



**İNEKLERDE PREPARTUM VE POSTPARTUM DÖNEMDE  
ANTİMÜLLERİAN HORMON, METABOLİK PROFİL VE  
MİNERAL DÜZEYLERİNİN DOĞUM-TEKRAR GEBE KALMA  
ARALIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Mustafa İLERİTÜRK**

**Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Özgür KAYNAR**

**Doktora Tezi-2020**

**T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNEKLERDE PREPARTUM VE POSTPARTUM  
DÖNEMDE ANTİMÜLLERİAN HORMON, METABOLİK  
PROFİL VE MİNERAL DÜZEYLERİNİN DOĞUM-  
TEKRAR GEBE KALMA ARALIĞI ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Mustafa İLERİTÜRK**

**Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Özgür KAYNAR**

**ERZURUM  
2020**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**İNEKLERDE PREPARTUM VE POSTPARTUM DÖNEMDE  
ANTİMÜLLERİAN HORMON, METABOLİK PROFİL VE MİNERAL  
DÜZEYLERİNİN DOĞUM-TEKRAR GEBE KALMA ARALIĞI  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Mustafa İLERİTÜRK**

**Tez Savunma Tarihi** : 20.02.2020

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Özgür KAYNAR (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ (Atatürk Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Abdurrahman Fatih FİDAN (Afyon Kocatepe Üniversitesi)

**Jüri Üyesi** : Dr. Öğr. Üyesi Cüneyt ÇAĞLAYAN (Bingöl Üniversitesi)

**Onay**

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Duygu ARIKAN**  
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi**  
**ERZURUM - 2020**

# İÇİNDEKİLER

|                                                                     |             |
|---------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>İÇİNDEKİLER .....</b>                                            | <b>I</b>    |
| <b>TEŞEKKÜR .....</b>                                               | <b>III</b>  |
| <b>ÖZET .....</b>                                                   | <b>IV</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                | <b>V</b>    |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>                          | <b>VI</b>   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>                                         | <b>VIII</b> |
| <b>TABLolar DİZİNİ .....</b>                                        | <b>XI</b>   |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                               | <b>1</b>    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>                                       | <b>3</b>    |
| 2.1. Geçiş Döneminde Mineral Dengesizliği.....                      | 6           |
| 2.1.1. Hipokalsemi .....                                            | 6           |
| 2.1.2. Diğer Makromineral Bozukluklar.....                          | 10          |
| 2.2. Geçiş Döneminde Hormonal Adaptasyonlar .....                   | 11          |
| 2.3. Metabolik Profil .....                                         | 13          |
| 2.4. Protein Dengesinin Değerlendirilmesi.....                      | 13          |
| 2.5. Süt İneklerinde Postpartum Uterus ve Ovaryum Fizyolojisi ..... | 15          |
| 2.7. Anti-Müllerian Hormon (AMH).....                               | 19          |
| <b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>                                   | <b>21</b>   |
| 3.1. Materyal .....                                                 | 21          |
| 3.1.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Yeri.....                      | 21          |
| 3.2. Yöntem.....                                                    | 22          |
| 3.2.1. Numunelerin Toplanması .....                                 | 22          |
| 3.2.2. AMH Ölçümü .....                                             | 22          |
| 3.2.3. $\beta$ -Hidroksibütirat (BHB) Ölçümü.....                   | 23          |

|                                                         |            |
|---------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.4. Total Kolesterol Ölçümü .....                    | 24         |
| 3.2.5. Kalsiyum Ölçümü .....                            | 25         |
| 3.2.6. Magnezyum Ölçümü.....                            | 26         |
| 3.2.7. Fosfor Ölçümü .....                              | 27         |
| 3.2.8. Total Protein Ölçümü.....                        | 28         |
| 3.2.9. Triasilgliserol Ölçümü .....                     | 29         |
| 3.2.10. Serbest Gliserol Ölçümü .....                   | 30         |
| 3.2.11. Serum Lipid Profilinin Belirlenmesi.....        | 32         |
| 3.2.12. Serum Protein Profilinin Belirlenmesi.....      | 32         |
| 3.2.13. İstatistiksel Analiz.....                       | 37         |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                 | <b>38</b>  |
| 4.1. Spektrofotometrik Bulgular .....                   | 38         |
| 4.2. Kromatografik Bulgular.....                        | 48         |
| 4.3. Elektroforetik Bulgular .....                      | 59         |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                 | <b>63</b>  |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                        | <b>75</b>  |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                  | <b>76</b>  |
| <b>EKLER .....</b>                                      | <b>105</b> |
| <b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ .....</b>                             | <b>105</b> |
| <b>EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....</b> | <b>106</b> |
| <b>EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU .....</b>                | <b>107</b> |
| <b>EK-4. İZİN BELGESİ .....</b>                         | <b>108</b> |

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve bu tezi hazırlamamda bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, karşıma çıkan her türlü sorunda desteğini her zaman hissettiğim sayın danışmanım Prof. Dr. Özgür KAYNAR' a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yine bu süreç içerisinde bilgi ve deneyimleriyle tüm desteklerini bana sunan sayın hocalarım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR' e, Prof. Dr. Necati UTLU' ya, Prof. Dr. Mesut Bünyami HALICI' ya, Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR' a, Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM' a, Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Serkan EROL' a, Dr. Öğr. Üyesi Sefa KÜÇÜKLER' e, Arş. Gör. Dr. Cihan GÜR' e ve anabilim dalında doktora eğitimine devam eden Annour Adoum BATIL' a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmam ve numune toplamamda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet CENGİZ' e, yine aynı şekilde numuneleri elde etmem konusunda ve istatistik değerlendirmede değerli yardımlarını sunan Prof. Dr. Armağan HAYIRLI' ya, ayrıca tez çalışmamda büyük emekleri olan Vet. Tek. Hakan CAMCI' ya ve bu çalışmayı PRJ2015/302 proje kodu ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Son olarak desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli eşime, güzel kızıma ve her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Mustafa İLERİTÜRK**

## ÖZET

### **İneklerde Prepartum ve Postpartum Dönemde Anti-Müllerian Hormon, Metabolik Profil ve Mineral Düzeylerinin Doğum-Tekrar Gebe Kalma Aralığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı; doğum öncesi 14. günden itibaren doğum sonrası 21. güne kadarki dönemde bulunan süt ineklerindeki AMH, Ca, P, KOL, total protein, magnezyum, triaçilgliserol, BHB, serbest gliserol düzeyleri, serum lipid ve protein profilleri ile ineklerin bir sonraki tohumlama dönemindeki tohumlama sayıları arasındaki ilişkiyi incelemektir.

**Materyal ve Metod:** Hayvan materyali olarak 2. laktasyon dönemindeki 36 adet Simental ırkı inek kullanıldı. Doğuma 14 gün kala, doğum esnasında, doğum sonrası 7., 14. ve 21. günlerde *vena jugularis*’ten jelli biyokimya tüpüne kan alınıp santrifüj edilerek serum elde edildi, örnekler -80°C’de analiz edilene kadar saklandı ve analizden 1 gün önce çözdürülerek ölçümler gerçekleştirildi. Bu ineklerin tekrar tohumlama sayıları takip edilerek çalışma tamamlandı.

**Bulgular:** Gruplara göre değerlendirildiğinde anti-müllerian hormonun ve enerji durumunu yansıtan parametrelerin (TP, TAG) tohumlama sayısı üzerinde önemli bir etkisi olduğu gözlemlendi. Serum toplam yağı içerisindeki KOLE oranının doğumla birlikte aşırı yükseldiği KOL oranında ve magnezyum konsantrasyonundaki değişimin kısıtlı olduğu görüldü. Doğum esnasında yüksek miktarda  $\beta$ -Hidroksibütirat tespit edilen hayvanların tohumlama sayılarında önemli bir fark tespit edildi.

**Sonuç:** Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ineğin enerji durumunun AMH düzeyini doğrudan etkilediği bunun ise bir sonraki tohumlama döneminde gebe kalma oranını değiştirdiği görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Geçiş Dönemi, Metabolik Profil, İneklerde Gebelik, Anti-Müllerian Hormon, Tohumlama

## ABSTRACT

### **Investigation of Effects of Anti-Mullerian Hormone, Metabolic Profile and Mineral Levels upon Born-Again Pregnancy Spacing in Cows Prepartum and Postpartum Period**

**Aim:** The aim of this study was to investigate the relationship between AMH, Ca, P, cholesterol, total protein, magnesium, triacylglycerol, BHB, free glycerol levels and serum lipid and protein profiles of the dairy cattle which are within the period from 14<sup>th</sup> day to 21<sup>st</sup> day and insemination numbers in the next insemination period.

**Material and method:** 36 Simental cattle, which were at the second lactation period, were used as animal material. The blood were drawn into the jelly biochemistry tube from *vena jugularis* at the 14<sup>th</sup> days before the parturition, during parturition, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days after the postpartum, and then it was centrifuged to obtain serum and samples were kept at -80°C until the analysis. However, parameters were measured after thawing 1 day before the analysis. The study was completed by following the re-insemination numbers of these cows.

**Results:** When it was analyzed according to the groups, it was observed that anti-mullerian hormone and the parameters reflecting the energy (TP, TAG) had a significant effect upon insemination. Cholesterol ester level was highly increased in the birth period while it was seen that cholesterol and magnesium concentration changes were limited. It was determined that there was a significant difference among the insemination levels of the cattle high-level  $\beta$ -hydroxybutyrate during the parturition period.

**Conclusion:** According to the results of the study, the energy level of the cattle affected directly to AHM levels, moreover it was seen that it would affect the probability being pregnant in the next insemination period.

**Key Words:** Transition Period, Metabolic Profile, Cow Pregnancy, Anti-Mullerian Hormone, Insemination

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                |                                                |
|----------------|------------------------------------------------|
| <b>AFS</b>     | : Antral Folikül Sayısı                        |
| <b>AMH</b>     | : Anti-Müllerian Hormon                        |
| <b>APS</b>     | : Amonyum Persülfat                            |
| <b>BHB</b>     | : $\beta$ -hidroksibutirat                     |
| <b>Ca</b>      | : Kalsiyum                                     |
| <b>DAG</b>     | : Diaçilgliserol                               |
| <b>FL</b>      | : Fosfolipid                                   |
| <b>FSH</b>     | : Folikül Uyarıcı Hormon                       |
| <b>GFO</b>     | : Gliserol-3-fosfat Oksidaz                    |
| <b>GEDTA</b>   | : Glikoleterdiamintetraasetik asit             |
| <b>GH</b>      | : Büyüme Hormonu                               |
| <b>GK</b>      | : Gliserokinaz                                 |
| <b>GnRH</b>    | : Gonadotropin Salgılatıcı Hormon              |
| <b>HMG KoA</b> | : $\beta$ -Hidroksi $\beta$ -metilglutaril-KoA |
| <b>IGF-1</b>   | : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1             |
| <b>iCa</b>     | : İyonize Kalsiyum                             |
| <b>KE</b>      | : Kolesterol Esteraz                           |
| <b>KMA</b>     | : Kuru Madde Alımı                             |
| <b>KOD</b>     | : Kolesterol Oksidaz                           |
| <b>KOL</b>     | : Kolesterol                                   |
| <b>KOLE</b>    | : Kolesterol Esteri                            |
| <b>LH</b>      | : Luteinleştirici Hormon                       |
| <b>LPL</b>     | : Lipoprotein Lipaz                            |
| <b>Mg</b>      | : Magnezyum                                    |

|                 |                                                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------|
| <b>MIS</b>      | : M llerian İnhibe Edici Madde                         |
| <b>NED</b>      | : Negatif Enerji Dengesi                               |
| <b>OHSS</b>     | : Over Hiperstim lasyon Sendromu                       |
| <b>P</b>        | : Fosfor                                               |
| <b>POD</b>      | : Peroksidaz                                           |
| <b>PTH</b>      | : Parathormon                                          |
| <b>SDS</b>      | : Sodyum Dodesils lfat                                 |
| <b>SDS-PAJE</b> | : Sodyum Dodesils lfat Poliakrilamid Jel elektroforezi |
| <b>SKHK</b>     | : Subklinik Hipokalsemi                                |
| <b>SYA</b>      | : Serbest Yağ Asiti                                    |
| <b>TAG</b>      | : Tri ilgliserol                                       |
| <b>tCa</b>      | : Toplam Kalsiyum                                      |
| <b>VLDL</b>     | :  ok D   k Yoğunluklu Lipoprotein                     |
| <b>VKS</b>      | : V cut Kondisyon Skoru                                |
| <b>YKAF</b>     | : Yem Katyon-Anyon Farkı                               |
| <b>YP T</b>     | : Y ksek Performanslı İnce Tabaka                      |
| <b>YP TK</b>    | : Y ksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi       |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Negatif enerji dengesi.....                                                                             | 4  |
| Şekil 2.2. İneklerde doğumdan sonra plazma FSH, LH ve progesteron konsantrasyonları .....                          | 18 |
| Şekil 3.1. Akrilamid ve N,N'-metilen bisakrilamid'in kimyasal yapısı .....                                         | 34 |
| Şekil 3.2. Poliakrilamid jelin kimyasal yapısı. ....                                                               | 34 |
| Şekil 4.1. Serum kalsiyum konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi .....                       | 39 |
| Şekil 4.2. Serum fosfor konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi .....                         | 40 |
| Şekil 4.3. Serum total kolesterol konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi .....               | 41 |
| Şekil 4.4. Serum total protein konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi .....                  | 42 |
| Şekil 4.5. Serum magnezyum konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi .....                      | 43 |
| Şekil 4.6. Serum triaçilgliserol konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi .....                | 44 |
| Şekil 4.7. Serum AMH konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi .....                            | 45 |
| Şekil 4.8. Serum $\beta$ -Hidroksibütirat (BHB) konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi ..... | 46 |
| Şekil 4.9. Serum serbest gliserol konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi .....               | 47 |
| Şekil 4.10. T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT kromatogramı .....                                           | 48 |

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.11.</b> Doğumdan 14 gün önce T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT         |    |
| dansitogramı.....                                                                         | 49 |
| <b>Şekil 4.12.</b> Doğum anı T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT dansitogramı ..... | 49 |
| <b>Şekil 4.13.</b> Doğumdan 7 gün sonra T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT         |    |
| dansitogramı.....                                                                         | 50 |
| <b>Şekil 4.14.</b> Doğumdan 14 gün sonra T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT        |    |
| dansitogramı.....                                                                         | 50 |
| <b>Şekil 4.15.</b> Doğumdan 21 gün sonra T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT        |    |
| dansitogramı.....                                                                         | 51 |
| <b>Şekil 4.16.</b> Serum toplam yağı içerisindeki kolesterol esteri oranının doğum        |    |
| zamanındaki günlere göre değişimi .....                                                   | 52 |
| <b>Şekil 4.17.</b> Serum toplam yağı içerisindeki triaçilgliserol (TAG) oranının doğum    |    |
| zamanındaki günlere göre değişimi .....                                                   | 53 |
| <b>Şekil 4.18.</b> Serum toplam yağı içerisindeki Serbest yağ asiti (SYA) oranının doğum  |    |
| zamanındaki günlere göre değişimi .....                                                   | 54 |
| <b>Şekil 4.19.</b> Serum toplam yağı içerisindeki serbest kolesterol oranının doğum       |    |
| zamanındaki günlere göre değişimi .....                                                   | 55 |
| <b>Şekil 4.20.</b> Serum toplam yağı içerisindeki diaçilgliserol (DAG) oranının doğum     |    |
| zamanındaki günlere göre değişimi .....                                                   | 56 |
| <b>Şekil 4.21.</b> Serum toplam yağı içerisindeki fosfolipid oranının doğum zamanındaki   |    |
| günlere göre değişimi.....                                                                | 57 |
| <b>Şekil 4.22.</b> T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJ elektroforetogramı..... | 59 |
| <b>Şekil 4.23.</b> Doğumdan 14 gün önce T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE   |    |
| dansitogramı.....                                                                         | 60 |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.24.</b> Doğum anı T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE dansitogramı             | 60 |
| <b>Şekil 4.25.</b> Doğumdan 7 gün sonra T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE dansitogramı  | 61 |
| <b>Şekil 4.26.</b> Doğumdan 14 gün sonra T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE dansitogramı | 61 |
| <b>Şekil 4.27.</b> Doğumdan 21 gün sonra T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE dansitogramı | 62 |



## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 3.1.</b> Çalışma hayvanlarına verilen rasyon .....                                                                                                       | 21 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Total Kolesterol Ölçüm Prosedürü .....                                                                                                          | 25 |
| <b>Tablo 3.3.</b> Kalsiyum Ölçüm Prosedürü.....                                                                                                                   | 26 |
| <b>Tablo 3.4.</b> Magnezyum Ölçüm Prosedürü .....                                                                                                                 | 27 |
| <b>Tablo 3.5.</b> Fosfor Ölçüm Prosedürü.....                                                                                                                     | 27 |
| <b>Tablo 3.6.</b> Total Protein Ölçüm Prosedürü .....                                                                                                             | 29 |
| <b>Tablo 3.7.</b> Triasilgliserol Ölçüm Prosedürü.....                                                                                                            | 30 |
| <b>Tablo 3.8.</b> Serbest Gliserol Ölçüm Prosedürü.....                                                                                                           | 31 |
| <b>Tablo 3.9.</b> SDS-PAJE jellerinin kompozisyonları .....                                                                                                       | 36 |
| <b>Tablo 3.10.</b> Oriol Boyama Protokolü.....                                                                                                                    | 36 |
| <b>Tablo 4.1.</b> Doğum öncesi 14. gün, doğum anında ve doğumdan sonra 7., 14. ve 21.<br>günde alınan kan numunelerinin spektrofotometre ve ELISA sonuçları. .... | 38 |
| <b>Tablo 4.2.</b> Doğum öncesi 14. gün, doğum anında ve doğumdan sonra 7., 14. ve 21.<br>günde alınan kan numunelerinin YPİTK analizleri.....                     | 51 |
| <b>Tablo 4.3.</b> Çalışmada ölçülen parametrelerin birbiri ile korelasyonu.....                                                                                   | 58 |
| <b>Tablo 4.4.</b> T3 grubu serum total proteini içindeki bireysel proteinlerin miktarları<br>(volumü). .....                                                      | 62 |

# 1. GİRİŞ

Geç gebelikten erken laktasyona geçiş döneminde süt ineklerinde çok miktarda metabolik değişiklik gerçekleşmektedir.<sup>1</sup> İneğin süt verimi arttıkça, bu süre zarfında meydana gelen çoğu bulaşıcı hastalık ve metabolik bozukluk ile geçiş süreci çok daha zorlaşmaktadır.<sup>2, 3</sup> Geç gebelikte kuru madde alımının azalması, karaciğerde glikojenin yıkımlanması ile başlayıp yağ dokusundan lipid mobilizasyonu ile devam eden bir dizi metabolik yolu tetiklemektedir.

Süt sentezi için besin madde talebi erken laktasyon döneminde giderek artar ve bu gereksinimle başa çıkmak için herhangi bir destekleyici besleme stratejisi belirlenmez ve/veya uygulanmaz ise, üreme işlevleri (hormonların sentezi ve salgılanması, folikülogenez ve embriyo gelişimi) deprese edilebilir. Süt üretimi için gerekli enerji ihtiyacı doğumdan sonra ilk 4-6 haftadaki enerji alımından çok daha fazladır ve bu nedenle yüksek verimli ineklerde negatif enerji dengesi (NED) durumu şekillenmektedir.

Süt ineklerinin yaklaşık % 30-50'si geçiş döneminde bir yada daha fazla metabolik veya bulaşıcı hastalıktan etkilenmektedir.<sup>4</sup> Bunlar arasında ketozis, mastitis, metritis, retensiyo sekundinarum ve abomasum deplasmanı bulunmaktadır.

Büyüyen preantral ve antral foliküllerin granulosa hücreleri tarafından üretilen ve dimerik bir glikoprotein olan anti-müllerian hormon (AMH),<sup>5</sup> süt ineklerinde yumurtalık rezervinin bir belirtecidir.<sup>6</sup> Kan dolaşımındaki AMH konsantrasyonu farklı inekler arasında oldukça değişkendir fakat aynı inekteki ölçümler yüksek oranda tekrarlanabilirliğe sahiptir.<sup>6-9</sup> Sığırlarda kan AMH konsantrasyonundaki değişiklikler, beslenme durumu, alt tür, cins ve laktasyon sayısı ile ilişkilidir.<sup>7, 10, 11</sup> Düşük plazma AMH konsantrasyonuna sahip inekler düşük gebe kalma oranına sahiptirler.<sup>12</sup>

Bu çalışma, negatif enerji dengesinin dolaşımdaki AMH konsantrasyonu üzerine etkisini ve bu etkinin ineklerin tekrar tohumlama sayıları üzerindeki rolünü açıklamayı amaçlamaktadır.

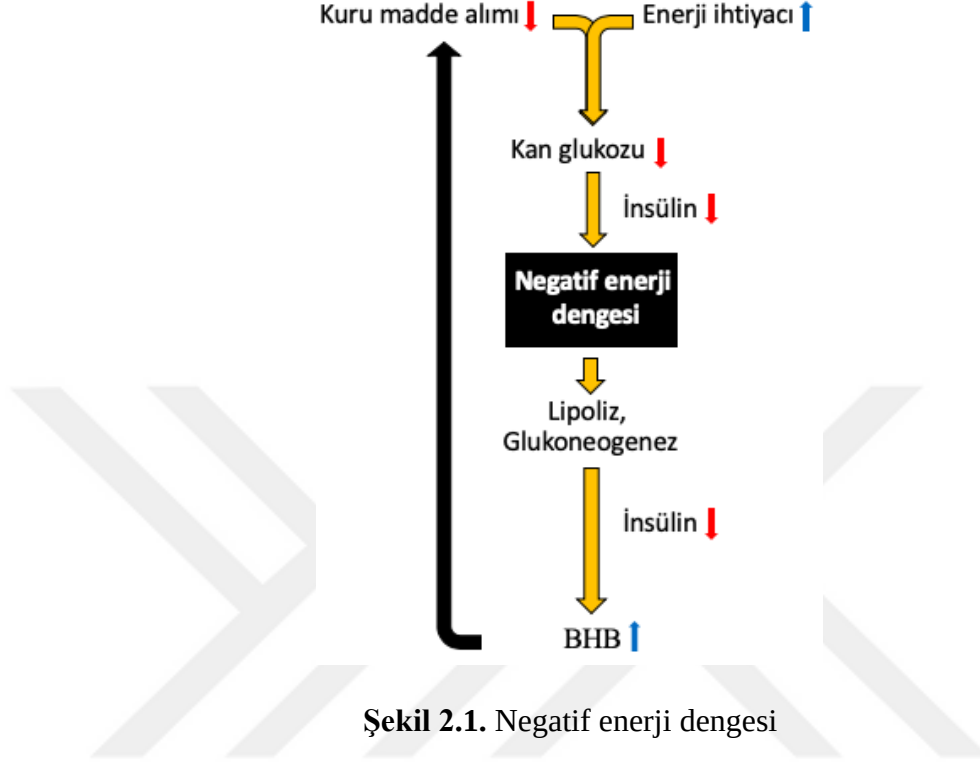


## 2. GENEL BİLGİLER

Sütçü ineklerde geçiş dönemi (transition period), birçok metabolik ve bulaşıcı hastalığın ortaya çıkmasından dolayı kritik fizyolojik değişimlerin yaşandığı doğumdan önceki 3 hafta (doğuma yakın kuru dönem - close-up dry period) ile doğumdan sonraki 3 haftayı (erken laktasyon dönem - early fresh period) kapsayan süreç olarak tanımlanmaktadır.<sup>2, 3, 13, 14</sup> Bu dönem boyunca, geç gebelikten başlayarak, süt sentezi ve sekresyonunu ile devam eden ve son olarak kararlı bir laktasyon fazına ulaşması ile inekte fizyolojik, besinsel, metabolik ve immünolojik değişimler meydana gelmektedir. Doğumdan önceki haftalarda, kuru madde alımının (KMA) % 10-30 azaldığı dönemde gebe ineğin metabolizması fetüsün yüksek besin gereksinimi ile karşı karşıya kalmaktadır.<sup>1</sup> Bu aşamada ineğin iştahının baskılanması, stres ve yönetim gibi faktörlerle KMA'yı daha da azaltmaktadır.<sup>15</sup> Bu dönemde inekte, triaçilgliserolün (TAG) meme tarafından alımının azalmasına bağlı olarak serum TAG konsantrasyonunda bir yükselme, kolesterolün (KOL) fetüs gelişimi ve steroid hormonların sentezi için kullanılmasından dolayı da düşük serum KOL konsantrasyonu görülür.<sup>16</sup>

Normal enerji ihtiyacı anında glukoz sentezi için gerekli olan ana substrat, besinsel karbohidratların rumen mikrobiyal fermentasyonundan kaynaklanan propiyonattır. Geç gebelik sırasında KMA'nın düşmesi sonucu olarak, enerji gereksinimi lipolitik ajanlara karşı artan duyarlılık ile birlikte adipoz doku ve kasta insülin direnci ile karşılanmaktadır<sup>1</sup>; bu olaylar periferik glukoz alımını azaltır ve endojen protein kaynaklarından elde edilen çoğu glikojenik amino asitler olan endojen substratların ve adipoz doku mobilizasyonundan elde edilen gliserolün kullanımını kolaylaştırır.<sup>17</sup> Doğum sırasında yaşanan enflamatuvar ve oksidatif stres, süt üretiminin başlamasıyla birlikte enerji gereksinimlerinde önemli bir artışa neden olmaktadır.<sup>18</sup> Bu sırada glukokortikoid ve östrojenindeki geçici yükseliş ile birlikte düşen plazma progesteron

seviyesi kuru madde alımını daha da azaltır.<sup>19, 20</sup> Enerji üretimi ve tüketimi arasındaki dengesizlik NED'ye neden olmaktadır.<sup>20, 21</sup> Enerjideki azalmayı tolere edebilmek için başlıca adipoz doku olmak üzere birçok dokudan daha fazla enerji mobilize edilir.



Şekil 2.1. Negatif enerji dengesi

Hem laktasyon için gerekli olan fazla miktardaki enerji hem de KMA'daki düşüşten dolayı kan glukoz düzeyinde azalma meydana gelmektedir. Glukoz konsantrasyonundaki bu düşüş ile birlikte büyüme hormonu (GH) konsantrasyonundaki artış buzağılamadan önce başlayan lipolitik aktiviteyi daha da arttırmaktadır.<sup>19, 20, 22</sup> Lipoliz sırasında, adipositler içindeki triaçilgliserol molekülleri hormona duyarlı lipazların etkisiyle parçalanır ve serbest yağ asitleri (SYA) meydana gelir. Açığa çıkan SYA, enerji kaynağı olarak kullanılmak ve negatif geri bildirim sağlayarak lipoliz hızını düzenlemek için albümin tarafından kana taşınır. Plazma SYA konsantrasyonu arttığında, karaciğer tarafından alınarak karbondioksite parçalanabilir, keton cisimlerine dönüşebilir veya yeniden esterleşerek triaçilgliserol halinde depolanabilir.<sup>19, 23, 24</sup>

Lipidler yağ dokusundan mobilize olduğundan dolayı erken laktasyon döneminde dolaşımda yüksek konsantrasyonda SYA tespit edilmektedir.<sup>25-27</sup> Dolaşımdaki SYA, çeşitli dokular tarafından enerji, meme bezi tarafından ise süt yağının kaynağı olarak kullanılabilir. Bu nedenle erken laktasyondaki hayvanların sütünde daha yüksek yağ konsantrasyonu bulunabilir.<sup>2, 25, 28-30</sup> Bununla birlikte, dolaşımdaki SYA'nın yaklaşık % 25'i karaciğer tarafından alınarak ATP üretmek için trikarboksilik asit döngüsünde kullanılabilir veya ekstrahepatik dokular tarafından enerji kaynağı olarak kullanılabilen keton cisimlerine oksitlenebilir.<sup>2, 25, 31</sup>

Serbest yağ asiti ve BHB ölçümleri birbirinin yerine kullanılmasına rağmen, erken laktasyon sırasında SYA ve BHB konsantrasyonları zayıf bir ilişkiye sahiptir ve iki metabolit arasındaki ilişkiler karşılaştırılırken dikkatli olunmalıdır.<sup>32</sup>

Periparturient dönemde karaciğerin oksidatif kapasitesini aşan SYA, TAG'ye dönüştürülerek çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) şeklinde ekstrahepatik dokulara taşınır veya karaciğerde depolanarak yağlı karaciğer sendromuna yol açar<sup>2, 24</sup> ve karaciğerin metabolik fonksiyonun azalmasına yol neden olur.<sup>2, 24, 31, 33</sup> Hepatik glukoneogenezdeki azalma üreme performansında düşüşe, metabolik sorunların artmasına, süt üretiminin azalmasına bağlı olarak ekonomik kayıpların artmasına, orta ve şiddetli yağlı karaciğer sendromunun görülmesine neden olmaktadır.<sup>33-36</sup>

SYA ve  $\beta$ -hidroksibütirat (BHB) kan konsantrasyonunun belirlenmesi, süt ineklerinde NED'ye adaptasyonun izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. SYA konsantrasyonu, lipit kaynaklarının kullanımını yansıtırken, keton cisimlerinin, özellikle periferik BHB konsantrasyonu, karaciğerin fazla miktardaki SYA'yı işleyebilme yeteneğini yansıtmaktadır.<sup>37</sup>

## **2.1. Geçiş Döneminde Mineral Dengesizliği**

Sütçü ineklerde en sık görülen mineral dengesizlikleri hipokalsemi, hipofosfatemi ve hipomagnezemi olarak bildirilmiştir. Bu minerallerin erken laktasyon döneminde anormal konsantrasyonları yatan inek sendromunun gelişiminde rol oynar.<sup>38-40</sup> Bu sendromun nedeninin anlaşılması ve oluşumunun önlenmesi hem üretim hem de hayvan refahı için önemlidir.<sup>41</sup> Geçiş dönemindeki tüm mineral dengesizliklerinin önemine rağmen, daha sıklıkla hipokalsemi incelenmiş ve sütçü inekleri etkileyen ana mineral dengesizliği olarak tanımlanmıştır.

### **2.1.1. Hipokalsemi**

#### **2.1.1.1. Tanım ve İnsidans**

Hipokalsemi olarak da bilinen düşük kan kalsiyum konsantrasyonu, iki yüzyılı aşkın bir süredir erken laktasyondaki süt ineklerinde karşılaşılan bir durum olarak rapor edilmiştir.<sup>42</sup> Şiddetine bağlı olarak hipokalsemi klinik veya subklinik olarak sınıflandırılır. Klinik hipokalsemi, ineğin yatması, uyuşukluk, hipotermi ve rumen atonisi gibi klinik bulguların gelişmesiyle karakterizedir ve 5,6 mg/dL'den daha düşük toplam kan kalsiyum konsantrasyonları ile ilişkilidir. Subklinik hipokalsemi (SKHK), görünür klinik bulgular olmadan düşük kan kalsiyum konsantrasyonuna karşılık gelir ve toplam kan kalsiyum değeri 5,6-8,0 mg/dL'dir.<sup>38, 43, 44</sup> Bununla birlikte, SKHK'yi çoklu klinik çalışmaların ve epidemiyolojik değerlendirmelerin sonuçlarına dayanarak tanımlamak için 8,0 mg/dL-8,8 mg/dL arasında değişen toplam kan kalsiyum değeri önerilmiştir.<sup>45, 46</sup>

Kuru dönem ve erken laktasyonda etkili beslenme yönetimi ve geçiş dönemi fizyolojisinin daha iyi anlaşılması, hipokalsemi insidansında %1 veya daha az bir azalmaya yol açmıştır.<sup>44, 47</sup>

### 2.1.1.2. Kalsiyum Homeostazi

Doğumdan önce günlük 30g olan kalsiyum ihtiyacı laktasyon başlangıcında 50 g'a yükselmektedir.<sup>38</sup> Bu beslenme sorununun üstesinden gelmek için kalsiyum Emilimi, kemikten mobilizasyonu ve böbrekten yeniden Emilimi artmaktadır.<sup>38, 43</sup> Erken laktasyonun karakteristiği olan düşük kan kalsiyum konsantrasyonları paratiroid bezleri tarafından paratiroid hormonlarının (PTH) salgılanmasını artırır, bu da böbrekler tarafından kalsitriol üretimini indükler. Bu iki hormonun kombine etkisi, geçiş dönemindeki süt ineklerinde fizyolojik hücre dışı kalsiyum konsantrasyonunun yeniden oluşturulması için gereklidir. Kalsitriol üretimini indüklemeye ek olarak, PTH kemik kalsiyum mobilizasyonunu başlatır ve bağırsak Emilimi yetersiz olduğu süreçte kalsiyumun tübüler reabsorbsiyonunu artırır.<sup>39</sup> Öte yandan kalsitriol, bağırsakta diyet kalsiyumunun Emilimini uyarır ve PTH varlığında kemik mobilizasyonunu sürdürür.<sup>38, 43</sup> Kalsitriol, farklılaşma aşamalarında kalsiyum taşıma kapasitelerini arttırmak için enterositleri uyarır. Bağırsak ve kemik adaptasyonlarının gelişmesi 24-48 saat sürer. Bu da doğumdan sonra SKHK'nin gelişim süresiyle neredeyse aynı bir zaman dilimidir.<sup>43, 48</sup>

Hücre dışı toplam kalsiyum (tCa) konsantrasyonu 8,5-10,0 mg/dL arasında tutulmaktadır.<sup>43</sup> Bu nedenle diyet ile alınan kalsiyumun Emilimi için bağırsak kapasitesi, kemik mobilizasyonu, renal rezorpsiyon veya kalsiyum atılımı bu dengeyi korumak için laktasyon boyunca dinamik olarak değişmektedir.<sup>39</sup> PTH ve kalsitriol arasındaki etkileşim, diyet ile alınan kalsiyumun absorpsiyonunu uyararak erken laktasyonda kalsiyum konsantrasyonunu dengeler.<sup>39</sup>

Kan tCa havuzunun sadece bir bölümünün serbest halde ve biyolojik aktiviteler için hazır olduğunu vurgulamak önemlidir. Bu kalsiyum havuzu iyonize kalsiyum (iCa) olarak adlandırılır ve esas olarak albümine bağlı şekilde kanda taşınır.<sup>49</sup> İnsanlarda iCa'un normal koşullar altında dolaşımdaki tCa'un yarısına karşılık geldiği bildirilmiştir.<sup>50, 51</sup>

Bununla birlikte, anormal dönemlerde bu tür bir ilişki sürdürülmez ve kalsiyum durumunu ortaya koymak için için iCa ölçümü gereklidir.<sup>52</sup> Doğumdan hemen sonra sütçü ineklerde iyonize Ca yüzdesi yükselmekte ve iCa:tCa oranında artış gözlenmektedir.<sup>53</sup> iCa kandaki biyoaktif kalsiyumu temsil eder, ancak belirlenmesi karmaşık ve maliyetlidir. Ancak iCa durumunu belirlemek tCa kadar etkili değildir. Bundan dolayı, tCa süt sığırcılığı araştırmalarında yaygın olarak ölçülür.

