünü ortaya koymak ve bu hastalıklarda erken terapötik müdahale için mitokondrilerin hedef olarak düşünülebileceği hakkında bilgi vermeyi amaçlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Adenosin trifosfat, hücre homeostazı, mitokondri, mitokondriyal DNA

The Role of Mitochondrial Dysfunction in Diseases

Hatice ESER FAKI, Bunyamin TRAS

University of Selcuk, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology,
KONYA

Mitochondria are cytoplasmic organelles that play a role in the production of adenosine triphosphate (ATP), the main source of cellular energy through oxidative phosphorylation (OXPHOS) that occurs within the respiratory chain or electron transport chain (ETC). Mitochondria play an important role in maintaining cell homeostasis and energy production. Mitochondrial dysfunctions are generally characterized by impairments in numerous mitochondrial function indicators such as ATP level, ETC enzyme activities, mitochondrial DNA (mtDNA), mitochondrial content, mitochondrial membrane potential, ROS production, impaired apoptosis, lactate level and intracellular calcium content. The causes of mitochondrial dysfunction are mitochondrial and genomic DNA mutations, supercomplex destabilization, mitochondrial protein accumulations, endoplasmic reticulum stress, aging, exposure to xenobiotics such as statins, and modern lifestyle. The presence of healthy mitochondria in the cell depends on the balance between fusion, fragmentation and mitophagia. Disruption of this balance affects all cell functions differently. Impaired mitochondrial dynamic causes disruption of mitochondrial function and the formation of energy deficit in the cell and the development of certain diseases as a result of these events. This mechanism, which causes cancer formation in mitotic cells, causes neurodegenerative diseases in post-mitotic cells. It is known that mitochondrial dysfunction plays a role in the etiology of diseases of organs with high energy needs such as liver, heart, muscle, kidney and nerve. This presentation aims to reveal the role of mitochondrial dysfunction in various diseases and to give information about the mitochondria as a target for early therapeutic intervention in these diseases.

Keywords: Adenosine triphosphate, cell homeostasis, mitochondria, mitochondrial DNA

Oksitetrasiklin İçeren Veteriner Müstahzarların Etken Madde Düzeyleri Üzerine Farklı

Saklama Şartlarının Etkileri

Shahram SAGHAEI¹, Ender YARSAN²

¹Orumieh İslamik Azad Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Çalışmanın amacı, veteriner hekimlikte yaygın şekilde kullanılan antibakteriyel ilaçlardan Oksitetrasiklinin farklı saklama koşullarında etken madde düzeylerinin değerlendirilmesidir. Bu kapsamda olacak şekilde açılmamış haldeki orjinal ambalajlarında ve kapağı açılmış şekildeki ilaçlar oda ısısında, karanlıkta ve buzdolabı ortamında farklı sürelerde bekletilerek etkin madde analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 100 mg/ml etkin madde oksitetrasiklin içeren iki müstahzar incelendi. Bu amaçla aynı seri numarasına sahip 5'er ilaç farklı saklama koşullarında muhafaza edildi, başlangıçta, 3, 6 ve 9. aylarda etkin madde miktarları analizleri yapıldı. Miktar analizleri HPLC ile gerçekleştirildi. Ayrıca ilaçların kullanıma süreleri dikkate alınarak; kapağı açılan ilaçlardan 24 ve 48. saatlerde de analizler yapıldı. Analizler sonucu elde edilen veriler rakamsal olarak (ppm ve grafikte etkin madde miktarıyla) değerlendirildi.

Oksitetrasiklin içeren (geleneksel) ve normal oda şartlarında muhafaza edilen A ve Yeni kapağı açılmış ilaç için 3., 6. ve 9. ayda elde edilen sonuçlar sırayla 6.14 ± 0.32 , 6.50 ± 0.19 ; 5.58 ± 0.00 , 6.38 ± 0.20 ve 6.08 ± 0.10 , 6.45 ± 0.32 ppm olarak elde edildi. Karanlıkta muhafaza edilen A ve yeni kapağı açılmış ilaç için 3., 6. ve 9. ayda elde edilen sonuçlar sırayla 6.29 ± 0.27 , 6.37 ± 0.34 ; 5.30 ± 0.04 , 6.30 ± 0.17 ve 5.97 ± 0.13 , 5.86 ± 0.06 ppm olarak; buzdolabı şartlarında muhafaza edilen A ve yeni kapağı açılmış ilaç için de 3., 6. ve 9. ayda elde edilen sonuçlar sırayla 7.55 ± 0.15 , 7.48 ± 0.11 ; 5.36 ± 0.05 , 5.81 ± 0.20 ve 6.06 ± 0.36 , 5.72 ± 0.07 ppm olarak belirlendi. A ve B spesiyaliteleri analiz dönemlerinde olacak şekilde birbiriyle de karşılaştırıldı. Buna göre normal oda şartlarında muhafaza edilen A ve B ilaçları için başlangıçta, 24.saat, 48.saat, 3., 6., ve 9. aylarda gerçekleştirilen analizlerde etken madde düzeyleri sırasıyla (8.35 ± 0.26 , 7.77 ± 0.55), (8.10 ± 1.02 , 7.82 ± 0.20), (7.50 ± 0.58 , 7.17 ± 0.36), (6.14 ± 0.32 , 6.88 ± 0.20), (5.58 ± 0.00 , 4.90 ± 0.16) ve (6.08 ± 0.10 , 6.08 ± 0.05) ppm olarak tespit edildi. Karanlık şartlarında muhafaza edilenler için; sırasıyla (8.76 ± 0.43 , 8.42 ± 0.25), (8.02 ± 0.61 , 7.65 ± 0.48), (8.14 ± 0.08 , 7.07 ± 1.28), (6.29 ± 0.27 , 6.37 ± 0.10), (5.30 ± 0.04 , 6.07 ± 0.26) ve (5.97 ± 0.13 , 5.40 ± 0.72) ppm olarak; buzdolabı şartlarında muhafaza edilenler için de (7.24 ± 0.49 , 7.33 ± 0.36), (9.07 ± 0.27 , 8.20 ± 0.00), (7.54 ± 0.62 , 7.23 ± 0.25), (7.55 ± 0.15 , 6.94 ± 0.40), (5.36 ± 0.05 , 6.23 ± 0.03) ve (6.06 ± 0.36 , 5.26 ± 0.19) ppm olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Etken madde, ilaç, oksitetrasiklin, saklama şartları, veteriner.

