

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**LAKTASYONDAKİ İNEKLERDE SÜTTE BULUNAN BAZI miRNA'LARIN
SOMATİK HÜCRE SAYISI VE SÜT KALİTESİ İLE İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Çağla GÜZEL

Danışman

Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN

HATAY-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**LAKTASYONDAKİ İNEKLERDE SÜTTE BULUNAN BAZI miRNA'LARIN
SOMATİK HÜCRE SAYISI VE SÜT KALİTESİ İLE İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Çağla GÜZEL

Danışman

Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

23.YL.014 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**LAKTASYONDAKİ İNEKLERDE SÜTTE BULUNAN BAZI miRNA’LARIN
SOMATİK HÜCRE SAYISI VE SÜT KALİTESİ İLE İLİŞKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Fatma Çağla GÜZEL

Bu tez isimleri aşağıda yazılı olan tez jürisi tarafından 22/10/2024 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı : Prof. Dr. Akın YAKAN

Üye : Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN

Üye : Doç. Dr. Murat Onur YAZLIK

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecine başladığım günden itibaren tecrübelerini ve bilgilerini içtenlikle paylaşan ve daima yanımda olan, öğrencisi olmaktan gurur ve onur duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN'a sonsuz saygılarımı, teşekkürlerimi sunarım.

Akademik düşünce ve ahlak konusunda sevgili tez danışmanım ile bana yeni bakış açıları kazandıran ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. Akın YAKAN'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın saha ve laboratuvar aşamalarında yardımcı olan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim elemanı Arş. Gör. Hasan Hüseyin KEÇELİ ile tez çalışmamda sonuçların analizi ve değerlendirilmesine yardımcı olan Doç. Dr. Ufuk KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitim süreci boyunca fikirlerini ve bilgilerini esirgemeyen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Sevda DALKIRAN'a teşekkür ederim. Tezimin deneysel çalışmalarını yürütebilmem adına sağladıkları katkılardan dolayı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, teşekkürlerimi sunarım. Eğitim sürecimi maddi ve manevi destekleyen ve her daim arkamda olduklarını bildiğim sevgili annem Nihal GÜZEL ile kardeşim Süleyman GÜZEL'e en derin minnet, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Fatma Çağla GÜZEL

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ÖZET.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Sığırlarda Meme Yapısı ve Süt Oluşum Mekanizması.....	5
2.2. Temel Süt Kalite Parametreleri.....	7
2.2.1. Süt Proteini.....	7
2.2.2. Süt Yağı	8
2.2.3. Laktoz.....	9
2.2.4. pH Değeri.....	9
2.2.5. Elektrik İletkenliği.....	10
2.2.6. Donma Noktası.....	10
2.2.7. Somatik Hücre Sayısı	11
2.3. MikroRNA: Biyogenezi ve Biyobelirteç Potansiyeli	13
2.3.1. miR-27a-3p.....	16
2.3.2. miR-29B-2.....	16
2.3.3. miR-142-5p.....	17
2.3.4. miR-148a.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Örneklerin Toplanması ve CMT (California Mastitis Test) Uygulaması	19
3.2. Temel Süt Kalite Parametrelerinin Ölçümü.....	21
3.3. Total RNA İzolasyonu.....	22

