

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

- Papillary Architecture of the Lingual Surface in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*, Pallas 1811)...** 1
Greater Flamingoda (*Phoenicopterus roseus*, Pallas 1811) Dil Yüzeyinin Papiller Mimarisi
İ. ORHAN, A. ALAN, F. KÖSE, A. DÜZLER
- Shape Analysis of Otoliths of *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) and *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) Species by Geometric Morphometry**..... 7
Capoeta trutta (Heckel, 1843) ve *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) Türlerinin Otolitlerinin Geometrik Morfometri ile Şekil Analizi
M.Y. DÖRTBUDAK, Y. DEMİRSLAN, İ. DEMİRCİOĞLU, F. AKSÜNGER KARAACI
- The Effects of Mesoporous Silica Nanoparticles on Spermatological Parameters of Merino Ram**..... 13
Mezogözenekli Silika Nanoparçacıkların Koç Spermatolojik Parametreleri Üzerine Etkisi
A.E. ÖZTÜRK, A. BALCI, G. SİVRİ, P. LEBLEBİCİ, A. SAĞLAM, Z. KILINÇ, E.G. YILDIZ, M. BODU
- İstanbul İlindeki Bazı Veteriner Kliniklerinde Muayene Edilen Kedilerde Obezite ve Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi**..... 19
Evaluation of Obesity and Risk Factors in Cats Examined at Selected Veterinary Clinics in İstanbul
E. ÖZENİR, E. BAYTOK, S. YILMAZ ÖZTAŞ
- Nevşehir Yöresindeki Sahipli Kedi ve Köpeklerde *Giardia duodenalis*'in Moleküler Prevalansı ve Genetik Karakterizasyonu**..... 28
Molecular Prevalence and Genetic Characterization of *Giardia duodenalis* in Owned Cats and Dogs from Nevşehir Province
B. SATAŞMAZ, G.K. KARADEMİR, A. ÇİLOĞLU
- Evaluating the Therapeutic Impact of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) on Long Bone Fracture Healing in Cats**..... 36
Kedilerde Uzun Kemik Kırıklarının İyileşmesinde Otolog Trombositten Zengin Plazmanın (PRP) Terapötik Etkisinin Değerlendirilmesi
N.D. YAŞRIN, İ. ERGİN
- The Usefulness of the HASTE Sequence in the Diagnosis of Spinal Diseases in Dogs and Cats**..... 45
Köpeklerde ve Kedilerde Spinal Hastalıklarının Tanısında HASTE Sekansının Kullanılabilirliği
M.N. ÇETİN, Y.S. ŞİRİN, B. NEYSE

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

- Kedi ve Köpek Dermatolojisinde Kriyoterapi Uygulamaları**..... 51
Cryotherapy Applications in Cat and Dog Dermatology
S. CAFER, R. GÖNÜL, M. ERMAN
- Yenidoğan Ruminantlarda Propolis Kullanımı**..... 58
Usage of Propolis in Newborn Ruminants
Ö. KABİLOĞLU, A. KABİLOĞLU, İ. ABAŞ



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

ISSN-1304-7280

Yıl/Year: 2025
Cilt/Volume: 22
Sayı/Number: 1

Yılda 3 sayı yayımlanır / Published 3 issues per year
<http://ercivet.erciyes.edu.tr>
E-posta: ercivet@gmail.com



ISSN-1304-7280

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Journal of Faculty of Veterinary Medicine,
Erciyes University

Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Bu dergi Web of Science- Zoological Records, EBSCO Host, CABI Abstracts, World Agricultural Economicsand Rural Sociology Abstract, Global Health, Tübitak-Ulakbim TR Dizin ve Türkiye Atıf Dizini tarafından dizinlenmektedir.

This journal is reviewed by Web of Science- Zoological Records, EBSCO Host, CABI Abstracts, World Agricultural Economicsand Rural Sociology Abstract, Global Health, Tubitak-Ulakbim TR Dizin and Turkey Citation Index.

Yıl / Year : 2025
Cilt / Volume : 22
Sayı / Number : 1

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>
E-posta: ercivet@gmail.com

Baskı Tarihi: Nisan 2025

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Sahibi / Owner

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına
Prof. Dr. Murat KANBUR (Dekan)

Baş Editör / Editor-in Chief

Prof. Dr. Öznur ASLAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Editör Yardımcıları / Assistant Editors

Prof. Dr. Seçil ABAY (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Emel ALAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Kanber KARA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)
Doç. Dr. Fatih Doğan KOCA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)
Doç. Dr. Aykut GRAM (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)
Dr. Öğr. Üyesi Fadime DALDABAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)
Dr. Öğr. Üyesi Emre TÜFEKÇİ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dergi Sekreterleri / Journal Secretary

Dr. Öğretim Üyesi Gamze ÖZKAYA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)
Dr. Öğretim Üyesi Mukaddes BAREL (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)
Arş. Gör. Sena YILMAZ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Yayın Kurulu / Editorial Consultants

Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Meryem EREN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

İstatistik Danışmanı / Statistical Editor

Dr. Öğr. Üyesi Elif ÇELİK GÜRBULAK (İstatistik) (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

İngilizce Dil Danışmanı / Language Editor

Dr. Öğr. Gör. Mustafa ÖZER (Abdullah Gül Yabancı Diller YO.)
Arş. Gör. Şeyma AŞAR (Erciyes Üniv. İngiliz Dili ve Edebiyatı)

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Ali AYDIN (İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Vet. Fak.)
Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Aytekin GÜNLÜ (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)
Assoc. Prof. Dr. Corneliu BRASLASU (Univ. Agricultural Sci. Vet. Med. Bucharest)
Prof. Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Funda KIRAL (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)
Dr. Gediminas VALKIUNAS (Nature Research Centre Vilnius)
Prof. Dr. med. vet. Heiner Bollwein (Clinic of Reproductive Med. Vetsuisse Fac. Univ. of Zurich, Switzerland)
Prof. Dr. İ. Safa GÜRCAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. İsa ÖZAYDIN (Kafkas Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)
Ass. Prof. Dr. Klaus RIEDELBERGER (Univ. Veterinary Med. Vienna)
Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ (Afyon Kocatepe Üniv. Vet. Fak.)
Assist. Prof. Linda Müller (University of Veterinary Medicine Budapest, Hungary)
Prof. Dr. Mariusz P. Kowalewski (Institute of Veterinary Anatomy, Vetsuisse-Faculty University of Zurich)
Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Mustafa GARİP (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Münir AKTAŞ (Fırat Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Nuh KILIÇ (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Oğuz KUL (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Oktay GENÇ (Ondokuz Mayıs Üniv. Vet. Fak.)
Assoc. Prof. Orsolya Balogh (Theriogenology Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine, Blacksburg)
Prof. Dr. Selim ASLAN (Near East University, Faculty of Vet. Med. North Cyprus)
Prof. Dr. Özcan ÖZGEL (Mehmet Akif Ersoy Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Rahşan ÖZEN (Fırat Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Sinan AKTAŞ (Atatürk Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Staffan BENSCH (University of Lund Vilnius)
Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI (Balıkesir Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Taylan AKSU (Yüzüncü Yıl Üniv. Vet. Fak.)
Prof. Dr. Thomas RÜLİCKE (Univ. Veterinary Med. Vienna)
Prof. Dr. Thomas WITTEK (Univ. Veterinary Med. Vienna)

Yazışma Adresi / Correspondence

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Dergisi Editörlüğü
38039-Kayseri / TÜRKİYE

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>

E-posta : ercvet@gmail.com

Tel : 0 352 339 94 84

Fax : 0 352 337 27 40

Yayın Türü / Publication Type: Yaygın süreli ve hakemli/ Common term and peer reviewed

Mizanpaj / Designer: Erhan GÜMÜŞ

Basım / Print: Erciyes Üniversitesi Matbaası, Melikgazi/KAYSERİ

ISSN-1304-728

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

Papillary Architecture of the Lingual Surface in Greater Flamingo (<i>Phoenicopterus roseus</i>, Pallas 1811)...	1
Greater Flamingo (<i>Phoenicopterus roseus</i> , Pallas 1811) Dil Yüzeyinin Papiller Mimarisi İ. ORHAN, A. ALAN, F. KÖSE, A. DÜZLER	
Shape Analysis of Otoliths of <i>Capoeta trutta</i> (Heckel, 1843) and <i>Capoeta umbla</i> (Heckel, 1843) Species by Geometric Morphometry.....	7
<i>Capoeta trutta</i> (Heckel, 1843) ve <i>Capoeta umbla</i> (Heckel, 1843) Türlerinin Otolitlerinin Geometrik Morfometri ile Şekil Analizi M.Y. DÖRTBUDAK, Y. DEMİRSLAN, İ. DEMİRCİOĞLU, F. AKSÜNGER KARAACI	
The Effects of Mesoporous Silica Nanoparticles on Spermatological Parameters of Merino Ram.....	13
Mezogözenekli Silika Nanoparçacıkların Koç Spermatolojik Parametreleri Üzerine Etkisi A.E. ÖZTÜRK, A. BALCI, G. SİVRİ, P. LEBLEBİCİ, A. SAĞLAM, Z. KILINÇ, E.G. YILDIZ, M. BODU	
İstanbul İlindeki Bazı Veteriner Kliniklerinde Muayene Edilen Kedilerde Obezite ve Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi.....	19
Evaluation of Obesity and Risk Factors in Cats Examined at Selected Veterinary Clinics in İstanbul E. ÖZENİR, E. BAYTOK, S. YILMAZ ÖZTAŞ	
Nevşehir Yöresindeki Sahipli Kedi ve Köpeklerde <i>Giardia duodenalis</i>'in Moleküler Prevalansı ve Genetik Karakterizasyonu.....	28
Molecular Prevalence and Genetic Characterization of <i>Giardia duodenalis</i> in Owned Cats and Dogs from Nevşehir Province B. SATAŞMAZ, G.K. KARADEMİR, A. ÇİLOĞLU	
Evaluating the Therapeutic Impact of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) on Long Bone Fracture Healing in Cats.....	36
Kedilerde Uzun Kemik Kırıklarının İyileşmesinde Otolog Trombositten Zengin Plazmanın (PRP) Terapötik Etkisinin Değerlendirilmesi N.D. YAŞRIN, İ. ERGİN	
The Usefulness of the HASTE Sequence in the Diagnosis of Spinal Diseases in Dogs and Cats.....	45
Köpeklerde ve Kedilerde Spinal Hastalıklarının Tanısında HASTE Sekansının Kullanılabilirliği M.N. ÇETİN, Y.S. ŞİRİN, B. NEYSE	

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

Kedi ve Köpek Dermatolojisinde Kriyoterapi Uygulamaları.....	51
Cryotherapy Applications in Cat and Dog Dermatology S. CAFER, R. GÖNÜL, M. ERMAN	
Yenidoğan Ruminantlarda Propolis Kullanımı.....	58
Usage of Propolis in Newborn Ruminants Ö. KABİLOĞLU, A. KABİLOĞLU, İ. ABAŞ	



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Research Article/Araştırma Makalesi
22(1), 1-6, 2025
DOI: 10.32707/ercivet.1556144

Papillary Architecture of the Lingual Surface in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*, Pallas 1811)

İmdat ORHAN^{1,a}, Aydın ALAN^{1,b}, Fatma KÖSE^{1,c}, Ayhan DÜZLER^{1,d}

Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Kayseri-TÜRKİYE
ORCID No: ^a0000-0002-6723-8617, ^b0000-0003-0428-578X, ^c0000-0002-3247-7781, ^d0000-0001-9515-574X

Corresponding author: İmdat ORHAN, E-mail: imdatorhan@erciyes.edu.tr

How to cite: Orhan İ, Alan A, Köse F, Düzler A. Papillary architecture of the lingual surface in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*, Pallas 1811). Erciyes Univ Vet Fak Derg 2025; 22(1):1-6

Abstract: The tongues of birds, which are generally adapted to their feeding habits, have a wide variety of anatomical structures. The tongue structures of flamingos are equipped with the ability to make 3 different types of feedings. The aim of this study was to examine the *lingual* structures of flamingos. *Cuticula cornificata linguae* (nail tongue) structure was not observed in flamingos, which were found to have significant size and numerous *papillae lingua rostralis*. *Micro papilla* structure was observed on *papilla lingua rostralis* in SEM images. In the Greater flamingo, the orifices of salivary glands were found to be located *lateral* to the *corpus* of the tongue. The *rugae linguae* structure was recorded for the first time in Greater Flamingos.

Keywords: Anatomy, flamingo, lingual architecture, SEM, tongue

Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*, Pallas 1811) Dil Yüzeyinin Papiller Mimarisi

Öz: Genellikle kuşların beslenme şekillerine uyum sağlayan dilleri, çok çeşitli anatomik yapıları sahiptir. Flamingoların dil yapıları 3 farklı beslenme tipine uygun biçimde donatılmıştır. Bu çalışmanın amacı flamingoların dil yapılarını incelemektir. Önemli büyüklükte ve çok sayıda *papilla lingua rostralis*'e sahip olduğu tespit edilen flamingolarda *cuticula cornificata linguae* (dil tırnağı) yapısına rastlanmadı. SEM görüntülerinde *papilla lingua rostralis* üzerinde *micro papilla* yapısı görüldü. Greater flamingolarda tükürük bezlerinin deliklerinin *corpus lingua*'nın yan tarafında yer aldığı tespit edildi. *Rugae linguae* yapısı ilk kez Greater flamingolarında kaydedildi.

Anahtar kelimeler: Anatomi, dil yapısı, flamingo, lingua, SEM

Introduction

Birds should also be considered unique in the animal world because of the wide variety of shapes and structures of their tongues. A bird's tongue can be very long, very short, hairy at the tips, have spines of various sizes, and in some species show specific adaptations for feeding (Johnston, 2014; Ahmed et al., 2018). Birds with different lifestyles and dietary habits adapt to these situations thanks to changes in their tongue and beak structures in order to reach different food sources (Emura and Chen, 2008).

There have been some studies on tongue structures and especially papillary architecture in birds. For example, Finch (Heidweiller and Zweers, 1990), Caribbean and Greater flamingos (Zweers et al., 1995), penguins (Kobayashi et al., 1998), Andean-James' and Chilean flamingos (Mascitti and Kravetz, 2002), Western Sandpiper and Dunlin (Elner et al., 2005), White Tailed eagle (Jackowiak and Godynicki, 2005), cormorants (Jackowiak et al., 2006), Peregrine Falcon and Common Kestrel (Emura et al., 2008), os-

trich (Jackowiak and Ludwig, 2008), Oriental Scops owl (Emura et al., 2009), Blue-and-White Flycatcher, Hawfinch and Japanese White-eye (Emura et al., 2010), long-legged buzzards (Erdoğan et al., 2012), storks (Tutuncu et al., 2012), quail (Pourlis, 2014), common buzzards and seagulls (Onuk et al., 2015), domestic duck (Skiersz-Szewczyk and Jackowiak, 2016) and Egyptian little owl (Ahmed et al., 2018), Guinea Fowl (Ilgun et al., 2020), barn owls (Ozkadif et al., 2023).

Filter feeders filter food particles and other suspended matter from water and sludge. Some flamingos, many ducks and geese, prions and avocets are among notable filter feeders. There are several different methods of how filter feeders filter food; first method is to shake the beak and use the beak to strain out food. The second method is to press the tongue and use it like a pump. Water/mud fills the *oral* cavity and then tongue is pressed against the palate and water/mud is thrown sideways through the *papillae* that capture solid food particles. Flamingos are the best known filter feeders that use both filter feeding methods. In shallow water, their large tongue acts like a piston, sucking the water in front of the beak and then pushing it out of the sides. Fringed

plates on the tongue trap algae and crustaceans. However, they do this with their beaks upside down (upper jaw below). For larger foodstuffs, they are fed using the 'catch and throw' mechanism where the role of tongue is unknown (Zweers et al., 1995; Holliday et al., 2006; Erdoğan and Iwasaki, 2014; Johnston, 2014).

Considering that, in birds, the tongue has an important role in taking food, so its shape and morphology are affected by the nutrition method and the environment of the animal (Erdoğan and Pérez, 2015; Skiersz-Szewczyk and Jackowiak, 2016; Tabasi and Mohammadpour, 2019).

In addition, other SEM conducted on pheasant tongue, red-necked phalarope, rainbow lorikeet, scarlet macaw, grey crowned crane (*Balearica regulorum*), American flamingo (*Phoenicopterus ruber*), great egret (*Ardea alba*), mallard (*Anas platyrhynchos*), black-necked stilt (*Himantopus mexicanus*), Himalayan monal (*Lophophorus impejanus*) and green macaw (*Ara militaris*) show the connection between the feeding habits of birds and the shape of their tongue (Emura, 2016; Tabasi and Mohammadpour, 2019).

In flamingos, there are 20 bilaterally located *papillae lingua rostralis* on the dorsolateral surface of the tongue, decreasing in height from rostral to caudal. In flamingos, there are 20 *papillae lingua caudalis* located transversely in 2 series parallel to each other on the dorsal surface of the caudal end of the tongue (Zweers et al., 1995; Mascitti and Kravetz, 2002).

This study on the lingual papillae of the greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*) species provides new findings in addition to previous studies in the literature, and these findings are thought to contribute significantly to the species' morphology. In this study, it is aimed to reveal the papillary architecture by examining the macro anatomical and electron microscopic structure of the tongue in Greater Flamingos, and to compare it with other bird species and especially other flamingo species.

Material and Methods

In this study, 2 females and 3 males Greater flamingo tongues were used. Two of them died during the operation at the Erciyes University Veterinary Faculty, where they were brought as a result of trauma, while the other three were found dead by a bird watcher around Sultan Reedy National Park and brought to the faculty.

Macro measurements were made immediately after the tongues were dissected together with the laryngeal region. Afterwards, for SEM application, the tongues were cut into pieces of appropriate sizes from different parts, washed with 0.1 M phosphate

buffer solution, and then fixed with 2.5% glutaraldehyde for 6 hours. Afterwards, it was washed again with 0.1 M phosphate buffer solution and then fixed with 1% osmium tetroxide. Subsequently, dehydration with acetone, critical-point drying and coating with gold ions were performed according to the SEM procedures by Alan et al., (2020) and Onuk et al., (2013). Samples were examined and photographed with a scanning electron microscope (Leica, model Leo S440, Leica Cambridge, Cambridge, UK). Nomina Anatomica Avium (Baumel et al., 1993) is used for terminology.

Results

It was observed that the length of the examined flamingo tongues was 12.5 ± 1 cm on average from the apex to the glottis cleft, and the average width was 2.3 ± 0.1 cm at the widest part. It was determined that the rostral 1/3 of the tongue was raised at an angle of 30° from the apex to the dorsal in harmony with the beak, and the apex lingua, which was flattened in the dorsoventral direction, expanded on both sides and formed a full *margo linguae*. *Cuticula cornificata linguae* (tongue nail) structure seen in some birds was not observed in the samples examined (Figure 1A). The presence of *sulcus linguae* continuing backwards from the apex was detected on the dorsal surface of the tongue. In the ascending part from the apex to the *dorsum lingua*, *caudomedial* directional fan-shaped, faint *rugae linguae* structures were determined (Figure 4A).

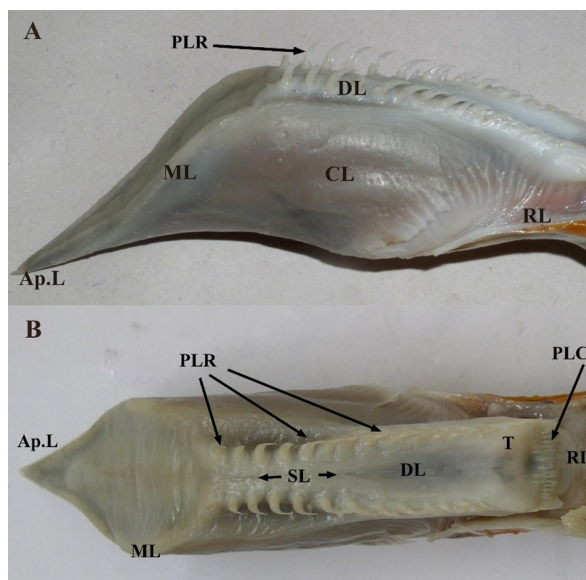


Figure 1. A. Dorsolateral; **B.** Dorsal view of tongue. **Ap.L:** Apex lingua; **CL:** Corpus lingua; **DL:** Dorsum lingua; **ML:** Margo lingualis; **PLC:** Papilla lingua caudalis; **PLR:** Papilla lingua rostralis; **RL:** Radix lingua; **SL:** Sulcus lingua; **T:** Torus lingua

In the *dorsum lingua*, it was determined that there were 15 bilateral single rows of backward-curving spines (*papilla lingua rostralis*) on the right and left of the *sulcus lingua* (Figure 1, 2, 5). One or two *irregular*, *eccentric* and small *intermediate papillae* were found in each flamingo tongue studied. It was observed that the size of the *papilla lingua rostralis* decreased from 4.5 mm to 2 mm caudally. The presence of a second set of *papillae* parallel to the *caudal* 10 *papillae* was noted (Figure 2). The placement of the *papillae* forming this *lateral* row coincided with the intervals of the inner row of *papillae linguae rostralis*, like the opposite teeth of the zipper.

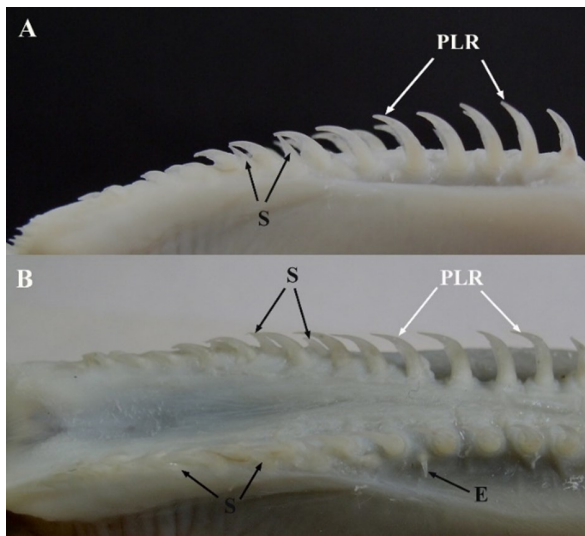


Figure 2. A. Lateral B. Dorso-lateral view of dorsum linguae. PLR: Papilla linguae rostrales; E: Exantric papilla; S: Second set of papillae

It was observed that the *torus lingua* was formed with a ridge at the end of the *papillae linguae rostrales*. A total of 30 *papillae lingua caudalis* were seen on the *transversal axis* just behind the *torus lingua*, in two parallel rows, the anterior row being shorter. The lengths of 14 *papillae* (Figure 3) in the anterior row ranged from 1-1.5 mm. In the posterior row, there were a total of 16 *papillae* with a length of 1.5-2.5 mm (Figure 3). On both sides of the *transversal* rows of the *papillae lingua caudalis*, a different row of longitudinally arranged *papillae* was detected. Each of these two different sets of *papillae* on the left and right sides of the tongue consisted of 10-12 *papillae* (Figure 3). These *papillae* can also be called *lateral longitudinal papillae linguae caudalis* because of their position and arrangement.

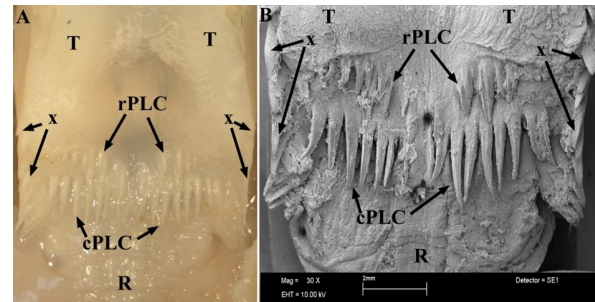


Figure 3. Dorsal view of radix lingua. A. Dissection microscope, B. Scanning Electron microscope. T: Torus lingua; rPLC: Rostral series of Papillae linguae caudales; cPLC: Caudal series of Papillae linguae caudales; x: Series of lateral longitudinal papillae; R: Radix lingua.

In SEM examinations, it was observed that the apex lingua had a flat surface and was covered with rough and scaly small *lamellae*, desquamating *superficial cells* (*epithelium stratificatum squamosum*) towards the *corpus* (Figure 4A2, B1, C2, Fig. 5 B1, B2). On the *lateral surface* of the *corpus lingua*, many orifices belonging to the ducts of the *glandulae linguales* were observed (Figure 4C). When these *orifices* were examined more closely, taste buds were detected nearly located at the exit of the *orifices* (Figure 4C).

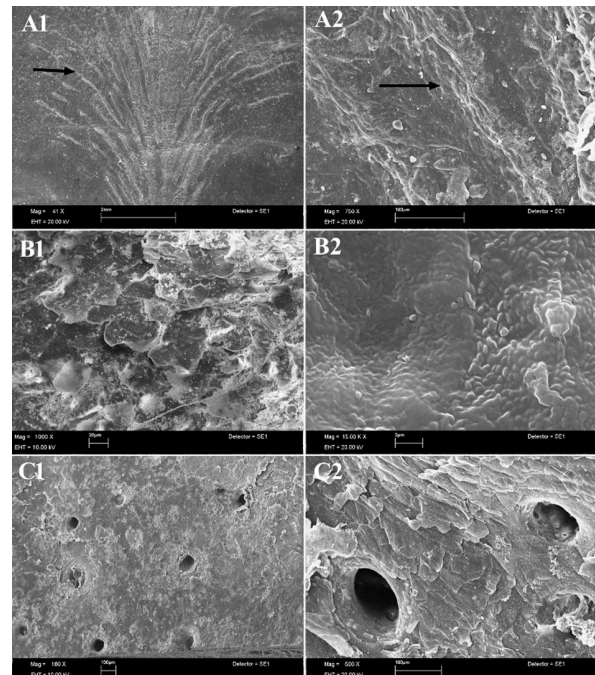


Figure 4. SEM images of surface of lingua. Surface of apex lingua. A1. 41X; A2. 750X; arrow: Rugae linguae; B1. Desquamating superficial cells on surface of apex lingua 1000X; B2. 15000X; Lateral surface of corpus lingua: Orifices of glandulae linguales; C1. 160X; C2. 500X. Taste buds in orifices.

In the SEM images of the *papilla lingua rostralis* found in the *dorsum lingua*, the presence of grooves starting from the ends of the *papillae* and continuing along their bodies was remarkable (Figure 5A1). On the *papilla lingua rostralis* and towards the *radix*, there were flat-conical secondary micro-papillary spines (Figure 5B1, B2).

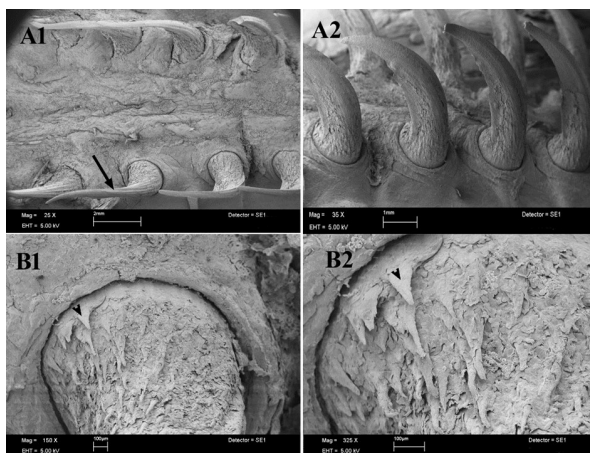


Figure 5. Papilla lingua rostralis and micropapillae. **A1.** Dorsal view 25X; **Arrow:** groove on the Papilla lingua rostralis; **A2.** Lateral view 35X; **B1.** Medial view 150X; **B2.** Medial view 325X; **Arrowhead:** micropapillary spines (desquamating cells).

Discussion and Conclusion

As reported in other studies examining the macro anatomical tongue in flamingos Zweers et al., (1995); Mascitti and Kravetz, (2002), the large and fleshy tongue in Greater flamingos rises from the *apex* to the *dorsum lingua* in line with the beak and on either side of the *apex lingua* it formed a plump *margo lingualis* structure. In the research of Emura (2016), the tongue of an American (*Chilean*) flamingo has a length of about 8.5 cm and a width of 1.9 cm. The Greater Flamingo tongues we examined in our study had an average length of 12.25 ± 1.25 cm and an average width of 2.3 ± 0.1 cm.

According to Zweers et al., (1995); Erdogan and Iwasaki (2014) and Onuk et al., (2015) in long-legged buzzards and seagulls, the *sulcus lingualis* structure, which is seen in the *median* line on the *dorsal* surface of the tongue in *anseriform* birds and flamingos, was also seen in the Greater flamingos examined in this study.

Rugae linguae structure has not been reported in the tongue of any poultry in the literature as reported by Zweers et al., (1995) and Mascitti and Kravetz (2002) in flamingos, Onuk et al., (2015) in long-legged buzzards and seagulls, Tutuncu et al., (2012) in storks, (other bird species can be added if you wish). The presence of rugae linguae structure, which was also

reported terminologically in *Nomina Anatomica Avium* (Baumel et al., 1993), was recorded for the first time in Greater flamingos (Figure 4A1 and A2).

Mascitti and Kravetz (2002) report that Chilean (*Phoenicopterus chilensis*), Andean (*Phoenicoparrus andinus*) and James' (*Phoenicoparrus jamesi*) flamingos have *papillae linguae rostralis*, which consists of approximately 20 flexible spines, the height of which decreases from *rostral* to *caudale* (3.5 to 1.0 mm). Again, according to this study, there are 20 *papillae linguae rostralis* in phoenicopterus species and the *papilla* height varies between 1.0 and 1.5 mm. Zweers et al., (1995) reported that Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*) tongues have approximately 20 flexible *spinae*, *papilla lingua rostralis*, and their length is shortened from 5 mm to 3 mm from *rostral* to *caudal*. According to our study, the number of *papillae linguae rostrales* was found to be 30 in the Greater flamingo. The lengths of these *papillae* decreased from 4.5 mm to 2 mm from *rostral* to *caudal*.

It has been reported that approximately 20 *papillae lingua caudalis* in two *transversal* rows in Greater flamingos Zweers et al., (1995). Consistent with the literature, in our study, it was determined that the *papillae lingua caudalis* were in the form of two *transversal* rows, but the number was 30 different from the literature.

The difference in the number of *papillae* reported in the literature and the number of *papillae* reported in our study was attributed to the fact that the counting process in the literature (Zweers et al., 1995, Mascitti and Kravetz, 2002) was not performed clearly and was reported as an approximate number. In addition, although two different flamingo species were studied in the study of Zweers et al., (1995), it was not clearly stated from which flamingo the *papilla* findings were obtained. If Zweers et al., (1995) obtained their numerical findings from Caribbean flamingos, it is normal to have different findings from the Greater flamingos we studied.

Desquamating cells structure has been reported to exist on the surface of the tongue in oriental scops owl (Emura et al., 2009), on the surface of *conical papillae* in Japanese white-eye (Emura et al., 2010), on the surface of the tongue in Cormorants (Jackowiak et al., 2006), in the body of the tongue in white tailed eagle (Jackowiak and Godynicki, 2005), and in the root of the tongue in ostrich (Jackowiak and Ludwig, 2008). In this study, the structure of desquamating cells, *epithelium stratificatum squamosum*, was determined on the *apex lingua*, on the *dorsal* surface of the tongue, on the *papilla lingua rostralis* and on the *papilla lingua caudales* on the *radix lingua* in flamingos.

It has been reported that there are orifices in the ducts of the *lingual* glands in various parts of the tongue in birds. It has been reported that these orifices, through which the tongue salivary glands open, were found on the *corpus lingua* in sandbirds (Elner et al., 2005), falcons and kestrels (Emura et al., 2008); on the *radix lingua* in the striped owl (Emura et al., 2009), the blue flycatcher, the great-headed Finch, and the Japanese white-eye bird (Emura et al., 2010); the base of the tongue in the Finch (Heidweiller and Zweers, 1990), and on the surface of the tongue in the ostrich (Jackowiak and Ludwig, 2008). In our study, orifices of lingual glands were observed in accordance with the literature. In the Greater flamingo, these orifices were found to be located *lateral* to the *corpus* of the tongue.

In a study on duck tongues, it was stated that food filtration apparatus on the tongue surface includes *conical* and *filiform papillae* (Skieresz-Szewczyk and Jackowiak, 2016). In addition to the *lingua rostralis* and *caudalis*, which form large *conical papillae* in the Great flamingo, there is also a *longitudinal caudolateral* series of *papillae*. The flamingos we examined do not have *filiform papillae*.

Skieresz-Szewczyk and Jackowiak, (2016) reported that structures related to *intraoral* transport include the *sulcus medianus linguae*, *lingual* combs, the *rostral* border of the *lingual* process, and prominent *conical* rows of *papillae* on the *lingual eminent*. In our study, it was determined that flamingos have *conical papillae*, *sulcus lingua* and *torus lingua* structures from these structures.

The tongues of flamingos, which can catch and swallow large pieces of live food, swallow small pieces by distinguishing them from water, and feed by filtering microorganisms from the water, are designed in such a way that these 3 different types of feedings can be very successful. Flamingos can perform these 3 types of feeding thanks to the presence of pointed apex *lingua* and spina-shaped *papillae lingua rostralis*, which are developed to catch and swallow large pieces; *papillae lingua rostralis* and *caudalis*, which help to separate small pieces from water and swallow them; and all other *papillae*, which help to filter microorganisms in the water. With this study, the anatomical structure specific to its functions and the species-specific anatomy and papillary architecture of the flamingo tongue were revealed.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest related to this report.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon rea-

sonable request.

REFERENCES

- Ahmed SA, Hafiz EH, Alm-Eldeen A. Scanning electron microscopic study on the dorsal lingual surface of the Egyptian little owl, *Athene noctua*. Sci JBAS 2018; 39(2): 85-90.
- Alan A, Onuk B, Alan E, Kabak M. Light and electron microscopic studies on the pecten oculi showing blood-retina barrier properties in Turkey's native Gerze chicken. Anat Histol Embryol 2020; 49(4): 478-85.
- Baumel JJ, King AS, Breazile JE, Evans HE, Vanden Berge JC. Nomina Anatomica Avium. The Nuttall Ornithological Club, Cambridge 1993; pp. 431-2.
- Elner RW, Beninger PG, Jackson DL, Potter TM. Evidence of a new feeding mode in western sandpiper (*Calidris mauri*) and dunlin (*Calidris alpina*) based on bill and tongue morphology and ultrastructure. Marine Biology 2005; 146: 1223-34.
- Emura S, Okumura T, Chen H. Scanning electron microscopic study of the tongue in the peregrine falcon and common kestrel. Okajimas Folia Anat Jpn 2008; 85(1): 11-5.
- Emura S, Chen H. Scanning electron microscopic study of the tongue in the owl (*Strix uralensis*). Anat Histol Embryol 2008; 37(6): 475-8.
- Emura S, Okumura T, Chen H. Scanning electron microscopic study of the tongue in the Oriental scops owl (*Otus scops*). Okajimas Folia Anat Jpn 2009; 86(1): 1-6.
- Emura S, Okumura T, Chen H. Comparative studies of the dorsal surface of the tongue in three avian species by scanning electron microscopy. Okajimas Folia Anat Jpn 2010; 86(4): 111-5.
- Emura S. Scanning electron microscopic study on the tongues of seven avian species. Okajimas Folia Anat Jpn 2016; 93(2): 41-51.
- Erdoğan S, Iwasaki S. Function-related morphological characteristics and specialized structures of the avian tongue. Ann Anat 2014; 196 (2-3): 75-87.
- Erdoğan S, Pérez W. Anatomical and scanning electron microscopic characteristics of the oropharyngeal cavity (Tongue, Palate and Laryngeal Entrance) in the Southern Lapwing (Charadriidae: *Vanellus chilensis*, Molina 1782). Acta Zool (Stockholm) 2015; 96(2): 264-72.
- Erdoğan S, Pérez W, Alan A. Anatomical and scanning electron microscopic investigations of the

- tongue and laryngeal entrance in the long-legged buzzard (*Buteo rufinus*, Cretzschmar, 1829). *Microsc Res Tech* 2012;75(9):1245-52.
- Holliday CM, Ridgely RC, Balanoff AM, Witmer LM. Cephalic vascular anatomy in flamingos (*Phoenicopterus ruber*) based on novel vascular injection and computed tomographic imaging analyses. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288(10): 1031-41.
- Heidweiller J, Zweers GA. Drinking mechanisms in the Zebra Finch and the Bengalese Finch, *The Condor* 1990; 92(1): 1-28.
- Ilgun R, Kuru N, Bölükbaş F, Gür F. Histological and electron microscopical structure of tongue and lingual papillae of Guinea Fowl (*Numida meleagris*). *Pakistan J Zool* 2020; 52(3): 949-56.
- Jackowiak H, Godynicki S. Light and scanning electron microscopic study of the tongue in the white tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*, Accipitridae, Aves). *Ann Anat* 2005; 187(3): 251-9.
- Jackowiak H, Andrzejewski W, Godynicki S. Light and scanning electron microscopic study of the tongue in the cormorant *Phalacrocorax carbo* (Phalacrocoracidae, Aves). *Zoolog Sci* 2006; 23(2):161-7.
- Jackowiak H, Ludwig M. Light and scanning electron microscopic study of the structure of the ostrich (*Strutio camelus*) tongue. *Zoolog Sci* 2008; 25(2): 188-94.
- Johnston NE. The avian tongue. San Francisco, Golden Gate Audubon Society 2014; p.15.
- Kobayashi K, Kumakura M, Yoshimura K, Inatomi M, Asami T. Fine structure of the tongue and lingual papillae of the penguin. *Arch Histol Cytol* 1998; 61(1): 37-46.
- Mascitti V, Kravetz FO. Bill morphology of South American Flamingos. *The Condor* 2002; 104(1): 73-83.
- Onuk B, Tutuncu S, Alan A, Kabak M, Ince NG. Macroanatomic, light and scanning electron microscopic studies of the pecten oculi in the stork (*Ciconia ciconia*). *Microsc Res Tech* 2013; 76(9): 963-7.
- Onuk B, Tütüncü S, Kabak M, Alan A. Macroanatomic, light microscopic, and scanning electron microscopic studies of the tongue in the seagull (*Larus fuscus*) and common buzzard (*Buteo buteo*). *Acta Zool* 2015; 96(1): 60-6.
- Ozkadif S, Haligur A, Haligur M, Alan A. Morphological examination and scanning electron microscopic study of the barn owl's (*Tyto alba*) tongue. *Microsc Res Tech* 2023; 86(7): 747-53.
- Pourlis AF. Morphological features of the tongue in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Morphol Sci* 2014; 31(3): 177-81.
- Tabasi M, Mohammadpour AA. Light and scanning electron microscopic study of the tongue in the guinea fowl (*Numida meleagris*). *Comp Clin Pathol* 2019; 28: 613-9.
- Tutuncu S, Onuk B, Kabak M. The morphological study of the lingua in stork (*Ciconia ciconia*). *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18(4): 623-6.
- Skieresz-Szewczyk K, Jackowiak H. Morphofunctional study of the tongue in the domestic duck (*Anas platyrhynchos f. domestica*, Anatidae): LM and SEM study. *Zoomorphology* 2016; 135: 255-68.
- Zweers G, Jong F, Berkhoudt H, Vanden Berge JC. Filter feeding in flamingos (*Phoenicopterus ruber*). *The Condor* 1995; 97(2): 297-324.



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Research Article / Araştırma Makalesi
22(1), 7-12, 2025
DOI: 10.32707/ercivet.1540573

Shape Analysis of Otoliths of *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) and *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) Species by Geometric Morphometry

Muhammed Yaşar DÖRTBUDAK^{1,a}, Yasin DEMİRASLAN^{2,b}, İsmail DEMİRCİOĞLU^{3,c},
Funda AKSÜNGER KARAACI^{4,d}

¹Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Fisheries and Diseases, Şanlıurfa-TÜRKİYE

²Dokuz Eylül University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, İzmir-TÜRKİYE

³Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Şanlıurfa-TÜRKİYE

⁴Bingöl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Bingöl-TÜRKİYE

ORCID No: ^aORCID: 0000-0001-7966-5678, ^bORCID: 0000-0003-3612-6142, ^cORCID: 0000-0002-0724-3019, ^dORCID: 0000-0001-8311-1723

Corresponding author: İsmail DEMİRCİOĞLU, E-mail: idemircioglu@harran.edu.tr

How to cite: Dörtbudak MY, Demiraslan Y, Demircioğlu İ, Aksünger Karaavcı F. Shape analysis of otoliths of *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) and *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) species by geometric morphometry. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2025; 22(1):7-12

Abstract: *Capoeta* (*C.*) *trutta* (Heckel, 1843) and *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) are the most common species living in the Tigris and Euphrates rivers. This study aimed analyze the shape of the otoliths of *C. trutta* and *C. umbla* fish from the *Capoeta* genus, which inhabit the Tigris River in Turkey. The geometric morphometric method was used to identify and compare the similarities and differences between these fish species. A total of 72 right otoliths, (for each species 36), were used. Geometric morphometric analyses were performed by marking semi-landmark and landmarklar on the otoliths. When the data were examined, it was determined that the first principal component accounted for 25.15% of the total shape difference, while the first four principal components (PC1+PC2+PC3+PC4) accounted for 59.14% of the total shape difference. According to the regression analysis of shape over size, 9.2615% of shape can be predicted in terms of size by groups and it was determined as 26.0817% of shape according to PC1 (P: 0.0001), 7.1205% according to PC2 (P: 0.0233) and 10.2255 (P: 0.0051) according to PC3 can be predicted. According to the cross-validation score, 7 (19.44%) samples from *C. trutta* and 4 (11.11%) samples from *C. umbla* were involved in the opposite group, and these results showed that the two groups had a successful grouping (at least 80%) according to the shape. Consequently, it is thought that the data of the present study can be reference data for many disciplines, especially the taxonomic classification of the species in question.