Active Matter Levels in the original and open forms of the veterinary preparations kept under different storage conditions and containing oxytetracycline

Shahram SAGHAEI¹, Ender YARSAN²

¹Islamic Azad University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Pharmacology and Toxicology, IRANIAN

²Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pharmacology and Toxicology, ANKARA

The purpose of the study is to evaluate the active matter level of oxytetracycline, which are used widely in veterinary medicine. Within this scope, the preparations in their original packages and in opened packages have been kept under room temperature, in the dark and in the refrigerator for different periods and they have been analyzed for active matters. For this purpose, 1 preparations containing oxytetracycline (100 mg/ml of active matter), have been examined. 5 each drugs with the same serial number for each preparation have been kept under different storage conditions. Initially, active matter quantities have been analyzed in the 3st, 6rd and 9th months. Quantities have been analyzed by means of HPLC. Besides, considering the life cycles of the drugs, those with open packages have been analyzed in the 24th and 48th hours as well. The data, obtained as a result of analysis have been evaluated quantitatively (ppm and active matter quantity in graphics). The results obtained from a drug A containing oxytetracycline (traditional) and kept under normal room conditions and from a newly unwrapped drug in the 3st, 6rd and 9th months are given below respectively: (6.14±0.32, 6.50±0.19), (5.58±0.00, 6.38±0.20) and (6.08±0.10, 6.45±0.32) ppm. The results obtained from a drug A, kept under the dark and from a newly unwrapped drug, in the 3st, 6rd and the 9th months are given below respectively: (6.29±0.27, 6.37±0.34), (5.30±0.04, 6.30±0.17) and (5.97±0.13, 5.86±0.06) ppm. The results obtained from a drug A, kept in the refrigerator and from a newly unwrapped drug, in the 3st, 6rd and 9th months are given below respectively: (7.55±0.15, 7.48±0.11), (5.36±0.05, 5.81±0.20) and (6.06±0.36, 5.72±0.07) ppm. The specialities of A and B have been compared during analysis periods. Thus, active matter levels obtained from the drugs A and B initially under normal room conditions in 24 hours, 48 hours, 3st, 6rd and 9th months are determined respectively as follows: (8.35±0.26, 7.77±0.55), (8.10±1.02, 7.82±0.20), (7.50±0.58, 7.17±0.36), (6.14±0.32, 6.88±0.20), (5.58±0.00, 4.90±0.16) and (6.08±0.10, 6.08±0.05) ppm. The results from the drugs kept under the dark are as follows respectively: (8.76±0.43, 8.42±0.25), (8.02±0.61, 7.65±0.48), (8.14±0.08, 7.07±1.28), (6.29±0.27, 6.37±0.10), (5.30±0.04, 6.07±0.26) and (5.97±0.13, 5.40±0.72) ppm. The results from the drugs kept in the refrigerator are as follows respectively: (7.24±0.49, 7.33±0.36), (9.07±0.27, 8.20±0.00), (7.54±0.62, 7.23±0.25), (7.55±0.15, 6.94±0.40), (5.36±0.05, 6.23±0.03) and (6.06±0.36, 5.26±0.19) ppm.

Keywords: Active matter, drug, oxytetracycline, storage conditions, veterinary.

Hayvan Yetiştiriciliği ve Gıda Üretim Yerlerinde Dezenfektan Kullanımı

Cansu ÖNCÜ ALGAN, Emine BAYDAN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Hayvancılık işletmelerinin toplum ve çevre sağlığına zarar vermeyen, çevre kirliliğine sebep olmayan, hayvan sağlığı ve gıda güvenliği ile ilgili tüm mevzuatları uygulayan, hayvan refahını ve güvenliğini sağlayacak şekilde kurulması gerekir. Gıda işletmelerinde hijyen, besinlerin üretimi, muhafazası ve taşınması aşamalarını kapsar. Tüm bu aşamalara ek olarak besinlerin satış ve tüketiminin sağlığa uygun koşullarda yapılmasını içerir. Hayvan yetiştiriciliği ve gıda işletmelerinde uygulanan dezenfeksiyonun amacı; mikroorganizma sayısını, hayvan sağlığını ve gıda hijyenini bozabilecek, tüketicinin sağlığını etkileyecek seviyelerin altına düşürmektir. Bu nedenle, bulaşık mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaştırılması, üremelerinin önlenmesi ve yeniden bulaşmalarının engellenmesi gerekmektedir. Uygulanan dezenfeksiyonun başarısı; ortamın temizlik derecesine, yüzey koşullarına, mevcut mikroorganizma türüne, ortam sıcaklığına, seçilen dezenfeksiyon tipine ve uygulama şekline bağlı olarak değişiklikler gösterir. Bu yazıda yetiştiricilikte ve gıda işletmelerinde kullanılacak olan dezenfektanların seçiminde nelere dikkat edilmesi gerektiği, temizlik ve dezenfeksiyon basamakları, uygulanan dezenfeksiyon yöntemleri ve kullanım alanlarına göre dezenfektanların belirtilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dezenfektan, gıda, hayvancılık işletmeleri.

Use of Disinfectants in Food Production Areas and Animal Breeding

Cansu ÖNCÜ ALGAN, Emine BAYDAN

Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pharmacology and Toxicology,
ANKARA

Animal breeding facilities must be established in a manner that they do not harm public and environmental health and cause environmental pollution while they apply all the regulations related to animal health and food safety and ensure animal welfare and security. Hygiene in food production facilities includes the stages of food production, preservation and transportation. In addition to all these steps, hygiene in food production facilities includes the sale and consumption of nutrients under the conditions consistent with health. The aim of disinfection applied in animal breeding and food production facilities is to reduce the number of microorganisms below the levels which might impair the animal health and food hygiene and affect the health of the consumer. Therefore, it is necessary to remove the contaminated microorganisms, prevent their reproduction and re-contamination. The success of the disinfection applied changes depending on the cleanliness degree the environment, surface conditions, the type of present microorganism, the ambient temperature, the type of disinfection selected and the method of application. In this article, it is aimed to give information about the parameters that should be considered in the selection of disinfectants for their use in animal breeding and food production facilities and also about cleaning and disinfection steps, disinfection methods which are being applied and disinfectants based on their area of use.