3.4. Poliadenilasyon ve cDNA Sentezi.....	23
3.5. Real Time PCR Uygulamaları.....	24
3.6. İstatiksel Analizler.....	24
4. BULGULAR.....	26
4.1. Gruplarda Somatik Hücre Sayısı ile Bazı Süt Kalite Parametrelerinin Seviyeleri	26
4.2. Total RNA İzolasyonu Bulguları.....	27
4.3. Real Time PCR Uygulaması Bulguları.....	27
4.4. Gruplardaki miRNA Ekspresyon Seviyeleri.....	31
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇ.....	40
7. KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa no
Şekil 2.1.1. İneklerde Meme Yapısı.....	6
Şekil 2.3.1. MikroRNA Biyogenezi.....	15
Şekil 3.1.1. A. Meme Loblarının %70'lik Alkol ile Temizlenmesi, B. Meme Loblarının Tek Kullanımlık Kâğıt Havlular ile Silinmesi, C. Örneklerin Toplanması, D. Toplanan Örneklerin Soğuk Zincirde Muhafaza Edilmesi.....	19
Şekil 3.1.2. Saha ve Laboratuvar İş Akışı.....	21
Şekil 3.2.1. Milko-tester Master Classic M2 P1 cihazı ile süt bileşenlerinin ölçümü....	22
Şekil 4.3.1. Örneklerde miR-27a-3p Ct Grafiği.....	27
Şekil 4.3.2. Örneklerde miR-27a-3p Erime Eğrisi Grafiği.....	28
Şekil 4.3.3. Örneklerde miR-29B-2 Ct Grafiği.....	28
Şekil 4.3.4. Örneklerde miR-29B-2 Erime Eğrisi Grafiği.....	28
Şekil 4.3.5. Örneklerde miR-142-5p Ct Grafiği.....	29
Şekil 4.3.6. Örneklerde miR-142-5p Erime Eğrisi Grafiği.....	29
Şekil 4.3.7. Örneklerde miR-148a Ct Grafiği.....	29
Şekil 4.3.8. Örneklerde miR-148a Erime Eğrisi Grafiği.....	30
Şekil 4.3.9. Örneklerde U6 Ct Grafiği.....	30
Şekil 4.3.10. Örneklerde U6 Erime Eğrisi Grafiği.....	30
Şekil 4.4.1. Örneklerdeki miR-27a-3p, miR-29B-2, miR-148a ve miR-142-5p ve Gen Ekspresyon Seviyeleri.....	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.5.1. Amplifikasyonu Yapılan Nükleik Asitlerin Primer Dizileri.....	24
Çizelge 4.1.1. Örneklerdeki SHS'nin Gruplara Göre Dağılımı.....	26
Çizelge 4.1.2. Temel Süt Kalite Parametrelerinin Gruplara Göre Değişim Bulguları.....	27
Çizelge 4.4.1. miRNA Ekspresyon Sonuçları.....	31
Çizelge 4.4.2. İncelenen Parametreler ve miRNA'lar Arasındaki Korelasyon Bulguları.....	33



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Keçi, Koyun, İnek ve Manda Sütlerinin Bazı Kalite Parametreleri.....	5
Tablo 3.1.1. Somatik Hücre Sayısının Jel Kıvamına Göre Yorumlanan CMT Skoru....	20



SİMGELER ve KISALTMALAR

AD	: Annealing Derecesi
CMT	: California Mastitis Test
CPT1B	: Carnitine palmitoyltransferase 1B
DSHS	: Düşük Somatik Hücre Sayısı
FAO	: Food and Agriculture Organisation
Kat.	: Katalog
miRNA	: Mikro RNA
ml	: Mililitre
pH	: Power of Hydrojen
PPAR	: Peroxisome Proliferator Activated Receptor
RT-qPCR	: Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RXR α	: Retinoid x receptor alpha
SHS	: Somatik Hücre Sayısı
TAG	: Triacylglycerol
WHO	: World Health Organisation, Dünya Sağlık Örgütü
YKM	: Yağsız Kuru Madde
YSHS	: Yüksek Somatik Hücre Sayısı
μ s/cm	: Microsiemens/santimetre

ÖZET

Laktasyondaki İneklerde Sütte Bulunan Bazı miRNA'ların Somatik Hücre Sayısı ve Süt Kalitesi ile İlişkisi

Bu tez çalışmasında, Kayseri İl'inde bulunan özel bir işletmeden orta laktasyon döneminde olan Holştayn ırkı ineklerde sütteki temel kalite parametrelerinin (protein, laktoz, yağ, yağsız kuru madde (YKM), pH, elektrik iletkenliği ve donma noktası) yanı sıra miR-27a-3p, miR-29B-2, miR-142-5p ve miR-148a'nın aktiviteleri somatik hücre sayısına (SHS) bağlı olarak değişimleri ve bunların temel süt kalite parametreleri ile olan ilişkileri araştırılmıştır.