### **2.1.1.3. Hipokalseminin Önlenmesi**

Klinik ve subklinik hipokalsemiyi önlemek için yaygın olarak beslenme stratejileri kullanılır. Doğum öncesi dönemde kalsiyum açısından düşük yemlerin kullanılması etkili bir beslenme stratejisidir. Kalsiyum açısından düşük yemler, osteoklastik kemik rezorpsiyonunu aktive ederek kalsiyumu etkin bir şekilde kana aktarmaları için buzağılamadan önce enterositleri uyarmaktadır.<sup>54</sup> Bununla birlikte, kalsiyum açısından düşük yemlerin formülasyonu son derece zordur. Birçok yem bu etkiyi elde etmek için gerekli minimum kalsiyum konsantrasyonunu aşmaktadır.<sup>39</sup>

Hipokalsemiyi önlemek için önerilen bir diğer etkili beslenme stratejisi, yem katyon-anyon farkının (YKAF) azalmasına neden olan doğum öncesi anyonik tuzların takviyesidir. Anyonik tuzların kullanımı, dolaşımda bulunan fazla miktarda anyonu dengelemek için kemiklerden hücre dışı sıvıya düşük miktarda kalsiyum salınımı sonucu kan pH'ında bir düşüşe neden olur.<sup>55</sup> Mobilize olan kalsiyum, laktasyondaki yüksek süt kalsiyum talebine kadar böbrekler tarafından atılır.<sup>38, 39</sup> Bu nedenle, düşük YKAF yemlerinin erken laktasyondaki sütçü ineklerde olumlu etkileri, kalsiyumun kemiklerden mobilize edilmesi ve PTH etkisinin sürdürülmesi ile açıklanmaktadır. Düşük YKAF diyetlerinin kullanımının çok sayıda araştırma grubu tarafından buzağılamada hipokalseminin önlenmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir.<sup>56-60</sup>

Hipokalseminin üstesinden gelmek için önerilen başka bir strateji de erken laktasyon döneminde oral yolla kalsiyum takviyesinin profilaktik kullanımıdır. Doğumdan sonra kalsiyum takviyesi yapılması, yüksek verimli süt ineklerinde üretim ve sağlığı iyileştirmesinden dolayı süt endüstrisinde kullanılan önemli stratejidir.<sup>47, 61</sup> Oral yolla kalsiyum bolusu kullanımının geleneksel intravenöz tedavilerle karşılaştırıldığında, kan kalsiyum seviyesini daha kalıcı bir şekilde yükselttiği bildirilmiştir.<sup>47, 62</sup>

#### **2.1.1.4. Hipokalseminin Üreme Performansına Etkisi**

Geleneksel olarak periparturient dönemde düşük kalsiyum konsantrasyonu distosi, uterus sarkması, tutulan plasenta, mastit, azalmış yem alımı ve azalmış rumen ve abomasum motilitesi ile ilişkilendirilmiştir.<sup>43, 63-66</sup> Hipokalsemi ve daha önce bahsedilen hastalıklar arasındaki ilişki çoğunlukla düz kas kasılması için kalsiyumun önemi ile bağlantılıdır. Düşük kan kalsiyum konsantrasyonu miyometriyal kontraktilitede azalmaya neden olur. Bu azalma da uterus prolaps olasılığının artmasına ve daha sonra gebe kalmayı olumsuz etkileyen retensiyon sekondinaruma yol açmaktadır.<sup>43, 67-69</sup> Benzer olarak, kalsiyum konsantrasyonu düşük olduğunda rumen ve abomasal motilite azalır ve bu da abomasum deplasmanı riskini arttırmaktadır.<sup>45</sup> Düşük kan kalsiyum seviyeleri immün hücrelerdeki sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun azalması ile ilişkilidir. Bu durum da immün hücrelerinin periparturient dönemde enfeksiyonlara karşı tepki verme kabiliyetini etkiler.<sup>70</sup>

Hipokalseminin yumurtalık aktivitesini değiştirerek üreme performansını bozabileceğine dair kanıtlar da giderek artmaktadır. Hipokalsemi şekillenen hayvanlar ilk yumurtlamadan sonra daha küçük foliküle, daha küçük korpus luteuma ve daha düşük plazma progesteron düzeyine sahiptirler. Bu durum üreme performansının düşmesine neden olmaktadır.<sup>71-73</sup>

## **2.1.2. Diğer Makromineral Bozukluklar**

### **2.1.2.1. Hipomagnezemi**

Magnezyum (Mg), çok sayıda metabolik enzim için kofaktör olarak gerekli olan hücre içi önemli bir katyondur. Mg'un plazmadaki normal seviyelerinin korunması diyet emilimi ile ilişkilidir.<sup>43</sup> Kan Mg konsantrasyonu, diyet ile alım-renal atılım arasındaki fark tarafından belirlenmektedir. Mg'un kan konsantrasyonunun 1,8 mg/dL'nin altına düşmesi hipomagnezemi olarak tanımlanmaktadır.<sup>43, 74</sup> Hipomagnezeminin klinik bulguları hipokalseminin belirtilerine benzemektedir. Bu klinik bulgular sıklıkla azalmış yem alımı, ataksi ve tetanik kas spazmlarını içermektedir. Bununla birlikte, hipomagnezemiden etkilenen hayvanlar nadiren ciddi klinik belirtiler göstermektedir. Hipomagnezemi vakaları magnezyum eksikliğini düzelterek kolayca tedavi edilebilmektedir.<sup>75</sup> Ancak düşük kan Mg konsantrasyonu kalsiyum metabolizmasını da etkilemektedir. Hipomagnezemi ile birlikte PTH sekresyonunda azalma meydana gelir. Bu da kalsiyum homeostazının bozulmasına neden olur. Ayrıca Mg, PTH reseptörlerinin aktivasyonu için de gereklidir. Bu nedenle hipomagnezeminin meydana gelmesi PTH'ye karşı doku duyarlılığını, kemik kalsiyum rezorpsiyonunu ve böbreklerde 1,25-dihidroksivitamin D'nin üretimini azaltır.<sup>43</sup> Buna bağlı olarak, hipomagnezemik süt ineklerinin kan kalsiyum konsantrasyonunu geri kazanma yeteneği daha düşüktür.

### **2.1.2.2. Hipofosfatemi**

Erken laktasyondaki süt ineklerinde, özellikle de anoreksik ineklerde sıklıkla düşük kan fosfor konsantrasyonu görülmektedir.<sup>76</sup> Kandaki fosfor konsantrasyonunun 5,6 mg/dL'nin altına düşmesi hipofosfatemi olarak adlandırılmaktadır. Hipofosfatemi, yatalak olma ve azalmış yem alımı gibi hipokalsemi ve hipomagnezemiye benzer klinik belirtilere sahiptir. PTH, salya ve idrarda fosfor atılımını artırır.<sup>77</sup> Hipofosfatemi genellikle hipokalsemiyle ilişkilidir. Çünkü kalsiyum konsantrasyonlarını yeniden

oluşturmak için hipofosfatemiye neden olan PTH sekresyonunun artması gerekmektedir. Bu nedenle, hipofosfatemi genellikle izole bir metabolik bozukluk değil, hipokalseminin bir sonucudur. Hipofosfatemik inekleri tedavi etmek için oral ve intravenöz çözeltiler kullanılmaktadır. Hipokalsemi tedavisi ve PTH'nin azalmasından sonra kan fosfor konsantrasyonu artmaktadır.<sup>76, 77</sup>

## **2.2. Geçiş Döneminde Hormonal Adaptasyonlar**

Periparturient dönemde metabolik hormonların plazma konsantrasyonlarında büyük değişiklikler meydana gelmektedir. İnsülin, leptin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) düşerken,<sup>78-80</sup> glukagon ve büyüme hormonu (GH) artmaktadır.<sup>80, 81</sup> Ek olarak periparturient süt inekleri, GH ve insülin etkilerine karşı direnç geliştirmektedir. Bu hormonal adaptasyonlar doğum öncesinde fetüs büyümesi ve kolostrum üretimine glukoz sağlamak için gereklidir ve aynı zamanda buzağılamadan sonra üretilen bol miktarda sütü desteklemektedir.<sup>82</sup>

Geçiş döneminde insülin ve glukagon, glukoz homeostazı için iki önemli bileşiktir. Bu dönem boyunca insülin düzeyindeki fizyolojik düşüş, periferik doku tarafından glukoz alımının azalması ve yağ dokusunda artmış lipoliz ile ilişkilidir.<sup>1, 82-84</sup> Plazma insülin seviyesindeki düşüş sonucu glikojenik amino asitler üzerindeki insülin baskısı azalır ve bu da hepatik glukoz üretimine doğrudan katkı sağlamaktadır. Ayrıca düşük plazma insülini, gliserol gibi endojen olarak türetilmiş öncüllerin mevcudiyetini arttırarak dolaylı olarak hepatik glukoz üretimine katkıda bulunmaktadır.<sup>81</sup>

Erken laktasyon, dolaşımdaki yüksek glukagon konsantrasyonları ile de karakterizedir. Glukagon, esansiyel olmayan amino asitleri kullanarak hepatik glukoz sentezini arttıran glukojenik ve ürojenik enzimlerin gen ekspresyonunu arttırır.<sup>85, 86</sup> Glukagon aktivitesi, periferik dokular için alternatif enerji kaynağı sağlamak amacıyla yağ asitleri oksidasyonunu ve keton üretimini arttırmak için önemlidir.<sup>87</sup> İnsülin, çeşitli

türlerde glukagon gen transkripsiyonunu inhibe eder ve bu nedenle erken laktasyonda hipoinsülinemi glukagon üretimini arttırmaktadır.<sup>88, 89</sup> Bu nedenle, dolaşımdaki SYA ve BHB seviyelerinin artması süt ineklerinde geçiş döneminin ayırt edici özelliğidir.

Leptin, gen ekspresyonu ile yağ dokusu tarafından üretilir ve dolaşımdaki konsantrasyonu enerji dengesi durumu kadar yağlanmayı da yansıtmaktadır. Leptin konsantrasyonunda belirgin bir azalma negatif enerji dengesinin, azalmış enerji alımının ve azalmış glukoz konsantrasyonunun göstergesidir.<sup>90, 91</sup> Benzer şekilde, erken laktasyondaki süt ineklerinde, bu dönemdeki NED ile ilişkili enerji eksikliğini gösteren plazma leptin konsantrasyonunda bir azalma gözlenmektedir.<sup>78, 92-95</sup> Açlık ve erken laktasyon gibi yem alımının azaldığı dönemlerde, dolaşımdaki düşük leptin konsantrasyonu, artan gıda alımı ve düşük enerji tüketimi gibi merkezi olarak düzenlenmiş yanıtları tetiklemektedir.<sup>91</sup> Bu yanıtların amacı, vücut enerji depolarının tüketimini ve iştahı düzenleyerek enerji eksikliği durumunu tersine çevirmektir.<sup>90, 91, 96</sup> Ek olarak, daha düşük leptin konsantrasyonu tiroid hormonlarını ve periferik dokuların insüline tepkisini azaltarak glukozun süt üretimine ayrılmasını sağlamaktadır.<sup>95</sup> Erken laktasyonda düşük leptin konsantrasyonu ile desteklenen fizyolojik adaptasyonların kombinasyonu, enerji eksikliği olan ineklerde süt üretimi için gerekli olan enerji ihtiyacını desteklemesi açısından önemlidir.

Büyüme hormonu, geç gebelikten erken laktasyona kadar yükselir.<sup>1, 78, 79</sup> GH tarafından belirlenen metabolik ve fizyolojik değişiklikler, çeşitli dokulardaki GH reseptörlerinin doğrudan, karaciğer ve diğer dokulardaki IGF-1 üretiminin ise dolaylı olarak uyarılması yoluyla meydana gelebilir. Yüksek GH konsantrasyonuna rağmen, NED döneminde karaciğerdeki IGF-1 transkripsiyonu artmaz. GH direncinin bu durumu, erken laktasyondaki hipoinsülinemisinin bir sonucu olan karaciğere spesifik GH reseptörünün azaltılmış ekspresyonu ile açıklanmaktadır.<sup>97-100</sup>

### **2.3. Metabolik Profil**

Süt ineği işletmelerinde meydana gelen veya gelebilecek sorunlara önlem almak açısından en önemli noktalardan biri; metabolik profil testlerinin kullanılması ve hayvanların içinde bulundukları durumun belirlenmesidir. Fakat unutulmaması gereken diğer bir nokta ise; tek başına kan alınarak metabolik profilin belirlenmesi kesin bir sonuç için yeterli olmayabilir. Metabolik profile ilave olarak diğer verilerle birlikte toplu bir değerlendirme yapılması daha doğru bir sonuç elde edilmesini sağlayacaktır. Bu kapsamda; çevre, vücut kondisyon skoru (VKS), yönetim, hastalıkların oranı ve diğer problemler adına bilgi toplanması gerekmektedir.<sup>101</sup>

Metabolik profilin belirlenmesiyle, subklinik yangısal problemlerin neler olduğu tespit edilip, sürülerde bunlara yönelik koruyucu tedbirler alınabilmektedir. Yangı sadece klinik hastalıklarda öneme sahip olan bir durum olmayıp, aynı zamanda subklinik sorunların da oluşum nedenleri arasında yer almaktadır.<sup>102</sup> Ayrıca, yangının etkilerinin geçiş döneminde de önemli bir yere sahip olduğu bildirilmiştir.<sup>103</sup> Yangı, bu dönemde şekillenen düşük kuru madde alımı, karaciğer fonksiyonlarının yetersiz kalması, artan lipomobilizasyon, enerji giderlerinin artması gibi fizyolojik ve metabolik olayları olumsuz etkilemektedir.<sup>103</sup> Enfeksiyonlar, ateş, travma, metabolik problemler, sindirim sorunları ve oksidatif stres gibi doğum öncesi ve sonrası yangıya neden olabilecek sorunların ortadan kaldırılması gerekmektedir. Subklinik yangısal reaksiyon sonucunda metabolizma olumsuz etkilenerek ketozis ve yağlı karaciğer sendromu riski artar.<sup>20</sup> Metabolik profil testleri yapılarak beslenme kaynaklı metabolizma hastalıklarının erken dönemde belirlenerek bu problemlere karşı önlemler alınması mümkündür.<sup>104</sup>

### **2.4. Protein Dengesinin Değerlendirilmesi**

Ruminantlarda protein düzeyinin fazlalığı veya eksikliği üreme performansı üzerine negatif etkiye sahiptir. Protein miktarındaki yetersizlikler sonucunda östrus

belirtileri azalarak dölleme oranında azalma meydana gelir. Hayvanlara sunulan rasyonda, kısa zinciri yağ asidi miktarı az ve azot kaynağı fazla ise mikrobiyal protein sentezi gerçekleşmez. Bakteriler tarafından rumende amonyum iyonları formunda fazla miktarda azot salınır. Açığa çıkan amonyum rumenden emilerek dolaşıma geçer, karaciğere gelir ve amonyumdan üre oluşumu gerçekleşir. Karaciğerin üreyi detoksifiye etme kapasitesi sınırlı olup, hepatik lipidozis altında bu oran daha da azalır. Bir miktar üre idrar ile atılırken, diğer bir kısmı ince bağırsağa ulaşarak mikrobiyal protein ve aminoasit monomerlerine parçalanır. Aminoasitlerin bir kısmı glukoneogenez yoluyla glukoz üretimi için kullanılırken, büyük bir kısmı yaşama payı, gebelik ve laktasyon amacıyla kullanılır. Vücutta üre sentezi arttıkça dengeleme mekanizması çalışır. Bu dengelenme mekanizmasında süt ve kan plazması ana role sahiptir.<sup>105</sup> Fazla amonyak etkisi altında uterus ortamının pH'ı düşer ve embriyonik yaşam olumsuz etkilenir, NED şiddeti artar, PGF2 $\alpha$  sekresyonu artar, progesteron seviyesi düşer, luteal faz kısalır, konsepsiyon oranı düşer ve tohumlama sayısı artar. Protein metabolizması; rasyondaki protein oranı ve rumende sindirilebilirliği, diyet aminoasit konsantrasyonu, karaciğer ve böbrek fonksiyonları, kas doku yıkımlanması, diyet karbonhidrat miktarı ve rumende sindirilebilirlik derecesi gibi parametreler ile doğrudan ilişkilidir. Protein dengesinin değerlendirilmesinde kullanılan parametreler; total protein, albümin, globülin ve üredir.<sup>106</sup>

Proteinler pek çok fizyolojik olayda önemli rol oynarlar. Dokuların temel yapılarını oluşturmalarının yanı sıra enzim ve hormon reaksiyonları gibi birçok kimyasal reaksiyonu düzenlerler. Total protein; albümin ve globülin miktarının toplanmasıyla elde edilir ve sığırlarda bu parametrenin normal değeri 6,7-7,5 g/dL'dir.<sup>107</sup> Sığırlarda kan albümin düzeyinin normal değeri 3-3,6 g/dL'dir. Karaciğerde üretim yetersizliğinde aşırı albümin kaybı veya protein bakımından yetersiz beslenme durumunda, sindirim ve

emilim bozukluklarında hipoalbüminemi meydana gelir. Hiperalbuminemi ise sadece dehidrasyon durumunda oluşmaktadır. Albüminin uzun bir yarılanma ömrüne sahip olmasından dolayı hipoalbüminemide karaciğer hastalıkları kronik ve şiddetli olmaktadır. Ayrıca uzun süre boyunca protein bakımından yetersiz beslenen sürülerde hipoalbüminemi gözlemlenebilir.<sup>108</sup> Üre protein metabolizmasının son ürünü olup vücuttaki tüm hücre ve dokulara nüfuz ederek kan dolaşımına, reproduktif dokulara, süte ve meme bezlerine kolaylıkla geçer. Bu nedenle üre hem kanda hem de sütte ölçülebilmektedir.<sup>109</sup>

## **2.5. Süt İneklerinde Postpartum Uterus ve Ovaryum Fizyolojisi**

İneklerde doğumdan sonra tekrar gebeliğin şekilleneceği döneme kadarki süreçte endometriyum rejenerasyonu, uterus involüsyonu, uterusun bakteriyel kontaminasyonunun eliminasyonu ve ovaryumlarda siklik aktivitenin yeniden başlaması gibi fizyolojik olaylar şekillenmektedir. Bu fizyolojik olayların şekillenmesi için gerekli uyarım fötusun doğması, yavru zarlarının atılımı ve yavru sularının boşalmasıyla başlar. İnvölüsyon; genital organların boyutundaki azalma olarak tanımlanmaktadır ve uterusun logaritmik ölçümündeki düşüştür. İneklerde uterusta meydana gelen bu küçülme durumu en çok doğumdan sonraki birkaç gün içerisinde şekillenmektedir. Doğum sürecinde başlayan uterus kontraksiyonları doğumdan sonra da belli bir süre devam eder. Fakat her geçen gün uterus kontraksiyonlarının sıklığı, frekansı, büyüklüğü ve süresi azalmaktadır. Uterus involüsyonu; sadece uterusun boyut olarak küçülmesini değil, uterus kontraksiyonları, fiziksel büzüşme, nekroz, karanküllerin dökülmesi ve endometriyum rejenerasyonunu kapsamaktadır.<sup>110</sup> Myofibrillerdeki atrofi postpartum birinci günde boyutunun 750 µm'den 400 µm'ye düşmesiyle kendini gösterir. Myofibrillerin boyutları sonraki birkaç gün içerisinde 200 µm'ye kadar düşer. Doku değişim miktarı uterusun ağırlığı ile tahmin edilebilir. Öyle ki doğum sırasında 9 kg olan bir uterus postpartum

otuzuncu günde 1 kg ağırlığa kadar düşer. Uterus involüsyonu yinelenen transrektal ultrasonografi veya rektal muayeneler ile takip edilebilir.<sup>110</sup>

Postpartum ikinci haftada normal involüsyon süreci yaşayan tüm hayvanlarda transrektal palpasyon yapılarak tüm dişi genital sistem muayene edilebilir. Bu dönemde gebeliğin tamamlanmış olduğu kornu daha geniş ve daha uzun olarak fark edilir.

Uterus involüsyonunda gecikmeye neden olan faktörler ileri dönemlerde subfertiliteye neden olabileceği için büyük öneme sahiptir.

Uterus involüsyonunda gecikmeye neden olan faktörler;<sup>111</sup>

- Hipokalsemi,
- Güç doğum,
- Retensiyo sekundinarum,
- Endometritis
- Metritis

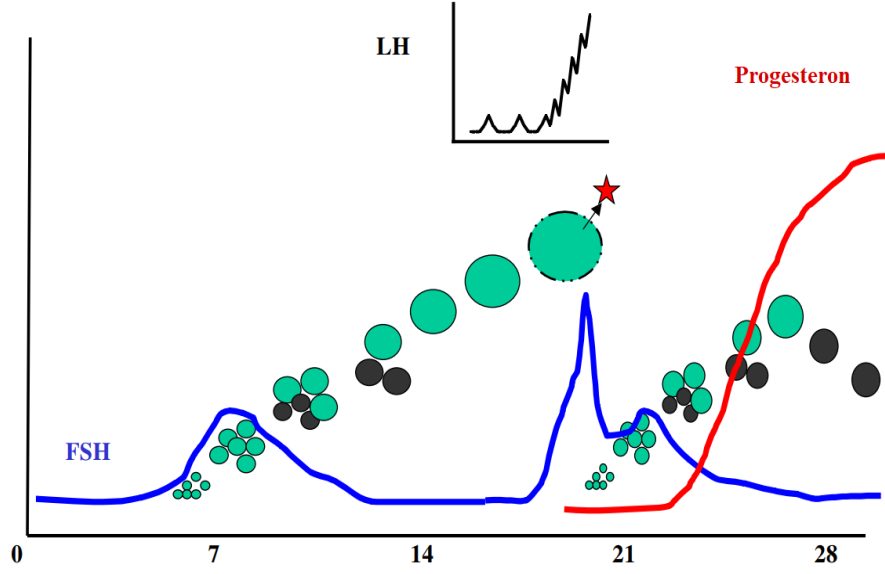
Allantokoryonun ortamdan uzaklaşmasından sonra uterus karanküllerinde nekroz başlayarak 12 gün boyunca devam eder. Postpartum dönemde, loşya akıntısı, uterusu kalan sıvılar ve umblikusun yırtılmasıyla biriken kan dışarı atılır. Loşya; visköz yapıda, sarı-kahverengi renkte, kötü kokulu olmayan sıvıdır. Uterusta doğum sonrasında yaklaşık 1-2 L loşya bulunur ve en çok postpartum ilk 2-3 gün içerisinde dışarı atılır.<sup>110</sup> Endometriyumun superfisiyal katmanının rejenerasyonu postpartum 3-4 hafta civarında tamamlanırken, daha derin katmanlarda bu süre 6-8 haftaya kadar uzar.<sup>112</sup> Doğumdan kısa bir süre sonra veya doğum sırasında vulvanın relaksasyonu ve serviksin dilatasyonu sonucunda hayvanların yaşam ortamında bulunan mikroorganizmalar uterus lümenini kontamine ederler.<sup>110</sup> İneklerde uterusun bakteriyel kontaminasyonu büyük çoğunlukla doğum sonrası ilk iki hafta içerisinde şekillenmektedir. Uterusun bakteriyel florası doğum sonrasında 7 hafta boyunca involüsyon sürecine bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu

dönemde bakteriyal kontaminasyon, temizlenme, yeniden kontaminasyon seyirli bir döngü ile karşılaşılabilir.<sup>113</sup> Postpartum uterus aerobik ve anaerobik birçok bakterinin büyümesi için uygun ortam sağlar. Postpartum 7-14 gün aralığında uterusun bakteriyel yükünde artış meydana gelmekte iken; uterus ortamından bakteri izolasyonu 16-30'uncu günlerde %78, 31-45'inci günlerde %50, 46-60' ıncı günlerde %9'dur.<sup>110</sup> Uterustan izole edilen birçok bakteriden hangisinin asıl patojen hangisinin ise fırsatçı olduğu çalışmalara göre farklılık gösterir.

Kabaca uterus enfeksiyonlarına neden olan bakteriler;<sup>114</sup>

- Endometriyum lezyonlarına neden olan etkenler,
- Endometritislerde sıklıkla karşılaşılan fakat uterusda herhangi bir lezyona neden olmayan, uterus lümeninden izole edilen potansiyel patojenler,
- Fırsatçı organizmalar, uterus lümeninden fazla izole edilmeyen mikroorganizmalar olarak sınıflandırılır.

Gebelik süresince yüksek steroid hormon konsantrasyonuna maruz kalan hipotalamo-hipofiziyel ekseninde baskılanma meydana gelmektedir. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) sekresyonu yetersiz uyarım şekillendirdiğinden folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH) sekresyonlarını engellenir. Doğum esnasında plazma steroid hormon konsantrasyonu bazal seviyeye kadar iner. Bazal seviyeye kadar inen plazma steroid hormon konsantrasyonu, FSH konsantrasyonunda artış meydana gelir. Plazma FSH konsantrasyonunda meydana gelen artış emzirme, beslenme, postpartum anöstrus aralığından etkilenmez ve her 7-10 günde bir düzenli olarak artar.<sup>115</sup>



Şekil 2.2. İneklerde doğumdan sonra plazma FSH, LH ve progesteron konsantrasyonları.<sup>110</sup>

Ovulasyon şekillenmemesinin belirtilen birçok nedeni olmasına rağmen genellikle LH yetersizliği üzerinde durulmaktadır. Yüksek düzey LH konsantrasyonu sonucunda ovulasyon şekillenirken, düşük düzey LH konsantrasyonu ise atrezi, orta düzeyde bir salınım ise persiste folikül durumlarını ortaya çıkarmaktadır. Atreziye uğrayan/uğrayacak foliküller persiste olacak olan ya da ovule olan foliküllere oranla düşük düzeyde östradiol üretimine ve konsantrasyonuna sahiptir. Atretik ve uzun süre kalıcılığını devam ettiren foliküllerle ilgili başka bir problem de, postpartum ilk ovulasyon aralığının 50 günden fazla olmasıdır.<sup>110, 116</sup> İneklerde postpartum 10-14'üncü günler arasında GnRH salınımı ve bu salınımına bağlı olarak LH konsantrasyonun da artış meydana gelir. Düşük LH konsantrasyonunun da ana kaynağı olarak NED gösterilmektedir. İneklerde ovulasyon için gerekli olan pulsatil LH salınımı ancak doğum sonrasında şekillenen ciddi negatif enerji dengesinden en kısa sürede kurtulmayla ilgilidir. Postpartum anovulator anöstrus oranı %20 civarındadır ve bu oranın büyük bir kısmı yüksek süt verimine sahip olan hayvanlardır. İnsülin ve IGF-1 gibi metabolik hormonlar da hipofiz üzerinde etki

oluşturarak LH sekresyonunda düşüşe, ovaryumlarda ise östradiol üretiminde azalmaya neden olur. Tüketilen yemlerin yağ rezervleri ile zenginleştirilmesi sonrasında negatif enerji dengesindeki ciddiyet azalarak yüksek östradiol konsantrasyonu olduğu böylece anovülasyon dönemin süresinin kısaldığı bildirilmektedir.<sup>117</sup>

Hormonlar ve metabolik durumlar hariç, fiziksel ve fizyolojik stres de ovaryumda siklik aktivitenin başlaması üzerine etki ederler.<sup>110, 118</sup> Postpartum 25-35 gün aralığı gerek uterus enfeksiyonlarının tanısı ve tedavisinde gerekse ovaryum patolojilerinin belirlenmesinde çok önemli role sahiptir. Bu süreçte ovaryum muayenelerinde dirençli folikül, inaktif ovaryum, kistik ovaryum folikülleri ve enfeksiyonlara bağlı kalıcı korpus luteum olgularıyla karşılaşılabileceği gibi tedavi için de en uygun zaman aralığıdır.

## **2.7. Anti-Müllerian Hormon (AMH)**

“Müllerian İnhibe Edici Madde” (MIS) olarak da bilinen Anti-Müllerian Hormon (AMH), Dönüştürücü Büyüme Faktörü-  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) ailesine ait 140 kDa’luk moleküler ağırlığa sahip olan homodimerik disülfid bağlı bir glikoproteindir.<sup>119</sup> İlk olarak 1940’larda Alfred Jost tarafından keşfedilmiştir.<sup>120</sup> AMH dişilerde foliküllerin granuloza hücreleri içinde eksprese edilir.<sup>121-123</sup> AMH sekresyonu en fazla 2-5 mm büyüklükteki antral foliküllerde gerçekleşir. Bununla birlikte daha küçük foliküller de serum AMH konsantrasyonuna katkıda bulunabilir.<sup>124</sup> AMH ekspresyonu foliküller büyüyüp genişledikçe azalmakta, 8 mm veya daha büyük çapa ulaştığında ise tamamen kaybolmaktadır.<sup>125</sup>

Anti-müllerian hormon, primordial foliküllerin, büyüyen folikül havuzuna (yani folikülojenez) alınmasını ve foliküllerin FSH yanıt vermesini düzenler. Yumurtalıkta AMH’nin primordial folikül alımında ve büyüyen foliküllerin FSH’ye yanıt vermesi üzerine inhibe edici bir etkiye sahiptir.<sup>126</sup> Primordial foliküller (dinlenme aşaması), dişilerin gelişmekte olan yumurtalıklarında gebeliğin ilk üç ayında oluşur. Doğumda,

buzaguların yumurtalıklarında bulunan folikül sayısının 10.000 ila 350.000 arasında değiştiği bildirilmiştir.<sup>127</sup> Model olarak AMH-yoksun fareleri kullanan çalışmalarda, bu tür farelerin fertil olduğunu, ancak yumurtalıklarındaki primordial foliküllerin sayısını, kontrol farelerinden daha erken uzaklaştırdıklarını gösterilmiştir.<sup>128</sup>

Sığırlardaki yumurtalık folikül rezervinin boyutunu belirlemek için serumdaki AMH konsantrasyonunun tek bir ölçümü yararlı bir araçtır.<sup>129</sup> Çünkü folikül sayısı düşük olan sığırlarda azalmış yumurtalık fonksiyonu, zayıf oosit kalitesi ve yetersiz doğurganlık görülür.<sup>130</sup>

Anti-müllerian hormon, oosit toplanması ve in vitro embriyo üretimi için foliküler uyarmaya yumurtalık cevabının iyi bir belirtecidir.<sup>131, 132</sup> AMH ayrıca embriyo üretimi için ineklere uygulanan süperovulatar yanıtları tahmin etmek için endokrin belirteç olarak da kullanılmaktadır.<sup>6</sup>

Anti-müllerian hormon, yumurtalıkların içindeki toplam sağlıklı folikül sayısı ile yüksek oranda ilişkilidir.<sup>126</sup> AMH, yumurtalıkların içindeki foliküler popülasyonu karakterize etmek için kullanılacaksa, bu foliküler popülasyonu doğru bir şekilde yansıtmak için AMH'nin ne zaman ve ne sıklıkla ölçülmesi gerektiği sorusu ortaya çıkar. Ireland ve ark.<sup>129</sup> yaptıkları bir çalışmada sığır düvelerini düşük, orta veya yüksek antral folikül sayısına göre karakterize etmek için ultrasonografi yöntemi kullanmışlar daha sonra östrojen döngüsünün 6. gününden sonraki döngünün 2. gününe kadar günlük AMH seviyelerini ölçmüşlerdir.

### 3. MATERYAL ve METOD

Bu araştırmada doğum öncesi 14. gün, doğum sırasında, doğum sonrası 7., 14. ve 21. günlerde simental süt ineklerinden alınan kanlardaki Ca, P, KOL, total protein, magnezyum, triaçilgliserol, AMH, BHB, serbest gliserol, ince tabaka kromatografisi ve elektroforez değerlerinin ineklerin bir sonraki tohumlamada kaç kez tohumlandıkları üzerine etkileri incelendi.

Sunulan bu tez çalışması Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (PRJ2015/302 proje kodlu). Araştırma Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Alt Etik Kurulu (AÜVFEAK; 13.07.2015 tarih ve 2015/9 sayılı karar) tarafından onaylanmıştır.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Yeri

Araştırmanın hayvan materyalini Erzurum ili Aşkale ilçesinde bulunan Nail Cinisli Süt Sığırcılığı Çiftliği'nde 2. laktasyonda bulunan birbirine yakın VKS'ye sahip olan toplam 36 adet simental ırkı süt ineği oluşturdu. Süt inekleri çalışma sonundaki tohumlama sayılarına göre 1 kez tohumlananlar (T1, n=13), 2 kez tohumlananlar (T2, n=12) ve 3 ve daha fazla kez tohumlananlar (T3, n=11) olarak gruplandırıldı.