Keywords: *Animal breeding facilities, disinfectan, food.*

Çad'da Antidiyabetik Olarak Kullanılan Bitkiler

Allafouza Tidjani MAHAMAT, Levent ALTINTAŞ

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Afrika Kıtası çok sayıda, çeşitli şifalı bitki barındırır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, Afrika halkının %80'inden fazlası sağlık problemleriyle başa çıkmak için geleneksel tıp ve farmakopesi tercih etmektedir. Dünyada 300.000'den fazla şifalı bitki türü vardır ve bunların da 200.000'den fazlası Afrika'nın tropikal bölgelerinde yetişir. Bitkilerde bulunan, özellikle alkaloidler, flavonoidler ve tanenler gibi etkin gruplar; hipoglisemik veya antidiyabetik aktivitede önemli etkiye sahiptir ve bu durum yapılan çalışmalar ile de ortaya konmuştur. Yalnız; tedavi amacıyla kullanılan bitkisel ürünler; farmasötik ilaçlara göre, hafif de olsa daha zehirli olarak kabul edilir. Bu sebeplerle de artık günümüzde ilaç endüstrisi, bitkiler üzerinde yapılan etnobotanik çalışmalara daha fazla önem verir duruma gelmiştir.

Çad'da yetişen antidiyabetik etkiye sahip bitkilerin başlıcaları; *Boscia senegalensis* (Pers.) (Cappardiaceae), *Picralima nitida* Stapf (Apocynaceae), *Vernonia colorata* Drake (Asteraceae), *Colocynthis vulgaris* Schrad. (Cucurbitaceae), *Bauhinia rufescens* Lam (Fabaceae), *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), *Eucalyptus citriodora* (Hook) (Myrtaceae), *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich) Murno (Poaceae), *Sclerocarya birria* (A. Rich) Hochst (Anacardiaceae), *Mitragina inermis* O. Kuntz (Rubiaceae)'dir.

Bu çalışmada; Çad'da yetişen ve hipoglisemik etkiye sahip olan bazı bitkilerin; dağılımları, morfolojik özellikleri ve tedavi amacıyla kullanımlarına yönelik genel bir bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antidiyabetik bitkiler, çad, geleneksel tıp.

Antidiabetic Plants Used in Chad

Allafouza Tidjani MAHAMAT, Levent ALTINTAŞ

Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology,
ANKARA

The African continent is home to numerous, varied medicinal plants. According to the World Health Organization, more than 80% of African people prefer traditional medicine and pharmacopoeia to cope with health problems. There are over 300,000 species of medicinal plants in the world, of which more than 200,000 grow in tropical regions of Africa. Active groups in plants, in particular alkaloids, flavonoids and tannins; has effect hypoglycemic or antidiabetic activity, and this situation has been demonstrated by studies. Alone; herbal products used for therapeutic purposes; It is considered to be more toxic effect has, albeit mildly, than pharmaceutical drugs. For these reasons, nowadays, the pharmaceutical industry gives more importance to ethnobotanical studies on plants.

The main antidiabetic plants grown in Chad are; *Boscia senegalensis* (Pers.) (Cappardiaceae), *Picralima nitida* Stapf (Apocynaceae), *Vernonia colorata* Drake (Asteraceae), *Colocynthis vulgaris* Schrad. (Cucurbitaceae), *Bauhinia rufescens* Lam (Fabaceae), *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), *Eucalyptus citriodora* (Hook) (Myrtaceae), *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich) Murno (Poacea), *Sclerocarya birria* (A. Rich) Hochst (Anacardiaceae), *Mitragina inermis* O. Kuntz (Rubiaceae).

It is purposed in this study for some information antidiabetic plants grown in Chad about distributions, morphological characteristics and their use for therapeutic purposes.

Keywords: *Antidiabetic plants, chad, traditional medicine.*

Bazı Organik Klorlu Bileşikler ve Poliklorlu Bifenillerin Balık Hücre Hattı Üzerindeki Proliferatif/Antiproliferatif Etkisi

Orhan TOKUR, Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi AD, SAMSUN

Endüstriyel gelişim her yıl çok sayıda kimyasal maddenin doğaya karışmasına neden olmaktadır. Bazı kimyasalların kullanımları toksik etkileri nedeniyle yasaklanmış veya kısıtlanmış, bazılarının kullanımları ise halen tartışmalıdır. Bunlar arasında, sağlık üzerindeki çok sayıda olumsuz etkisi ispatlanan poliklorlu bifeniller (PCB'ler) ve organik klorlu bileşiklerin (OC'ler) kullanımları 1970'li yıllardan itibaren birçok ülke tarafından yasaklanmıştır. Bu maddeler endokrin ve reproduktif sisteme zarar vermekte, kansere yol açmalarının yanında hücre büyümesi ve proliferasyonunu etkilemekte ve ayrıca yasaklanmalarının üzerinden 40 yılı aşkın süre geçmesine rağmen halen çevresel ve biyolojik örneklerde tespit edilmektedirler. Bazı araştırmalarda PCB ve OC'lerin östrojenik etkileri ile hücre proliferasyonunu artırdığı belirtilirken bazı araştırmalarda ilgili bileşiklerin antiproliferatif etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, PCB ve OC'lerin proliferatif/antiproliferatif etkisi, önemli akuatik kirleticiler olmaları dolayısıyla EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprinii*) balık hücre hattı üzerinde *in vitro* olarak araştırılmıştır. 9 farklı OC bileşiği (Grup 1; 2,4-DDT, 4,4-DDT, 2,4-DDE, 4,4-DDE, gamma-HCH, beta-HCH, alpha-HCH, hexachlorobenzene, aldrin) ve 9 farklı PCB (Grup 2; PCB-28, PCB-52, PCB-70, PCB-99, PCB-118, PCB-138, PCB-153, PCB-180, PCB-208) bileşiği hücre vasatı içerisinde 25 ng/mL ve 100 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanarak JULI-BR canlı hücre görüntüleme sistemi ile 72 saatlik proliferasyon testi gerçekleştirilmiştir. Test sonucunda kontrol grubu (% 166) ile karşılaştırıldığında; PCB grubunun 25 ng/mL konsantrasyonda proliferasyonda önemli bir değişikliğe yol açmadığı (%181), 100 ng/mL konsantrasyonda ise proliferasyonu durdurduğu (% 7); OC grubunun 25 ng/mL konsantrasyonda proliferasyonu durdurduğu (% 8), 100 ng/mL konsantrasyonda ise proliferasyonu durdurduğu ve bir miktar azalttığı (- % 16) tespit edilmiştir. Çalışmada denenen konsantrasyonlarda PCB ve OC'lerin antiproliferatif etki gösterdiği, doza bağımlı olarak özellikle OC bileşiklerin proliferasyon üzerindeki baskılayıcı etkilerinin daha şiddetli olduğu ve daha geniş doz aralıkları ile yapılacak denemelere ihtiyaç duyulduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Organik klorlu bileşikler, poliklorlu bifeniller, proliferasyon.

