



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2017; 31 (2): 123 - 130
<http://www.fusabil.org>

Fulya BENZER¹
Mine ERİŞİR²
Ayşe KILIÇ³
Bülent TAŞDEMİR⁴
Osman GÜLER⁵
Halil ŞİMŞEK⁶
Sema TEMİZER OZAN²

¹ Munzur Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü,
Tunceli, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

³ Fırat Üniversitesi,
Sivrice Meslek Yüksekokulu,
Elazığ, TÜRKİYE

⁴ Elazığ Veteriner Kontrol ve
Araştırma Enstitüsü,
Elazığ, TÜRKİYE

⁵ Munzur Üniversitesi,
Petek Sakine Genç Meslek
Yüksekokulu,
Tunceli, TÜRKİYE

⁶ Bingöl Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu,
Bingöl, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 28.04.2017
Kabul Tarihi : 12.07.2017

Yazışma Adresi
Correspondence

Mine ERİŞİR

Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

mineerisir@yahoo.com

***Ornithobacterium rhinotracheale* ile Enfekte Edilen Broylerlerde Lipid Peroksidasyon ve Bazı Antioksidanlar Üzerine Enrofloksasin ve Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkisi ***

Bu araştırmada 4 haftalık 96 broyler civciv 8 gruba bölündü. I. Kontrol Grubu, II. Antibiyotik Grubu, III. Kafeik asit fenetil ester (KAFE) Grubu, IV. Antibiyotik+KAFE Grubu, V. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) Grubu, VI. ORT+Antibiyotik Grubu, VII. ORT+KAFE Grubu ve VIII. ORT+Antibiyotik+KAFE Grubu. ORT 3263/91 suşunu (serotip A) 3.8×10^8 CFU/mL içeren inokulum aerosol olarak verildi (Grup V-VIII). Gruplara antibiyotik ve KAFE uygulanmasına ORT verilmesinden sonraki 17. günde aynı zamanda başlatıldı. 6 gün süre ile enrofloksasin (10 mg/kg/gün) içme sularına katıldı (Grup II, IV, VI, VIII), KAFE (10 µmol/kg) i.p olarak uygulandı (Grup III, IV, VII, VIII). ORT enfeksiyonu sonucu akciğer dokusunda malondialdehit (MDA) düzeyi ($P < 0.01$) ve superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ($P < 0.05$), trake dokusunda MDA ($P < 0.001$) ve glutatyon (GSH) ($P < 0.05$) düzeyi ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ($P < 0.01$) aktivitesi arttı, akciğerde GSH-Px ($P < 0.001$) ve katalaz (KAT) aktiviteleri ise ($P < 0.05$) azaldı. Akciğerde kontrol grubuna antibiyotik ve KAFE tek başına ve birlikte uygulanması MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artışa ($P < 0.05$), GSH-Px ($P < 0.01$) ve KAT ($P < 0.001$) aktivitelerinde önemli azalmaya sebep oldu. ORT enfeksiyonu sonucu akciğer dokusunda meydana gelen MDA seviyesindeki artış üzerine antibiyotik ve KAFE tek başına ve birlikte önemli azaltıcı etki gösterdi ($P < 0.001$). Trekada kontrol grubuna tek başına antibiyotik ve Ant+KAFE uygulanması sonucu MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış ($P < 0.001$) saptandı. Enfeksiyon grubunda Ant ve KAFE'nin tek başına ve birlikte verilmesinin artan MDA üzerine önemli bir etkisi bulunmadı. Enrofloksasin ve KAFE enfeksiyon durumunda akciğer oksidatif hasarını önlerken treka için etkili bulunmadı. Enrofloksasin ve KAFE kanatlılarda bakteriyel akciğer hastalıklarında oksidatif hasarı azaltmak için önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Ornithobacterium rhinotracheale*, enrofloksasin, kafeik asit fenetil ester, oksidant-antioksidant durum

The Effects of Enrofloxacin and Caffeic Acid Phenethyl Ester on Lipid Peroxidation and Some Antioxidants in Broilers Infected by *Ornithobacterium rhinotracheale*

In this study, 96 broiler chicks aged 4 weeks were divided into 8 groups. The groups were; I. Control, II. Antibiotic, III. caffeic acid phenethyl ester (CAPE), IV. Antibiotic+CAPE, V. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), VI. ORT+Antibiotic, VII. ORT+CAPE and VIII. ORT+Antibiotic+CAPE. An inoculum of the ORT 3263/91 strain containing 3.8×10^8 CFU/mL was given as aerosol (Groups V-VIII). The administration of antibiotic and CAPE to the groups was started at the same time on the 17th day after giving the ORT. Enrofloxacin (10 mg/kg/day) was added to drinking water (Groups II, IV, VI, VIII), CAPE (10 µmol/kg) was applied as i.p (Groups III, IV, VII, VIII) for 6 days. ORT infection increased malondialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD) activity in lung tissue, MDA, glutathione (GSH) levels and glutathione peroxidase activity (GSH-Px) activity in trachea tissue, while decreased GSH-Px and catalase (CAT) activities in lung ($P < 0.05$). In lungs, the administration of antibiotic and CAPE alone and in combination to control group caused significant increase in the MDA level ($P < 0.05$), significant decrease in GSH-Px and CAT activities ($P < 0.01$). Antibiotic and CAPE alone and in combination caused significant reduction effect on the increased MDA level in the lung tissue due to ORT infection ($P < 0.001$). In trachea, the administration of antibiotic alone and antibiotic+CAPE to control group caused the significant increase in MDA level ($P < 0.001$). In the infection group, the administration of antibiotic and CAPE did not have a significant effect on the increased MDA level. The administration of antibiotic and CAPE prevented lung oxidative damage in the case of infection, but were not effective in trachea. Enrofloxacin and CAPE can be recommended to reduce oxidative damage in bacterial lung diseases in poultry.