**Tablo 3.1.** Çalışma hayvanlarına verilen rasyon

| Kuru Madde Miktarı, kg |       |
|------------------------|-------|
| Çayır Kuru Otu         | 2,50  |
| Tritikale Silajı       | 4,00  |
| Mısır Silajı           | 4,50  |
| Tritikale danesi       | 0,89  |
| Süt Yemi               | 8,54  |
| HP                     | 14,06 |
| Enerji                 | 2438  |
| KM %                   | 53,04 |

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Numunelerin Toplanması

Araştırmadaki tüm hayvanlardan doğum öncesi 14. günde ve doğumu takip eden 2 saat içerisinde kan örneği alınmıştır. Doğum sonrasında ise tüm hayvanlardan, doğumu takip eden 7., 14. ve 21. günlerde sabah sağımı sonrası yemlemeden önce *Vena jugularis*'ten antikoagülsüz 10 mL'lik vakumlu kan tüplerine kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri Heraeus Labofuge 200 santrifüj cihazında 4000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları çıkarıldı.

Kan serumları ependorf tüplere porsiyonlanarak analizler yapılana kadar -80°C'deki derin dondurucuda saklandı.

#### 3.2.2. AMH Ölçümü

Çalışma gruplarından elde edilen serum örneklerinde AMH düzeyleri Sandwich-ELISA yönteminin kullanıldığı Anti-Müllerian Hormone (AMH) (Elabscience Biotechnology Co., Ltd. Amerika Birleşik Devletleri) kiti (Catalog No: E-EL-H0317) ile çalışıldı. Prospektüste kitin analitik duyarlılığı 56,25 pg/mL ve tespit aralığı 93,75-6000 pg/mL olarak bildirilmekteydi.

Çalışma şekli:

1. Standart referans solüsyonu (6000 pg/mL), örnek sulandırıcı ile seri dilüsyon sonucu standart solüsyonlar (3000; 1500; 750; 375; 187,5; 93,75; 0 pg/mL) elde edildi.
2. Standart solüsyonlar (3000; 1500; 750; 375; 187,5; 93,75; 0 pg/mL), blank ve serum örneklerinden 100 µL, AMH antikoru kaplı kuyucuklara eklendi. Plaka üzeri koruyucu film ile kapatıldı ve 90 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.

3. Kuyucukların içerisindeki sıvı döküldü ve üzerine 100 µL biyotin işaretli AMH antikor içeren solüsyon eklendi. Plaka koruyucu ile kapatıldı ve 1 saat boyunca 37°C' de inkübe edildi.
4. Kuyucuklar, 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı.
5. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat eklendi. Plaka koruyucu ile kapatıldı ve 30 dakika boyunca 37°C' de inkübe edildi.
6. Kuyucuklar, 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı.
7. Her kuyucuğa 90 µL substrat solüsyonu karanlık ortamda eklendi. Plaka koruyucu ile kapatıldı ve 15 dakika boyunca 37°C' de inkübe edildi.
8. Her kuyucuğa substrat solüsyonunun eklenme sırası gözetilerek 50 µL stop solüsyonu eklendi. Renk hızlı bir şekilde sarıya dönüştü.
9. Bir mikroparka okuyucu (BioTek, µQuant Elisa reader/USA) kullanılarak 450 nm'de spektrofotometrik olarak optik dansitesi tespit edildi ve standart grafik kullanılarak serum örneklerinin konsantrasyonları hesaplandı.

### 3.2.3. β-Hidroksibütirat (BHB) Ölçümü

Çalışma gruplarından elde edilen serum örneklerinde β-hidroksibütirat düzeyleri Sandwich-ELISA yönteminin kullanıldığı Bovine Beta-Hydroxybutyric Acid (β-HB) (Sunlong Biotech Co., Ltd. Çin) kiti (Catalog No: SL0027Bo) ile çalışıldı. Prospektüste kitin analitik duyarlılığı 0,05 µg/mL ve tespit aralığı 0,3-18 µg/mL olarak bildirilmekteydi.

Çalışma şekli:

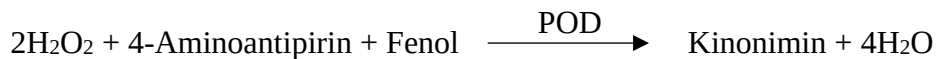
1. Standartlar kit prospektüsüne göre 15 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL ve 1,25 µg/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlandı.
2. Örnek kuyucuklarına 40 µL örnek dilüsyon tamponu ve 10 µL numune eklendi.

3. Plaka koruyucu ile kapatıldı ve 30 dakika boyunca 37°C’de inkübe edildi.
4. Kuyucuklar, 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı.
5. Her kuyucuğa 50 µL HRP konjugat eklendi. Plaka koruyucu ile kapatıldı ve 30 dakika boyunca 37°C’de inkübe edildi.
6. Kuyucuklar, 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı.
7. Her kuyucuğa 50 µL kromojen A ve 50 µL kromojen B eklendi ve dikkatlice karıştırıldıktan sonra 15 dakika boyunca 37°C’de inkübe edildi.
8. Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk hızlı bir şekilde maviden sarıya dönüştü.
9. Stop solüsyonunun eklenmesinden sonra 15 dakika içinde bir mikropilaka okuyucu (BioTek, µQuant Elisa reader/USA) kullanılarak 450 nm’de spektrofotometrik olarak optik dansitesi tespit edildi ve standart grafik kullanılarak serum örneklerinin konsantrasyonları hesaplandı.

#### 3.2.4. Total Kolesterol Ölçümü

Serum kolesterol düzeyleri (DiaSys Diagnostic Systems, Almanya) kiti (Catalog No: 1 1350 99 10 021) ile ölçüldü.

KOL ölçümü enzimatik fotometrik metottur ve enzimatik hidroliz ve oksidasyon sonrası tespit prensibine dayanır.<sup>133, 134</sup> Kolesterol esteraz (KE), kolesterol esterini (KOLE) parçalar ve serbest KOL ile SYA oluşur. Oluşan serbest KOL, kolesterol oksidaz (KOD) tarafından kolesterol-3-on ve hidrojen peroksit parçalanır. Peroksidazın (POD) etkisi ile hidrojen peroksitin 4-aminoantipirin ve fenol ile reaksiyona girmesinin sonucu olarak kolorimetrik indikatör olan kinonimin şekillenir.



Oluşan Kinonimin' in renk yoğunluğu kolesterolün konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

#### Çalışma Reaktifleri

|                    |           |              |
|--------------------|-----------|--------------|
| Good's buffer      | pH 6,7    | 50 mmol/L    |
| Fenol              |           | 5 mmol/L     |
| 4-Aminoantipirin   |           | 0,3 mmol/L   |
| Kolesterol Esteraz | (KE)      | ≥ 200 U/L    |
| Kolesterol Oksidaz | (KOD)     | ≥ 100 U/L    |
| Peroksidaz         | (POD)     | ≥ 3 kU/L     |
| Standart           | 200 mg/dL | (5,2 mmol/L) |

**Tablo 3.2.** Total Kolesterol Ölçüm Prosedürü

|                     | Kör     | Örnek veya Standart |
|---------------------|---------|---------------------|
| Örnek veya Standart | -       | 10 µL               |
| Distile Su          | 10 µL   | -                   |
| Çalışma Reaktifi    | 1000 µL | 1000 µL             |

Verilen miktarlar karıştırıldı ve 37°C' de 5 dakika inkübe edildi. 60 dakika içinde köre karşı 500 nm'de absorbans okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile

$$\text{Total Kolesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Numunenin Abs.}}{\text{Standartın Abs.}} \times \text{Standart Kons. (mg/dL)}$$

eşitliği kullanılarak numunelerin her biri için konsantrasyon hesaplandı.

#### 3.2.5. Kalsiyum Ölçümü

Serum kalsiyum düzeyleri (DiaSys Diagnostic Systems, Almanya) kiti (Catalog No: 1 1130 99 10 021) ile ölçüldü. Kalsiyum ölçümü arsenazo III kullanarak fotometrik test prensibine dayanır. Nötr pH'da arsenazo III bulunan kalsiyum, yoğunluğu kalsiyum konsantrasyonu ile orantılı olan mavi renkli bir kompleks verir. Magnezyum interferansı 8-hidroksikinolin-5-sülfonik asit eklenerek engellenir.<sup>135-137</sup>

### Çalışma Reaktifleri

|                                   |          |              |
|-----------------------------------|----------|--------------|
| Fosfat Tamponu                    | pH 7,5   | 50 mmol/L    |
| 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit |          | 5 mmol/L     |
| Arsenazo III                      |          | 120 µmol/L   |
| Standart                          | 10 mg/dL | (2,5 mmol/L) |

**Tablo 3.3.** Kalsiyum Ölçüm Prosedürü

|                     | Kör     | Örnek veya Standart |
|---------------------|---------|---------------------|
| Örnek veya Standart | -       | 10 µL               |
| Distile Su          | 10 µL   | -                   |
| Reaktif             | 1000 µL | 1000 µL             |

Verilen miktarlar karıştırıldı ve 37°C’de 5 dakika inkübe edildi. 60 dakika içinde köre karşı 650 nm’de absorbans okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile

$$\text{Kalsiyum (mg/dL)} = \frac{\text{Numunenin Abs.}}{\text{Standartın Abs.}} \times \text{Standart Kons. (mg/dL)}$$

eşitliği kullanılarak numunelerin her biri için konsantrasyon hesaplandı.

### 3.2.6. Magnezyum Ölçümü

Serum magnezyum düzeyleri (DiaSys Diagnostic Systems, Almanya) kiti (Catalog No: 1 4610 99 10 021) ile ölçüldü. Magnezyum ölçümü ksilidil mavisi kullanılarak fotometrik test prensibine dayanır. Magnezyum iyonları alkali çözelti içinde ksilidil mavisi ile mor renkli bir kompleks oluşturur. Kalsiyum iyonları ile kompleks yapan glikoleterdiamintetraasetik asit (GEDTA) varlığında reaksiyon spesifikdir. Mor rengin yoğunluğu magnezyum konsantrasyonu ile orantılıdır.<sup>138, 139</sup>

### Çalışma Reaktifleri

|                                          |         |               |
|------------------------------------------|---------|---------------|
| Etanolamin                               | pH 11,0 | 750 mmol/L    |
| GEDTA (Glikoleterdiamintetraasetik asit) |         | 60 µmol/L     |
| Ksilidil mavisi                          |         | 110 µmol/L    |
| Standart                                 | 2 mg/dL | (0,82 mmol/L) |

**Tablo 3.4.** Magnezyum Ölçüm Prosedürü

|                     | Kör     | Örnek veya Standart |
|---------------------|---------|---------------------|
| Örnek veya Standart | -       | 10 µL               |
| Distile Su          | 10 µL   | -                   |
| Reaktif             | 1000 µL | 1000 µL             |

Verilen miktarlar karıştırıldı ve 37°C’de 5 dakika inkübe edildi. 60 dakika içinde köre karşı 520 nm’de absorbans okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile

$$\text{Magnezyum (mg/dL)} = \frac{\text{Numunenin Abs.}}{\text{Standartın Abs.}} \times \text{Standart Kons. (mg/dL)}$$

eşitliği kullanılarak numunelerin her biri için konsantrasyon hesaplandı.

### 3.2.7. Fosfor Ölçümü

Serum fosfor düzeyleri (DiaSys Diagnostic Systems, Almanya) kiti (Catalog No: 1 5211 99 10 021) ile ölçüldü. Fosfor ölçümü endpoint tespiti ile fotometrik uv test test prensibine dayanır.<sup>135, 140</sup>

Amonyum molibdat + sülfürik asit + fosfat  $\longrightarrow$  inorganik fosfor molibdat kompleksi

#### Çalışma Reaktifleri

|                  |                               |               |
|------------------|-------------------------------|---------------|
| <b>Reaktif 1</b> | Glisin/ Sülfürik asit tamponu | 50 mmol/L     |
| <b>Reaktif 2</b> | Glisin tamponu                | 50 mmol/L     |
|                  | Amonyum Molibdat              | 1.75 mmol/L   |
| Standart         | 5 mg/dL                       | (1,61 mmol/L) |

**Tablo 3.5.** Fosfor Ölçüm Prosedürü

|                     | Kör    | Örnek veya Standart |
|---------------------|--------|---------------------|
| Örnek veya Standart | -      | 10 µL               |
| Distile Su          | 10 µL  | -                   |
| Reaktif 1           | 800 µL | 800 µL              |
| Reaktif 2           | 200 µL | 200 µL              |

Verilen miktarlar karıştırıldı ve 37°C’de 5 dakika inkübe edildi. 340 nm’de A1 abosrbansı okundu. Sonrasında R2 Reaktifi eklenerek 37°C’de 5 dakika inkübe edildi ve 60 dakika içinde 340 nm’de A2 absorpsansı okundu.

$$\Delta A = (A2 - A1) \text{ örnek veya standart}$$

Elde edilen verilerden önce  $\Delta A$  hesaplandı. Daha sonra

$$\text{Fosfor (mg/dL)} = \frac{\text{Numunenin Abs.}}{\text{Standartın Abs.}} \times \text{Standart Kons. (mg/dL)}$$

eşitliği kullanılarak numunelerin her biri için konsantrasyon hesaplandı.

### 3.2.8. Total Protein Ölçümü

Serum total protein düzeyleri (DiaSys Diagnostic Systems, Almanya) kiti (Catalog No: 1 2311 99 10 021) ile ölçüldü. Total protein ölçümü, biüret metoduna dayanan fotometrik test prensibine dayanır. Proteinler, alkali çözelti içerisinde bakır iyonlarıyla mor mavi renk kompleksi oluşturur. Rengin şiddeti, konsantrasyon ile doğrudan orantılıdır.<sup>135, 141</sup>

#### Çalışma Reaktifleri

|                  |                          |                                   |
|------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <b>Reaktif 1</b> | Sodyum hidroksit         | 100 mmol/L                        |
|                  | Potasyum sodyum tartarat | 17 mmol/L                         |
| <b>Reaktif 2</b> | Sodyum hidroksit         | 500 mmol/L                        |
|                  | Potasyum sodyum tartarat | 80 mmol/L                         |
|                  | Potasyum iyodit          | 75 mmol/L                         |
|                  | Bakır sülfat             | 30 mmol/L                         |
| <b>Standart</b>  | 5 g/dL                   | Sığır serum albümini içerir (<5%) |

**Tablo 3.6.** Total Protein Ölçüm Prosedürü

|                     | Kör     | Örnek veya Standart |
|---------------------|---------|---------------------|
| Örnek veya Standart | -       | 20 µL               |
| Distile Su          | 20 µL   | -                   |
| Reaktif 1           | 1000 µL | 1000 µL             |
| Reaktif 2           | 250 µL  | 250 µL              |

Verilen miktarlar karıştırıldı, 37°C’de 5 dakika inkübe edildi ve 540 nm’de A1 absorbansı okundu. Sonrasında R2 Reaktifi eklenerek 37°C’de 5 dakika inkübe edildi ve 540 nm’de A2 absorbansı okundu.

$$\Delta A = (A2 - A1) \text{ örnek veya standart}$$

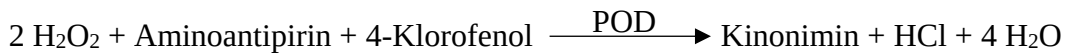
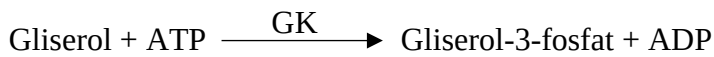
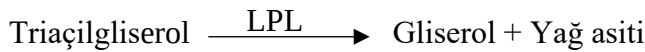
Elde edilen absorbans değerleri ile

$$\text{Total Protein (g/dL)} = \frac{\Delta A / \text{dakika numune}}{\Delta A / \text{dakika standart}} \times \text{Standart Kons. (g/dL)}$$

eşitliği kullanılarak numunelerin her biri için konsantrasyon hesaplandı.

### 3.2.9. Triaçilgliserol Ölçümü

Triaçilgliserol düzeyleri (DiaSys Diagnostic Systems, Almanya) kiti (Catalog No: 1 5760 99 10 021) ile ölçüldü. Triaçilgliserol ölçümü, gliserol-3-fosfat oksidaz (GFO) kullanarak kolorimetrik test prensibine dayanır. Triaçilgliseroller lipoprotein lipaz (LPL) ile parçalanırlar. Peroksidazın (POD) etkisi ile hidrojen peroksitin 4-aminoantipirin ve fenol ile reaksiyona girmesinin sonucu olarak kolorimetrik indikatör olan kinonimin şekillenir.<sup>142, 143</sup>



### Çalışma Reaktifleri

|                           |           |              |
|---------------------------|-----------|--------------|
| Good's buffer             | pH 7,2    | 50 mmol/L    |
| 4-Klorofenol              |           | 4 mmol/L     |
| ATP                       |           | 2 mmol/L     |
| Mg <sup>2+</sup>          |           | 15 mmol/L    |
| Gliserokinaz              | (GK)      | ≥ 0.4 kU/L   |
| Peroksidaz                | (POD)     | ≥ 2 kU/L     |
| Lipoprotein lipaz         | (LPL)     | ≥ 4 kU/L     |
| 4-Aminoantipirin          |           | 0.5 mmol/L   |
| Gliserol-3-fosfat oksidaz | (GFO)     | ≥ 1.5 kU/L   |
| Standart                  | 200 mg/dL | (2,3 mmol/L) |

**Tablo 3.7.** Triaçilgliserol Ölçüm Prosedürü

|                     | Kör     | Örnek veya Standart |
|---------------------|---------|---------------------|
| Örnek veya Standart | -       | 10 µL               |
| Distile Su          | 10 µL   | -                   |
| Reaktif             | 1000 µL | 1000 µL             |

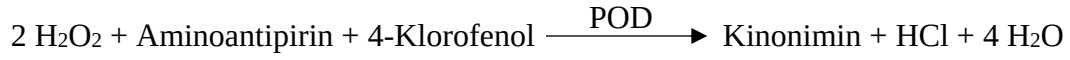
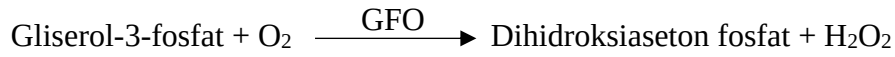
Verilen miktarlar karıştırıldı ve 37°C’de 5 dakika inkübe edildi. 60 dakika içinde köre karşı 500 nm’de absorbans okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile

$$\text{Triaçilgliserol (mg/dL)} = \frac{\text{Numunenin Abs.}}{\text{Standartın Abs.}} \times \text{Standart Kons. (mg/dL)}$$

eşitliği kullanılarak numunelerin her biri için konsantrasyon hesaplandı.

### 3.2.10. Serbest Gliserol Ölçümü

Serbest gliserol düzeyleri (DiaSys Diagnostic Systems, Almanya) kiti (Catalog No: 1 5730 99 10 730) ile ölçüldü. Serbest gliserol ölçümü, gliserol-3-fosfat oksidaz (GFO) kullanarak kolorimetrik enzimatik test prensibine dayanır. Peroksidazın (POD) etkisi ile hidrojen peroksitin 4-aminoantipirin ve fenol ile reaksiyona girmesinin sonucu olarak kolorimetrik indikatör olan kinonimin şekillenir.<sup>143-145</sup>



#### Çalışma Reaktifleri

|                           |           |              |
|---------------------------|-----------|--------------|
| Good's buffer             | pH 7,2    | 50 mmol/L    |
| 4-Klorofenol              |           | 4 mmol/L     |
| ATP                       |           | 2 mmol/L     |
| Mg <sup>2+</sup>          |           | 15 mmol/L    |
| Gliserokinaz              | (GK)      | ≥ 0.4 kU/L   |
| Peroksidaz                | (POD)     | ≥ 2 kU/L     |
| 4-Aminoantipirin          |           | 0.5 mmol/L   |
| Gliserol-3-fosfat oksidaz | (GFO)     | ≥ 1.5 kU/L   |
| Standart                  | 200 mg/dL | (2,3 mmol/L) |

**Tablo 3.8.** Serbest Gliserol Ölçüm Prosedürü

|                     | Kör     | Örnek veya Standart |
|---------------------|---------|---------------------|
| Örnek veya Standart | -       | 10 µL               |
| Distile Su          | 10 µL   | -                   |
| Reaktif             | 1000 µL | 1000 µL             |

Verilen miktarlar karıştırıldı ve 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. 15 dakika içinde köre karşı 500 nm'de absorbans okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile

$$\text{Serbest Gliserol (mg/dL)} = \frac{\text{Numunenin Abs.}}{\text{Standartın Abs.}} \times \text{Standart Kons. (mg/dL)}$$

eşitliği kullanılarak numunelerin her biri için konsantrasyon hesaplandı.

### 3.2.11. Serum Lipid Profilinin Belirlenmesi

Lipid profilini tespit etmek için serumlar analizden bir gün önce -80°C'deki dondurucudan çıkartılarak oda sıcaklığında çözümleri için beklendi. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografi (YPİTK) metodu ile serum lipid profil analizi gerçekleştirildi. Kromatografi, farklı bileşiklerin dağılacakları iki faz arasında farklı çözünürlüğe sahip olmaları prensibine dayanır. İnce tabaka kromatografisi organik bileşiklerin ayrıştırılması için kullanılan, basit ve hızlı oluşu nedeniyle maddelerin saflığının kontrolü amacıyla sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir. YPİTK, duyarlı ve ucuz bir analitik tekniktir. Ayrıca YPİTK mikro tekniktir; 1'den 100x10<sup>-6</sup> g'a kadar büyüklükteki numune boyutlarına rağmen 10<sup>-9</sup> g'a kadarki miktarda her madde tespit edilebilir.<sup>146</sup>

Önce 1 mL serum üzerine 1 mL n-hekzan/izo-propanol [2:1 (h/h)] karışımı eklendi ve tüp kapağı kapatılarak +4°C'de 15 dakika süre ile 2000 rpm'de santrifüj edildi. 10 dakika beklendikten sonra tüpler tekrar çalkalandı. Çalkalama işlemi 2 defa daha tekrar edildi. Çalkalanan serum tüpleri 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst faz 20x10 cm "Silika Jel 60" YPİTK plakalarına yüklendi.<sup>147</sup> Plakalar hekzan: dietileter: asetik asit [80:20:2 (h/h/h)] karışımında 7 cm yürütülüp, oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan bu plakalar üzerine %8 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> içerisindeki %3'lük CuSO<sub>4</sub> püskürtüldü ve 180°C'deki etüvde yaklaşık 10 dakika yakılarak lipid bantları görünür hale getirildi.<sup>146</sup>

YPİTK plakaları Epson Perfection V500 fotoğraf tarayıcıda 600 dpi çözünürlükte tarandıktan sonra her bir örneğe ait lipid bantlarının kapladığı alan Phoretix 1D (TL120) yazılımı kullanılarak tespit edildi ve toplam karışımdaki % olarak ifade edildi.

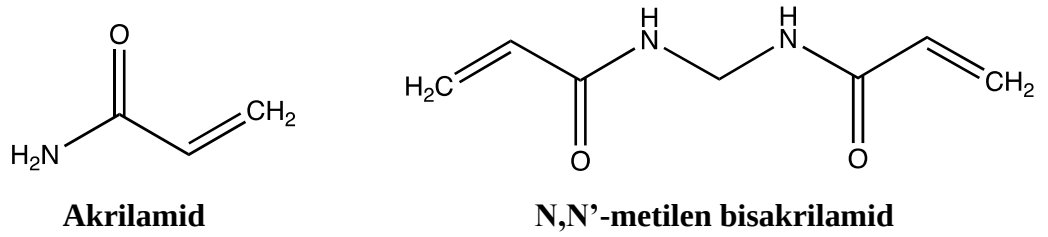
### 3.2.12. Serum Protein Profilinin Belirlenmesi

Serum protein profilinin belirlenmesi Laemmli<sup>148</sup> sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAJE) metodu ile gerçekleştirildi. Elektroforetik

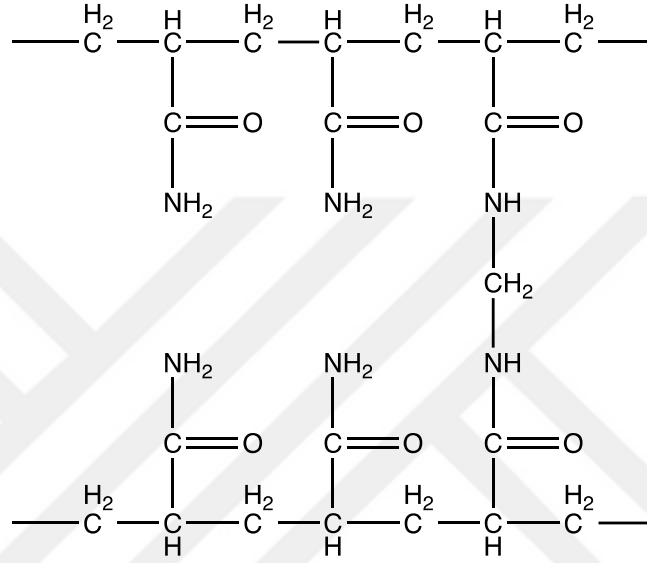
yöntemler prensipte kromatografik yöntemlere benzerlik gösterir. Elektroforezde durgun fazı, örneğin üzerine uygulandığı kâğıt ya da sentetik jeller oluşturur. Hareketli faz ise elektrik akımıdır. Elektrik akımı, elektrolit bir tampon çözelti yardımıyla uygulanır. Seçilen pH değerine göre aynı özellikteki biyomoleküllerin iyonizasyonu benzer olacağından yürüme yalnız bir kutba doğru oluşur. Böylece ayrışma molekül büyüklüğü ve üç boyutlu yapıya göredir. Yürümeyi yük/kütle oranı doğrudan etkiler. Küçük moleküller önde büyükler ise geride olacak şekilde sıralama oluşur. SDS-PAJE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, molekül ağırlıklarının saptanması ve konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Sodyum dodesilsülfat (SDS) anyonik bir deterjan olup iki aminoasitte bir peptid zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca negatif yük taşıdığından peptidlere de yüksek oranda negatif yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Jel konsantrasyonu artırılarak protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır. Eppendorf tüpe alınan 100 µL serum üzerine 400 µL elektroforez örnek tamponu eklendi. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 100°C’de 1 dakika süreyle bekletildikten sonra Laemmli<sup>148</sup> metodu BioRad TetraCell sistemine uyarlanarak SDS-PAJE işlemleri gerçekleştirildi.

#### **3.2.12.1. Solüsyonların hazırlanışı**

**Akrilamid Stok Solüsyonu (% 30):** 14,6 g akrilamid ve 0,4 g N,N’-metilen bisakrilamid 50 mL’ye distile suyla tamamlandı ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika süreyle karıştırıldı. Süzgeç kâğıdından geçirilerek süzüldü. Koyu renkli şişede +4°C’de en fazla 2 hafta muhafaza edildi.



**Şekil 3.1.** Akrilamid ve N,N'-metilen bisakrilamid'in kimyasal yapısı.



**Şekil 3.2.** Poliakrilamid jelin kimyasal yapısı.

**Resolving Jel Tamponu [1,5 M tris-HCl (pH 8,8)]:** 18,15 g trizma-base yaklaşık 90 mL distile suda eritildi ve 1N HCl ile pH 8,8'e ayarlandı. Toplam hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak +4°C'de saklandı.

**Stacking Jel Tamponu [0,5 M tris-HCl (pH 6,8)]:** 6,1 g trizma-base yaklaşık 90 mL distile suda eritildi ve 1N HCl ile pH 6,8'e ayarlandı. Toplam hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak +4 °C' de saklandı.

**Tris-Glisin Elektrod Tamponu (pH 8,3):** 1,515 g tris, 7,2 g glisin ve 0,25 g SDS distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

**Örnek Tamponu:** 4 mL distile su, 1 mL 0,5M tris-HCl (pH 6,8) (stacking jel tamponu), 0,8 mL gliserol, 1,6 mL %10 SDS, 0,4 mL 2-β-merkaptoetanol, 0,2 mL %0.05

bromfenol mavisi karıştırıldı. Koyu renkli şişede, oda ısısında en fazla 3 ay süreyle saklandı.

**%10 (a/h) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS):** 10 g SDS 50 mL distile suda hafifçe karıştırılarak çözüldü ve toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**%10 (a/h) Amonyum Persülfat (APS):** 100 mg amonyum persülfat üzerine 1 mL distile su ilave edildi. Kullanmadan hemen önce, taze olarak hazırlandı.

**Bromfenol Mavisi Solüsyonu:** 50 mg bromfenol blue yaklaşık 5 mL distile suda çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

**%5 (h/h) Asetik Asit Solüsyonu:** 50 mL Asetik asit distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Jeller bu solüsyonda saklandı.

**SDS-PAJE analizi;** Düz cam plaka (10 x 8,5 cm) ile 1,5 mm kalınlığındaki plastik şeritleri (spacer) olan plaka sandviç teşkil edecek şekilde bir araya getirildi. İlk önce resolving jel (Tablo 3.8) 10 mL'lik bir enjektör ile plakaların arasına hava kabarcığı oluşturmada dolduruldu. Doldurma işlemine üst kenara 3 cm kalıncaya kadar devam edildi. Jelin dökülmesini takiben 1 mL'lik bir enjektör ile jel yüzeyi üzerinde distile suyla doyurulmuş bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Böylece düz bir polimerizasyon hattı meydana getirildi. En az 2 saat süreyle polimerizasyon için beklendikten sonra su süzgeç kağıdıyla uzaklaştırıldı ve stacking jel (Tablo 3.8) hazırlanıp hava kabarcığı oluşturmada bir enjektör yardımı ile döküldü. Hemen ardından 1,5 mm kalınlığındaki taraklar yerleştirildi ve polimerizasyon için en az 3 saat süreyle bekletildi. Sürenin sonunda taraklar çıkarıldı ve polimerizasyon artıklarını uzaklaştırmak için numunelerin uygulanacakları kuyucuklar 3 defa tris-glisin elektrod tamponuyla (pH 8,3) yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklar aynı tampon ile dolduruldu ve numuneler kuyucuklara 10 µL uygulandı. 20 mA/jel sabit akım modunda yaklaşık 60 dakika süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi.<sup>148</sup>

**Tablo 3.9.** SDS-PAJE jellerinin kompozisyonları

|                              | Rezolving Jel<br>(%10) | Stacking Jel<br>(%4) |
|------------------------------|------------------------|----------------------|
| dH <sub>2</sub> O            | 32,1 mL                | 12 mL                |
| Tris-HCl pH 8,8              | 20 mL                  | -                    |
| Tris-HCl pH 6,8              | -                      | 5 mL                 |
| %10 SDS                      | 0,8 mL                 | 0,2 mL               |
| Akrilamid stok               | 26,7 mL                | 2,66 mL              |
| APS                          | 400 µL                 | 100 µL               |
| Tetrametiletildiamin (TEMED) | 27 µL                  | 10 µL                |

Hazırlanan solüsyonlar cam plakalar arasına döküldü.

Serum proteinleri Tablo 3.9’ da verilen oriol boyama protokolüne göre boyanarak protein band yoğunluklarının dansitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir.<sup>149</sup>

**Tablo 3.10.** Oriol Boyama Protokolü

| Adım      | Solüsyon     | Süre   |
|-----------|--------------|--------|
| Sabitleme | Sabitleyici  | 30 dk  |
| Yıkama    | Deiyonize su | 30 dk  |
| Boyama    | Oriol        | 120 dk |
| Yıkama    | Deiyonize su | 30 dk  |

#### Protein standartlarının hazırlanması

**Hazırlanışı:** Protein standart solüsyonları 5 µL’lik porsiyonlara bölündü ve -20 °C’de saklandı. Elektroforez öncesi 20 µL örnek tamponu ilave edilerek, örneklerle birlikte 2-3 dakika 95°C’lik suda bekletildi.

**Uygulanışı:** Kuyucuklara 10 µL örnek ilave edildi. 20 mA/jel sabit akımda yaklaşık 60 dakika süreyle elektroforez işlemine devam edildi. Elektroforez sonrası jeller

oriole ile boyandı, GE LAS500 görüntüleme sistemi ile görüntülenerek Phoretix 1D (TL120) jel analiz programı ile analiz edildi.

### **Proteinlerin Molekül Ağırlıklarının Hesaplanması**

Molekül ağırlıklarının hesaplanması, molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin, molekül ağırlıkları ve jeldeki göç mesafeleriyle ilişkili olarak semi-logaritmik doğrusal bir grafik yardımıyla örnek proteinin molekül ağırlığının tespiti esasına dayanır.

Her standart protein için Rf değeri hesaplanır ve bunun için aşağıdaki formül kullanılır:

$$\text{Relative front (Rf)} = \frac{\text{Proteinin göç mesafesi}}{\text{Boyanın göç mesafesi}}$$

Görüntülenen serum proteinlerinin molekül ağırlıkları yukarıdaki prensibe göre, Nonlinear Dynamics firmasından temin edilen Phoretix 1D (TL 120) programı ile otomatik olarak gerçekleştirildi.

### **3.2.13. İstatistiksel Analiz**

Elde edilen tüm veriler SAS 2009 (Statistical Analysis System, Version 9.0, 2002, Cary, NC, USA) paket program kullanılarak analiz edildi.<sup>150</sup> Veriler kategorik olmadığı için tek-yönlü varyans analizine tabi tutuldu. Proc. GLM (General Linear Model) prosedürü kullanılarak şu lineer model oluşturuldu:

$Y_{ij} = \mu + Z_i + e_{ij}$ ,  $Z = i$ 'ninci tohumlamaya göre zaman (gün) ve  $e = i$  ve  $j$ 'ninci değer in hatası. Zamanlara göre farklılıklar LSD (Least Square Differences) opsiyonu ile belirlendi. Parametrelerin günlere göre değer ortalama + SH (standart hata) şeklinde sunuldu ve farklılıklar  $p < 0.05$  düzeyinde önemli kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Spektrofotometrik Bulgular

**Tablo 4.1.** Doğum öncesi 14. gün, doğum anında ve doğumdan sonra 7., 14. ve 21. günde alınan kan numunelerinin spektrofotometre ve ELISA sonuçları.