Keywords: *Capoeta*, geometric morphometry, otolith, semilandmark, shape analysis

Capoeta trutta (Heckel, 1843) ve *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) Türlerinin Otolitlerinin Geometrik Morfometri ile Şekil

Öz: *Capoeta* (*C.*) *trutta* (Heckel, 1843) ve *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) Dicle ve Fırat nehirlerinde yaşayan en yaygın türlerdir. Bu çalışmada, Türkiye'de Dicle Nehri'nde yaşayan *Capoeta* cinsine ait *C. trutta* ve *C. umbla* balıklarının otolitlerinin geometrik morfometrik yöntem kullanılarak şekil analizlerinin yapılması ve aralarındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya konulması amaçlanmıştır. Her biri 36 adet olmak üzere toplam 72 adet sağ otolit kullanılmıştır. Geometrik morfometrik analizler otolitlerin üzerine semilandmarklar ve landmarklar konularak gerçekleştirilmiştir. Veriler incelendiğinde, ilk temel bileşen toplam şekil farkının %25.15'ini oluştururken, ilk dört temel bileşenin (PC1+PC2+PC3+PC4) toplam şekil farkının %59.144'ünü oluşturduğu belirlenmiştir. Boyut üzerinden şeklin regresyon analizine göre, gruplar tarafından boyut açısından şeklin %9.2615'inin tahmin edilebildiği ve PC1'e göre şeklin %26.0817'sinin (P: 0.0001), PC2'ye göre %7.1205'inin (P: 0.0233) ve PC3'e göre 10.2255'inin (P: 0.0051) tahmin edilebildiği belirlenmiştir. Çapraz doğrulama skoruna göre *C. trutta*'dan 7 (%19.44) ve *C. umbla*'dan 4 (%11.11) örnek zıt grupta yer almış ve bu sonuçlar iki grubun şekle göre başarılı bir gruptama (en az %80) yaptığını göstermiştir. Sonuç olarak, mevcut çalışmanın verilerinin söz konusu türlerin taksonomik sınıflandırması başta olmak üzere birçok disiplin için referans veri olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Capoeta*, geometrik morfometri, otolit, semilandmark, şekil analizi

Introduction

There are *C. trutta* and *C. umbla* species belonging to the genus *Capoeta* in the Tigris and Euphrates river systems. These species are among the most

common and dominant fish of the river system (Kuru, 1975; Ünlü, 1991). It is inevitable for species with a wide distribution to show some genetic variations due to the different ecological conditions in which they live in river systems. Morphometric variation is used to distinguish similar fish species and to identify hybrids (Carlson et al., 1985). For this reason, morphometric

Geliş Tarihi/Submission Date : 29.08.2024
Kabul Tarihi/Accepted Date : 06.12.2024

and meristic variations of *C. trutta* (Heckel, 1843) and *C. umbla* species (Heckel, 1843), which are widely distributed in the Tigris and Euphrates river basins, were attempted to be determined by discriminant analysis (Çiçek, 2009).

Diagnostic characteristics of *C. trutta* are D.III-IV/8, A.III/5, L.lat: 71-85 with an average of 76.5. Its body is high and laterally compressed. Its mouth is ventral and has 1 pair of barbels. Pharyngeal dental formula is 4.3.2-2.3.4. In terms of color, the dorsal contains black spots against an off-white backdrop, whereas the ventral is white. The longest unbranched ray on the dorsal fin is greater than the head length (Dağlı and Erdemli, 2011).

Diagnostic characteristics of *C. umbla* are D.III-IV/ (8) 9(10), A.III/5, L. Lat: 72-93 with an average of 80.8. Its body is elongate and cylindrical. Its mouth is ventral and has a pair of short barbels. Pharynx dental formula is 4.3.2-2.3.4. The lips are covered with a horny skin and the upper lip is well developed. The color is dark brown or gray on dorsal and muddy yellow on lateral and ventral. The last ossified simple ray of the dorsal fin is serrated with thin and flexible distal (Dağlı and Erdemli, 2011).

One of the preferred bony formations for the age determination of Osteichthyes is otoliths. There are three types of otoliths ("sagitta", "lapillus" and "asteriscus") in the semicircular canals on the right and left sides of the head, which act both as a balance organ and hearing aid in fish. The location, structure, size and shape of these three types of otoliths are different (Kontaş et al., 2020). They are usually ranked by size as sagitta, lapillus, and asteriscus. Sagittas are most preferred for age determination (Atilgan et al., 2010). Otoliths are widely used in fish biology. In addition, otolith morphometry is employed to obtain information about fish length, growth and ecomorphology, population identification, age estimation, determination of growth rates, the field of paleontology, and changes in the habitat conditions (Volpedo and Fuchs, 2010; Ilkay et al., 2011; Jawad, 2018). Otoliths are also used to estimate size and identity of the prey due to interspecies differences in shape and resistance to digestion (Battaglia et al., 2010).

The aim of the study is to reveal the similarities and differences of *C. trutta* and *C. umbla* and the changes depending on the shape according to the effect of species by conducting the shape analysis of these species' otoliths with geometric morphometry.

Material and Method

Ethical Statement Samples

The materials utilized in this study were obtained as waste products from fishermen engaged in fishing activities in the Tigris River located in Şırnak prov-

ince. The acquisition of these samples was conducted in compliance with the guidelines outlined in the Regulation on the Working Procedures and Principles of Animal Experimentation Ethics Committees, as published in the Official Gazette. This regulation explicitly states that the use of deceased animals, tissues, slaughterhouse materials, and waste fetuses does not require permission from the HADYEK.

Samples

Fish samples were taken from the Tigris River (Şırnak/Turkey), and their sagittal otoliths were removed, cleaned, dried, and stored in labeled boxes. Otoliths were photographed using stereo-microscope (Olympus SZ61TR+Olympus LC20). A total of 72 right otoliths, (for each species 36), were used.

Imaging and Digitization

The right otoliths were zoomed in and photographed. Photographing was performed at 500 µm. The JPG photos were saved to the computer. A total of 80 markings, consisting of 2 homologous landmarks (rostrum and antirostrum) and 78 semilandmarks, were made using TpsUtil (Version 1.79)¹² and TpsDig2 (Version 2.31) (Rohlf, 2019) software. Thus, the x and y cartesian coordinates of the points representing the general shape of the otolith were determined. Before statistical analysis, a confirmation test was performed for landmarks in TpsSmall software (Version 1.34) (Rohlf, 2018). As a result of this test, uncentered correlation and root mean square error values were found to be 0.999999 and 0.000075, respectively. These outcomes proved that the marked semilandmarks were accurate.

Statistical Analysis

General Procrustes Analysis was performed. Since there were differences in direction, position and size in the photographs (Slice, 2007). The new coordinates from the Procrustes analysis were subjected to principal component analysis. In addition, in areas where shape differences are concentrated, allometry and grouping features were determined by the Discriminant Function Analysis (DFA). MorphoJ (Klingenberg, 2011) software was used for all these analyses.

Results

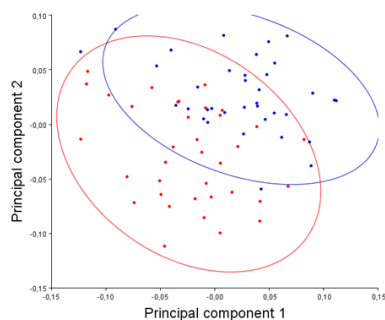
Based on the principal component analysis, the two fish species that were part of the study had 71 components total. Table 1 displays the results from this research. The first principal component (PC1) accounted for 25.150% of the total shape variation, while the first four principal components accounted for 59.144% of the total shape variation. A significant difference was observed among principal components after PC4 and PC5.

Table 1. Results of the principal component analysis, PC: principal component

PC	Eigenvalue	% Variance	PC	Eigenvalue	% Variance	PC	Eigenvalue	% Variance
1	0.003119	20.15	25	8.96E-05	0.579	49	1.96E-05	0.127
2	0.002257	14.58	26	8.42E-05	0.544	50	1.91E-05	0.124
3	0.00204	13.178	27	7.97E-05	0.515	51	1.87E-05	0.121
4	0.001739	11.236	28	7.49E-05	0.484	52	1.8E-05	0.116
5	0.000756	4.881	29	7.08E-05	0.457	53	1.61E-05	0.104
6	0.000539	3.483	30	6.59E-05	0.426	54	1.48E-05	0.095
7	0.000489	3.161	31	5.99E-05	0.387	55	1.32E-05	0.086
8	0.000402	2.598	32	5.8E-05	0.374	56	1.2E-05	0.078
9	0.000312	2.019	33	5.61E-05	0.362	57	1.16E-05	0.075
10	0.000285	1.843	34	5.13E-05	0.331	58	1.08E-05	0.07
11	0.000239	1.545	35	4.95E-05	0.32	59	1.05E-05	0.068
12	0.000211	1.364	36	4.58E-05	0.296	60	9.65E-06	0.062
13	0.000206	1.331	37	4.1E-05	0.265	61	9.1E-06	0.059
14	0.000192	1.243	38	3.99E-05	0.258	62	7.67E-06	0.05
15	0.000161	1.039	39	3.81E-05	0.246	63	6.91E-06	0.045
16	0.000153	0.986	40	3.64E-05	0.235	64	6.79E-06	0.044
17	0.00015	0.968	41	3.47E-05	0.224	65	5.83E-06	0.038
18	0.000141	0.913	42	3.27E-05	0.211	66	4.97E-06	0.032
19	0.000131	0.848	43	3.11E-05	0.201	67	4.34E-06	0.028
20	0.000127	0.817	44	2.97E-05	0.192	68	4.27E-06	0.028
21	0.000117	0.756	45	2.65E-05	0.171	69	3.35E-06	0.022
22	0.000112	0.725	46	2.47E-05	0.159	70	3.07E-06	0.02
23	0.000104	0.671	47	2.32E-05	0.15	71	2.53E-06	0.016
24	9.69E-05	0.626	48	2.28E-05	0.147			

The distribution of the samples according to PC1 and PC2 is shown in the graph in Figure 1. Accordingly, *C. trutta* samples were more distinctly separated from *C. umbla* samples (*C. trutta*: 55%, *C. umbla*: 27%)

As a result of the regression analysis of the shape (PCs) on the centroid size, it was determined that 9.2615% of the shape could be predicted in terms of size ($P: 0.0001$ at confidence interval of 95%). 26.0817% ($P: 0.0001$) of the shape according to PC1, 7.1205% ($P: 0.0233$) according to PC2, and 10.2255% ($P: 0.0051$) according to PC3 were predictable in terms of size. Figure 2 shows the graphs showing at which landmark level the shape differences were concentrated according to PC1 and PC2. Therefore, the variations in shape, as indicated by PC1 and PC2 (Figure 2), were clearly observed in the dorsal edge and antirostrum.

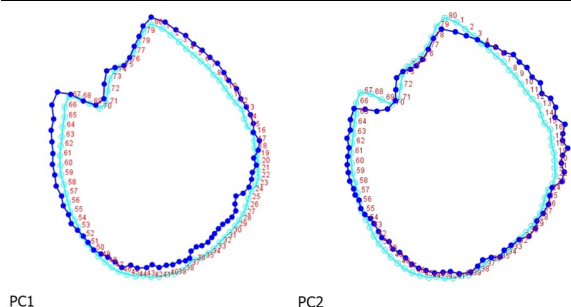
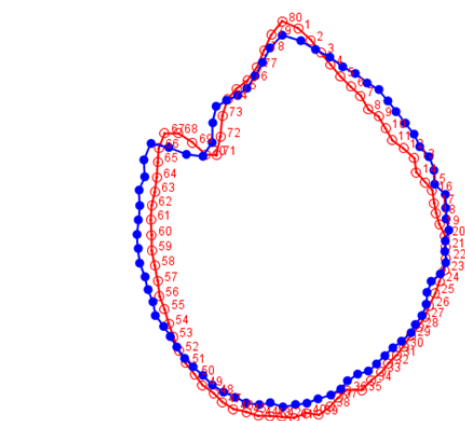
**Figure 1.** Graphical distribution of the samples according to PC1 and PC2

As a result of discriminant function analysis, Mahalanobis and Procrustes distances were determined as 5.8335 and 0.07999546 ($P: 0.0001$), respectively. Table 2 shows the grouping characteristics obtained as a result of this analysis. According to the cross-validation score, 7 (19.44%) samples from *C. trutta* and 4 (11.11%) samples from *C. umbla* were included in the opposite group. These results showed that the two groups had a successful grouping (at least 80%) according to the shape.

Figure 3 show that the variations in shape based on the groups found in the otolith wire-frame warp graph. Accordingly, it was observed that *C. umbla* was wider than *C. trutta* at the level of its dorsal and ventral edges. The rostrum of *C. trutta* was larger and sharp pointed. Additionally, the *C. trutta* had a more indented area at the dorsoventral intersection point (symmetrical of the rostrum).

Table 2. Grouping characteristics of the samples according to discriminant function analysis

Discriminant Function				
Group	<i>C. trutta</i>	<i>C. umbla</i>	Total	
<i>C. trutta</i>	36	0	36	
<i>C. umbla</i>	0	36	36	
Cross-Validation				
Group	<i>C. trutta</i>	<i>C. umbla</i>	Total	
<i>C. trutta</i>	29	7	36	
<i>C. umbla</i>	4	32	36	

**Figure 2.** Wireframe graphical representation of shape differences according to PC1 and PC2. Blue represents the average shape relative to the principal component.

CT-CU

Figure 3. Wire-frame warp graph of otolith shape according to discriminant function analysis. Red: *C. trutta*, Blue: *C. umbla*. (CT: *C. trutta*, CU: *C. umbla*)

Discussion and Conclusion

The morphology of otoliths is important because it provides a plethora of information that may be used to infer the systematics and evolution of fish, as well as information about the age and general biology of fish (Samsun and Samsun, 2006; Avşar et al., 2007). Traditional morphometric method enable us to make measurements such as length, depth, and width obtained by distance, angles and ratios between points, but it cannot reveal complete data in terms of the shapes of the objects examined. The morphometric geometry method enables the shapes of objects to be revealed fully through analysis (Zelditch et al., 2012; Aytek; 2017). In addition, it has been reported that the morphometric geometry method is effective in revealing the similarities and differences of taxonomically close species (Ibanez et al., 2012; Teimori; 2016). In the study, the similarities and differences of the *C. umbla* and *C. trutta* were revealed by determining the shape analyses of the otoliths of the two species living in the same zones, using the morphometric geometry method.

In the study, it was determined that PC1 accounted for 25.15% of the total shape variations and 59.144% of the first four principal components (PC1+PC2+PC3+PC4) in analysis of 71 principal components. A significant difference was observed among the principal components after PC4 and PC5.

Dörtbudak et al. (2022) in their study on *C. kais* and *C. macrostomus* otoliths, reported that PC1 accounted for 26.871% of the total shape variation, while the first three principal components (PC1+PC2+PC3) accounted for 52.235%, and a significant difference was observed among the principal components after PC5 and PC6.

In their shape analysis of 6 different fish species from the family Sebastes, Afanasyev et al. (2017), reported that the PC1 of the samples accounted for the total shape variation as 48%.

Çiçek et al. (2017), reported that the sum of the first two principal components (PC1+PC2) was 52.2% in their morphometric geometry study on fish scales of *C. umbla* and *C. trutta*. These results revealed that the two fish species analyzed in terms of otolith

shape in the present study are distinguished from each other at rates similar to the literature.

Dörtbudak et al. (2022), as a result of the regression analysis of the shape (PCs) over the centroid size, reported that 2.1020% of the shape can be predicted in terms of size, according to the groups, and thus in the comparison of the otolith morphology of the individuals in terms of groups, the shape variations were not dependent on the size, therefore, there was no allometric component. In the study, regression analysis revealed that 9.2615% of the shape could be predicted in terms of size (centroid size) according to the groups. The predictability of the shape in terms of size was 26.0817% according to PC1, 7.1205% according to PC2, and 10.2255% according to PC3. These results showed that the predictability of the otolith shapes belonging to which breed was higher in the study.

In the study, it was determined that the shape differences of the otoliths in terms of PC1 and PC2 became evident in the dorsal edge and anterostrum. In the shape analysis of the otoliths of the *C. kais* and *C. macrostomus* (Dörtbudak et al., 2022) species using the morphometric geometry method, it was reported that the shape differences in terms of PC1 became evident at the level of the entire dorsal edge, rostrum, antirostrum and the middle of the ventral edge. These differences are thought to be important in species taxonomy and identification.

There are different anatomical studies determining the similarities and differences of *C. umbla* and *C. trutta* species (Çiçek, 2009; Dağlı and Erdemli, 2011). Dörtbudak et al. (2022) reported that the two groups had a successful grouping (at least 75%) according to the shape, and it was determined in their study that they showed a successful grouping of 80% on the two species in question. Findings of the present study showed that *C. umbla* and *C. trutta* species were highly similar to each other. Although they inhabit the same zone, the dams built on the rivers they live in divide these regions into sub-living areas, so even if they are in the same genus, differences may occur after a while.

Consequently, the similarities and differences between *C. umbla* and *C. trutta* were revealed by making the shape analysis of the otoliths of the two species living in different zones of the same habitat. It is thought that as a result of the determination of shape-related variations according to the effect of breed, the present study presents data that would contribute to the taxonomic classification of these two species and the fauna of the Euphrates and Tigris Rivers, which are an important source of biodiversity for the Mesopotamian region.

References

- Afanasyev PK, Orlov AM, Rolsky AY. Otolith shape analysis as a tool for species identification and studying the population structure of different fish species. *Biol Bull* 2017; 44(8): 952-9.
- Atilgan E, Erbay M, Aydın İ. Doğu Karadeniz'deki ekonomik bazı otolit özellikleri. *Aquac Stud* 2010; 1: 12-5.
- Avşar D, Çiçek E, Yeldan H, Manaşirli M, Mavruk S. İskenderun ve Mersin körfezlerindeki Centracentidae familyasına ait (kemikli balık) bazı türlerin otolit morfolojileri. *Türk Sucul Yaşam Dergisi* 2007; 5: 116 - 23.
- Aytek Aİ. Geometrik morfometri. *MASROP E-Dergi* 2017; 11(17): 1-7.
- Battaglia P, Malara D, Romeo T, Andaloro F. Relationships between otolith size and fish size in some mesopelagic and bathypelagic species from the Mediterranean Sea (Strait of Messina, Italy). *Sci Mar* 2010; 74: 605-12.
- Carlson DM, Pflieger WL, Trial L, Haverland PS. Distribution, biology and hybridization of *Scaphirhynchus albus* and *S. platyrhynchus* in the Missouri and Mississippi rivers. *Environ Biol Fishes* 1985; 14(1): 51-9.
- Çiçek T. Dicle ve Fırat Su Sistemlerinde Yaşayan Cyprinidae Familyasına Ait Bazı Türlerde Görülen Morfometrik ve Meristik Varyasyonların İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniv Fen Bil Ens, Diyarbakır 2009.
- Çiçek T, Kaya A, Bilici S, Dörtbudak MY. Discrimination of *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) and *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) from scales by geometric morphometric methods. *J Surv Fish Sci* 2017; 4(1): 8-17.
- Dağlı M, Erdemli AÜ. *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) ve *Capoeta trutta* (Heckel, 1843)'nın bazı meristik ve morfometrik özelliklerinin karşılaştırılması. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi* 2011; 2(3): 46-56.
- Dörtbudak MY, Demiraslan Y, Demircioğlu İ. Geometric analysis of otoliths in *Cyprinion kais* and *Cyprinion macrostomus*. *Anat Histol Embryol* 2022; 51 (6): 1-7.
- Ibanez AL, Pacheco-Almanzar E, Cowx IG. Does compensatory growth modify fish scale shape? *Environ Biol Fishes* 2012; 94(2): 477-82.
- İlkyaz AT, Metin G, Kinacigil HT. The use of otolith length and weight measurements in age estimations of three Gobiidae species (*Deltentosteus quadrimaculatus*, *Gobius niger*, and *Lesueurigobius frie-*

sii). Turk J Zool 2011; 35(6): 819-27.

Jawad LA. A comparative morphological investigation of otoliths of six parrotfish species (Scaridae) from the Solomon Islands. J Fish Biol 2018; 93: 1046–58.

Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Mol Ecol Resour 2011; 11(2): 353-7.

Kontaş S, Yedier S, Bostancı D. Otolith and scale morphology of endemic fish *Cyprinion macrostomum* in Tigris–Euphrates Basin. Mol Ecol Resour 2020; 60(4): 562-9.

Kuru M. Dicle-Fırat, Kura-Aras, Van Gölü ve Karadeniz Havzası Tatlı Sularında Yaşayan Balıkların (Pisces) Sistematiği ve Zoocoğrafik Yönden İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniv Fen Bil Ens, Erzurum 1975.

Rohlf FJ. TpsDig Version 2.31. Ecology & Evolution, SUNY at Stone Brook, USA, 2018. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>

Rohlf FJ. TpsUtil program Version 1.79. Ecology & Evolution, SUNY at Stone Brook, USA, 2019. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>

Samsun N, Samsun S. Kalkan (*Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1811)) balığının otolit yapısı, yaş ve balık uzunluğu-otolit uzunluğu ilişkilerinin belirlenmesi. FÜMBD 2006; 18(2): 181-7.

Slice DE. Geometric morphometrics. Annu Rev Anthropol 2007; 36: 261-81.

Teimori A. Scanning electron microscopy of scale and body morphology as taxonomic characteristics of two closely related cyprinid species of genus *Capoeta Valenciennes*, 1842 in southern Iran. Curr Sci 2016; 111: 1214-9.

Ünlü E. Dicle Nehrinde yaşayan *Capoeta trutta* (Heckel, 1843)'nın biyolojik özellikleri üzerinde çalışmalar. Doğa-Turk J Zool 1991; 15: 22-38.

Volpedo AV, Fuchs DV. Ecomorphological patterns of the lapilli of *Paranoplatense Siluriforms* (South America). Fish Res 2010; 102: 160-5.

Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD. Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. San Diego, USA: Academic Press- Elsevier, 2012.



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Research Article / Araştırma Makalesi
22(1), 13-18, 2025
DOI: 10.32707/ercivet.1557680

The Effects of Mesoporous Silica Nanoparticles on Spermatological Parameters of Merino Ram*

Ali Erdem ÖZTÜRK^{1,a}, Aysu BALCI^{2,b}, Gizem SİVRİ^{2,c}, Pınar LEBLEBİCİ^{2,d}, Aslıhan SAĞLAM^{2,e},
Zeliha KILINÇ^{1,f}, Esen Gül YILDIZ^{2,g}, Mustafa BODU^{3,h}

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kayseri-TÜRKİYE

³Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Konya-TÜRKİYE

ORCID No: ^a0000-0002-3053-4615; ^b0009-0005-7495-9200; ^c0009-0009-3463-0207; ^d0009-0005-1768-3033;
^e0009-0001-4451-8763; ^f0009-0008-0788-8379; ^g0009-0005-5575-1041; ^h0000-0002-8432-7347

Corresponding Author: Ali Erdem ÖZTÜRK, E-mail: aeozturk@erciyes.edu.tr

How to cite: Öztürk AE, Balcı A, Sivri G, Leblebici P, Sağlam A, Kılınç Z, Yıldız EG, Bodu M. The Effects of Mesoporous Silica Nanoparticles on Spermatological Parameters of Merino Ram. Erciyes Univ Vet Fak Derg, 2025; 22 (1):13-18

Abstract: In recent years, nanotechnology has emerged as a rapidly advancing field with diverse applications across various sectors including materials science, electronics, healthcare, aerospace, environmental sustainability, defense, biotechnology, agriculture, and food industries. Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) have recently gained significance as nanomaterials due to their stability, inert properties, thermal durability, low density, minimal toxicity, and biocompatibility. These attributes will make mesoporous silica nanoparticles instrumental in drug delivery systems, cellular imaging, and therapeutic interventions. In this study, aimed at assessing the potential of MSNs as effective carriers for various materials to spermatozoa (sptz), experimental groups were established as control (C), MSN10 (10 µg/10⁷ sptz), MSN20 (20 µg/10⁷ sptz), and MSN40 (40 µg/10⁷ sptz). To investigate this hypothesis, semen was collected from five healthy rams (2-3 years of age), pooled, diluted, and divided into experimental groups. Following this study, analyses were conducted on motility, dead-live spermatozoa ratio, functional integrity of the sperm's plasma membrane (HOST), and abnormal spermatozoa ratios across five replicates. It was observed that MSNs did not have a negative effect on the freezability of ram semen in terms of dead-live spermatozoa ratio and HOST data, but caused an increase in motility (MSN40) and head and tail abnormality levels compared to the control group, though still within acceptable ranges. In the light of the data obtained, it is suggested that MSNs can be used as biocarriers for ram semen in terms of basic spermatological parameters, but it is necessary to expand the scope of the research and conduct more detailed analyses.

Keywords: Mesoporous silica nanoparticles, nanotechnology, ram, sperm

Mezogözenekli Silika Nanopartiküllerinin Merinos Koçlarının Spermatolojik Parametreleri Üzerindeki Etkileri

Öz: Nanoteknoloji, son yıllarda oldukça gelişim gösteren ve kullanım alanı bulan bir teknolojidir. Malzeme ve imalat sektörü, elektronik ve bilgisayar teknolojileri, tıp ve sağlık sektörü, havacılık ve uzay araştırmaları, çevre ve enerji, savunma sanayii, biyoteknoloji, tarım ve gıda gibi pek çok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Son dönemde kullanım alanı bulan nanomalzemelerden bir tanesi de mezoporoz silika nanoparçacıklarıdır (MSN). Kararlılıkları, inert yapıları, termal dayanıklılıkları, düşük yoğunlukları, düşük toksisiteleri ve biyouyumlulukları sayesinde mezoporoz silika nanopartiküller ilaç taşıma sistemlerinde, hücre görüntülemeye ve tedavi yöntemlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu noktada MSN'lerin çeşitli materyalleri spermatozoaya (sptz) taşıma noktasında etkili bir ajan olup olmayacaklarının test edilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada kontrol (C), 10 µg/10⁷ sptz (MSN10), 20 µg/10⁷ sptz (MSN20) ve 40 µg/10⁷ sptz (MSN40) µg olacak şekilde gruplar oluşturulmuştur. Sağlıklı ve 2-3 yaşlarında 5 adet koçtan spermalar alınarak pooling yapılmış ve sulandırılarak deney gruplarına bölünmüştür. Toplamda 5 tekrar halinde yapılan bu çalışma sonucunda motilite, ölü-canlı spermatozoa oranı, membran dayanım oranı (HOST) ve anormal spermatozoa oranları hesaplanmıştır. Proje sonucunda MSN lerin koç spermasının dondurulabilirliği üzerine ölü-canlı spermatozoa oranı ve HOST verileri bakımından olumsuz bir etkisinin olmadığı, ancak kabul edilebilir sınırlar içerisinde olsa da, kontrol grubuna kıyasla, motilite ve anormalite düzeylerinde artışa neden olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler ışığında MSN lerin koç sperması için biyo taşıyıcı olarak kullanılabileceği temel spermatolojik parametreler bakımından ön görülse de, araştırma kapsamının genişletilerek daha detaylı analizlerin yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Koç, mezogözenekli silika nanoparçacıklar, nanoteknoloji, sperma

Geliş Tarihi/Submission Date : 28.09.2024

Kabul Tarihi/Accepted Date : 24.12.2024

* This study was summarized from the project numbered 1919B012206003 supported by TUBITAK.

Introduction

The term "nano" in Nanotechnology originates from the Greek word for "dwarf" and signifies one billionth of a meter (1x10⁻⁹ m). Nanotechnology facilitates the

practical utilization of structures at the nanometer scale (1-100 nm) and generally materials smaller than 100 nm are categorized as nanomaterials, whereas in the medical field, particles measuring 200 nm in size are also classified as nanomaterials (Bayda et al., 2019; Contera et al., 2020).

Over the past few years, nanotechnology has been widely incorporated in biomedical uses, notably influencing biological sensing, medication transport, and diagnostic imaging. This is particularly important in the emerging field of reproductive health, which has become an important area of research (Acharya et al., 2024). Infertility, endometriosis, ectopic pregnancy, erectile dysfunction, benign prostatic hyperplasia, sexually transmitted infections and reproductive cancers have become worldwide concerns. Nanotechnology presents hopeful remedies to tackle these issues through novel methods and tools, enabling early detection, precise drug delivery, and enhanced imaging Technologies (Ammar et al., 2019; Bansal et al., 2020; Chakraborty et al., 2023; Zhao et al., 2023). Nanotechnology holds immense promise in the field of reproductive medicine, paving the way for advancements in diagnosis, personalized treatments, and fertility preservation. Utilizing nanotechnology-based drug delivery systems is anticipated to enhance treatment outcomes, reduce side effects, and offer patients treatments that are not only more accurate but also more efficient (Acharya et al., 2024; Friend, 2017).

Nanomaterials, tiny forms of various materials measured in nanometers, originate diversely. Among these, mesoporous silica nanoparticles (MSNs) are notable examples. Due to their expansive surface area, stability, and biocompatibility, mesoporous silica nanoparticles (MSNs) find applications in biomedical, pharmaceutical, and biochemistry fields. Their mechanical stability and resistance to microbial degradation can be attributed to the siloxane bonds (Si-O-Si) present in their structure. The cost-effective and convenient synthesis of MSNs makes them favorable for various industries. Their distinctive features, including azoles-containing structures, make them valuable in biomedical, chemical, and food-related sectors (Usul et al., 2022).

Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) are a favorable choice for cellular transport investigations due to their exceptional chemical properties, minimal toxicity, and structural resilience. Their compatibility with diverse materials and ease of functionalization make them versatile. These nanoparticles are valuable for detailed cell imaging and advancing reproductive health and genetic studies. MSNs serve as efficient carriers for various substances into sperm cells, ensuring safe and effective use without adverse effects on the reproductive system (Barkalina et al., 2014; 2015). Consequently, mesoporous silica nanoparti-

cles hold promise in reproductive biology research. With these advantages in mind, the aim was to explore the impact of mesoporous silica nanomaterials on ram semen.

Material and Method

Chemicals and Reagents

All the necessary chemicals for the Tris-based egg yolk extender used in the research were sourced from Sigma-Aldrich (Citric Acid C0706, Glycerol G2025, Fructose F2543, Trisma Base T6066). Local services for producing mesoporous silica nanoparticles (MSNs) were provided by Nano Enzyme Hybrid Technology (Kayseri, Türkiye).

Characterisation of MSN with Electron Microscopic Imaging

The characterization (size and shape) of the produced nanomaterials was carried out using STEM images. The necessary preparations for STEM images and acquisition of the images were carried out with the services of Erciyes University Technology Research and Application Center (ERUTAUM).

Experimental Design

The research involved 5 Merino rams aged between 2 and 3 years, previously used in breeding. These animals were housed and nourished at Selçuk University Prof. Dr. Humeyra Özgen Research and Application Farm. Semen from the selected rams, healthy and suitable for breeding, was collected twice a week for a total of 5 replications using an electroejaculator. Samples with optimal mass movement score (3 or above), at least 80% motility, and a density of 2.5×10^9 were pooled after collection to reduce individual variations in a 37°C water bath. Subsequently, the spermatozoa were divided into experimental groups comprising a control group and three groups treated with 10, 20, and 40 µg MSNs (Table 1). After grouping, the samples were equilibrated at +4°C for 2 hours, frozen using liquid nitrogen vapor, and stored until thawing (Figure 1) (Bodu et al., 2024). The ethical approval required for the study was obtained through decision number 22/266 from the Erciyes University Local Animal Experiments Ethics Committee.



Figure 1. Illustration of the experimental design.

Table 1. Experimental groups.

Groups	Extender Content
Control	Tris-Egg Yolk Extender
MSN10	Tris + 10 µg MSNs / 10 ⁷ sptz
MSN20	Tris + 20 µg MSNs / 10 ⁷ sptz
MSN40	Tris + 40 µg MSNs / 10 ⁷ sptz

Sperm Motility Assessment

Frozen semen was thawed after 2 weeks in 38°C water for 25 seconds, 10 micro liters was dropped onto the slide, covered with a cover slip and examined at 400x magnification under a phase contrast microscope by looking at 5 different areas. The motility of semen was subjectively determined as a percentage value by taking the average of 5 different areas (Evans and Maxwell, 1987).

Hypoosmotic Swelling Test

Test solution was prepared with 0.735 g sodium citrate + 1 g fructose + 100 ml distilled water. Then, 300µl of the prepared solution was mixed with 30µl semen and incubated at 37°C for 30 minutes. 20µl of the mixture was taken and a total of 300 spermatozoa were counted at 400x magnification under phase contrast microscope. The number of spermatozoa with swollen and curled tails was determined and the membrane resistance ratio was determined by calculating the percentage of these spermatozoa (Revell and Mrode, 1994).

Determination of Abnormal Spermatozoa

Ten micro liters of the dissolved sperm was taken and then completed to 200µl with Hancock's solution. A drop of 10 µl was placed on a slide, covered with a cover slip. At least 200 spermatozoa were counted at 100x magnification under a phase contrast microscope, and anomalies in the acrosome, head, mid-piece, and tail were identified (Evans and Maxwell, 1987).

Determination of Live/Dead Spermatozoa

Eosin-Nigrosin staining method was used to determine the ratio of dead to live semen. Smears were prepared by mixing 1 drop of semen with 2 drops of Eosin-Nigrosin stain on the slide. The prepared froths were examined under phase contrast microscope at 400X magnification. At least 300 spermatozoa were counted and those with red staining on the head were considered dead and those without red staining (white) were considered alive and the result was noted in percentages (Björndahl et al., 2003).

Statistical Analysis

The IBM SPSS Statistics 25 program was used for the statistical evaluation of the data obtained in the study. The averages of the results emerging in the spermatological parameters and imaging were determined for each experimental group using variance analysis (One-Way ANOVA). The comparison of groups showing significant differences within the same parameters was conducted using the post-hoc multiple comparison test Duncan. When evaluating the results, the presence of differences at a significance level of $P < 0.05$ was considered statistically important.

Results

Electron Microscopic Imaging of MSN

The STEM image of the produced MSNs is given in Figure 2. When the image is examined, it is seen that the produced MSNs are round-shaped and planar, and their sizes are between approximately 20-50 nm.

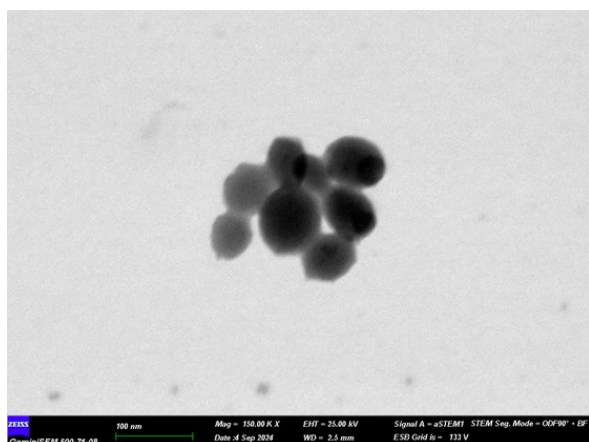


Figure 2. STEM images of synthesized MSNs.

Spermatologic Parameters

When sperm motility data were analyzed, it was observed that MSN 10 and MSN 20 groups gave similar results with the control group, while MSN 40 group gave statistically more successful results than all other groups ($P < 0.05$) (Figure 3).

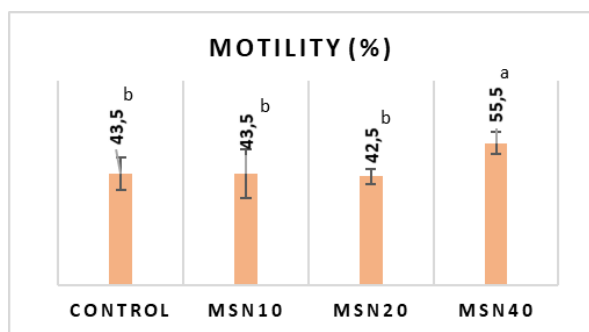


Figure 3. Motility results of the study groups. Control, MSN10 and MSN20 groups showed similar motility data, while MSN40 group had a higher motility value than all other groups ($P < 0.05$). *a,b: Shows the statistical difference between experimental groups.

No significant differences were observed among the experimental groups in terms of the ratio of live/dead spermatozoa and the Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST). The live/dead ratio reflects the membrane integrity of semen under optimal conditions, whereas HOST assesses the membrane resistance of semen in a low osmotic pressure environment. The viability percentage in the control group was 69.75%, and the functional integrity of the sperm's plasma membrane (HOST+) was 18.95%. Similar declines were noted in all groups, suggesting that mesoporous silica nanoparticles (MSNs) did not have a discernible impact on membrane resilience (Figure 4).

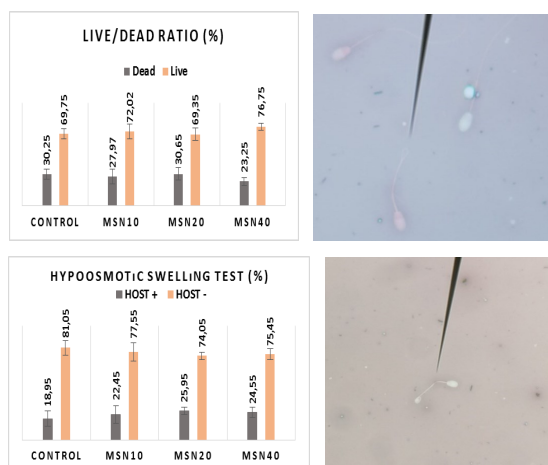


Figure 4. A. Graphic of Live/Dead ratio. B. Counting of Live/Dead spermatozoa. Dead spermatozoa with red arrow and live spermatozoa with white arrow. C. Graphic of Hypoosmotic Swelling Test. D. HOST positive spermatozoa with round head (blue arrow) and curved tail (green arrow) ($P > 0.05$).

When the abnormal spermatozoa data were analyzed, MSNs significantly increased both head- and tail-related abnormality rates (Figure 5). However, since the abnormality data obtained are within acceptable limits, they do not pose any danger in terms of using MSNs as biocarriers.

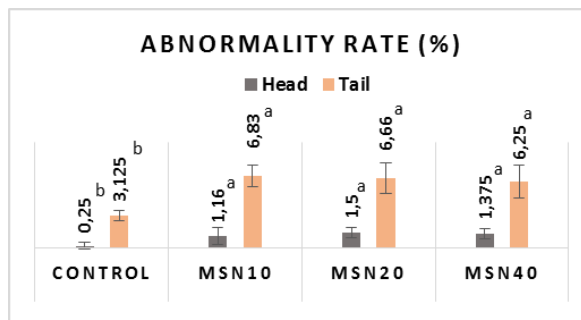


Figure 5. Head and Tail abnormality rates. All groups containing with MSN increased abnormality rates ($P < 0.05$). *a,b: Shows the statistical difference between experimental groups

Discussion and Conclusion

MSNs are one of the nanomaterials that have come to the fore in drug delivery in recent years. They are frequently used especially in cancer therapy and bioimaging systems. They can modify their surfaces to be suitable for the target tissue and thus become an advantageous nanomaterial at the point of cellular

uptake (Argyo et al., 2014; Baek et al., 2015).

Thanks to their drug delivery ability, MSNs have been tested in many therapeutic modalities. In one of these studies, Rathod et al. (2023) combined MSNs with Berberine, which is used as an anti-inflammatory in traditional Chinese medicine but can hardly be used in topical applications due to its low penetration ability. As a result of the study, Berberine used in combination with MSNs in rat paw edema was more successful than using it alone. In another study, Huang et al. (2022) utilized the ability of MSNs to transport 5-Fluororacil to reduce the proliferation ability and control the metastasis of oral squamous cancer cells.

In addition to these promising health studies, MSNs need some proof to gain toxicological credibility. Tacconi et al. (2022) stated that MSNs had a negative effect on the embryonic development of *Paracentrotus lividus*. They also emphasized that despite their promising potential, uncontrolled use of biomolecules may harm the environment and living organisms. In a similar study, Xu et al. (2014) revealed that silica nanoparticles negatively affected mouse spermatogenesis in a reversible manner, caused oxidative stress and damaged the structure of mitochondria. These and similar studies can be diversified. Rashidian et al. (2023) found that long-term exposure to silica nanoparticles decreased the reproductive performance of zebra fish.

Despite their high transport capacity, mesoporous silica nanoparticles have the potential to exhibit toxicity due to their size, surface properties, and pharmacokinetic aspects (Niroumand et al., 2023). Therefore, toxicity studies should be carried out considering dose and size. Considering the studies on semen, it was seen that there are very limited publications of MSNs in the literature.

In one of these studies, (Barkalina et al., 2014) incubated MSNs at 37 °C for 4 hours by adding 10, 15 and 30 µg/10⁷ spz doses in boar semen. When the data obtained were analyzed, it was stated that MSNs did not cause any negative effect on any of the basic parameters such as motility, viability, acrosomal integrity and DNA fragmentation. Again, Barkalina et al. (2015) reported that MSNs functionalized with cell penetrating peptide (C105Y) could bind to boar semen and did not cause any negative effect on motility data. Finally, in a study conducted in goat semen, Dev et al. (2020) reported that they did not observe any decrease in calculation data in the 3-hour incubation of 200 µg/ml MSNs.