Key Words: *Ornithobacterium rhinotracheale*, enrofloxacin, caffeic acid phenethyl ester, oxidant-antioxidant status

Giriş

Entansif tavukçuluğun en önemli problemlerinden olan solunum sistemi hastalıkları; ölüm oranında artış, yumurta veriminde düşme, yumurta kalitesinde bozulma, döllülük oranında azalma ve hastalanma oranında artışa sebep olarak ağır

* Bu araştırma Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından desteklenmiştir (TAGEM/HS/09/12/03/153).

ekonomik kayıplar oluşturmaktadır (1). *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) gram negatif, pleomorfik, sporsuz, hareketsiz, çomak biçimli bir bakteridir (2). *O.rhinotracheale* tavuk ve hindilerde primer patojen etken olup, oluşturduğu hastalık kısaca ORT olarak isimlendirilmektedir (3, 4). Enfeksiyon 4-6 haftalık broylerlerde yem tüketiminde azalma, büyümede gerileme, depresyon, sinüzit, burun ve göz akıntısı, solunum bozuklukları, ölüm oranında artış gibi semptomlarla seyretmektedir (5, 6).

Kanatlı sektöründe bakteriyel hastalıkların önlenmesi, sağaltımı ve yayılma oranının düşürülmesi amacıyla çeşitli antibakteriyeller kullanılmaktadır. Sentetik bir florokinolon olan Enrofloksasin, veteriner hekimlikte solunum ve sindirim yolu enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (7). Enrofloksasin, florokinolon karboksilik bir antibakteriyel ajandır ve DNA girazı inhibe ederek bakterilerin DNA replikasyonunu, dolayısıyla DNA sentezini engelleyerek bakteriositik etki gösterir (8).

Reaktif oksijen türleri (ROT); hücrelerde normal biyokimyasal reaksiyonlar sırasında meydana gelen son derece toksik bileşiklerdir (9). ROT lipid, protein ve nükleik asit gibi makromolekülleri okside edebilirler. Özellikle hücre zarlarında bulunan doymamış yağ asitleri oksidasyona duyarlı olup bunların oksidasyonu lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını başlatır. Lipid peroksidasyonu sonucu, lipid peroksitler ve diğer ara ürünler oluşur (10) ve hücre membranlarının özelliklerini ve fizyolojik fonksiyonlarını etkileyen bu ürünlerin en yaygını malondialdehit (MDA)'dir (11).

ROT'un zararlı etkilerine karşı hücrelerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri bulunur. Bunlar superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (KAT) gibi enzimatik ve glutatyon (GSH), α -tokoferol, karotenoidler ve C-vitamini gibi enzimatik olmayan antioksidanlardır (12, 13).

Kafeik asit fenetil ester (KAFE) flavonoid bir bileşik olup, bal arılarının bitki özlerinden topladığı propolisin aktif bir bileşenidir. KAFE immünomodülatör, antiviral, antitümör, antiallerjik, antiinflamatuvar, antifibrotik, antiproliferatif, antikanser gibi geniş bir terapötik yelpazeye sahip olması yanında antimikrobiyal ve antioksidan olduğu da gösterilmiştir (14-16).

Kanatlılarda bakteriyel solunum sistemi hastalıklarında solunum sisteminin oksidan ve antioksidan durumunu inceleyen araştırmalar sınırlı olup (17), bu araştırmada ORT enfeksiyonu sırasında broylerlerin akciğer ve trake dokusunda meydana gelen serbest radikal hasarı ve antioksidan sistemdeki değişim üzerine Enrofloksasin ve KAFE'nin tek başına ve birlikte uygulanmasının etkilerinin araştırılması amaçlandı. Ayrıca KAFE'nin antimikrobiyal ve antioksidan özelliği göz önüne alınacak olursa, bu çalışma ile kanatlılarda KAFE'nin bakteriyel solunum sistemi enfeksiyonlarında meydana gelen serbest radikal hasarını önlemede ne

derece faydalı olacağı konusunda bir sonuca varılması da amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Etken: *Ornithobacterium rhinotracheale* B 3263/91 (serotip A) suşu, Dr. Hafez Mohamed Hafez, Institute of Poultry Diseases, Free University Berlin, Almanya'dan temin edildi. ORT B 3263/ 9 (serotip A) suşundan inokulum hazırlandı. Bakterinin %7 kanlı agara ekimi yapıldı, %5-10 CO₂'li ortamda 48 saat inkube edildi. Bakteriyel süspansiyon 3.8x10⁸ koloni oluşturan hücre sayısı (Colony Forming Units: CFU/mL) olarak civcivleri infekte etmek için kullanıldı. Kültür izolasyonu için, akciğer ve trachea örnekleri aseptik olarak %7 koyun kanı içeren beyin kalp infüzyon agarı (BHIA) ve MacConkey agara ekim yapıldı. 48 saat %5-10 CO₂ lik atmosferde mikroaerofilik ortamda üremeye bırakıldılar. Bakterinin identifikasyonu koloni morfolojisi, gram boyama ve biyokimyasal testlere göre yapıldı.