Güncel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan, kodlama yapmayan RNA molekülleri olan miRNA'lar süt verimi ve meme sağlığı ile ilişkilendirilmektedir. Bu çalışmanın hayvan materyalini oluşturan süt örnekleri Kaliforniya Mastitis Test (CMT) ve SHS sonuçlarına göre gruplandırılmış ve örneklerle düşük SHS (DSHS) ve yüksek SHS (YSHS) olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Gruplarda protein, laktoz, yağ, YKM, pH ve donma noktası parametrelerinin benzer seviyelerde olduğu, elektrik iletkenliğinin YSHS grubunda daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0.001$). YSHS grubundaki örneklerde miR-27a-3p ve miR-29B-2 seviyelerinin DSHS grubuna kıyasla yaklaşık 3 kat fazla ifade edildiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). Gruplardaki miR-142-5p ekspresyon seviyeleri benzer bulunurken, miR-148a seviyelerinin YSHS grubunda DSHS grubuna kıyasla 6 kattan fazla upregüle olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Yapılan korelasyon analizlerinde miR-27a-3p ile miR-29B-2 ($r: 0.583$; $P<0.001$), miR-148a ($r: 0.629$; $P<0.001$) ve elektrik iletkenliği ($r: 0.316$; $P<0.05$) parametreleri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. miR-29B-2 ve miR-148a ($r: 0.605$; $P<0.001$), SHS ($r: 0.366$; $P<0.05$), yağ ($r: 0.319$; $P<0.05$) ve elektrik iletkenliği ($r: 0.390$; $P<0.05$) parametreleri arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca miR-142-5p'nin süt proteini ile negatif korele olduğu ($r: -0.311$; $P<0.05$), miR-148a ile SHS'nin ise pozitif korele olduğu tespit edilmiştir ($r: 0.441$; $P<0.01$).

Yapılan bu çalışmada, gruplar arasındaki kat değişimleri ve parametreler arasındaki korelasyon bulguları ile miR-27a-3p, miR29B-2 ve miR148a'nın süt kalitesinin ve meme sağlığının tespitinde biyobelirteç olabilme potansiyellerinin olduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte miR-142-5p'nin SHS ve süt kalitesi ile ilişkisinin daha iyi anlaşılması için SHS aralığının daha geniş tutulacağı yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İnek sütü, miRNA, Somatik hücre sayısı, Süt kalitesi

ABSTRACT

Relationship of Some miRNAs in Milk with Somatic Cell Count and Milk Quality in Lactating Cows

In this thesis, changes in basic milk quality parameters (protein, lactose, fat, fat-free dry matter (FFDM), pH, electrical conductivity and freezing point) as well as activities of miR-27a-3p, miR-29B-2, miR-142-5p and miR-148a depending on somatic cell count (SCC) and their relationships with basic milk quality parameters were investigated in Holstein cows in the mid-lactation period from a private farm in Kayseri Province.

miRNAs, which are non-coding RNA molecules, have been widely used in studies and are associated with milk yield and udder health. Milk samples constituting the animal material of the study were grouped according to the California Mastitis Test (CMT) and SCC results, and two groups were formed from the samples as low SCC (LSCC) and high SCC (HSCC). It was determined that protein, lactose, fat, FFDM, pH and freezing point parameters were at similar levels in the groups, and electrical conductivity was higher in the HSCC group ($P<0.001$). It was determined that miR-27a-3p and miR-29B-2 levels were approximately 3 times more expressed in the samples from the HSCC group compared to the LSCC group ($P<0.05$). It was determined that protein, lactose, fat, FFDM, pH and freezing point parameters were at similar levels in the groups, and electrical conductivity was higher in the HSCC group ($P<0.001$). It was found that miR-27a-3p and miR-29B-2 levels were expressed approximately 3-fold in the samples from the HSCC group compared to the LSCC group ($P<0.05$). While miR-142-5p expression levels were similar in the groups, miR-148a levels were found to be more than 6-fold upregulated in the HSCC group compared to the LSCC group ($P<0.05$). In the correlation analyses, a positive correlation was found between miR-27a-3p and miR-29B-2 ($r: 0.583$; $P<0.001$), miR-148a ($r: 0.629$; $P<0.001$) and electrical conductivity ($r: 0.316$; $P<0.05$) parameters. It was determined that there was a positive correlation between miR-29B-2 and miR-148a ($r: 0.605$; $P<0.001$), SCC ($r: 0.366$; $P<0.05$), fat ($r: 0.319$; $P<0.05$) and electrical conductivity ($r: 0.390$; $P<0.05$) parameters. In addition, miR-142-5p was negatively correlated with milk protein ($r: -0.311$; $P<0.05$), and miR-148a was positively correlated with SCC ($r: 0.441$; $P<0.01$).