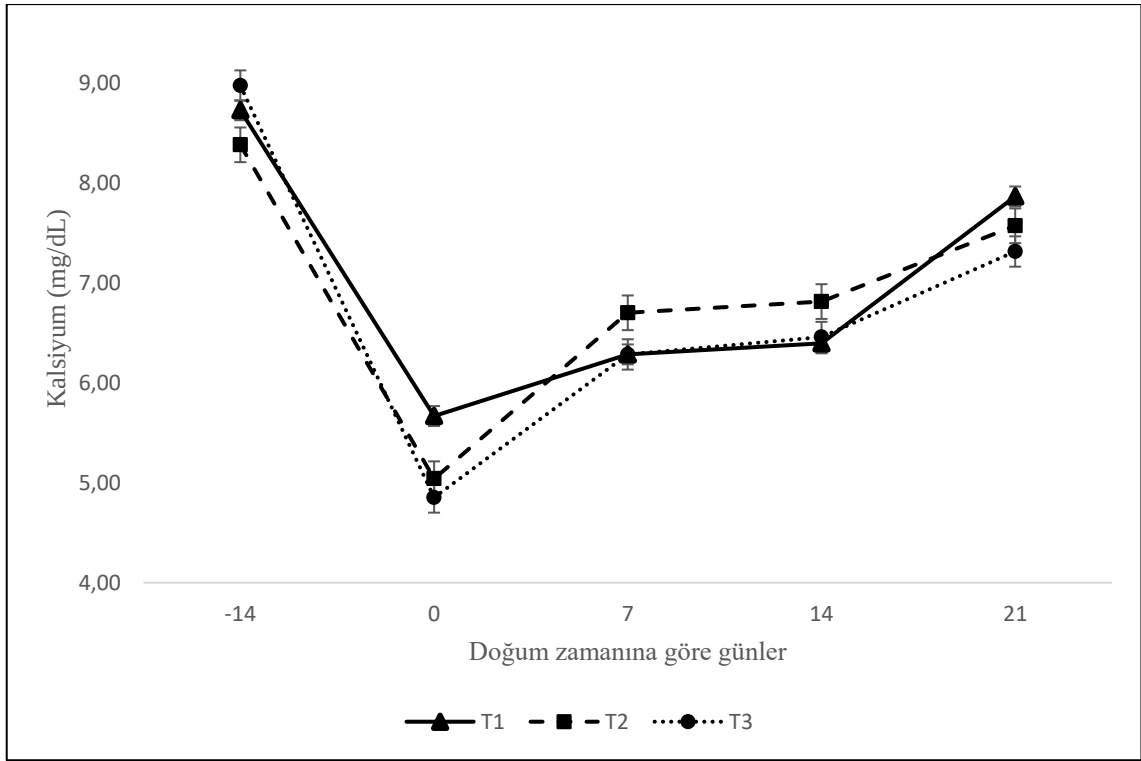
|                                | T1<br>$\bar{x} \pm SH$          | T2<br>$\bar{x} \pm SH$          | T3<br>$\bar{x} \pm SH$          | Tohumlama<br>Sayısı | Zaman  | Tohumlama*<br>Zaman |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|--------|---------------------|
| Kalsiyum<br>(mg/dL)            | 6,99 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>    | 6,90 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>   | 6,78 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>    | >0,05               | <0,001 | <0,001              |
| Fosfor<br>(mg/dL)              | 5,49 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>    | 4,83 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>    | 5,32 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>    | <0,001              | <0,001 | >0,05               |
| Total<br>kolesterol<br>(mg/dL) | 87,07 $\pm$ 3,72 <sup>c</sup>   | 100,72 $\pm$ 4,74 <sup>b</sup>  | 123,68 $\pm$ 5,16 <sup>a</sup>  | <0,001              | <0,001 | >0,05               |
| Total protein<br>(g/dL)        | 7,33 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>    | 7,04 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>    | 6,62 $\pm$ 0,23 <sup>c</sup>    | <0,001              | <0,001 | >0,05               |
| Magnezyum<br>(mg/dL)           | 2,21 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>    | 2,09 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>    | 1,86 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>    | <0,001              | <0,001 | >0,05               |
| Triaçilgliserol<br>(mg/dL)     | 20,47 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>   | 17,51 $\pm$ 1,63 <sup>b</sup>   | 14,63 $\pm$ 1,25 <sup>c</sup>   | <0,001              | <0,001 | >0,05               |
| AMH<br>(pg/mL)                 | 350,88 $\pm$ 12,87 <sup>a</sup> | 324,00 $\pm$ 14,72 <sup>b</sup> | 277,77 $\pm$ 12,44 <sup>c</sup> | <0,001              | <0,001 | <0,001              |
| BHB<br>( $\mu$ g/mL)           | 8,69 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>    | 9,04 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>    | 10,12 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>   | <0,001              | <0,001 | <0,001              |
| Serbest<br>gliserol<br>(mg/dL) | 171,60 $\pm$ 2,35 <sup>c</sup>  | 183,53 $\pm$ 3,83 <sup>b</sup>  | 207,58 $\pm$ 3,91 <sup>a</sup>  | <0,001              | <0,001 | <0,001              |

\*Aynı satırdaki farklı üstel harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0.05).

T1: Bir sonraki tohumlama döneminde 1 kez tohumlananlar

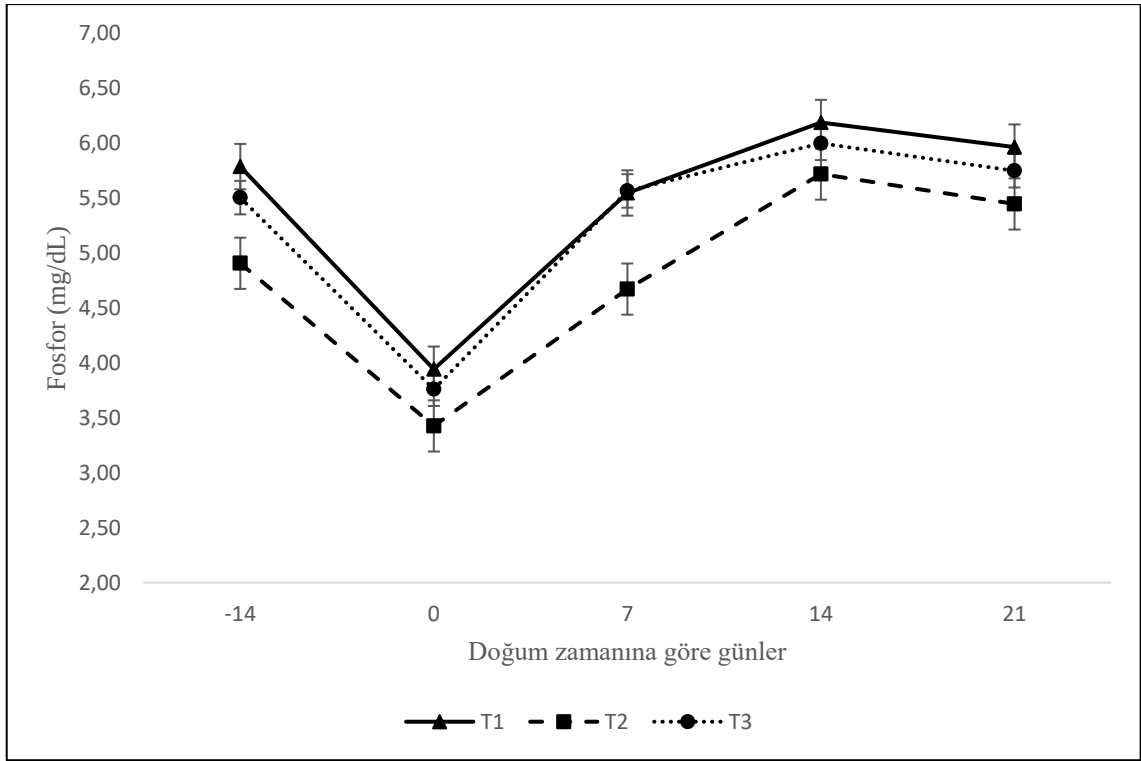
T2: Bir sonraki tohumlama döneminde 2 kez tohumlananlar

T3: Bir sonraki tohumlama döneminde 3 ve daha fazla kez tohumlananlar



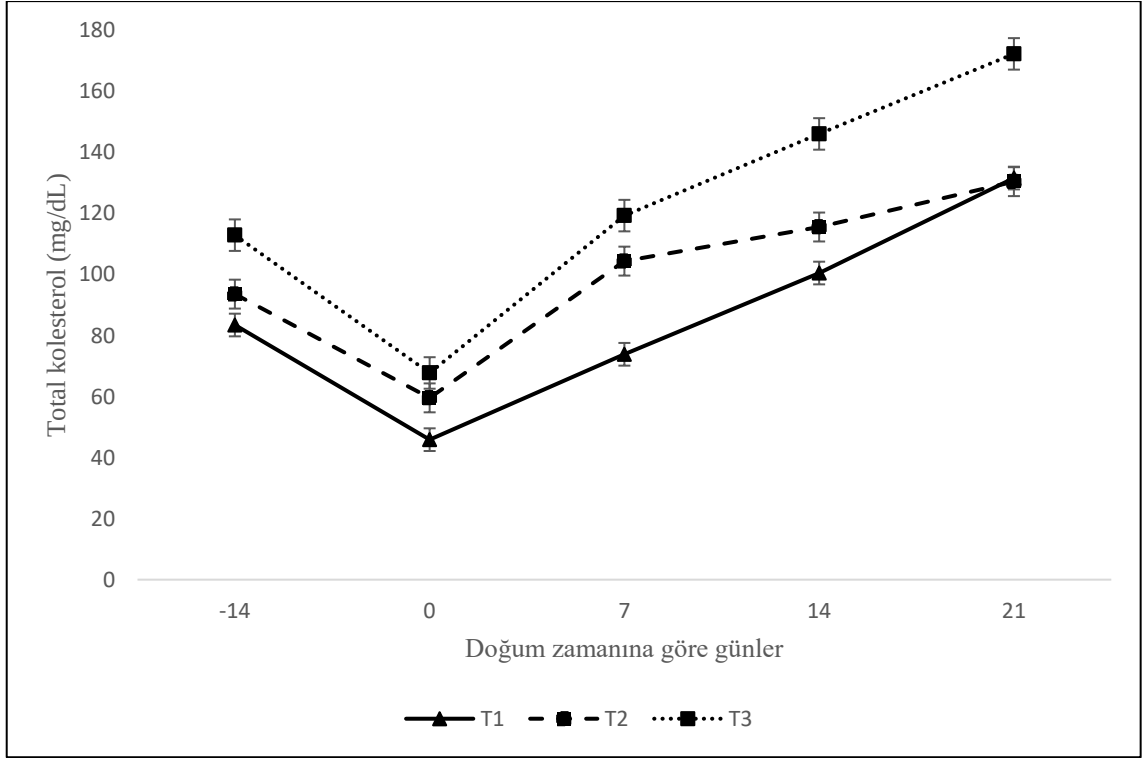
**Şekil 4.1.** Serum kalsiyum konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Kalsiyum konsantrasyonunun doğumla beraber azaldığı fakat doğum sonrasında artmaya başladığı görülmüştür. Kalsiyum konsantrasyonu en yüksek T1 ( $6,99 \pm 0,10$ ) grubunda, en düşük T3 ( $6,78 \pm 0,15$ ) grubunda olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1). Serum kalsiyum düzeyleri incelendiğinde tohumlama sayısının istatistiksel olarak önemsiz olup ( $P > 0.05$ ), örnekleme zamanının ve tohumlama\*zaman etkisinin ise istatistiksel olarak anlamlı ( $P < 0.001$ ) olduğu görülmektedir.



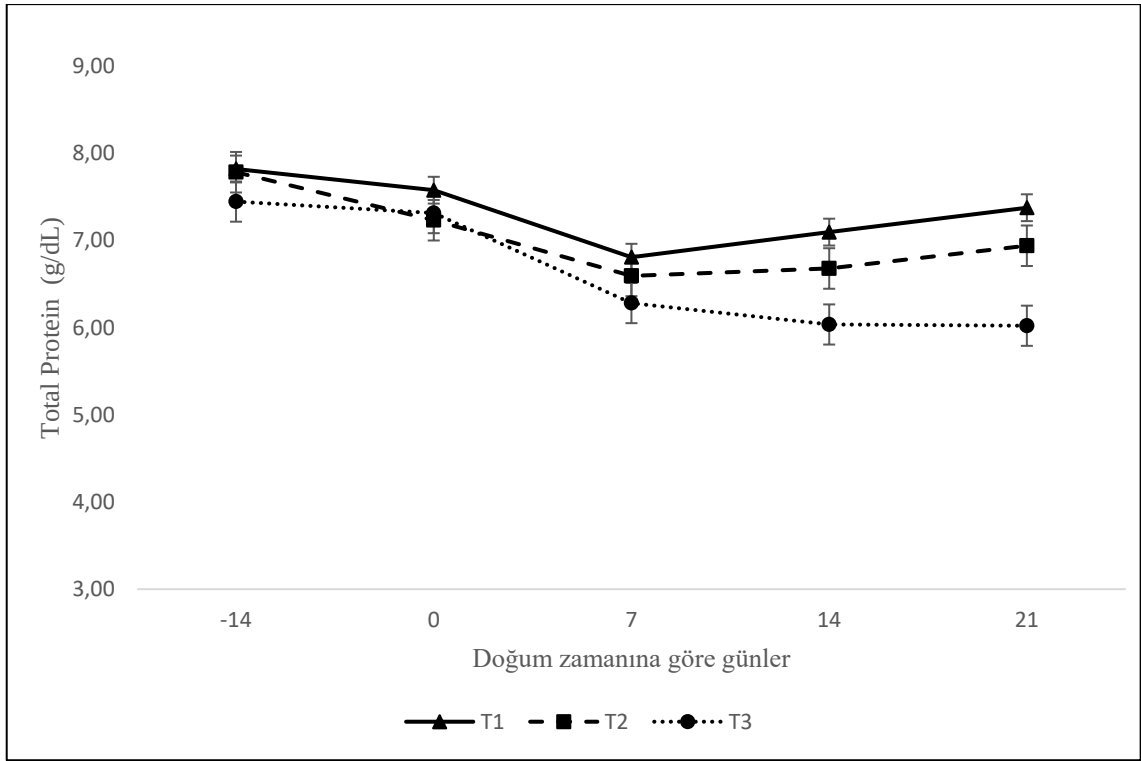
**Şekil 4.2.** Serum fosfor konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Fosfor konsantrasyonunun doğumla beraber azaldığı fakat doğum sonrası 14. güne kadar arttığı, bundan sonra ise yine azalmaya başladığı görüldü. En yüksek konsantrasyonun T1 ( $5,49 \pm 0,21$  mg/dL) grubunda, en düşük konsantrasyonun ise T2 ( $6,90 \pm 0,17$  mg/dL) grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Tohumlama sayısı ve örnekleme zamanının istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $P < 0,001$ ) belirlenmiştir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.2).



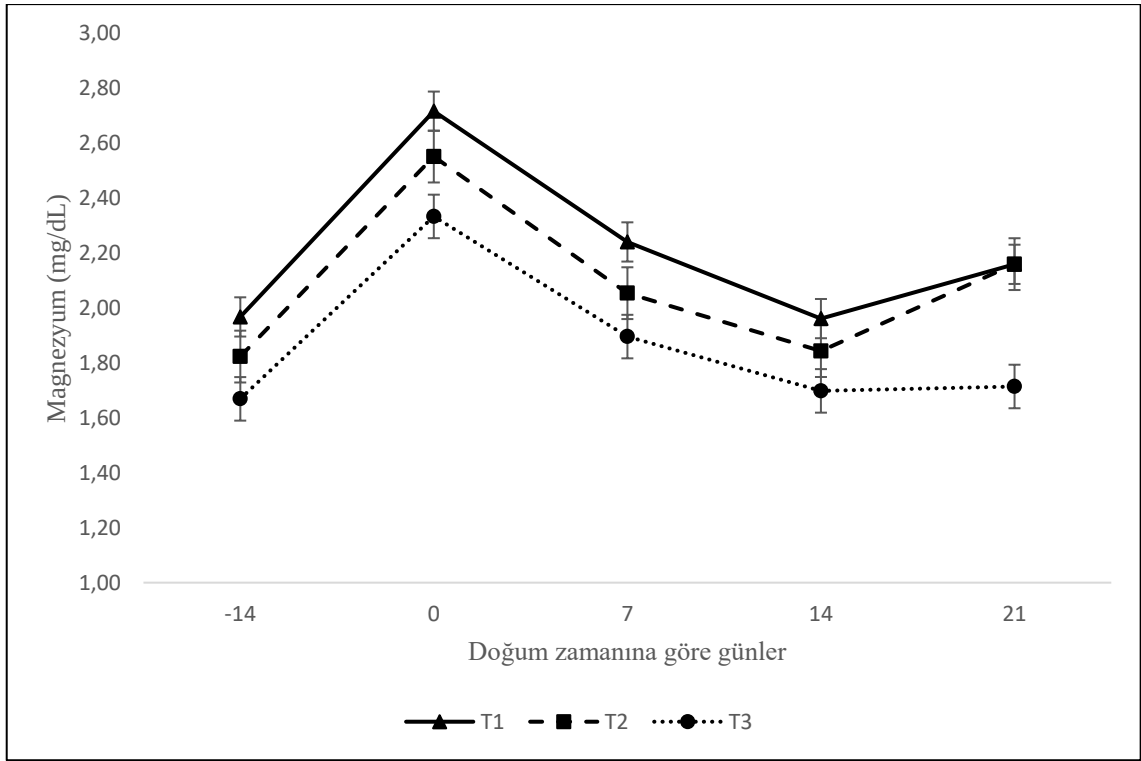
**Şekil 4.3.** Serum total kolesterol konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Doğumla beraber total KOL miktarının aşırı azaldığı fakat sonrasında artmaya başladığı, doğum sonrası 21. günde serum total KOL düzeylerinin doğum öncesi total KOL düzeylerini aştığı belirlenmiş ve en yüksek total KOL düzeyinin T3 ( $123,68 \pm 5,1$  mg/dL) grubunda, en düşük total KOL düzeyinin ise T1 ( $87,07 \pm 3,72$  mg/dL) grubunda olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.3). Serum total KOL konsantrasyonu incelendiğinde örnekleme zamanının ve tohumlama sayısının istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $P < 0,001$ ), tohumlama\*zaman etkisinin ise istatistiksel olarak anlamsız olduğu ( $P > 0,05$ ) tespit edilmiştir.



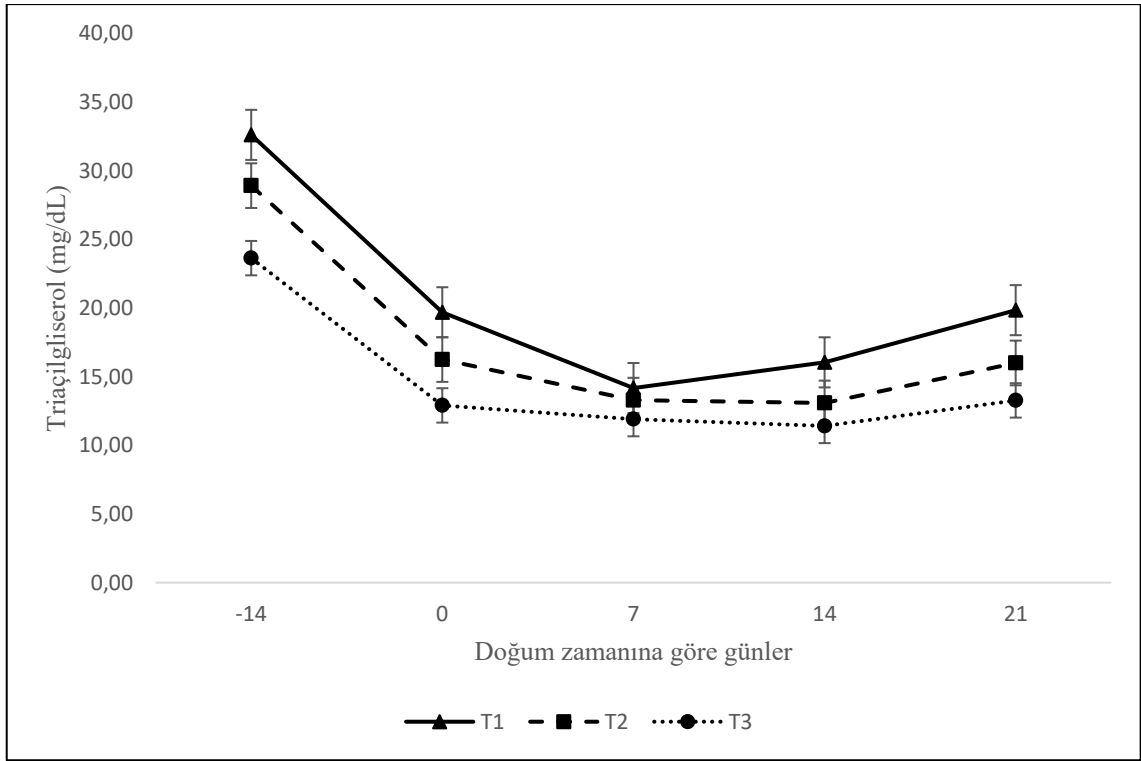
**Şekil 4.4.** Serum total protein konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Doğuma kadar total protein konsantrasyonu değişimi sınırlıdır, fakat doğumla birlikte önemli derecede düşmüştür. Total protein düzeyindeki düşüş T3 ( $6,62 \pm 0,23$  mg/dL) grubunda doğum sonrası 21. güne kadar devam ederken, T1 ( $7,33 \pm 0,15$  mg/dL) ve T2 ( $6,62 \pm 0,23$  mg/dL) gruplarında 14. günden itibaren artmaya başlamıştır (Şekil 4.4). Total protein konsantrasyonlarında tohumlama sayısının ve zamana bağlı örnekleme istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P < 0,001$ ) belirlenmiştir (Tablo 4.1).



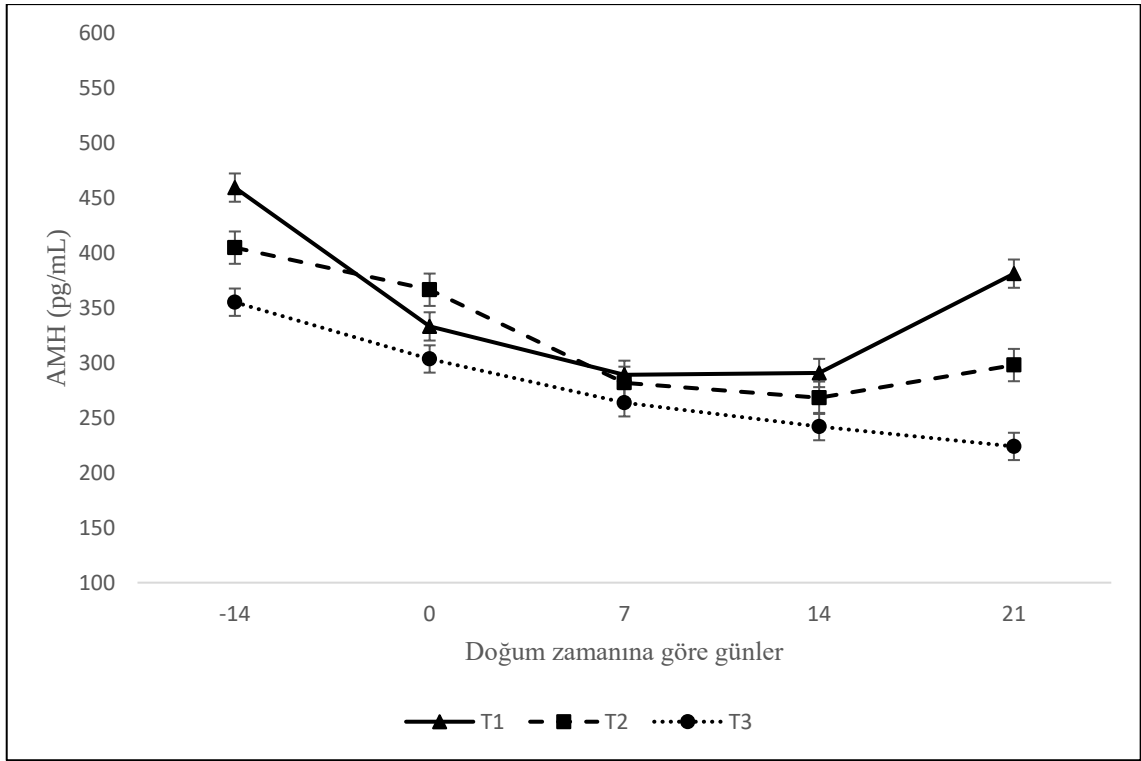
**Şekil 4.5.** Serum magnezyum konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Kan magnezyum konsantrasyonlarında T1 ( $2,21 \pm 0,07$  mg/dL) en yüksek değere sahip grup olurken, en düşük değere sahip grubun T3 ( $1,86 \pm 0,08$  mg/dL) olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.1). Doğumla birlikte artan Mg' nin doğum sonrası azalmaya başladığı görülmüştür. T3 grubunda azalma devam ederken, T1 ve T2 grubunda 14. günden itibaren artış başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Tohumlama\*zaman etkisi istatistiksel olarak anlamsız ( $P > 0,05$ ) iken, örnekleme zamanı tohumlama sayılarına etkisi ele alındığında gruplar üzerinde istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu ( $P < 0,001$ ) tespit edilmiştir.



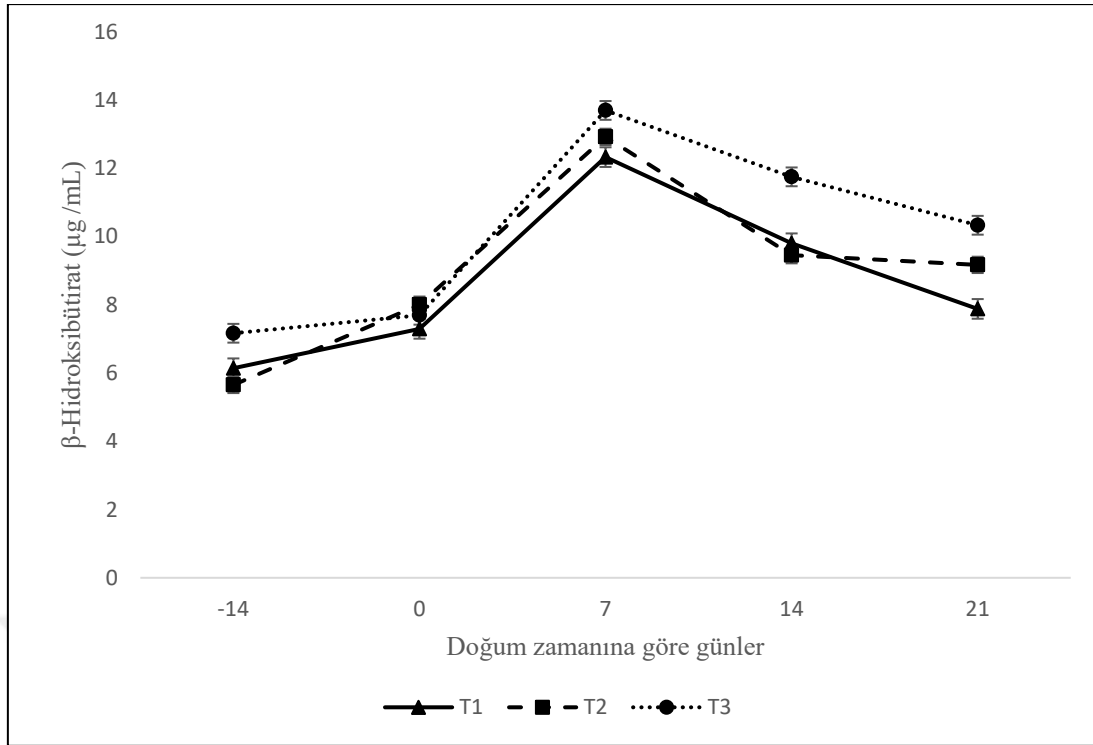
**Şekil 4.6.** Serum triaçilgliserol konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Doğum sonrası 7. güne kadar azalan serum triaçilgliserol konsantrasyonlarında doğumla birlikte tekrar artış gözlemlenmiştir. En yüksek triaçilgliserol konsantrasyonu T1 ( $20,47 \pm 1,82$  mg/dL) grubunda, en düşük triaçilgliserol konsantrasyonu ise T3 ( $14,63 \pm 1,25$  mg/dL) grubunda belirlenmiştir (Şekil 4.6). Serum triaçilgliserol düzeyleri incelendiğinde tohumlama sayısının istatistiksel olarak anlamsız ( $P > 0.05$ ), örnekleme zamanının ve tohumlama\*zaman etkisinin ise istatistiksel olarak anlamlı ( $P < 0.001$ ) olduğu görülmektedir (Tablo 4.1).



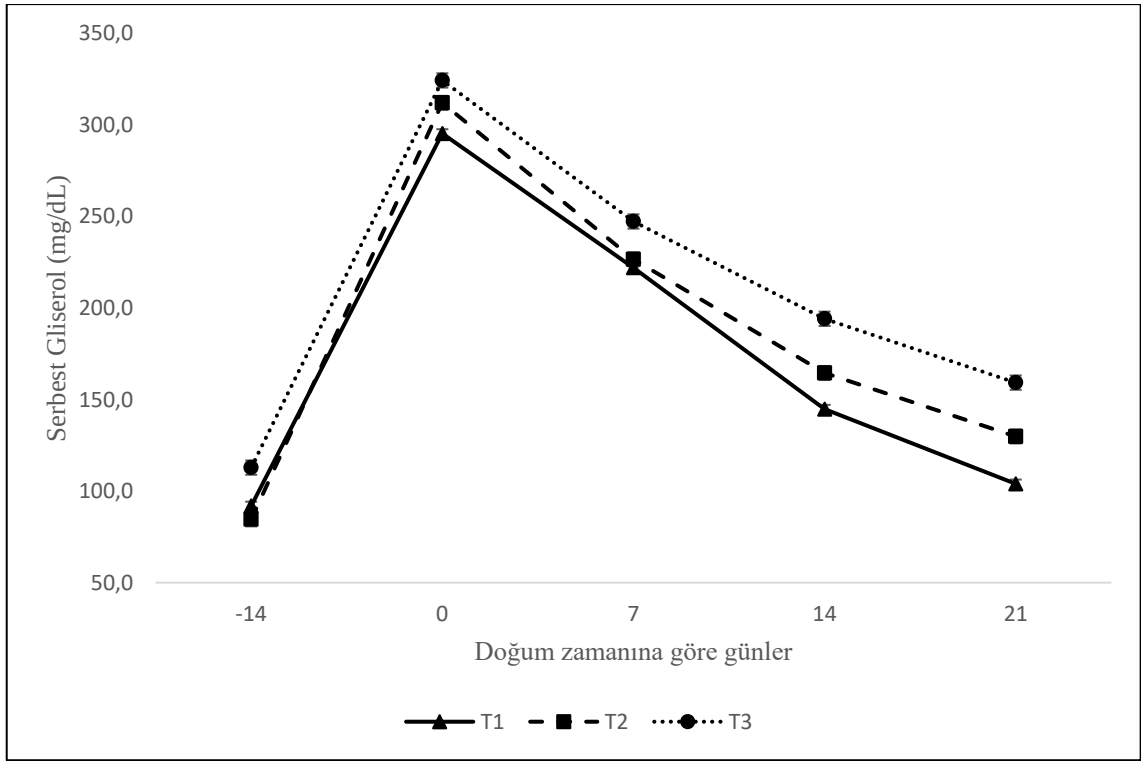
**Şekil 4.7.** Serum AMH konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Serum AMH konsantrasyonları incelendiğinde tohumlama sayısı, örnekleme zamanı ve tohumlama\*zaman etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P<0,001$ ) tespit edildi (Tablo 4.1). Doğumdan sonra AMH düzeyleri T1 ( $350,88\pm12,87$  pg/mL) grubunda yükselirken, T2 ( $324,00\pm14,72$  pg/mL) ve T3 ( $277,77\pm12,44$  pg/mL) grubunda ise düştüğü belirlendi. Her 3 grupta da doğum sonrası 7. güne kadar azaldığı, T1 grubunda 7. günden sonra, T2 grubunda 14. günden sonra artmaya başladığı, T3 grubunda ise 21. güne kadar azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.7).



**Şekil 4.8.** Serum  $\beta$ -Hidroksibütirat (BHB) konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

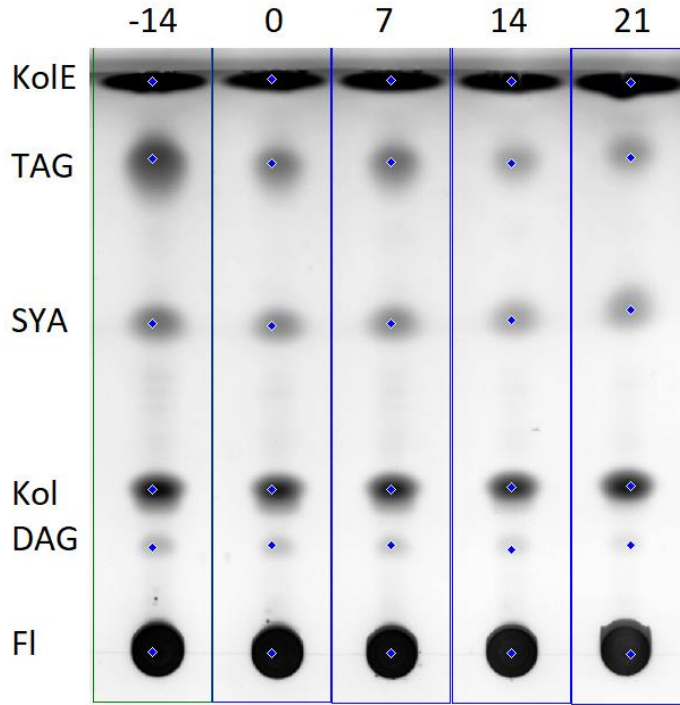
Doğumdan sonraki 7. güne kadar artan BHB konsantrasyonlarında doğumdan sonra sert bir yükseliş ve ardından kademeli düşüş gözlemlendi (Şekil 4.8). En yüksek konsantrasyona sahip grup T3 ( $10,12 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$ ) iken, T1 ( $8,69 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ ) ve T2 ( $9,04 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$ ) gruplarının konsantrasyonları birbirine benzer olarak tespit edildi. BHB konsantrasyonları üzerine tohumlama sayısı, örnekleme zamanı ve tohumlama\*zaman etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $P < 0,001$ ) belirlendi (Tablo 4.1).