ORT Suşunun Antibiyotik Duyarlılık Testi: Oksitetrasiklin, Enrofloksasin, Amoksisilin-Klavulanik asit, Gentamisin, Eritromisin, Trimetoprim-Sülfametoksazol, Ampisilin, Streptomisin, Penisilin ve Sefalekssin etken maddelerini içeren antibiyotik diskleri firmalardan temin edilerek antibiyogram testinde kullanıldı. *Ornithobacterium rhinotracheale* suşunun antibiyotiklere duyarlılığı Kirby Bauer disk difüzyon yöntemine (18) göre yapıldı. Mueller Hinton Agar (Merck) besi yeri üzerine antibiyotik diskleri (Oksitetrasiklin, Enrofloksasin, Amoksisilin-Klavulanik asit, Gentamisin, Eritromisin, Trimetoprim-Sülfametoksazol, Ampisilin, Streptomisin, Penisilin ve Sefalekssin) yerleştirildi ve 37 °C'de 24 saat inkube edildi. Bir gecelik inkubasyondan sonra petrillerdeki inhibisyon zon çapları cetvel ile ölçüldü. The National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS)'in önerdiği duyarlı ve dirençli sınırlarına göre değerlendirme yapıldı. Yapılan antibiyogram testi sonucu en duyarlı antibiyotiğin Enrofloksasin olduğu belirlendi.

Deney Aşaması: Çalışmamızda yerel etik kurulu onayı (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, No: 23.10.2008-6) alındıktan sonra kuluçkadan çıkan 96 adet civciv önceden dezenfekte edilmiş binaya alınarak 4 haftalık olana kadar büyütüldü. Daha sonra 48 adet civciv bir başka binaya alınarak, 4 ayrı bölmeye ayrıldı, bu civcivlere ORT 3263/91 suşu (serotip A) verildi. Diğer 48 civciv ise kontrol olarak ilk alındıkları binada kaldılar, bu civcivler de 4 ayrı bölmeye ayrıldı (Her bölme 2 m²). Gruplara enrofloksasin (19) ve KAFE uygulaması (20, 21), civcivler 4 haftalık olduktan sonraki 17. günde aynı zamanda başlatıldı. Büyütme ünitesinde 23 saat aydınlık, 1 saat karanlık aydınlatma programı uygulanırken, nem oranı %50-70'e ayarlandı. Sıcaklık ise 27 °C'den başlatılıp her hafta 2 derece azaltılıp, 4. haftadan sonra 18-21 °C arasında sabitlendi. Çalışmada NRC (22) standartlarına göre mısır ve soya küspesine dayalı 0-21. günler arası etlik civciv yemi (%23 HP, 3.200 kcal/kg ME), 22-42. günler arası etlik piliç yemi

(%20 HP, 3.200 kcal/kg ME) ve 43-56. günler arası son dönem etlik piliç yemi (%18 HP, 3.200 kcal/kg ME) rasyonları olmak üzere 3 karma yem izokalorik ve izonitrojenik olarak özel bir yem fabrikasına hazırlattırıldı. Gruplar;

I. Kontrol Grubu: Normal civciv büyütme yemi ile deney süresince bakım ve beslenmesi yapıldı.

II. Antibiyotik Grubu: Enrofloksasin (10 mg/kg/gün), 6 gün süre ile tek başına içme sularına katıldı.

III. KAFE Grubu: 6 gün boyunca KAFE (10 µmol/kg) i.p olarak uygulandı.

IV. Antibiyotik+KAFE Grubu: Enrofloksasin (10 mg/kg/gün) içme suyuna katılarak, KAFE (10 µmol/kg) i.p olarak 6 gün süre ile uygulandı.

V. ORT Grubu: ORT 3263/91 suşu (serotip A) mililitre başına 3.8×10^8 CFU/mL içeren inokulum aerosol olarak verildi.

VI. ORT+Antibiyotik Grubu: ORT 3263/91 suşu (serotip A) mililitre başına 3.8×10^8 CFU/mL içeren inokulum aerosol olarak verildi. 17. günde enrofloksasin uygulanmasına başlandı ve 6 gün süre ile tek başına enrofloksasin (10 mg/kg/gün) içme sularına katıldı.