Proliferative/Antiproliferative Effect of Selected Organochlorine Compounds (OCs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on A Fish Cell Line

Orhan TOKUR, Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, SAMSUN

Industrial development causes many chemicals to enter the environment every year. Some chemicals have banned or restricted due to their toxic effects, while others are still controversial. Among these, the use of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine compounds (OCs), that have been shown to have many adverse effects on health, have been banned by many countries since the 1970s. PCBs and OCs usually affect the endocrine and reproductive systems, besides being known to cause cancer; they also affect cell growth and proliferation. Although over 40 years have passed since their ban, they are still detected in environmental and biological samples. In some studies, it was stated that PCB and OCs increase cell proliferation due to their estrogenic effects, while in others it has been shown that PCBs and OCs have inhibitory effects on cell proliferation. In this study, the proliferative / antiproliferative effects of PCBs and OCs were investigated *in vitro* on EPC (*Epithelioma papulosum cyprinii*) fish cell line as these substances are important aquatic pollutants. 9 different OC compounds (Group 1; 2,4-DDT, 4,4-DDT, 2,4-DDE, 4,4-DDE, gamma-HCH, beta-HCH, alpha-HCH, hexachlorobenzene, aldrin) and 9 different PCBs (Group 2; PCB-28, PCB-52, PCB-70, PCB-99, PCB-118, PCB-138, PCB-153, PCB-180, PCB-208) were prepared in medium at 100 ng / mL and 25 ng / mL concentrations and 72 hours proliferation test was performed with JULI-BR live cell analyzer. When compared with the control group (166%) it was found that; PCB group did not cause a significant change in proliferation at a concentration of 25 ng / mL (181%), but proliferation ceased at a concentration of 100 ng / mL (7%); OC group ceased proliferation at a concentration of 25 ng / mL (8%) and besides ceasing proliferation, total number of cells decreased slightly (-16%) at a concentration of 100 ng / mL concentration. It was understood that PCBs and OCs showed antiproliferative effect at the tested concentrations, and the antiproliferative effect of OC compounds were more severe dose-dependently. It was concluded that more studies with wider dose ranges are needed to explain the effects of PCBs and OCs on proliferation.

Keywords: Organochlorine compounds, polychlorinated biphenyls, proliferation.

İneklerde Kuru Dönem Tedavisinde Cephapirin Benzathine ile Cephapirin Benzathine+Proteolitik Enzimlerin Etkinliğinin Karşılaştırılması

Merve SARIOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri

Bu çalışmada, subklinik mastitisli süt ineklerinde, kuru dönem tedavisinde; cephapirin benzathine ile cephapirin benzathine+proteolitik enzim içeren ticari preparatın karşılaştırılarak; proteolitik enzimlerin etkinliği ve antibiyotik tedavisine olan etkisi ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmanın materyalini en az bir laktasyon dönemi geçirmiş ineklerde yapılan klinik muayaneler, California Mastitis Test (CMT), Somatik Hücre Sayısı (SHS) ve mikrobiyolojik incelemeler sonucunda *Staphylococcus aureus* ile enfekte olduğu tespit edilen 81 subklinik mastitisli meme lobu oluşturmuştur. Gruplardaki inekler aseptik şartlara uyularak kuruya ayrılmıştır. Birinci gruba 300 mg Cephapirin benzathine, 10 mg tripsin ve 10 mg kemotripsin içeren ticari kuru dönem preparatı uygulanırken, ikinci gruba sadece 300 mg cephapirin benzathine içeren preparasyon verilmiştir. Kontrol grubuna karşılaştırmak amacıyla ilacın taşıt maddesini içeren aseptik meme tüpü uygulanmıştır. Dördüncü gruba ise sadece 10 mg tripsin ve 10 mg kemotripsin içeren meme tüpü uygulanmıştır. Kuruya çıkarılan ineklerden alınan süt örneklerinin SHS verileri normal dağılıma uygun hale gelmesi için Logaritma 10 tabanında dönüşüm uygulanmıştır. Buna göre Grup 1'in postpartum 2. hafta alınan örneği 5,09 bulunurken, Grup 2'nin postpartum 2.hafta SHS 5,17 Grup 3'ün postpartum 2.hafta SHS 5,66, Grup 4'ün ise 5,36 bulunmuştur. Gruplar arası postpartum 2. hafta sayısal ve istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmazken Grup 1 ve Grup 2'deki dönemler arası SHS değerleri istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Grup 1 $P<0,006$; Grup 2 $P<0,008$).

Mikrobiyolojik olarak prepartum ve postpartum 1. ve 2. haftadaki iyileşme oranları karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmiştir ($P< 0,001$). Ancak, postpartum 1. ve 2. haftadaki mikrobiyolojik iyileşme, gruplar arasında sadece sayısal olarak fark göstermiştir ($p > 0,05$).

Sonuçlar değerlendirildiğinde mikrobiyolojik iyileşme yönünden Grup 1, Grup 2 ve Grup 4'te istatistiki olarak farkın önemli olduğu, ancak Grup 4'teki iyileşme oranının diğer gruplara göre sayısal olarak yüksek çıkması sadece enzim uygulamalarının *S. aureus*'ların neden olduğu subklinik ve/veya klinik mastitislerde tercih edilebileceğini kanaatini oluşturmuştur.

Anahtar kelimeler: Cephapirin benzathine, inek, Kuru dönem, proteolitik enzim, subklinik mastitis.

Comparison of Effectiveness of Cephapirin Benzathine and Cephapirin Benzathine+Proteolytic Enzymes in the Treatment of Dry off in Cows

Merve SARIOĞLU

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences, KAYSERİ

In this study, it was aimed to put forth in dry cows in subclinical mastitis dairy cows; comparing the commercial preparation containing cephalixin benzathine and cephalixin benzathine + proteolytic enzyme; the efficacy of proteolytic enzymes and their effect on antibiotic therapy.