In the current study, it was observed that 40 µg/10⁷ spz of mesoporous silica nanoparticles (MSNs) positively increased the motility data of ram sperm during the freezing and thawing process, while other groups showed similar results to the control groups. Regarding

the live/dead analyses and Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST), MSNs exhibited results similar to the control group, showing no positive or negative effects. Lastly, when abnormal spermatozoa data were examined, MSNs increased both head and tail abnormality rates, but as this increase remained within acceptable limits, it was not considered significant.

When the results were compared with the literature, both the studies by Barkalina et al. (2014; 2015), as well as the studies by Dev et al. (2020), yielded similar results. Just like in boar and goat sperm, no damage was observed on ram spermatozoa. Only a slight increase was noted in the head and tail abnormality rates. However, as other studies did not examine abnormality rates, comparisons cannot be made in this regard.

In conclusion, mesoporous silica nanoparticles (MSNs) can be utilized in any planned drug delivery study on ram sperm (within the current dosage limits). However, the present study only encompasses basic spermatological parameters. To reach conclusive results, detailed analyses including DNA damage, genetic analyses, and flow cytometric analyses are required. In this regard, the current study serves as a fundamental resource for future research endeavors.

Acknowledgement

The project was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) with the project number 1919B012206003. We would like to thank TUBITAK for their support.

References

- Acharya B, Behera A, Behera S, Moharana S. Recent advances in nanotechnology-based drug delivery systems for the diagnosis and treatment of reproductive disorders. ACS Appl Bio Mater 2024; 7(3): 1336-61.
- Ammar HO, Tadros MI, Salama NM, Ghoneim AM. Therapeutic strategies for erectile dysfunction with emphasis on recent approaches in nanomedicine. IEEE T Nanobiosci 2019; 19(1): 11-24.
- Argyo C, Weiss V, Bräuchle C, Bein T. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as a universal platform for drug delivery. Chem Mater 2014; 26(1): 435-51.
- Baek S, Singh RK, Khanal D, Patel KD, Lee EJ, Leong KW, Chrzanowski W, Kim HW. Smart multifunctional drug delivery towards anticancer therapy harmonized in mesoporous nanoparticles. Nanoscale 2015; 7(34): 14191-216.

- Bansal M, Kumar A, Malinee M, Sharma TK. Nanomedicine: Diagnosis, treatment, and potential prospects. *Nanoscience in Medicine* 2020; 1: 297-331.
- Barkalina N, Jones C, Kashir J, Coote S, Huang X, Morrison R, Townley H, Coward K. Effects of mesoporous silica nanoparticles upon the function of mammalian sperm in vitro. *Nanomedicine: Nanotechnol Biol Med* 2014; 10(4): 859-70.
- Barkalina N, Jones C, Townley H, Coward K. Functionalization of mesoporous silica nanoparticles with a cell-penetrating peptide to target mammalian sperm in vitro. *Nanomed* 2015; 10(10): 1539-53.
- Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules* 2019; 25(1): 112.
- Björndahl L, Söderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reprod* 2003; 18(4): 813-6.
- Bodu M, Öztürk AE, Kılınç Z, Hatipoğlu Ö, Ataman MB, Bucak MN, Kul M. The effect of lycopene and ascorbic acid on the post thaw Angora buck semen parameters. *J VetBio Sci Tech* 2024; 9(2): 133-42.
- Chakraborty D, Ghosh D, Kumar S, Jenkins D, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Nanodiagnostics as an emerging platform for oral cancer detection: Current and emerging trends. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2023; 15(1): e1830.
- Contera S, Bernardino de la Serna J, Tetley TD. *Biotechnology, Nanotechnology and Medicine*. First Edition. London: Portland Press Ltd, 2020; p.551-4.
- Dev K, Kaul G, Dhanda S. Cytotoxicity evaluation of MWCNTs and silica nanoparticles on caprine spermatozoa: an in vitro comparative study. *Ann Biol* 2020; 36 (3): 366-71.
- Evans G, Maxwell WMC. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Second Edition. Sydney: Butterworths, 1987; p.2.
- Friend DR. Drug delivery for the treatment of endometriosis and uterine fibroids. *Drug Deliv Transl Res* 2017; 7(6): 829-39.
- Huang Y, Li P, Zhao R, Zhao L, Liu J, Peng S, Fu X, Wang X, Luo R, Wang R. Silica nanoparticles: Biomedical applications and toxicity. *Biomed Pharmacoter* 2022; 151: 113053.
- Niroumand U, Firouzabadi N, Goshtasbi G, Hassani B, Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. The effect of size, morphology and surface properties of mesoporous silica nanoparticles on pharmacokinetic aspects and potential toxicity concerns. *Front Mater* 2023; 10: 1189463.
- Rashidian G, Mohammadi-Aloucheh R, Hosseinzadeh-Otaghvari F, Chupani L, Stejskal V, Samadikhah H, Zamanlui S, Multisanti CR, Faggio C. Long-term exposure to small-sized silica nanoparticles (SiO₂-NPs) induces oxidative stress and impairs reproductive performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2023; 273: 109715.
- Rathod K, Ahmed H, Gomte SS, Chougule S, Prabakaran A, Deth MR, Patel RJ, PVP DB, Alexander A. Exploring the potential of anti-inflammatory activity of berberine chloride-loaded mesoporous silica nanoparticles in carrageenan-induced rat paw edema model. *J Solid State Chem* 2023; 317: 123639.
- Revell S, Mrode R. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 1994; 36(1-2): 77-86.
- Tacconi S, Augello S, Persano F, Sbarigia C, Carata E, Leporatti S, Fidaleo M, Dini L. Amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles (NH₂-MSiNPs) impair the embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2022; 95: 103956.
- Uşul SK, Aslan A, Özçimen D. Azol fonksiyonel gözenekli ve içi boş silika nanokompozitlerin karakterizasyonu ve antifungal uygulamaları. *Eurasian J Bio Chem Sci* 2022; 5(Ek sayı 1): 151-6.
- Xu Y, Wang N, Yu Y, Li Y, Li Y-B, Yu Y-B, Zhou X-Q, Sun Z-W. Exposure to silica nanoparticles causes reversible damage of the spermatogenic process in mice. *PLoS One* 2014; 9(7): e101572.
- Zhao J, Zhang J, Xu Y, Dong J, Dong Q, Zhao G, Shi Y. Nanotechnological approaches for the treatment of placental dysfunction: recent trends and future perspectives. *Nanomed* 2023; 18(26): 1961-78.



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Araştırma Makalesi / Research Article
22(1), 19-27, 2025
DOI: 10.32707/ercivet.1603028

İstanbul İlindeki Bazı Veteriner Kliniklerinde Muayene Edilen Kedilerde Obezite ve Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi*

Erdal ÖZENİR^{1,a}, Erol BAYTOK^{2,b}, Sena YILMAZ ÖZTAŞ^{2,c}

¹Veteriner Hekim, İstanbul-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları ABD, Kayseri-TÜRKİYE
ORCID No: ^a0009-0007-4714-3542; ^b0000-0003-1267-534X; ^c0000-0002-0161-4923

Sorumlu yazar: Erdal ÖZENİR, E-posta: ozenirerdal@gmail.com

Atıf yapmak için: Özenir E, Baytok E, Yılmaz Öztaş S. İstanbul ilindeki bazı veteriner kliniklerinde muayene edilen kedilerde obezite ve risk faktörlerinin değerlendirilmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2025; 22(1):19-27

Öz: Bu çalışmada, İstanbul'daki bazı veteriner kliniklerinde muayene edilen 200 kedi üzerinde obezite prevalansı ve risk faktörleri değerlendirilmiştir. Kediler, vücut kondisyon skorlarına (VKS) göre VKS'si 7 ve üzeri olanlar (%60) ile 7'nin altında olanlar (%40) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. VKS'si 7 ve üzerinde olan kedilerde en yaygın görülen hastalıklar; gastrointestinal rahatsızlıklar (%20.0), davranış problemleri (%20.0) ve üriner sistem hastalıkları (%16.67) olarak belirlenmiştir. VKS'si 7'nin altında olan kedilerde ağız ve diş hastalıkları (%22.5) ile gastrointestinal rahatsızlıklar (%21.25) öne çıkmıştır. Araştırmada Tekir kediler %60, British kediler %15.5, Scottish kediler %8, İran ırkı kediler %6, Ankara kedisi %3, Van kedisi %2.5, Siyam kedileri %2.5, melez ırklar %2.0 ve Sphynx ırkı kediler %0.5 oranında yer almıştır. Yaş dağılımı incelendiğinde, kedilerin %30'unun 1-3 yaş, %45'inin 4-7 yaş, %25'inin ise 8 yaş ve üzeri olduğu gözlenmiştir. Araştırmada yer alan kedilerin %53.5'i erkek; %46.5'i dişidir. Kedilerin yaşındaki her 1 birimlik artışın obezite görülme oranını arttırdığı bulunmuştur ($P<0.05$). İrk, kısırlaştırma ve evde yaşayan kişi sayısı değişkenlerinin ise obezite odds oranı üzerinde anlamlı etkisi bulunmamıştır ($P>0.05$). Bu çalışma, obezitenin kedi sağlığı üzerinde yaygın etkileri olduğunu ve enerji alımı ile fiziksel aktivitenin kontrol edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Beslenme, diyet, kedi, obezite, vücut kondisyon skoru

Evaluation of Obesity and Risk Factors in Cats Examined at Selected Veterinary Clinics in İstanbul

Abstract: This study evaluated the prevalence of obesity and associated risk factors in 200 cats examined at selected veterinary clinics in İstanbul. Cats were divided into two groups based on their body condition score (BCS), those with a BCS of 7 or higher (60%) and those below 7 (40%). Among cats with a BCS ≥ 7 , the most common conditions were gastrointestinal disorders (20.0%), behavioral problems (20.0%), and urinary system diseases (16.67%). Conversely, for cats with a BCS < 7 , dental and oral health issues (22.5%) and gastrointestinal disorders (21.25%) were predominant. In the present study, Tabby cats were 60 %, British cats 15.5%, Scottish cats 8%, Persian cats 6%, Angora cats 3%, Van cats 2.5%, Siamese cats 2.5%, hybrid breeds 2.0% and Sphynx cats 0.5%. Age distribution showed that 30% of the cats were 1-3 years old, 45% were 4-7 years old, and 25% were 8 years old or older. It was found that aging is directly proportional to obesity in cats. ($P<0.05$). Such variables as breed, neutering status, and the number of households were found to have no significant effect on the odds ratio of obesity ($P>0.05$). The study underscores the widespread impacts of obesity on feline health and emphasizes the need for energy intake and physical activity management.

Keywords: Body condition score, cat, diet, nutrition, obesity

Giriş

Kedilerde obezite, veteriner hekimlikte giderek artan bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmakta ve evcil kedilerin hem sağlık hem de konfor düzeyini ciddi şekilde etkilemektedir (Hanford ve Linder, 2021). Obezite, enerji alımının enerji harcamasını aştığı durumlarda ortaya çıkan ve vücutta aşırı yağ dokusu birikimi ile karakterize edilen karmaşık bir metabolik bozukluk olarak tanımlanmaktadır (German, 2006). İdeal vücut ağırlığının %20-30'undan daha fazla kiloya sahip kediler "obez" olarak tanımlanırken, ideal vücut ağırlığının %10-19' undan fazla kiloya sahip

kediler ise "aşırı kilolu" olarak tanımlanmaktadır (Saavedra ve ark., 2024).

Günümüzde beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler, hareketsiz yaşam tarzı ve kısırlaştırma gibi faktörlerin etkisiyle kedilerde obezitenin görülme sıklığı hızla artmaktadır (Demir ve Altaçlı, 2024). Araştırmalara göre, kedilerde obezite prevalansı dünya genelinde %11.5 ile %63.0 arasında değişmekte ve bu oranlar sorunun ciddiyetini gözler önüne sermektedir (Öhlund ve ark., 2018). Bu durum, sağlık komplikasyonlarının ortaya çıkma riskini arttırmakta ve kedilerin yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Hoelmlkjær ve Bjornvad, 2014). Obezite, kedilerde diyabet, insülin direnci, eklem rahatsızlıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve deri hastalıkları gibi çeşitli

Geliş Tarihi/Submission Date : 17.12.2024
Kabul Tarihi/Accepted Date : 05.02.2025

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Erdal ÖZENİR tarafından yapılan Yüksek Lisans Tezi'nden özetlenmiştir.

metabolik ve klinik komplikasyonlara yol açabilmektedir (Chandler ve ark., 2017). Özellikle kısırlaştırma, enerji gereksiniminde azalma ve iştah artışına neden olan hormonal değişikliklerden dolayı obezite riskini arttırmaktadır (Hanford ve Linder, 2021). Kısırlaştırılmış kedilerin daha düşük enerji harcadığı ve daha az aktif olduğu bilinmekte, bu durum kilo alımını kolaylaştıran önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır (Demir ve Altaçlı, 2024). Kedilerde obezitenin oluşumunda beslenme alışkanlıkları ve diyet içeriği de önemli bir rol oynamaktadır. Enerji içeriği yüksek ve dengesiz diyetlerle beslenen kedilerde obezite riskinin arttığı gözlenmiştir (Öhlund ve ark., 2018). Bunun yanı sıra, obezitenin yalnızca fiziksel sağlığı değil, aynı zamanda kedilerin davranışsal ve psikolojik durumlarını da etkilediği belirtilmiştir. Obez kedilerin daha az oyun oynadığı, sosyal etkileşimlerde bulunmadığı ve genel olarak daha az hareketli olduğu rapor edilmiştir (Chandler ve ark., 2017).

Obeziteyi önlemek ve yönetmek hem veteriner hekimler hem de hayvan sahipleri için büyük bir öneme sahiptir. Etkili bir obezite yönetimi, dengeli bir diyet, düzenli fiziksel aktivite ve veteriner hekim kontrollerini içeren multidisipliner bir yaklaşımı gerektirmektedir (German, 2006). Kedi sahiplerinin, kedilerinin ideal vücut kondisyonunu koruma konusunda bilinçlendirilmesi, obezitenin önlenmesi açısından kritik bir role sahiptir (Hoelmkjaer ve Bjornvad, 2014). Bu makalede obezite ve aşırı kilonun ırk, yaş, cinsiyet, kısırlaştırma, fiziksel aktivite, mama çeşidi ve miktarı, diğer hastalıklarla ilişkisi, öğün sayısı, yaşadığı ortam, evdeki kedi sayısı, köpeğin varlığı ve evde yaşayan kişi sayısı ile ilişkileri irdelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Anketin Tasarlanması ve Uygulanması

Çalışma İstanbul ilindeki bazı veteriner kliniklerinde klinik sahiplerinin yardımlarıyla yapılmıştır. Bu amaçla 39 klinikten (Avcılar 3, Bakırköy 12, Beylikdüzü 5, Zeytinburnu 2, Sarıyer 2, Beşiktaş 2, Kadıköy 2, Ataşehir 1, Başakşehir 2, Beyoğlu 3, Küçükçekmece 2, Kartal 1, Ümraniye 1, Bayrampaşa 1) veri toplanmıştır. Anket, veteriner kliniklerinde veteriner hekimler tarafından muayene sırasında hasta sahiplerine sorular yöneltilerek uygulanmıştır. Anket soruları çoktan seçmeli şıklar şeklinde toplam 15 sorudan oluşmuştur. Anket, hayvanın yaşı, ırkı, cinsiyeti, kısırlaştırılma durumu, vücut ağırlığı, VKS, günlük fiziksel aktivite süresi, diyet türü ve miktarı, geçmişte konulan teşhisler, günlük öğün sayısı, yaşam ortamı, aynı ortamı paylaştığı diğer kedi sayısı, ortamda köpek bulunup bulunmadığı ve evde yaşayan kişi sayısı gibi soruları içermektedir. Anket çalışmasında hasta sahibinin isim, soy isim gibi kişisel bilgileri kesinlikle talep edilmemiştir. Çalışmada kullanılan kedilerin %60'ı Tekir, %15.5'i British, %8'i Scottish, %2.5'u Van, %6'sı İran, %3'ü Ankara, %2.5'i Siyam, %0.5'i Sphynx ve %2'si

melez kedilerden oluşmaktaydı. Ankete katılım için 7 aylık bir süre belirlendi.

VKS'nin Belirlenmesi

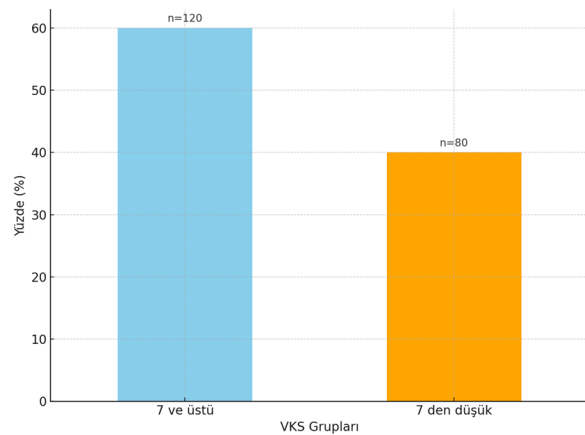
VKS belirlenirken 9 puanlı ölçek kullanılmıştır (Laflamme 1997). Bu ölçeğe göre: kaşektik 1, çok zayıf 2, zayıf 3, düşük kilolu 4, ideal 5, kilolu 6, aşırı kilolu 7, obez 8, aşırı obez olanlara 9 puan verilmektedir.

İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki tüm veriler, SPSS 25.0 paket programı (IBM Corp., SPSS Inc., IL, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan veriler üzerinde öncelikle temel betimleyici istatistikler hesaplanmıştır. Cinsiyet, ırk, kısırlaştırma durumu gibi kategorik değişkenler ile aşırı kilo/obezite (VKS ≥ 7) arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla tek değişkenli lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Her bir değişken bağımsız olarak analiz edilerek aşırı kilo ve obezite üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Anlamli bulunan değişkenler, çok değişkenli lojistik regresyon analizine dahil edilmiştir.

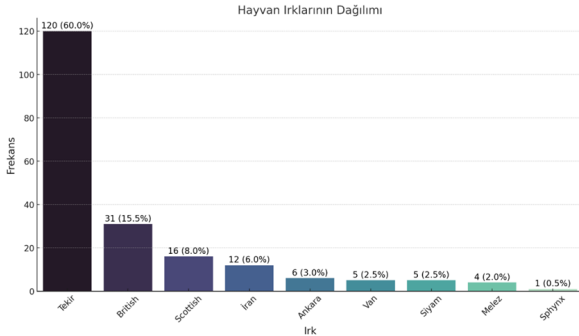
Bulgular

Kedilerin VKS'sine göre yapılan analizde, bireyler iki gruba ayrılmıştır: VKS 7 ve üzeri olanlar "7 ve üstü" grubunu, VKS 7'den düşük olanlar ise "7'den düşük" grubunu oluşturmuştur. Sonuçlara göre, "7 ve üstü" grubunda toplam 120 birey yer almakta olup bu grup, genel popülasyonun %60'ını oluşturmaktadır. Diğer taraftan, "7'den düşük" grubunda toplam 80 birey bulunmakta ve bu grup, popülasyonun %40'ını temsil etmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Çalışmaya dahil edilen kedilerin Vücut Kondisyon Skoru (VKS) dağılımları

Bu çalışmada toplam 200 kedi incelenmiş ve kedilerin ırk, yaş, kısırlaştırma durumu ve cinsiyet dağılımları değerlendirilmiştir. Çalışmada Tekir kediler %60, British kediler %15.5, Scottish kediler %8, İran ırkı kediler %6, Ankara kedisi %3, Van kedisi %2.5, Siyam kedileri %2.5, melez ırklar %2.0 ve Sphynx ırkı kediler %0.5 oranında temsil edilmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Çalışmaya dahil edilen kedilerin ırk dağılımları

Çalışmada 1-3 yaş arasındaki kedilerin %30, 4-7 yaş arasındaki kedilerin %45, 8 yaş ve üzeri kedilerin ise %25 oranında yer aldığı belirlendi. Kedilerin %83.5'inin kısırlaştırıldığı ve %16.5'inin ise kısırlaştırılmadığı saptandı. Erkek kedilerin %53.5 ve dişi kedilerin %46.5 oranında olduğu belirlendi. VKS'si 7'nin altında olan hayvanlarda en sık görülen hastalığın gastrointestinal hastalıklar olduğu (17 vaka, %21.25) gözlemlendi. Üriner sistem hastalıklarının 12 vaka (%15.0), deri hastalıklarının 10 vaka (%12.5), davranış problemlerinin 9 vaka (%11.25), ağız ve diş hastalıklarının 18 vaka (%22.5) olduğu saptandı. Hastalık saptanamayan hayvan sayısı 5 (%6.25), diyabetli hayvan 4 (%5.0), eklem problemleri 5 (%6.25) iken; hipotiroidizm ise hiç görülmemiştir (%0.0).

VKS'si 7 ve üzeri olan hayvanlarda ise en sık görülen hastalık 24 vaka (%20.0) ile gastrointestinal hastalıklardır. Üriner sistem hastalıkları 20 (%16.67), davranış problemleri 24 (%20.0), deri hastalıkları 10 (%8.33), ağız ve diş hastalıkları 15 (%12.5), diyabet 9 (%7.5), eklem problemleri 11 (%9.17), hipotiroidizm 1 (%0.83) vaka olarak görülmüştür. Hastalık bulunmayan hayvan sayısı ise 6 (%5.0) olarak tespit edilmiştir. Tek değişkenli lojistik regresyon analizlerinde kedilerin yaşındaki her 1 birimlik artışın obezite odds oranında 1.19 kat yükselişe sebep olduğu belirlendi ($P<0.05$). Scottish ırkı kedilerin Tekir ırkı kedilere göre obezite odds oranının 0.083 kat daha az olduğu görüldü ($P<0.05$); diğer ırkların Tekir ırkına göre obezite odds oranı farkının anlamlı olmadığı görüldü ($P>0.05$). Kısırlaştırılmamış kedilerin kısırlaştırılmış kedilere göre obezite odds oranının ise 0.296 kat daha az olduğu görüldü ($P<0.05$). Erkek kedilerin obeziteye yakalanma odds oranı dişi kedilere göre 1.663 kat fazla bulundu ($P>0.05$). 1-3 saat arası fiziksel aktivitesi bulunan kedilerin 0-1 saat fiziksel aktivitesi bulunan kedilere göre obeziteye yakalanma odds oranının 0.134 kat daha az olduğu bulunurken; 3-5 saat fiziksel aktivitesi bulunan kedilerde 0-1 saat fiziksel aktivitesi bulunan kedilere göre obeziteye yakalanma odds oranının 0.109 kat daha az olduğu saptandı ($P<0.05$). 5 saatten fazla fiziksel aktivitesi bulunan kedilerin obezite odds oranı farkının 0-1 saat fiziksel aktivitesi bulunan kedilerden anlamlı olmadığı belirlendi ($P>0.05$). Kuru mama ile beslenen kedilere göre diğer diyetlerin uygulandığı kedilere göre obezite odds oranı farkının anlamlı olmadığı bulundu ($P>0.05$). Hastalığı olmayan kedilere göre diğer hastalıklara sahip olan kedilerin obezite odds oranı farkının anlamlı olmadığı tespit edildi ($P>0.05$). Tablo 1'de görülebileceği gibi öğünde 50 gr'dan az mama tüketen kedilere göre, 100-150 gr mama tüketen kedilerin obezite odds oranının 0.208 kat daha az olduğu görüldü ($P<0.05$); diğer öğün miktarlarının anlamlı farklılık göstermediği görüldü ($P>0.05$). Öğün sayısı 2 ve 3 ve daha fazla olan kedilerin öğün sayısı 1 olan kedilere göre obezite odds oranı farkının anlamlı olmadığı anlaşıldı ($P>0.05$). Kapalı ortamda yaşayan kediler ile açık ve karma ortamda yaşayan kediler arasında obezite odds oranları bakımından anlamlı fark bulunmadı ($P>0.05$). Evde bulunan kedi sayısı ve evde yaşayan kişi sayısının kedilerin obeziteye yakalanma riski üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı anlaşıldı ($P>0.05$). Evde köpek bulunmasına göre bulunmaması durumunun obezite odds oranı üzerinde etkili olmadığı görüldü ($P>0.05$). Hastalığı olmayan kedilere göre diğer hastalıklara sahip olan kedilerin obezite odds oranı farkının anlamlı olmadığı saptandı ($P>0.05$) (Tablo 1).

Tablo 1. Tek değişkenli lojistik regresyon analizi

Değişkenler	B Katsayısı	St Hata	Wald İstatistiği	df	P Değeri	OR	95% GA Alt Sınır (OR)	95% GA Üst Sınır (OR)
Yaş	0.1751	0.0646	7.35	1	0.0067	1.19	1.05	1.35
İrk (vs Tekir)			3.09	8	0.079			
British	-.195	0.658	0.087	1	0.767	0.823	0.227	2.991
Scottish	-2.483	1.004	6.123	1	0.013	0.083	0.012	0.597
İran	-1.296	0.932	1.935	1	0.164	0.274	0.044	1.699
Ankara	-0.591	1.086	0.297	1	0.586	0.554	0.066	4.648
Van	-0.736	1.181	0.388	1	0.533	0.479	0.047	4.851
Siyam	-2.201	1.377	2.555	1	0.110	0.111	0.007	1.645
Melez	*	*	*	*	*	*	*	*
Sphynx	*	*	*	*	*	*	*	*
Kısırlaştırma Durumu (vs Kısırlaştırılmış)			5.25	1	0.022			
Kısırlaştırılmamış	-1.216	0.593	4.210	1	0.040	0.296	0.093	0.947
Cinsiyet (vs Dişi)			2.28	1	0.131			
Erkek	0.509	0.440	1.338	1	0.247	1.663	0.703	3.936
Fiziksel Aktivite (vs 0-1 saat)			1.42	3	0.234			
1-3 saat	-2.010	0.621	10.479	1	0.001	0.134	0.040	0.453
3-5 saat	-2.212	0.889	6.187	1	0.013	0.109	0.019	0.626
5 saatten fazla	-1.812	1.152	2.474	1	0.116	0.163	0.017	1.562
Diyet (vs Kuru Mama)			0.057	3	0.812			
Yaş Mama	-0.039	0.966	0.002	1	0.967	0.961	0.145	6.379
Kuru Mama ve Yaş Mama	-0.656	0.526	1.554	1	0.213	0.519	0.185	1.455
Ev Yemekleri	-1.093	0.925	1.395	1	0.238	0.335	0.055	2.056
Hastalık (vs Hastalık Yok)			1.02	8	0.757			
Deri Hastalıkları	-0.095	0.735	0.017	1	0.346	0.909	0.215	3.843
Diyabet	0.511	0.816	0.391	1	0.568	1.667	0.336	8.258
Gastrointestinal Hastalıklar	0.317	0.679	0.217	1	0.859	1.373	0.363	5.195
Üriner Sistem Hastalıkları	0.364	0.714	0.260	1	0.845	1.439	0.355	5.837
Ağız Boşluğu ve Diş Hastalıkları	-0.247	0.704	0.123	1	0.798	0.781	0.197	3.106
Hipotiroidizm	*	*	*	*	*	*	*	*
Eklemler Hastalıkları	0.511	0.816	0.391	1	0.597	1.667	.336	8.258
Davranış Problemleri	0.616	0.726	0.719	1	0.121	1.852	.446	7.691
Öğünde Verilen Miktar (vs 50 gr az)			2.93	3	0.087			
50-100 gr	0.372	0.680	.299	1	0.585	1.450	0.382	5.500
100-150 gr	-1.570	0.591	7.042	1	0.008	0.208	0.065	.663
150 gr'dan fazla	-0.176	0.624	.080	1	0.777	0.838	0.247	2.846
Öğün Sayısı (vs 1)			3.33	2	0.068			
2	1.756	0.940	3.493	1	0.062	5.789	.918	36.502
3 ve daha fazla	1.561	0.923	2.863	1	0.091	4.764	.781	29.061
Yaşadığı ortam (vs Kapalı)			2.08	2	0.149			
Açık	0.000	2.039	.000	1	1.000	1.000	.018	54.387
Karma	0.782	0.610	1.645	1	0.200	2.186	.662	7.219
Evde Bulunan Kedi Sayısı	-0.1336	0.2657	0.25	1	0.6151	0.88	0.65	1.34
Köpek Varlığı (vs Var)			0.48	1	0.489	0.70		
Yok	0.372	0.680	0.299	1	0.585	1.450	0.382	5.500
Evde Yaşayan Kişi Sayısı	-0.3591	0.1887	3.62	1	0.057	0.69	0.48	1.01

Cox & Snell $R^2 = 0.405$. Nagelkerke $R^2 = 0.548$

-2 LL: 165.296 G: 103.909 P < 0.001

Tek değişkenli lojistik regresyon modellerinde $P < 0.25$ anlamlılık seviyesinin altında olan bağımsız değişkenler çok değişkenli lojistik regresyon modeli için aday değişken olarak belirlendi. Buna göre yaş, ırk, kısırlaştırma durumu, cinsiyet, fiziksel aktivite, diyet, hastalık, öğünde verilen miktar, öğün sayısı, yaşadığı ortam ve evde yaşayan kişi sayısı değişkenleri çok değişkenli lojistik regresyon modeline dahil edildi. Çok değişkenli lojistik regresyon modelinde yaş değişkeninin 1 birimlik artışının obezite odds oranını 1.232 kat artırdığı görüldü ($P < 0.05$). 100-150 gr öğünü bulunan kedilerin 50 gr'dan az öğünü bulunan kedilere göre obezite odds oranının 0.135 kat daha az olduğu görüldü ($P < 0.05$); diğer öğün miktarlarının 50 gr'dan az öğünü bulunan kedilere göre obezite odds oranı farkı anlamlı bulunmadı ($P > 0.05$). İrk, kısırlaştırma ve evde yaşayan kişi sayısı değişkenlerinin ise obezite odds oranı üzerinde anlamlı etkisi bulunmadı ($P > 0.05$) (Tablo 2).

yöntemle değerlendirilmiş; yöntemlerden birinde oran %30.5, diğerinde ise %32.5 olarak belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise kedilerin %42'sinin, köpeklerin ise %30'unun aşırı kilolu ve obez oldukları belirlenmiştir (Demir ve Altaçlı, 2024). Bu çalışmada elde edilen aşırı kiloluluk ve obezite oranının önceki çalışmalardan farklılık göstermesi birkaç faktöre bağlı olabilir. Öncelikle, farklı VKS ölçeklerinin kullanımı önemli bir etkidir. Bazı çalışmalarda 5 puanlı ölçek kullanılırken (Allan ve ark., 2000; Lund ve ark., 2005; McGreevy ve ark., 2008; Colliard ve ark., 2009; Courcier ve ark., 2010; 2012); bazılarında ise 9 puanlı ölçek (Cave ve ark., 2012; Corbee, 2014) tercih edilmiştir. Ölçekler arasındaki farklılıklar, aşırı kiloluluk veya obezite sınır değerlerinin eşik olarak kullanılmasıdaki değişiklikler oranlardaki çeşitliliği açıklamaktadır. Ayrıca, değerlendiricilerin sayısının birden fazla olması veya bireysel değerlendirme farklılıkları da bu oranlarda sapmalara neden olabilmek-

Tablo 2. Çok değişkenli lojistik regresyon analizi

Değişkenler	B Kat-sayısı	St Hata	Wald İstatistiği	df	P Değeri	OR	95% GA Alt sınır (OR)	95% GA Üst sınır (OR)
Yaş	0.209	0.069	9.21	1	0.002	1.232	1.07	1.41
İrk (vs Tekir)			12.052	8	0.149			
British	0.854	0.528	2.614	1	0.106	2.349	0.834	6.615
Scottish	-1.159	0.741	2.444	1	0.118	0.314	0.073	1.342
İran	-0.750	0.728	1.059	1	0.303	0.473	0.113	1.970
Ankara	-1.444	0.977	2.185	1	0.139	0.236	0.035	1.601
Van	-0.608	0.982	0.383	1	0.536	0.545	0.079	3.730
Siyam	-1.730	1.083	2.553	1	0.110	0.177	0.021	1.480
Kısırlaştırma Durumu (vs Kısırlaştırılmamış)								
Kısırlaştırılmamış	-0.991	0.530	3.498	1	0.061	0.371	0.131	1.049
Öğünde Verilen Miktar (vs 50 gr az)			22.355	3	0.000			
50-100 gr	*	*	*	1	*	*	*	*
100-150 gr	-2.004	0.720	7.752	1	0.005	0.135	0.033	.552
150 gr'dan fazla	-0.104	0.725	0.021	1	0.886	0.901	0.218	3.731
Evde Yaşayan Kişi Sayısı	-0.272	0.167	2.657	1	0.103	0.762	0.549	1.057

Cox & Snell $R^2 = 0.327$. Nagelkerke $R^2 = 0.442$
-2 LL: 190. 013

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada yüksek VKS değerlerine sahip kedilerin oranının dikkat çekici düzeyde olduğu görülmekte (Şekil 1) ve kilo yönetimi ile diyet programlarının önemine işaret edilmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalara bakıldığında, kedilerde obezite insidansının geniş bir aralıkta değiştiği görülmektedir. Bazı araştırmacılar bu oranı %11-52 olarak bildirirken (Lund ve ark., 2005; Hill, 2009; Courcier ve ark., 2010, 2012; Cave ve ark., 2012; Corbee, 2014) bazıları (Teng ve ark., 2018; Öhlund ve ark., 2018; Gates ve ark., 2019; Wall ve ark., 2019) ise %11.5-63 olarak bildirmiştir. Wall ve ark. (2019)'nın 81 ülkede gerçekleştirdiği bir ankette, kedilerin obezite oranları iki farklı

tedir (Colliard ve ark., 2009; Cave ve ark., 2012). Bu bulgular, kedilerde kilo yönetimi için standardize edilmiş değerlendirme yöntemlerinin ve tutarlı tanımlamaların önemini vurgulamaktadır. Kedi sahiplerine ve veteriner hekimlere, kilo kontrolü ve beslenme planlaması konusunda rehberlik edecek daha net protokollerin oluşturulması, obezite oranlarının daha doğru bir şekilde saptanması ve kontrol altına alınmasında etkili olacaktır.

Şekil 2'de çalışmada yer alan kedilerin ırk dağılımları verilmiştir. Kocabağlı ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, kedilerde ırkın aşırı kilo veya obezite üzerindeki etkisinin anlamlı olmadığı rapor edil-

miştir. Benzer şekilde, Colliard ve ark. (2009), Courcier ve ark. (2010, 2012), Rowe ve ark. (2015) gibi araştırmacılar da ırkın aşırı kilo ve obezite gelişiminde önemli bir risk faktörü olmadığını öne sürmüştür. Ancak, Robertson (1999), Lund ve ark. (2005), McGreevy ve ark. (2008), Teng ve ark. (2018) tarafından yapılan diğer bazı çalışmalarda belirli ırkların obezite gelişiminde etkili faktörler olduğu kabul edilmiştir. Örneğin, Chiang ve ark. (2022) tarafından yapılan bir araştırmada, melez kedilerde aşırı kilo veya obezite oranının (%42.5) safkan kedilere (%30.1) göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Gates ve ark. (2019) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, British ırkı kedilerin %40.3 oranıyla en yüksek aşırı kilolu veya obez oranına sahip olduğu, Persian ve Birman ırklarının ise sırasıyla %10.6 ve %6.2 ile en düşük oranlara sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Chiang ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, British ve Norveç Orman kedisi gibi bazı ırkların aşırı kiloluluk veya obezite ile anlamlı bir şekilde ilişkilendirildiği belirtilmiştir. Çalışmanın sonunda ırk faktörünün obezite üzerinde anlamlı etkisinin bulunmaması, kedilerde obeziteye yol açan faktörlerin yalnızca ırk ile sınırlı olmadığını; beslenme alışkanlıkları, fiziksel aktivite düzeyi ve çevresel faktörlerin de önemli rol oynadığını göstermektedir. Dolayısıyla, ırkın obezite üzerindeki etkisi, daha geniş bir bağlamda ele alınmalı ve kedilerde kilo yönetimi için multidisipliner bir yaklaşım benimsenmelidir. Bu bulgular, özellikle obeziteye yatkın olan ırkların göz önünde bulundurulmasının yanı sıra, kedilerin genel sağlık durumunu iyileştirmeye yönelik çevresel ve davranışsal faktörlerin önemini de vurgulamaktadır.

Chiang ve ark. (2022), genç kedilerde aşırı kilolu veya obez olma oranının %24.2 olduğunu, yaşlı kedilerde ise bu oranın %48.9'a çıktığını saptamıştır. Benzer şekilde, Cave ve ark. (2012) tarafından 2 yaş altı kedilere kıyasla, 3-7 yaş arası kedilerde obezite riskinin 2.3 kat, 8-12 yaş arası kedilerde 5.5 kat, 13 yaş üzerindeki kedilerde ise 13.8 kat arttığı belirtilmiştir. Yaşın obezite için önemli bir risk faktörü olduğu bulgusu, Sloth (1992), Kronfeld ve ark. (1994), Russell ve ark. (2000) ve Colliard ve ark. (2009) gibi birçok araştırmacı tarafından desteklenmiştir. Özellikle orta yaş ve üzerindeki kedilerde obezitenin daha yaygın olduğu gözlenmiştir. Kocabağlı ve ark. (2019), fazla kilolu veya obez kedilerin prevalansının 1 yaş grubunda %4.5, 3 yaş grubunda %27.5 ve 4 yaş grubunda %22.7 olduğunu tespit etmişlerdir. Gates ve ark. (2019) da benzer şekilde, aşırı kilolu veya obez kedilerin en yaygın olarak 5-11 yaş grubunda bulunduğunu belirtmiştir. Orta yaşlı ve yetişkin kedilerde obezite riskinin yüksek olduğu ve bu oranın erişkin kedilerde %35-40, 7 yaşından büyük kedilerde ise %50'den fazla olduğu görülmüştür (Demir ve Altaçlı, 2024). Çalışmanın sonuçlarında da görüldüğü gibi kedilerde obeziteye yol açan önemli faktörlerden birinin yaş olduğu ve yaşla birlikte metabolik değişiklikler ve fi-

ziksel aktivitedeki düşüşün, obezite riskini arttırabileceği düşünülmektedir. Yaşın bu etkisi, daha genç yaşlardaki kedilerde gözlemlenmeyen ancak ileri yaşlardaki kedilerde belirgin hale gelen obezite eğilimlerinin nedenlerini anlamada önemli bir yol göstericidir.

Çoğu çalışma (Hoenig ve Ferguson, 2002; Nguyen ve ark., 2004; Lund ve ark., 2006; McGreevy ve ark., 2008; Colliard ve ark., 2009; Courcier ve ark., 2010; Cave ve ark., 2012; Naughton ve ark., 2021), kısırlaştırmanın kedilerde aşırı kilo veya obezite olasılığını arttırdığını bildirir de, araştırma sonunda kısırlaştırma ile obezite riski arasında anlamlı bir sonuca ulaşılmaması, diğer bazı araştırmalarla (Kienzle ve Bergler, 2006; Rowe ark., 2015; Kocabağlı ve ark., 2019) benzerlik göstermektedir. Bu, obeziteyi belirleyen diğer faktörlerin (diyet, fiziksel aktivite düzeyi, çevresel koşullar) etkisinin daha belirgin olabileceğiyle açıklanabilir. Ayrıca, çalışmanın metodolojik farklılıkları ve kısırlaştırma sonrası kilo değişikliklerini izlemek için kullanılan süre, kısırlaştırma sonrası steril mama kullanımı gibi değişkenler, bu ilişkiyi anlamada zorluk oluşturabilir.