VII. ORT+KAFE Grubu: ORT 3263/91 suşu (serotip A) mililitre başına 3.8×10^8 CFU/mL içeren inokulum aerosol olarak verildi. 17. günde KAFE (10 µmol/kg i.p olarak) uygulanmasına başlandı ve uygulama 6 gün sürdü.

VIII. ORT+Ant+KAFE Grubu: ORT 3263/91 suşu (serotip A) mililitre başına 3.8×10^8 CFU/mL içeren inokulum aerosol olarak verildi, 17. günde enrofloksasin (10 mg/kg/gün) içme sularına katılarak, KAFE (10 µmol/kg) i.p olarak 6 gün süre ile uygulandı.

Enrofloksasin ve KAFE uygulaması sonunda, 7. günde piliçler kesilerek akciğer ve treka dokuları alındı ve analiz yapıncaya kadar -80°C 'de muhafaza edildiler.

Analizler: Doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında suyu alındıktan sonra tartılarak %1.15'lik KCl içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırıldı ve kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde $+4^\circ\text{C}$ 'de 3.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlarda MDA, SOD, GSH, KAT, GSH-Px, nitrik oksit (NO) ve protein tayinleri yapıldı.

Lipid peroksidasyon sonucu oluşan MDA tayini Placer ve ark. (23) yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA'nın TBA ile reaksiyonu temelinde dayanır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorpsiyonu 532 nm 'de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır.

SOD aktivite ölçümü ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalının nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek renk oluşması esasına dayanır. Bu şekilde üretilen süperoksit radikalının NBT'ü indirgemesi 560 nm 'de maksimum absorpsiyon veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır (24).

GSH-Px aktivite düzeyi Lawrence ve Burk (25) yöntemine göre ölçüldü. GSH-Px, okside glutatyon (GSSG)'a okside ederken kümenhidroperoksit kullanır. Renk ajanı olarak 5,5-ditiyo-bis [2-nitrobenzoik asit] (DTNB) solusyonu ile karıştırılması sonucu hem kör ve hem de örneklerde meydana gelen sarı renk kompleksinin 412 nm 'de spektrofotometre ile okunması belirlenir.

KAT aktivitesi Aebi (26) yöntemine göre yapıldı. KAT enzimi H_2O_2 'i yıkarak H_2O ve O_2 'e dönüşümünü katalize eder. H_2O_2 'in katalaz tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak ölçüldü.

GSH düzeyi Sedlak ve Lindsay (27) tarif ettiği şekilde belirlendi. Bu metot renk ajanı olarak DTNB eklendiğinde sülfidril gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması temelinde dayanmaktadır.

Nitrit ölçümü Griess reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik bir ölçümdür (28). Griess reaktifinde bulunan H_3PO_4 ile nitrit reaksiyona girer ve nitroz asit meydana gelir. Nitroz asit sulfanilamid ile reaksiyona girerek diazobenzosülfonik asiti meydana getirir. Bu da ortamda bulunan naftiletilendiaminle koyu pembe renkli bir bileşik verir, bu bileşiğin rengi spektrofotometrede 545 nm 'de okunur.

Homojenatlardaki protein miktarı standart olarak sığır serum albümini kullanılarak Lowry ve ark. (29) yöntemine göre ölçüldü.

Analizlerdeki kimyasallar Sigma-Aldrich, Merck, Fluka gibi firmalara ait olup KAFE Sigma-Aldrich firmasından, Enrofloksasin (Baytril) Bayer firmasından temin edilmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme: Bu çalışmanın istatistiksel analizlerinde SPSS 12.0 paket programı kullanıldı. Gruplar arası farklılığın önemi tek yönlü ANOVA ile grup içindeki farklılıkların derecesi Duncan testi, iki grup arasındaki farklılığın derecesi bağımsız t-testi ile analiz edildi. Veriler; ortalama \pm standart hata olarak gösterildi ve anlamlılıkları $P < 0.05$ esas alınarak değerlendirildi.

Bulgular

Akciğer dokusunda ORT enfeksiyonu sonucu MDA düzeyi ($P < 0.01$) ve SOD aktivitesi ($P < 0.05$) arttı, GSH-Px ($P < 0.001$) ve KAT aktiviteleri ($P < 0.05$) azaldı, GSH ve NO düzeyleri ise etkilenmedi ($P > 0.05$) (Tablo 1). Kontrol grubunda antibiyotik ve KAFE tek başına ve birlikte MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artışa ($P < 0.05$), GSH-Px ($P < 0.01$) ve KAT ($P < 0.001$) aktivitelerinde önemli

azalmaya sebep oldu (Tablo 2). ORT enfeksiyonu sonucu akciğer dokusunda meydana gelen MDA seviyesindeki artış üzerine antibiyotik ve KAFE tek başına ve birlikte önemli azaltıcı etki gösterdi ($P<0.001$). Antibiyotik ve KAFE tek başına ve birlikte enfeksiyon sonucu azalan KAT aktivitesinin de tekrar önemli olarak azalmasına sebep oldu ($P<0.001$) (Tablo 3).