**Şekil 4.9.** Serum serbest gliserol konsantrasyonlarının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

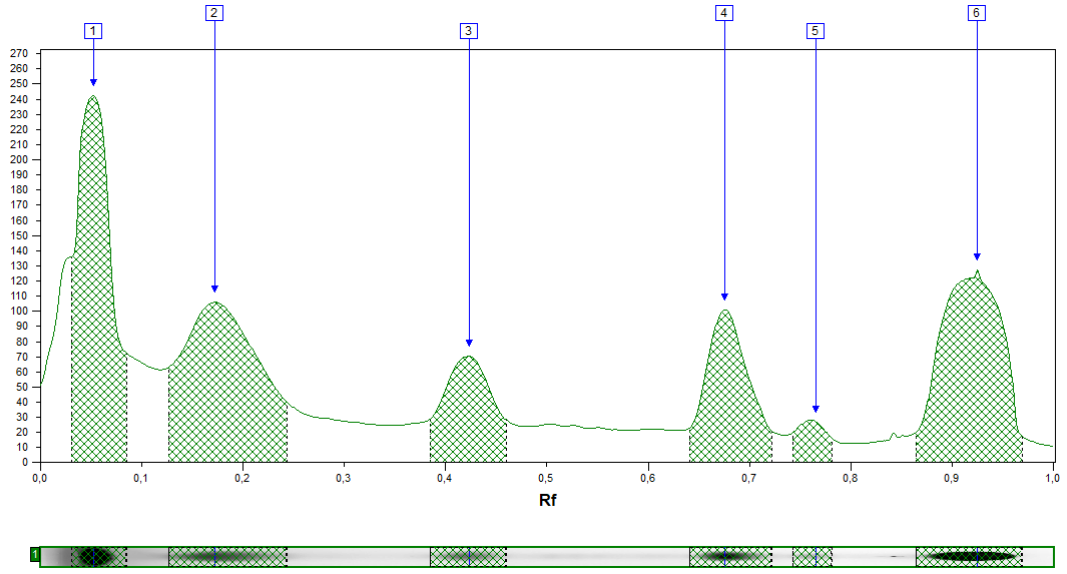
Serbest gliserol konsantrasyonları incelendiğinde doğumla birlikte büyük miktarda bir yükseliş ve sonrasında doğum öncesi konsantrasyonlarına yakın bir değere kademeli olarak düşüş gözlemlendi (Şekil 4.9). En yüksek serbest gliserol konsantrasyonu T3 ( $207,58 \pm 3,91$  mg/dL) grubunda, en düşük ise T1 ( $171,60 \pm 2,35$  mg/dL) grubunda tespit edildi. Tohumlama, örnekleme zamanı ve tohumlama\*zaman etkisinin gruplar üzerinde istatistiki olarak anlamlı ( $P < 0,001$ ) olduğu belirlendi (Tablo 4.1).

## 4.2. Kromatografik Bulgular

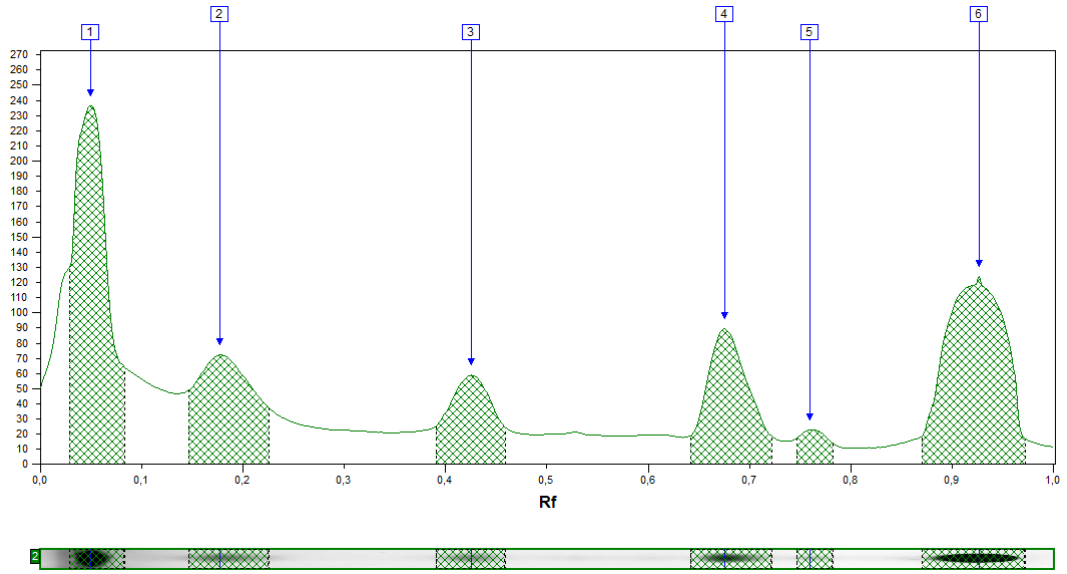


**Şekil 4.10.** T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT kromatogramı

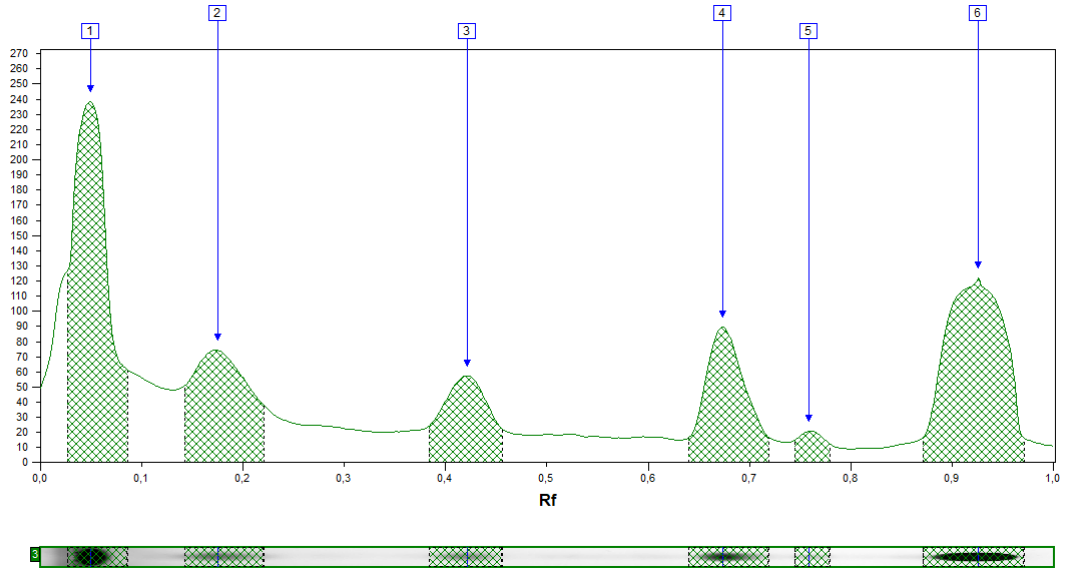
Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi ile serum lipid profili incelendiğinde başlıca 6 lipid sınıfı tespit edildi (Şekil 4.10): 1. Kolesterol esteri (KOLE), 2. Triaçilgliserol (TAG), 3. Serbest yağ asidi (SYA), 4. Serbest kolesterol (KOL), 5. Diaçilgliserol (DAG), 6. Fosfolipid (FL).



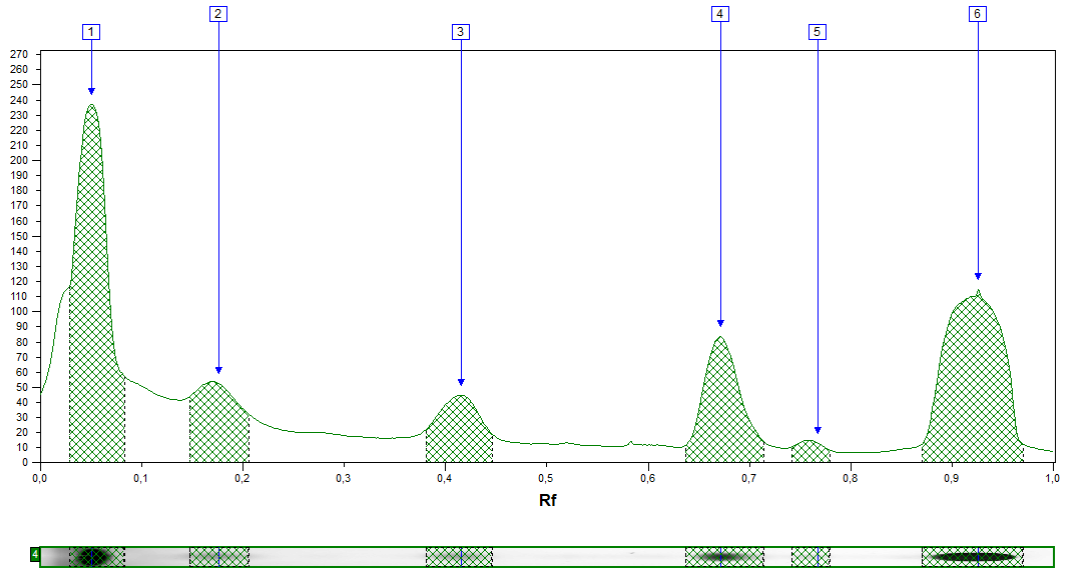
**Şekil 4.11.** Doğumdan 14 gün önce T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT dansitogramı



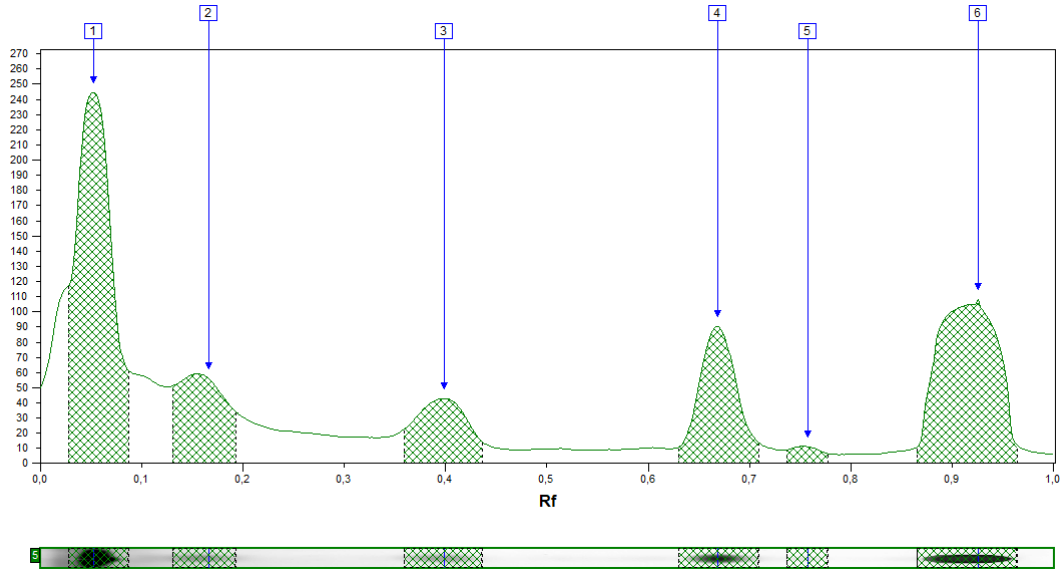
**Şekil 4.12.** Doğum anı T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT dansitogramı



**Şekil 4.13.** Doğumdan 7 gün sonra T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT dansitogramı



**Şekil 4.14.** Doğumdan 14 gün sonra T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİT dansitogramı



**Şekil 4.15.** Doğumdan 21 gün sonra T3 grubu serum lipid sınıflarına ait YPİTK dansitogramı

**Tablo 4.2.** Doğum öncesi 14. gün, doğum anında ve doğumdan sonra 7., 14. ve 21. günde alınan kan numunelerinin YPİTK analizleri.

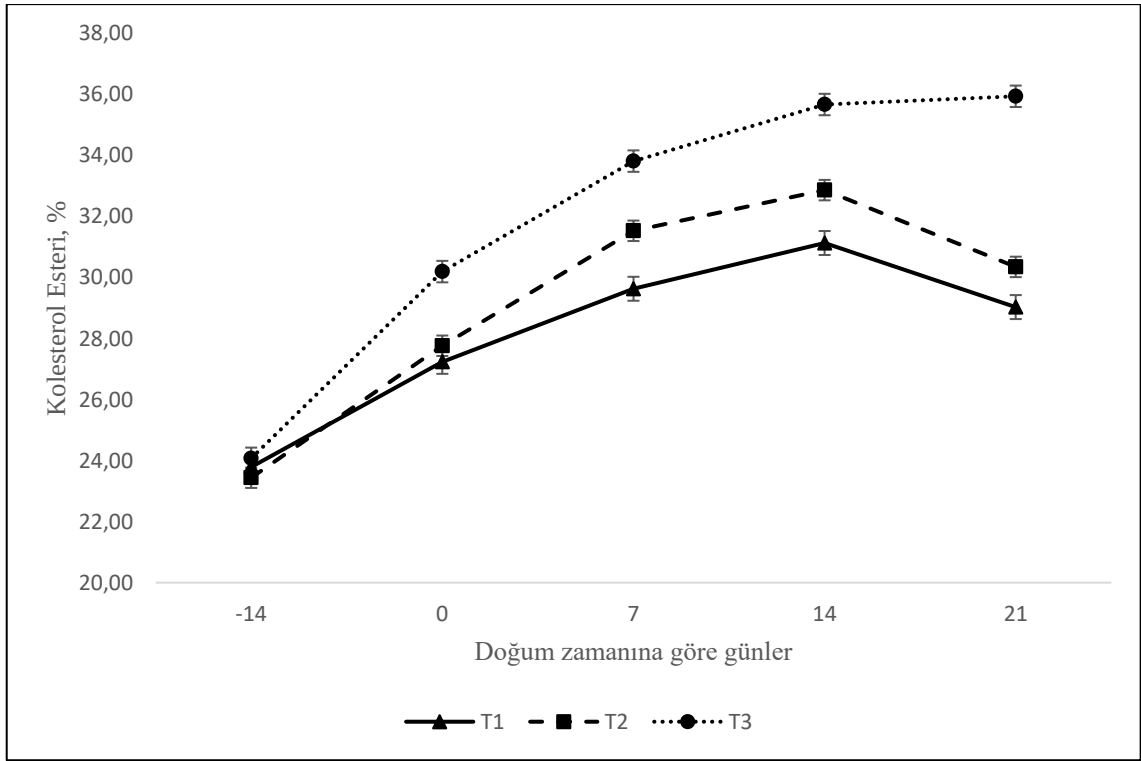
| Gün                   | T1<br>$\bar{x} \pm SH$  | T2<br>$\bar{x} \pm SH$  | T3<br>$\bar{x} \pm SH$  | Tohumlamaya<br>Bağlı P Değeri | Zamana<br>Bağlı P<br>Değeri | TxZ<br>Bağlı P<br>Değeri |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Kolesterol esteri, %  | 28,16±0,80 <sup>c</sup> | 29,09±1,02 <sup>b</sup> | 31,94±1,39 <sup>a</sup> | <0,001                        | <0,001                      | <0,001                   |
| TAG, %                | 20,29±0,77 <sup>a</sup> | 18,94±0,90 <sup>b</sup> | 16,33±1,41 <sup>c</sup> | <0,001                        | <0,001                      | <0,001                   |
| SYA, %                | 9,21±0,21 <sup>a</sup>  | 9,58±0,22 <sup>b</sup>  | 9,12±0,26 <sup>a</sup>  | <0,001                        | <0,001                      | <0,001                   |
| Serbest kolesterol, % | 14,41±0,25              | 14,16±0,27              | 14,10±0,27              | >0,05                         | >0,05                       | >0,05                    |
| DAG, %                | 2,47±0,04 <sup>b</sup>  | 2,54±0,06 <sup>b</sup>  | 1,94±0,16 <sup>a</sup>  | <0,001                        | <0,001                      | <0,001                   |
| Fosfolipid, %         | 25,47±0,35 <sup>b</sup> | 25,61±0,34 <sup>b</sup> | 26,40±0,49 <sup>a</sup> | <0,001                        | >0,05                       | <0,001                   |

\*Aynı satırdaki farklı üstel harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0,05).

T1: Bir sonraki tohumlama döneminde 1 kez tohumlananlar

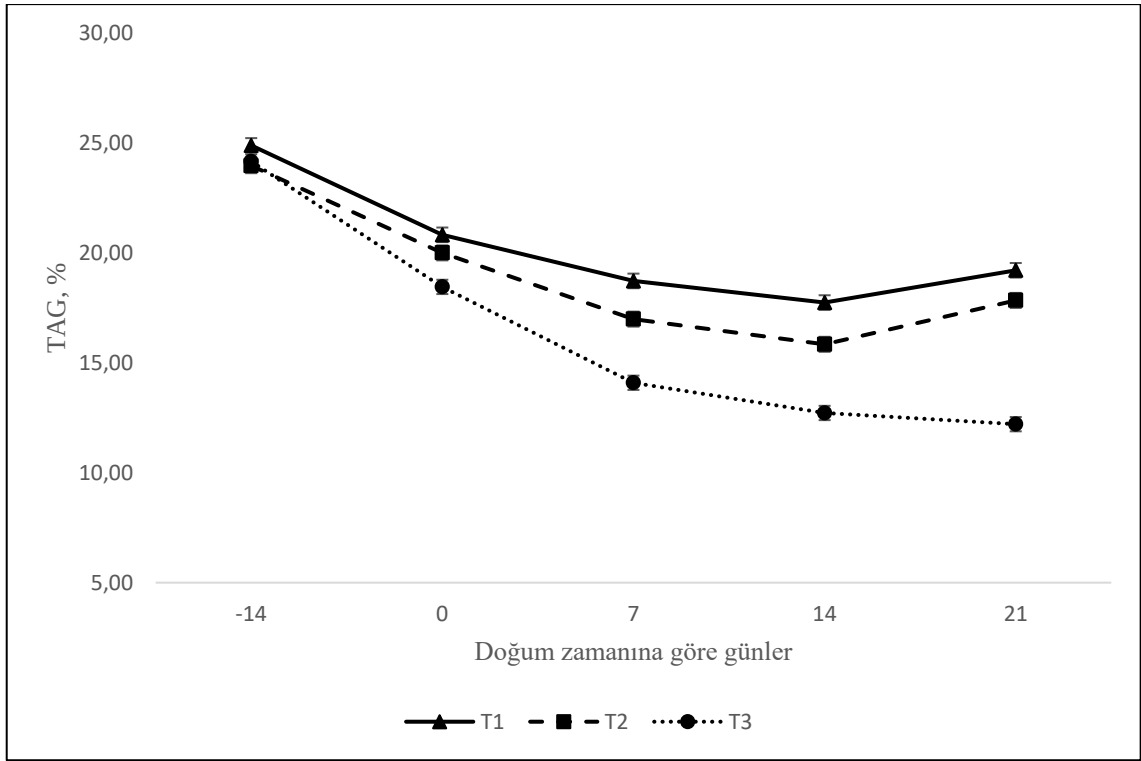
T2: Bir sonraki tohumlama döneminde 2 kez tohumlananlar

T3: Bir sonraki tohumlama döneminde 3 ve daha fazla kez tohumlananlar



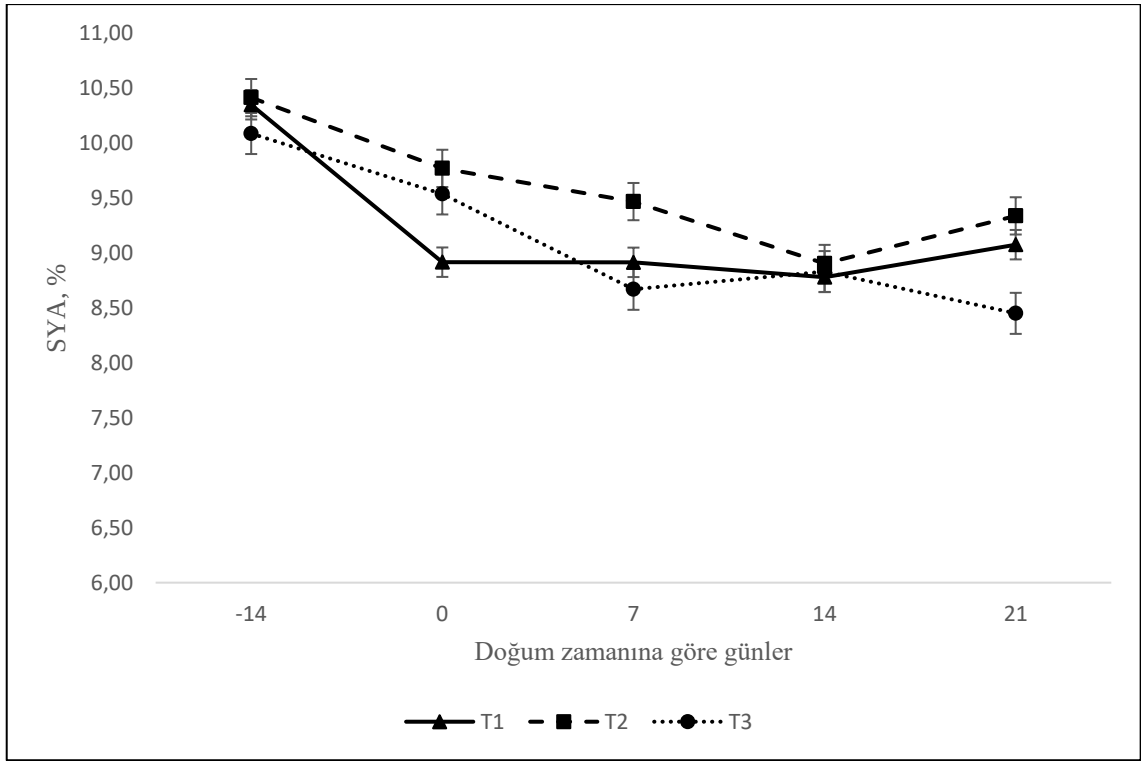
**Şekil 4.16.** Serum toplam yağı içerisindeki kolesterol esteri oranının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Serum toplam yağı içerisindeki KOLE oranı incelendiğinde doğum öncesinden başlayarak doğum sonrası 14. güne kadar giderek artan oran gözlemlenmektedir. 14. günden sonra T1 ve T2 gruplarında KOLE oranı azalma başlarken T3 grubunda artmaya devam etmiştir (Şekil 4.16). En yüksek artış T3 ( $31,94 \pm 1,39$ , %) grubunda görülürken, T2 ( $29,09 \pm 1,02$ , %) ve T1 ( $28,16 \pm 0,80$ , %) gruplarında sırasıyla daha az yükselme tespit edilmiştir. İstatistiki değerlendirmede tohumlama sayısı, örnekleme zamanı ve tohumlama\*zaman etkisi anlamlı olarak  $P < (0,001)$  belirlenmiştir (Tablo 4.2).



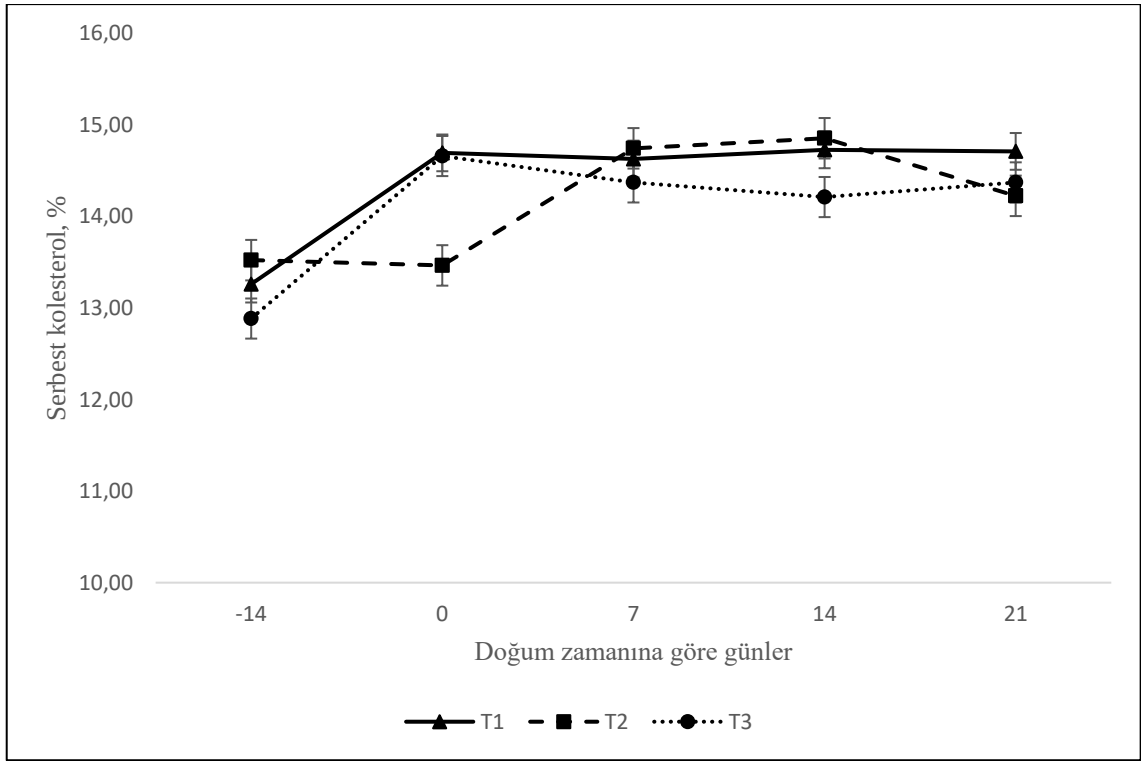
**Şekil 4.17.** Serum toplam yağı içerisindeki triaçilgliserol (TAG) oranının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Serum toplam yağı içerisindeki triaçilgliserol oranı doğumdan başlayarak doğumdan sonra 14. güne kadar değişen oranlarda azaldığı gözlenmektedir (Şekil 4.17). En büyük azalma T3 ( $16,33 \pm 1,41$ , %) grubunda, en düşük azalma ise T1 ( $20,29 \pm 0,77$ , %) grubunda tespit edilmiştir. Tohumlama sayısı, örnekleme zamanı ve tohumlama\*zaman etkisi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı ( $P < 0,001$ ) bulunmuştur (Tablo 4.2).



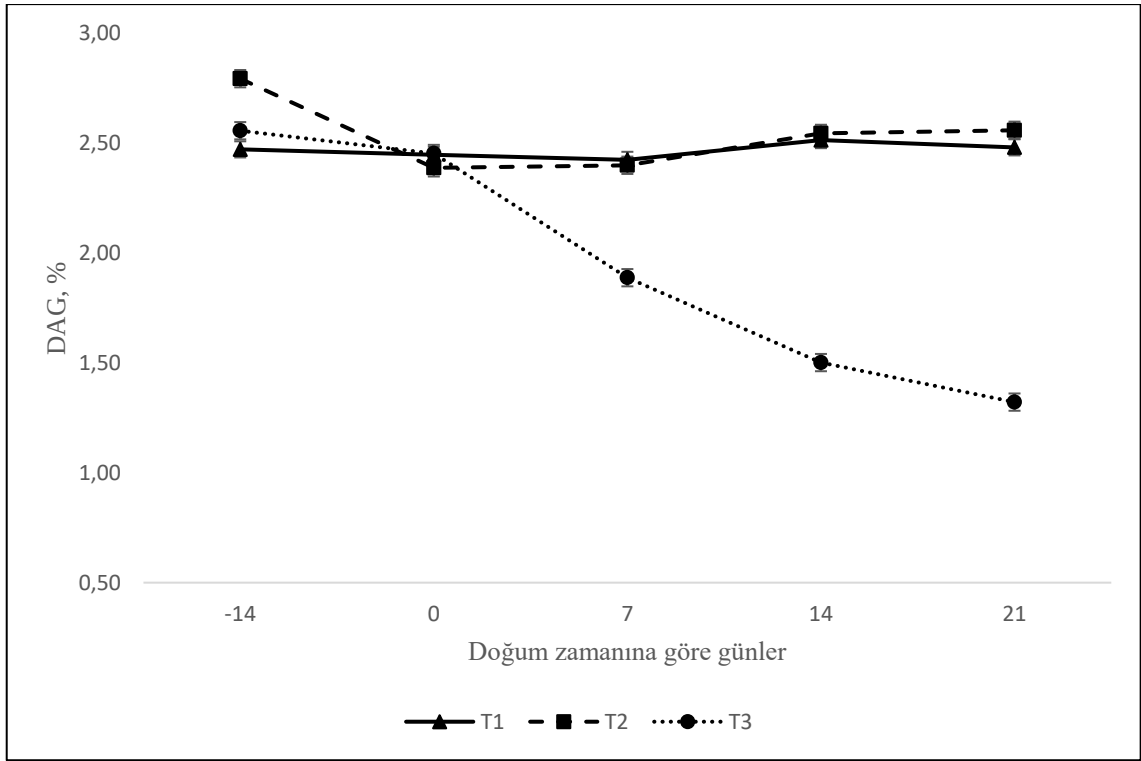
**Şekil 4.18.** Serum toplam yağı içerisindeki Serbest yağ asiti (SYA) oranının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Serum toplam yağı içerisindeki serbest yağ asiti oranının doğum zamanındaki günlere göre değişimi incelendiğinde doğum öncesi 14. günden başlayarak doğumdan sonra 14. güne kadar kademeli bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Doğum sonrası 14. günden itibaren T1 ve T2 gruplarında SYa oranı artarken, T3 grubunda azalmaya devam etmiştir (Şekil 4.18). Serbest yağ asiti oranı T1 ( $9,21 \pm 0,21$ , %) ve T3 ( $9,12 \pm 0,26$ , %) grubunda benzer iken, T2 ( $9,58 \pm 0,22$ , %) grubunda bu iki gruptan yüksektir. Tablo 4.2’ de gösterildiği üzere istatistiki olarak değerlendirildiğinde ise örneklem zamanına göre gruplar arasındaki değişim anlamlıdır ( $P < 0,001$ ).



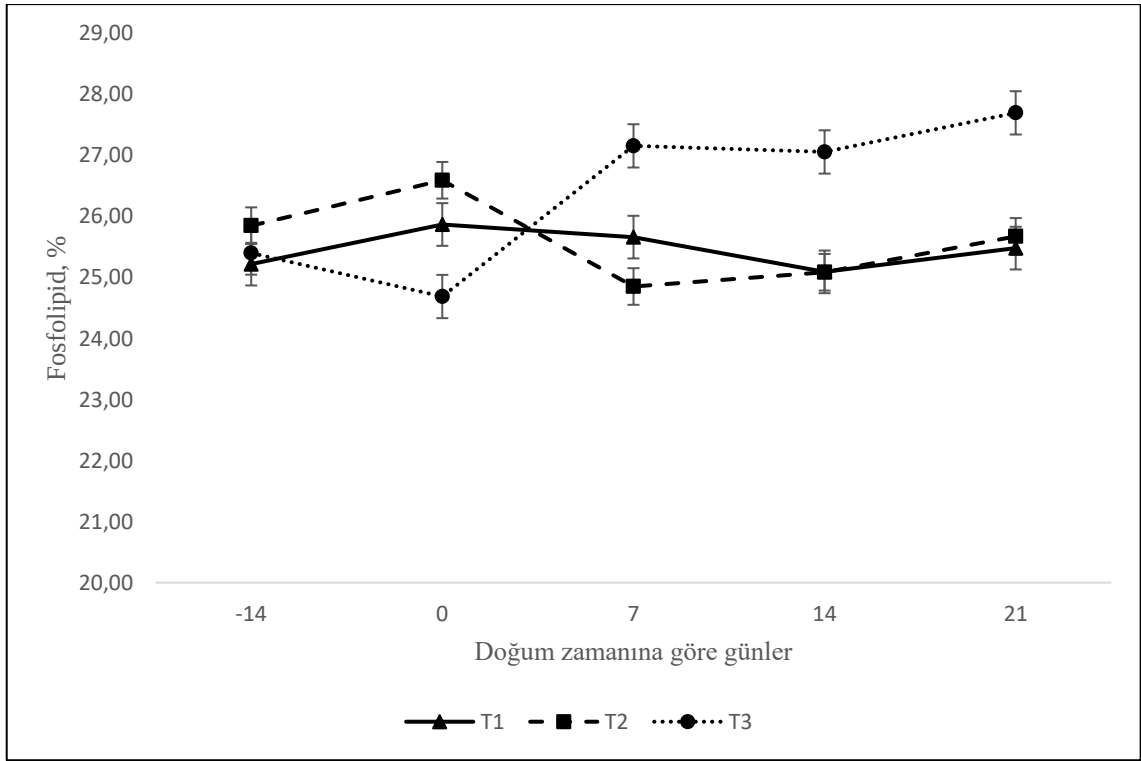
**Şekil 4.19.** Serum toplam yağı içerisindeki serbest kolesterol oranının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Serum toplam yağı içerisindeki serbest kolesterol oranı incelendiğinde büyük oranda bir değişim gözlemlenmemektedir (Şekil 4.19). Gruplar arası kolesterol oranında fark tespit edilemedi. İstatistiki değerlendirmede tohumlama sayısı, örneklme zamanı ve tohumlama\*zaman etkisi önemsiz  $P > (0,05)$  olarak belirlendi (Tablo 4.2).