Hanford ve Linder (2021), ev ortamında yaşayan kedilerin fiziksel aktivite seviyelerinin sınırlı olduğunu ve bunun obezite oranlarını arttırdığını bildirmiştir. Lund ve ark. (2006) ise hareketsiz yaşam tarzı ve yüksek kalorili diyetlerin, kedilerde obezite eğilimini destekleyen temel faktörler olduğunu vurgulamaktadır. Fiziksel aktivite, kedilerin kilo kontrolü ve genel sağlık durumlarının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Öhlund ve ark. (2018) kapalı ortamda yaşayan kedilerin, dışarıda serbestçe hareket edebilen kedilere göre daha düşük fiziksel aktivite seviyelerine sahip olduğunu ve bunun obezite riskini arttırdığını belirtmiştir. Yapılan çalışmalarda (Courcier ve ark., 2012; Teng ve ark., 2018) hareketsizlik kedilerde aşırı kilolu veya obez olma riskini artıran önemli bir faktör olduğu görüşü savunulsa da, bu çalışmada kedilerde fiziksel aktivite ve obeziteye yakalanma riski arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Bazı çalışmalar (Rowe ve ark., 2015; 2017; Öhlund ve ark., 2018) kuru mama ile beslenen kedilerin aşırı kiloluluk veya obezite riski açısından daha yüksek bir risk taşıdığını ortaya koymuştur. Kocabağlı ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada, kedilerin %78.8'inin kuru mama ile beslendiği ve kuru mama kullanımının aşırı kiloluluk veya obezite riski üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Sunulan çalışmanın bulguları diyet türünün obezite üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını savunan bu çalışmalarla paralellik göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda beslenme sıklığının obezite riskini artırıcı bir etken olduğu belirtilmiştir (Russell ve ark., 2000; Harper ve ark., 2001). Bu çalışmada ise beslenme sıklığının obezite riskini arttıran önemli bir faktör olmadığı bulgusu, Robertson (1999), Allan ve ark. (2000), Colliard ve ark. (2009)'nın sonuçları ile uyumludur. Sunulan

çalışmada kedilerin yaşadığı ortamın obezite üzerinde etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuç Courcier ve ark. (2010), Öhlund ve ark. (2018) ve Naughton ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Yapılan çalışmada, evde başka kedilerin varlığının obezite eğilimi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı görülmektedir. Ancak, sosyal dinamiklerin kedilerin fiziksel aktivite seviyelerini etkileyebileceği de unutulmamalıdır. Teng ve ark. (2018), çok hayvanlı evlerde kedilerin daha fazla sosyal etkileşime girdiklerini ve oyun aktivitelerinin arttığını, bunun da enerji harcamasını artırarak obezite riskini azaltabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, Scarlett ve Donoghue (1998) de, çok hayvanlı evlerde kedilerin aktivite seviyelerinin yükseldiğini ve bunun obezite riskini azalttığını ifade etmiştir. Öte yandan, evdeki diğer hayvanların varlığı her zaman aktivite seviyelerini arttırmamaktadır. Diğer hayvanların baskın davranışları bazı kedilerde stres yaratabilir ve bu stres, yeme bozuklukları ve kilo alımı ile sonuçlanabilir. Kershaw ve Flier (2004), stresin obezite üzerindeki etkisini artıran kortizol seviyeleri ve değişen iştah mekanizmaları ile açıklamışlardır. Yapılan bu çalışmada ulaşılan, köpek varlığının obezite için önemli bir risk faktörü olmadığı sonucu, Kershaw ve Flier (2004) tarafından yapılan bir çalışmayla da uyumludur. Evdeki insan ve hayvan sayısının artması, kedilerin beslenme düzeninin tutarlı bir şekilde kontrol edilmesini zorlaştırabilir. Wall ve ark. (2019)'nın çalışmasında, birden fazla kişinin kediye beslemesi veya porsiyon kontrolündeki eksikliklerin obeziteye katkıda bulunabileceği belirtilmiştir. Ancak sunulan çalışmada evde yaşayan kişi sayısının kedilerde obezite üzerine anlamlı bir risk faktörü olmadığı gözlenmesi, belirli çevresel veya davranışsal faktörlerin bu etkiyi dengeleyebileceğini düşündürmektedir. Örneğin, evde yaşayan kişi sayısındaki artış, kedilere daha fazla dikkat ve ilgi gösterilmesine veya onların fiziksel aktivitelerinin artmasına neden olabilir; bu da enerji harcamalarını artırabilir. Ayrıca, verilen mama miktarlarının kontrollü bir şekilde tespit edilmesi, fazla kilo alımını önleyebilir ve bu tür denetim mekanizmaları obezite riskini azaltmada etkili olabilir. Bu bulgular, kedilerde obezite ile ilişkili risk faktörlerinin yalnızca biyolojik değil, aynı zamanda çevresel ve sosyal faktörlerle de bağlantılı olduğunu vurgulamaktadır. Ancak daha kapsamlı çalışmalarla bu ilişkinin doğrulanması gerekmektedir. Çeşitli çalışmalar, porsiyon kontrolünün kedilerde enerji alımını dengelemek ve obeziteyi önlemek için önemli bir strateji olduğunu vurgulamaktadır. German (2006) yüksek kalorili diyetlerle beslenen kedilerde porsiyon kontrolünün, enerji alımını dengeleme açısından kritik olduğunu belirtmiştir. Scarlett ve Donoghue (1998), aşırı miktarda mama verilmesinin kedilerde obezite riskini arttırabileceğini ifade etmiştir. Lund ve ark. (2005) ise porsiyon kontrolü sağlanamayan durumlarda, enerji alımının enerji harcamasını aşarak kilo alımına yol açabileceğini bildirmiştir. Öhlund ve ark.

(2016) da porsiyonların belirlenmesi ve günlük enerji ihtiyacına uygun şekilde düzenlenmesinin önemine dikkat çekmiştir. Sunulan çalışmanın bulguları literatürle paralel olarak, porsiyon kontrolünün kedilerin kilo yönetiminde önemli bir rol oynadığını ve uygun porsiyon miktarlarının belirlenmesinin obezite riskini azaltmada etkili bir strateji olduğunu ortaya koymaktadır. Kedilerin beslenme düzenlerinin, aşırı kilo alımını önlemek ve uzun vadeli sağlık sonuçlarını iyileştirmek için dikkatlice planlanması gerektiği bu çalışmada da gözlenmiştir.

Bu bulgular, kedilerin bireysel ihtiyaçlarına göre şekillendirilecek beslenme ve yaşam tarzı yönetimi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanıyabilir. Özellikle yaşa, fiziksel aktivite seviyesine, cinsiyete ve kısırlaştırma durumuna göre özelleştirilmiş yaklaşımlar, kedilerin obezite riskini minimize etmede etkili bir yol sunabilir. Bu durum, veteriner hekimlere, hasta sahiplerine ve araştırmacılara kedi sağlığının korunması konusunda katkıda bulunabilir.

Kaynaklar

- Allan FJ, Pfeiffer DU, Jones BR, Esslemont DHB, Wiseman MS. A cross-sectional study of risk factors for obesity in cats in New Zealand. *Prev Vet Med* 2000; 46(3): 183-96.
- Cave NJ, Allan FJ, Schokkenbroek SL, Metekohy CAM, Pfeiffer DU. A cross-sectional study to compare changes in the prevalence and risk factors for feline obesity between 1993 and 2007 in New Zealand. *Prev Vet Med* 2012; 107(1-2): 121-33.
- Chandler M, Cunningham S, Lund E M, Khanna C, Naramore R, Patel A, Day MJ. Obesity and associated comorbidities in people and companion animals: a one health perspective. *J Comp Pathol* 2017; 156(4): 296-309.
- Chiang CF, Villaverde C, Chang WC, Fascetti AJ, Larsen JA. Prevalence, risk factors, and disease associations of overweight and obesity in dogs that visited the veterinary medical teaching hospital at the University of California, Davis from January 2006 to December 2015. *Top Companion Anim Med* 2022; 48: 100640.
- Colliard L, Ancel J, Benet JJ, Paragon BM, Blanchard G. Risk factors for obesity in dogs in France. *J Nutr* 2009; 136(7): 1951-4.
- Corbee RJ. Obesity in show cats. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2014; 98(6): 1071-7.
- Courcier EA, O'Higgins R, Mellor DJ, Yam PS. Prevalence and risk factors for feline obesity in a first opinion practice in Glasgow, Scotland. *J Surg Med* 2010; 12(10): 746-53.

- Courcier EA, Thomson RM, Mellor DJ, Yam PS. Epidemiological factors associated with obesity in dogs in Great Britain: A cross-sectional study. *Vet Rec* 2012; 171(16): 419.
- Demir İE, Altaçlı S. Evaluation of obesity in cats and dogs together with the profiles of pet owners. *Van Vet J*, 2024; 35(1): 38-46.
- Gates MC, Zito S, Walker JK. The influence of demographic and lifestyle factors on body condition in pet cats in New Zealand. *Prev Vet Med* 2019; 166(3): 17-24.
- German AJ. The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr* 2006; 136(7): 1940-6.
- Hanford R, Linder DE. Impact of obesity on quality of life and owner's perception of weight loss programs in cats. *Vet Sci* 2021; 8(2): 32.
- Harper EJ, Stack DM, Watson TDG, Moxham G. Effects of feeding regimens on bodyweight, composition and condition score in cats following ovari-hysterectomy. *J Small Anim Pract* 2001; 42(9): 433-8.
- Hill RC. Evaluating body condition in cats. *J Feline Med Surg* 2009; 11(1): 66-72.
- Hoelmkjaer KM, Bjornvad CR. Management of obesity in cats. *Vet Med* 2014; 5: 97-107.
- Hoenig M, Ferguson DC. Effects of neutering on hormonal concentrations and energy requirements in male and female cats. *Am J Vet Res* 2002; 63(5): 634-9.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6): 2548-56.
- Kienzle E, Bergler R. Human-animal relationship of owners of normal and overweight cats. *J Nutr* 2006; 136(7): 1947-50.
- Kocabağlı N, Değer Y, Uğurlu F. Kedilerde aşırı kiloluluk ve obezite prevalansının incelenmesi. *J Vet Res* 2019; 23(3): 125-33.
- Kronfeld DS, Banta CA, Wolfsheimer KJ. Nutrition of the aging cat and dog. *Veterinary Clinics of North America. J Small Anim Pract* 1994; 24(6): 1111-26.
- Laflamme D. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Pract* 1997; 22(1): 10-5.
- Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Klausner JS. Prevalence and risk factors for obesity in adult cats from private US veterinary practices. *Intern J Appl Res Vet Med*, 2005; 3(2): 88-96.
- McGreevy PD, Thomson PC, Pride C, Fawcett A, Grassi T, Jones B. Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. *Vet Rec* 2008; 163(7): 367-70.
- Naughton G, Morgan SK, Weese JS. Prevalence of obesity in domestic cats in Northern Ireland. *J Small Anim Pract* 2021; 62(4): 275-80.
- Nguyen PG, Dumon HJ, Siliart BS, Martin LJ, Sergheraert R, Biourge VC. Effects of dietary fat and energy on body weight and composition after gonadectomy in cats. *Am J Vet Res* 2004; 65(12): 1708-13.
- Öhlund M, Palmgren M, Holst BS. Overweight in adult cats: a cross-sectional study. *Acta Vet Scand* 2018; 60(1): 5.
- Robertson ID. The influence of diet and other factors on owner-perceived obesity in privately owned cats from metropolitan Perth, Western Australia. *Prev Vet Med* 1999; 40(2): 75-85.
- Rowe E, Browne W, Casey R, Gruffydd-Jones, T, Murray J. Risk factors identified for owner-reported feline obesity at around one year of age: Dry diet and indoor lifestyle. *Prev Vet Med* 2015; 121(3-4): 273-81.
- Rowe EC, Browne WJ, Casey RA, Gruffydd Jones TJ, Murray JK. Early-life risk factors identified for owner-reported feline overweight and obesity at around two years of age. *Prev Vet Med* 2017; 143: 39-48.
- Russell K, Sabin R, Holt S, Bradley R, Harper EJ. Influence of feeding regimen on body condition in the cat. *J Small Anim Pract* 2000; 41(1): 12-8.
- Saavedra C, Pérez C, Oyarzún C, Torres-Arévalo Á. Overweight and obesity in domestic cats: epidemiological risk factors and associated pathologies. *J Feline Med Surg* 2024; 26(11): 1098612X241285519.
- Scarlett JM, Donoghue S. Associations between body condition and disease in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212(11): 1725-31.
- Sloth C. Practical management of obesity in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 1992; 33(4): 178-82.
- Teng KT, McGreevy PD, Toribio JALML, Raubenheimer D, Kendall K, Dhand NK. Associations of body condition score with health conditions related to overweight and obesity in cats. *J Small Anim Pract* 2018; 59(10): 603-15.

Wall M, Cave NJ, Vallee E. Owner and cat-related risk factors for feline overweight or obesity. *Front Vet Sci* 2019; 6: 266.



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Araştırma Makalesi / Research Article
22(1), 28-35, 2025
DOI: 10.32707/ercivet.1595487

Nevşehir Yöresindeki Sahipli Kedi ve Köpeklerde *Giardia duodenalis*'in Moleküler Prevalansı ve Genetik Karakterizasyonu*

Beyzanur SATAŞMAZ^{1,a}, Gupse Kübra KARADEMİR^{1,2,b}, Arif ÇİLOĞLU^{2,c}

¹Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Parazitolojisi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

² Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

ORCID No: ^a0009-0008-3898-5585; ^b0000-0002-3594-1770; ^c0000-0003-2695-7102

Sorumlu yazar: Arif ÇİLOĞLU; E-posta: arifciloglu@erciyes.edu.tr; arifciloglu@gmail.com

Atıf yapmak için: Sataşmaz B, Karademir GK, Çiloğlu A. Nevşehir yöresindeki sahipli kedi ve köpeklerde *Giardia duodenalis*'in moleküler prevalansı ve genetik karakterizasyonu. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2025; 22(1):28-35

Öz: Bu çalışmada, Nevşehir yöresinde çeşitli şikayetler ile özel veteriner kliniklerine getirilen sahipli kedi ve köpeklerde, *Giardia duodenalis*'in moleküler prevalansının araştırılması, genetik karakterizasyonlarının sağlanması, filogenetik yapılarının belirlenmesi ve moleküler epidemiyolojik veriler kapsamında kedi ve köpeklerin halk sağlığı yönünden risk faktörlerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla 2023 yılında Nevşehir yöresinde farklı yaş ve cinsiyetteki sahipli 100 kedi ve 100 köpekten toplam 200 adet dışkı örneği toplanmıştır. Toplanan dışkı örneklerinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen izolatlar, β -giardin gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerlerle nested PCR analizine tabi tutulmuştur. Nested PCR analizleri sonucu ikisi kedi ve biri köpek olmak üzere toplam üç (%1.5) örnek *G. duodenalis* DNA'sı yönünden pozitif belirlenmiştir. Pozitif belirlenen ampiklonlar, sekans analizlerine tabi tutularak hedef gen bölgesine ait nükleotid dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen izolatların veri tabanlarına kaydedilmiş diğer *G. duodenalis* izolatları ile çoklu hizalamaları yapılarak filogenetik analizleri gerçekleştirilmiş ve GenBank veri tabanı kayıtları yapılmıştır (PQ514072-4). Yapılan çoklu hizalama ve filogenetik analizler sonucunda sahipli kedilerden elde edilen izolatların zoonotik Assemblage B ile Assemblage C ve sahipli köpekten elde edilen izolatın Assemblage D'de yer aldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile Nevşehir yöresinde sahipli kedi ve köpeklerde *G. duodenalis*'in ilk kez moleküler karakterizasyonu yapılmış ve sahipli kedi ve köpeklerin halk sağlığı yönünden oluşturabileceği risk potansiyelleri ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: *Giardia duodenalis*, Nevşehir, PCR, β -giardin

Molecular Prevalence and Genetic Characterization of *Giardia duodenalis* in Owned Cats and Dogs from Nevşehir Province

Abstract: This study aimed to investigate the molecular prevalence of *Giardia duodenalis* in owned cats and dogs presented with various clinical complaints at private veterinary clinics in the Nevşehir region. It was also aimed to determine the genetic characterization and phylogenetic relationships of *G. duodenalis* isolates. Furthermore, it evaluated the potential public health risks posed by cats and dogs within the context of molecular epidemiological data. In 2023, a total of 200 fecal samples were collected from 100 owned cats and 100 owned dogs of various ages and sexes in the Nevşehir region. Genomic DNA was subsequently isolated from the fecal samples and then subjected to nested PCR using specific primers targeting the β -giardin gene region of *G. duodenalis*. Nested PCR analysis identified *G. duodenalis* DNA in three samples (1.5%): two from cats and one from a dog. Positive amplicons were sequenced. The sequence analysis revealed three distinct genotypes among the isolates. These genotypes were submitted to the GenBank database with accession numbers PQ514072-4. Phylogenetic analyses were performed by aligning sequences from other *G. duodenalis* isolates available in the databases. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree construction indicated that the isolates obtained from cats belonged to zoonotic Assemblage B and Assemblage C, whereas the isolate from the dog was classified as Assemblage D. In conclusion, this study represents the first molecular characterization and phylogenetic analysis of *G. duodenalis* in owned cats and dogs in the Nevşehir region and highlights the potential public health risks posed by owned cats and dogs.

Keywords: *Giardia duodenalis*, Nevşehir, PCR, β -giardin

Giriş

Giardiasis dünya çapında geniş bir yayılım gösteren, insan ve hayvanlarda özellikle gastrointestinal sis-

temde ciddi sorunlara yol açabilen protozoal bir enfeksiyondur (Dixon, 2021). *Giardia duodenalis* (syn. *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*), kırktan fazla memeli hayvan türünde görülen ve yıllık ortalama 280 milyon insanda semptomatik enfeksiyona neden olan bir parazit türüdür (Upcroft ve Upcroft, 1998; Lane ve Lloyd, 2002; Monis ve ark., 2009). Bu protozoon türü, dünyanın hemen her yerinde yayılım göstermesi ve

Geliş Tarihi/Submission Date : 03.12.2024

Kabul Tarihi/Accepted Date : 06.03.2025

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen TYL-2024-13516 kodlu Yüksek Lisans tez projesinden özetlenmiştir.

özellikle de gelişmekte olan ülkelerde en sık rastlanan bağırsak paraziti olarak bildirilmesi nedeniyle, giardiasis neden olan diğer protozoon türleri içerisinde oldukça önemli bir yere sahiptir (Feng ve Xiao, 2011). Özellikle kalabalık yaşam ortamları ve kontamine çevresel koşullar altında hayvanlardan insanlara veya insanlardan hayvanlara doğrudan veya dolaylı temasla bulaşabilen *G. duodenalis*, tek sağlık kavramı çerçevesinde veteriner hekimlik ve halk sağlığı alanında ortak öneme sahip bir patojen olarak kabul edilmektedir (Dixon, 2021). Bu bağlamda, *G. duodenalis*'in etkeni olduğu giardiasisin yayılım dinamiklerinin ve bulaşma kaynaklarının anlaşılması, bu zoonoz hastalığa karşı kontrol ve mücadele stratejilerinin geliştirilmesi açısından kritik önem arz etmektedir (Cai ve ark., 2021).

Giardia duodenalis'in teşhisi, geleneksel olarak mikroskopi veya immünolojik testler ile yapılmakla birlikte bu yöntemler, parazitin düşük yoğunlukta bulunduğu durumlarda özellikle de kronik enfeksiyonlarda sınırlı hassasiyet sergileyebilmektedir (Koehler ve ark., 2014; Soares ve Tasca, 2016; Adeyemo ve ark., 2018). Bu kapsamda teşhisin doğru ve net bir şekilde yapılamaması nedeniyle özellikle hastalık etkenini herhangi bir klinik belirti göstermeden taşıyan rezervuar konaklar, etkenin yayılım ve bulaşmasında rol oynamakta, böylece hem insan hem de hayvan sağlığını tehdit etmektedirler (Sommer ve ark., 2018; Cai ve ark., 2021). Son yıllarda moleküler tabanlı tekniklerin yaygınlaşmasıyla birlikte *G. duodenalis*, daha kesin ve hassas bir şekilde teşhis edilmeye başlanmıştır (Feng ve Xiao, 2011). Bu yöntemler içerisinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin *G. duodenalis*'in direkt identifikasyonu noktasında moleküler karakterizasyon analizlerinin gerçekleştirilmesine temel oluşturduğu ve parazitin genetik yapısının detaylı bir şekilde incelenmesine olanak tanıyarak hastalığa karşı etkin kontrol ve mücadele stratejilerinin geliştirilmesinde önemli katkılar sağladığı bildirilmektedir (Wielinga ve Thompson, 2007; Feng ve Xiao, 2011).

Kedi ve köpekler gibi evcil hayvanlarda *G. duodenalis* enfeksiyonlarının tespiti, mevcut zoonotik risk nedeniyle büyük önem taşımaktadır (Cai ve ark., 2021). Özellikle yavru kedi ve köpekler, giardiasis olgularında sık rastlanılan ishal gibi klinik semptomlar göstermese bile rezervuar konaklar olarak parazitin kist formlarını çevrelerine yayabilmekte ve etkenin farklı konaklara bulaşmasında rol oynayabilmektedirler (Traub ve ark., 2004; Dado ve ark., 2012). Yetişkin kedi ve köpeklerde enfeksiyon yayma riski, gençlere kıyasla daha düşük olabilmekle birlikte yine bu hayvanlar da rezervuar konak olarak parazitin bulaşma ve yayılmasında görev alabilmektedir (Kurnosova ve ark., 2024). Bu nedenle, insanlarla yakın temasta olan ve hatta evde beslenen hayvanlara başta *G. duodenalis* olmak üzere zoonotik patojenlerin tespiti için güvenilirliği yüksek yöntemlerle yapılan tarama

testlerinin düzenli olarak uygulanması büyük önem arz etmektedir (Barutzki ve Schaper, 2011).

Son yıllarda çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarla kedi ve köpeklerde *G. duodenalis*'in moleküler epidemiyolojisi üzerine kapsamlı veriler elde edilmiştir (Feng ve Xiao, 2011; Cai ve ark., 2021). Türkiye'de ise günümüze kadar bu hayvanlarda *G. duodenalis* ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunlukla konvansiyonel mikroskobik teşhis yöntemleri temelinde gerçekleştirildiği, etkenin moleküler düzeyde identifikasyonu ve filogenetik karakterizasyonlarının belirlenmesini içeren çalışmaların ise oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Ancak *G. duodenalis*'in bulaşma dinamiklerinin ortaya konması, epidemiyolojik faktörlerin analizi, çeşitli coğrafik bölgeler arasındaki ilişkilerin araştırılması ve etkin kontrol stratejilerinin geliştirilebilmesi için enfeksiyona yol açan genotip/alttiplerin moleküler olarak ortaya konulması ve filogenetik yapılanmalarının belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Sprong ve ark., 2009; Hao ve ark., 2024). Nitekim, Türkiye'de kedi ve köpeklerde *G. duodenalis* genotiplendirmesi üzerine yapılan sınırlı sayıda çalışmada zoonotik karakterli genotiplerin yaygın olarak bulunduğu rapor edilmiş ve bu kapsamda kontrol stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır (Gultekin ve ark., 2017; Sursal ve ark., 2020; Aslan Çelik ve ark., 2023a).

Bu çalışmada, Nevşehir yöresinde çeşitli şikayetler ile özel veteriner kliniklerine getirilen sahipli kedi ve köpeklerde, *G. duodenalis*'in varlığının ve moleküler prevalansının araştırılması, genetik karakterizasyonlarının sağlanması, filogenetik yapılanmalarının belirlenmesi ve elde edilecek moleküler epidemiyolojik veriler kapsamında halk sağlığı yönünden risk potansiyellerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma sahası ve örneklerin toplanması

Çalışmanın materyalini, 2023 yılında Nevşehir yöresinde çeşitli şikayetlerle (iştahsızlık, kusma, ateş, iştah kaybı, letarji, sarılık, kabızlık, ishal vb.) veteriner kliniklerine getirilen farklı yaş ve cinsiyetteki sahipli 100 kedi ve 100 köpekten tekniğine uygun olarak toplanan 200 adet dışkı örneği oluşturmuştur. Toplanan dışkı örnekleri öncelikle steril dışkı kaplarına aktarılmış ve daha sonra hayvanlara ait yaş ve cinsiyet bilgileriyle birlikte kayıt altına alınmıştır. Örnekler, ilk aşamada -20 °C'de muhafaza edilmiş ve sonrasında soğuk zincirde Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na intikal ettirilmiştir. Örnek alınan hayvanların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. İncelenen kedi ve köpek dışkı örnekleri ve *Giardia duodenalis* pozitifliğinin cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı

	İncelenen Örnek Sayısı		Pozitif örnek sayısı		Toplam
	Köpek	Kedi	Köpek	Kedi	
Cinsiyet					
Dişi	52	43	1	-	1
Erkek	48	57	-	2	2
Yaş grubu (yıl)					
<1	37	23	-	-	-
1-3	30	35	1	1	2
>3	33	42	-	1	1
Toplam	100	100	1	2	3

Genomik DNA İzolasyonu

Dışkı örneklerinden genomik DNA izolasyonları, ticari kit (NucleoGene Stool DNA Quick Extraction Kit, NucleoGene, Türkiye) kullanılarak ve üreticinin belirlediği prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA'lar Qubit® 3.0 Fluorometric Quantitation (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazında işlenmiş ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir. Takiben, ölçümleri tamamlanan genomik DNA'lar analize tabi tutulana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

β-giardin Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Sekans Analizleri

Dışkı numunelerinden elde edilen genomik DNA izolatları, *G. duodenalis*'in β-giardin gen bölgesini amplifiye eden ve Tablo 2'de verilen primerler ile nested PCR analizine tabi tutulmuştur. Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda; 12.5 µl ticari master mix (DreamTaq™ Hot Start Green PCR Master Mix, Thermo Scientific, ABD), 1.3 µl her bir primer (10 µM konsantrasyon), 7.9 µl steril ddH₂O ve 2 µl template DNA (10-20 ng/µl) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Birinci amplifikasyon için protokol; ön denatürasyon: 95 °C'de 3 dk; denatürasyon: 95 °C'de 1 dk, bağlanma: 65 °C'de 30 s, uzama: 72 °C'de 1 dk, 35 siklus; final uzama: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde dizayn edilmiştir. İkinci PCR'da ilk reaksiyon ürününden 1 µl amplikon kullanılmış steril ddH₂O miktarı 8.9 µl olarak ayarlanmış ve bağlanma sıcaklığı 55 °C olarak belirlenmiştir. PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak laboratuvarı muhafaza edilen referans *G. duodenalis* genomik DNA'sı ile negatif kontrol olarak sterilize edilmiş ddH₂O kullanılmıştır.

Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (5 µl) %1.5'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, iBright™ CL1500 Jel Görüntüleme Sisteminde (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) görüntülenip analiz edilmiştir. Hedef baz aralığında görünen bantlar sekans analizleri öncesinde ticari kit kullanılarak (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Almanya) jelden pürifiye edilmiştir.

Sekans analizleri ikinci PCR analizlerinde kullanılan forward ve reverse primer dizileri ile çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir (Macrogen Europe). Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlar ait kromotogramlar Quality (Phred) skorlarına göre dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious Prime (<https://www.geneious.com>) yazılımında işlenmiş ve kalite skoru yüksek 511 bp uzunluğundaki hedef bölge sekansları sağlanarak izolatlar için final nükleotid dizilimleri elde edilmiştir.

Genotiplendirme ve Filogenetik Analizler

Çalışmada elde edilen izolatlar ait nükleotid dizilimleri, GenBank BLASTn algoritması (Altschul ve ark., 1990) kullanılarak GenBank'ta kayıtlı tüm *G. duodenalis* genotiplerine ait nükleotid sekansları ile çoklu hizalamaları yapılarak karşılaştırılmış ve moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Takiben karakterize edilen nükleotid dizilerinin GenBank veri bankasına kayıtları yapılmış ve erişim numaraları alınmıştır. *Giardia duodenalis* izolatları arasındaki genetik farklılıklar Geneious Prime yazılımı kullanılarak belirlenmiştir.

Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Maximum Likelihood (ML) analizleri uygulanmıştır. Bu kapsamda öncelikle GenBank veri tabanında kayıtlı çeşitli assemblage'lere ait izolatların β-giardin gen bölgesi dizilimleri ile veri seti oluşturulmuştur. Daha sonra ML

Tablo 2. β-giardin gen bölgesinin nested PCR analizlerinde kullanılan primerler

	Primer İsmi	Primer Dizilimi (5' - 3')	Kaynak
1. PCR	G7	AAGCCCGACGACCTCACCCGACGTGC	Cacciò ve ark. (2002)
	G759	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC	
2. PCR	2005F	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	Lalle ve ark. (2005)
	2005R	CTCGACGAGCTTCGTGTT	

analizleri için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) kullanılmış ve en düşük AIC (Akaike Information Criterion) değeri model filogenetik ağaçların oluşturulmasında tercih edilmiştir. ML analizleri MEGA X (Kumar ve ark., 2018) yazılımı üzerinden gerçekleştirilmiştir. ML analizleriyle oluşturulan ağaçların güvenilirliğinin tespit edilmesinde 1000 tekrarlı Bootstrap testi kullanılmıştır.

Bulgular

Nested PCR analizleri sonucu farklı yaş ve cinsiyetteki sahipli 100 kedi ve 100 köpeğe ait dışkı örneklerinden elde edilen toplam 200 genomik DNA örneğinin üçünde (%1.5) *G. duodenalis* DNA'sı tespit edilmiştir (Tablo 1). *Giardia duodenalis* pozitifliği sahipli kedilerde, köpeklere kıyasla daha yüksek oranda gözlenmiştir. Bununla birlikte erkeklerde ve 1-3 yaş aralığında bulunan hayvanlarda, dişilere ve diğer yaş gruplarına kıyasla daha fazla sayıda pozitiflik tespit edilmiştir (Tablo 1). Pozitif örnek sayısının düşük olması nedeniyle örneklenen kedi ve köpeklerin yaş ve cinsiyetleri temelinde herhangi bir istatistik analiz ve değerlendirme yapılamamıştır.

Yapılan analizler sonucunda β -giardin gen bölgesine göre sekanslanan toplam üç izolattın, üç farklı genotip yapısında olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlardan, oluşturulan protokol numaraları kapsamında CB31 (kedi), CB50 (kedi) ve DB4 (köpek) olarak isimlendirilmiştir. CB31 izolattının, CB50 ve DB4 izolatlara sırasıyla %94.9 ve %93.9 oranlarında, CB50 izolattının ise DB4 izolattına %92.9 oranında genetik benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

CB31, CB50 ve DB4'ün GenBank BLASTn analizleri ile yüksek genetik benzerlik gösterdikleri saptanan kayıtlı izolatlardan elde edilen CB31'in Assemblage C'de yer aldığı belirlenirken, 5.5 yaşındaki erkek kedi dışkısından elde edilen CB50'nin ise zoonotik Assemblage B'de bulunduğu tespit edilmiştir. 1.5 yaşındaki dişi bir köpek dışkısından elde edilen DB4'te yine aynı analizlere tabi tutulmuş ve bu genotipin Assemblage D'de yer aldığı görülmüştür. İzolatlar, PQ514072 (CB31), PQ514073 (CB50) ve PQ514074 (DB4) aksesyon numaraları ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

Filogenetik analizler için oluşturulan β -giardin gen bölgesi veri setine, çalışmadan elde edilen Assemblage C, B ve D'de yer alan sırasıyla CB31, CB50 ve DB4 izolatlarıyla birlikte GenBank'ta mevcut olan farklı assemblajelerde yer alan toplam 46 izolat dahil edilmiştir. ML filogenisi için en uygun model Tamura-Nei (GTR+G+I) olarak belirlenmiş ve midpoint temelli filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. *Giardia duodenalis* izolatlarının β -giardin gen bölgesi Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolat isimlerinin başına siyah kare işareti konmuştur. Düğümlerin önündeki rakamlar ML olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir

Şekil 1'de görüldüğü üzere analize dahil edilen tüm izolatlar, assemblage bazında monofiletik yapıda bir kümelenme göstermiş ve filogenetik çözünürlük, genotipler bazında yüksek bootstrap oranları ile desteklenmiştir. Assemblage A, E, F ve G'de yer alan izolatlar birbirine yakın kardeş kladlar oluştururken Assemblage B'nin bu assemblajelerle aynı düğümde temsil edildiği fakat uzak bir klad oluşturduğu görülmektedir. Bunun yanında Assemblage C ve D'nin ise söz konusu assemblajelerden farklı bir düğüm ile temsil edildiği ve birbirine yakın kardeş kladlar oluşturdukları görülmektedir.

Çalışmada kedi dışkısından izole edilen CB31'in filogenetik ağaçta (Şekil 1) Assemblage C'de yer alan izolatlarla birlikte kümelenildiği ve Hırvatistan (JN416552), Japonya (LC437428) ve Türkiye (PP918967)'de bulunan köpeklerin dışkılarından elde edilen *G. duodenalis* izolatlarıyla %100 identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Öte yandan çalışmada yine kedi dışkısından izole edilen CB50'nin ise Assemblage B'de yer alan izolatlarla birlikte kümelenildiği ve Ja-

ponya (AB618785), Polonya (EU626199, FJ009207, FJ009209) ve İtalya (EU637579)'dan sırasıyla insan, Thomson ceylanı ve küçük karıncayı ile %100'lük bir genetik benzerlik oranı gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1). Çalışmada köpek dışkısından izole edilen DB4'ün de Assemblage D'de yer alan izolatlarla birlikte kümelendiği ve en yüksek genetik benzerliği % 99.8 ile Çin (KY979503) ve Japonya (LC437453)'da köpek dışkılarından izole edilerek kaydedilen *G. duodenalis* izolatlarıyla gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 1).

Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de kedi ve köpekler üzerinde yürütülen ve teşhis metodu olarak hem yüksek hassasiyet ve özgünlüğe sahip olması hem de zoonotik karakterli genotiplerin belirlenebilmesi amacıyla nükleik asit temelli yöntemler içerisinde PCR yönteminin kullanıldığı çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Bu kapsamda kediler üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Sursal ve ark. (2020)'nın *G. duodenalis*'in moleküler yöntemlerle teşhisi noktasında ilk çalışmayı gerçekleştirmiş oldukları ve moleküler prevalansı %29.4 olarak belirledikleri görülmektedir. Takiben Önder ve ark. (2021) Kayseri ve Samsun yörelerinde 100 kedide *G. duodenalis*'in varlığını moleküler yöntemleri kullanarak araştırdıkları çalışmalarında 8 (%8) kedide pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Aslan Çelik (2022) ve Aslan Çelik ve ark. (2023a)'nın sırasıyla Mardin ve Siirt yörelerindeki kedilerde yaptıkları çalışmalarda %16.6 ve %2.5 prevalans oranlarında *G. duodenalis* pozitifliği saptadıkları görülmektedir. Bunun yanında Türkiye'de köpekler üzerinde yürütülen moleküler çalışmalar incelendiğinde ise Gultekin ve ark. (2017)'nin Aydın yöresinde sahipli köpeklerin yanında barınak köpeklerini de dahil ettikleri moleküler çalışmalarında *G. duodenalis* pozitifliğini %18.8 olarak bildirildikleri görülmüştür. Öte yandan Aslan Çelik ve ark. (2023b) Diyarbakır yöresinde barınak köpekleri üzerinde yürüttükleri çalışmalarında bu oranı %4 olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda farklı yaş ve cinsiyette 100 kedi ve 100 köpek olmak üzere toplam 200 sahipli hayvandan tekniğine uygun bir şekilde alınan dışkı örnekleri, genomik DNA izolasyonunu takiben nested PCR yöntemi ile *G. duodenalis* varlığı yönünden araştırılmıştır. PCR analizleri sonucunda ikisi kedi (%2) ve biri köpek (%1) olmak üzere toplam üç (%1.5) hayvanda *G. duodenalis* DNA'sı saptanmıştır. Bu kapsamda çalışmamızda sahipli kedi ve köpeklerde *G. duodenalis* prevalansının yukarıda bahsedilen Türkiye'deki kedi ve köpekler üzerinde gerçekleştirilen moleküler çalışmalardan bildirilen prevalans oranlarına kıyasla daha düşük olduğu dikkati çekmiştir. Bu durumun dışkı örneği alınan evde beslenen kedi ve köpeklerin bakım şartlarının barınak veya sokak şartlarına göre oldukça yüksek olması ve dolayısıyla hayvanların *Giardia* kistleri ile kontamine olmuş besin ve su kaynaklarından uzak olmaları, hijyen, dışkı kontrolü ve

genel bakım besleme koşullarının diğer çalışmalarda örneklenen hayvanlara göre daha yüksek derece sağlanması neticesinde gerçekleşebileceğinin yanında örneklem sayısı, coğrafik bölge koşulları ve iklimsel özelliklere de bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Giardia duodenalis'in genotip ve alt genotiplerinin saptanması ve moleküler karakterizasyonu enfeksiyonun epidemiyolojisi, surveyans, korunma ve kontrolde oldukça önem arz etmektedir. *Giardia duodenalis*'in genotiplendirilmesi için sık kullanılan genler β -giardin, triose phosphate isomerase, glutamate dehydrogenase ve küçük alt ünite ribozomal RNA (ssu-rRNA) genleridir (Ryan ve Caccio, 2013). Tüm bu gen bölgelerine ait sekansların tek başına veya birlikte kullanılması neticesinde *G. duodenalis*'in genotip ve alt genotipleri üzerine veriler sağlanabilmektedir (Pallant ve ark., 2015). *Giardia duodenalis*'in hem konak spesifik genotipleri (C-H) hem de belirli bir konakla sınırlı olmayan genotiplerinin (A ve B) varlığı, ilgili genlerin sekans analizleriyle ortaya koyulmuştur (Cai ve ark., 2021). Bu kapsamda çalışmamızda *G. duodenalis*'in genotiplendirilmesinde en sık kullanılan genlerden biri olan β -giardin geni amplifiye edilmiş ve böylece elde edilen izolatların genotipleri hakkında veriler sağlanarak ilgili veri bankalarına kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Köpeklerde, Assemblage C ve D en yaygın genotip grupları olarak bildirilmekle birlikte, zoonotik Assemblage A da köpeklerde yine yaygın bir grup olarak belirtilmektedir (Cai ve ark., 2021). Assemblage A ve canin-spesifik assemblagelerin (C ve D) dağılımı göz önüne alındığında, köpeklerde *G. duodenalis*'in bulaşmasının iki farklı yol ile olabileceği varsayılmaktadır (Feng ve Xiao, 2011). Bunların ilki Assemblage C ve D temelinde, kötü hijyen şartlarına sahip, kalabalık barınaklar veya yaşam alanlarında köpekten köpeğe bulaşma şeklidir (Feng ve Xiao, 2011). Diğer bulaşma şekli ise zoonotik Assemblage A temelinde sahipli köpekler ve insanlar arasında gerçekleşen bulaşma durumudur (Feng ve Xiao, 2011). Nitekim Thompson ve ark. (2008) çalışmalarında aynı evi paylaşan insan ve köpeklerden izole ettikleri *G. duodenalis* izolatlarının genetik olarak identik oldukları bildirmişlerdir. Araştırmacılar (Thompson ve ark., 2008), elde ettikleri bu verilerle *G. duodenalis*'in hem köpekten insanlara hem de insanlardan köpeklere bulaşabildiğini kaydetmişlerdir. Assemblage B köpeklerde çoğunlukla sporadik olarak bildirilmesine rağmen (Feng ve Xiao 2011) İspanya'da yapılan bir çalışmada (Gil ve ark., 2017), Assemblage B'nin köpeklerdeki *G. duodenalis* enfeksiyonlarının %42.1'ini (8/19) oluşturduğu kaydedilirken, Assemblage C ve D'nin ise yalnızca %21.1 oranında tespit edildiği bildirilmiştir. Gultekin ve ark. (2017)'nin Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada ise Assemblage B, genotiplendirmesi yapılan 89 köpek izolatının 51'inde (%57.3) tespit edilmiştir. Yapılan bu son çalışmalar göz önüne alındığında özellikle son yıllarda köpeklerde Assemblage A ve B'nin yayılışın-

da bir artış olduğu, bunun da insanlar ve köpeklerin bir arada daha çok yaşamaya başlaması sonucunda *G. duodenalis*'in yaşam çemberini insan-köpek döngüsü çerçevesinde devam ettirebileceği, dolayısıyla da bulaşmanın insan-köpek temelinde daha çok gerçekleşebileceği dikkati çekmiştir. Çalışmamızda farklı yaş ve cinsiyetten 100 sahipli köpekten alınan dışkı örneklerinin sadece birinde *G. duodenalis* pozitifliği saptanmış ve yapılan genotip analizleri sonucunda bu izolatin zoonotik assemblajelerden farklı şekilde canin-spesifik olarak nitelendirilen Assemblage D'de yer aldığı tespit edilmiştir. Bu kapsamda çalışmamızda *G. duodenalis* pozitif bulunan 1.5 yaşındaki bu dişi köpeğin etkeni muhtemelen başka bir enfekte köpekten almış olabileceği düşünülmüştür.