Trake dokusunda ORT enfeksiyonu sonucu MDA ($P<0.001$) ve GSH ($P<0.05$) düzeyi ile GSH-Px ($P<0.01$) aktivitesinde artış görülürken, SOD ve KAT aktiviteleri ile NO düzeyleri etkilenmedi ($P>0.05$) (Tablo 4). Kontrol

grubunda tek başına antibiyotik ve Ant+KAFE gruplarında MDA düzeyinde istatistik olarak anlamlı artış ($P<0.001$) saptanırken, tek başına KAFE grubunda MDA da istatistik olarak önemsiz bir azalma, GSH da ise önemli bir artış ($P<0.05$) saptandı (Tablo 5). Enfeksiyon grubunda Ant ve KAFE'nin tek başına ve birlikte verilmesinin MDA üzerine önemli bir etkisi bulunmadı. Fakat tek başına KAFE grubunda MDA da istatistik olarak önemsiz, GSH düzeyinde de önemli bir azalma ($P<0.05$) saptandı (Tablo 6).

Tablo 1. ORT enfeksiyonunun broilerlerin akciğer dokusundaki serbest radikal hasarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri

	MDA nmol/g doku	SOD U/mg prot	GSH-Px Ü/g prot	KAT k/g prot	GSH nmol/g doku	NO µmol/g doku
Kontrol	4.21±0.44	0.09±0.02	48.80±1.60	6.32±0.59	1.08±0.05	65.94±0.79
ORT	5.74±0.15	0.17±0.02	36.28±1.84	4.65±0.28	1.11±0.04	66.93±0.12
P	<0.01	<0.05	<0.001	<0.05	>0.05	>0.05

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 2. Antibiyotik ve KAFE uygulamasının sağlıklı broilerlerin akciğer dokusundaki serbest radikal hasarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri

	MDA nmol/g doku	SOD U/mg prot	GSH-Px Ü/g prot	KAT k/g prot	GSH nmol/g doku	NO µmol/g doku
Kontrol	4.21±0.44 ^b	0.09±0.02	48.80±1.60 ^a	6.32±0.59 ^a	1.08±0.05	65.94±0.79 ^{ab}
K+Ant	6.73±0.89 ^a	0.12±0.02	35.80±4.32 ^b	4.08±0.25 ^b	1.17±0.68	66.28±0.30 ^a
K+KAFE	6.75±0.17 ^a	0.12±0.02	38.26±3.87 ^b	5.75±0.47 ^a	1.15±0.03	66.69±0.16 ^a
K+Ant+KAFE	7.53±1.17 ^a	0.10±0.01	33.45±0.88 ^b	4.25±0.24 ^b	1.13±0.03	64.73±0.36 ^b
P	<0.05	>0.05	<0.01	<0.001	>0.05	<0.05

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 3. Antibiyotik ve KAFE uygulamasının ORT ile enfekte broilerlerin akciğer dokusundaki serbest radikal hasarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri

	MDA nmol/g doku	SOD U/mg prot	GSH-Px Ü/g prot	KAT k/g prot	GSH nmol/g doku	NO µmol/g doku
ORT	5.74±0.15 ^a	0.17±0.02	36.28±1.84	4.65±0.28 ^a	1.11±0.04	66.93±0.12
ORT+Ant	4.21±0.28 ^b	0.22±0.02	39.71±2.16	2.78±0.20 ^c	1.14±0.02	66.88±0.52
ORT+KAFE	4.25±0.23 ^b	0.18±0.01	38.23±1.76	3.99±0.10 ^b	1.26±0.04	66.42±0.31
ORT+Ant+KAFE	4.83±0.32 ^b	0.21±0.01	37.83±3.85	3.29±0.17 ^c	1.18±0.02	67.29±0.24
P	<0.001	>0.05	>0.05	<0.001	>0.05	>0.05

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 4. ORT enfeksiyonunun broilerlerin trake dokusundaki serbest radikal hasarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri

	MDA nmol/g doku	SOD U/mg prot	GSH-Px Ü/g prot	KAT k/g prot	GSH nmol/g doku	NO µmol/g doku
Kontrol	4.21±0.44	0.43±0.03	91.71±6.35	6.24±0.62	2.69±0.12	65.94±0.79
ORT	11.51±0.96	0.40±0.02	132.85±9.17	4.65±0.28	3.05±0.06	66.93±0.12
P	<0.001	>0.05	<0.01	>0.05	<0.05	>0.05

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 5. Antibiyotik ve KAFE uygulamasının sağlıklı broilerlerin trake dokusundaki serbest radikal hasarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri

	MDA nmol/g doku	SOD U/mg prot	GSH-Px Ü/g prot	KAT k/g prot	GSH nmol/g doku	NO µmol/g doku
Kontrol	4.41±0.64 ^b	0.43±0.03	91.71±6.35	8.84±1.10	2.69±0.12 ^{ab}	65.84±0.89
K+Ant	11.03±0.47 ^a	0.40±0.04	96.68±4.59	11.67±1.14	2.64±0.09 ^c	66.78±0.20
K+KAFE	3.77±0.35 ^b	0.41±0.05	99.25±5.16	10.65±1.51	3.04±0.08 ^a	66.03±0.23
K+Ant+KAFE	8.46±2.35 ^a	0.43±0.06	104.16±6.74	8.93±0.86	2.92±0.02 ^{ab}	64.74±0.67
P	<0.001	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 6. Antibiyotik ve KAFE uygulamasının ORT ile enfekte broilerlerin trake dokusundaki serbest radikal hasarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri

	MDA nmol/g doku	SOD U/mg prot	GSH-Px Ü/g prot	KAT k/g prot	GSH nmol/g doku	NO µmol/g doku
ORT	11.51±0.96	0.40±0.02	132.85±9.17	9.70±0.39	3.05±0.06 ^a	67.61±0.42
ORT+Ant	11.32±1.48	0.37±0.04	135.66±8.55	11.52±0.68	3.13±0.15 ^a	67.24±0.30
ORT+KAFE	9.62±1.51	0.45±0.05	163.91±11.66	12.73±2.05	2.69±0.10 ^b	66.59±0.64
ORT+Ant+KAFE	10.66±0.40	0.38±0.02	140.50±5.88	11.34±0.90	3.25±0.12 ^a	67.20±0.30
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tartışma

Aşırı ROT üretimi ve/veya antioksidan kapasitedeki azalma oksidatif stresin sebebidir. Broilerlerin trake ve akciğer dokusunda MDA düzeyindeki istatistik olarak önemli artış ve NO düzeyindeki önemsiz artış ORT enfeksiyonu sonucu oksidatif stresin oluştuğunun göstergesidir (Tablo 1) (17). Benzer olarak *Klebsiella pneumoniae* ve *Stenotrophomonas maltophilia* ile flagellarının intranasal, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Streptococcus pneumoniae*'nin intratrakeal olarak verildiği farelerin ve *Mycobacterium tuberculosis*'li kobayların akciğer homojenatlarında MDA ve NO değerlerinin önemli olarak arttığı tespit edilmiştir (30-34). İnsanlarda da serum MDA seviyelerinin üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlu hastalarda değişen derecelerde istatistiksel olarak arttığı bulunmuştur (35). MDA düzeyi, enfeksiyonu takiben doku hasarının bir göstergesidir (31). Bu çalışmada akciğer ve trake MDA düzeylerine bakıldığında ORT enfeksiyonu akciğere göre trakede daha şiddetli oksidatif hasara sebep olmuştur (Tablo 1, 4).

Mikroorganizmaların vücuda girmesi sonucu oluşan enfeksiyon durumunda serbest radikal üretiminde önemli bir artış olmaktadır (35). Normalde solunum yolu epiteli, endojen ve eksojen ROT yüküne karşı antioksidan enzim ve moleküllerle korunur. Hücre içi enzimler arasında SOD, KAT, GSH-Px bulunurken, enzimatik olmayan başlıca antioksidanlar GSH, E ve C vitamini, ürik asit, beta-karotendir (36). Antioksidan enzimler ROT'un şekillenmesini baskılayarak veya etkilerini engelleyerek oksidatif hasara karşı hücrel savunmanın ilk hattı olarak göz önünde tutulur. SOD enzimi süperoksit radikallerini hızla hidrojen perokside dönüştüren ve

antioksidan savunmada rol alan ilk enzimlerden birisidir (34). Xu ve ark. (37)'ları pulmoner tüberkülozlu hastaların serumunda SOD'un arttığını ve SOD'un pulmoner tüberkülozisin teşhisi için potansiyel biomarker olabileceğini önermişlerdir. *Mycoplasma bovis* ile enfekte olan buzağılarda oluşan bronkopneumonide, dejenere bronşial epitel hücrelerinde SOD ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (38). Bu çalışmada da ORT enfeksiyonu sonucu akciğer dokusunda SOD aktivitesinin önemli olarak arttığı tespit edilmiştir (Tablo 1). Akciğerlerdeki SOD'un hyaluronan oksidatif fragmentasyonunu önleyerek inflamasyonu inhibe edebildiği gösterilmiştir (39). Bundan dolayı ORT enfeksiyonu sonucu artan SOD, kanatlılarda da akciğerdeki oksidan-antioksidan dengeyi sürdürmede anahtar rol oynayabilir ve akciğeri koruyucu faktör olabilir. ORT enfeksiyonu sonucu trakede SOD aktivitesinin değişmemesi trakede MDA artışının akciğerden fazla olmasının sebebi olabilir (Tablo 1, 4).

Benzer olarak *Streptococcus pneumoniae* ile *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte edilen farelerin akciğerlerinde SOD aktivitesi artarken (34, 40), GSH-Px aktivitesi (40), GSH düzeyi (34) azalmıştır. Broilerlerde de ORT enfeksiyonu sonucu akciğer dokusunda SOD aktivitesi önemli olarak artarken GSH-Px ve KAT aktivitesinin azaldığı tespit edildi (Tablo 1). Yine ratlarda çeşitli bakterilerin sebep olduğu pneumonide ve akciğer hasarında SOD, GSH-Px, KAT aktivitesi ve GSH seviyesinin azaldığı, bakterial akciğer hasarlarında antioksidan savunma sistemlerinin zayıfladığı, oksidan-antioksidan durumdaki değişikliklerin bakterilerin sebep olduğu akciğer hasarında önemli rol aldığı bildirilmiştir (33, 41). GSH-Px ve KAT, SOD'un oluşturduğu hidrojen

peroksidi su ve oksijene çevirir (34). Bu çalışmada akciğerde SOD artmasına rağmen, GSH-Px ve KAT'daki azalma sonucu oksidatif stres engellenemedi.