The material of the study consisted of 81 subclinical mastitis breast lobes infected with *Staphylococcus aureus* as a result of clinical examinations, California Mastitis Test (CMT), Somatic Cell Count (SCC) and bacteriological examinations performed in cows that had at least one lactation period. The udder drying off quarters lobes included in the study were distributed equally among the groups according to the severity of the infection and the type of agent. The cows in the group were separated into the drying off quarters according to aseptic conditions. The first group received 300 mg of Cephalixin benzathine, 10 mg of trypsin and 10 mg of chemotrypsin, while the second group received only 300 mg of cephalixin benzathine. Aseptic mammary tube containing vehicle substance of the drug was applied to the control group for comparison. The fourth group received a mammary tube containing only 10 mg trypsin and 10 mg chemotrypsin. In order to make the SCC data of the milk samples taken from dry cows suitable for normal distribution, transformation was performed on Logaritma 10 base. According to this, it was found that the sample taken in Group 1 in Postpartum 2nd week was 5.09, while SCC 5.17 in Group 2 postpartum 2nd week was SCC 5.66 in Postpartum 2nd week and 5.36 in Group 4. While there was no statistically significant difference between the groups in the postpartum 2nd week, SCC values between the periods, in Groups 1 and 2 were found to be statistically significant.

When the microbiological recovery rates of prepartum and postpartum 2 weeks were compared, a statistically significant difference was found ($p < 0.001$). However, microbiological improvement at postpartum 2 weeks showed only numerical differences between the groups ($p > 0.05$).

Key words: Cow, dry period, cephalixin benzathine, proteolytic enzyme subclinical mastitis.

Kedilerde ve Köpeklerde Ağır Metal Maruziyetinin Belirlenmesi

Handan Hilal ARSLAN¹, Oğuzhan YAVUZ², Duygu TARHAN³,
Özge MARANGOZ², Başar Ulaş SAYILKAN¹, Alev Meltem ERCAN³,
 Ercan KARABULUT⁴, Mehmet Erman OR⁵

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları AD, SAMSUN

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, SAMSUN

³İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik AD, İSTANBUL

⁴Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, ANKARA

⁵İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları AD, İSTANBUL

Ağır metaller, özellikle sanayi bölgeleri ve büyük şehirlerde insan ve evcil hayvanlar için günümüzün en önemli çevre kirleticileri arasında yer almaktadır. Bu çalışmada kedi ve köpeklerde önemli ağır metallerle maruziyetin belirlenmesi ve tespit edilen ağır metal yoğunlukları ile tür, yaş, cinsiyet gibi faktörler arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmanın ilk etabında, büyük şehirde yaşayan 8 kedi (5 dişi ve 3 erkek) ve 16 köpekten (7 dişi ve 9 erkek) kan ve serum örnekleri alınarak, krom (Cr), bakır (Cu), mangan (Mn), çinko (Zn), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve arsenik (As) seviyeleri İndüktif Olarak Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES) yöntemi ile ölçüldü. İncelenen ağır metallerin hepsi çeşitli yoğunluklarda en az bir örnekte tespit edildi. Cr, Cu, Mn ve Zn hem kedi hem de köpeklerde bütün örneklerde tespit edilirken, en az bulunan ağır metal As oldu (her iki türde n=4). Türler arası karşılaştırmada Cd (kedi ve köpeklerde sırasıyla 0.10 ± 0.00 ve 0.32 ± 0.29 µg/dL) ve Pb (kedilerde 1.81 ± 2.82 µg/dL, köpeklerde 7.06 ± 9.11 µg/dL) yoğunluklarının istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0.05$). Cinsiyetler arası farka bakıldığında kedilerde hiçbir parametrede fark bulunmazken ($p > 0.05$), köpeklerde Cu seviyesinin dişilerde daha yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Hayvanların yaşı açısından hiçbir ağır metal için istatistiksel bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Bu çalışma ile kedi ve köpeklerde incelenen bütün ağır metallere farklı yoğunluklarda maruziyet olduğu görüldü ve insanlarla çok yakın ilişkide olan bu hayvanlardaki maruziyetin periyodik aralıklarla izlenmesi ve daha geniş gruplarda yaşam ortamı, beslenme alışkanlıkları, vücuttaki eser elementler gibi diğer faktörlerle birlikte değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Ağır metal, kedi, köpek, kan, serum.

The Evaluation of Heavy Metal Exposure in Cats and Dogs

Handan Hilal ARSLAN¹, Oğuzhan YAVUZ², Duygu TARHAN³,
Özge MARANGOZ², Başar Ulaş SAYILKAN¹, Alev Meltem ERCAN³,
 Ercan KARABULUT⁴, Mehmet Erman OR⁵

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University,
 SAMSUN

²Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs
 University, SAMSUN

³Department of Biophysics, Cerrahpasa Medical Faculty, Istanbul University-Cerrahpasa, ISTANBUL
⁴Yıldırım Beyazıt University, ANKARA

⁵Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa,
 ISTANBUL

Today, heavy metals are among the most important pollutants, especially in industrial and urban areas. In this study, the determination of heavy metal exposure in cats and dogs and relationships between some factors, such as species, age, gender, were aimed. Blood and serum samples were collected from 8 cats (5 females and 3 males) and 16 dogs (7 females and 9 males), which were living in urban areas, and chrome (Cr), copper (Cu), manganese (Mn), zinc (Zn), cadmium (Cd), lead (Pb) and arsenic (As) levels were measured by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) technique in the first stage of the study. All the investigated heavy metals were detected in at least one sample. While Cr, Cu, Mn, and Zn were detected in all samples, As was the least detected heavy metal (n=4 for each species). For the comparison of species, Cd (0.10 ± 0.00 and 0.32 ± 0.29 µg/dL in cats and dogs, respectively) and Pb (1.81 ± 2.82 µg/dL in cats, 7.06 ± 9.11 µg/dL in dogs) concentrations were observed statistically different ($p < 0.05$). There was no difference between genders in cats ($p > 0.05$), however, Cu levels were determined higher in females in dogs ($p < 0.05$). There was no statistical difference between the ages of animals for all heavy metals ($p > 0.05$). In this study, heavy metal exposures were observed in different concentrations in cats and dogs and it was concluded that the exposure of heavy metals in these animals, which are in close relationship with humans, should be periodically monitored and evaluated with other factors, such as living environment, feeding behaviours, trace elements in the body.