In this study, fold changes between groups and correlation findings between parameters showed that miR-27a-3p, miR-29B-2 and miR-148a have the potential to be biomarkers in determining milk quality and udder health. However, it was evaluated that new studies with a wider SCC range are needed to better understand the relationship between miR-142-5p and SCC and milk quality.

Keywords: Cow's milk, miRNA, Somatic cell count, Milk quality

1. GİRİŞ

Sürdürülebilir sağlık, birçok faktörle birlikte dengeli ve yeterli beslenme ile mümkündür. Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organisation, FAO) verilerine göre popülasyonun 2050 yılında 10 milyara ulaşacağı öngörülmektedir (FAO 2024). Artan nüfusa bağlı olarak bitkisel ve hayvansal gıdalara olan talep her geçen gün artmaktadır. İnsanlarda tüketim bilincinin artması da kaliteli gıda kaynaklarından olan hayvansal ürünlere talebin artmasında önemli bir diğer faktör olarak ön plana çıkmaktadır (Komarek ve ark. 2021).

Hayvansal gıdaların içeriği ile insan sağlığı arasındaki ilişki tarımsal faaliyetlerin iyileştirilmesini ve çiftlik hayvanlarından elde edilen gıdalarda verim ve kalite hedeflerinin yükselmesini sağlamaktadır (Godber ve Wall 2014, Brito ve ark. 2021). Çiftlik hayvanı yetiştiriciliği insan beslenmesinde önemli yer tutan et, süt, süt ürünleri ve yumurta gibi hayvansal ürünlerin temininde çok önemli bir yere sahiptir (Yakan ve ark. 2021).

Süt, memelilerde yavrunun gelişimi ve büyümesinde içeriğindeki temel moleküllerden dolayı vazgeçilmez bir role sahiptir. Sürdürülebilir sağlıklı yaşam için gerekli besin maddelerini içeriğinde yeterli miktarda bulunduran süt, modern yaşamda en çok tüketilen besin maddelerindendir (Yakan ve ark. 2021). Çiftlik hayvanlarında süt ve süt ürünleri büyük oranda sığır yetiştiriciliği ile sağlanmaktadır (Çoban ve Tüzemen 2007, FAO 2024).

Çiftlik hayvanlarında süt salgısı kolostrum ile başlar ve ırk, yaş, yetiştiricilik uygulamaları gibi faktörlere bağlı olarak değişen sürelerde devam eder. Bu salgı temelde hem yavrunun ihtiyaç duyduğu enerjinin sağlanmasında hem de yavru immün sisteminin gelişiminde önemlidir (Komarek ve ark. 2021). Laktasyonun devamıyla, üretilen sütün kalitesi laktoz, protein ve yağ gibi süt kompozisyonunu oluşturan bazı parametrelerin yanı sıra sütteki somatik hücre sayısı (SHS) ile ilişkilidir. Sığırlarda sütte doğal olarak bulunan somatik hücreler, büyük oranda meme epitel hücreleri ve lökositlerden oluşur (Wilm ve ark. 2021, Vitenberga-Verza ve ark. 2022). Sığır sütünde bu hücrelerin sayısındaki artış inflamasyon ve enfeksiyonlarla ilişkilendirilmekte ve yüksek SHS'nin süt kalite kaybı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Yakan ve ark. 2021).