Kedilerde *G. duodenalis*'in genotiplendirildiği çalışmalar dikkate alındığında bu hayvanların çoğunlukla feline-spesifik Assemblage F ile enfekte oldukları belirtilmiştir (Cai ve ark., 2021). Zoonotik Assemblage A ise F'den sonra kedilerde en yaygın görülen *G. duodenalis* genotip grubu olarak bildirilmektedir (Cai ve ark., 2021). Nitekim Kanada'da Hoopes ve ark. (2015)'nin yaptıkları bir çalışmada, kedilerden elde edilen ve genotiplendirmesi yapılan sekiz izolatin tümünün zoonotik Assemblage A'da yer aldığı ifade edilmiştir. Assemblage B, C ve D kedilerden izole edilen örneklerde az sayıda bildirilmelerine rağmen Sursal ve ark. (2020) Türkiye'de yaptıkları çalışmalarında kedilerden izole ettikleri tüm *G. duodenalis* izolatlarının Assemblage B'de yer aldıklarını bildirmişlerdir. Yine Önder ve ark. (2021) Kayseri ile Samsun yörelerinde ve Aslan Çelik ve ark. (2023a) Siirt yöresindeki kedilerde yaptıkları çalışmalarda genotiplendirdikleri tüm izolatların Assemblage B'de yer aldıklarını belirtmişlerdir. Dünya'nın farklı bölgelerinde yürütülen diğer çalışmalarda da kedilerden elde edilen izolatların feline-spesifik assemblajelerin yanında Assemblage B'de de yer aldıkları bildirilmiştir (Jaros ve ark., 2011; McDowall ve ark., 2011; Pallant ve ark., 2015; Lijima ve ark., 2018). Çalışmamızda farklı yaş ve cinsiyetten 100 sahipli kediden alınan dışkı örneklerinin ikisinde *G. duodenalis* pozitifliği saptanmış ve yapılan moleküler genotiplendirme analizleri sonucunda bu izolatların Assemblage B ve C'de yer aldıkları tespit edilmiştir. Bu kapsamda çalışmamızda zoonotik Assemblage B olarak genotiplendirilen izolatin Türkiye'de kedilerden bildirilen diğer tüm izolatlarla aynı genotip grubunda olduğu görülmüştür. Bunun yanında Assemblage B'nin Türkiye'de insanlarda (Aydin ve ark., 2004) ve hatta su kaynaklarında da (Koloren ve ark., 2016) tespit edilmiş olması bu genotip grubunun ülkede yaygın bir şekilde seyrettiğini göstermektedir. Dolayısıyla çalışmamızda elde edilen Assemblage B'nin 5.5 yaşındaki erkek kediye başta insan olmak üzere diğer kedilerden veya kontamine sularla bulaşmış olma ihtimali göz önüne alınmış ve söz konusu hayvanın sporadik olarak kist atımı yapabileceği düşünüldüğünde, başta insanlar olmak üzere

diğer hayvanlar için oluşturabileceği risk faktörleri dikkati çekmiştir. Çalışmamızda ayrıca 2 yaşındaki erkek kedi dışkısından izole edilen diğer *G. duodenalis* izolati ise Assemblage C'de yer almıştır. Assemblage C grubunda yer alan izolatlar daha çok köpeklerden bildirilmesine rağmen çalışmamızda bu izolatin bir kediden bildirilmesi rastlantısal olarak değerlendirilmeye birlikte, Türkiye'de kedilerde bu gruptan bildirilen ilk izolat olması önem arz etmiştir. Ayrıca Dünya'da yapılan diğer çalışmalar (Mancianti ve ark., 2015; Adriana ve ark., 2016; Xu ve ark., 2016; Ito ve ark., 2017; Kostopoulou ve ark., 2017; Liu ve ark., 2017; Tangtrongsup ve ark., 2020) incelendiğinde Assemblage C'nin kedilerden izole edilen izolat gruplarında az sayıda da olsa bildirildiği görülmektedir. Bunun yanında Assemblage C'nin sadece köpekgillerden bildirilen spesifik bir grup olmadığı da dikkati çekmektedir. Nitekim, Traub ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmalarında insanlardan elde edilen izolatların (%2.5) Assemblage C grubunda yer aldıklarını bildirmişlerdir. Bu da Assemblage C'nin gelecekte zoonotik bir önem taşıyabileceği ve halk sağlığı yönünden tehdit oluşturabileceği ihtimalini göz önüne getirmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmayla birlikte, Nevşehir yöresindeki sahipli kedi ve köpeklerde *G. duodenalis*'in moleküler prevalansı ve genetik karakterizasyonu ilk kez ortaya koyulmuştur. Bu çalışma aynı zamanda Türkiye'de kedilerde Assemblage C grubunda yer alan bir izolatin bildirildiği ilk çalışma özelliğini de taşımaktadır. Bu kapsamda çalışmada Dünya literatürü için özgün veriler sağlanmış olmakla birlikte kedi ve köpeklerin insan enfeksiyonları için oluşturabilecekleri risk potansiyeline dikkat çekilmiştir. Çalışma, elde edilen sonuçlar çerçevesinde Türkiye'de *G. duodenalis* enfeksiyonlarının tek sağlık temelinde bir bütün olarak ele alınması gerekliliğini bir kez daha ortaya koymuş ve gelecekte giardiasisin moleküler epidemiyolojisi ile giardiasise karşı korunma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi noktasında daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir.

Teşekkür

Bu çalışmayı TYL-2024-13516 proje kodu ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Adeyemo FE, Singh G, Reddy P, Stenström TA. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. Acta Trop 2018; 184: 15-28.
- Adriana G, Zsuzsa K, Mirabela Oana D, Mircea GC, Viorica M. *Giardia duodenalis* genotypes in domestic and wild animals from Romania identified by PCR-RFLP targeting the *gdh* gene. Vet Parasitol

- 2016; 217: 71-5.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215(3): 403-10.
- Aslan Çelik B, Çelik ÖY, Ayan A, Akyıldız G, Oruç Kılıncı Ö, Oktay Ayan Ö, Ercan K. Preliminary investigation of the prevalence and genotype distribution of *Cryptosporidium* spp., and *Giardia duodenalis* in cats in Siirt, Turkey. *Acta Vet-Beograd* 2023a; 73(3): 317-324.
- Aslan Çelik B, Çelik ÖY, Koçhan A, Ayan A, Oruç Kılıncı Ö, Akyıldız G, İrak K, Oktay Ayan Ö, Ercan K. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in shelter dogs of southeastern Türkiye. *Vet Res Forum* 2023b; 14(11): 595-599.
- Aslan Çelik B. First detection of *Giardia duodenalis* in cats in Mardin province. *FU Vet J Health Sci* 2022; 36(2): 108-11.
- Aydin AF, Besirbellioglu BA, Avci IY, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50(2): 147-51.
- Barutzki D, Schaper R. Results of parasitological examinations of faecal samples from cats and dogs in Germany between 2003 and 2010. *Parasitol Res* 2011; 109 Suppl 1: S45-S60.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment 35 length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol* 2002; 32(8): 1023-30.
- Cai W, Ryan U, Xiao L, Feng Y. Zoonotic giardiasis: an update. *Parasitol Res* 2021; 120(12): 4199-218.
- Dado D, Montoya A, Blanco MA, Miró G, Saugar JM, Bailo B, Fuentes I. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in Spain: possible zoonotic transmission and public health importance. *Parasitol Res* 2012; 111(6): 2419-22.
- Dixon BR. *Giardia duodenalis* in humans and animals - Transmission and disease. *Res Vet Sci* 2021; 135: 283-89.
- Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(1): 110-40.
- Gil H, Cano L, de Lucio A, Bailo B, de Mingo, MH, Cardona GA, Fernández-Basterra JA, Aramburu-Aguirre J, López-Molina N, Carmena D. Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infect Genet Evol* 2017; 50: 62-9.
- Gultekin M, Ural K, Aysul N, Ayan A, Balıkcı C, Akyıldız G. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs in Aydın, Turkey. *Int J Environ Health Res* 2017; 27(3): 161-8.
- Hao Y, Liu A, Li H, Zhao Y, Yao L, Yang B, Zhang W, Yang F. Molecular characterization and zoonotic potential of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in humans and domestic animals in Heilongjiang Province, China. *Parasit Vectors* 2024; 17(1): 155.
- Hoopes J, Hill JE, Polley L, Fernando C, Wagner B, Schurer J, Jenkins E. Enteric parasites of free-roaming, owned, and rural cats in prairie regions of Canada. *Can Vet J* 2015; 56(5): 495-501.
- Lijima Y, Itoh N, Ito Y, Kimura Y. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from household cats and pet shop kittens. *Vet Parasitol* 2018; 259: 44-8.
- Ito Y, Lijima Y, Itoh N, Kimura Y. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from breeding cattery cats in Japan. *JFMS Open Rep* 2017; 3(2): 2055116917745237.
- Jaros D, W Zygmier, S Jaros, H. Wedrychowicz. Detection of *Giardia intestinalis* assemblages A, B and D in domestic cats from Warsaw, Poland. *Pol J Microbiol* 2011; 60: 259-63.
- Koehler AV, Jex AR, Haydon SR, Stevens MA, Gasser RB. Giardia/giardiasis - a perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnol Adv* 2014; 32(2): 280-89.
- Koloren Z, Seferoğlu O, Karanis P. Occurrence of *Giardia duodenalis* assemblages in river water sources of Black Sea, Turkey. *Acta Trop* 2016; 164: 337-44.
- Kostopoulou D, Claerebout E, Arvanitis D, Ligda P, Voutzourakis N, Casaert S, Sotiraki S. Abundance, zoonotic potential and risk factors of intestinal parasitism amongst dog and cat populations: The scenario of Crete, Greece. *Parasit Vectors* 2017; 25;10(1):43.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018; 35(6): 1547-49.
- Kurnosova OP, Panova OA, Arisov MV. Prevalence of *Giardia duodenalis* in dogs and cats: age-related predisposition, symptomatic, and asymptomatic cyst shedding. *Vet World* 2024; 17(2): 379-83.

- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 2005; 35(2): 207-13.
- Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the water borne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 2002; 28(2): 123-47.
- Liu H, Shen Y, Liu A, Yin J, Yuan Z, Jiang Y, Pan W, Zhang Y, Zhao W, Cao J. Occurrence and multi-locus genotyping of *Giardia duodenalis* in pets and zoo animals in Shanghai, China. *J Infect Dev Ctries* 2017; 11(6): 479-86.
- Mancianti F, Nardoni S, Mugnaini L, Zambernardi L, Guerrini A, Gazzola V, Papini RA. A retrospective molecular study of select intestinal protozoa in healthy pet cats from Italy. *J Feline Med Surg* 2015; 17(2): 163-67.
- McDowall RM, Peregrine AS, Leonard EK, Lacombe C, Lake M, Rebelo AR, Cai HY. Evaluation of the zoonotic potential of *Giardia duodenalis* in fecal samples from dogs and cats in Ontario. *Can Vet J* 2011; 52(12): 1329-33.
- Monis PT, Cacciò SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 2009; 25(2): 93-100.
- Önder Z, Yetişmiş G, Pekmezci D, Delibaşı Kökçü N, Pekmezci GZ, Çiloğlu A, Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A. Investigation of zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia intestinalis* species and genotypes in cats (*Felis catus*). *Türkiye Parazit Derg* 2021; 45(4): 252-56.
- Pallant L, Barutzki D, Schaper R, Thompson RC. The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasit Vectors* 2015; 8: 2.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; 25(7): 1253-56.
- Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol* 2013; 43(12-13): 943-56.
- Soares R, Tasca T. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *J Microbiol Methods* 2016; 129: 98-102.
- Sommer MF, Rupp P, Pietsch M, Kaspar A, Beelitz P. *Giardia* in a selected population of dogs and cats in Germany - diagnostics, coinfections and assemblages. *Vet Parasitol* 2018; 249: 49-56.
- Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW; ZO-OPNET network and partners. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(12): e558.
- Sursal N, Simsek E, Yıldız K. Feline giardiasis in Turkey: prevalence and genetic and haplotype diversity of *Giardia duodenalis* based on the β -giardin gene sequence in symptomatic cats. *J Parasitol* 2020; 106(5): 699-706.
- Tangtrongsup S, Scorza AV, Reif JS, Ballweber LR, Lappin MR, Salman MD. Seasonal distributions and other risk factors for *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats in Chiang Mai, Thailand. *Prev Vet Med* 2020; 174: 104820.
- Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J* 2008; 177(1): 18-25.
- Traub RJ, Inpankaew T, Reid SA, Sutthikornchai C, Sukthana Y, Robertson ID, Thompson RC. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok—a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop* 2009; 111(2): 125-32.
- Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 2004; 128(3): 253-62.
- Upcroft J, Upcroft P. My favorite cell: *Giardia*. *Bioessays* 1998; 20(3): 256-63.
- Wielinga CM, Thompson RC. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* 2007; 134(12): 1795-821.
- Xu H, Jin Y, Wu W, Li P, Wang L, Li N, Feng Y, Xiao L. Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China. *Parasit Vectors* 2016; 9: 121.



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Research Article / Araştırma Makalesi
22(1), 36-44, 2025
DOI: 10.32707/ercivet.1610440

Evaluating the Therapeutic Impact of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) on Long Bone Fracture Healing in Cats*

Nail Deniz YAŞRIN^{1,a}, İrem ERGİN^{2,b}

¹Ankara University, The Graduate School of Health Sciences, Ankara-TÜRKİYE

²Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Ankara-TÜRKİYE

ORCID No: ^a0000-0002-2873-3156; ^b0000-0003-2373-5133

Corresponding author: Nail Deniz YAŞRIN; E-mail: naildenizyasrin@gmail.com

How to cite: Yaşrin ND, Ergin İ. Evaluating the therapeutic impact of autologous platelet-rich plasma (PRP) on long bone fracture healing in cats. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2025; 22(1):36-44

Abstract: This study evaluated the clinical and radiographic effects of platelet-rich plasma (PRP) on the healing of long bone fractures in cats. It featured a control group (n= 11) and a PRP group (n= 11). In the control group, only osteosynthesis was performed, whereas the PRP group received a combination of PRP and a gelatin sponge applied to the osteosynthesis site. Clinical and radiographic evaluations were conducted on days 0 (preoperative), 15 and 30 (postoperative). Clinical evaluation included lameness scoring, while radiographic assessment focused on fracture healing according to the Hammer scale, fracture reduction, intramedullary pin positioning, and callus formation. A significant reduction in lameness scores was observed on the 15th and 30th days in both groups. Although no statistically significant differences were detected between the groups on days 15, and 30, the PRP Group demonstrated lower scores. Based on the evaluations performed using the Hammer scale, no statistically significant differences were observed between the groups in callus formation and fracture line scores at the postoperative time points of days 15 and 30. However, upon examining the union score, the difference observed between the two time periods was found to be statistically significant, with a more pronounced effect in the PRP group on day 15. In conclusion, no complications were observed during the study. While PRP did not significantly alter the overall clinical healing process of long bone diaphyseal fractures in cats, it was found to accelerate early healing and reduce lameness.

Keywords: Callus, feline, growth factor, intramedullary pinning, platelets

Kedilerde Uzun Kemik Kırıklarının İyileşmesinde Otolog Trombosit Zengin Plazmanın (PRP) Terapötik Etkisinin Değerlendirilmesi

Öz: Bu çalışmada, kedilerde uzun kemik kırıklarının iyileşmesi üzerine otolog trombosit zengin plazmanın (PRP) klinik ve radyografik etkileri değerlendirildi. Çalışma iki gruptan oluştu: kontrol grubu (n= 11) ve PRP grubu (n= 11). Kontrol grubunda sadece osteosentez yapılırken, PRP grubuna osteosentez bölgesine jelatin sünger ile kombine edilen PRP uygulandı. Klinik ve radyografik değerlendirmeler 0. (preoperatif), 15. ve 30. (postoperatif) günlerde yapıldı. Klinik değerlendirme topallık skorlamasını içerirken, radyografik değerlendirme Hammer skalasına göre kırık iyileşmesi, kırık redüksiyonu, intramedüller pin konumlandırması ve kallus oluşumuna odaklandı. Her iki grupta da 15. ve 30. günlerde topallık skorlamasında anlamlı bir azalma gözlemlendi. 15. ve 30. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmasa da, PRP grubunda daha düşük skorlama elde edildi. Gruplar arasında postoperatif 15. ve 30. gün zaman noktalarında kallus oluşumu ve kırık hattı skorlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Ancak, kaynama skoru incelendiğinde, iki zaman dilimi arasında gözlenen farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu, PRP grubunda 15. günde daha belirgin bir etki olduğu bulundu. Sonuç olarak, çalışma sırasında herhangi bir komplikasyon gözlemlenmedi. PRP'nin, kedilerde uzun kemik kırıklarının genel klinik iyileşme sürecini önemli ölçüde değiştirmezken, erken dönemde, yangı fazında iyileşmeyi hızlandırdığı ve topallamayı azalttığı görüldü.

Anahtar kelimeler: Büyüme faktörü, felin, intramedüller pin, kallus, trombosit

Introduction

Fracture healing is a complex and prolonged process influenced by various factors, including species-specific differences, age, sex, and medical and environmental conditions. To reduce the risk of complica-

tions such as non-union or delayed union in bone healing, treatment strategies should focus on enhancing and optimizing the healing process. Providing favourable conditions are established, bone tissue with disrupted integrity has the capacity for complete regeneration through the interplay between biomechanical and biological processes. These conditions may range from simple splint immobilization to fixation using implants such as intramedullary pins, plates and screws. In recent years, research has focused on exploring and utilizing materials with oste-

Geliş Tarihi/Submission Date : 31.12.2024
Kabul Tarihi/Accepted Date : 19.03.2025

* Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenen 147 kodlu ve "Otolog Trombosit Zengin Plazmanın Kedilerde Uzun Kemik Kırıklarında İyileşme Üzerine Etkisi" isimli doktora tez projesinden özetlenmiştir.

ogenic and osteoinductive properties to enhance the biological environment of bone tissue (Giannoudis et al., 2007; Van Lieshout and Den Hartog, 2021).

Platelet-rich plasma (PRP) and its derivatives are widely utilized in various fields of veterinary medicine, particularly in the context of bone fracture healing, and remain an active area of investigation across diverse therapeutic models.

In the process of bone regeneration during fracture healing, particularly in the remodelling phase, the activity and proliferation of bone cells, alongside growth factors, play a crucial role in enhancing vascularization, which is critical for effective bone healing (Li et al., 2007). Platelet-derived growth factor, which facilitates the reconstruction and local angiogenesis of bone tissue, insulin-like growth factors, which are critical for bone mass acquisition, callus formation, and direct defect repair during the developmental period (Yuan et al., 2021; Reible et al., 2018), and transforming growth factor-beta, which promotes cartilage formation and contributes to callus development (Sarahrudi et al., 2011), represent some of the key growth factors present in platelet-rich plasma. Numerous clinical and experimental studies have demonstrated the efficacy of plasma-rich growth factors and PRP in promoting cartilage and bone healing in animals (Kasten et al., 2008; Thor et al., 2013).

The objective of this study is to clinically and radiographically evaluate the short-term effects of platelet-rich plasma on fracture healing in diaphyseal fractures of feline extremities, utilizing an absorbable gelatin sponge as a delivery material.

Materials and Methods

Ethical approval for the study was obtained from the Animal Experiments Local Ethics Committee of Ankara University (Approval no: 2020-5-34). Moreover, the owners of the animals were adequately informed about the study, and their consent was obtained prior to their participation in the research.

Animals

The study included 22 cats, aged between 1 and 6 years, that were admitted to Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Animal Hospital with single-piece fractures along the diaphyseal region of the femur, humerus, or tibia. A detailed anamnesis obtained from the owners indicated that all cases had a history of trauma, such as falls from height or traffic accidents. Only cats with no prior trauma to the same region and no underlying conditions affecting bone metabolism were included in the study.

The cats included in the study were randomly divided into two equal groups: The control group (n=11), which received a saline solution to the fracture site

following surgery, and the PRP group (n=11), which received PRP-gelatin sponge application to the fracture site following surgery.

PRP Preparation

Approximately 3 mL of peripheral venous blood was aseptically collected from cats and transferred into citrate anticoagulant tubes (9nc 3.2%) (Oryan et al., 2016; Toyoda et al., 2018) and centrifuged (300g/5 minutes, Sirena, AFI Group). The blood sublayer was removed, and the platelet-rich fraction was subjected to a second centrifugation at 700g for 17 minutes. Following this step, the supernatant platelet-poor plasma (PPP) fraction was discarded. The resulting extract, enriched with PRP and growth factors, was carefully collected using a pipette. To activate the platelets, 0.1% calcium chloride was added prior to application, rendering the preparation suitable for local use at the fracture site (Oryan et al., 2016; Singh et al., 2017; Malhotra et al., 2014; Toyoda et al., 2018) (Figure 1).

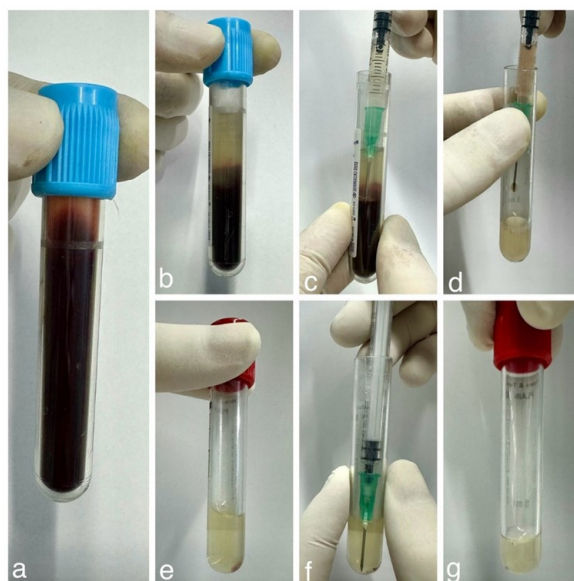


Figure 1. PRP preparation stages. **a.** Collection of blood from v. cephalica in a citrated tube **b.** The appearance of the platelet-rich and platelet-poor plasma mixture after the first centrifugation process (300g x 5min) **c.** Collection of the mixture with the help of a cannula **d.** The collected mixture is transferred to a new tube **e.** Appearance after the second centrifugation process **f.** Collection of PRP and PPP with the help of a cannula **g.** Appearance of the PRP ready for application in a sterile tube.

Operation Method and Application of PRP to the Fracture Area

General anaesthesia was provided with medetomidine HCl (80 µg/kg, intramuscularly, Domitor®, Finland) and ketamine HCl (5 mg/kg, intramuscularly,

Keta-Control®, Türkiye). Isoflurane (with 100% oxygen, Isoflurane®, USA) was used for anaesthesia maintenance. Butorphanol tartrate (0.1mg/kg, subcutaneously, Butomidor®, Austria) was administered for analgesia. Balanced electrolyte solutions (Ringer's lactate, 50 ml/kg/h, intravenously) and cefazolin (25 mg/kg, intravenously, Eqizolin®, Türkiye) were administered intraoperatively.

In all cases, fracture reduction was successfully achieved using the retrograde intramedullary pinning technique. A lateral surgical approach was employed for diaphyseal fractures of the femur and humerus, while a medial approach was selected for tibial fractures. Following precise anatomical alignment, fracture stabilization was performed using a standard surgical technique. Depending on the diameter of the medullary cavity, a Steinmann pin was inserted via the retrograde technique, ensuring that the implant occupied approximately 70-80% of the medullary canal's diameter. To prevent rotational instability of the fracture ends, a cerclage wire was additionally applied.

In the PRP group, following completion of the fixation procedure, a 1×1×1 cm absorbable gelatin sponge (Surgifoam, Johnson & Johnson Ethicon, USA) was placed over the fracture line and preoperatively prepared autologous PRP was applied to the site using a sterile syringe.

During the postoperative period, the affected limb was supported with a bandage for one week to minimize movement, with bandages replaced during follow-up visits. Additionally, activity restriction was enforced throughout the recovery period to facilitate optimal healing. All animals received amoxicillin-clavulanic acid (25 mg/kg, orally) for one week postoperatively. For analgesia, meloxicam HCl (0.3 mg/kg, subcutaneously) was administered for five days.

Clinical Examination

Clinical evaluations of the animals in both groups were conducted on the 0th, 15th and 30th days. In the clinical evaluation of the cases, lameness scoring was used.

Grade 1. Low-grade lameness. Lameness is barely visible or no lameness is apparent, but the cat lifts its foot while sitting (thoracic limbs) or cannot jump (pelvic limbs).

Grade 2. Moderate lameness. Lameness is clearly visible, but the limb is used for most steps.

Grade 3. High-grade lameness. The cat only touches its toes or does not bear any weight (Voss and Steffen, 2009).

Radiographic Examination

Radiographic assessments were performed on the 0th, 15th, and 30th days by two independent experts in a blinded evaluation. Direct radiographs were obtained in mediolateral and anteroposterior positions for radiographic evaluations (Figure 2). The assessment included the examination of fracture healing, fracture reduction, intramedullary pin position, and callus formation.



Figure 2. Preoperative and postoperative day 0 mediolateral and anteroposterior radiographic images of the long oblique diaphyseal humeral fracture in Case 13. The preoperative images depict the extent and orientation of the fracture, while the postoperative images demonstrate fracture alignment and stabilization following surgical intervention.

Day 0 radiographs were chosen to determine the accuracy of the postoperative surgical method; day 15 radiographs were chosen to reveal the differences in healing in the soft callus process; and day 30 radiographs were chosen to compare and evaluate the clinical healing process (Marsh and Li, 1999). Postoperative radiographic scoring was performed based on the scale developed by Hammer et al. (1985) (Table 1).

Table 1. Hammer scale (1985)

Grade	Callus formation	Fracture Line	Union
1	Homogeneous bone structure	Obscured/eliminated	Successful
2	Massive bone trabeculae crossing the fracture line	Barely visible	Successful
3	Visible bridging at the fracture site	Visible	Indeterminate
4	No evidence of bridging at the fracture site	Separate/distinct	Unsuccessful
5	No callus formation	Separate/distinct	Unsuccessful

Statistical Analysis

Descriptive statistics were calculated and presented as the median (min-max) or arithmetic mean $\pm$ standard deviation, depending on the data distribution. The Student's t-test was used to analyse the distribution of age across groups, while the chi-square test was employed to evaluate the frequency distribution of gender between groups. A robust single-factor repeated two-way analysis of variance was conducted to assess changes in callus formation, fracture line, union, and lameness scores between groups and over time. Model estimation utilized the bootstrap method, median estimator, and Mahalanobis distance criteria. Data analysis was performed using R software (Version 4.2.1; R Core Team, 2021) and the WRS2 package (Mair and Wilcox, 2020). A criterion of $p < 0.05$ was used for all statistical comparisons.

Results

The study included a total of 22 cats, consisting of 7 females and 4 males for the control group, and 2 females and 9 males for the PRP group. The average age of the cases was determined to be 1.41 ± 0.38 years for the control group, 1.09 ± 0.3 years for the PRP group. When examining the distribution of fractures in the study, tibial fractures were the most common (68.2%), followed by femoral (18.8%) and humeral (13.63%) fractures (Table 2).

Table 2. Signalement, fracture localization and type, treatment for control and PRP groups.

Groups	Cats	Breeds	Age	Gender	Fracture localization	Fracture type
Control Group	1	Van cat	1	M	H	Long oblique diaphyseal
	2	Crossbreed	1.5	M	F	Diaphyseal spiral
	3	Crossbreed	1	M	T/F	Short oblique diaphyseal
	4	Crossbreed	2	Fe	T/F	Mid-diaphyseal transverse
	5	Crossbreed	1.5	M	T	Distal-third oblique diaphyseal
	6	Crossbreed	1.5	Fe	T/F	Proximal-third oblique diaphyseal
	7	Crossbreed	1	M	T/F	Distal-third oblique diaphyseal
	8	Crossbreed	2	M	T/F	Proximal-third diaphyseal oblique
	9	Crossbreed	1.5	M	T	Short oblique diaphyseal
	10	Crossbreed	1.5	M	T	Short oblique diaphyseal
	11	Crossbreed	1	M	F	Long oblique diaphyseal
PRP Group	12	Crossbreed	1	Fe	F	Mid-diaphyseal transverse
	13	Crossbreed	2	M	H	Long oblique diaphyseal
	14	Crossbreed	1	M	F	Proximal-third oblique diaphyseal
	15	Crossbreed	1	M	T/F	Short oblique diaphyseal
	16	Crossbreed	1	Fe	T	Short oblique diaphyseal
	17	Crossbreed	1	Fe	T/F	Distal-third oblique diaphyseal
	18	Crossbreed	1	Fe	H	Long oblique diaphyseal
	19	Crossbreed	1	M	T	Short oblique diaphyseal
	20	Crossbreed	1	Fe	T	Short oblique diaphyseal
	21	Crossbreed	1	Fe	T	Short oblique diaphyseal
	22	Crossbreed	1	Fe	T/F	Long oblique diaphyseal

T: Tibia, H: Humerus, F: Femur; M: Male, Fe: Female

Clinical Examination Findings

A significant reduction in lameness scores was observed within each group on days 15 and 30 compared to day 0 (Figure 3). Although no statistically significant differences were detected between the groups on days 15 and 30 ($p=0.579$), the PRP group exhibited lower lameness scores (Table 3). Additionally, qualitative assessment of pain responses indicated that animals in the PRP group displayed lower responsiveness during both evaluation periods.

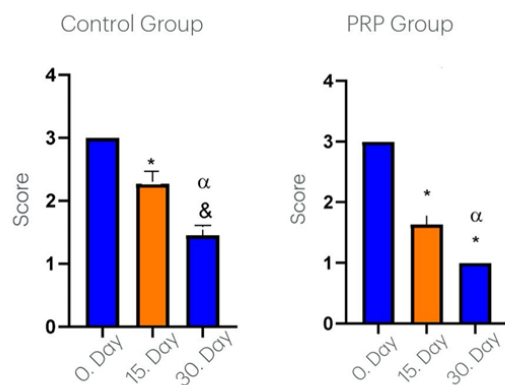


Figure 3. A significant reduction in lameness scores was observed on days 15 and 30 compared to day 0 within the group. A significant reduction in lameness scores was observed on the 15th and 30th days in both groups (Control group * $p<0.01$, ^a $p<0.01$, ^a $p<0.0001$; PRP group * $p<0.0001$, ^a $p<0.0001$).

Radiographic Examination Findings

Based on the evaluations performed using the Hammer scale, no statistically significant differences were observed between the groups in callus formation and fracture line scores at the postoperative time points of days 15 and 30 ($p=0.509$, $p=0.155$, respectively). However, upon examining the union score, the difference observed between the two time periods was found to be statistically significant, with a more pronounced effect in the PRP group on day 15 ($p=0.007$). When the scores for callus formation, fracture line, and union were examined within the groups, a statistically significant decrease was observed on both day 15 and day 30 compared to day 0 ($p<0.001$, $p<0.012$, $p<0.001$, respectively) (Table 3; Figure 4).

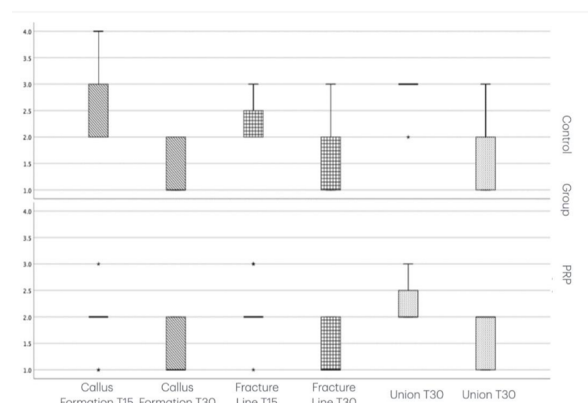


Figure 4. Radiographic evaluation of callus formation, fracture line visibility, and bone union in both groups on postoperative days 15 and 30. Comparative analysis illustrates the progression of healing and differences in callus development over time.

Table 3. Biostatistical analysis of lameness scoring, callus formation, fracture line and bone healing (union) score on the postoperative 15th and 30th days.

Lameness Score						
		15 th day	30 th day		p	
Group	n	Median (min-max)	Median (min-max)	Group	Time	Group*Time
Control	11	2 (1 - 3)	1 (1 - 2)	0.579	<0.001	0.472
PRP	11	2 (1 - 2)	1 (1 - 1)			
Callus Formation						
		15 th day	30 th day		p	
Group	n	Median (min-max)	Median (min-max)	Group	Time	Group*Time
Control	11	2 (2 - 4)	1 (1 - 2)	0.509	<0.001	0.462
PRP	11	2 (1 - 3)	1 (1 - 2)			
Fracture Line						
		15 th day	30 th day		p	
Group	n	Median (min-max)	Median (min-max)	Group	Time	Group*Time
Control	11	2 (2 - 3)	2 (1 - 3)	0.155	0.012	0.182
PRP	11	2 (1 - 3)	1 (1 - 2)			
Bone Healing (Union) Score						
		15 th day	30 th day		p	
Group	n	Median (min-max)	Median (min-max)	Group	Time	Group*Time
Control	11	3 (2 - 3)	2 (1 - 3)	0.007	0.028	0.058
PRP	11	2 (2 - 3)	2 (1 - 2)			

In all cases, anatomical reduction of the fracture site was successfully achieved on postoperative day 0, with the intramedullary pin properly positioned and appropriately sized. By postoperative day 15, the fracture edges had lost their sharpness and appeared rounded (Figure 5). A reduction in the gap between fracture fragments was observed, accompanied by clear evidence of periosteal callus formation surrounding the fracture site. By postoperative day 30, the fracture line had become indistinct, and the amount of callus tissue had increased, appearing more pronounced compared to the previous evaluation (Figure 6).



Figure 5. Postoperative day 15 mediolateral and anteroposterior radiographic images of diaphyseal oblique humeral fractures in Control and PRP Groups. Mediolateral (a) and anteroposterior (b) direct radiographic images of animal 1 in the control group on postoperative day 15 reveal a clearly defined fracture line, with a noticeable reduction in the sharpness of the fracture edges and the initiation of fibrous callus formation (white arrows). In contrast, mediolateral (c) and anteroposterior (d) radiographic images of animal 18 in the PRP group at the same time point demonstrate more advanced callus formation compared to the control group, with a marked reduction in the prominence of the fracture line (white arrows).

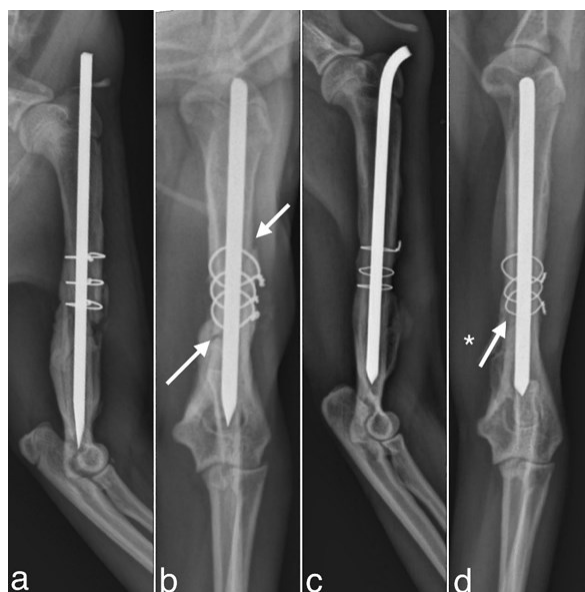


Figure 6. Postoperative day 30 mediolateral and anteroposterior radiographic images of diaphyseal oblique humeral fractures in Control and PRP Groups. Mediolateral (a) and anteroposterior (b) direct radiographic images of animal 1 in the control group on postoperative day 30 demonstrate a further reduction in the prominence of the fracture line compared to postoperative day 15, although it remains discernible (white arrows). Conversely, mediolateral (c) and anteroposterior (d) radiographic images of animal 18 in the PRP group at the same time point reveal that the fracture line has almost completely resolved (white arrows).

Discussion and Conclusion

A review of clinical and experimental studies indicates that PRP has been utilized in various fields, either alone or in combination with compatible materials (Zhang et al., 2018; Singh et al., 2017). In recent years, the use of autologous PRP as an alternative to promote fracture healing has gained increasing popularity. Although its definitive effects are still under investigation, platelet-derived growth factors in PRP have been shown to play a role in angiogenesis, osteoblast proliferation, mesenchymal cell activation, and chemotaxis during fracture healing (Garcia et al., 2012; Van Lieshout and Den Hartog, 2021). In this study, the effects of PRP were clinically and radiographically evaluated using scoring systems in diaphyseal fractures of feline extremities. PRP was found to be safe, cost-effective, and easy to apply, with satisfactory short-term outcomes in fracture healing. To the authors' knowledge, no clinical research has been published regarding the use of PRP in diaphyseal fractures of feline extremities.

Various techniques have been developed for the preparation and activation of PRP. Single or multiple centrifugation methods, cooled and uncooled centrifuge devices, and different anticoagulant agents can be employed to obtain PRP. Additionally, numerous

commercial PRP preparation kits are available for researchers. Despite the variety of preparation methods, it is essential to emphasize that all procedures must adhere to aseptic and antiseptic principles. (Miguel-Pastor et al., 2022). In this study, sodium citrate was selected as the anticoagulant, and PRP was obtained through double centrifugation using a refrigerated centrifuge. Sodium citrate was chosen because it induces minimal to no alteration in platelet shape and volume, thereby preserving the normal discoid structure of platelets. Additionally, its low pH results in reduced pain at the application site (Oryan et al., 2016). Although double centrifugation increases processing time, it facilitates the separation of platelet-rich and platelet-poor plasma fractions from red blood cells and enhances platelet yield (Saqlain et al., 2023). As outlined in the study methodology, the lowest possible G-force was selected for both centrifugation steps. This choice was made primarily to preserve platelet membrane stability during centrifugation and to prevent premature platelet degranulation (Hanna et al., 2004). Consequently, the PRP preparation method used in this study was designed to optimize platelet yield.

PRP extract can be applied independently or in combination with various biomaterials, such as gelatin sponges, autografts, and allografts. Gelatin sponges are readily available, cost-effective compared to many other materials, biocompatible due to their non-toxic nature, and biodegradable, allowing them to gradually degrade in the body and facilitate the formation of new tissue. Their high porosity enables deep tissue penetration by cells and biomolecules (Xue et al., 2017). When used as a PRP carrier, gelatin sponges offer significant advantages, including accelerated wound healing, enhanced tissue regeneration, and increased cellular proliferation. The sponge facilitates the gradual and sustained release of growth factors from PRP, while simultaneously degrading within the body over time. This system provides an optimal method for the continuous release of growth factors and their efficient delivery to the site of injury (Rodriguez et al., 2014). Based on these properties, the application of PRP extract to the fracture line using a gelatin sponge was chosen in this study.

The effects of PRP on fracture healing in long bones remain a topic of debate regarding its contribution to healing speed. While some studies report that PRP has no significant impact on the healing process (Singh et al., 2017; Peerbooms et al., 2012; Ozak et al., 2010), others have demonstrated that PRP significantly accelerates fracture healing (Basdeliöglu et al., 2020; Canbeyli et al., 2018). When examining the fracture healing process, three main phases can be identified: inflammation, repair, and remodelling. During the inflammation phase, platelets, along with growth factors, are transported to the site, initiating

angiogenesis and cell proliferation, which are fundamental steps in the healing process (Haluzan et al., 2015). The initial two-week period, encompassing the inflammatory phase, represents the cellular basis of healing at the fracture site. The concentrated growth factors present in PRP can potentially stimulate early-stage healing (Singh et al., 2017; Maruyama et al., 2020). Upon reviewing the study data, it was observed that the preoperative and postoperative scores on days 15 and 30 showed significant positive changes in animals treated with PRP. Although a similar trend was noted in the control group, the PRP group exhibited greater radiographic consolidation, particularly during the two-week period corresponding to the inflammatory phase. Additionally, the statistically lower union score observed in the PRP group indicated that fracture line union was more successful during this period. By the 30th postoperative day—a key marker of clinical recovery—the effects of PRP continued to show positive progression. However, no significant difference was observed between the PRP and control groups in the earlier period. This finding suggests that PRP may offer more pronounced benefits in the early (cellular) phase of long bone fracture healing in cats. When lameness scoring, a key indicator of clinical recovery, was evaluated, no significant differences were detected between the two groups. However, the reduction in pain symptoms, particularly in the PRP group, was positively interpreted in terms of animal well-being. Although this improvement could not be demonstrated statistically, qualitative differences were noted based on the observed responses of the animals.

Various scoring systems are employed to evaluate fracture healing. Among these, Hammer scoring is widely preferred by researchers for radiographic assessments, as it allows for the separate evaluation of healing degrees in different extremities, fracture lines, callus formation, and the presence or absence of union (Hammer et al., 1985; Leow et al., 2016). In this study, Hammer scoring was applied during preoperative and postoperative radiographic evaluations. Clinical evaluation was supported by objective data obtained through lameness scoring. Due to the difficulty in observing more than a few steps at a time in cats, the 1-10 or 1-5 scale systems commonly used for dogs can be challenging to implement in this species. Therefore, based on previous studies, an alternative 1-3 grading scheme was utilized, as it proved to be more practical for clinical examinations (Voss and Steffen, 2009).

In conclusion, this study demonstrated that the application of an autologous PRP-gelatin sponge significantly enhanced healing during the first two weeks of radiographic evaluations, particularly during the inflammatory phase and soft callus stages of diaphyseal fractures in the extremities of cats. However, this significant difference diminished during the transition

to the hard callus and remodelling phases, yielding results comparable to the control group. Although no statistically significant differences were observed in fracture healing as assessed by clinical lameness scoring, the more rapid resolution of pain in the PRP group could be considered a favourable outcome. Given the limited number of studies investigating the effects of PRP on bone healing in cats, future research incorporating various biomaterial combinations would help further elucidate its potential benefits.

Acknowledgements

We would like to thank Ankara University Scientific Research Projects Coordination Unit for their support in conducting this thesis study through Project No. 147.