Key words: Blood, cat, dog, heavy metal, serum.

Pharmacokinetics and Tissue Residues of Meloxicam in Geese: Computing A Theoretical Effective Dose

I. Sartini¹, B. Łebkowska-Wieruszewska², A. Lisowski², A. Poapolathep³, M. Giorgi⁴

¹University of Sassari, Sassari, ITALY

²University of Life Sciences, Lublin, POLAND

³Kasetsart University, Bangkok, THAILAND

⁴University of Pisa, Pisa, ITALY

Meloxicam (MLX) is one of the most commonly NSAIDs used in veterinary medicine to relieve pain. Although its wide use, no report exists about its pharmacokinetics in the goose. The purpose of this study was two-folds: I) to determine the pharmacokinetic profile of MLX in geese after intravenous (IV) and oral (PO) administration and II) to assess tissue residues in muscle, heart, liver, lung and kidney. Ten clinically normal females of Bilgoraska geese underwent a 3phase parallel study with a 3-week washout period. In phase I animals received MLX (0.5 mg/Kg) by IV administration; the blood was collected up to 48h. In the phase II and III geese were treated orally at the same dosage for the collection of blood and tissue samples, respectively. After the extraction procedure, a validate HPLC method with UV detection was used for plasma and organs analysis. The plasma concentrations were quantifiable up to 24 h after both the administrations. The clearance was slow (0.01 L/h*Kg), the volume of distribution small (0.05 L/Kg) and consequently the half-life was short (5 h). After PO administration C_{max} and T_{max} were 5.19±1.25 µg/mL and 2.62±1.19 h, respectively. The bioavailability was 64.20±23.99% and the MAT value was 2.37±3.11 h. The therapeutic plasma concentration of MLX in geese has yet to be determined. In Hispaniolan Amazon parrots, it has been shown that a mean plasma concentration of 3.5 µg/mL provided analgesia. In the present study the AUC(0-24) value able to provide the average plasma concentration of 3.5 µg/mL is 84 mg*h/L. If MLX is anticipated as concentration dependent drug in geese, the effective dose should be 1.26±0.39 mg/Kg. Residues of MLX were lower the LOQ (0.1 µg/Kg) in any tested tissue and at any collection time. However, MLX concentrations in the first 10 h after PO administration in tissues were not evaluated in the present research, thus it is not excluded that quantifiable MLX residues may be present.

Keywords: Analgesic; HPLC, geese, pharmacokinetics.

Pharmacokinetics of Vilazodone in Dogs: Can Feeding Affect it?

I. Sartini¹, M. Gbylik-Sikorska², B. Łebkowska-Wieruszewska³, A. Gajda², A. Lisowski³, C. J. Kowalski³,
A. Posyniak², A. Poapolathep⁴, M. Giorgi⁵

¹ University of Sassari, Sassari, ITALY

² National Veterinary Research Institute, Pulawy, POLAND

³ University of Life Sciences, Lublin, POLAND

⁴ Kasetsart University, Bangkok, THAILAND

⁵ University of Pisa, San Piero a Grado, ITALY

Vilazodone (VLZ) is a drug approved for the treatment of major depressive disorder in humans, but no data is available for dogs. Trazodone is another phenylpiperazine chemical derivative which is used as an off-label medication for long term treatment of anxiety disorders in dogs and as anxiolytic after surgery. VLZ might have the potential to have better pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety profiles than trazodone in the dog as theorized in human beings. The present study was aimed to evaluate the pharmacokinetics of a single oral 40 mg dose of VLZ in Labrador dogs in fasted and fed conditions. Six healthy Labrador dogs were used. Dogs were randomly divided in to two (n=3) groups according to a cross-over study design (2x2). Group I was administered with VLZ at 40 mg/dog after fasting over-night. Group II was fed prior to and 15 min after administration of the same dose. A two-weeks washout period was observed. A validated UHPLC-MS/MS method was used in order to analyse VLZ concentrations in plasma samples: it was detectable in dogs' plasma in two different windows of time (30 min to 10 h for the fasted group and 4 h to 35 h for the fed group). The values for $t_{1/2\lambda z}$ were statistically different between the groups (fed, 4.6 ± 1.1 h vs fasted, 1.7 ± 0.2 h). T_{max} drastically changed between the groups (fed, 10 h vs fasted, 1.5 h), while C_{max} did not significantly varied (fed, 39.4 ± 5.6 ng/mL vs fasted, 38.7 ± 4.8 ng/mL). The AUC value was always statistically highest in the fed group. As a result, the average relative oral fasted bioavailability of VLZ was low, $28.8 \pm 6.1\%$. In conclusion, feeding can affect the VLZ pharmacokinetics in the dog.

Keywords: Dogs, LC-MS/MS, pharmacokinetics, unfed-fed, vilazodone.

Pesticide exposure and risk assessment to bees and beehive products

Shimon Barel¹, Roy Sperling², Levent Aydın³, A. Onur Girisgin³, Jakob A. Shimshoni⁴

¹ Department of Toxicology, Kimron Veterinary Institute, Ministry of Agriculture, Beit-Dagan, Israel.

² Department of Instrumental Analytic, Bilacon GmbH, Berlin, Germany.

³ Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Uludağ, Bursa, Turkey

⁴ Department of Food Quality & Safety, Institute for Postharvest and Food Sciences, Agricultural Research Organization, Volcani Center, Rishon Letzion, Israel.

Özet

Kovan ürünleri, çevre kirleticilerin bir göstergesi olarak kabul edilir. Bal ve balmumunda pestisitlerin varlığı, tüketiciler için bir sağlık tehlikesi oluşturabilir. Bu çalışmanın amacı, İsrail ve Türk bal / balmumu örneklerindeki pestisit profilini, insan sağlığı yönünden belirlemektir. Bal ve balmumuna bulaşan en az iki pestisit aynı anda belirlenmiş, bunlardan amitraz metabolitleri ve kumafosa daha sık rastlanmıştır. Neonikotinoid insektisitler ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit sadece bir bal örneğinde bulunmuşken, daha fazla lipofilik pestisitler çoğunlukla balmumunda bulunmuştur. Risk değerlendirmesi bal için yapılmış ve insanlar için gözardı edilebilir değerler bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Bal, balmumu, gıda güvenliği, pestisitler, risk değerlendirmesi

Abstract

Beehive products are considered sentinels for environmental pollutants. The presence of pesticides in honey and beeswax may pose a health hazard to consumers. The study's aim was to determine the profile of pesticides in Israeli and Turkish honey and beeswax samples in relation to human risk assessment. At least two pesticides contaminated the honey and beeswax samples simultaneously, in which, amitraz metabolites and coumaphos were frequently detected. The neonicotinoid insecticides and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, were found only in honey samples, whereas the more lipophilic pesticides were predominantly found in beeswax. The risk assessment performed for honey, indicated negligible risk to humans.