Meme dokusunun yangısı mastitis olarak tanımlanmaktadır. Mastitis süt sığır larında travmatik faktörler veya çeşitli mikroorganizmaların etkisiyle sık görülen ve memede oluşan enfeksiyon durumudur (Abed ve ark. 2021). Mastitis, hayvan sağlığını etkilemesinin yanı sıra süt veriminde azalma ve süt kalitesinde d  meye sebep olmaktadır. Bu durum yeti tircilikte önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Mastitisi klinik seyrine göre klinik ve subklinik mastitis olmak üzere iki sınıfta incelemek mümkündür. Klinik mastitis meme dokusunda kızarıklık,   ilik ve fonksiyon kaybı gibi inflamasyon ile ilişkili belirtiler gösterir. Bu belirtiler sayesinde klinik mastitis tespiti görece kolaydır. Bununla birlikte subklinik mastitis olgularında klinik mastitis bulgularına rastlanmaz ve bu durum subklinik mastitisin tespitini zorla tır. Sığır larda yapılan çalışmalar klinik belirti olmaksızın seyreden subklinik mastitisin görülme sıklığının klinik mastitise göre çok daha fazla olduğunu ortaya çıkar mı tır (Ebrahimi ve ark. 2018,  zkan ve ark. 2024).

Sığır larda mastitis durumunda sütteki SHS'yi oluşturan hücrelerden olan lökositlerin sayısı artmakta buna bağlı olarak toplam SHS artmaktadır. Bu durum SHS tespiti ile mastitis teşhisini kolaylaştırmaktadır.  lkelere göre değişiklik göstermekle birlikte genelde meme dokusu bakımından sağlıklı olduğu kabul edilen sığır larda sütteki SHS'nin 200.000 hücre/ml ve altında olması gerektiği önerilmektedir (Anonim 2000, Ebrahimi ve ark. 2018, Stefanon ve ark. 2023). Türkiye'de ise izin verilen yasal sınır 500.000 hücre/ml süt olarak belirtilmektedir (Bulca ve ark. 2016).

Sütte artan SHS ile subklinik mastitis arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir. Ancak beslenme, mevsim, laktasyon dönemi gibi faktörler SHS'nin subklinik mastitis teşhisi için tek başına yeterli olmayacağını göstermektedir (Aytekin ve ark. 2014). Ayrıca süt kalitesi ile SHS arasındaki ilişki ile ilgili mevcut bilgi sınırlıdır.

Moleküler tekniklerin gelişimi ve bu tekniklerin hayvan yeti tirciliği çalışmalarında uygulanabilirliği, yeti tircilik alanında moleküler düzeyde önemli ilerlemeler kaydedilmesini sağlamıştır. Fizyolojik ve patolojik değişikliklerin izlenebilmesinde kullanılmak üzere biyobelirteç arayışları devam etmektedir. Son 30 yılda, proteinler, RNA ve DNA gibi moleküllerin biyobelirteç olma potansiyeline yönelik çok sayıda önemli araştırma gerçekleştirilmiştir ( zkan ve Yakan 2017). Bununla birlikte bu moleküllerin farklı genetik ve  evre koşullarında geçerliliklerinin sınırlı olduğu anlaşılmıştır. Güncel araştırmalarda ise kısa kodlama yapmayan RNA moleküllerinden olan mikroRNA

(miRNA)'ların çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda biyobelirteç olma potansiyellerinin olduğu keşfedilmiştir (O'Brien ve ark. 2018, Do ve ark. 2021). Kısa kodlama yapmayan RNA moleküllerinden olan miRNA'lar, diğer RNA türlerine kıyasla oldukça dayanıklı yapılarıyla dikkat çekmektedir. Bu dayanıklılık, miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini artırmaktadır. Güncel araştırmalar, miRNA'ların çeşitli patolojik durumların yanı sıra fizyolojik süreçlerin teşhis ve takibinde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Özellikle enfeksiyonlar ve metabolik hastalıklar gibi birçok durumun yanı sıra, miRNA'ların çeşitli fizyolojik süreçlerde de önemli bir rol oynadığı bilimsel verilerle desteklenmiştir (O'Brien ve ark. 2018, Do ve ark. 2021). Ancak, çiftlik hayvanlarında miRNA'larla yapılan çalışmaların sınırlı olduğu ve bu alanda daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Bu bağlamda, miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımı, hayvan sağlığı ve yetiştiriciliği alanında önemli bir potansiyel taşımaktadır. Bununla birlikte çiftlik hayvanlarında miRNA'larla ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır (Do ve ark. 2021).