**Şekil 4.20.** Serum toplam yağı içerisindeki diaçilgliserol (DAG) oranının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Tablo 4.2 ve Şekil 4.20 incelendiğinde serum toplam yağı içerisindeki diaçilgliserol oranı T1 ( $2,47 \pm 0,04$ , %) ve T2 ( $2,54 \pm 0,06$ , %) gruplarında doğum öncesi 14. günden doğum sonrası 21. güne kadar sabit bir seyir izlerken T3 ( $1,94 \pm 0,16$ , %) grubunda doğum öncesinden başlayarak kademeli bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Tohumlama sayısının, örnekleme zamanının ve tohumlama\*zaman etkisinin gruplar üzerinde istatistiki olarak önemli olduğu ( $P < 0,001$ ) belirlenmiştir.



**Şekil 4.21.** Serum toplam yağı içerisindeki fosfolipid oranının doğum zamanındaki günlere göre değişimi

Tablo 4.2’ deki serum toplam yağı içerisindeki fosfolipid oranı incelendiğinde T1 ( $25,47 \pm 0,35$ , %) ve T2 ( $25,61 \pm 0,34$ , %) gruplarının birbirine yakın değerde oldukları T3 ( $26,40 \pm 0,49$ , %) grubunun ise bu iki gruptan daha yüksek değerde olduğu saptanmıştır. Tohumlama sayısı ve tohumlama\*zaman etkisinin gruplar üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $P < 0,001$ ) belirlenmiştir. Şekil 4.21’ de gösterildiği üzere 21. günde T1 ve T2 grupları doğum öncesi oranlarında iken, T3 grubu 21. günde doğum öncesine göre artmış bulunmaktadır.

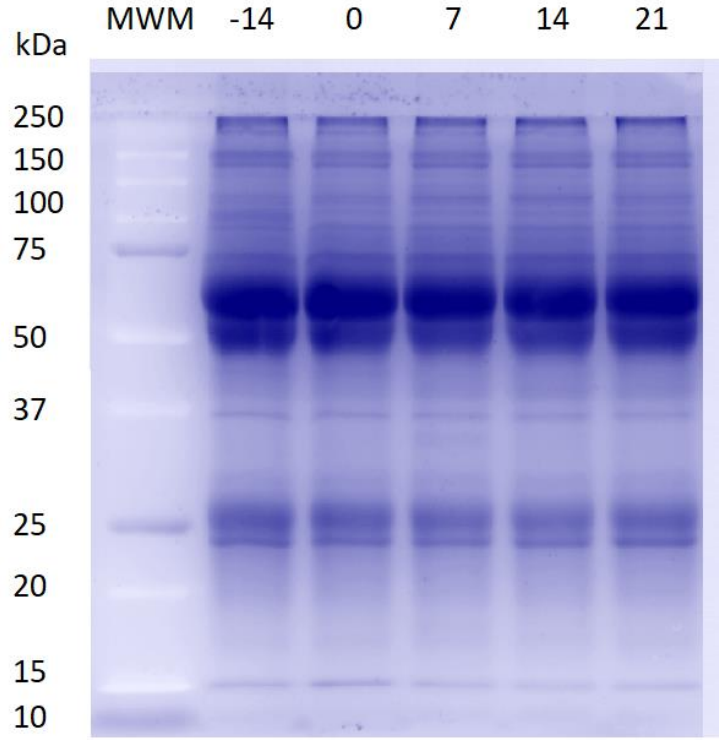
**Tablo 4.3.** Çalışmada ölçülen parametrelerin birbiri ile korelasyonu

|                        | KolE,% | TAG,%    | SYA,%    | Kol,%    | DAG,%    | Fl,%     | Ca<br>(mg/dL) | TP<br>(g/dL) | TAG<br>(mg/dL) | P<br>(mg/dL) | Mg<br>(mg/dL) | Kol<br>(mg/dL) | AMH<br>(pg/mL) | BHB<br>(µg/mL L) | S. Gliserol<br>(mg/dL) |
|------------------------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------|--------------|----------------|--------------|---------------|----------------|----------------|------------------|------------------------|
| KolE                   | 1      | -0,942** | -0,596** | 0,317**  | -0,670** | 0,184*   | 0,012         | -0,246**     | -0,297**       | -0,034       | -0,096        | 0,462**        | -0,323**       | 0,111            | -0,007                 |
| TAG, %                 |        | 1        | 0,601**  | -0,407** | 0,702**  | -0,336** | -0,015        | 0,274**      | 0,301**        | 0,035        | 0,078         | -0,478**       | 0,352**        | -0,148*          | -0,016                 |
| SYA, %                 |        |          | 1        | -0,253** | 0,464**  | -0,366** | 0,047         | 0,250**      | 0,252**        | -0,097       | 0,000         | -0,333**       | 0,320**        | -0,179*          | -0,007                 |
| Kol, %                 |        |          |          | 1        | -0,077   | -0,194** | -0,023        | -0,120       | -0,163*        | -0,018       | -0,091        | 0,150*         | -0,173*        | 0,077            | 0,010                  |
| DAG, %                 |        |          |          |          | 1        | -0,490** | 0,010         | 0,221**      | 0,116          | -0,034       | 0,015         | -0,329**       | 0,214**        | -0,067           | -0,015                 |
| Fl, %                  |        |          |          |          |          | 1        | -0,008        | -0,133       | -0,079         | -0,002       | 0,093         | 0,127          | -0,154*        | 0,080            | 0,058                  |
| Ca (mg/dL)             |        |          |          |          |          |          | 1             | 0,243**      | 0,494**        | 0,440**      | -0,360**      | 0,376**        | 0,409**        | -0,315**         | -0,845**               |
| TP (g/dL)              |        |          |          |          |          |          |               | 1            | 0,376**        | -0,117       | 0,114         | -0,297**       | 0,528**        | -0,493**         | -0,097                 |
| TAG (mg/dL)            |        |          |          |          |          |          |               |              | 1              | 0,042        | -0,121        | -0,126         | 0,571**        | -0,508**         | -0,435**               |
| P (mg/dL)              |        |          |          |          |          |          |               |              |                | 1            | -0,376**      | 0,553**        | -0,122         | 0,164*           | -0,566**               |
| Mg (mg/dL)             |        |          |          |          |          |          |               |              |                |              | 1             | -0,327**       | 0,009          | -0,058           | 0,569**                |
| Kol (mg/dL)            |        |          |          |          |          |          |               |              |                |              |               | 1              | -0,334**       | 0,283**          | -0,469**               |
| AMH (pg/mL)            |        |          |          |          |          |          |               |              |                |              |               |                | 1              | -0,599**         | -0,277**               |
| BHB (µg/mL)            |        |          |          |          |          |          |               |              |                |              |               |                |                | 1                | 0,278**                |
| S. Gliserol<br>(mg/dL) |        |          |          |          |          |          |               |              |                |              |               |                |                |                  | 1                      |

\*\* Önem derecesi P&lt;0,01

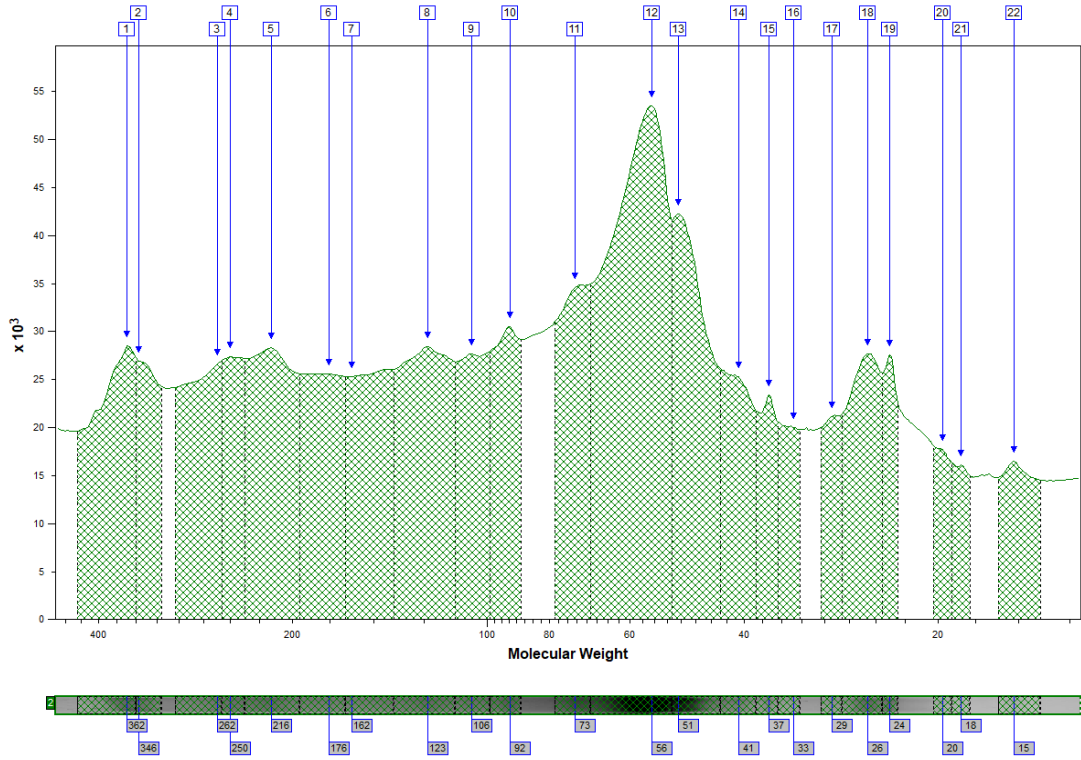
\* Önem derecesi P&lt;0,05

### 4.3. Elektroforetik Bulgular

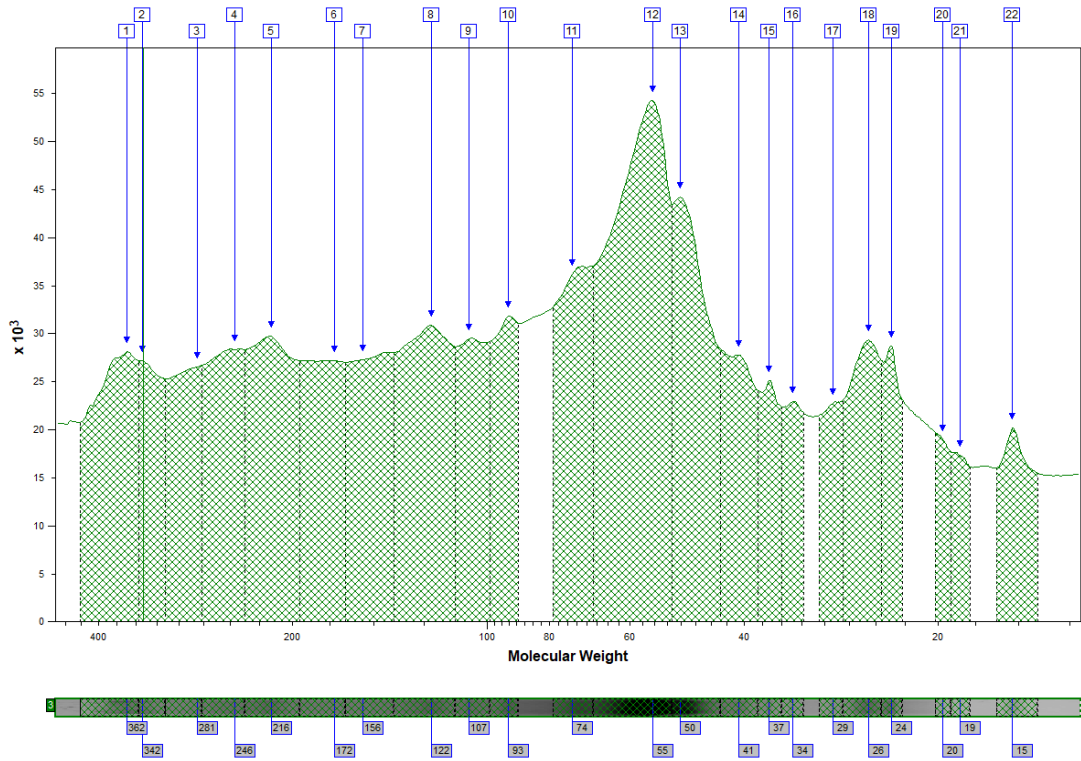


**Şekil 4.22.** T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJ elektroforetogramı

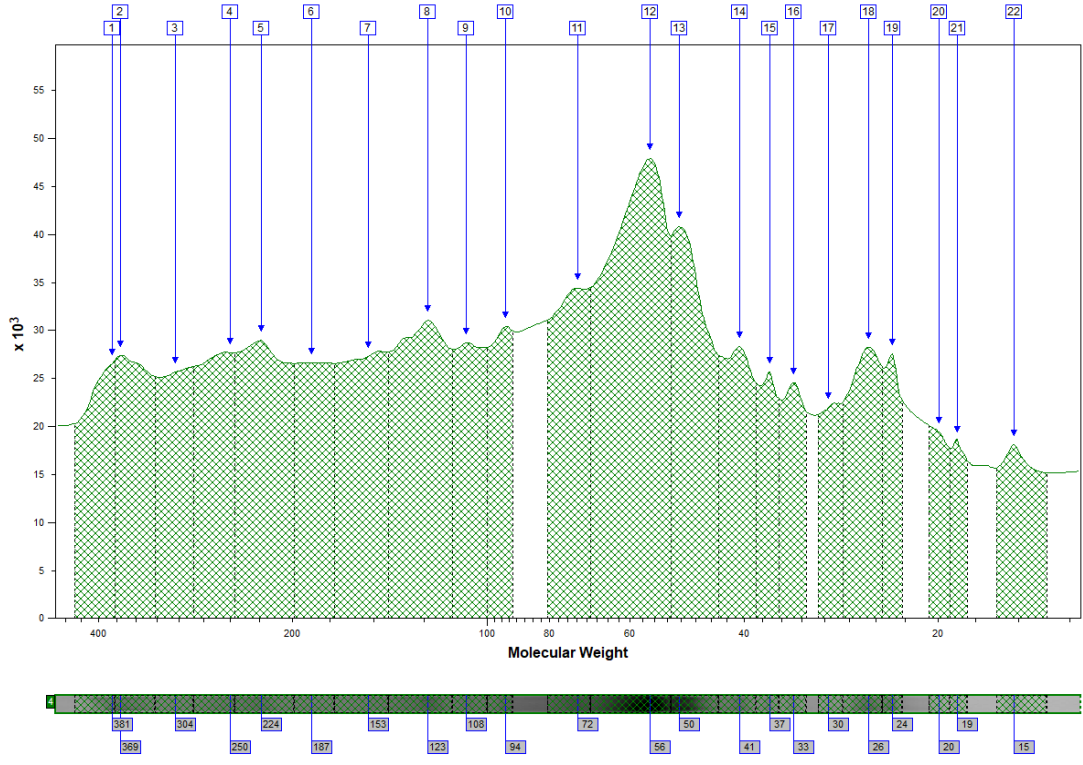
Serum örneklerinin SDS-PAJE analizi sonucu 361,538 Da ile 15,251 Da arası toplam 24 protein tespit edildi (Şekil 4.22 ve Tablo 4.4).



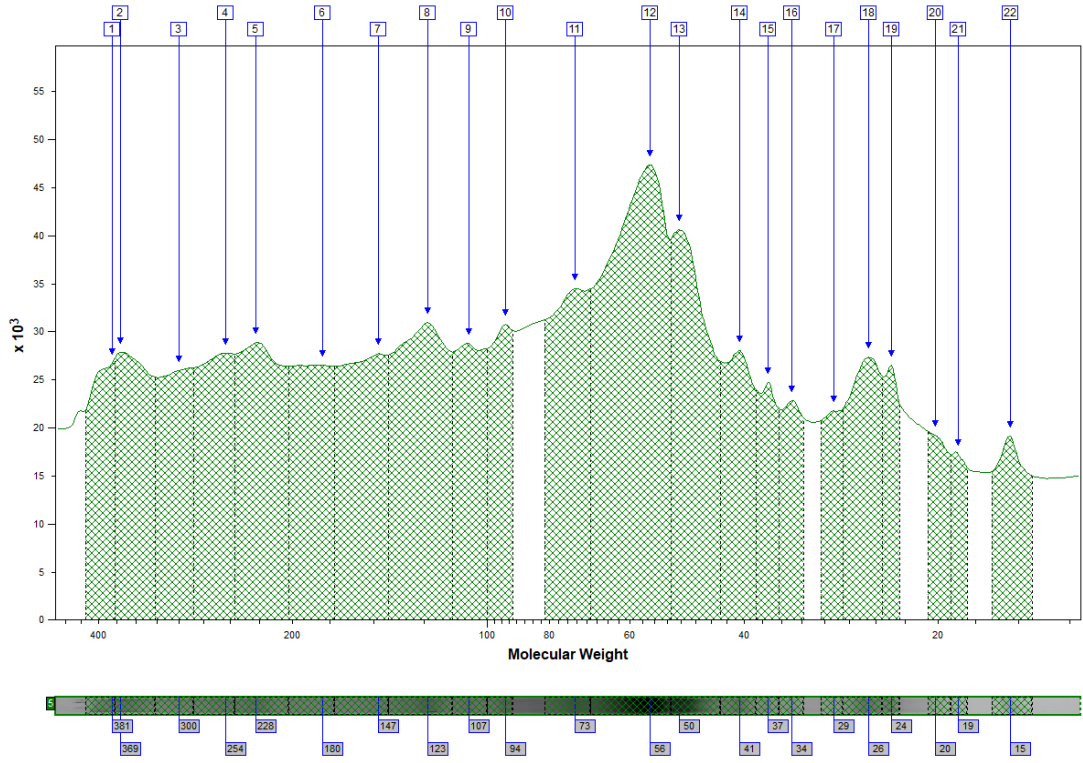
Şekil 4.23. Doğumdan 14 gün önce T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE dansitogramı



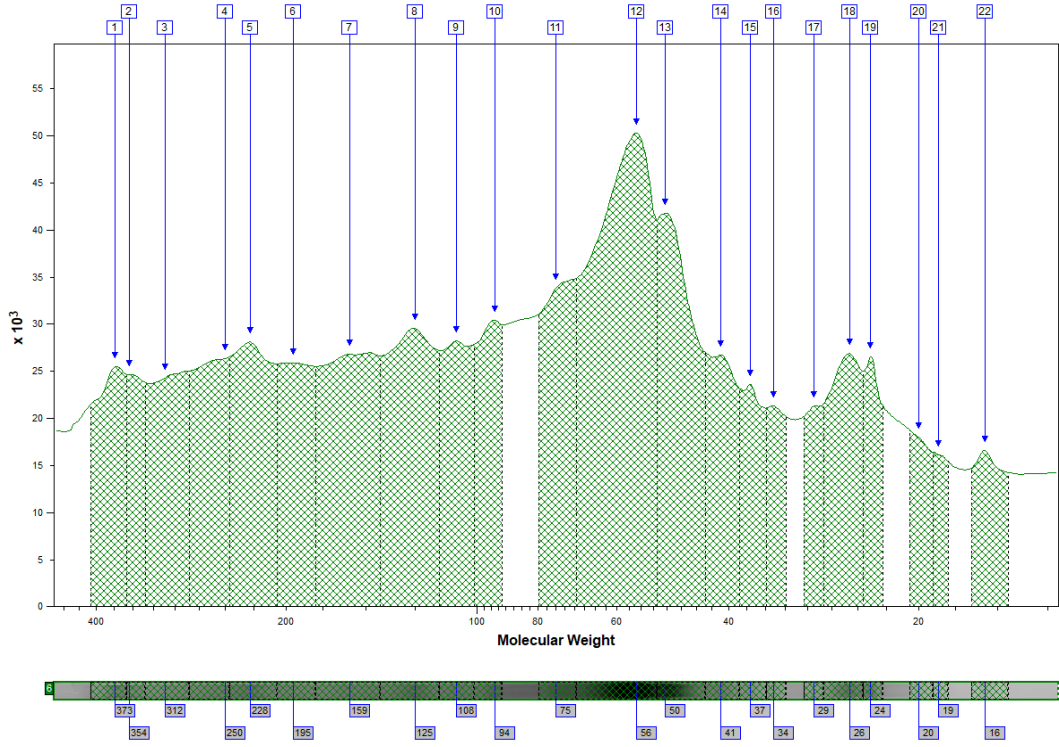
Şekil 4.24. Doğum anı T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE dansitogramı



Şekil 4.25. Doğumdan 7 gün sonra T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE dansitogramı



Şekil 4.26. Doğumdan 14 gün sonra T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE dansitogramı



Şekil 4.27. Doğumdan 21 gün sonra T3 grubu serum protein sınıflarına ait SDS-PAJE dansitogramı

Tablo 4.4. T3 grubu serum total proteini içindeki bireysel proteinlerin miktarları (volumü).

| MA<br>(Da)        | Gün   |           |       |           |       |           |       |           |       |           |
|-------------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|
|                   | -14   |           | 0     |           | 7     |           | 14    |           | 21    |           |
|                   | Volum | Band<br>% | Volum | Band<br>% | Volum | Band<br>% | Volum | Band<br>% | Volum | Band<br>% |
| 361,538           | 501   | 4,06      | 485   | 4,00      | 253   | 2,18      | 283   | 2,51      | 188   | 1,76      |
| 346,154           | 212   | 1,72      | 194   | 1,60      | 323   | 2,79      | 135   | 1,20      | 159   | 1,49      |
| 261,538           | 305   | 2,47      | 238   | 1,97      | 260   | 2,25      | 291   | 2,58      | 237   | 2,22      |
| 250,000           | 138   | 1,12      | 255   | 2,10      | 249   | 2,16      | 237   | 2,10      | 279   | 2,62      |
| 215,550           | 276   | 2,24      | 264   | 2,18      | 256   | 2,22      | 224   | 1,99      | 240   | 2,25      |
| 176,005           | 207   | 1,68      | 200   | 1,65      | 195   | 1,69      | 166   | 1,47      | 178   | 1,67      |
| 162,209           | 233   | 1,89      | 228   | 1,88      | 248   | 2,15      | 292   | 2,59      | 202   | 1,89      |
| 123,461           | 444   | 3,60      | 435   | 3,59      | 431   | 3,73      | 388   | 3,44      | 398   | 3,73      |
| 105,612           | 360   | 2,92      | 348   | 2,87      | 339   | 2,93      | 332   | 2,94      | 303   | 2,84      |
| 92,018            | 356   | 2,88      | 310   | 2,56      | 273   | 2,36      | 297   | 2,64      | 246   | 2,30      |
| 73,089            | 510   | 4,14      | 556   | 4,59      | 582   | 5,03      | 492   | 4,37      | 472   | 4,42      |
| 55,633            |       |           |       |           |       |           |       |           |       |           |
| (Albümin)         | 2502  | 20,28     | 2297  | 18,94     | 2052  | 17,75     | 2189  | 19,42     | 1963  | 18,39     |
| 50,569            | 1551  | 12,57     | 1504  | 12,4      | 1426  | 12,33     | 1458  | 12,94     | 1500  | 14,05     |
| 40,827            | 750   | 6,08      | 772   | 6,36      | 738   | 6,38      | 691   | 6,13      | 599   | 5,62      |
| 36,543            | 423   | 3,43      | 462   | 3,81      | 414   | 3,58      | 496   | 4,40      | 391   | 3,67      |
| 33,489            | 407   | 3,30      | 415   | 3,42      | 470   | 4,06      | 347   | 3,08      | 372   | 3,48      |
| 29,271            | 465   | 3,77      | 495   | 4,08      | 435   | 3,76      | 387   | 3,43      | 403   | 3,77      |
| 25,760            | 1005  | 8,14      | 922   | 7,60      | 890   | 7,69      | 896   | 7,95      | 899   | 8,42      |
| 23,764            | 369   | 2,99      | 467   | 3,85      | 372   | 3,21      | 408   | 3,62      | 340   | 3,18      |
| 19,709            | 510   | 4,13      | 449   | 3,70      | 578   | 5,00      | 579   | 5,13      | 578   | 5,41      |
| 18,428            | 532   | 4,31      | 541   | 4,46      | 485   | 4,19      | 429   | 3,81      | 413   | 3,87      |
| 15,251            | 282   | 2,28      | 291   | 2,40      | 296   | 2,56      | 255   | 2,26      | 314   | 2,94      |
| Toplam<br>*100000 | 12337 | 100       | 12127 | 100       | 11564 | 100       | 11271 | 100       | 10674 | 100       |

## 5. TARTIŞMA

Geçiş dönemi sağlığı, süt hayvanlarının sonraki dönemlerde üretim ve üreme performansının önemli bir belirleyicisidir.<sup>151</sup> Periparturient dönemde enerji ihtiyacını karşılamak için derin endokrin değişiklikler meydana gelmektedir.<sup>152</sup> Bu tezin başlıca amacı folikül gelişiminin düzenlenmesinde rol oynayan temel faktörlerden biri olan AMH'nin geçiş dönemi serum konsantrasyonu ile gebe kalma oranı arasındaki korelasyonu değerlendirmektir.

Anti-müllerian hormon dişi embriyoda granuloza hücreleri tarafından salgılanmaktadır. AMH ekspresyonunun primer foliküllerde düşük düzeyde başlayıp antral aşamaya kadar devam ettiği, en yüksek seviyeye ise preantral foliküllerde ulaştığı bildirilmiştir.<sup>126, 153, 154</sup>

Dişilerde AMH erken primordial folikül aktivasyonunu inhibe eder. Bu hormonun eksikliğinin farelerde erken menopoza neden olduğu gösterilmiştir.<sup>128, 155</sup> Dişilerdeki AMH seviyelerinin reproduktif yaşlanma, yumurtalık rezervi, gelişen folikül sayısı veya antral folikül sayısı (AFS), süperovulasyon ilaçlarına cevap verme yeteneği ile in vitro üretim sırasında alınan oosit sayısını yansıttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>156-159</sup>

Foliküler düzeyde AMH, pre-antral büyüyen foliküller tarafından exprese edilir ve kalan primordial folikülleri uyku halinde tutar.<sup>160, 161</sup> Serum ve/veya plazmada ölçülen bireysel AMH seviyelerinin, hipotalamik-hipofiz-gonadal ekseninden bağımsız olarak, östrus siklusları arasında tutarlı olduğu ve FSH düzeyleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.<sup>6, 162-164</sup> Popülasyon düzeyinde incelendiğinde ise AMH farklı yumurtalık potansiyeline sahip bireyler arasında oldukça farklı seviyeler göstermektedir.<sup>129</sup> Sığır alt türleri *Bos taurus taurus* ve *Bos taurus indicus* incelendiğinde, her alt türün spesifik bir AMH seviyesine sahip olduğu bildirilmiştir.<sup>11, 165-167</sup>

Anti-müllerian hormon ölçümüyle tahmin edilen yumurtalık rezervi, genel olarak yumurtalıkta mevcut toplam oosit miktarını yansıtmaktadır.<sup>129, 157</sup> Yapılan bir çalışmada, AMH östrus siklusunun herhangi bir aşamasında serumda ölçüldüğünde diğer endokrin ve parakrin üreme hormonları konsantrasyonlarına bakılmaksızın kesin sonuç verdiği gösterilmiştir.<sup>158</sup> AMH konsantrasyonunun insanlarda ve hayvanlarda bir siklustan diğerine tutarlı olduğu bildirilmiştir ve bu da onu döngü içi ve döngüler arası yumurtalık durumunun mükemmel bir göstergesi yapmaktadır.<sup>5, 168</sup> Yine AMH doğurganlık için iyi bir prognostik araçtır ve iyi bir sütçü sürü elde etmek için sığırların ayıklanmasında kullanılabilir.<sup>169</sup>

Yapılan bu çalışmada serum AMH konsantrasyonlarının tohumlama sayısı, örneklem zamanı ve tohumlama\*zaman etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P<0,001$ ) tespit edildi (Tablo 4.1). Doğumdan sonra AMH düzeyleri T1 ( $350,88\pm12,87$  pg/mL) grubunda yükseldiği, T2 ( $324,00\pm14,72$  pg/mL) ve T3 ( $277,77\pm12,44$  pg/mL) grubunda ise düştüğü ve gruplar arasında anlamlı fark olduğu ( $P<0,05$ ) belirlendi. Bu sonuçlara dayanarak negatif enerji dengesinde postpartum AMH konsantrasyonlarını daha hızlı ve daha yüksek konsantrasyona ulaştırabilen ineklerin bir sonraki tohumlamada daha kolay gebe kaldıkları söylenebilir.

Periparturient dönemde enerji ihtiyacını karşılamak için endokrin değişikliklerin yanında metabolik değişiklikler de meydana gelmektedir.<sup>152</sup> Kolostrum ve süt sentezi için yüksek düzeyde enerji ve besin maddesi ihtiyacı, yine bu dönemde yem alımının azalması ile birleştiğinde geçiş dönemindeki ineklerde NED ve mikro besin madde eksikliklerine yol açmaktadır. NED'den dolayı, ineklerde adipoz dokudaki vücut yağları SYA'ya mobilize edilir ve BHB birikimine neden olur. Erken laktasyon sırasında azalan kuru madde alımı ile kolostrogenez/laktogenez başlaması sonucu artan aşırı enerji ihtiyacını gidermek için hepatik glukoneogenez uyarılır.<sup>170</sup> Aynı zamanda artan lipoliz, karaciğer,

kas veya yağ dokusu tarafından glukoz kullanımını önleyen bir insülin direnci oluşturur. Bu durumda yağ mobilizasyonu ve süt yağı sentezi için enerji kaynağı olarak SYA kullanımı artar.<sup>2</sup> Periparturient dönemde yeterince glukoz sağlanamaması SYA'nın trikarboksilik asit döngüsü ile asetil KoA'ya eksik veya kısmi oksidasyonuna yol açar. Bu durum da aseton, asetoasetat ve BHB' yi içeren keton cisimleri konsantrasyonunu artırır.<sup>171</sup>

$\beta$ -hidroksibutirat, kolayca ölçülebilen en kararlı keton cismidir. SYA gibi BHB de geçiş dönemindeki süt ineklerinde NED seviyesini yansıtır. Kandaki BHB seviyesindeki artışın 1,4 mmol/L'ye yükselmesinin metabolik bozukluk riskinde artışla ilişkili iken, 2,0 mmol/L'den yüksek bir seviyenin azalmış süt verimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.<sup>172</sup> Yine BHB konsantrasyonunun sığırlarda ketozis tanısı için altın belirteç olduğu ileri sürülmüştür.<sup>173</sup> Artmış keton cisimleri konsantrasyonunun aynı zamanda hepatik glukoneogenezi inhibe ederek hayvanın hipoglisemik durumunu daha da şiddetlendirdiği gösterilmiştir.<sup>174</sup>

McArt ve ark.<sup>175</sup> kan BHB analizinin SYA'dan daha ucuz ve nispeten kolay olduğu ileri sürmüşlerdir. Yapılan bir çalışmada 1,0 - 3,0 mmol/L arasındaki serum BHB konsantrasyonunun genellikle subklinik ketozisli süt ineklerinde tespit edildiğini ve 1 mmol/L'den düşük konsantrasyonların ise normal olduğu gösterilmiştir.<sup>176</sup> Bu çalışmadaki gruptan T1 ve T2'nin BHB düzeyleri normal seviyede iken T3 grubunun ketozisli olduğu ve BHB düzeyinin tohumlama sayısına etki ettiği tespit edilmiştir.