Keywords: pesticides, honey, beeswax, food safety, risk assessment

Introduction

Pesticide residues acquired by bee foragers outside of the colony are of concern. We now know that a variety of pesticides used in honey bee colonies can have adverse, sub lethal effects on individual bees (Kasiotis et al., 2014). Several studies claimed that pesticides tend to accumulate in hives, mainly in honey, beeswax and pollen (Bommuraj et al., 2019; Kasiotis et al., 2014; Calatayud-Vernich et al., 2019). Forager honeybees from colonies placed in natural ecosystems and agricultural crops carry numerous environmental chemicals from air, soil, water, and vegetation, which accumulate in their hives mainly within honey, beeswax and pollen (Calatayud-Vernich et al., 2019). Hence, honeybees are increasingly being employed to monitor environmental pollutants such as heavy metals, pesticides and radionuclides. Most risk assessments have focused on direct acute exposure of bees to agrochemicals from spray drift. However, the large number of pesticide residues found in pollen and honey demand a thorough determination of all residual compounds so as to identify those of highest risk to bees.

Aims

To evaluate the overall exposure of humans to pesticides present in major beehive products, namely honey and beeswax, in association with dietary risk assessment.

Methods

Beehives ($n = 32$) were sampled during January 2018-September 2018. Beehives were monitored and analyzed for 660 pesticides. Pesticides were determined in honey and beeswax, by GC-MS/MS and LC-MS/MS. Risk posed by individual pesticides found in honey and beeswax samples was evaluated through the "Hazard Quotient" (HQ) and "Hazard Index" procedure (US EPA 2000). The assessment of consumer's chronic exposure to the residues was based on the maximum level of contamination in honey as follows: 1) $HQ = ADI / RfD$; 2) $ADI = (C_{max} \times IR) / BW$; where ADI is the average daily intake ($\mu\text{g/kg/day}$), HQ is the Hazard quotient, RfD is the daily intake reference dose ($\mu\text{g/kg/day}$), C_{max} is the maximum chemical concentration in honey ($\mu\text{g/kg}$), IR is the honey (0.8 gr/day/kg body weight) consumption rate and BW is the average human body weight (kg) considered for adults and children to be 60 and 15 kg, respectively. HQs were calculated individually, then the sum of the HQs were calculated for the hazard index (HI), to estimate total risk of multiple chemicals on the assumption of dose additivity as follows (US EPA 2000): 3. $HI = HQ_1 + HQ_2 + \dots + HQ_n$.

Results and Discussion

The detected mean pesticide levels and their prevalence in beeswax and honey samples are listed in Table 1. All of the Israeli honey samples were simultaneously contaminated with at least two pesticides and up to 9 pesticides, among which, 32 % of the samples contained between 3-5 pesticide residues. The highly hydrophilic neonicotinoid insecticides, namely acetamiprid and imidacloprid were found only in honey samples (Table 1). The latter results clearly indicate the predominant distribution tendency of the highly water soluble pesticides into honey. The beeswax samples were divided into two major groups, namely samples containing 3-5 pesticide mixtures with an occurrence rate of 30 % and samples containing more than 6-8 pesticide residues at a 70 % occurrence rate. Highly lipophilic pesticides ($\log P > 2$) were predominantly found in beeswax, such as oxyfluorfen, tau-fluvalinate, fenbutatin oxide and coumaphos, all of which revealing higher prevalence and mean concentrations in beeswax as compared to honey (Table 1). Since more than 87 % of the honey samples included amitraz metabolites (DMF and DMPF) and coumaphos, it seems that honey produced in Israel consistently entails the aforementioned pesticides as background contamination. The consistent presence of coumaphos in honey is most likely the result of unremitting diffusion of coumaphos from beeswax into honey. Coumaphos is among the most common beeswax contaminant worldwide, frequently occurring at high concentrations of several hundred mg/kg. Due to its short half-life, amitraz is usually undetected in the majority of beeswax and honey samples worldwide, necessitating its quantification indirectly through its metabolites.

Since beehive products have been claimed for many years to reliably reflect environmental pollution within the foraging area of honey bees, we additionally aimed to test, whether indeed honey and beeswax may function as sentinels for pesticides applied in vicinity to the apiary. The apiary tested, consisted of 35 beehives scattered in a

The risk assessment of honey and beeswax consumption containing pesticides was calculated by the ratio of daily honey consumption and RfD values. The risk assessment was based on the maximum level of contamination found in honey, which corresponds to a worst-case scenario (highest concentration found). According to Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, the average daily honey consumption in Europe is 0.8 g/day/kg body weight (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2009). Calculated Hazard Quotient (HQ) and Hazard Index (HI) values below 1 are indicative of negligible health risk for the consumer, while values ≥ 1 indicate an increased health risk for consumers (US EPA 2000). The calculated HQ and HI following the simultaneous exposure to the highest concentrations of pesticides found both in honey or in beeswax, was below 1, hence indicative of negligible risk to the end consumer assuming daily oral exposure of honey.

Table 1. Pesticide profile in honey and beeswax samples in Israel.