Yapılan bu tez çalışmasında Holştayn ırkı ineklerden alınan süt örnekleriyle SHS'ye göre düşük SHS'li (DSHS, 200.000 hücre/ml altı) ve yüksek SHS'li (YSHS, 200.000 hücre/ml üstü) olmak üzere 2 grup oluşturulmuştur. Bu gruplarda sütteki Bta-miR-27a-3p, Bta-miR-29B-2, Bta-miR-142-5p ve Bta-miR-148a isimli miRNA'ların ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Ayrıca hedef miRNA'ların SHS ve temel bazı süt kalite parametreleri (protein, laktoz, yağ, yağsız kuru madde (YKM), elektrik iletkenliği ve donma noktası) ile olan aralarındaki ilişkiler de incelenmiştir. Bu bağlamda yapılan bu çalışma ile meme sağlığı ve süt kalitesinin tespitinde ve iyileştirilmesinde ilgili miRNA'ların biyobelirteç olabilme potansiyelleri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Süt, memelilerde doğumu takiben meme bezinden salgılanan, protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mineral gibi makro ve mikro besin maddeleri açısından zengin, beyaz renkte, kendine has tadı ve kokusu olan biyolojik bir sıvıdır (Svennersten-Sjaunja ve Olsson 2005). Kaliteli besin kaynaklarından birisi olarak değerlendirilen süt, yavru için birincil ve besleyici besin kaynağı görevi görmektedir. Zira, yavrunun sağlıklı bir şekilde büyüüp gelişmesi ve bağışıklık sisteminin oluşması için önemlidir (Fox 2008). Bununla birlikte çiftlik hayvanlarından elde edilen süt insan beslenmesi için önemli bir hayvansal üründür. Temel besin maddelerinden olan sütün kanser, obezite ve hipertansiyon gibi hastalıkların önlenmesinde de önemli rollere sahip olduğu bildirilmektedir (Li ve ark. 2022, Özkan ve ark. 2024).

Sütün insan beslenmesi ve sağlığındaki önemi, üretim ve kalite hedeflerinin artmasına neden olmaktadır (Lin ve ark. 2021). Etkili yetiştiricilik sistemleri ve gelişen teknolojinin yetiştiriciliğe entegrasyonu ile çiftlik hayvanlarında süt verimi ile ilgili önemli iyileştirmeler sağlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan rapora göre toplam süt üretimi 1988 yılında yaklaşık 530 milyon ton olarak kaydedilirken 2018 yılında bu miktarın yaklaşık 850 milyon tona yükseldiği belirlenmiştir (FAO 2024). Aynı raporda 2030 yılına kadar dünyadaki yıllık süt üretiminin yaklaşık 1 milyon tona ulaşacağı öngörülmektedir (FAO 2024).

Yetiştiriciliği yapılan farklı türlerde, sütlerin kompozisyonu temel olarak benzer olsa da kompozisyon parametrelerinde türe özgü önemli farklılıklar bulunabilmektedir (Çoban ve Tüzemen 2007, Foroutan ve ark. 2019). Tablo 2.1’de bazı çiftlik hayvanlarının temel süt kompozisyon parametrelerinin yaklaşık oranları sunulmuştur (Park ve ark. 2007).