Geçiş dönemindeki ineklerin kullanıldığı bir tez çalışmada doğumla birlikte kolesterol seviyesinde düşüş eğilimi bildirilmiş ve kolesterol seviyesinin ancak 6. haftadan itibaren arttığı belirlenmiştir.<sup>177</sup> Geçiş döneminde, diğer dönemlere kıyasla KOL konsantrasyonunda oldukça anlamlı bir azalma ( $p < 0.01$ ), gebelik döneminde ise laktasyon dönemine kıyasla anlamlı olmayan bir azalma gözlemlenmiştir.<sup>177</sup> Bossaert

ve ark.<sup>178</sup> ve Trevisi ve ark.<sup>179</sup> tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, geç gebelikten itibaren azalan, buzağılamada minimum seviyeye ulaşan ve daha sonra artan KOL düzeyleri tespit edilmiştir. Yapılan başka bir araştırmada, doğumdan bir hafta sonra KOL konsantrasyonunda bir düşüşün olduğu gösterilmiştir.<sup>180</sup> Boassaert ve ark.<sup>178</sup>, 21 süt ineği üzerinde yaptıkları bir çalışmada, buzağılama döneminde KOL konsantrasyonunun düştüğünü ve laktasyon başlangıcı ile birlikte artmaya başladığını bildirmiştir. Süt ineklerinde yapılan başka bir çalışmada doğum sonrası dönemde serum KOL düzeylerinde azalma tespit edilmiş,<sup>66, 181</sup> toplam KOL seviyesinin klinik ve subklinik ketotik ineklerde, normal ineklerden daha düşük olduğu bildirilmiştir.<sup>176</sup> Kadınlarda yapılan bir çalışmada total KOL düzeyinin doğumu takiben hızla azaldığı ve doğum sonrası 3. ayda en düşük seviyeye gerilediği bildirilmiştir.<sup>182</sup> Geçiş dönemindeki ineklerde negatif enerji dengesi sebebiyle ATP konsantrasyonu azalmaktadır. Bu durumda NED'li hayvanlarda pentoz fosfat yolu, biyosentetik yollar için yeterli düzeyde NADPH üretemeyecektir. Böylece, hem keton cisimcikleri hem de KOL sentezinde ortak molekül olan  $\beta$ -Hidroksi  $\beta$ -metilglutaril-KoA (HMG KoA)'nın kolesterogeneze ziyade ketogeneze yönlendirilmesine neden olur. Ayrıca, KOL sentezinde anahtar düzenleyici enzim olan HMG KoA redüktaz aktivitesi, ATP konsantrasyonunda azalmaya bağlı olarak, cAMP bağımlı protein kinaz tarafından baskılanır. Bu enzim, artan glukagon ile ortaya çıkan yüksek cAMP seviyesi ile aktive edilir, bu da hipoglisemi sırasında üretilir. Bu nedenle, KOL konsantrasyonunda gözlenen azalma, birincil olarak geçiş sırasında hayvanların düşük enerji durumuna bağlanabilir.<sup>177, 183</sup> Diğer yandan ise doğumla beraber kolostrum – süt üretiminde fazla miktarda biyomoleküle talep olması nedeniyle hem laktasyon dönemi hem de besin madde alımının sınırlandırılmasından dolayı KOL düzeyinin değişebileceği bildirilmiştir.<sup>180</sup> KOL konsantrasyonunda ilerleyen laktasyonda yükselme sebebinin ise genelde hayvanın enerji dengesini sağlamak üzere kazandığı adaptasyonlar

sonucu olduğu bildirilmiştir.<sup>183</sup> Bu tez çalışmasında geçiş dönemindeki ineklerin lipid parametreleri hem spektrofotometrik hem de kromatografik incelenmiştir. Serum toplam yağını oluşturan lipid sınıfları incelendiğinde serum toplam yağı içerisindeki KOLE oranının doğumdan önceki 14. günden itibaren doğum sonrası 14. güne kadar sürekli arttığı, T1 ve T2 gruplarında 14. günden itibaren azalmaya başladığı fakat T3 grubunda artışın devam ettiği bulunmuştur. Diğer yandan serum toplam yağı içerisindeki serbest KOL oranının geçiş dönemi boyunca değişmediği fakat total KOL miktarının T1 ve T3 gruplarında doğumla beraber, T2 grubunda ise doğum sonrası 7. günde arttığı görülmüştür. Sunulan çalışmada kromatografik olarak serbest KOL oranının nispeten değişmediğini fakat toplam KOL düzeyinin arttığını tespit edilmiştir. Serum toplam yağı içerisindeki TAG oranındaki azalmanın serum serbest KOL oranındaki azalmayı baskıladığını, yine serum total KOL düzeyindeki artışın ise serbest KOL'den değil aşırı KOLE oranından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Geçiş ineklerinde lipoliz, azalmış glikoz ve insülin seviyeleri diğer yandan artmış katekolamin, büyüme hormonu ve glukokortikoidler tarafından uyarılmaktadır. Negatif enerji dengesi döneminde insülinin hem ekspresyonunun hem de doku duyarlılığının azalması lipolizi arttırır ve lipogenezi azaltır.<sup>25</sup> Lipoliz sırasında, yağ dokusundaki depolanmış TAG'ler, hormon – insülin duyarlı lipaz tarafından parçalanarak önce diaçilgliserol, sonra monoaçilgliserol ve sonuçta serbest gliserol ve üç adet esterleştirilmemiş SYA'ya ayrılır. Bu nedenle, artan SYA seviyesi, artmış lipoliz oranını yansıtır.<sup>184</sup>

Ruminantlarda, diğer hayvanlardan farklı olarak, normal doku fonksiyonları için glikoz talebi karaciğerdeki glukoneogenez tarafından karşılanır; propionat ana substrattır. Kuru madde alımının azalması, geviş getiren hayvanlarda majör glikojenik uçucu yağ asidi olan ruminal propiyonat seviyesinin azalmasına yol açar.<sup>185</sup> Yem kısıtlama

dönemlerinde, propiyonat yerine yağ dokusu yıkımlanmasından açığa çıkan ve NED'yi yansıtan gliserol karaciğerde glukoneogeneze katkıda bulunur.<sup>186</sup> Süt ineklerinde laktasyonun başlamasıyla glukoz gereksinimi artar ve gerekli glukoz esas olarak karaciğerde glikoneogeneze ile karşılanır.<sup>187</sup>

Contreras ve Sordillo<sup>188</sup> geçiş dönemindeki süt ineklerinde lipolizin önemini belirtmiş ve lipid mobilizasyonunu, memeliler tarafından azalmış besin alımı ve enerji yetersizliğinde hayatta kalmak için fizyolojik bir adaptasyon olarak tanımlamıştır. Geçiş dönemi boyunca şekillenen NED, hormon duyarlı lipaz tarafından laktasyonun en az 8. haftasına kadar<sup>189-191</sup> yağ dokusunda depolanan TAG'nin yoğun mobilizasyonuna neden olur ve kan gliserol ile SYA konsantrasyonunu artırır.<sup>25, 188, 192</sup>

Negatif enerji dengesi sonucu oluşan yüksek enerji talebi lipid yıkımı ile telafi edilir.<sup>176</sup> Bu arada, az miktarda glukozun fetal büyüme ve laktasyon için kullanımına öncelik verilebilir.<sup>188</sup> Kadınlarda yapılan bir çalışmada TAG'nin doğumu takiben hızla azaldığı ve doğum sonrası 3. ayda en düşük seviyeye gerilediği bildirilmiştir.<sup>182</sup> Sütçü ineklerde yapılan bir çalışmada ise toplam KOL, serbest KOL, KOLE, TAG, FL miktarları doğumdan sonra azalmaya, doğum sonrası 1. haftadan itibaren yükselmeye başladığı belirlenmiş, düşük plazma KOL ve TAG seviyelerinin, bu yağ bileşenlerinin süte transferi nedeniyle olabileceği ifade edilmiştir.<sup>193</sup> Ayrıca serum KOL konsantrasyonu ile serum TAG konsantrasyonu arasında ilişki olduğu da bildirilmiştir.<sup>194</sup>

Serbest yağ asiti konsantrasyonu, süt ineklerinde, erken gebelik ve geç laktasyon aşamalarında ortalama 0.2 mM'dan azdır ve doğum sonrası 10 güne kadar 0.7 mM'ın üzerinde bir konsantrasyona ulaşır.<sup>195</sup> Yapılan bir çalışmada, geçiş dönemi SYA konsantrasyonunun geçiş dönemi sonrası ve geçiş dönemi harici periyoddan daha yüksek olduğu ( $p<0.01$ ) bildirilmiştir.<sup>177</sup> Fakat gebelik verileri laktasyon verileri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmemiştir.<sup>177</sup>

Sunulan tezde serum toplam yağı içerisindeki TAG oranının doğumdan önceki 14. günden itibaren doğum sonrası 14. güne kadar sürekli azaldığı, T1 ve T2 gruplarında 14. günden itibaren artmaya başladığı fakat T3 grubunda azalmanın devam ettiği, en düşük TAG düzeyinin T3 grubunda olduğu tespit edildi. Lipoliz ürünü DAG oranının T1 ve T2 gruplarında nispeten değişmediği T3 grubunda doğum sonrası 21. güne kadar azaldığı, FL oranının ise gruplar ve zamana göre dalgalı seyir izlediği belirlendi. Bir diğer lipoliz ürünü olan SYA oranının doğumla beraber azaldığı, T1 grubunda doğum sonrası azalma olmadığı, yine azalmanın T2 ve T3 gruplarında doğum sonrası 7. günde durduğu, T3 grubunda ise doğum sonrası 14. günde tekrar azalma başladığı tespit edildi.

Genel literatürün aksine Van der Drift ve ark.<sup>196</sup> ile uyumlu olarak geçiş döneminde tespit ettiğimiz azalmış SYA konsantrasyonunun, SYA'ları  $\beta$ -oksidasyon ile aşırı enerji ihtiyacını karşılamak için hızla dolaşımdan uzaklaştırılması, perifer dokular tarafından alınması ve/veya süt yağı sentezi için meme bezinin artan alımı nedeniyle olabileceğini düşündürmüştür.<sup>175</sup>

Bu tezde serum toplam yağı içerisindeki FL oranının literatürün aksine arttığını tespit ettik. Bulunan bu artış serum toplam yağı içerisindeki TAG oranındaki aşırı azalmanın serbest KOL'de olduğu gibi, serum FL oranındaki lipolize ve/veya lipogenezdeki baskıya bağlı azalmayı maskeleydiği düşündürmektedir.

Periparturient süt ineklerinde doğumla birlikte kalsiyum talebinde ani bir artış olmaktadır. Geç gebelikte fetal büyüme için gerekli kalsiyum ihtiyacı günde sadece 10 g'dır, ancak bu ihtiyaç buzağılama sonrası sadece kolostrum üretimi için 30-50 g/gün'e çıkar.<sup>197</sup> Kandaki kalsiyum konsantrasyonunu kontrol eden homeostatik mekanizmalar genellikle bu gereksinimi karşılayacak kadar hızlı yanıt veremez. Sonuç olarak, süt ineklerinde klinik ve subklinik hipokalsemi şekillenir.<sup>38, 198</sup> Hipokalseminin uterus kasılmasının azalması,<sup>199-202</sup> negatif enerji dengesi riskinin artması,<sup>44, 46, 203</sup> bağışıklık

fonksiyonunun baskılanması<sup>46, 70, 204</sup> ve yumurtalıklara kan akışının azalması<sup>205</sup> dahil olmak üzere sığır fertilitatesini etkileyebileceği bir dizi mekanizma vardır. Subklinik hipokalseminin doğurganlık üzerine etkisi üzerine çok az çalışma vardır; daha sıklıkla doğurganlık klinik hipokalsemi ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir.<sup>198, 206</sup> Bazı araştırmacılar, bizim çalışmamıza paralel olarak klinik hipokalsemi ve üreme sonuçları arasında bir ilişki bulmamıştır.<sup>207, 208</sup> Diğer çalışmalar, klinik hipokalsemili ineklerde, ilk yumurtlama için uzayan aralık, ilk yumurtlamadan sonra daha uzun luteal faz,<sup>200</sup> bozulmuş yumurtalık siklitesisi<sup>201</sup> ve hem ilk tohumlama<sup>209</sup> hem de tutunma için artan süreleri içeren daha düşük üreme sonuçları göstermiştir.<sup>209, 210</sup> Chamberlin ve ark.<sup>203</sup> hipokalsemik ve normokalsemik gruplar arasında buzağılamadan 50-60 gün sonra siklik döngüdeki inek yüzdesi, tohumlama veya gebe kalma süresi açısından fark görmemişlerdir. Wilhelm ve ark.<sup>211</sup> hipokalsemik ve normokalsemik inekler arasındaki ilk tohumlama veya gebeliklerde zaman bakımından fark bulamamışlardır. Aksine, diğer çalışmalar hipokalsemik ineklerin ilk siklus süresinin 49 güne<sup>212</sup> düştüğünü ve ilk tohumlamada gebe kalma olasılığının daha düşük olduğunu göstermiştir.<sup>213</sup> Caixeta ve ark.<sup>214</sup> doğumdan sonraki ilk üç gün içinde hipokalsemi sergileyen ineklerin siklusa dönme ve ilk tohumlamada gebe kalma olasılığının daha düşük olduğunu bulmuşlardır.

Hipofosfatemiye süt ineklerinin geçiş döneminde yaygın olarak rastlanır.<sup>215-217</sup> Bu elektrolit dengesizliğinin klinik önemi belirsizliğini korumaktadır ve bu durum uzun yıllardır tartışılmaktadır. Ampirik kanıtlar, genç ineklerde hipofosfatemi veya fosfor (P) yetersizliğinin süt ineklerinde yatan inek sendromu veya doğum sonrası hemoglobinüri gibi hastalıklara neden olabileceğini veya en azından katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.<sup>76, 218, 219</sup> Periparturient ineklerde P eksikliği olan üretici ve veteriner hekimlerin endişeleri yukarıda belirtilen koşullara odaklanırken, P eksikliği ve hipofosfatemi diğer türlerdeki çeşitli diğer klinik belirtiler ve durumlarla

ilişkilendirilmiştir. Geçici olarak bildirilen ve türler arasında şiddetli hipofosfateminin en sık görülen semptomu, etkilenen bireylerde anoreksinin gelişmesi gibi görünmektedir.<sup>220-</sup>  
<sup>222</sup> Her ne kadar geçiş dönemi ineklerinde hipofosfatemi araştırılmış olsa da fertilité üzerine etkileri hala anlaşılabilmiş değildir. Bizim çalışmamızda fosfor konsantrasyonunun doğuma kadar azaldığını ve doğumla birlikte tekrar eski düzeylerine geri geldiği tespit edilmiştir. Yapılan istatistik sonucunda da bu fosfor değişiminin ineklerin bir sonraki tohumlama dönemine anlamlı olarak ( $P<0,001$ ) katkı sağladığı saptanmıştır.

Magnezyum hücre içi düzeyde metabolik reaksiyonlarda enzimatik bir katalizör olarak çalışır, hücre dışında ise sinir iletimi, kas fonksiyonu ve kemiklerin mineral oluşumunda rol oynar.<sup>223</sup> Goff<sup>43</sup>, Mg fazlalığının böbrek filtrasyonu yoluyla hızla atıldığını ileri sürmüştür. Plazmadaki düşük Mg seviyeleri, hipokalsemiye yanıt olarak parathormon (PTH) salgısını veya doku duyarlılığını azaltarak Ca metabolizmasını etkiler. Kandaki normal konsantrasyonu 1,8 - 2,4 mg/dL olan magnezyum, sinir ve kas membranlarının elektrik potansiyelini sürdürmede ve sinir impuls iletimini devam ettirmede görev almaktadır.<sup>224</sup> Kolostrumdaki magnezyum konsantrasyonu normal süttten yaklaşık üç kat daha yüksektir<sup>225</sup> ve laktasyondaki ineklerde süt üretimi için kullanılan hücre dışı magnezyum yeniden temin edilemezse hızlı bir şekilde hipomagnezemiye neden olduğu gösterilmiştir.<sup>223</sup> Geçiş döneminde yetersiz serum magnezyum seviyeleri, istenmeyen metabolik durum ve muhtemelen daha yüksek periparturient komplikasyon insidansı ile ilişkili olabilir ve bu da üreme performansının düşmesine neden olabilir.

Sonuçlarımız, geçiş döneminde serum magnezyum konsantrasyonlarının, süt ineklerinde üreme performansı ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır [T1 ( $2,21\pm0,07$ ), T2 ( $2,09\pm0,11$ ) ve T3 ( $1,86\pm0,08$ )]. Bu nedenle, geçiş süresi boyunca serum magnezyum konsantrasyonu süt ineklerinde yeniden tohumlama üzerine bir biyobelirteç olabileceğini

düşündürmektedir. Bu çalışmada doğum öncesi ve sonrası dönemlerde çalışma hayvanlarında ölçülen ortalama serum magnezyum konsantrasyonu (2,05 mg/dL), Cozzi ve ark.<sup>226</sup> ve Jonsson ve ark.<sup>227</sup> tarafından yapılan çalışmalara paralel, ancak Djokovic ve ark.<sup>228</sup> tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre daha düşük olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmalar arasında serum magnezyum konsantrasyonlarındaki tutarsızlık, inek beslenmesi için çiftliklerdeki (diyet bileşimi ve süt üretim seviyesi) farklı yönetim stratejilerinden kaynaklanabilmektedir.<sup>229</sup> Yapılan bir başka çalışmada, magnezyumun düz kasın uyarılabilirliğini azaltmada önemli bir hücre içi rol oynadığını ve düz kas tonusunda bir azalmaya yol açtığını göstermiştir.<sup>230</sup> Bu nedenle, peripartum dönemde düşük serum magnezyum konsantrasyonunun fetus ve plasentanın tutulma riskini artıracığı muhtemeldir, çünkü magnezyum eksikliğinin sinir dinlenme membran potansiyelindeki azalmanın neden olduğu hipereksitabiliteye yol açtığı gösterilmiştir.<sup>231</sup>

Albümin ve globülinlerin hepsi “toplam serum proteini” ni oluşturur. Proteinler hem ozmotik basıncın korunmasında rol oynar hem de amino asit kaynağıdır. Serum proteinleri ayrıca kanda lipitleri, bakır, demir ve hemoglobin vb. biyomolekülleri taşırlar. Karaciğerde sentezlenen albümin, plazma osmokonsantrasyonunda ve serbest yağ asitleri ile biyomoleküllerin taşınmasında rol alan ana proteindir.<sup>232</sup>

Yapılan bir çalışmada, total protein miktarının doğum sonrası 4. güne kadar hafif azaldığı fakat doğum sonrası 60. güne kadar arttığı bildirilmiştir.<sup>233</sup> Diğer yandan geçiş döneminde albümin konsantrasyonunun azaldığı belirtilmiştir.<sup>178, 179, 234, 235</sup> Yine Djokovic ve ark.<sup>181</sup>, serum albümin düzeyinin karaciğerin sentetik kapasitesini gösterdiğini ve erken laktasyondaki hayvanlarda azalma eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada, geçiş dönemi ineklerinde karaciğer fonksiyonunda bozulma olduğunu gösteren düşük albümin düzeyleri, yüksek insidanslı yağlı karaciğer - negatif enerji dengesi bildirmiştir.<sup>236</sup> Gaona RC ve ark.<sup>233</sup> tarafından

yapılan araştırmada yukardaki sonuçlara zıt olarak başlıca serum proteini olan albümin konsantrasyonunda doğum öncesi 35 gün ile doğum sonrası 60. günde alınan örneklerde farklılık belirlenmemiştir. Geçiş dönemi albumin konsantrasyonunda değişiklik olmadığını belirten bu sonuçlar Castillo ve ark.<sup>237</sup> ve Piccione ve ark.<sup>238</sup> tarafından yapılan çalışma ile uyum göstermiştir. Bunun yanında Perumbilly<sup>177</sup> tarafından hazırlanan tezde geçiş dönemindeki farklı zaman dilimlerinde albümin konsantrasyonunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Sunulan çalışmada total proteinin doğuma kadar az olmakla birlikte doğum sonrası 7. güne kadar önemli derecede azaldığı sonrasında ise T1 ve T2 gruplarında arttığını, T3 grubunda ise azalmanın doğum sonrası 14. günde durduğu ve doğum sonrası 21. günde dahi yükselmediğini tespit edilmiştir. Bu protein düzeyinde azalmanın, serum protein elektroforetogramları incelendiğinde, albumin de dahil olmak üzere bir çok serum proteininin ekspresyonlarının farklı düzeylerde azalması sonucu olduğunu belirlenmiştir.

Doğum sonrası 2-5 hafta boyunca süt üretimi pik yapar, ancak hayvan normal beslenme davranışına doğumdan sekiz hafta sonra geri döner.<sup>239</sup> Bertoni ve ark.<sup>240</sup> tarafından süt verimi ile süte salgılanan yağ, protein ve laktoz miktarlarının, laktasyonun başlamasından sonraki ilk üç hafta aşırı arttığı ve ihtiyacın diyetle sağlanandan çok daha fazla olduğu öne sürülmüştür. Yüksek verimli süt ineklerde buzağılama döneminde yem alımının azalması, geç gebelik ve laktasyonda büyüyen fetus için artan enerji talepleri ile hayvanı, doğumdan sonraki ilk birkaç hafta boyunca, özellikle doğum sırasında daha belirgin olduğu tespit edilen negatif enerji dengesi durumuna yönlendirir.<sup>241</sup>

Hayirli ve ark.<sup>242</sup> kuru madde alımının, gebeliğin son üç haftasında yüzde 30 azaldığı ve bu durumun fetal büyümeyi ve laktogenez için gerekli besin maddeleri sınırlandırdığını bildirilmişlerdir. Doğum sonrası dört gün içinde glukoz ve amino asitlere olan talep birkaç kat artmaktadır.<sup>242</sup> Genelde total protein değerindeki düşmeler,

hayvanların diyet ile protein alımlarının nispi bir eksikliğini, bu da mikrobiyal proteinin sentezi için amino asit yetersizliği oluşması ile açıklanabilir. Çünkü bakteriyel protein sentezinin azalması karaciğerde hem albümin hem de diğer serum proteinlerinin sentezi için yetersiz öncül madde anlamına gelmektedir. Puppel ve Kuczyriska<sup>243</sup> süt sığırlarında NED'nin genel olarak endokrin sistem, organ fonksiyonları, sütteki laktoz, protein ve yağ içeriği nispi oranı ve hayvanın genel sağlık durumu üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Bu bilgiler ışığında tespit ettiğimiz total protein konsantrasyonlarındaki azalma, muhtemelen prepartum dönem sonlarına doğru kuru madde alımının azalmasına bağlı mikrobiyal protein sentezindeki azalma, kolostrogenez-laktogenezin başlamasıyla aşırı protein ihtiyacı ve son olarak kolostrogenez-laktogenezin başlamasıyla aşırı enerji ihtiyacına bağlı negatif enerji dengesi - glukoneogenez sonucu baskılanan protein sentezinin bir kombinasyonu sonucu olabileceği düşünülmektedir.

Protein ve albümin düzeylerindeki artışlar ise adaptasyon sürecindeki hayvanın yeni fizyolojik durumuna geçişi ile açıklanabilir. Çünkü laktasyon ilerledikçe gereksinimler azalır ve/veya gerekli maddelerin diyet alımı artar ve böylece hayvan homeostaza ulaşabilmektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı sütçü ineklerde prepartum ve postpartum dönemde anti-müllerian hormon, metabolik profil ve mineral düzeylerinin doğum-tekrar gebe kalma aralığı üzerine etkilerinin incelenmesidir.

Elde edilen veriler ışığında serum AMH konsantrasyonunun mineral düzeylerinden ziyade ineğin enerji dengesini yansıtan parametreler - TP, TAG, BHB düzeyleri ile yakından ilişkili olduğu görüldü. Doğum öncesi AMH düzeyi yüksek olan inekler ve negatif enerji dengesinden erken çıkan ineklerin ise daha az tohumlama sayısı ile gebe kaldığı tespit edildi. Yine bu sonuçlara paralel olarak sürü içersindeki ineklerin bireysel AMH düzeylerinin tohumlama stratejisi konusunda veteriner hekime yardımcı olabileceği, ayrıca sürü içi ayıklamalarda bir hayvan hakkında karar vermede belirteç olabileceği sonucuna varıldı.

## KAYNAKLAR

1. Bell AW. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci*, 1995, 73: 2804-2819.
2. Drackley JK. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci*, 1999, 82: 2259-2273.
3. Grummer RR. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci*, 1995, 73: 2820-2833.
4. Leblanc S. Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. *J Reprod Develop*, 2010, 56: S29-S35.
5. La Marca A, Volpe A. Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol*, 2006, 64: 603-610.
6. Rico C, Fabre S, Medigue C, di Clemente N, Clement F, Bontoux M, Touze JL, Dupont M, Briant E, Remy B, Beckers JF, Monniaux D. Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod*, 2009, 80: 50-59.
7. Ribeiro ES, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A, Kumar A, Thatcher WW, Santos JEP. Plasma anti-Mullerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J Dairy Sci*, 2014, 97: 6888-6900.
8. Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, Dresch AR, Verstegen JP, Shaver RD, Wiltbank MC. Relationship between circulating anti-Mullerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci*, 2015, 98: 169-178.
9. Gobikrushanth M, Dutra PA, Bruinje TC, Colazo MG, Butler ST, Ambrose DJ. Repeatability of antral follicle counts and anti-Mullerian hormone and their

- associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology*, 2017, 92: 90-94.
10. Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JL, Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ, Evans AC. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol Reprod*, 2013, 88: 92.
  11. Batista EOS, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MDDV, Sa MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RNVR, Renno FP, Baruselli PS. Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. *Reprod Domes Anim*, 2014, 49: 448-452.
  12. Gobikrushanth M, Purfield DC, Colazo MG, Butler ST, Wang Z, Ambrose DJ. The relationship between serum anti-Mullerian hormone concentrations and fertility, and genome-wide associations for anti-Mullerian hormone in Holstein cows. *J Dairy Sci*, 2018, 101: 7563-7574.
  13. Van Saun RJ. Indicators of dairy cow transition risks: Metabolic profiling revisited. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 2016, 44: 118-126; quiz 127.
  14. Wankhade PR, Manimaran A, Kumaresan A, Jeyakumar S, Ramesha KP, Sejian V, Rajendran D, Varghese MR. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Vet World*, 2017, 10: 1367-1377.
  15. Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 2014, 144: 60-71.

16. Turk R, Juretic D, Geres D, Turk N, Rekic B, Simeon-Rudolf V, Robic M, Svetina A. Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Res Vet Sci*, 2005, 79: 15-18.
17. Sordillo LM, Mavangira V. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. *Anim Prod Sci*, 2014, 54: 1204-1214.
18. Turk R, Juretic D, Geres D, Turk N, Rekic B, Simeon-Rudolf V, Svetina A. Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. *Res Vet Sci*, 2004, 76: 57-61.
19. Drackley JK, Dann HM, Douglas GN, Guretzky NAJ, Litherland NB, Underwood JP, Looor JJ. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital J Anim Sci*, 2005, 4: 323-344.
20. Ingvarlsen KL. Feeding- and management-related diseases in the transition cow - Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim Feed Sci Tech*, 2006, 126: 175-213.
21. Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2004, 20: 447-+.
22. Lucy MC, Jiang H, Kobayashi Y. Changes in the Somatotrophic Axis Associated with the Initiation of Lactation. *J Dairy Sci*, 2001, 84: E113-E119.
23. Herdt TH. Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2000, 16: 387-+.
24. Bobe G, Young JW, Beitz DC. Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci*, 2004, 87: 3105-3124.

25. Herdt TH. Ruminant adaptation to negative energy balance - Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2000, 16: 215-+.
26. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J Dairy Sci*, 2010, 93: 546-554.
27. McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *J Dairy Sci*, 2012, 95: 5056-5066.
28. Duffield TF, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Lumsden JH. Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario. *Can Vet J*, 1997, 38: 713-718.
29. Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J Dairy Sci*, 2003, 86: 1201-1217.
30. Ospina PA, Mcart JA, Overton TR, Stokol T, Nydam DV. Using Nonesterified Fatty Acids and beta-Hydroxybutyrate Concentrations During the Transition Period for Herd-Level Monitoring of Increased Risk of Disease and Decreased Reproductive and Milking Performance. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2013, 29: 387-+.
31. Grummer RR. Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient Dairy-Cows. *J Dairy Sci*, 1993, 76: 3882-3896.
32. McCarthy MM, Yasui T, Felipe MJB, Overton TR. Associations between the degree of early lactation inflammation and performance, metabolism, and immune function in dairy cows. *J Dairy Sci*, 2016, 99: 680-700.

33. McCarthy MM, Piepenbrink MS, Overton TR. Associations between hepatic metabolism of propionate and palmitate in liver slices from transition dairy cows. *J Dairy Sci*, 2015, 98: 7015-7024.
34. Veenhuizen JJ, Drackley JK, Richard MJ, Sanderson TP, Miller LD, Young JW. Metabolic Changes in Blood and Liver during Development and Early Treatment of Experimental Fatty Liver and Ketosis in Cows. *J Dairy Sci*, 1991, 74: 4238-4253.
35. Jorritsma R, Jorritsma H, Schukken YH, Wentink GH. Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. *Theriogenology*, 2000, 54: 1065-1074.
36. Jorritsma R, Wensing T, Kruip TAM, Vos PLAM, Noordhuizen JPTM. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet Res*, 2003, 34: 11-26.
37. Opsomer G. Interaction between metabolic challenges and productivity in high yielding dairy cows. *Jpn J Vet Res*, 2015, 63: S1-S14.
38. DeGaris PJ, Lean IJ. Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *Vet J*, 2008, 176: 58-69.
39. Martin-Tereso J, Verstegen MWA. A novel model to explain dietary factors affecting hypocalcaemia in dairy cattle. *Nutrition Research Reviews*, 2011, 24: 228-243.
40. Goff JP. Calcium and Magnesium Disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2014, 30: 359-+.
41. Green AL, Lombard JE, Garber LP, Wagner BA, Hill GW. Factors associated with occurrence and recovery of nonambulatory dairy cows in the United States. *J Dairy Sci*, 2008, 91: 2275-2283.

42. Murray RD, Horsfield JE, McCormick WD, Williams HJ, Ward D. Historical and current perspectives on the treatment, control and pathogenesis of milk fever in dairy cattle. *Vet Rec*, 2008, 163: 561-+.
43. Goff JP. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet J*, 2008, 176: 50-57.
44. Reinhardt TA, Lippolis JD, McCluskey BJ, Goff JP, Horst RL. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet J*, 2011, 188: 122-124.
45. Chapinal N, Carson M, Duffield TF, Capel M, Godden S, Overton M, Santos JEP, LeBlanc SJ. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J Dairy Sci*, 2011, 94: 4897-4903.
46. Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Maunsell F, Galvao K, Santos JE. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci*, 2012, 95: 7158-7172.
47. Oetzel GR, Miller BE. Effect of oral calcium bolus supplementation on early-lactation health and milk yield in commercial dairy herds. *J Dairy Sci*, 2012, 95: 7051-7065.
48. Oetzel GR. Oral Calcium Supplementation in Peripartum Dairy Cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2013, 29: 447-+.
49. Sava L, Pillai S, More U, Sontakke A. Serum calcium measurement: Total versus free (ionized) calcium. *Indian J Clin Biochem*, 2005, 20: 158-161.
50. Forman DT, Lorenzo L. Ionized Calcium - Its Significance and Clinical Usefulness. *Ann Clin Lab Sci*, 1991, 21: 297-304.
51. Kragh-Hansen U, Vorum H. Quantitative analyses of the interaction between calcium ions and human serum albumin. *Clin Chem*, 1993, 39: 202-208.

52. Ong GS, Walsh JP, Stuckey BG, Brown SJ, Rossi E, Ng JL, Nguyen HH, Kent GN, Lim EM. The importance of measuring ionized calcium in characterizing calcium status and diagnosing primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97: 3138-3145.
53. Sweeney BM, Martens EM, Felipe MJ, Overton TR. Impacts and Evaluation of Subclinical Hypocalcemia in Dairy Cattle. *2014 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Proceedings*, 2014: 67-74.
54. Green HB, Horst RL, Beitz DC, Littledike ET. Vitamin-D Metabolites in Plasma of Cows Fed a Prepartum Low-Calcium Diet for Prevention of Parturient Hypocalcemia. *J Dairy Sci*, 1981, 64: 217-226.
55. Goff JP, Horst RL. Role of acid-base physiology on the pathogenesis of parturient hypocalcaemia (milk fever) - the DCAD theory in principal and practice. *Acta Vet Scand*, 2003: 51-56.
56. Oetzel GR, Olson JD, Curtis CR, Fettman MJ. Ammonium-Chloride and Ammonium-Sulfate for Prevention of Parturient Paresis in Dairy-Cows. *J Dairy Sci*, 1988, 71: 3302-3309.
57. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J Dairy Sci*, 1994, 77: 1936-1951.
58. Moore SJ, VandeHaar MJ, Sharma BK, Pilbeam TE, Beede DK, Bucholtz HF, Liesman JS, Horst RL, Goff JP. Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows. *J Dairy Sci*, 2000, 83: 2095-2104.
59. Ramos-Nieves JM, Thering BJ, Waldron MR, Jardon PW, Overton TR. Effects of anion supplementation to low-potassium prepartum diets on macromineral status and performance of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 2009, 92: 5677-5691.

60. Grunberg W, Donkin SS, Constable PD. Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium, and phosphorus homeostasis and on intravenous glucose tolerance test in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci*, 2011, 94: 727-745.
61. McArt JA, Oetzel GR. A stochastic estimate of the economic impact of oral calcium supplementation in postparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 2015, 98: 7408-7418.
62. Blanc CD, Van der List M, Aly SS, Rossow HA, Silva-del-Rio N. Blood calcium dynamics after prophylactic treatment of subclinical hypocalcemia with oral or intravenous calcium. *J Dairy Sci*, 2014, 97: 6901-6906.
63. Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Powers PA, Smith MC, White ME, Hillman RB, Pearson EJ. Association of Parturient Hypocalcemia with 8 Periparturient Disorders in Holstein Cows. *J Am Vet Medl Assoc*, 1983, 183: 559-561.
64. Risco CA, Reynolds JP, Hird D. Uterine Prolapse and Hypocalcemia in Dairy-Cows. *J Am Vet Med Assoc*, 1984, 185: 1517-1519.
65. Seifi HA, LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. Metabolic predictors of postpartum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet J*, 2011, 188: 216-220.
66. Sepulveda-Varas P, Weary DM, Noro M, von Keyserlingk MAG. Transition Diseases in Grazing Dairy Cows Are Related to Serum Cholesterol and Other Analytes. *Plos One*, 2015, 10.
67. Hansen SS, Blom JY, Ersboll A, Jorgensen RJ. Milk fever control in Danish dairy herds. *Acta Vet Scand*, 2003: 137-139.
68. Whiteford LC, Sheldon IM. Association between clinical hypocalcaemia and postpartum endometritis. *Vet Rec*, 2005, 157: 202-203.

69. Heppelmann M, Krach K, Krueger L, Benz P, Herzog K, Piechotta M, Hoedemaker M, Bollwein H. The effect of metritis and subclinical hypocalcemia on uterine involution in dairy cows evaluated by sonomicrometry. *J Reprod Develop*, 2015, 61: 565-569.
70. Kimura K, Reinhardt TA, Goff JP. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J Dairy Sci*, 2006, 89: 2588-2595.
71. Kamgarpour R, Daniel RCW, Fenwick DC, McGuigan K, Murphy G. Post partum subclinical hypocalcaemia and effects on ovarian function and uterine involution in a dairy herd. *Vet J*, 1999, 158: 59-67.
72. Wilde D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, 2006, 96: 240-249.
73. Chapinal N, LeBlanc SJ, Carson ME, Leslie KE, Godden S, Capel M, Santos JEP, Overton MW, Duffield TF. Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. *J Dairy Sci*, 2012, 95: 5676-5682.
74. Martin-Tereso J, Martens H. Calcium and magnesium physiology and nutrition in relation to the prevention of milk fever and tetany (dietary management of macrominerals in preventing disease). *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2014, 30: 643-670.
75. Reynolds CK, Bell MC, Sims MH. Changes in Plasma, Red-Blood-Cell and Cerebrospinal-Fluid Mineral Concentrations in Calves during Magnesium Depletion Followed by Repletion with Rectally Infused Magnesium-Chloride. *J Nutr*, 1984, 114: 1334-1341.
76. Grunberg W. Treatment of phosphorus balance disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2014, 30: 383-408, vi.