Pesticide	Honey				Beeswax		
	Mean $\pm$ S D (μ g/kg)	Range (μ g/kg)	% Positive	MRL (μ g/kg)	Mean $\pm$ S D (μ g/kg)	Range (μ g/kg)	% Positive
2,4-D	2.0 $\pm$ 1.3	1 - 4	12.5	50	-	-	-
Acetamidrid	2.3 $\pm$ 1.0	1 - 3	15.6	50	-	-	-
DMF	28.3 $\pm$ 20.8	7 - 93	87.5	200	111.5 $\pm$ 43.1	53 - 175	10 - 0
DMPF	23.6 $\pm$ 17.4	6 - 69	87.5	200	115.2 $\pm$ 92.5	10 - 240	10 - 0
Carbendazim	7.0 $\pm$ 2.8	5 - 9	6.3	1000	-	-	-
Clopyralid	8.6 $\pm$ 9.2	1 - 21	15.6	50	-	-	-
Coumaphos	4.1 $\pm$ 4.2	1 - 17	87.5	100	927.0 $\pm$ 620.4	190 - 2200	10 - 0
Fenbutatin oxide	-	-	-	-	42.7 $\pm$ 31.0	12 - 74	30
Imidacloprid	3.3 $\pm$ 1.5	2 - 7	65.6	50	-	-	-
Pirimicarb-desmethyl	1.5 $\pm$ 0.8	1 - 3	18.8	50	-	-	-
Tau-Fluvalinate	-	-	-	50	23.8 $\pm$ 14.2	12 - 54	80
Thiacloprid	1.4 $\pm$ 0.5	1 - 2	30	200	-	-	-
Oxyfluorfen	-	-	-	-	25.0 $\pm$ 11.3	17 - 33	20

Conclusions

All of the honey samples analyzed complied with the Israeli and European MRL's. Altogether, a total of 10 various pesticide/pesticide metabolites have been detected in honey samples. The results of the present study together with xenobiotic profile in beehive products reported by numerous research groups around the globe, indicate that beeswax might function additionally as a detoxifying compartment, into which toxic as well as non-toxic xenobiotics are being constantly sequestered, thereby contributing to a safer environment of brood and worker bees. The risk assessment performed for honey containing detectable pesticides, clearly indicated that the consumption of one daily teaspoon of honey by a child or an adult is considered safe. Since beeswax is a major contamination sink of environmental pollutants and due to the extensive use of beeswax in the food and pharma industry, efficient decontamination procedures are highly warranted for beeswax recycling. The ability of beeswax and honeycomb structure to efficiently absorb a variety of toxic substances, dilute and distribute the contaminants, on a big surface area of the combs, is a unique capability that enable honeybees to forage safely in unknown and risky environments. We believe this concept could be applied in nutrition and pharmaceutical applications as gastro intestinal treatments or preparation for skin protection.

Reference

- Bommuraj, V., Chen, Y., Klein, H., Sperling, R., Barel, S., & Shimshoni, J.A.(2019). Pesticide and trace element residues in honey and beeswax combs from Israel in association with human risk assessment and honey adulteration. *Food Chem.* 299: 125123.
- Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., Pascual Aguilar, J.A., & Picó, Y. (2019). A two-year monitoring of pesticide hazard in-hive: High honey bee mortality rates during insecticide poisoning episodes in apiaries located near agricultural settings. *Chemosphere* 232: 471-480.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2009). Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Seventieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 954, Geneva.
- Kasiotis, K. M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., & Machera, K. (2014). Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LCMS/MS screening: reported death incidents in honeybees. *The science of the Total Environment*, 485-486, 633-642

US EPA. (2000). Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. Risk Assessment Forum Technical Panel. United States Environmental Protection Agency Office of EPA/630/R-00/002.

Jakob A. Shimshoni, Roy Sperling, Muhammad Massarwa, Yaira Chen, Vijayakumar Bommuraj, Mikhail Borisover, Shimon Barel, (2019).

Pesticide distribution and depletion kinetic determination in honey and beeswax: Model for pesticide occurrence and distribution in beehive products. PLOS ONE, 14 (2), e0212631. DOI: 10.1371/journal.pone.0212631.

Novel Pain-Killers Active Compounds in Veterinary Medicine:An Update

M. Giorgi

Department of Veterinary Sciences, University of Pisa, San Piero a Grado, Pisa Italy

Aim: This paper is aimed to deliver an up to date on the novel active ingredients that are expected to be launched on the veterinary market in the next years, discussing their pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety profiles.

Pets are treated as members of the family and pet owners demand the same level of care they expect for themselves. This change in attitude has led to rapid evolution in the field of pharmacology with trend towards the development of more effective and innovative veterinary therapies with higher potency, more rapid speed of action and fewer side effects. Two new active ingredients are under pivotal trials to get into the drug veterinary market: grapiprant (GP) and soluble epoxide hydrolase inhibitors (sEH). A new molecule cebranopandol (CP), looks very promising for the coming years.

Prostaglandin E2 (PGE2) is a key mediator of inflammation and pain, exerts its effects via four receptors, EP1, EP2, EP3 and EP4. The EP4 receptor is the primary mediator of the PGE2-elicited sensitization of sensory neurons and PGE2-elicited inflammation. The EP4 receptor is not the only receptor involved in inflammation and pain, but its inhibition may mediate central sensitization and play a role in chronic pain in humans and animals. GP is a novel analgesic and anti-inflammatory drug in the piprant class that works as a selective EP4 prostaglandin receptor antagonist (PRA) (1).

All arachidonic acid metabolites, which encompass the prostanoids, leukotrienes and epoxy fatty acids, are bioactive lipids that play a positive or negative role in inflammation and pain, specifically under pathological conditions. The allogeneic and pro-inflammatory prostanoids and leukotrienes drive and maintain inflammation, while the anti-inflammatory and analgesic epoxy fatty acids epoxyeicosatrienoic acids (EETs) reduce and resolve inflammation. EETs are generated by cytochrome P450 enzymes and have various beneficial biological effects, not only do they have anti-inflammatory and analgesic actions but they also have protective effects on the cardiovascular system and kidney as recently reported in the literature. Unfortunately EETs are very instable and are rapidly converted into the corresponding 1, 2 diols (dihydroxyeicosatrienoates, DHETs), characterized by a pro-inflammatory actions. Inhibiting the enzyme that carries out this reaction, the soluble epoxide hydrolase (sEH), the EET levels can be stabilized with expected beneficial biological effects (2).

CP is a novel opioid analgesic of the benzenoid class which is currently under development. It has an unique mechanism of action as an opioid, binding to and activating all four of the opioid receptors. CP acts as a full agonist of the μ - and δ -opioid receptor and as a partial agonist of the nociceptin and κ -opioid receptor (3). This molecule might overcome the weak points reported from other opioids such as tramadol and tapentadol.

During the presentation the recent studies performed on these three drugs and their potentialities will be discussed.

1 Giorgi 2015 Am J Anim Vet Sci 10, 53-56

2 Lee et al. 2014 Israeli J Vet Med 69, 55-61

3 Linz et al. 2104 J Pharmacol Exp Therap 349, 535-48