Tablo 2.1. Keçi, Koyun, İnek ve Manda Sütlerinin Bazı Kalite Parametreleri

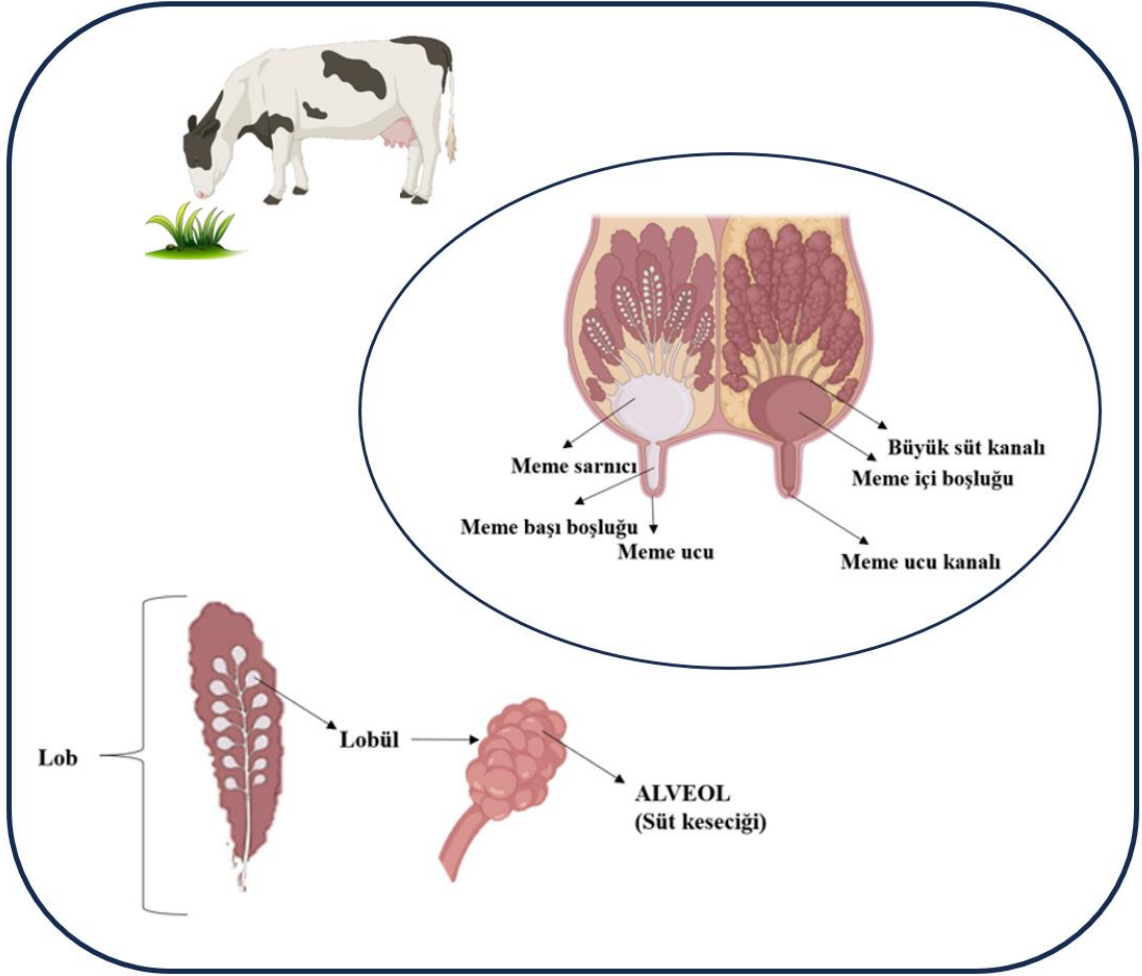
Tür	Yağ (%)	Yağsız Kuru Madde (%)	Laktoz (%)	Protein (%)
İnek	3.60	9.00	4.70	3.20
Keçi	3.80	8.90	4.10	3.40
Koyun	7.90	12.00	4.90	6.20
Manda	7.97	10.00	4.83	4.36

Dünya süt üretiminin büyük bir kısmı (yaklaşık %85'i) sığır yetiştiriciliği ile sağlanmaktadır. Sığırlarda süt üretimi memelerinin büyük ve süt depolama yeteneklerinin gelişmiş olması, sağım kolaylığı ve süt kompozisyon özellikleri gibi sebeplerle avantajlıdır. Bu durum yetiştiricilikte süt sığır yetiştiriciliğinin ön plana çıkmasına sebep olan faktörlerdendir (Turan ve ark. 2017). Dünyada 2021 yılında 270 milyondan fazla süt sığır ve 800'den fazla sığır ırkı bulunduğu bilinmektedir (Brito ve ark. 2021). Sığırlarda ırk faktörüne bağlı olarak verim özellikleri farklılık göstermektedir. Bununla birlikte Türkiye'de, farklı ortamlara uyum yetenekleri ve yüksek verim özelliği ile Holştayn ırkı sığırlar daha çok tercih edilmektedir (Şahin ve ark. 2022).