77. Goff JP. Macromineral disorders of the transition cow. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2004, 20: 471-+.
78. Block SS, Butler WR, Ehrhardt RA, Bell AW, Van Amburgh ME, Boisclair YR. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J Endocrinol*, 2001, 171: 339-348.
79. Ohtani Y, Takahashi T, Sato K, Ardiyanti A, Song SH, Sato R, Onda K, Wada Y, Obara Y, Suzuki K, Hagino A, Roh S, Katoh K. Changes in circulating adiponectin and metabolic hormone concentrations during periparturient and lactation periods in Holstein dairy cows. *Anim Sci J*, 2012, 83: 788-795.
80. Mann S, Yepes FAL, Duplessis M, Wakshlag JJ, Overton TR, Cummings BP, Nydam DV. Dry period plane of energy: Effects on glucose tolerance in transition dairy cows. *J Dairy Sci*, 2016, 99: 701-717.
81. De Koster JD, Opsomer G. Insulin Resistance in Dairy Cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2013, 29: 299-+.
82. Bauman DE, Currie WB. Partitioning of Nutrients during Pregnancy and Lactation - a Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *J Dairy Sci*, 1980, 63: 1514-1529.
83. McNamara JP, Murray CE. Sympathetic nervous system activity in adipose tissues during pregnancy and lactation of the rat. *J Dairy Sci*, 2001, 84: 1382-1389.
84. Komatsu T, Itoh F, Kushibiki S, Hodate K. Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. *J Anim Sci*, 2005, 83: 557-564.
85. Hanigan MD, Crompton LA, Reynolds CK, Wray-Cahen D, Lomax MA, France J. An integrative model of amino acid metabolism in the liver of the lactating dairy cow. *J Theor Biol*, 2004, 228: 271-289.

86. Bobe G, Velez JC, Beitz DC, Donkin SS. Glucagon increases hepatic mRNA concentrations of ureagenic and gluconeogenic enzymes in early-lactation dairy cows. *J Dairy Sci*, 2009, 92: 5092-5099.
87. Bobe G, Sonon RN, Ametaj BN, Young JW, Beitz DC. Metabolic responses of lactating dairy cows to single and multiple subcutaneous injections of glucagon. *J Dairy Sci*, 2003, 86: 2072-2081.
88. Bansal P, Wang QH. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol-Endoc M*, 2008, 295: E751-E761.
89. Zarrin M, Wellnitz O, Bruckmaier RM. Conjoint regulation of glucagon concentrations via plasma insulin and glucose in dairy cows. *Domest Anim Endocrin*, 2015, 51: 74-77.
90. Rosenbaum M, Leibel RL. 20 years of leptin: role of leptin in energy homeostasis in humans. *J Endocrinol*, 2014, 223: T83-96.
91. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*, 2015, 64: 24-34.
92. Liefers SC, Veerkamp RF, Pas MFWT, Delavaud C, Chilliard Y, van der Lende T. Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in dairy cows. *J Dairy Sci*, 2003, 86: 799-807.
93. Janovick NA, Boisclair YR, Drackley JK. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *J Dairy Sci*, 2011, 94: 1385-1400.
94. Schoenberg KM, Giesy SL, Harvatine KJ, Waldron MR, Cheng C, Kharitononkov A, Boisclair YR. Plasma FGF21 Is Elevated by the Intense Lipid Mobilization of Lactation. *Endocrinology*, 2011, 152: 4652-4661.

95. Ehrhardt RA, Foskolos A, Giesy SL, Wesolowski SR, Krumm CS, Butler WR, Quirk SM, Waldron MR, Boisclair YR. Increased plasma leptin attenuates adaptive metabolism in early lactating dairy cows. *J Endocrinol*, 2016, 229: 145-157.
96. Ingvarsen KL, Boisclair YR. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domest Anim Endocrin*, 2001, 21: 215-250.
97. Radcliff RP, McCormack BL, Crooker BA, Lucy MC. Growth hormone (GH) binding and expression of GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 2003, 86: 3933-3940.
98. Kim H, Barton E, Muja N, Yakar S, Pennisi P, Leroith D. Intact insulin and insulin-like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function in vivo. *Endocrinology*, 2005, 146: 1772-1779.
99. Rhoads RP, Kim JW, Van Amburgh ME, Ehrhardt RA, Frank SJ, Boisclair YR. Effect of nutrition on the GH responsiveness of liver and adipose tissue in dairy cows. *J Endocrinol*, 2007, 195: 49-58.
100. Boisclair Y, Wesolowski SR, Kim J, Ehrhardt RA. Roles of growth hormone and leptin in the periparturient dairy cow. İçinde: Sejrsen K, Hvelplund T, Nielsen MO (editörler). *Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*, Netherland, Wageningen Academic Pub, 2006: 327 - 346.
101. Bertoni G, Trevisi E. Use of the Liver Activity Index and Other Metabolic Variables in the Assessment of Metabolic Health in Dairy Herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2013, 29: 413-+.

102. Bertoni G, Trevisi E, Han X, Bionaz M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci*, 2008, 91: 3300-3310.
103. Trevisi E, Ferrari A, Piccioli-Cappelli F. An additional study on the relationship between the inflammatory condition at calving time and net energy efficiency in dairy cows. İçinde: Crovetto M (editör). *Energy and protein metabolism and nutrition*, Netherlands, Wageningen Academic Publishers, 2010: 489-490.
104. Van Soest RJ In *Application of a pooled sample metabolic profile for use as a herd screening tool*, Danish Bovine Practitioner Seminar, Middelfart, Denmark, (editör). (editörler). Middelfart, Denmark, 2007; 24-25.
105. Hayırlı A, Çolak A. İneklerin kuru ve geçiş dönemlerinde sevk-idare ve besleme stratejileri: postpartum süreçte metabolik profil, sağlık durumu ve fertilitateye etkisi. *Türkiye Klinikleri Journal Of Veterinary Science*, 2011, 2: 1-35.
106. Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Veterinary Medicine*. 9th Edition Baskı. Philadelphia, Bailliere Tindall, 2000: 1118-1120.
107. Turgut K. *Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis*. Baskı. Konya, Bahçivanlar Basım Sanayi AŞ., 2000: 180-201.
108. Quiroz-Rocha GF, LeBlanc SJ, Duffield TF, Wood D, Leslie KE, Jacobs RM. Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *Can Vet J*, 2009, 50: 383-388.
109. Godden SM, Kelton DF, Lissemore KD, Walton JS, Leslie KE, Lumsden JH. Milk urea testing as a tool to monitor reproductive performance in Ontario dairy herds. *J Dairy Sci*, 2001, 84: 1397-1406.
110. Sheldon IM. The postpartum uterus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2004, 20: 569-591.

111. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82-83: 295-306.
112. Küplülü Ş, Vural R, Polat İM. İneklerde Uterus Enfeksiyonlarının Etiyopatogenezi, Klinik Semptomları ve Sağaltım Girişimleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 2011, 2: 58-65.
113. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Dobson H. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet Rec*, 2002, 151: 531-534.
114. Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 2005, 63: 102-117.
115. Duffy P, Crowe MA, Boland MP, Roche JF. Effect of exogenous LH pulses on the fate of the first dominant follicle in postpartum beef cows nursing calves. *J Reprod Infertil*, 2000, 118: 9-17.
116. Peter AT, Vos PLAM, Ambrose DJ. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*, 2009, 71: 1333-1342.
117. Dobson H, Smith RF. Stress and Reproduction in Farm-Animals. *J Reprod Infertil*, 1995: 451-461.
118. Karsch FJ, Battaglia DF, Breen KM, Debus N, Harris TG. Mechanisms for Ovarian Cycle Disruption by Immune/inflammatory Stress. *Stress*, 2002, 5: 101-112.
119. Josso N, di Clemente N, Gouedard L. Anti-Mullerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 179: 25-32.

120. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: An instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev*, 2001, 22: 657-674.
121. Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of Anti-Mullerian Hormone - Another Homology between Sertoli and Granulosa-Cells. *Endocrinology*, 1984, 114: 1315-1320.
122. Takahashi M, Hayashi M, Mangano TF, Donahoe PK. The Ontogeny of Mullerian Inhibiting Substance in Granulosa-Cells of the Bovine Ovarian Follicle. *Biol Reprod*, 1986, 35: 447-453.
123. Monniaux D, di Clemente N, Touze JL, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard JY, Fabre S. Intrafollicular steroids and anti-Mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod*, 2008, 79: 387-396.
124. van Rooij IAJ, Broekmans FJM, te Velde ER, Fauser BCJM, Bancsi LFJMM, de Jong FH, Themmen APN. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*, 2002, 17: 3065-3071.
125. Weenen C, Laven JSE, von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BCJM, Themmen APN. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Hum Reprod*, 2004, 10: 77-83.
126. Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 2006, 131: 1-9.
127. Erickson BH. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*, 1966, 25: 800-805.

128. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 1999, 140: 5789-5796.
129. Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans ACO, Ireland JJ. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. *Biol Reprod*, 2008, 79: 1219-1225.
130. Ireland JJ, Zielak-Steciwo AE, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettegowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Knight PG, Smith GW, Lonergan P, Evans AC. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol Reprod*, 2009, 80: 954-964.
131. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG*, 2004, 111: 1248-1253.
132. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG*, 2005, 112: 1384-1390.
133. Artiss JD, Zak B. Measurement of cholesterol concentration. İçinde: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH (editörler). *Handbook of lipoprotein testing*, Washington, AACCC Press, 1997: 99-114.
134. Deeg R, Ziegenhorn J. Kinetic Enzymic Method for Automated-Determination of Total Cholesterol in Serum. *Clin Chem*, 1983, 29: 1798-1802.
135. Thomas L. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1. Baskı. Frankfurt, TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998: 231-241.

136. Michaylova V, Ilkova P. Photometric Determination of Micro Amounts of Calcium with Arsenazo-III. *Anal Chim Acta*, 1971, 53: 194-+.
137. Bauer PJ. Affinity and Stoichiometry of Calcium-Binding by Arsenazo-III. *Anal Biochem*, 1981, 110: 61-72.
138. Mann CK, Yoe JH. Spectrophotometric determination of magnesium with 1-Azo-2-hydroxy-3-(2,4 dimethylcarboxanilido)-naphthalene-1'-(2-hydroxybenzene). *Anal Chim Acta*, 1957, 16: 155-160.
139. Bohoun C. Microdosage du magnesium dans divers milieux biologiques. *Clinica Chimica Acta*, 1962, 7: 811-817.
140. Enders DB, Rude RK. Mineral and bone metabolism. İçinde: Burtis CA, Ashwood ER (editörler). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3. Baskı. Philadelphia, W.B Saunders Company, 1999: 1395-1457.
141. Johnson AM, Rohlfes EM, Silverman LM. Proteins. İçinde: Burtis CA, Ashwood ER (editörler). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3. Baskı. Philadelphia, W.B Saunders Company, 1999: 477-540.
142. Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. İçinde: Burtis CA, Ashwood ER (editörler). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3. Baskı. Philadelphia, W.B Saunders Company, 1999: 809-861.
143. Cole TG, Klotzsch SG, McNamara J. Measurement of triglyceride concentration. İçinde: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH (editörler). *Handbook of lipoprotein testing*, Washington, AACC Press, 1997: 115-126.
144. Tietz NW. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 3. Baskı. Philadelphia, W.B.Saunders Company, 1995: 294-295.
145. Greiling H, Gressner AM. *Textbook Clinical Chemistry and Pathobiochemistry*. Baskı. Schattauer, 1987: 238-240.

146. Sherma J. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. Third Edition Baski. New York, Taylor & Francis, 2003.
147. Hara A, Radin NS. Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. *Anal Biochem*, 1978, 90: 420-426.
148. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 1970, 227: 680-+.
149. Biorad. Oriole™ Fluorescent Gel Stain Instruction Manual. 2014.
150. Statistical analysis system, version 9.0, Cary, NC, USA. 2002.
151. Ferguson JD. Nutrition and reproduction in dairy herds, Intermountain Nutrition Conference, 2001, Salt Lake City, Utah 65-82.
152. Goff JP, Horst RL. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 1260-1268.
153. Themmen AP. Anti-Mullerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2005: 18-21.
154. Visser JA, Themmen APN. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 234: 81-86.
155. Pereira FTV, Oliveira LJ, Barreto RDN, Mess A, Perecin F, Bressan FF, Mesquita LG, Miglino MA, Pimentel JR, Neto PF, Meirelles FV. Fetal-Maternal Interactions in the Synepitheliochorial Placenta Using the eGFP Cloned Cattle Model. *Plos One*, 2013, 8.
156. Anderson RA, Nelson SM, Wallace WH. Measuring anti-Mullerian hormone for the assessment of ovarian reserve: when and for whom is it indicated? *Maturitas*, 2012, 71: 28-33.

157. Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F, Lonergan P, Evans AC. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 2011, 23: 1-14.
158. La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS, Table ESIGfRE-AR. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod*, 2009, 24: 2264-2275.
159. Malek A, Sager R, Schneider H. Transport of proteins across the human placenta. *Am J Reprod Immunol*, 1998, 40: 347-351.
160. Brownbill P, Edwards D, Jones C, Mahendran D, Owen D, Sibley C, Johnson R, Swanson P, Nelson DM. Mechanisms of alphafetoprotein transfer in the perfused human placental cotyledon from uncomplicated pregnancy. *J Clin Invest*, 1995, 96: 2220-2226.
161. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Mullerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil and Steril*, 2008, 89: 586-591.
162. Morgan K, Meredith J, Kuo JYA, Bilkey DK, McLennan IS. The sex bias in novelty preference of preadolescent mouse pups may require testicular Mullerian inhibiting substance. *Behav Brain Res*, 2011, 221: 304-306.
163. Wang J, Dicken C, Lustbader JW, Tortoriello DV. Evidence for a Mullerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium. *Fertil and Steril*, 2009, 91: 1195-1203.

164. Wittmann W, McLennan IS. The Male Bias in the Number of Purkinje Cells and the Size of the Murine Cerebellum may Require Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone. *J Neuroendocrinol*, 2011, 23: 831-838.
165. Firoozi F, Ducharme FM, Lemiere C, Beauchesne MF, Perreault S, Forget A, Blais L. Effect of fetal gender on maternal asthma exacerbations in pregnant asthmatic women. *Respir Med*, 2009, 103: 144-151.
166. Hocher B, Chen YP, Schlemm L, Burdack A, Li J, Halle H, Pfab T, Kalk P, Lang F, Godes M. Fetal sex determines the impact of maternal PROGINS progesterone receptor polymorphism on maternal physiology during pregnancy. *Pharmacogenet Genomics*, 2009, 19: 710-718.
167. Walsh JM, Segurado R, Mahony RM, Foley ME, McAuliffe FM. The Effects of Fetal Gender on Maternal and Fetal Insulin Resistance. *Plos One*, 2015, 10: e0137215.
168. La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod*, 2006, 21: 3103-3107.
169. Ireland J, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO, Evans ACO. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*, 2007, 22: 1687-1695.
170. Lucy MC. Nutrient Partitioning and Reproductive Performance in Dairy Cows, Proceedings of Intermountain Nutrition Conference, 2008, Syracuse, New York 139-150.
171. White HM. The Role of TCA Cycle Anaplerosis in Ketosis and Fatty Liver in Periparturient Dairy Cows. *Animals*, 2015, 5: 793-802.

172. Duffield T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2000, 16: 231-+.
173. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6. Baski. San Diego, Academic Press, 2008: 916p.
174. Duehlmeier R, Fluegge I, Schwert B, Parvizi N, Ganter M. Metabolic adaptations to pregnancy and lactation in German Blackheaded Mutton and Finn sheep ewes with different susceptibilities to pregnancy toxemia. *Small Ruminant Res*, 2011, 96: 178-184.
175. McArt JA, Nydam DV, Oetzel GR, Overton TR, Ospina PA. Elevated non-esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Veterinary J*, 2013, 198: 560-570.
176. Li Y, Ding HY, Wang XC, Feng SB, Li XB, Wang Z, Liu GW, Li XW. An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows. *J Anim Physiol An N*, 2016, 100: 844-851.
177. Perumbilly AJ. Metabolic Profile of Crossbred Dairy Cows During Transition Period. Faculty of Veterinary and Animal Sciences. Kerala Veterinary and Animal Sciences University, 2017.
178. Bossaert P, Trevisi E, Opsomer G, Bertoni G, De Vliegher S, Leroy JLMR. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: An observational study. *Vet J*, 2012, 192: 222-225.
179. Trevisi E, Amadori M, Cogrossi S, Razzuoli E, Bertoni G. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Res Vet Sci*, 2012, 93: 695-704.

180. Gross JJ, Kessler EC, Albrecht C, Bruckmaier RM. Response of the Cholesterol Metabolism to a Negative Energy Balance in Dairy Cows Depends on the Lactational Stage. *Plos One*, 2015, 10.
181. Djokovic R, Cincovic M, Belic B, Toholj B, Davidov I, Hristovska T. Relationship between Blood Metabolic Hormones, Metabolites and Energy Balance in Simmental Dairy Cows during Peripartum period and Lactation. *Pak Vet J*, 2015, 35: 163-167.
182. Novack V, Novack L, Wiznitzer A. Postpartum Levels of Total Cholesterol and Triglycerides in Women with and without Gestational Diabetes Mellitus and Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 199: S167-S167.
183. Ashmawy NA. Blood Metabolic Profile and Certain Hormones Concentrations in Egyptian Buffalo During Different Physiological States. *Asian J Anim Vet Adv*, 2015, 10: 271-280.
184. Drackley JK. Rethinking nutritional management during the dry period and transition, Compendium of Southeast Dairy Herd Management Conference, 2007, Georgia p70.
185. Contreras GA, O'Boyle NJ, Herdt TH, Sordillo LM. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J Dairy Sci*, 2010, 93: 2508-2516.
186. Donkin SS. The role of liver metabolism during transition on postpartum health and performance, Florida Ruminant Nutrition Symposium, 2012, Florida, USA 97-106.
187. Reynolds CK. Glucose balance in cattle, Florida Ruminant Nutrition Conference, 2005, Florida, USA 143-154.

188. Contreras GA, Sordillo LM. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2011, 34: 281-289.
189. Tamminga S, Luteijn PA, Meijer RGM. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. *Livest Prod Sci*, 1997, 52: 31-38.
190. Komaragiri MVS, Casper DP, Erdman RA. Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 2. Effect of dietary fat on mobilization of body fat and protein. *J Dairy Sci*, 1998, 81: 169-175.
191. van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J, van Straalen WM, Heetkamp MJW, Tamminga S, Kemp B. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: Energy partitioning and milk composition. *J Dairy Sci*, 2007, 90: 1467-1476.
192. Douglas GN, Rehage J, Beaulieu AD, Bahaa AO, Drackley JK. Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 2007, 90: 2941-2959.
193. Kessler EC, Gross JJ, Bruckmaier RM, Albrecht C. Cholesterol metabolism, transport, and hepatic regulation in dairy cows during transition and early lactation. *J Dairy Sci*, 2014, 97: 5481-5490.
194. Schlumbohm C, Harmeyer J. Hyperketonemia impairs glucose metabolism in pregnant and nonpregnant ewes. *J Dairy Sci*, 2004, 87: 350-358.
195. Adewuyi AA, Gruys E, van Eerdenburg FJCM. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet Quart*, 2005, 27: 117-126.

196. van der Drift SGA, Houweling M, Schonewille JT, Tielens AGM, Jorritsma R. Protein and fat mobilization and associations with serum beta-hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *J Dairy Sci*, 2012, 95: 4911-4920.
197. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. Adapting to the transition between gestation and lactation: Differences between rat, human and dairy cow. *J Mammary Gland Biol*, 2005, 10: 141-156.
198. Houe H, Ostergaard S, Thilsing-Hansen T, Jorgensen RJ, Larsen T, Sorensen JT, Agger JF, Blom JY. Milk Fever and Subclinical Hypocalcaemia - An evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta Vet Scand*, 2001, 42: 1-29.
199. Aleknah MM, Noakes DE. A Preliminary-Study on the Effect of Induced Hypocalcemia and Nifedipine on Uterine Activity in the Parturient Cow. *J Vet Pharmacol Ther*, 1989, 12: 237-239.
200. Risco CA, Drost M, Thatcher WW, Savio J, Thatcher MJ. Effects of Calving-Related Disorders on Prostaglandin, Calcium, Ovarian Activity and Uterine Involution in Postpartum Dairy-Cows. *Theriogenology*, 1994, 42: 183-203.
201. Whiteford LC, Sheldon IM. Association between clinical hypocalcaemia and postpartum endometritis. *Vet Rec*, 2005, 157: 202-204.
202. Ward G, Marion GB, Campbell CW, Dunham JR. Influences of Calcium Intake and Vitamin-D Supplementation on Reproductive Performance of Dairy Cows. *J Dairy Sci*, 1971, 54: 204-&.
203. Chamberlin WG, Middleton JR, Spain JN, Johnson GC, Eilersieck MR, Pithua P. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism,

- postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 2013, 96: 7001-7013.
204. Ducusin RJ, Uzuka Y, Satoh E, Otani M, Nishimura M, Tanabe S, Sarashina T. Effects of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on phagocytosis and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Res Vet Sci*, 2003, 75: 27-32.
205. Jonsson NN, Daniel RCW. Effects of hypocalcaemia on blood flow to the ovaries of the sheep. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 1997, 44: 281-287.
206. Jonsson NN. The effects of subclinical hypocalcaemia on postpartum fertility. *Cattle Pract*, 1999, 7: 255-260.
207. Eicker SW, Grohn YT, Hertl JA. The association between cumulative milk yield, days open, and days to first breeding in New York Holstein cows. *J Dairy Sci*, 1996, 79: 235-241.
208. Cobo-Abreu R, Martin SW, Willoughby RA, Stone JB. The association between disease, production and culling in a university dairy herd. *Can Vet J*, 1979, 20: 191-195.
209. Borsberry S, Dobson H. Periparturient Diseases and Their Effect on Reproductive-Performance in 5 Dairy Herds. *Vet Rec*, 1989, 124: 217-219.
210. Suriyasathaporn W, Nielen M, Dieleman SJ, Brand A, Noordhuizen-Stassen EN, Schukken YH. A Cox proportional-hazards model with time-dependent covariates to evaluate the relationship between body-condition score and the risks of first insemination and pregnancy in a high-producing dairy herd. *Prev Vet Med*, 1998, 37: 159-172.
211. Wilhelm AL, Maquivar MG, Bas S, Brick TA, Weiss WP, Bothe H, Velez JS, Schuenemann GM. Effect of serum calcium status at calving on survival, health,

- and performance of postpartum Holstein cows and calves under certified organic management. *J Dairy Sci*, 2017, 100: 3059-3067.
212. Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Bisinotto RS, Monteiro APA, Favoreto M, Ayres H, Marsola RS, Martinez N, Thatcher WW, Santos JEP. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J Dairy Sci*, 2013, 96: 5682-5697.
213. Chapinal N, Carson ME, LeBlanc SJ, Leslie KE, Godden S, Capel M, Santos JE, Overton MW, Duffield TF. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J Dairy Sci*, 2012, 95: 1301-1309.
214. Caixeta LS, Ospina PA, Capel MB, Nydam DV. Association between subclinical hypocalcemia in the first 3 days of lactation and reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 2017, 94: 1-7.
215. Macrae AI, Whitaker DA, Burrough E, Dowell A, Kelly JM. Use of metabolic profiles for the assessment of dietary adequacy in UK dairy herds. *Vet Rec*, 2006, 159: 655-+.
216. Grunberg W, Constable P, Schroder U, Staufenbiel R, Morin D, Rohn M. Phosphorus homeostasis in dairy cows with abomasal displacement or abomasal volvulus. *J Vet Intern Med*, 2005, 19: 894-898.
217. Macrae AI, Burrough E, Forrest J. Assessment of nutrition in dairy herds: Use of metabolic profiles. *Cattle Pract*, 2012, 20: 120-127.
218. Macwilliams PS, Searcy GP, Bellamy JEC. Bovine Postparturient Hemoglobinuria - a Review of the Literature. *Can Vet J*, 1982, 23: 309-312.
219. Menard L, Thompson A. Milk fever and alert downer cows: does hypophosphatemia affect the treatment response? *Can Vet J*, 2007, 48: 487-491.

220. Knochel JP. Pathophysiology and Clinical Characteristics of Severe Hypophosphatemia. *Arch Intern Med*, 1977, 137: 203-220.
221. Ternouth JH, Sevilla CC. The Effects of Low-Levels of Dietary Phosphorus Upon the Dry-Matter Intake and Metabolism of Lambs. *Aus J Agric Res*, 1990, 41: 175-184.
222. Gartner BJW, Murphy GM, Hoey WA. Effects of induced, subclinical phosphorus deficiency on feed intake and growth of beef heifers. *J Agric Sci*, 1982, 98: 23-29.
223. Goff JP. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Anim Feed Sci Tech*, 2006, 126: 237-257.
224. Konseyi AUA. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7. Baskı. Washington, DC, National Academy Press, 1996.
225. Tsioulpas A, Grandison AS, Lewis MJ. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *J Dairy Sci*, 2007, 90: 5012-5017.
226. Cozzi G, Ravarotto L, Gottardo F, Stefani AL, Contiero B, Moro L, Brscic M, Dalvit P. Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. *J Dairy Sci*, 2011, 94: 3895-3901.
227. Jonsson NN, Fortes MRS, Piper EK, Vankan DM, de Cisneros JPJ, Wittek T. Comparison of metabolic, hematological, and peripheral blood leukocyte cytokine profiles of dairy cows and heifers during the periparturient period. *J Dairy Sci*, 2013, 96: 2283-2292.

228. Djokovic RD, Kurcubic VS, Ilic ZZ. Blood serum levels of macro- and micronutrients in transition and full lactation cows. *Bulg J Agric Sci*, 2014, 20: 715-720.
229. Moretti P, Paltrinieri S, Trevisi E, Probo M, Ferrari A, Minuti A, Giordano A. Reference intervals for hematological and biochemical parameters, acute phase proteins and markers of oxidation in Holstein dairy cows around 3 and 30 days after calving. *Res Vet Sci*, 2017, 114: 322-331.
230. Griffin IJ. Magnesium. İçinde: Caballero B, Trugo LT, Finglas PM (editörler). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2 Baskı. Waltham, USA, Academic Press, 2003: 3641-3646.
231. Konseyi AUA. *Mineral Tolerance of Animals*. 7. Baskı. Washington, DC, National Academy Press, 2005.
232. Russell KE, Roussel AJ. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2007, 23: 403-426, v.
233. Gaona RC, Alegria KG, Hernandez EA, Patino LG. Protein and mineral metabolites for dairy cows during the transition period under tropical conditions. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 2012, 65: 6719-6728.
234. Montagner P, Krause ART, Schwegler E, Weschenfelder MM, Maffi AS, Xavier EG, Schneider A, Pereira RA, Jacometo CB, Schmitt E, Brauner CC, Del Pino FAB, Correa MN. Relationship between pre-partum body condition score changes, acute phase proteins and energy metabolism markers during the peripartum period in dairy cows. *Italian J Anim Sci*, 2017, 16: 329-336.
235. Trevisi E, Jahan N, Bertoni G, Ferrari A, Minuti A. Pro-inflammatory cytokine profile in dairy cows: consequences for new lactation. *Italian J Anim Sci*, 2015, 14.

236. Montagner P, Krause ART, Schwegler E, Weschenfelder MM, Rabassa VR, Schneider A, Pereira RA, Brauner CC, Del Pino FAB, Goncalves FM, Correa MN. Reduction of liver function delays resumption of postpartum ovarian activity and alters the synthesis of acute phase proteins in dairy cows. *Res Vet Sci*, 2016, 106: 84-88.
237. Castillo C, Hernandez J, Valverde I, Pereira V, Sotillo J, Alonso ML, Benedito JL. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res Vet Sci*, 2006, 80: 133-139.
238. Piccione G, Messina V, Marafioti S, Casella S, Giannetto C, Fazio F. Changes of Some Haematochemical Parameters in Dairy Cows during Late Gestation, Post Partum, Lactation and Dry Periods. *Veterinarija Ir Zootechnika*, 2012, 58: 59-64.
239. Ingvarsen KL, Andersen JB. Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci*, 2000, 83: 1573-1597.
240. Bertoni G, Trevisi E, Lombardelli R. Some new aspects of nutrition, health conditions and fertility of intensively reared dairy cows. *Italian J Anim Sci*, 2009, 8: 491-518.
241. Drackley JK. The other side of the transition: Effects on colostrum and calf, Tri-State Dairy Nutrition Conference, 2011, 20.
242. Hayirli A, Grummer RR, Nordheim EV, Crump PM. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *J Dairy Sci*, 2002, 85: 3430-3443.
243. Puppel K, Kuczynska B. Metabolic profiles of cow's blood; a review. *J Sci Food Agric*, 2016, 96: 4321-4328.

## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler                             |                                                                                                                 |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Adı Soyadı:</b>                           | Mustafa İLERİTÜRK                                                                                               |
| <b>Doğum tarihi:</b>                         | 14 Kasım 1984                                                                                                   |
| <b>Doğum Yeri:</b>                           | Daskotna/BULGARİSTAN                                                                                            |
| <b>Medeni Hali:</b>                          | Evli                                                                                                            |
| <b>Uyruğu:</b>                               | T.C.                                                                                                            |
| <b>Adres:</b>                                | Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi                                                                        |
| <b>Tel:</b>                                  | 0534 954 28 64                                                                                                  |
| <b>Faks:</b>                                 | -                                                                                                               |
| <b>E-mail:</b>                               | m.ileriturk@atauni.edu.tr                                                                                       |
| Eğitim                                       |                                                                                                                 |
| <b>Lise:</b>                                 | Yalova Endüstri Meslek Lisesi (2002)                                                                            |
| <b>Lisans:</b>                               | Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi,<br>Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi (2010) |
| <b>Yüksek lisans:</b>                        | -                                                                                                               |
| <b>Doktora:</b>                              | Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,<br>Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı                     |
| Yabancı Dil Bilgisi                          |                                                                                                                 |
| <b>İngilizce:</b>                            | Orta                                                                                                            |
| <b>Almanca:</b>                              | -                                                                                                               |
| <b>Rusça:</b>                                | -                                                                                                               |
| Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar                |                                                                                                                 |
| -                                            |                                                                                                                 |
| İlgi Alanları ve Hobiler                     |                                                                                                                 |
| Kayak, Masa tenisi, Doğa ve kültürel geziler |                                                                                                                 |

## EK-2.ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
Graduate School of Health Sciences

### ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Veterinerlik Biyokimyası ana bilim dalında Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Özgür KAYNAR danışmanlığında sunulan “İneklerde Parturientum ve Postpartum Dönemde Antimüllerian Hormon, Metabolik Profil ve Mineral Düzeylerinin Doğum-Tekrar Gebe Kalma Aralığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre yazıldığını, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

| Tez Bölümleri     | Tezin Benzerlik Oranı (%) | Maksimum Oran (%) |
|-------------------|---------------------------|-------------------|
| Giriş             | 3                         | 15                |
| Genel Bilgiler    | 2                         | 30                |
| Materyal ve Metod | 28                        | 35                |
| Bulgular          | 7                         | 10                |
| Tartışma          | 1                         | 15                |

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 11/ 03/ 2020

  
**Mustafa İLERİTÜRK**  
İmza

  
**Prof. Dr. Özgür KAYNAR**  
İmza

\* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun ....../....../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun ....../....../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

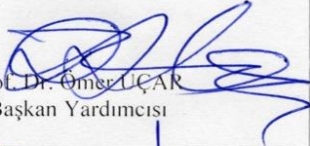
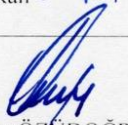
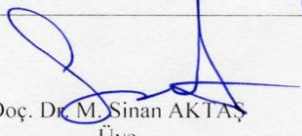
### EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ  
ETİK ALT KURUL BAŞKANLIĞI  
(AÜVFEAK)



#### ETİK KURUL KARARI

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Karar Sayısı:</b> 2015/9                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>Karar Tarihi:</b> 13/07/2015                                                                                                   |
| <p>Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Özgür Kaynar ve Araş. Gör. Mustafa İleritürk tarafından sunulan “İneklerde prepartum ve postpartum dönemde antimüllerian hormon, metabolik profil ve mineral düzeylerinin doğum-tekrar gebe kalma aralığı üzerine etkilerinin incelenmesi” adlı bilimsel teze ait başvuru formu etik kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir.</p> <p>Çalışmada özel bir işletmeye ait olan 40 adet ineğin v. jugularislerinden alınan kan örneklerinde antimüllerian hormon, metabolik profil ve mineral düzeyler üzerine incelemeler yapılacaktır.</p> <p>Sunulan bilimsel tez çalışmasının Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ilkelerine uygun olduğuna karar verilmiştir.</p> |                                                                                                                                   |
| <br>Prof. Dr. Yunusemre ÖZKANLAR<br>Başkan                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <br>Prof. Dr. Ömer UÇAR<br>Başkan Yardımcısı |
| <br>Prof. Dr. Zekeriya ÖZÜDOĞRU<br>Üye                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <br>Doç. Dr. M. Sinan AKTAŞ<br>Üye           |
| <br>Doç. Dr. Emre KARAKUŞ<br>Üye                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                   |

#### EK-4. İZİN BELGESİ

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında doktora öğrenimi yapan öğrenciniz Mustafa İLERİTÜRK'ün "Peripartum Sütçü İneklerde Metabolik Profil Değişimi" ile alakalı yapacağı tez çalışmasını Aşkale İlçesi Ortabahçe Köyünde bulunan Nail Cinsli Süt Sığırcılığı İşletmemizde yapması tarafımızca uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize arz ederim. 9.6.2015

Mete Ertürk

Gn. Müdür