References

- Basdelioglu K, Meric G, Sargin S, Atik A, Ulsal AE, Akseki D. The effect of platelet-rich plasma on fracture healing in long-bone pseudoarthrosis. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2020; 30(8): 1481-86.
- Canbeyli ID, Akgun RC, Sahin O, Terzi A, Tuncay IC. Platelet-rich plasma decreases fibroblastic activity and woven bone formation with no significant immunohistochemical effect on long-bone healing: An experimental animal study with radiological outcomes. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2018; 26(3): 2309499018802491.
- Garcia P, Pietruschka A, Klein M, Tami A, Hosting T, Holstein JH, Scheuer C, Pohlmann T, Menger MD. Temporal and spatial vascularization patterns of unions and nonunions: Role of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic proteins. *J Bone Joint Surg Am* 2012; 94(2): 49-58.
- Giannoudis P, Psarakis S, Kontakis G. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. *Injury* 2007; 38(1): 81-9.
- Haluzan D, Davila S, Antabak A, Dobric I, Stipic J, Augustin G. Thermal changes during healing of distal radius fractures- Preliminary findings. *Injury* 2015; 46(6): S103.
- Hammer RR, Hammarby S, Lindholm B. Accuracy of radiologic assessment of tibial shaft fracture union in humans. *Clin Orthop Relat Res* 1985; (199): 233-38.
- Hanna R, Trejo P, Weltman RL. Treatment of intra-bony defects with bovine derived xenograft alone and in combination with platelet rich plasma: a randomized clinical trial. *J Periodontol* 2004; 75(12): 1668-77.
- Kasten P, Vogel J, Beyen I, Weiss S, Niemeyer P, Leo A, Luginbuhl L. Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: The specific surface area makes a difference. *J Biomater Appl* 2008; 23(2): 169-88.
- Leow JM, Clement ND, Tawonsawatruk T, Simpson CJ, Simpson AH. The radiographic union scale in tibial (RUST) fractures: Reliability of the outcome measure at an independent centre. *Bone Joint Res* 2016; 5(4): 116-21.
- Li NY, Chen LQ, Chen T, Jin XM, Yuan RT. Effect of platelet-rich plasma and latissimus dorsi myofascial with blood vessels on vascularization of tissue engineered bone in dogs. *West China Journal of Stomatology* 2007; 25(4): 408-11.
- Mair P, Wilcox R. Robust statistical methods in R using the WRS2 package. *Behav Res Methods* 2020; 52(2): 464-88.
- Malhotra A, Pelletier M, Oliver R, Christou C, Walsh WR. Platelet-rich plasma and bone defect healing. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(19-20): 2614-33.
- Marsh DR, Li G. The biology of fracture healing: Optimising outcome. *Br Med Bull* 1999; 55(4): 856-69.
- Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, Zhang N, Ueno M, Yao Z, Goodman SB. Modulation of the inflammatory response and bone healing. *Front Endocrinol* 2020; 11(11): 386.
- Miguel-Pastor L, Satue K, Chicharro D, Torres-Torrillas M, Romero AD, Pelaez P, Carrillo JM, Cuervo B, Sopena JJ, Ceron JJ, Rubio M. Evaluation of a standardized protocol for plasma rich in growth factors obtention in cats: A prospective study. *Front Vet Sci* 2022; 14(9): 866547.
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2016; 16(2): 213-32.
- Ozak A, Yardımcı C, Nisbet HO, Bayrak İK, Nisbet C. Evaluation of the effect of platelet-rich plasma (PRP) on enhancement of bone healing in diaphyseal bone defects by radiography and computed tomography. *Ank Univ Vet Fak Derg* 2010; 57(2): 77-82.
- Peerbooms JC, Colaris JW, Hakkert AA, Van Appeldorn M, Bruijn DJ, Den Ouden BLD, Gosens T. No positive bone healing after using platelet rich plasma in a skeletal defect. An observational prospective cohort study. *Int Orthop* 2012; 36(10): 2113-19.
- Reible B, Schmidmaier G, Moghaddam A, Westhauser F. Insulin-like growth factor-1 as a possible

- alternative to bone morphogenetic protein-7 to induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Int J Mol Sci* 2018; 19(6): 1674.
- Rodriguez IA, Growney Kalaf EA, Bowlin GL, Sell SA. Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 392398.
- Saqlain N, Mazher N, Fateen T, Siddique A. Comparison of single and double centrifugation methods for preparation of platelet-rich plasma (PRP). *Pak J Med Sci* 2023; 39(3): 634-37.
- Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Köttstorfer J, Kecht M, Aharinejad S. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) levels in human fracture healing. *Injury* 2011; 42(8): 833-37.
- Singh R, Rohilla R, Gawande J. To evaluate the role of platelet-rich plasma in healing of acute diaphyseal fractures of the femur. *Chinese J Traumatol* 2017; 20(1): 39-44.
- Thor AL, Hong J, Kjeller G, Sennerby L, Rasmusson L. Correlation of platelet growth factor release in jawbone defect repair-A study in the dog mandible. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013; 15(5): 759-68.
- Toyoda T, Isobe K, Tsujino T. Direct activation of platelets by addition of CaCl_2 leads to coagulation of platelet-rich plasma. *Int J Implant Dent* 2018; 4(1): 23.
- Van Lieshout EMM, Den Hartog D. Effect of platelet-rich plasma on fracture healing. *Injury* 2021; 52(2): 58-66.
- Voss K, Steffen F. Patient Assessment. Montavon PM, Voss K, Langley-Hobbs SJ. (eds.) *Feline Orthopaedic Surgery and Musculoskeletal Disease*. First Edition. London: Elsevier 2009; pp. 3-19.
- Yuan S, Wan ZH, Cheng SL, Michaelsson K, Larsson SC. Insulin-like growth factor-1, bone mineral density, and fracture: A Mendelian randomization study. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; 106(4): 1552-58.
- Xue D, Zhang W, Chen E, Gao X, Liu L, Ye C, Tan Y, Pan Z, Li H. Local delivery of HMGB1 in gelatin sponge scaffolds combined with mesenchymal stem cell sheets to accelerate fracture healing. *Oncotarget* 2017; 8(26): 42098-115.
- Zhang M, Yu W, Niibe K, Zhang W, Egusa H, Tang T, Jiang X. The effects of platelet-derived growth factor-BB on bone marrow stromal cell-mediated vascularized bone regeneration. *Stem Cells Int* 2018; 3272098.



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Research Article / Araştırma Makalesi
22(1), 45-50, 2025
DOI: 10.32707/ercivet.1587868

The Usefulness of the HASTE Sequence in the Diagnosis of Spinal Diseases in Dogs and Cats

Mehmet Nur ÇETİN^{1,a}, Yusuf Sinan ŞİRİN^{1,b}, Batuhan NEYSE^{2,c}

¹Mehmet Akif Ersoy University, Department of Surgery, Burdur-TÜRKİYE

²Istanbul University, Institute of Health Sciences Istanbul-TÜRKİYE

ORCID No: ^a0000-0003-2610-8477; ^b0000-0003-1322-7290; ^c0000-0001-6862-482X

Corresponding author: Mehmet Nur ÇETİN, E-mail: mncetin@mehmetakif.edu.tr

How to cite: Çetin MN, Şirin YS, Neyse B. The usefulness of the HASTE sequence in the diagnosis of spinal diseases in dogs and cats. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2025; 22(1):45-50

Abstract: Single-shot turbo spin-echo sequences are dense T2-weighted sequences that are well suited for evaluating the subarachnoid space. In T2-weighted fast spin-echo sequences routinely used in spinal magnetic resonance (MR) imaging, the subarachnoid space is poorly distinguished from the surrounding epidural fat, which may lead to the under detection of neurological disorders. We aimed to determine the utility of the Half-fourier single-shot turbo spin-echo (HASTE) sequence in the diagnosis of neurological disorders in dogs and cats and the agreement between the HASTE sequence and T2 sequences. The study included 17 patients (cats and dogs) with suspected neurological disorders and an indication for magnetic resonance imaging. One observer was initially asked to interpret T2-weighted images only and then T2-weighted and HASTE sequences together. The MR images were anonymized and no signal, history, or clinical information was provided. Without the HASTE sequence, the observer recognized 71% of the neurological disorders. With the addition of the HASTE sequence, the observer recognized 100% of the neurological disorders. After the addition of the HASTE sequence, the observer was able to make a more accurate diagnosis with a difference of 29%. In addition, according to the results obtained, a moderate to good diagnostic agreement was found between T2-weighted and T2-weighted + HASTE sequences. Without the HASTE sequence, the observer was able to localize 89% of the lesions. With the addition of the HASTE sequence, the observer was able to localize 100% of the lesions, the difference of 11% was not statistically significant ($P=0.15$). In conclusion, our study has shown that the acquisition of single-shot fast spin-echo sequences in addition to standard T2-weighted fast spin-echo sequences provides more accurate detection of neurological disorders and provides advantages in terms of localization of neurological disorders.

Keywords: Cat, dog, HASTE sequence, magnetic resonance imaging, neurological disorders

Kedi ve Köpeklerde Spinal Hastalıklarının Teşhisinde HASTE Sekansının Kullanılabilirliği

Öz: Tek atışlı turbo spin-eko dizileri, subaraknoid boşluğu değerlendirmek için oldukça uygun olan yoğun T2 ağırlıklı sekanslardır. Spinal manyetik rezonans (MR) görüntülemeye rutin olarak kullanılan T2 ağırlıklı hızlı spin-eko sekanslarında, subaraknoid boşluk çevredekı epidural yağdan yeterince ayırt edilemez ve bu durum nörolojik bozuklukların yeterince tespit edilememesine yol açabilir. Amacımız, köpeklerde ve kedilerde nörolojik bozuklukların tanısında yarım fourier tek atışlı turbo spin-eko (HASTE) sekansının kullanılabilirliğini ve HASTE sekansı ile T2 ağırlıklı sekans arasındaki uyumu belirlemektir. Çalışmaya nörolojik bozukluk şüphesi olan ve manyetik rezonans görüntüleme endikasyonu olan 17 hasta (kediler ve köpekler) dahil edildi. Bir gözlemciden başlangıçta yalnızca T2 ağırlıklı görüntüleri, sonrasında ise T2 ağırlıklı ve HASTE sekansı görüntülerini birlikte yorumlaması istenmiştir. MR görüntüleri anonimleştirildi ve hiçbir sinyal, geçmiş veya klinik bilgi sağlanmadı. HASTE sekansı olmadan gözlemci nörolojik bozuklukların %71'ini tanıdı. HASTE sekansının eklenmesiyle gözlemci nörolojik bozuklukların %100'ünü tanıdı. HASTE sekansının eklenmesinden sonra gözlemci %29'luk bir farkla daha doğru tanı koyabilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre, T2 ağırlıklı ve T2 ağırlıklı + HASTE sekanslar arasında orta ve iyi düzeyde bir tanısal uyum tespit edildi. HASTE sekansı olmadan gözlemci lezyonların %89'unu lokalize edebildi. HASTE sekansının eklenmesiyle gözlemci lezyonların %100'ünü lokalize edebildi, %11'lik fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P=0.15$). Sonuç olarak çalışmamız, standart T2 ağırlıklı hızlı spin-eko dizilerine ek olarak tek atımlı hızlı spin-eko dizilerinin elde edilmesinin spinal lezyonların daha doğru tespitini sağladığını ve spinal lezyonların lokalizasyonu açısından avantajlar sağladığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: HASTE sekansı, kedi, köpek, manyetik rezonans görüntüleme, nörolojik bozukluklar

Introduction

Magnetic resonance imaging (MRI) is regarded as the "gold standard" for spinal imaging in both humans

and veterinary patients due to the detailed tissue information it provides, and its greater safety compared to radiography, computed tomography, or myelography (Dennis, 2011). T2-weighted spin-echo sequences are commonly utilized for imaging the brain, spinal cord, and subarachnoid space (Pease et al.,

Geliş Tarihi/Submission Date : 19.11.2024
Kabul Tarihi/Accepted Date : 19.03.2025

2006). Ultra-fast heavily T2-weighted sequences, such as the HASTE sequence, were initially developed for cardiac and abdominal imaging (Burke et al., 2021). HASTE is a proprietary term used by Siemens Medical Solutions (Malvern®, PA, USA) (Seiler et al., 2012). This sequence is advantageous for neurological imaging in both humans and animals due to the high signal obtained from cerebrospinal fluid (CSF) in the subarachnoid space and ventricular system (Mankin et al., 2012; Pease et al., 2006). The HASTE sequence provides a high signal from the CSF without capturing signals from fat (Khan and Freeman, 2023), allowing the vertebral canal to be scanned for compressive lesions and enabling the identification of structural changes caused by cerebrospinal fluid (Pease et al., 2006).

This study aimed to investigate the usability of the HASTE sequence in the diagnosis of various neurological disorders in cats and dogs and to evaluate the agreement between the HASTE sequence and the T2 sequence.

Material and Methods

The experimental protocol was approved by the Animal Experiments Ethics Committee of Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine (protocol number: 1276/2024). The study involved 17 cats and dogs with suspected neurological disorders, for which magnetic resonance imaging (MRI) was warranted. Each patient underwent a thorough clinical and neurological evaluation, and lesion localization was determined following the neurological assessment. Recorded data included patient history, time to examination, trauma type, and neurological grade. Neurological grading was performed using the Modified Frankel Scale, which categorizes cases as follows: 0= paraplegia without deep pain sensation, 1= paraplegia without superficial pain sensation, 2= paraplegia with deep pain sensation intact, 3b= non-ambulatory paraparesis unable to bear weight on hind limbs without support, 3a= non-ambulatory paraparesis capable of bearing weight on hind limbs without support, 4= ambulatory paraparesis, 5= normal gait with paraspinal paresthesia (Griffin et al., 2009). Additionally, cases were classified based on onset as peracute (<1 hour), acute (1-24 hours), and chronic (>24 hours) according to Scott and McKee (1999).

All MRI examinations were conducted under general anesthesia. The patients were placed under general anesthesia with a combination of medetomidine (respectively, 0.08 ml/kg and 0.1 ml/kg, intramuscular (IM), Tomidin, Provet, Turkey) and ketamine (5 mg/kg, IM, Alfamin, Erse, Turkey). The effect of medetomidine was then reversed with atipamezole (100 µg/kg IM, Reversal, Provet, Turkey) at the end of MRI. Imaging was performed with a 1.5 T MRI scanner (MAGNETOM-Avanto, Siemens) with patients

positioned prone. Based on neurological examination findings, lesion areas were localized, and T2-weighted sagittal and transverse, as well as dorsal and sagittal HASTE sequences, were acquired from the specified regions. Imaging parameters varied according to patient size (T2-weighted sequence: TR= 900-3970 ms, TE= 76-130 ms, slice thickness= 2.5-3.5 mm; HASTE sequence: TR= 8000 ms, TE= 341-346 ms, slice thickness=0.8-1.0 mm). An experienced veterinary surgeon reviewed all MRIs using a standard DICOM viewer (MicroDicom viewer).

The MR images were anonymized, and the observer was blinded to the animal's signalment, history, clinical findings, final diagnosis, and study objective. However, the observer was informed that a spinal lesion was anticipated. They were instructed to analyse the images, identify any important lesions, and make a diagnosis based on the findings. Initially, the observer was shown only transverse and sagittal images from the T2-weighted sequence. Afterward, T2-weighted and HASTE images were provided together for re-evaluation. The observer was also asked to rate their diagnostic confidence on a scale of 1-3 (1= sure, 2= somewhat sure, 3= not sure) (Seiler et al., 2012).

Statistical Analysis

The statistical analyses were conducted using the IBM SPSS Statistics 27 software package. A significance threshold of $P < 0.05$ was applied. Categorical variables were represented as "n, %n." Agreement between sequences used in magnetic resonance imaging was evaluated using Cohen's Kappa test. Wilcoxon Signed Rank test was used to determine whether the difference between the two sequences was significant in terms of lesion localization.

Results

The study included a total of 8 dogs and 9 cats. The dog breeds were as follows: French Bulldog (n=1), Pincher (n=1), Terrier (n=2), and, Mixed breed (n=4). The cat breeds were Mixed (n=7) and Scottish Fold (n=2). Among the dogs, there were 4 males (50%) and 4 females (50%), while the cats consisted of 4 males (45%) and 5 females (55%). The median age of the dogs was 5.7 years, with a range from 2 to 13 years, and for cats, it was 5.3 years, ranging from 2 to 10 years.

The clinical severity scores for dogs were: grade 0 (n=2), grade 1 (n=1), grade 2 (n=4), and grade 4 (n=1). For cats, the scores were: grade 0 (n=4), grade 1 (n=1), grade 2 (n=3), and grade 4 (n=1). Time to examination was classified as acute (n=2) and chronic (n=6) for dogs, and acute (n=3) and chronic (n=6) for cats (Table 1).

Table 1. Signalement, examination, and neurological findings

Case	Breed, gender, age	Patient history	Duration	Neurological examination findings	Neurological grading	Diagnosis
1	Dog, mixed, male, 4 y	Non-ambulation	Acute	Paraplegia, deep pain sensation present, UMN findings present	2	IVDH
2	Dog, pincher, female, 2 y	Seizures	Chronic	Tetraparesia, generalized pain, decreased corneal reflex, phantom scratching	4	Chiari-like malformation
3	Dog, mixed, male, 2 y	Non-ambulation	Acute	Paraplegia, deep pain sensation present, UMN findings present	2	IVDH
4	Dog, french bulldog, male, 5.5 y	Non-ambulation	Chronic	Paraplegia, deep pain sensation is not present, LMN findings present	0	IVDH
5	Dog, mixed, female, 6 y	Non-ambulation	Chronic	Paraplegia, deep pain sensation present, LMN findings present	1	IVDH
6	Dog, Terrier, female, 10 y	Weakness in walking	Chronic	Tetraparesia, generalized pain, phantom scratching	2	Syringomyelia
7	Dog, Terrier, male, 13 y	Non-ambulation	Chronic	Paraplegia, deep pain sensation present, LMN findings present	2	Arachnoid cyst
8	Dog, mixed, female, 3 y	Non-ambulation	Chronic	Paraplegia, deep pain sensation is not present, LMN findings present	0	IVDH
9	Cat, mixed, female, 2 y	Non-ambulation	Acute	Paraplegia, deep pain sensation present, UMN findings present	2	Vertebral fracture
10	Cat, Scottish fold, male, 2 y	Non-ambulation	Chronic	Tetraparesia, deep pain sensation present	4	IVDH
11	Cat, mixed, female, 3 y	Non-ambulation	Acute	Paraplegia, deep pain sensation present, LMN findings present	2	Vertebral fracture
12	Cat, Scottish fold, female, 4 y	Non-ambulation	Acute	Paraplegia, deep pain sensation is not present, UMN findings present	0	Vertebral fracture
13	Cat, mixed, male, 5.7 y	Non-ambulation	Chronic	Paraplegia, deep pain sensation is not present, UMN findings present	0	Vertebral fracture
14	Cat, mixed, female, 6 y	Non-ambulation	Chronic	Paraplegia, deep pain sensation present, LMN findings present	2	IVDH
15	Cat, mixed, male, 7 y	Non-ambulation	Chronic	Paraplegia, deep pain sensation is not present, LMN findings present	0	Vertebral Fracture
16	Cat, mixed, male, 8 y	Non-ambulation	Chronic	Paraplegia, deep pain sensation is not present, UMN findings present	0	Vertebral Fracture
17	Cat, mixed, female, 10 y	Non-ambulation	Chronic	Paraplegia, deep pain sensation present, UMN findings present	1	Vertebral Fracture

y year, UMN Upper motor neuron, LMN Lower motor neuron, IVDH Intervertebral disc herniation

Table 2. Diagnostic percentages of T2-weighted sequences and T2-weighted + HASTE sequences

Method	Diagnosis			Total number of cases	Accuracy (%)
	Sure	Somewhat sure	Not sure		
T2-weighted	12	2	3	17	71%
T2 weighted+HASTE	17	0	0	17	100%

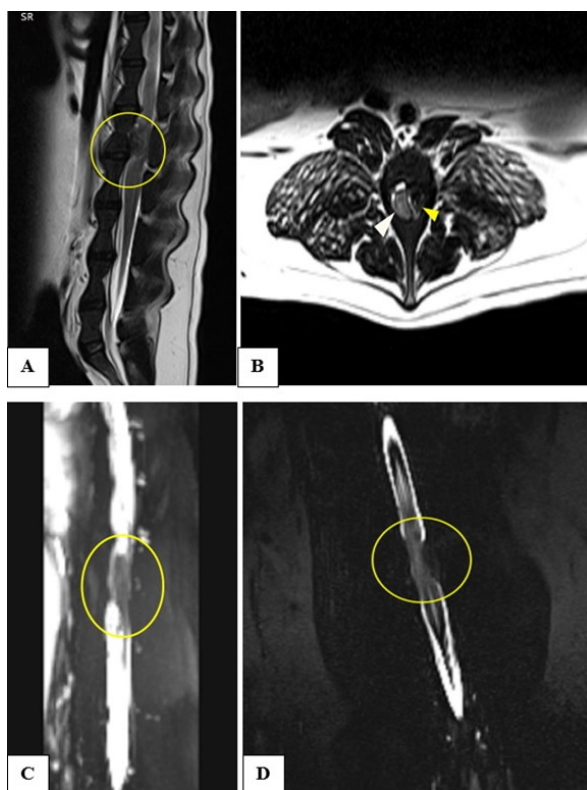


Figure 1. Sagittal and transverse T2-weighted, sagittal, and dorsal HASTE sequence images obtained in a dog. A) Extruded disc material on sagittal T2-weighted image at the lumbar 3-4 vertebrae level (yellow circle). B) Extruded disc material (yellow arrowhead) and spinal cord (white arrowhead) on transverse T2-weighted image. C) Attenuated cerebrospinal cord image on sagittal HASTE sequence imaging (yellow circle). D) Attenuated cerebrospinal cord image on dorsal HASTE sequence imaging (yellow circle).c

In the initial review of sagittal and transverse T2-weighted images, the observer was sure (score: 1) of the diagnosis in 12 cases (71%), somewhat sure (score: 2) in 2 cases (12%), and not sure (score: 3) in 3 cases (17%). After reviewing both T2-weighted images along with dorsal and sagittal HASTE images, the observer was sure of the diagnosis across all cases (100%) (Table 2). In three cases out of 17, the initial diagnosis (edema) was revised to another diagnosis (intervertebral disc herniation (IVDH), fracture, or combined fracture) upon review of the combined sequences. In two initially ambiguous cases (arachnoid cyst/syringomyelia and IVDH/fracture), a definitive diagnosis (syringomyelia and fracture) was

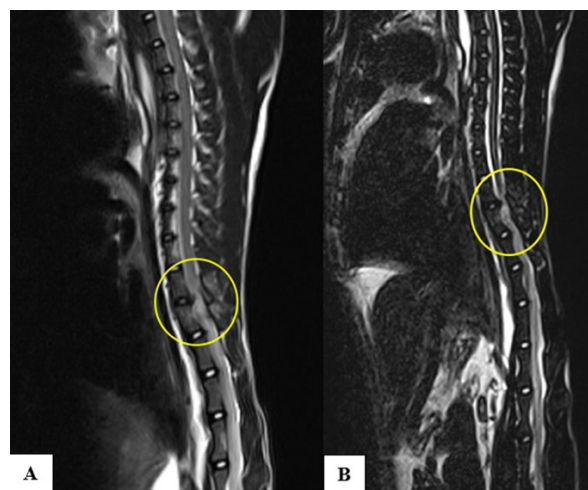


Figure 2. Sagittal T2-weighted and sagittal HASTE sequence images obtained in a cat. A) Fracture and spinal cord compression at thoracic 10-11 vertebral level on sagittal T2-weighted imaging (yellow circle). B) Fracture and spinal cord compression at thoracic 10-11 vertebral level on sagittal HASTE sequence imaging (yellow circle).

established. After the addition of the HASTE sequence, the observer was able to make a more accurate diagnosis with a difference of 29%. In addition, according to the results obtained, Cohen's Kappa coefficient for the diagnostic agreement of T2 weighted and T2 weighted+HASTE sequences was calculated as 0.61. According to the classification accepted in the literature, a Kappa value of 0.61 indicates moderate to good agreement. In the end, the diagnoses included IVDH (n=7), fracture (n=7), Chiari-like malformation (n=1), syringomyelia (n=1), and arachnoid cyst (n=1), all later confirmed surgically. (Figure 1) (Figure 2).

In the initial examination of T2-weighted sagittal and transverse images, the observer successfully identified the lesion location in 15 cases (89%), with 2 cases (11%) where localization was unsuccessful. The two cases with non-localized lesions involved multiple IVDH (lumbar 5-6/thoracic 13-1 in one case and cervical 2-3/cervical 5-6 in the other). Upon evaluating T2-weighted and dorsal and sagittal HASTE images together, the observer was able to pinpoint the lesions with maximum CSF compression (thoracic 13-1 and cervical 5-6) in both cases. The resulting 11% difference after adding the HASTE sequence was statistically non-significant ($P=0.15$).

Discussion and Conclusion

In studies on HASTE sequence in dogs, it was found that there was CSF attenuation due to compressive lesions in disc herniations (Mankin et al., 2012; Pease et al., 2006), and in a study on arachnoid diverticulum, it was found that there was enlargement of the subarachnoid region (Seiler et al., 2012). In our study, CSF attenuation was detected similar to the studies conducted in disc herniations. In addition, unlike other studies, Chiari-like malformation, syringomyelia, and arachnoid cyst cases were diagnosed with enlargement of the subarachnoid region and increased CSF hyperintensity, similar to the study on arachnoid diverticulum. In vertebral fracture cases, swelling in the subarachnoid region and increased CSF hyperintensity were present after CSF attenuation in the compressed area.

In a study assessing the role of HASTE sequences in detecting arachnoid diverticula in dogs, only 25% of these diverticula were identified without using HASTE sequences. However, the inclusion of the HASTE sequence raised the detection rate of arachnoid diverticula to 52.8%. The 27.8% improvement in detection with the addition of HASTE was statistically significant (Seiler et al., 2012). In the current study, the HASTE sequence was combined with the T2-weighted sequence for identifying spinal lesions, resulting in a 29% increase in accurate diagnoses. Integration of the HASTE sequence with other imaging protocols for diagnostic evaluation improved diagnostic accuracy and suggests that the use of this sequence is a useful improvement to MRI protocols for the diagnosis of neurological disorders in cats and dogs.

When multiple disc herniations with varying levels of spinal cord compression are present, identifying the most clinically relevant lesion can be challenging. In the HASTE sequence, a compressive (surgical) lesion is recognized based on the extent of subarachnoid space narrowing, similar to the diagnostic approach used for extradural lesions in myelography. Given that the HASTE sequence enhances visualization of subarachnoid space alterations more effectively than conventional T2-weighted sequences, our findings suggest it may be more effective for detecting clinically important compressive lesions indicated by focal narrowing of the subarachnoid space when included in a standard spinal MR imaging protocol (Mankin et al., 2012). In our study, we examined the degree of subarachnoid space compression in multifocal disc herniation cases and the spinal region with the highest CSF attenuation was the region with the most compressive disc herniation. Accordingly, we believe that the addition of HASTE sequence to the imaging protocol in cases of indeterminate disc herniation will be very important in guiding clinical decisions.

To accurately identify the anatomical location of a compressive lesion, the HASTE sequence should be compared with another sequence that enables precise vertebral body numbering (Mankin et al., 2012; Pease et al., 2006). The HASTE sequence alone does not allow for detailed identification of anatomical structures and primarily excels at visualizing the subarachnoid space. Therefore, in studies assessing the effectiveness of the HASTE sequence for accurate localization, it has been evaluated alongside T2-weighted images, and it is recommended that it be used in conjunction with other imaging protocols to determine the lesion's anatomical position.

Canine patients undergoing MRI are under general anesthesia, which eliminates any issues with movement or claustrophobia. However, a complete MRI evaluation of the spine can be lengthy and can take from 45 minutes to an hour, depending on the magnet strength and sequences obtained. As the strength of the magnet decreases, the time required to acquire a single sequence can double, further increasing the time required to complete an entire study (Pease et al., 2006). There are additional benefits to routinely using the HASTE sequence for spinal imaging when combined with other sequences, such as T2-weighted images, that provide greater morphologic detail. The HASTE sequence is acquired in approximately 5 seconds; therefore, the addition of this sequence does not compromise patient safety or efficiency by increasing the duration of anesthesia. Other imaging techniques, such as T2-weighted imaging with fat suppression, that focus on the CSF and provide higher resolution take significantly longer to acquire. While fat suppression techniques may enhance the detection of subarachnoid space lesions (Seiler et al., 2012), the HASTE sequence can be completed in seconds and is helpful in rapidly identifying compressive or spinal regions (Gallach et al., 2011). At our institution, we first obtain the HASTE sequence to localize the lesion in patients with poor general conditions who cannot remain under anesthesia for long periods. This reduces the duration of anesthesia and provides additional benefits to the neurologic examination by aiding in lesion localization.

In conclusion, our study demonstrates that the use of single-shot fast spin-echo sequences in combination with standard T2-weighted fast spin-echo sequences increases the accuracy of detecting neurological disorders and provides advantages for precise lesion localization. Therefore, we recommend routine inclusion of this sequence in spinal MRI protocols when applicable.

Acknowledgment

-

Financial Support

There was no funding from any organization to conduct this research.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest to be declared by the authors.

Author Contributions

MNÇ, YSS, and BN took part in the study planning and sample collection. The writing of the study and final checks were carried out with the contributions of all authors.

Ethical Statement

The experimental protocol was approved by the Animal Experiments Ethics Committee of Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine (protocol number: 1276/2024).

References

- Burke CJ, Samim M, Alizai H, Sanchez J, Kingsbury D, Babb JS, Walter WR. Clinical feasibility of 2D dynamic sagittal HASTE flexion-extension imaging of the cervical spine for the assessment of spondylolisthesis and cervical cord impingement. *Eur J Radiol* 2021; 134(1): 109447.
- Dennis R. Optimal magnetic resonance imaging of the spine. *Vet Radiol Ultrasound* 2011; 52(1): 72-80.
- Gallach RG, Suran J, Cáceres AV, Reetz JA, Brown DC, Mai W. Reliability of T2-weighted sagittal magnetic resonance images for determining the location of compressive disc herniation in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2011; 52(5): 479-86.
- Griffin JF, Levine JM, Kerwin SC. Canine thoracolumbar intervertebral disk disease: pathophysiology, neurologic examination, and emergency medical therapy. *Compend Contin Educ Vet* 2009; 31(3): 1-13.
- Khan S, Freeman P. HASTE MRI sequence findings correlate with loss of deep pain perception in dogs with thoracolumbar disc extrusion. *Vet Med Sci* 2023; 9(2): 604-8.
- Mankin JM, Hecht S, Thomas WB. Agreement between T2 and HASTE sequences in the evaluation of thoracolumbar intervertebral disc disease in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2012; 53(2): 162-6.
- Pease A, Sullivan S, Olby N. Value of a single-shot turbo spinecho pulse sequence for assessing the architecture of the subarachnoid space and the constitutive nature of cerebrospinal fluid. *Vet Radiol Ultrasound* 2006; 47(3): 254-9.
- Scott HW, Mckee WM. Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. *J Small Anim Pract* 1999; 40(9): 417-22.
- Seiler GS, Robertson ID, Mai W, Widmer WR, Suran J, Nemanic S, Lamb CR, Lang J, Johnson JL, Thrall DE. Usefulness of a half-fourier acquisition single-shot turbo spinecho pulse sequence in identifying arachnoid diverticula in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2012; 53(2): 157-61.



Kedi ve Köpek Dermatolojisinde Kriyoterapi Uygulamaları

Said CAFER^{1,a}, Remzi GÖNÜL^{1,b}, Mehmet Erman OR^{1,c}

¹Istanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul-TÜRKİYE
ORCID: ^a0009-0002-4470-9890; ^b0000-0001-9425-0964; ^c0000-0002-8764-1956

Sorumlu yazar: Mehmet Erman OR; E-posta: ermanor@iuc.edu.tr

Atıf yapmak için: Cafer S, Gönül S, Or ME. Kedi ve köpek dermatolojisinde kriyoterapi uygulamaları. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2025; 22(1):51-57

Öz: Kriyoterapi hızlı dondurma ve yavaş çözündürme prensibiyle çalışan, çevre dokulara minimum hasar verirken hedef doku parçasının dondurularak yok edilmesini sağlayan minimal invazif terapötik bir prosedürdür. Tüm vücut kriyoterapisi, buz uygulamaları, kriyojen madde türleri içeren kriyocerrahi uygulamaları gibi birçok çeşitten oluşur. Genellikle dermatolojide, lezyon tedavilerinde kullanılır ancak kullanım alanları sadece bununla sınırlı değildir ve beyin gibi ulaşılması zor dokularda da kullanımı raporlanmıştır. Temel prensibi olan ısı difüzyonu, bir kriyonekroz alan yaratır ve lezyondaki hücrelerin yıkımını sağlar. Bunun için üretilmiş olan veteriner kriyocerrahi ünitelerinde, genellikle, sıvı nitrojen ve nitroz oksit kullanılır. Doku boyutuna ve sitolojisine göre birkaç seans sonrasında, doku alanında tamamen iyileşmeler görülür. Günümüzde, ayakta tedavi olanakları, minimal anestezi süreleri ve düşük komplikasyon riskleri sayesinde özellikle yaşlı veya kalp yönünden riskli hayvanların kitle tedavilerinde umut ışığı olmaktadır. Bu derlemede, kriyoterapinin kedi ve köpek dermatolojisindeki kullanımının incelenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Dermatoloji, kriyoterapi, neoplazi

Cryotherapy Applications in Cat and Dog Dermatology

Abstract: Cryotherapy is a minimally invasive therapeutic procedure that works on the principle of rapid freezing and slow thawing, allowing the target tissue to be destroyed by freezing while causing minimal damage to surrounding tissues. It consists of many types such as whole body cryotherapy, ice applications, and cryosurgery applications containing cryogenic substance types. It is generally used in dermatology and lesion treatments, but its areas of use are not limited to this and its use has also been reported in hard-to-reach tissues such as the brain. Its basic principle, heat diffusion, creates a cryonecrosis field and ensures the destruction of cells in the lesion. In veterinary cryosurgery units produced for this purpose, liquid nitrogen and nitrous oxide are generally used. Depending on the tissue size and cytology, complete recovery is observed in the tissue area after a few sessions. Today, thanks to outpatient treatment opportunities, minimal anesthesia times and low complication risks, it is a ray of hope in the mass treatment of especially elderly or heart-risk animals. This review aims to examine the use of cryotherapy in cat and dog dermatology.

Keywords: Cryotherapy, dermatology, neoplasia

Giriş

Kriyoterapi, Yunanca donmuş anlamına gelen “Kryos” ve tedavi anlamına gelen “Terapi” kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulan, yara ve iltihapların tedavisinde antik çağlardan beri kullanılan terapötik bir yöntemdir (Tarım ve ark., 2000; Verebová ve Staničová, 2022). Kriyoterapi çevre dokulara minimum hasar verirken hedef doku parçasının dondurularak yok edilmesini sağlayan minimal invazif terapötik bir prosedürdür ve tüm vücut kriyoterapisi, buz uygulamaları, kriyojen madde türleri içeren kriyoterapi gibi birçok çeşitten oluşur (Richman ve ark., 2017). Tarih kayıtlarında ilk olarak M.Ö. 3000’de antik Mısır toplumunda, yaralanmaların ve enflamasyonların tedavisi için soğuk kompres uygulamaları yer almaktadır. Daha sonraki kayıtlarda Hipokrat’ın Antik Yunan topraklarında kriyoterapi uygulamasını önerdiği görülmüştür. Malign

hastalıkta kullanımı ise ilk olarak 19. yüzyılda bildirilmiştir (Nayeema ve Subha, 2013). Yirminci yüzyılın başlarına gelindiğinde cilt lezyonlarının tedavisinde sıvı karbondioksit uygulamalarına başlanmıştır (Verebová ve Staničová, 2022). Uzun bir süre kullanımda kalan sıvı karbondioksit kullanımı daha sonra, hazırlanışının, bulunmasının kolaylığı ve daha fazla soğutması gibi avantajlarından dolayı, sıvı azotun ve nitroz oksitin kriyojen olarak kullanımları yaygınlaşmıştır (Tarım ve ark., 2000).

Prosedür esasında hedef dokuların kısa sürede dondurulması ve ardından çözülmesi suretiyle hedef dokudaki hücre ölümünü sağlamaya dayanmaktadır (Angileri ve ark., 2020). Bu amaçla dokunun sıcaklığından daha düşük kriyojen uygulaması, dokudan ısı çekilmesine sebep olur (Barış ve Türkyılmaz, 2023). Hedef dokunun sıcaklıkları nitroz oksit ile -70°C’ye ulaşabilirken sıvı nitrojen uygulamalarında -185°C’ye ulaşabilmektedir (Miller ve ark., 2013). Isı transferi ve sonrasındaki yavaş çözünme işlemleri sonucunda

hedef dokunun hücreleri hasar görür ve nekroze olur (Verebová ve Staničová, 2022).

Genellikle iyi huylu kutanöz neoplazmalar veya neoplastik olmayan dokuları yok etmek için yaygın olarak kullanılan kriyoterapi; enflamasyonlarda, insan tıbbındaki ağrı tedavisinde, rehabilitasyonlarda, yaralanmalarda ayrıca yorucu aktiviteler sonrası ağrıyı hafifletmek gibi birçok terapötik alanda kullanılmaktadır (Chesterton ve ark., 2002; Prado ve ark., 2017; Woo ve ark., 2022). Günümüzde, özellikle insan tıbbında, kriyoterapinin uygulanma alanları sadece dermatolojiyle sınırlı kalmamakla beraber kalp cerrahisi, nörocerrahi ve jinekoloji gibi tıbbın çok farklı alanlarında da kullanılmaktadır (Tarım ve ark., 2000). Veteriner tıbbında yaygın olarak tümörlerin (deri ve deri altı) tedavisinde kullanılmakta ve teknolojinin ilerlemesiyle beraber kullanım alanları da genişlemektedir (Ma ve ark., 2021).

Kriyoterapi, veteriner tıpta giderek daha popüler hale gelmektedir; çünkü kedi ve köpekte ayakta tedavi yapılabilmesi, minimal anestezi süreleri, düşük komplikasyon riski ve lazer terapisi, ultrason gibi çeşitli uygulamalardan çok daha kolay öğrenilebilir olması gibi temel avantajlar sunmaktadır (Sharp, 2012). Bunun yanı sıra kriyoterapi sonucu doku nekrozu 2-3 haftalık kozmetik olarak istenmeyen görüntülere veya hayati yapıların (sinirler, kan damarları gibi) hasarlarına sebep olabilir (Scott ve Miller, 2011). Yanlış koşullar altında uygulama yapılması veya tecrübeye dayalı uygulama gerektirmesi kriyoterapi sonucunda çeşitli komplikasyonlarla karşı karşıya kalınmasına neden olduğundan kriyoterapi uygulamalarının tercih edilmediği durumlar söz konusu olabilmektedir (Miller ve ark., 2013). Slovakya'da yapılan bir araştırmada veteriner hekimlerin kriyoterapi yöntemlerini kullanmadıkları veya çok sınırlı sayıda hastada kullandıkları raporlanmıştır (Verebová ve Staničová, 2022).

Bu makalede kriyojen içerikli kriyoterapinin kedi ve köpek dermatolojisi pratiğinde uygulama alanları hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Temel Prensipleri

Deri üzerine uygulanan kriyoterapi, ısı çıkarım işlemi ile derideki ve bir miktar deri altındaki dokuların sıcaklıklarını düşürür. Donan ve ardından çözülen hücreler yıkıma uğrar ve bu sayede benign ve malign lezyonları yok etmede kullanılır (Fesseha ve Yılma, 2020). Kullanım kolaylıkları ve maliyetleri bakımından daha ucuz buz kasetlerinden, nispeten daha pahalı kriyoterapi cihazlarına kadar uzanan farklı uygulama modaliteleri mevcuttur. Bu çeşitlilik kullanım alanlarını ve tedavi prensiplerini de değiştirmektedir (Chesterton ve ark., 2002).

Kriyoterapi işlemine başlanmadan önce hedef doku bölgesinin topografik bir planı oluşturulur. Bu plan, lezyon dışındaki bölgelerin soğuktan etkilenerek yapı-

larının bozulmaması için önemlidir. Daha sonra hedef dokunun kenarlarına termoelektrik termometre olarak bilinen termokupllar yerleştirilir. Termokupllar dijital bir termometre görevi görerek ve hedef bölge dışındaki alanların sıcaklıklarını ölçer, istenmeyen sıcaklık değişimlerine karşı kriyoterapi operatörünü bilgilendirir (Knottenbelt ve ark., 2009). Daha sonra kriyojen madde, dokuyu dondurarak, bölgedeki lezyonları minimum acıyla yok eder. Doku nekrozunun yanı sıra, antijenitenin artması ile birtakım yararlı immüno-lojik yanıtların görülmesi, lezyonun yok edilmesinde olumlu sonuçlar doğurur (Miller ve ark., 2013).

Kriyoterapi cihazları, gazların genleşme prensiplerini kullanırlar. Bu prensipler, Joule-Thomson etkisi (Joule-Kelvin etkisi veya Kelvin-Joule etkisi) olarak bilinir. Bir kriyojen madde, sonda veya sprey aracılığıyla, dar bir tüp içerisinden kriyoterapi cihazının ucuna doğru ilerler ve burada hızla genleşerek çok düşük sıcaklıklara ulaşır. Bu sayede dokuya doğru hedeflenen prob, doku üzerinden ısı çeker ve dokunun soğumasını sağlar (Ferris ve Ho, 1992). Probun temas ettiği ve çok düşük sıcaklıklara ulaşan doku alanına "buz topu" veya "buz kristali", donmuş doku hacmine ise "ölümcül bölge" denir. Genellikle ölümcül bölgeler, -20°C sıcaklıktadırlar (Ferris ve Ho, 1992).

Hücre dışındaki donmuş alan, hücre içerisinde su kaybına, elektrolit konsantrasyonunun ve pH'nın değişmesine sebep olur (Fesseha ve Yılma, 2020). Bu sayede %70'i su olan hücre içinde buz kristalleri oluşur ve ozmotik basınç çok hızlı bir şekilde artar. Buna bağlı olarak fosfolipid zarlar hasar alır ve hücre içerisindeki maddelerin kaybına sebep olur (Knottenbelt ve ark., 2009). Hücre içi ve dışındaki, anormal su ve elektrolit konsantrasyonları toksik seviyelere ulaşır (Verebová ve Staničová, 2022). Hücre, iyon geçiş yeteneğini kaybeder, bax protein ekspresyonu artar ve kaspaz aktivasyonu ile birlikte apoptoza girer. Apoptoza, mitokondriyal hasar da katkıda bulunur (Gage ve ark., 2009).