GSH, tüm memeli hücrelerinde bulunan, intrasellüler ve ekstrasellüler en önemli kritik antioksidanlar arasındadır (32). Akciğerden farklı olarak trakede hem GSH-Px aktivitesinde hemde GSH seviyesinde önemli artış saptandı (Tablo 4). Safarian ve Karapetian (42) çalışmalarında pulmoner tüberkülozlu hastaların kanında SOD, GSH-Px ve glutatyon redüktaz (GR) enzimlerini yüksek bulmuşlar ve bunu lipid peroksidasyonun artması nedeniyle kompensatuar olarak antioksidan enzimlerin artmasına bağlamışlardır. Hermes-Lima ve ark. (43) antioksidan savunmalarının aktivasyonunun, oksiradikallerin üretimini azaltmak için oksidatif strese karşı koruyucu bir mekanizma olduğunu önermişlerdir.

Antibiyotiklerin organizmadaki oksidatif durumu etkilediği gösterilmiştir (44). Antimikrobiyal ajanlardan enrofloksasin, karaciğer mikrozomal enzimlerinden olan sitokrom P450 tarafından okside edilir, bu oksidasyon sırasında üretilen serbest radikaller lipid peroksidasyona neden olmaktadır (45). Enrofloksasinin sazan balığının karaciğerinde ROS ve MDA'yı artırdığı ve total antioksidant kapasiteyi ise azalttığı tespit edilmiştir (46). Bu çalışmada enfeksiyon yok iken tek başına enrofloksasin uygulaması akciğer ve trake dokusunda MDA düzeyinde önemli artışa, akciğer dokusunda GSH-Px ve KAT aktivitelerinin ise azalmasına neden oldu (Tablo 2, 5). Bu bulgular enrofloksasinin sağlıklı akciğer ve trake dokusunda oksidatif strese sebep olduğunun açık göstergesidir. Bu araştırma ile enrofloksasinin kanatlı akciğer ve trake dokusunda sitotoksik etkisi için ilk bulgular elde edildi. Antibiyotiklerin metabolizmaları esnasında ROT üretilmediği gibi antibiyotikler bakterilere cevap olarak da hücre içi ROT üretimini artırabilir (47). ORT'li grupta akciğer dokusunda artan MDA değerlerini enrofloksasin uygulaması düşürürken, ilginç olarak treka üzerine etkisinin olmadığı görüldü (Tablo 3, 6).

Kaynaklar

1. Hafez HM. Current status on the *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) infection in poultry. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1998; 111: 143-145.
2. Tahseen A. *O. rhinotracheale* developing into a serious infection. World Poult Misset 1997; 3: 47-48.
3. Sprenger SJ, Back A, Shaw DP, et al. *O. rhinotracheale* infection in turkeys: Experimental reproduction of the disease. Avian Dis 1998; 42: 154-161.
4. Van Veen L, Van Empel P, Fabri T. *O. rhinotracheale*, A primary pathogen in broilers. Avian Dis 2000; 44: 896-900.
5. Van Beek PN, van Empel PC, van den Bosch G, et al. Respiratory problems, growth retardation and inflammation of joints in turkeys and broilers caused by a pasteurilla-like bacterium: *O. rhinotracheale* or 'taxon 28'. Tijdschr Diergeneeskde 1994; 119: 99-101.
6. Hafez HM. Current status on the role of *O. rhinotracheale* (ORT) in respiratory disease complexes in poultry. Arch Geflugelkd 1996; 61: 208-211.
7. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Díaz MJ, et al. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. Am J Vet Res 1995; 56: 501-506.
8. Fernandes PB. Mode of action, and in vitro and in vivo activities of the fluoroquinolones. J Clin Pharmacol 1988; 28: 156-168.
9. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 1993; 49: 481-493.
10. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fiziopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
11. Comporti M. Three models of free radical induced cell injury. Chem Biol Interact 1989; 72: 1-56.

12. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E. Oxidative stress, antioxidants and animal function. J Dairy Sci 1993; 76: 2812-2823.
13. Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: Vitamins E and C and carotenoids. Diabetes 1997; 46: 14-18.
14. Ma Y, Zhang JX, Liu YN, et al. Caffeic acid phenethyl ester alleviates asthma by regulating the airway microenvironment via the ROS-responsive MAPK/Akt pathway. Free Radic Biol Med 2016; 101: 163-175.
15. Sirmalı M, Solak O, Tezel C, et al. Comparative analysis of the protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on pulmonary contusion lung oxidative stress and serum copper and zinc levels in experimental rat model. Biol Trace Elem Res 2013; 151: 50-58.
16. Zaeemzadeh N, Hemmati A, Arzi A, et al. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on amiodarone-induced pulmonary fibrosis in rat. Iran J Pharm Res 2011; 10: 321-328.
17. Benzer F, Yılmaz S. Effects on oxidative stress and antioxidant enzyme activities of experimentally induced *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broilers. J Anim Vet Adv 2009; 8: 548-553.
18. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Path 1966; 45: 493-496.
19. Altınordulu S, Eraslan G. Effects of some quinolone antibiotics on malondialdehyde levels and catalase activity in chicks. Food Chem Toxicol 2009; 47: 2821-2823.
20. Ozyurt H, Söğüt S, Yıldırım Z, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. Clin Chim Acta 2004; 339: 65-75.
21. Koxsel O, Ozdulger A, Tamer L, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. Pulm Pharmacol Ther 2006; 19: 90-95.
22. National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry. 9th revised ed. National Academy Press, 1994.
23. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems. Anal Biochem 1966; 16: 359-364.
24. Sun Y, Oberley WL, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34: 497-500.
25. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem Biophys Res Commun 1976; 71: 952-958.
26. Aebi H. Catalase in vitro assay methods. Method Enzymol 1984; 105: 121-126.
27. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 1968; 25: 192-205.
28. Lyall F, Young A, Greer IA. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1995; 173: 714-718.
29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.
30. Zgair AK, Al-Adressi AM. *Stenotrophomonas maltophilia* fimbrin stimulates mouse bladder innate immune response. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013; 32: 139-146.
31. Saini A, Harjai K, Chhibber S. Sea-cod oil supplementation alters the course of *Streptococcus pneumoniae* infection in BALB/c mice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30: 393-400.
32. Palanisamy GS, Kirk NM, Ackart DF, et al. Evidence for oxidative stress and defective antioxidant response in guinea pigs with tuberculosis. PLoS One 2011; 6: e26254.
33. Suntres ZE, Omri A, Shek PN. *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury: Role of oxidative stress. Microb Pathog 2002; 32: 27-34.
34. da Cunha LG Jr, Ferreira MF, de Moraes JA, et al. ExoU-induced redox imbalance and oxidative stress in airway epithelial cells during *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis. Med Microbiol Immunol 2015; 204: 673-680.
35. Gündoğdu S, Ertekin A. İnsanlarda üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının lipid peroksidasyonu, antioksidan savunma sistemleri üzerine etkilerinin araştırılması. YYÜ Vet Fak Derg 2006; 17: 19-25.
36. Zahlten J, Kim YJ, Doehn JM, et al. *Streptococcus pneumoniae*-induced oxidative stress in lung epithelial cells depends on pneumococcal autolysis and is reversible by resveratrol. J Infect Dis 2015; 211: 1822-1830.
37. Xu D, Li Y, Li X, et al. Serum protein S100A9, SOD3, and MMP9 as new diagnostic biomarkers for pulmonary tuberculosis by iTRAQ-coupled two-dimensional LC-MS/MS. Proteomics 2015; 15: 58-67.
38. Hermeyer K, Jacobsen B, Spersger J, et al. Detection of *Mycoplasma bovis* by in-situ hybridization and expression of inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and manganese superoxide dismutase in the lungs of experimentally-infected calves. J Comp Pathol 2011; 145: 240-250.
39. Gao F, Koenitzer JR, Tobolewski JM, et al. Extracellular superoxide dismutase inhibits inflammation by preventing oxidative fragmentation of hyaluronan. J Biol Chem 2008; 283: 6058-6066.
40. Dominis-Kramarić M, Bosnar M, Kelnerić Z, et al. Comparison of pulmonary inflammatory and antioxidant responses to intranasal live and heat-killed *Streptococcus pneumoniae* in mice. Inflammation 2011; 34: 471-486.
41. Dwivedi VK, Soni A, Chaudhary M, et al. Fixed-dose combination of cefepime plus amikacin (potentox) inhibits pneumonia infection. Exp Lung Res 2009; 35: 621-629.
42. Safarian MD, Karapetian ET. Dynamics of the activity of antioxidant enzymes in the blood of patients with pulmonary tuberculosis. Probl Tuberk 1990; 8: 60-61.
43. Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. Comp Biochem Physiol. B-Biochem Mol Biol 1998; 120: 437-448.
44. Rizzo A, Pantaleo M, Mutinati M, et al. Effects of antibiotics on biochemical parameters, leukocytes and reactive oxygen species (ROS) in bitches after ovariectomy. Immunopharmacol Immunotoxicol 2009; 31: 682-687.

45. Gürbay A, Gonthier B, Daveloose D, et al. Microsomal metabolism of ciprofloxacin generates free radicals. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1118-1121.
46. Liu B, Cui Y, Brown PB, et al. Cytotoxic effects and apoptosis induction of enrofloxacin in hepatic cell line of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Shellfish Immunol* 2015; 47: 639-644.
47. Albesa I, Becerra MC, Battàn PC, et al. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 605-609.
48. Yildiz OG, Soyuer S, Saraymen R, et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on radiation induced lung injury in rats. *Clin Invest Med* 2008; 31: E242-247.