Kriyoterapi uygulamasının hücre dışı etkilerinden biri ise vasküler değişikliklerdir. Yüzeye yakın kılcal damarlar vazomotor (vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon) aktiviteler ile cilt sıcaklığını düzenlerler. Cilt yüzeyindeki ısı kaybı kılcal kan damarlarının daralmasına sebep olur. Bölgede ısı kaybeden kan, hipotalamusu uyarak vazokonstriksiyonun kalıcılığını sağlar (Olson ve Stravino, 1972). Vazokonstriksiyon ile yavaşlayan dolaşım (staz), interstisyel ödeme sebep olan hücre zarı hasarları ve endotelial hasarlar, damarlarda, trombüs oluşumunu sağlar. Bu trombüs çeşidine kriyotromboz ismi verilir ve kriyoterapi uygulamalarından birkaç saat ile 48 saat içerisinde ortaya çıkar (Verebová ve Staničová, 2022). Kriyotromboz oluşumundan sonra dokular kandan mahrum kalır ve iskemik gerçekleşir. Buna bağlı olarak dokuda bir nekroz alanı oluşur. Bu bölgeye "kriyonekroz alan" denir. Vaskülerite, kriyonekrozun cilde olan etkileriyle pozitif

bir korelasyon gösterir. Örneğin, kornea gibi damardan yoksun dokular, kriyoterapiye olumlu yanıt vermezler (Fesseha ve Yılma, 2020).

Lezyonun yok edilmesindeki temel prensip, hızlı dondurma ve yavaş (kendiliğinden) çözülmedir. Isı difüzyonu, dokunun nemine, temas derecesine, dondurma süresine ve doku ile prob arasındaki sıcaklık farkına bağlıdır (Ferris ve Ho, 1992). -70°C (nitroz oksit) ve -185°C (sıvı nitrojen) sıcaklıklara ulaşan probun ucu ile, doku kitlesi -20°C (minimum ulaşılması gereken sıcaklık) ile -30°C 'nin altına soğutulabilir. Bu dondurma işlemi üç döngüde tekrarlanarak maksimum hücre hasarına ulaşılır. Dondurma sonrasında doku kendiliğinden çözünmeye bırakılır (Miller ve ark., 2013). İşlemden sonraki 12-24 saat içerisinde kriyoterapi uygulanan bölge şişer. Beş gün sonra enflamasyon ve ödem bölgeleri makroskopik olarak görünür hale gelir. Bölge 10-21 gün içerisinde nekrotik hale gelir ve granülasyon dokusu oluşur. Daha sonraki günlerde skar doku dökülür ve iyileşme görülür (Knottenbelt ve ark., 2009). Nekrotik alanın hızlı iyileşmesi için enzimatik tedaviler uygulanabilir veya granülasyon dokusuna masaj yapılabilir. Bu sebeple hayvanların yara bölgelerini yalamaları bu granülasyon dokusunun iyileşmesini hızlandırır (Verebová ve Staničová, 2022). Bu işlemler esnasında fibroblastların kolajen üretimleri azalır. Pigmentasyonu sağlayan melanoistler -5°C 'de yıkımlandıkları için renk değişimleri gözlemlenebilir (Fesseha ve Yılma, 2020). Bölgedeki tüy kaybı ve pembeleşme geri döndürülemez. Tedavi bölgesinin yanındaki (dondurulmayan alandaki) tüylerde beyazlaşma dahi rapor edilmiştir (Knottenbelt ve ark., 2009).

İstenilen etkinin oluşması için tecrübeli ve bilgili bir kriyoterapi uygulayıcısına ihtiyaç vardır. Bu şekilde, uygun dondurma hızı, dondurma ve çözündürme döngüsü sayısı, son sıcaklık (minimum -20°C) ve çözülme hızı gibi parametreler kontrol altında tutulabilir. Her bir parametre, kriyoterapinin başarısı için hayati öneme sahiptir. Kısa süreli dondurma işlemi, dokunun yüzeyini dondurmaya başarsa da cildin altında kalan ve görünmeyen kısımlarını yok edemez. Uzun süreli uygulamalar ise derin yapılara zarar verir. Dondurma işleminin dikkatli bir şekilde yapılabilmesi için operatörün, termokupllardan yararlanması gerekir. Dondurma ve çözündürme döngüleri en az iki kez tekrarlanmalıdır ve optimal uygulamalarda üç kez tekrar yapılır. Bu sayede hedef dokuda yok edilmeyen hücre kalmaz. İkinci ve üçüncü dondurmalar bölgedeki dolaşım ağına zarar verilmemesi için daha kısa süreli uygulanmalıdır. Çözündürme işlemi ise kendiliğinden ve dondurma işlemine göre 2-3 kat daha yavaş gerçekleşir (Miller ve ark., 2013).

Tüm terapi neredeyse ağrısızdır. Düşük sıcaklıklar, kan akışını azaltarak lezyon bölgesindeki ödem oluşma riskini en aza indirirler. Sinir iletim hızı yavaşlar ve lokal analjezi oluşur. Tedavi esnasında önlem amaçlı lokal anestezi veya lezyonun boyutuna göre

genel anestezi kullanılabilir. Büyük lezyonlar küçük parçalara ayrılabilir ve her birine ayrı kriyoterapi işlemi uygulanabilir. İşlemin komplikasyon riski çok azdır ve işlem tekrarlanabilir (Verebová ve Staničová, 2022).

Uygulama Teknikleri ve Kriyoterapi Üniteleri

Kriyojen madde, cilt yüzeyine, sprey, kriyoprob, aplikatör tekniği ve termo-bağlayıcı yöntemlerle uygulanır. Kriyocerrahi üniteleri, kriyo tabancası ve ona bağlı bir uç, basınç regülatörü, gaz basınç göstergesi ve gaz silindirinden oluşmaktadır. Bunlara ek olarak, uygulamalarda, termokupllardan da yararlanır. Kriyoterapi ünitelerinin uçları sprey veya prob olabilir. Sprey uçlar püskürtme metodu ile çalışırlar. Yüzey alanı daha küçük hedeflerde ise kriyoprob kullanılır (Fesseha ve Yılma, 2020).

Problar, tek bağlantıları olan, kriyo tabancalarına bağlıdır. Gümüş, bakır veya altın gibi yüksek termal iletken maddelerden üretilirler ve direkt olarak lezyona hedeflenirler. Özellikle skar dokuların tedavilerinde kullanılır (Karakuzu ve Tatlı, 2018; Fesseha ve Yılma, 2020). Bu uçlar tedavi edilecek bölgeye veya canlıya göre farklı boyut ve şekillerde (yuvarlak, düz, kavisli, sivri) piyasada bulunmaktadır (Miller ve ark., 2013). Bazı kriyoterapi ünitelerinin problemlerinde, temassız sıcaklık ölçümü sağlayan, pirometreler bulunur (Ferris ve Ho, 1992). Problemler uygulamalarda kriyojen olarak sıvı nitrojen veya nitroz oksit seçilir ve küçük cilt lezyonlarının tedavisinde kullanılır. Aynı zamanda vasküler lezyonların tedavilerinde de kullanılabilir. Problemler, içi boş ve katı olmak üzere ikiye ayrılır. Sıvı prob içerisinden dolaştırılarak uç tarafından yüksek basınç altında çıkan türe içi boş; sıvı kriyojen ile dondurma işlemi yapılabilenler ise katı problemler olarak sınıflandırılır. Donmanın en kolay kontrol edilebileceği prob türü içi boş olanlardır fakat donma hızı katı problemlere göre yavaştır. İçi boş problemler penetrasyonlu veya temaslı dondurma işlemi yapılabilir. Kriyoprob, her bir uygulama sonrası dezenfekte edilmelidir (Fesseha ve Yılma, 2020).

Sprey tekniğinde, basınçlı püskürtme tabancaları kullanılır (Şekil 1). Açık veya kapalı olarak uygulanır. Açık teknikte sprey uzaktan, dik bir açıyla sıkılır. Genellikle düzgün olmayan cilt yüzeylerinde tercih edilir. Kapalı teknikte ise huni benzeri bir aparat kullanılır. Kriyojen madde püskürtme metodu ile bu huniden cilde aktarılır. Kapalı teknik, küçük lezyonlarda kullanılır (Karakuzu ve Tatlı, 2018). Kriyojen, kriyoprob gibi tek yüzeye etki etmez ve bir miktar yayılır. Genellikle, sıvı nitrojen seçilen kriyojen madde cilde temas eder ve cildin sıcaklığıyla beraber kaynar, daha sonra buharlaşarak gaz fazına geçer. Bu buhar cilt yüzeyinden ısı çekerek lezyonu dondurur (Fesseha ve Yılma, 2020). Kriyojen seçimine göre buhar ve sıvı karışım oranları, %15-55 buhar oranından, %45-85 sıvı oranına kadar değişkenlik gösterir. Sıvı oranı arttıkça ısı transferi daha derin dokulara

ilerler (Miller ve ark., 2013). Bu metot, kriyoprobula göre ciltten daha fazla ısı çeker. Basınç tabancası ve tetik olmak üzere ünitenin iki parçasının kullanılması kolaylık sağlar. Bu durum onu en sık kullanılan kriyocerrahi uygulaması yapmaktadır. Aynı zamanda iyi huylu lezyonlar için oldukça uygundur. Hedef bölgeye kolay uygulanan sprej metodunda fazla kriyojen kullanımı çevredeki dokulara akma riskinden dolayı dikkatli kullanılmalıdır. Bu akıntının engellenmesi için vazelin emdirilmiş süngerlerle veya püskürtme kaplarıyla çevre dokular korunur (Fesseha ve Yılma, 2020).



Şekil 1. Sıvı nitrojenli kriyoterapi cihazının basınçlı püskürtme tabancası ve uçları.

Kriyo tabancalarının bir tetiği ve tutma kolu bulunur. Namlusu dokuya hedeflenirken gövdesi gaz silindiri-ne bağlıdır. Tetiğe basıldığı zaman kriyojen madde dokuyu dondurmaya başlar. Gaz silindiriyle kriyo tabancası arasında bir basınç göstergesi yer alır. Bu basınç göstergeleri kg/cm^2 veya lbs/in^2 olarak gaz silindirinin içindeki gazın basıncını gösterir. Yüksek basınçtan, güvenlik tehlikesi sebebiyle ve düşük basınçtan, yetersiz donma ihtimali sebebiyle kaçınılmazdır. Bazı kriyo tabancalarına pirometreler entegre edilmiştir (Ferris ve Ho, 1992). Pirometreler, hedef dokuda elde edilen sıcaklığın, monitörler aracılığıyla ölçümlemleri sağlar (Fesseha ve Yılma, 2020).

Termokupllar, hedef dokunun sıcaklıklarını ölçen cihazlardır. Genellikle metal yapıldırlar. Pirometreler

ile birlikte kullanıldıklarında lezyon içindeki sıcaklığın gerçek ölçümünü yapabilirler. Bir iğne içerisinde bulunurlar ve dokunun belirli bir miktar derinliklerine yerleştirilirler (Ferris ve Ho, 1992). Dokuya yerleştirme esnasında lezyona lokal anestezi uygulanır ve lezyon boyutu kadar doku içerisine yerleştirilir. Termokupllar, -75°C 'ye varan sıcaklıkları okuyabilirler ve dokunun istenen yıkımının yapılabilmesi için gereken sıcaklığa ulaşmayı kolaylaştırır (Fesseha ve Yılma, 2020).

Dipstik aplikatör yöntemi, sıvı kriyojen maddenin (sıvı nitrojen) bir pamuk uçlu aplikatör ile lezyona uygulanmasını baz alan bir uygulama şeklidir (Karakuzu ve Tatlı, 2018). Aplikatör önce bir kaptaki sıvı nitrojene batırılır. Daha sonra lezyona bastırılır. Sprey ve kriyoprobula göre daha az düşük sıcaklıklar elde edilir. Kullanımı kolay ve pratiktir fakat çok düşük sıcaklıklara ulaşamadığı için dokuda kontamine olabilir. Özellikle Adenovirüsler, aplikatörün uygulandığı bölgeden başka bir dokuya veya canlıya geçişi muhtemeldir. Bu sebeple bir aplikatör, sadece bir canlıda kullanılmalı daha sonra atılmalıdır (Fesseha ve Yılma, 2020).

Kriyojen Seçimi

Piyasada çeşitli kriyojen maddeler bulunmaktadır. Veteriner hekimlikte en çok sıvı nitrojen ve nitröz oksit kullanılır. Nadir olmakla beraber karbondioksit ve freon da kullanılır (Miller ve ark., 2013). Sıvı nitrojen, düşük kaynama noktası (-195.8°C), kolay tedarik edilebilmesi ve kullanım kolaylığı bakımından beşeri ve veteriner tıbbında yaygın bir şekilde kullanılır (Fesseha ve Yılma, 2020; Miller ve ark., 2013). Düşük kaynama noktası, hedef dokuda çok düşük sıcaklıkların elde edilmesini sağlar (Ferris ve Ho, 1992). Yalıtımlı kaptaki iki gün aktif kalabilir ve maksimum bir aya kadar orijinal kaplarında saklanabilirler (Miller ve ark., 2013). Sprey, kriyoprob ve aplikatör metodlarında kullanıma uygunlardır (Fesseha ve Yılma, 2020).

En yaygın dondurucu ajanlardan bir diğeri nitröz oksittir. Kaynama noktası -89.5°C 'dir. Sıvı nitrojene göre daha yüksek kaynama noktasına sahip olması sebebiyle daha uzun süre dondurma işlemi istenen donmayı sağlar. Özel kapalı kaplarda depolanırlar ve özel tasarlanmış kriyoterapi ünitelerine ihtiyaç duyulur. Bu sebeple sıvı nitrojen kadar kolay saklama koşullarına sahip değildir (Ferris ve Ho, 1992). Sıvı nitrojene kıyasla daha maliyetli olmaları, uzun dondurma süreleri ve özel ünite gereksinimleri gibi dezavantajlarına rağmen; atık üretmemeleri, daha uzun saklama sürelerine sahip olmaları ve daha kolay erişilebilir olmaları avantajlarıdır. (Miller ve ark., 2013).

Kriyoterapi öncesinde hastanın genel bir muayenesinin yapılması; lezyonun, sitolojik ve histopatolojik yönlerden incelenmesi gerekir. Kriyocerrahinin, çoğu zaman sedasyon veya lokal anestezi ile uygulanması

komplikasyonları en aza indirmektedir (Fesseha ve Yilma, 2020). Buna rağmen hasta sahibinin oluşabilecek komplikasyonlar hakkında ve diğer tedavi yöntemleri bakımından bilgilendirilmesi ve yazılı onaylarının alınması gereklidir (Tarım ve ark., 2000). Kitlenin kötü huylu olması durumunda, cerrahi ve onkolojik yönlerden tedavi edilmesi endikedir (Fesseha ve Yilma, 2020).

Uygulama sonrası donma derinliği izlenmeli, gerekli ölçümler yapılmalıdır. Doku tahribatının derecesi belirlenirken öldürücü derinliğe ulaşıp ulaşılmadığı kontrol edilmelidir. Beşeri tıpta uygulama sonrası kortikosteroid uygulamaları yapılmaktadır (Yosipovitch ve ark., 2001).

Endikasyonları ve Kullanım Alanları

Kriyoterapi veteriner hekimlikte sıklıkla dermatolojik vakalarda tercih edilmektedir. Genellikle sebasöz hiperplazilerde ve adenomlarda kriyocerrahi uygulamalarına başvurulur. Bu tip olgularda genellikle kötü huylu lezyonlara üç donma/çözülme döngüsü uygulanırken iyi huylu lezyonlarda iki döngü uygulaması yeterli olur.

Kedilerde ağız boşluğu hastalıkları ve iltihaplanmaları çok yaygındır. Ülser ve erozyon gibi ağız boşluğu bozukluklarına sahip 220 kedide yapılan bir çalışmada bu bozuklukların sebeplerinin altta yatan sistemik hastalıklardan eozinofilik granülomlara, böbrek hastalıklarına kadar geniş bir yelpazesinin olduğu raporlanmıştır (Dokuzeyul ve ark., 2016). Erişimin zor olduğu ağız boşluğu lezyonlarında ve diş eti epulislerinde kriyocerrahi uygulamaları, kanamanın çok aza indirgenmesi ile en iyi tedavi seçeneği olarak yer alır (Miller ve ark., 2013). Anal fistül tedavisinde de kullanılan kriyoterapi, operasyonel tedavi seçeneklerine nazaran anal sfinktere zarar verme riski taşımaz (Rhodes ve Werner, 2018). Hemanjiomların nöks etmesi dolayısıyla cerrahi uygulamalar yerine kullanımı tartışılmaktadır (Jackson ve Marsella, 2012).

Foliküler tümörler, perianal bez tümörleri, nodüler dermatofibrosis, kutanöz histiositoma, kedi sporotrichosis tedavilerinde kullanılması önerilir (Coyner, 2020; Han, 2020). Bazal hücreli karsinomlarda, solar veya solar olmayan dermatitlerde kullanımı yaygındır (Campbell, 2004; Kılıç ve ark., 2011). Küçük hayvanların yanı sıra atlarda *Mycobacterium ulcerans*'in cilt ülserlerinde ve melanotik tümörlerinin tedavilerinde kriyoterapinin etkinliği kanıtlanmıştır (Lloyd, 2003; Malik ve ark., 2013). Ayrıca yumuşak doku yaralanmalarından sonra akut inflamasyonun tedavisi için uygulanır. Fakat dokunun türü değiştiğinde donmaya karşı olan tolerans seviyeleri de değişir (Bleakley ve Davison, 2010). Bunların yanı sıra kriyoterapinin uygulama esnasında ve sonrasında, köpeklerde, stres ve kaygı oluşturmaması, tüy kalitesini bozmaması ve hareketliliği azaltmaması gibi bir dizi amacından ba-

ğımsız faydaları bulunmaktadır (Verebová ve Staníčová, 2022). Ayrıca periferik sinir uçlarının geçici ölümü sonucu kaşıntı ve yalama isteği azalır (Patel ve ark., 2008).

Köpeklerde yapılan bir çalışmada, iyi huylu sebasöz neoplazi ve folliküler kistlerden oluşan 52 deri tümörüne sıvı nitrojenle, sprey kriyoterapisi uygulanmıştır. Uygulama öncesinde sedatif, anestezi veya analjezik bir uygulama yapılamayan köpeklerin, uygulama esnasında bilinçleri açık bırakılmıştır. Ağrı hissiyatı çok azında bildirilmiş olup, ortalama 15 saniyelik 1-4 döngü şeklinde uygulanmıştır. Dört hafta sonra küçülme gözükmeyen lezyonlara bir seans daha uygulama yapılmıştır. Köpeklerin büyük çoğunluğunda, lezyonlar tamamen iyileşmiştir (Angileri ve ark., 2020). Bir başka çalışmada ise, viral papilloma lezyonlu üç köpekte, 5-6 döngülü sıvı nitrojen uygulaması yapılmış ve lezyonlarda kalıcı gerileme gözlenmiştir. Sıklıkla kullanılan 2-3 dondurma/çözülme döngüsü yerine daha fazla uygulanan döngü sayısına rağmen bir yan etki bildirilmemiştir (Richman ve ark., 2017). Deri ve derialtı tümörlü 20 köpekte kriyoterapi uygulaması sonrası ise lezyonların %94.5' inin tamamen iyileştiği görülmüştür (Ma ve ark., 2021). Cilt lezyonlarının yanı sıra köpeklerde, kornea pigmentasyonu sonucu göz üzerine uygulamalarda da başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Azoulay, 2013).

Kedilerde yapılan bir çalışmada, skuamoz hücreli karsinomlara sıvı nitrojen spreyi uygulanmış, sonrasında meloksikam tedavisine başlanılmıştır. Vakaların %38.5' inde tam iyileşme, %46.1' inde kısmi iyileşme gözlenmiştir. Burun lezyonlarındaki uygulamalarda burun deliği stenozu bildirilmiştir (Prado ve ark., 2017). Bir başka çalışmada, *Leishmania mexicana* sebepli ülseratif burun lezyonlu bir kedide sıvı nitrojenli sprey kriyoterapisi kullanılmış ve iki seans sonrasında lezyonlar tamamen iyileşmiştir. Fakat işlem sonrasında hipopigmentasyon düzelmemiştir (Mendoza ve ark., 2022).

Deri lezyonlarına belirli bir miktar uzaklıktan yapılan kriyoterapi uygulamaları harici intrakranial ve endoskopi tabanlı metodlar da mevcuttur. Beşeri tıpta 1960'lı yıllardan beri uygulanan intrakranial uygulamalar, veteriner tıbbında köpeklerde de günümüzde uygulanmaya başlanmıştır. Kranyektomi ile kriyoprobun geçişi için küçük delikler açılır ve problemler, beyin loblarına doğru iletirilir. Özellikle beşeri tıpta hareket bozukluğu tedavisi için kullanılmasına karşın, veteriner tıbbında yalnızca deneysel çalışmalar raporlanmıştır (Quigley ve ark., 1992).

Trakeal stenozlu hastaların tedavisinde ise endobronşiyal kriyoterapiden faydalanılmaktadır (Rodgers ve ark., 1979). Köpeklerde yapılan bir deneysel çalışmada da endoskoplukriyoterapi cihazı, özofagus mukozasına uygulanmıştır. Buna göre ülser modelinde çalışmalar tanımlanmıştır (Pasricha ve ark., 1999).

Bir başka çalışmada ise 30 kediye endoözofageal kriyoterapi uygulamaları yapıp, kedi özofagusunun -100°C'ye kadar olan sıcaklıkları tolere edebildiği gözlenmiştir (Rodgers ve Pappelis, 1985).

İnsanlarda bu gibi lezyonel ve postoperatif örnekler ek olarak farklı alanlarda da kullanımı bildirilmiştir. Örneğin halk arasında saçkıran hastalığı olarak bilinen alopesi areata olgularının büyük bir kısmında iyileşme gözlenmiştir (Aksakal ve ark., 2000). Zührevi hastalıklardan, prostat hastalıklarına kadar birçok hastalıkta olumlu sonuçlar kaydedilmiştir (Gökşin ve ark., 2020; Gürbüz ve Yurdakul, 2020). Ayrıca kriyoterapi ve kortikosteroidlerin kombine kullanımının sonucunda, sadece kriyoterapi uygulamasından daha iyi sonuçlar alındığı öne sürülmüştür (Yosipovitch ve ark., 2001).

Sonuç

Kriyoterapi, basit soğuk uygulamalarından karmaşık kriyocerrahi ünitelere kadar uzanan geniş bir yelpazede yıllardır yara tedavilerinde kullanılan etkili bir terapi yöntemidir. Özellikle veteriner tıbbında, neoplastik lezyonların tedavisinde yaygın olarak tercih edilmekte olup, neredeyse ağrısız bir deneyim sunarak komplikasyon riskini minimuma indirir. Ağrısız, sedasyonsuz ve anestezisiz uygulanabilen bu yöntemin kedi ve köpek dermatolojisinde etkinliğini artırarak daha fazla kullanım alanı bulacağı kanısındayız.

Kaynaklar

- Aksakal AB, Akar A, Erbil H, Kurumlu Z. Kriyoterapi alopesi areata tedavisinde ilk seçeneklerden birisi olabilir mi? Türkiye Klinikleri J Dermatol 2000; 10 (3): 184-7.
- Angileri M, Furlanello T, Lucia MD. Cryotherapy to treat benign skin tumours in conscious dogs. Vet Dermatol 2020; 31(2): 163-6.
- Azoulay T. Adjunctive cryotherapy for pigmentary keratitis in dogs: A study of 16 corneas. Vet Ophthalmol 2013; 17(4): 241-9.
- Barış SD, Türkyılmaz A. Endodontide post-operatif ağrı yönetimine güncel bir yaklaşım: Kriyoterapi. Eur J Dent 2023; 7(3): 163-71.
- Bleakley C, Davison GW. Cryotherapy and inflammation: evidence beyond the cardinal signs. Phys Ther Rev 2010; 15(6): 430-5.
- Campbell KL. Small Animal Dermatology Secrets. First Edition. Pennsylvania: Elsevier Science, 2004; p. 319.
- Chesterton LS, Foster NE, Ross L. Skin temperature response to cryotherapy. Arch Phys Med Rehabil 2002; 83(4): 543-9.

- Coyner KS, ed. Clinical Atlas of Canine and Feline Dermatology. First Edition. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2020; pp. 404-9.
- Dokuzeylül B, Kayar A, Or ME. Prevalence of systemic disorders in cats with oral lesions. Vet Med-Czech 2016; 61(4): 219-23.
- Ferris DG, Ho JJ. Cryosurgical equipment: A critical review. J Fam Pract 1992; 35(2): 185-93.
- Fesseha H, Yilma T. Cryosurgery: Its principles and application-A review. CPQ Med 2020; 10(2): 1-18.
- Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo. Cryobiology 2009; 59 (3): 229-43.
- Gökşin Ş, Aksoy S, Duygulu Ş. Atipik yerleşimli kutanöz larva migrans olgusu. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi 2020; 7(1): 57-9.
- Gürbüz C, Yurdakul İ. Prostat kanseri tedavisinde fokal tedaviler. Endourol Bull 2020; 12(1):53-61.
- Han HS. Sporothrichosis. Noli C, Colombo S. eds. In: Feline Dermatology. First Edition. Gewerbestrasse: Springer Cham 2020; pp. 329-43.
- Jackson HA, Marsella R. BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology. Third Edition. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association 2012; p. 241.
- Karakuzu A, Tatlı EU. Kriyoterapi. Turkderm-Turk Arch Dermatol Venerol 2018; 52(2): 76-7.
- Kılıç S, Eröksüz Y, Ünsaldı S, Canpolat İ, Kulualp K. Bir ineğin göz kapağında bazal hücre karsinomu. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi 2011; 22(1): 49-51.
- Knottenbelt DC, McGarry JW, Pascoe RR. Pascoe's Principles & Practice of Equine Dermatology. Second Edition. Edinburgh: Elsevier/Saunders 2009; pp. 123-5.
- Lloyd DH, Littlewood JD, Craig JM, Thomsett LR. Practical Equine Dermatology. First Edition. Oxford: Blackwell Science 2003; p. 70.
- Ma J, Yu X, Lv J, Lin D, Lin J, Bai Y, Wang Y, Li X, Dong J. Cryotherapy mediates histopathological and microstructural changes during the treatment of skin and subcutaneous tumors in dogs. Cryobiology 2021; 98: 164-71.
- Malik R, Smits B, Reppas G, Laprie C, O'Brien C, Fyfe J. Ulcerated and nonulcerated nontuberculous cutaneous mycobacterial granulomas in cats and dogs. Vet Dermatol 2013; 24(1): 146-e33.
- Mendoza Y, Colmenares A, Hernández-Pereira CE, Shaban MV, Mogollón A, Morales-Panza RJ, Sua-

- rez-Alvarado MJ, Sordillo EM, Kato H, Paniz-Mondolfi AE. Cutaneous leishmaniosis due to *Leishmania mexicana* in a cat treated with cryotherapy. *Vet Dermatol* 2022; 33(5): 450-3.
- Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. Muller & Kirk's Small Animal Dermatology. Seventh Edition. Missouri: Elsevier Mosby 2013; pp. 156-8.
- Nayeema S, Subha DRM. Cryotherapy—a novel treatment modality in oral lesions. *Int J Pharm Sci* 2013; 5(4): 4-5.
- Olson JE, Stravino VD. A review of cryotherapy. *Phys Ther* 1972; 52(8): 840-53.
- Pasricha PJ, Hill S, Wadwa KS, Gislason GT, Okolo III PI, Magee CA, Canto MI, Kuo WH, Baust JG, Kalloo AN. Endoscopic cryotherapy: experimental results and first clinical use. *Gastrointest Endosc* 1999; 49(5): 627-31.
- Patel A, Forsythe P. Saunders Solutions in Veterinary Practice: Small Animal Dermatology. First Edition. UK: Saunders Elsevier 2008; p. 268.
- Prado LOC, Rossetto VJV, Carvalho LMCR, Ferreira AP, Matsubara LM, Rodrigues JCZ, Brandão CVS. Evaluation of the cryosurgery for treatment of squamous cell carcinoma in cats. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2017; 69(4): 877-82.
- Quigley MR, Loesch DV, Shih T, Marquardt M, Lupe-tin A, Maroon JC. Intracranial cryosurgery in a canine model: A pilot study. *Surg Neurol* 1992; 38(2): 101-5.
- Rhodes KH, Werner AH. Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion Small Animal Dermatology. Third Edition. West Sussex: John Wiley & Sons 2018; pp. 161-3.
- Richman AW, Kirby AL, Rosenkrantz W, Muse R. Persistent papilloma treated with cryotherapy in three dogs. *Vet Dermatol* 2017; 28(6): 625-e154.
- Rodgers BM, McDonald AP, Talbert JL, Donnelly WH. Morphologic and functional effects of esophageal cryotherapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979; 77(4): 543-9.
- Rodgers BM, Pappelis P. Profound endoesophageal cryotherapy. *Cryobiology* 1985; 22(1): 86-92.
- Scott DW, Miller WH. Equine Dermatology. Second Edition. Missouri: Elsevier/Saunders 2011; p. 119.
- Sharp B. Feline physiotherapy and rehabilitation: 1. Principles and potential. *J Feline Med Surg* 2012; 14(9): 622-32.
- Tarım G, Cantürk T, Şentürk N, Turanlı AY. Dermatolojik tedavide kriyoterapi kullanımı. *OMÜ Tıp Dergisi* 2000; 17(3): 210-2.
- Verebová V, Staničová J. The effect of the cryotherapy on the health and welfare of dogs: preliminary study. *Folia Veterinaria* 2022; 66(4): 31-9.
- Woo SC, Lee J, Millis DL, Drum MG. Thermographic evaluation of the duration of skin cooling after cryotherapy in dogs following tibial plateau leveling osteotomy surgery. *Front Vet Sci* 2022; 9: 1-7.
- Yosipovitch G, Sugeng MW, Goon A, Chan YH, Goh CL. A comparison of the combined effect of cryotherapy and corticosteroid injections versus corticosteroids and cryotherapy alone on keloids: a controlled study. *J Dermatolog Treat* 2001; 12(2): 87-90.



Yenidoğan Ruminantlarda Propolis Kullanımı

Özge KABİLOĞLU^{1, a}, Ali KABİLOĞLU^{2, b}, İsmail ABAŞ^{3, c}

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul-TÜRKİYE

²Esenyurt İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, İstanbul-TÜRKİYE

³İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul-TÜRKİYE

ORCID No: ^a0009-0001-1593-846X; ^b0000-0003-1579-1901; ^c0000-0003-2850-6452

Sorumlu Yazar: Özge KABİLOĞLU; E-posta: ozgeekabiloglu@gmail.com

Atıf yapmak için: Kabiloğlu Ö, Kabiloğlu A, Abaş İ. Yenidoğan ruminantlarda propolis kullanımı. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2025; 22(1):58-64

Öz: Uzun yıllar boyunca ruminantlarda yenidoğan kayıplarını azaltmak, enfeksiyonlardan korumak, büyümeyi desteklemek ve ekonomik olarak hayvansal üretimi artırmak için antimikrobiyal ajanlar yem katkı maddesi olarak kullanıldı. Ancak yem katkı maddesi olarak kullanılan bu kimyasalların hayvansal ürünlerde kalıntı bırakması, mikrobiyal direnç geliştiren patojen organizmaların insan ve hayvan sağlığını tehdit etmesi ve gıda alerjileri bu maddeleri tartışma konusu yapmıştır. Bunun sonucunda da tedavi gerektiren hastalıklar dışında antimikrobiyal ajanların eti, sütü ve yumurtası tüketilen hayvanlarda kullanılması yasaklanmıştır. Bu olumsuzluklar nedeniyle propolis gibi doğal maddelerin hayvan beslemede kullanılması araştırılmaya başlanmıştır. Propolis doğal bir arı ürünüdür. Yapısındaki bitkisel flavonoidler ve fenolik bileşikler ile antibakteriyel, antiviral, hepatoprotektif aktiviteler, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antioksidan, antiparaziter ve antiseptik özellikler gibi önemli biyolojik özellikler gösterir. Bunun yanında insan gıdası olarak kullanılan hayvansal ürünlerde zararlı kimyasal kalıntı riski oluşturmaz. Böylelikle propolisin yem katkı maddesi olarak kullanılabilirliği ve hayvansal ürünlerin güvenliği ve toksisitesi hakkında güncel tüketici beklentilerini karşılayabileceği ön görülmektedir. Bu derlemenin amacı alternatif yem katkı maddesi olarak propolisin etkinliğini ve en çok ekonomik kaybın yaşandığı süt emme dönemindeki ruminantların gelişme ve sağlık durumu üzerinde yapılan çalışmalarını incelemektir.

Anahtar kelimeler: Propolis, ruminant, yenidoğan.

Usage of propolis in newborn ruminants

Abstract: For many years, antimicrobial agents have been used as feed additives in ruminants to reduce neonatal losses, to develop protection against infections, to support growth and to increase economical animal production. However, the fact that these chemicals used as feed additives leave residues in animal products, pathogenic organisms that develop microbial resistance threaten human and animal health and food allergies have made these substances a subject of debate. As a result, the use of antimicrobial agents in animals whose meat, milk and eggs are consumed, except for diseases requiring treatment, has been prohibited. Due to these Adversities or challenges, the use of natural substances such as propolis in animal nutrition has begun to be investigated. Propolis is a natural bee product. It exhibits important biological properties such as antibacterial, antiviral, hepatoprotective activities, anti-inflammatory, immunomodulatory, antioxidant, antiparasitic and antiseptic properties with its structure's plant flavonoids and phenolic compounds. In addition, it does not pose a risk of harmful chemical residues in animal products used as human food. Thus, it is foreseen that propolis can be used as a feed additive and meet current consumer expectations regarding the safety and toxicity of animal products. The aim of this review is to examine the effectiveness of propolis as an alternative feed additive and the studies on the development and health status of ruminants during the lactation period, when the most economic loss occurs.

Keywords: Newborn, propolis, ruminant.

Giriş

Kolostrum alma, süt emme ve süttten kesme dönemi yenidoğan ruminant hayvanların bağışıklık sistemi gelişimlerinde üç önemli dönemdir (Htoo ve ark., 2015). Kuzu, oğlak ve buzağların kolostrum tüketimi, pasif bağışıklık transferinde ve hayatta kalma oranında temel bir role sahiptir (Hernández-Castellano ve

ark., 2015). Bununla birlikte kuzu, oğlak ve buzağı kayıplarının en çok yaşandığı ve hayvanların sonraki dönemlerdeki verimlerin doğrudan etkilendiği dönem süt emme dönemidir (Ayağ ve Konyalı, 2009; Htoo ve ark., 2015).

Süt emme dönemindeki kuzu, oğlak ve buzağı kayıplarını önlemek, bağışıklığı artırmak ve büyümeyi hızlandırmak için eskiden iyonofor grubu antibiyotikler, lasolacid gibi kimyasal ajanlar, hormon taklidi yapan β -adrenerjik reseptör inhibitörleri yem katkı maddesi

olarak kullanılmıştır (Kara ve ark., 2014; Kabiloğlu ve Kocabağlı, 2022). Ancak 20. yüzyılın sonlarında yapılan araştırmalar bu maddelerin düşük miktarlarının bile mikrobiyal direnci geliştirebileceğini, et ve süt ürünlerinde ciddi kalıntılar bırakabileceğini ortaya koymuştur (Kara ve ark., 2014; Küçükbuğru ve Acaröz, 2020). Antibakteriyel ajanların 1996 yılında Avrupa Birliği Ülkelerinde (Avrupa Birliği (EU) Konseyi Direktifleri, 1996), 2006 yılında ülkemizde ürünleri ve eti insan gıdası olarak kullanılan hayvanlarda tedavi amacı dışında kullanılması yasaklanmıştır (Resmi Gazete, 2006). Vitamin takviyeleri dışındaki ilaçların da kullanımı 2011 yılında sınırlandırılmıştır (Resmi Gazete 2011). Bu sınırlamalar sonucunda yenidoğanların yaşam gücünü artırma potansiyeli olan, fiziksel olarak geliştiren ve en önemlisi de sentetik maddelere göre daha güvenli olan alternatif ürünler ile ilgili araştırmalar artmıştır (Güçlü ve Kara, 2009; Kabiloğlu ve Kocabağlı, 2022).

Propolisin halk dilindeki adı arı tutkalıdır (Kocot ve ark., 2018). Propolis arı kovanında işçi arılar tarafından reçineli ağaç ve bitkilerin dallarından, yaprak köklerinden ve gövdelerindeki yarıklardan toplanan yapışkan maddeler, kovanda üretilen diğer ürünler ve işçi arılar tarafından üretilen bir enzimin karıştırılmasıyla oluşturulur (Toreti ve ark., 2013). Fenolik maddeler açısından zengin bir üründür (Bogdanov, 2017). Propolis, arı kovanında arılar tarafından kovanda zayı olan veya öldürülen ve dışarı atılamayan diğer arıların, doğal düşmanların mumyalanmasında, larva ve boş peteklerin dezenfekte edilmesinde, peteklerdeki kırıkların ve kovandaki deliklerin kapatılmasında kısacası arı kolonisinin dış ve iç etmenlere karşı korunmasında kullanılmaktadır (Sung ve ark., 2017). Arı kovanının bulunduğu yerin florasına ve iklim şartları-

na göre propolis yeşil, açık sarı, kırmızı ve kahverengi olmak üzere çok farklı renklerde ve akışkanlıkta olabilir (Toreti ve ark., 2013; Bogdanov, 2017).

Propolisin Yapısı ve Potansiyel Etkileri

Propolisin yapısı; bal arısı ırkına, kovanın bulunduğu yerin bitki florasına, iklim şartlarına, doğal düşmanların olup olmamasına ve kovandan toplanma şekline göre değişir (Toreti ve ark., 2013). Propolis; 20-25 ° C'nin altında kolayca kırılabilen, sert formda, 20-25 ° C'de mumsu formda ve bu derecelerin üzerinde ise jöle veya sümüksü yapıdadır ve çoğu türünün erime ısısı 60-70 °C arasındadır (Bogdanov, 2017; Kocot ve ark., 2018). Propolisin yaklaşık %50'si reçine, %30-40'ı bal mumu, %5-10 aromatik yağlar, %5'i polen ve nektar ve %5 diğer organik ve inorganik bileşiklerden oluşur (Abdulkhani ve ark., 2017). Ayrıca B grubu vitaminler ve çeşitli mineralleri içermekle (Abdulkhani ve ark., 2017; Kocot ve ark., 2018) birlikte, fiziksel olarak çoğunlukla yapışkan ve lipofilik yapıda olup etanolde tamamına yakını çözülmemektedir (Bogdanov, 2017).

Araştırmalar sonucu propolisin kimyasal yapısındaki bileşik sayısının 300'ün üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Flavonoidler, fenolik asitler, terpen ve terpen bileşenleri propolisin yapısındaki en etkili ve yoğun bileşiklerdir (Abdulkhani ve ark., 2017; Bogdanov, 2017). Flavonoidler en güçlü antimikrobiyel ve antioksidan etkinliğe sahip bileşendir (Maciejewicz ve ark., 2002). Ana moleküllerindeki değişikliklere bağlı olarak flavonlar, flavanonlar, flavonoller, flavanonoller, izoflavonlar, kateşinler, kalkonlar, antosiyanidinler ve lokoantosiyanidinler olarak adlandırılan temel sınıflara ayrılır. Fenolik asitler; hidroksil ve karboksil grupla-

Tablo 1. Propolisin biyolojik aktiviteleri ve etki mekanizması

Biyolojik Aktivite	Etki Mekanizması
Antibakteriyel	Bakteriyel protein sentezini yavaşlatarak veya durdurarak ve sitoplazma çeperinde geçirgenliği bozar (Anjum ve ark. 2019).
Antiviral	Viral protein enzimlerini inhibe ederek RNA sentezini engeller (Bogdanov, 2017).
Antifungal ve antimikotik	Mantar ve küflerdeki sıvı dengesini bozar (Anjum ve ark., 2019).
Antiparaziter	Kandaki makrofajların eozinofile bağlı aktivitesini artırır (Linécio ve ark., 2022).
Antienflamatuvar	Araşidonik asit metabolizmasının lipoksijenaz yolunu inhibe eder (Bogdanov, 2017).
İmmunmodilatör	Timus bezini ve tiroid bezini uyarıp antikor üretimini artırır. B ve T lenfositleri aktive ederek ve fagositozu güçlendirir (Boukara, 2013).
Antioksidan	Süperoksitlerin hücre içi üretimini yavaşlatıp mitokondriyal dokuda oksidatif strese bağlı doku yıkımını önler ve ksantin oksidaz aktivitesini inhibe eder (Bogdanov, 2017).
Antitümoral	Tümör hücrelerindeki DNA'nın parçalanmasına yol açıp tümoral apoptozisi hızlandırır (Bassani-Silva ve ark., 2007).
Yara iyileştirici	Yara hattında orta ila tam kalın vasküler granülasyon dokusu oluşumunu, daha fazla fibroblast ve kolajen birikimi, hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve tam epitelizeasyon sergilemiştir (Abu-Ahmed ve ark., 2013; Abu-Seida, 2023).

rı ile bir benzen halkasının birleşmesiyle meydana gelmektedir. Benzoik ile sinamik asit ve bunların esterleri propoliste bulunan başlıca fenolik asit çeşitleridir ve etki mekanizması flavonoidlerle benzerdir (Górecka ve ark., 2014). Propolisin biyolojik etkileri ve etki mekanizması Tablo 1'de, etkilediği patojenler Tablo 2'de belirtilmiştir.

bir çalışmada, yeterli miktarda kolostrumlarını almış 24 baş *Simmental* ırkı buzağları iki gruba ayırmış ve bir gruptakilere sütten kesilene kadar ek olarak 4 ml %30'luk EEP'i oral olarak içirmişlerdir. Çalışma sonunda propolis uygulamasının canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanmayı olumlu etkilediğini ortaya koymuşlardır. Benzer bir çalışma 24 baş *Hols-*

Tablo 2. Propolisin etkili olduğu patojenler (Bogdanov, 2017'dan modifiye edilmiştir)

Patojenler	
Gram Pozitif Bakteriler	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Mycobacteria spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
Gram Negatif Bakteriler	<i>E. coli</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Klebsiella ozaemae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella spp.</i>
Virüsler	<i>Adenovirus</i> , <i>Coronavirus</i> , <i>Herpes simplex</i> , <i>Influenza A and B virus</i> , <i>Newcastle disease virus</i> , <i>Polio virus</i> , <i>Vaccinia</i> , <i>Rotavirus</i> , <i>Vesicular Stomatitis Virus</i> ,
Parazitler	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Eimeria</i> , <i>Giardia</i> , <i>Trichomonas</i> ve <i>Trypanosoma spp.</i>
Mantarlar	<i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Histoplasma</i> , <i>Microsporum</i> , <i>Saccharomyces</i> ve <i>Trichophyton</i> türleri

Propolisin Yenidoğan Ruminantlarda Kullanımı

Süt emen ruminantlarda propolis uygulamasının performans üzerine etkisi

Ruminantlarda süt emme dönemindeki performans çalışmaları genellikle vücut ölçümleri ve yem tüketimi ile ilgili verileri kapsar. Sütten kesilmemiş ruminantlarda propolis uygulaması ile ilgili bazı çalışmalar yapılmış ve farklı sonuçlar bulunmuştur.

Yenidoğan buzağların kullanıldığı bir çalışmada Tolon ve ark. (2002) 2 ml (500 mg/ml) propolis etanol ekstraktı (EEP) sütten kesilene kadar, 56 gün boyunca, buzağlara oral yolla vermişlerdir. Çalışma sonunda özellikle dişi buzağların günlük canlı ağırlık artışının önemli ölçüde olumlu etkilendiğini bildirmişlerdir. Yapılan benzer bir çalışmada, Yücel ve ark. (2015), 20 adet *Holstein* yenidoğan buzağını her grupta 5 dişi 5 erkek buzağı olacak şekilde iki gruba (kontrol ve uygulama) bölmüştür. Bir gruptaki buzağlara 35 gün boyunca 2 ml EEP (%70'lik etanol ile hazırlanmış 500 mg/ml propolis) verilmiş ve deneme sonunda uygulama grubundaki dişi buzağların canlı ağırlık artışı, vücut uzunluğu ve cıdago yüksekliği açısından kontrol grubundakilere kıyasla olumlu etkilendiğini bildirmiştir. Erkek buzağlarda ise sadece cıdago yüksekliğinin olumlu etkilendiği bildirilmiştir. Propolisin sütle beslenen buzağlarda performans üzerine farklı sonuçların ortaya konduğu bir başka çalışmada, Slanzon ve ark. (2019) tarafından neonatal dönemden sütten kesilene kadar buzağların süt ikame yemine 4 ml EEP (300 mg/ml kırmızı propolis) ilave edilmiş ve çalışma sonunda sadece günlük yemden yararlanma oranının olumlu etkilendiği bildirilirken propolis uygulamasının buzağı performansına olumlu bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Propolisin farklı ırklardaki buzağlar üzerine etkileri de değerlendirilmiştir. Kabiloğlu ve ark. (2023) yaptıkları

tein ırkı buzağlar kullanılarak yapılmış (Özdemir ve Yanar, 2024) ve bu çalışmada propolisin yemden yararlanma oranı üzerine olumlu bir etkisinin olduğu bildirilmiştir. *Simmental* buzağlara %10'luk EEP içirilerek yapılan başka bir çalışmada da (Kupczyński ve ark., 2012), 30 baş buzağı 3 gruba ayrılmış (kontrol, 2 ve 4 ml EEP) EEP içirilen buzağlarda canlı ağırlıkların olumlu etkilendiği, özellikle 4 ml EEP içirilen grup ile kontrol grubu kıyaslandığında canlı ağırlıkların arasındaki farkın önemli olduğu bildirilmiştir.

Yenidoğanlarda propolis uygulaması EEP formunda olduğu gibi propolisten ekstrakte edilen flavonoidler de kullanılmıştır. Bu yönde yapılan çalışmada propolisten ekstrakte edilen flavonoidler tablet formu getirilmiş ve 4 gruba ayrılmış 20 adet süt emen *Holstein* buzağlara 4 farklı dozda (0; 7.3×10^{-5} ; 7.3×10^{-4} ; 3.6×10^{-3} g/kg CA) verilmiştir. Deneme sonunda 3.6×10^{-3} g/kg CA verilen grupta büyümenin olumlu etkilendiği ve kuru madde alımının arttığı ifade edilmiştir (Yaghoubi ve ark., 2008).

Propolis uygulamasının farklı bitkisel ekstraktlar ile birlikte kullanımının etkilerinin değerlendirildiği çalışmada (El-Nagar ve ark., 2023) 20 adet *Friesian* ırkı buzağı süt emme döneminde 4 gruba ayrılarak (kontrol, 5 g propolis, 2 ml kekik yağı ve 5 g propolis +2 ml kekik yağı) beslenmiş ve buzağı başına 5 g propolis ile birlikte 2 ml kekik yağının süt ile verilmesinin sinerjik etkiyi artırarak büyüme performansını arttırdığı ileri sürülmüştür.

Propolis uygulamasının süt emme dönemindeki buzağlar üzerine etkisi yoğun bir şekilde değerlendirilirken, farklı ruminant türlerinin yenidoğanları üzerine etkileri de çalışma konusu olmuştur. Cecere ve ark. (2021) 36 baş *Lacaune* kuzularının sütle besleme döneminde içme sütlerine farklı dozlarda yeşil propolis özütü (0, 150, 200, 250 µL propolis/kg/CA) ilave edilmesinin canlı ağırlık artışı üzerine olumlu etkilerini

gözlemlemekle birlikte en yüksek etkiyi 150 µL propolis/kg/CA verilen grupta gözlemlemiştir. Benzer şekilde Itavo ve ark. (2011) farklı dozlardaki (4, 8, 12, 16 ml) EEP'nin (300mg/ml yeşil propolis) *Suffolk* melezi kuzularda kuru madde alımını ve yemden yararlanma oranını olumlu etkilediğini, EEP dozu arttıkça bu etkinin azaldığını, kuzulardaki ideal EEP dozunun ise 7.60 ml/gün olduğunu bildirmiştir. Silva ve ark. (2019), 13 g/kg/CA kahverengi ham propolis ve 15 ml %30'luk EEP'nin *Texel* melezi kuzularda uygulanmasının canlı ağırlık ve vücut ölçülerinde önemli bir fark oluşturmadığı, ancak ham propolisin kuru madde emilimini iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Bunun yanında Sadek ve ark. (2020) propolisin aljinatlı nanopartiküllerinin yenidoğan *Nubiya* keçilerinde süttan kesim performansını artırdığını bildirmişlerdir.

Süt emen kuzular üzerine propolis ilavesinin etkisinin denendiği çalışmalar yanında anaç koyunlara propolis verilerek süt emen kuzular üzerine etkileri de değerlendirilmiştir. Morsy ve ark. (2021) doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde *Santa Ines* anaç koyunlarının rasyonlarına 3 g kırmızı propolis ekstraktı ilavesinin kuzuların süttan kesim ağırlığına önemli etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Shedeed ve ark. (2019) bireysel kafeslerde yetiştirilen *Barki* ırkı koyunları rasyonlarına doğum öncesi ve doğum sonrası 5 g/kg Çin ham propolis ilave etmiş ve kuzu performansının arttığını gözlemlemiştir.

Buzağılardaki benzer çalışmalar malaklar üzerinde de yapılmıştır. Süt emen malaklar 4 gruba ayrılmış; 1. gruba 60 mg flavomisin, 2. gruba 50 mg kahverengi propolis, 3. gruba 60 mg flavomisin + 50 mg kahverengi propolis süte karıştırılarak verilmiş ve 4. gruba kontrol grubu olarak süte ek her hangi bir katkı maddesi verilmemiştir. Çalışma sonucunda kontrol grubuna kıyasla uygulama gruplarında vücut gelişiminin daha iyi olduğu görülmüştür (Abd-Allah ve Daghash, 2019).

Süt emen ruminantlarda propolis uygulamasının büyüme ve yem ile ilgili performans verileri üzerinde potansiyel olumlu etkilerinin nedeni olarak propolisin içerisindeki flavonoidler, fenolik asitler ve terpenlerin başta antimikrobiyel ve bağışıklık artırıcı etkilerinden ötürü sindirim kanalındaki mikroflora patojen etkenlerin hakim olmasını engelleyerek dışkı ile kaybolan enerji ve sıvı miktarını azaltması olarak düşünülmektedir (Bobdanov, 2017; Zhang ve ark., 2021; Kabiloğlu, 2023). Çalışmaların bazılarında özellikle dişi buzağının canlı ağırlık artışlarının daha fazla olduğu görülmüştür (Tolon ve ark., 2002; Yücel ve ark., 2015). Söz konusu çalışmalarda bunun nedeni ile ilgili veri bulunmamakla birlikte beşeri alanda yapılan çalışmalarda propolisin yapısında bulunan flavonoidlerin östrojen reseptör tiplerine göre hem östrojenik hem de antiöstrojenik etkileriyle östrojen-progesteron seviyelerini değiştirebileceği ve genç kızlarda kilo alımını artırabileceği düşünülmüştür (Şanlıer ve Yabancı,

2004; Jung ve ark. 2010).

Süt emen ruminantlarda propolis uygulamasının bağışıklık ve sağlık durumuna etkisi

Buzağılar, kuzular ve oğlaklar doğduklarında dış hastalık etkenlerine karşı son derece savunmasızdır. Ağız sütünün içerisindeki antikorların doğumun hemen sonrasında yavru tarafından alınmasıyla oluşan pasif bağışıklık yeni doğanları korur (Hernández-Castellano ve ark., 2015). Ancak yenidoğanlarda zamanla pasif bağışıklığın azalması ve aktif bağışıklığın kademeli olarak artması nedeniyle süt emme dönemi ruminantlar için çok önemlidir (Htoo ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda propolisin kuzu, oğlak ve buzağı bağışıklığının artırılmasında, süt emme dönemi ishal vakaları başta olmak üzere hastalıklarla mücadele konusunda kalıntı bırakma riski olan ilaçlara alternatif olabileceğini ve bakteri, maya, parazit ve virüs gibi birçok mikroorganizma türüne karşı propolis uygulamasının etkili olduğu bildirilmiştir (Al Ani ve ark., 2018; Anjum ve ark., 2019).

Yaghoubi ve ark. (2008) yaptığı çalışmada farklı dozlarda propolis flavonoidi tableti verilen *Holstein* buzağılarda yaşamın 21. gününde daha yüksek serum İmmunglobulin G konsantrasyonu elde etmişlerdir. Benzer bulgular Sarker ve Yang (2010) tarafından da gözlemlenmiştir; araştırmacılar *Hanwoo* buzağılarını doğumdan itibaren süte ek olarak 90 gün boyunca propolis, illit ve neomisin içeren katkılarla beslemişler, çalışma sonucunda propolis grubunda İmmunglobulin A, M ve G düzeylerinin en yüksek olduğunu bulmuşlardır. Benzer bir şekilde Özdemir ve Yanar (2024) EEP takviyesinin *Holstein* buzağılarda kan serum IgG ve IgM düzeylerini kontrol grubuna kıyasla artırdığını bildirmişlerdir.

Bağışıklık ile ilgili belirleyici faktör olan kan immunglobulin seviyelerinin yanında Kupczyński ve ark. (2012) propolis buzağılarda eritropoez ve kan demir düzeyini artırdığını, Slanzon ve ark. (2019) 4 ml EEP (300 mg/ml kırmızı propolis) ilavesinin süt emen buzağılarda total globulin ve lökosit seviyelerini artırarak bağışıklığı uyardığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde El-Nagar ve ark. (2023) *Friesian* buzağılarında 5 g propolis + 2 ml kekik yağı karışımının genel sağlık durumunu, bağışıklık tepkisini ve toplam antioksidan kapasitesini iyileştirebildiğini belirlemişlerdir.

Buzağılarda olduğu gibi kuzu ve oğlaklarda da propolis uygulamalarının bağışıklık üzerine etkileri incelenmiştir. Cecere ve ark. (2021) tarafından farklı dozlarda yeşil propolis özütü (0, 150, 200, 250 µL propolis/kg/CA) karıştırılan sütlerle beslenen *Lacaune* kuzularının kan serumunda immunglobulin A düzeyinin 0 doz grubuna göre diğer dozlarda yüksek düzeyde kaldığı, IgG düzeyinin etkilenmediği, 250 µL propolis/kg/CA grubunda IgA'nın yanında serum transferrin konsantrasyonunun da yükseldiği bildirilmiştir. Benzer

sonuçlar propolis ilaveli rasyonla beslenen anaç koyunları emen kuzularda da elde edilmiştir. Shedeed ve ark. (2019) tarafından propolis takviyesi verilmiş geç gebe *Barki* ırkı koyunların kuzularında da IgA düzeylerinde artış gözlemlendi ancak IgM ve IgG düzeylerinde değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Bunun yanında Sadek ve ark. (2020) nano propolis partiküllerinin oğlaklarda bağışıklık düzeyini geliştirdiğini bildirmişlerdir.

Bağışıklığın artırılmasının yanında süt emme dönemindeki hayvan kayıplarının çoğundan sorumlu olan ishal vakaları ile ilgili de gözlemler propolis çalışmalarında yer almıştır. Slanzon ve ark. (2019) süt emen buzağılarda 4 ml EEP'nin ishal ve tıbbi müdahale oranlarını azalttığını çalışmasında belirtmiştir. Benzer şekilde Kupczyński ve ark. (2012) ve Yücel ve ark. (2015) neonatal buzağılarda propolisin ishal vakalarında hem koruyucu hem de tedavi edici özelliğinin olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte Özdemir ve Yanar (2024) EEP takviyesinin, immünostimülatör etkileri yoluyla, neonatal buzağı ishallerinin kontrolünde önemli bir rol oynadığını bildirmiştir. Ayrıca Kabiloğlu ve ark. (2023) tarafından yapılan çalışmada EEP'nin süt emen *Simmental* buzağılarda ishal vakalarının yanında öksürük skorunu olumlu etkilediği, genel sağlık skorunu olumlu etkileme potansiyelinde olduğu ve tıbbi tedavi gerektiren vaka sayısını da azalttığı ileri sürülmüştür.

Buzağılara benzer şekilde kuzu ve oğlaklarda da propolisin dışkı yapısını etkilediğini öne süren çalışmalar mevcuttur. *Lacaune* kuzularında süte ek olarak propolis içirilmesi sonucu dışkıdan alınan örneklerde *Escherichia coli* ve toplam koliform miktarında azalma olduğu bildirilmiştir (Cécere ve ark., 2021). Sadek ve ark. (2020)'da kırmızı propolisin *Nubiya* oğlaklarında ishal vakalarını azalttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde inek sütü ve peynir altı suyu ile beslenen *Saanen* oğlaklarında mamalarına 0.2 ml ve 0.4 ml propolis ilavesinin ishal skorunu düşürdüğü ve ishali önlediği ileri sürülmüştür (Manav, 2021).

Sunulan çalışmalarda propolisin bağışıklık artırıcı etkisinin yapısındaki aktif bileşiklerin immunglobulinlerin üretildiği lenf bezlerini, timusu ve tiroidi uyarmasıyla ilişkili olabileceği, bununla birlikte fagositik aktiviteyi artırması, patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkileri ve antienflamatuvar etkisinin ruminantlarda sağlık verilerini iyileştirdiği düşünülmektedir.

Sonuç

Yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılan propolis; sentetik ilaçlara alternatif, antibakteriyel, antiviral ve antioksidatif aktivite başta olmak üzere birçok biyolojik aktivitesi yanında mikrobiyal direnç, kalıntı ve bilindiği kadarıyla gıda alerjisi problemi oluşturmayan doğal bir bileşiktir. Kuzu, oğlak ve buzağı kayıplarının en çok gözlemlendiği süt emme döneminde yapılan ça-

lışmalar incelendiğinde propolis ve propolis ekstraktlarının performans, sağlık ve bağışıklık üzerine olumlu etkilerinin olduğu açıktır. Bu sebeple propolis kuzu, oğlak ve buzağı kayıplarını, ishale seyreden hastalıklar başta olmak üzere bakım ve tedavi giderlerini azaltmak ve büyüme performansını geliştirmek için potansiyeli olan alternatif bir yem katkı maddesi olarak değerlendirilmektedir. Çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesinin nedeni propolis türlerinin içerdiği flavonoid ve fenolik asit gibi aktif bileşiklerin miktarının standart olmaması ve birçok çevresel faktörden etkilenmesidir.

Kaynaklar

- Abd-Allah M, Daghash MWH. Influence of using flavomycin and propolis as feed additives on buffalo milk production, and growth performance and blood metabolites of suckling calves. Egypt J Nutr and Feeds 2019; 22(1): 13-22.
- Abdulkhani A, Hosseinzadeh J, Ashori A, Esmaeili H. Evaluation of the antibacterial activity of cellulose nanofibers/polylactic acid composites coated with ethanolic extract of propolis. Poly Compos 2017; 38(1): 13-9.
- Abu-Ahmed H, Abdel-Wahed RE, El-Kammar MH, El-Neweshy MS. Evaluation of the effectiveness of propolis compared with honey on second intention wound healing in the equine. Middle East J Sci Res 2013; 14(10): 1292-8.
- Abu-Seida AM. Potential benefits of propolis in large and small animal practices: a narrative review of the literature. World Vet J 2023; 13(3): 441-51.
- Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. Medicines 2018; 5(1): 2.
- Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Bashir MA, Tahir M, Ansari MJ, Ghramh HA. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. Saudi J Biol Sci 2019; 26(7): 1695-703.
- Ayağ BS, Konyalı A. Yeni Doğan çiftlik hayvanlarında adaptasyon parametreleri. Hayvansal Üretim 2009; 50(1): 74-80.
- Bassani-Silva S, Sforcin JM, Amaral AS, Gazpar Luiz FJ, Rocha Noeme S. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cells. Rev Port Cien Vet 2007; 102(563-564): 261-5.
- Bogdanov S. Propolis: Biological properties and medical applications. The propolis book. 2017; <https://s66a5b07cb261a6cc.jimcontent.com/download/version/1609255034/module/11112716973/name/>

PropolisBook2.pdf Erişim tarihi: 01.10.2024.

Boukraa L. Honey and Bee Products for Animal Health And Wellness. Honey in Traditional and Modern Medicine, 1st Edition. CRC Press., Boca Raton, 2013; Chapter 13, pp. 263-278.

Cecere BGO, da Silva AS, Molosse VL, Alba DF, Leal KW. Addition of propolis to milk improves lactating lamb's growth: effect on antimicrobial, antioxidant and immune responses in animals. Small Rum Res 2021; 194 (1): 106265.

El-Nagar HA, El-Hais AM, Abd El-Aziz AH, Wafa WM, Faraag MS, Badawy MI, Atia SES. Growth performance, immunity, and general health status of newborn friesian calves fed milk supplemented with propolis, thyme, or their combination, as antioxidants, during the suckling period. Adv Anim Vet Sci 2023; 11(11): 1830-9.

European Commission Council Directive. Measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products, <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1996/23/oj> Erişim tarihi: 01.09.2024.

Górecka AK, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. Molecules 2014; 19(1): 78-101.

Güçlü BK, Kara K. Ruminant beslemede alternatif yem katkı maddelerinin kullanımı: 1. probiyotik, prebiyotik ve enzim. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2009; 6(1): 65-75.

Hernández-Castellano LE, Morales-delaNuez A, SánchezMacías D, Moreno-Indias I, Torres A, Capote J, Argüello A, Castro N. The effect of colostrum source and timing of the first colostrum feeding on body weight and immune status of artificially reared newborn lambs. J Dairy Sci 2015; 98(1): 204-10.

Htoo NN, Khaing AT, Abba Y, Htin NN, Abdullah JF, Kyaw T, Khan MA, Lila MA. Enhancement of growth performance in pre-weaning suckling Boer kids supplemented with creep feed containing alfalfa. Vet World 2015; 8(6): 718-22.

Itavo CCBF, Morais MG, Ramos CL, Itavo LCV, Tomich TR, Silva JA. Green propolis extract as additive in the diet for lambs in feedlot. The Brazilian J Anim Sci 2011; 40(9): 1991-6.

Jung BI, Kim MS, Kim HA, Kim D, Yang J, Her S, Song YS. Caffeic acid phenethyl ester, a component of beehive propolis, is a novel selective estrogen receptor modulator. Phytother Res 2010; 24 (2): 295-300.

Kabiloğlu A. Propolis Ekstraktının Sütçü Buzağlarının Büyüme Performansı ve Sağlık Durumuna Etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Univ Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enst, İstanbul, 2023; s. 50-7.

Kabiloğlu A, Kocabağlı N, Kecec AI. Effects of propolis extract on growth performance and health condition of dairy calves. Trop Anim Health and Prod 2023; 55(2): 115.

Kabiloğlu A, Kocabağlı N. Propolis ve ruminantlarda alternatif yem katkı maddesi olarak kullanımı. Dicle Üniv Vet Fak Derg 2022; 15(1): 59-64.

Kara K, Kocaoğlu Güçlü B, Karakaş Oğuz F. Propolis ve fenolik asitlerin ruminant beslemede kullanımı. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2014; 11, 43-53.

Kocot J, Kiczynska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. Oxid Med Cell Longev 2018; 7074209.

Kupczyński R, Adamski M, Falt D, Roman A. The efficiency of propolis in post-colostrum dairy calves. Archiv Für Tierzucht 2012; 55(4): 315-24.

Küçükbüğrü N, Acaröz U. Gıdalarda antibiyotik kalıntıları ve halk sağlığına etkileri. Vet Farm Toks Dern Bult 2020; 11(3): 161-7.

Linécio M, Garcia RC, Galhardo D, de Oliveira TE, de Mello Peixoto ECT. Alcoholic extract of propolis for worms' control in sheep. Res Soc Dev 2022; 11(1): e1711120617.

Maciejewicz W, Daniewski M, Dzido T, Bal K. GC-MS and HPLC analysis of phenolic acids extracted from propolis and from Populus nigra bud exudate. Chem Anal 2002; 47: 21-30.

Manav S. Peynir Altı Suyu Tozu ve Propolis İçeren Mamalar ile Beslenen Oğlaklarda Bazı Büyüme ve Gelişme Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniv Fen Bil Enst, Aydın 2021, s. 25-34.

Morsy AS, Soltan YA, El-Zaiat HM, Alencarc SM, Abdallad AL. Bee propolis extract as a phytogenic feed additive to enhance diet digestibility, rumen microbial biosynthesis, mitigating methane formation and health status of late pregnant ewes. Anim Feed Sci Technol 2021; 273: 114834.

Ozdemir VF, Yanar, M. Effects of propolis extract administration on immune parameters, faecal consistency scores, and growth performance of Holstein-Friesian calves. Trop Anim Health Prod 2024; 56: 259.

Resmî Gazete. Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında

- Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ (No: 2006/1), 2006; <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2006/01/20060121> Erişim tarihi: 01.10.2024.
- Resmî Gazete. Canlı hayvanlar ve hayvansal ürünlerde belirli maddeler ile bunların kalıntılarının izlenmesi için alınacak önlemlere dair yönetmelik 2011; <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111217> Erişim tarihi: 01.10.2024 .
- Sadek W, Elhoussiny A, Al-Mwafy A, Farag T, Al-Gethami A, Grawish S, Hegazi A. Egyptian propolis 16: The effect of consumption of propolis and alginate-propolis nanoparticles in combination with colostrum on the performance of newborn goats. *Adv Anim Vet Sci* 2020; 8(12): 1256-65.
- Sarker M, Yang CJ. Propolis and illite as feed additives on performance and blood profiles of preweaning Hanwoo calves. *J Anim Vet Adv* 2010; 9 (19): 2526-31.
- Shedeed HA, Farrag B, Elwakeel EA, El-Hamid I, El-Rayes MA. Propolis supplementation improved productivity, oxidative status, and immune response of baki ewes and lambs. *Vet World* 2019; 12(6): 834-43.
- Silva JD, Ítavo CCBF, Ítavo LCV, Morais MDG, Silva PD, Ferelli KLSM, Arco TDS. Dietary addition of crude form or ethanol extract of brown propolis as nutritional additive on behaviour, productive performance and carcass traits of lambs in feedlot. *J Anim Feed Sci* 2019; 28(1): 31-40.
- Slanzon GS, Toledo AF, Silva AP. Red propolis as an additive for preweaned dairy calves: Effect on growth performance, health, and selected blood parameters. *J Dairy Sci* 2019; 102(10): 8952-62.
- Sung SH, Choi GH, Lee NW, Shin BC. External use of propolis for oral, skin, and genital diseases: A systematic review and meta-analysis. *Evid Based Complementary Altern Med* 2017; 2017(1): 8025257.
- Şanlıer N, Yabancı N. The effect of premenstrual syndrome on food cravings and physical activity levels in young college girls. *Gazi J Phys Edu Sport Sci* 2004; 9(3): 27-36.
- Tolon B, Önenç A, Kaya A, Altan Ö. Effects of propolis on growth of calves, 1st German Congress for Bee Products and Apitherapy. 23-24 March 2002; Passau Germany, P:71.
- Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013(1): 697390.
- Yaghoubi SMJ, Ghorbani GR, Rahmani HR, Nikkhah A. Growth, weaning performance, and blood indicators of humoral immunity in holstein calves fed flavonoids. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2008; 92(1): 456-62.
- Yücel B, Onenc A, Kaya A, Altan O. Effects of propolis administration on growth performance and neonatal diarrhea of calves SOJ Veterinary Sciences 2015; 1(1): 102.
- Zhang Y, Choi S H, Nogoy K M, Liang S. The development of the gastrointestinal tract microbiota and intervention in neonatal ruminants. *Animal* 2021; 15 (8): 100316.

Yazım Kuralları

1. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde veteriner bilimlerini ilgilendiren alanlarda orijinal araştırmalar, olgu sunumları, araştırma notları, kısa bildiri, derleme ve editöre mektup yayımlanır.
2. Dergide yayımlanacak yayınlar için resmi dil Türkçe'dir. İngilizce yazılmış eserler de yayımlanabilir. **İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir.**
3. Yayınlar A4 tipi formatta, çift aralık, Arial, 10 punto ve iki yana yaslı olarak yazılmalıdır. Her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak, sayfaların sağ altına numara verilmelidir. Resimler, şekiller ve kaynaklar dâhil orijinal makaleler ve derlemeler 14, olgu sunumları, araştırma notu ve kısa bildiriler 7 sayfa geçmemelidir.
4. Yazılar, ercvet@gmail.com adresine gönderilmelidir. Yazışmalar için, makale kapak sayfasında, sorumlu yazarın yazar adı, unvanı, ORCID numarası ve E-posta adresi yazılmalıdır.
5. Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir.
6. Araştırma herhangi bir kuruluş tarafından desteklenmiş ise kapak sayfasında dipnot olarak belirtilir.
7. Kapak sayfasında Türkçe makale başlığı (koyu ve ilk harfleri büyük), İngilizce başlık (ilk harfler büyük), kısa başlık (40 karakteri geçmemeli ve ilk kelimenin ilk harfi büyük, diğerleri küçük olarak yazılmalıdır), yazar adları (unvansız), çalıştıkları kuruma ait bilgiler (soyadı üstüne numara konulup dipnot olarak) verilmelidir.
8. Türkçe ve İngilizce özetlerin bir sonraki sayfaya yazılması gerekir. Bu sayfa, paragrafsız olarak Türkçe ve İngilizce özetleri (en fazla 250 kelime) içermelidir. Anahtar kelimeler özetlerin altına alfabetik olarak (virgülle ayrılmış şekilde) yazılmalıdır. Yalnızca ilk anahtar kelime büyük harfle başlanmalıdır. **Türkçe Bilmeyen yazarlar için Türkçe özet ve anahtar kelimeler yazma zorunluluğu bulunmamaktadır.**
9. Araştırma makalesi; Kapak Sayfası - Özet (Türkçe ve İngilizce) - Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller, Sorumlu yazar (Correspondence Author) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Metin içindeki tüm başlıklar koyu yazılmalıdır. Metin içinde paragraf girintisi yapılmamalı, devamlı satır numarası verilmelidir.
10. Derlemeler, orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, yazarların konu ile doğrudan ilişkili **en az 3 adet** çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayınlanmak üzere kabul edilebilecektir. Derlemeler kapak sayfası, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, konunun kendine ait alt başlıkları, Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir.
11. Olgu Sunumları, Özet (Türkçe ve İngilizce), Anahtar kelimeler (Türkçe ve İngilizce), Giriş, Olgu(lar), Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar bölümlerini içermelidir.
12. Etik kurul onayı gerektiren çalışmalarda Etik Kurul onayı alınan kurumun adı ve onay numarası, çalışmanın Gereç ve Yöntem kısmında belirtilmelidir.
13. Tablo ve şekillerin metinde geçeceği yer, altı ve üstü çizgili olarak belirtilmelidir.
14. Öndalık ifadelerde nokta kullanılmalıdır.
15. Tür isimleri ve anatomik terimler gibi Latince ifadeler *italik* karakterle yazılmalıdır. Tüm ölçü birimleri SI (*Système Internationale*)'e göre verilmelidir.
16. Tablolar kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üzerinde bulunmalı ve **Tablo 1.** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.
17. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1.** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar şekil ismi ile birlikte şeklin altına yerleştirilmelidir. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır.
18. Kaynaklar metin içinde cümle sonunda belirtilmelidir. Yazar soy isimleri ve tarihi yazı içinde her kaynağa ait yayın yılı yazar isminden hemen sonra parantez içinde belirtilmelidir. Kaynak iki isimli ise isimler belirtilmeli (örn; Kaldhone ve Nayak, 2008). Kaynakta yazar sayısı ikiden fazla ise sorumlu yazar "ve ark." şeklinde belirtilmelidir (örn, Kaldhone ve ark., 2008). Eğer kaynak cümlemin başında kullanılıyorsa yazar isimlerinden sonra parantez içinde yayın yılı belirtilmelidir.
19. Kaynaklar yazılırken alfabetik sıraya konulmalı, kaynaklar bölümünde 0.5 cm içeri doğru asılı halde yazılmalıdır. Noktalama işaretlerine örneklerde gösterildiği şekilde dikkat edilmelidir. Dergi kısaltmaları *Index Medicus* ile uyum içerisinde olmalıdır. **Orijinal araştırma makaleleri, derlemeler ve olgu sunumları sırasıyla 30, 45 ve 15'ten fazla kaynak içermemelidir.**
Kaynaklar;
19.1. Kaynak süreli yayın ise;
Örnek: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Turkey-associated sources. Appl Environ Microbiol 2008; 74(16): 5038-46.
19.2. Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;
Örnek: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH. eds. In: Current Protocols in Immunology. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
19.3. Kaynak kitap ise;
Örnek: Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
19.4. Kaynak editörlü kitap ise;
Örnek: Balows A, Mousier WJ, Herramafl KL, eds. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
19.5. Kaynak kongre bildirisi ise;
Örnek: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.
19.6. Kaynak tez ise;
Örnek: Erdem V. Köpek göz hastalıklarında klinik oftalmoskopik ve ultrasonografik bulguların değerlendirilmesi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara 2003; s. 1-2.
19.7. Kaynak internette bulunan bir web sitesi ise;
Örnek: TÜİK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Eserler dergide yayımlandıktan sonra, bütün sorumluluk sahiplerine aittir.
21. Yazılar gönderilirken son kontrol listesi izlenecek ve "Telif Hakkı Devir Formu" tüm yazarlarca isim sırasına göre imzalanacaktır. **Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan yayınlar işleme alınmayacaktır.**

Instructions to Authors

1. The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University publishes original research articles, short communications, case reports, letter to editor and original review articles related to the field of Veterinary Medicine.
2. Formal language of manuscripts is Turkish. Manuscripts in English are also accepted. **The publication of English-language manuscripts is given priority.**
3. Publications should be in A4 format, double spacing and Arial 10 font size. With a margin of 2.5 cm from each edge, the page number should be placed at the bottom right of the pages. Original articles and reviews should not exceed 14 pages and case reports, research notes and short papers should not exceed 7 pages including illustrations, figures and references..
4. Manuscripts should be sent to ercvet@gmail.com. For correspondence, author's name, title, ORCID number, and E-mail address should be written on cover page of the manuscripts.
5. Studies were presented in a meeting and published as an abstract can be published with indication of this status at the bottom of the cover page.
6. Information should be included on any institutions financially contributed to the study as a footnote on the cover page.
7. The cover page should be supplied as a separate page and include: Turkish running title (bold and first letters capital), English title (first letters capital), short title (max 40 characters and first letters of first word is capital, others should be written as small), author(s) names (without titles), author(s) affiliations (Superscript numbers should be given to the surnames of authors as affiliation information).
8. The summaries in Turkish and English should be written on the next page. The title page must contain the Turkish and English summaries (up to 250 words) with no paragraph and not more than five Key words in Turkish and English. Key words must be placed below summary with an alphabetical order (comma delimited). Only the first Key word must start with a capital letter. **For non-Turkish authors, there is no obligation to write summary and keywords in Turkish.**
9. Original research paper must be organized as follows: Cover page, Summary (Turkish and English), Key words (Turkish and English), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence. All titles in the text should be written in bold. There should be no paragraph indent in the text and continuous line number should be given.
10. Review articles are considered for publications if they are original and contain recent developments and accepted for publication if the authors have **at least 3 papers** directly related to the subject. Reviews must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Sub-headings of the subject, Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
11. Case reports must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words (Turkish and English), Introduction, Case(s), Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables and Figures and Correspondence.
12. In the studies requiring the ethics approval, the name and approval number of the institution of the Ethics Committee must be specified in the Materials and Methods section of manuscript.
13. The place where the tables and figures belong in the text should be indicated as underlined and upperlined.
14. Decimal expressions should be used in the dot.
15. Species names and anatomical terms in Latin should be italicized. All measurement specifications must follow the SI (Système Internationale) units.
16. Tables must be given in a separate page after the text. First letters of first word should be capital, others should be written as small in the headings of the tables. Title of tables and figures should be numbered in order as **Table 1**. Internal and lateral lines should not be used in the tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.
17. Each picture, graphic and drawing; should be given as figure and should be written as **Figure 1**. Each one should be on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed below the figures. Pictures should be the least 300dpi resolution.
18. References should be specified in the text at the end of the sentence. Author surnames and the date of publication should be specified in parentheses. If the reference has two names, the names should be given after the publication year (eg, Kaldhone and Nayak, 2008). If the reference has more than two names should be given as "et al.," (eg, Kaldhone et al., 2008). If the source is used at the beginning of the sentence, the year of publication should be specified in parentheses after the names of the authors.
19. References should be placed in alphabetical order and hanging 0.5 cm inwards in the references section. Punctuation should be taken into consideration as shown in the examples, Journal abbreviations must be in line with *Index Medicus*. **The reference list must not contain more than 30, 45, and 15 references for original research articles, reviews and case reports, respectively.** References;
 - 19.1. If the reference is a periodical, citation must be done as shown below;
Example: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF, Logue CM, Foley SL. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16): 5038-46.
 - 19.2. If the reference is from chapter of a book with an editor, citation must be done as shown below;
Example: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE. Kruisbeek AM. Marguiles DH. eds. In: *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
 - 19.3. If the reference is a book, citation must be done as shown below;
Example: Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
 - 19.4. If the reference is whole book with an editor, citation must be as below;
Example: Balows A, Mousier WJ, Herramafl KL, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
 - 19.5. If the reference is from meeting, citation must be done as shown below;
Example: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.
 - 19.6. If the reference is from a thesis, citation must be done as shown below;
Example: Erakinci G. Investigation of Antibodies Against Parasites in Blood Donors. PhD Thesis. Ege Univ. Institute of Health Sciences. Parasitology Program, Izmir-Turkey, 1993.
 - 19.7. The reference is a website on the internet, citation must be done as shown below;
Example: TUIK. Hayvancılık İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/hayvancilik.app/hayvancilik.zul>; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Once the studies one published in the journal, all the responsibility belongs to the authors.
21. The final checklist should be followed when submitting manuscripts and the "Copyright Release Form" must be signed by all authors in order. **Manuscripts which are not prepared in accordance with the "Instructions for authors" will not be processed.**

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ / JOURNAL OF FACULTY OF
VETERINARY MEDICINE, ERCİYES UNIVERSITY

Makale Türü/ Article Type:

.../ .../ 20..

(...) Araştırma / Research (...) Derleme / Review (...) Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

(...) Olgu Sunumu / Case Report (...) Editöre Mektup / Letter to Editor

Makale Başlığı/Article

Entitled:.....
.....
.....

Sayın Editör,

- Yayınlanması dileğiyle Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;
- 1- Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orijinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
 - 2- Makalenin; daha önce yayımlanmadığını, derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
 - 3- Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
 - 4- Gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı günden itibaren Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here we affirm and warranty as the Author(s) of this manuscript submitted to Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University that;

- 1- The manuscript /We submitted to the Bulletin is original and responsibilities belong to us ethically and scientifically,
- 2- The manuscript has not been previously published, being considered for publication by any other journal and will not be submitted to any other journal for such review while under evaluation by this bulletin,
- 3- The manuscript contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights.
- 4- The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University reserves all rights with due corrections from the date it has been published onwards.

Yazar/ Yazarların Adı

Author's/Authors' Printed Name

1).....İmza/Signature:.....

2).....İmza/Signature:.....

3).....İmza/Signature:.....

4).....İmza/Signature:.....

5).....İmza/Signature:.....

Not/Note: Formu aşağıdaki adrese,e-mail ya da posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz./ Please send this form to the address below by e-mail, post or deliver personally.

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi / Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğü, 38039, Melikgazi-KAYSERİ / TÜRKİYE
Tel/Phone: 0352 339 94 84 Faks/Fax: 0352 337 27 40 e-posta/e-mail: ercvet@gmail.com

SON KONTROL LİSTESİ

Makalenizi göndermeden önce lütfen bu bölümdeki maddelerle karşılaştırma yapınız ve eksiklikleri gideriniz.

- ☐ Eksiksiz doldurulmuş ve bütün yazarlarca imzalanmış **“Telif Hakkı Devri Formu”** (<http://ercvet.gmail.com> adresinden ulaşabilirsiniz) makale ile birlikte gönderildi.
- ☐ Metnin tamamı çift aralıklı (5 mm) yazıldı (özetler, tablolar, şekil alt yazıları, kaynaklar v.d. dahil).
- ☐ Her bir kenarda 2,5 cm boşluk bırakıldı.
- ☐ Yazılar 10 punto (Arial) ile yazıldı.
- ☐ Satır numaraları verildi.
- ☐ Kapak sayfasında, makalenin başlığı (sadece yazım dilindeki) koyu (bold) yazıldı, kısa başlık eklendi.
- ☐ Kapak sayfasında, yazar isimleri açık olarak yazıldı (kısaltma yok).
- ☐ Kapak sayfasına dipnot (varsa) eklendi.
- ☐ Türkçe başlık yazıldı.
- ☐ Türkçe özet yazıldı.
- ☐ Türkçe anahtar kelimeler (alfabetik sıralı ve ilk kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük harfle yazıldı) verildi.
- ☐ İngilizce başlık yazıldı.
- ☐ İngilizce özet yazıldı.
- ☐ İngilizce anahtar kelimeler verildi.
- ☐ Şekillerin orijinal halleri eklendi.
- ☐ Metin içinde şekiller ardışık numaralandı.
- ☐ Şekil boyutları min.=8x20; max.=16x20 cm.
- ☐ Metin içinde tablolar ardışık numaralandı.
- ☐ Tablo boyutları min.=8x20 cm; max.=16x20 cm.
- ☐ Şekil ve tabloların metin içinde gelmesi istenilen yer belirtildi.
- ☐ Şekiller listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- ☐ Her şekil ayrı sayfaya yerleştirildi.
- ☐ Tablolar listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- ☐ Her tablo ayrı sayfaya yerleştirildi.
- ☐ Kaynaklar yazım kurallarına uygun yazıldı.
- ☐ Yazışma adresi verildi.

FINAL CHECKLIST

Before you submit your work, please take the time to be certain that your paper (and other writings as applicable) is in the correct format and that you have included everything necessary by checking it against this checklist.

- ☐ Copyright Release Form has been enclosed, completed and signed by all authors (<http://ercvet.gmail.com>).
- ☐ Entire paper has been 5 mm double-spaced (abstract, tables, captions/legends, references).
- ☐ Margins have been 2,5 cm each side.
- ☐ Font size has been 10 pt (Arial).
- ☐ Lines have been numbered.
- ☐ Title of the manuscript has been written bold and short title added on the cover page.
- ☐ Author(s) names have been fully written (not abbreviated) on the cover page.
- ☐ Footnote has been given on the cover page (if necessary)
- ☐ English title has been given.
- ☐ English summary has been given.
- ☐ English keywords have been given alphabetically.
- ☐ Turkish title has been given.
- ☐ Turkish summary has been given.
- ☐ Turkish keywords have been given alphabetically.
- ☐ Original figures have been enclosed.
- ☐ Original figures have been prepared correctly according to instructions.
- ☐ Figures have been referred to consecutively in the paper.
- ☐ Dimensions of figures have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- ☐ Tables have been referred to consecutively in the paper.
- ☐ Dimensions of tables have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- ☐ Figures and tables have been stated requiring put on the manuscript.
- ☐ Names of figures have been given on a separate page as figure list.
- ☐ Each figure has been given on a separate page.
- ☐ Names of tables have been given in a separate page as table list.
- ☐ Each table has been given on a separate page.
- ☐ References has been typed according to instructions.
- ☐ Corresponding address has been given.