2.1. Sığırlarda Meme Yapısı ve Süt Oluşum Mekanizması

Memelilerde tür faktörüne bağlı olarak süt kompozisyonunda olduğu gibi meme dokusunda ve süt sentezinde yapısal farklılıklar bulunmaktadır. Sığırlarda fetal dönemden başlayan meme bezi gelişimi gebeliğin 6. ayında tamamlanır (Kul ve ark. 2006). Memenin şekli ve boyutu ırk, yaş, laktasyon sayısı ve gebelik durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Sığırlarda meme bezleri vücudun inguinal bölgesinde arka bacaklar arasında, yavrunun kolayca erişebileceği bir noktada yer almaktadır (Baştan 2022).

Meme bezi sığırlarda birbirinden bir membran ile sağ ve sol olmak üzere iki yarıma ayrılan ve her bir yarımda iki lob olmak üzere toplamda dört loptan oluşan bir salgı organıdır (Baştan 2002). Meme bezi kompleks bir yapıda olup normal bir sığırın her bir meme lobu birer meme ucu, meme ucu kanalı, meme başı boşluğu, meme içi boşluğu, büyük süt kanalı, meme sarnıcı ile alveollerden oluşmaktadır. Süt sentezi meme bezinde alveol denilen süt hücrelerinde gerçekleşir (Lu ve ark. 2014) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1.1. İneklerde Meme Yapısı

Meme yapısında hayvanın yaşı ve genetik yapısı ile laktasyon dönemi ve laktasyon sayısı gibi faktörlere bağlı olarak değişiklikler gözlenirse de arka meme lobları ön meme loblarından büyük olup süt sentezinin %60'ı memenin arka loblarında, %40'ı ise ön loblarında gerçekleşir (Weiss ve ark. 2004).

Sığırlarda süt salgısının başlaması için gebeliğin şekillenmesi gerekir. Süt salgısı gebeliğin son döneminde meme bezinin gelişimi ve kolostrum sentezi (kolostrogenез) ile başlar. Gebelik ve laktasyon döneminde ineklerde süt sekresyonunun düzenlenmesi ve meme bezi gelişiminde görevli östrojen, progesteron, prolaktin, büyüme hormonu, glukokortikoidler, tiroit hormonları ve insülin hormonu gibi çeşitli hormonlar görev alır (Svennersten-Sjaunja ve Olsson 2005).

Laktasyon, memelilerin süt üretimini ve sütün salgılanma sürecini kapsayan dönemdir. Laktasyon genetik ve çevre faktörlerine bağlı olarak değişen sürelerde devam eder. Sığırlarda laktasyon dönemi yaklaşık 305 gün sürmektedir. Bu dönemin ardından genelde 2 ay süren kuru dönem uygulanır (Svennersten-Sjaunja ve Olsson 2005).

Memelilerde süt üretimi için su, mineral ve vitamin bileşenleri kan dolaşımından yardımcı bir taşıyıcıya ihtiyaç duymadan geçebilirken; protein, yağ ve laktoz bileşenleri yardımcı taşıyıcılar aracılığıyla kan dolaşımından geçerek ve salgı hücrelerinde üretilerek oluşur (Lu ve ark. 2014).

2.2. Temel Süt Kalite Parametreleri

Besin değeri açısından büyük öneme sahip olan sütün yağ, protein, laktoz gibi kompozisyonunu oluşturan parametrelerle SHS, elektrik iletkenliği ve pH gibi parametreler temel süt kalite parametreleri olarak değerlendirilmektedir (Özek 2015). Süt kalitesi yaş ve ırk gibi hayvana bağlı bireysel faktörlere ek olarak beslenme gibi çevresel faktörlerden de etkilenir. Ticari olarak tüketime sunulan sütün kompozisyonu süt ve süt ürünlerinin kalitesini etkileyeceği için fiyatlandırılmayı etkiler (Özel ve ark 2008, Yakan ve ark. 2021).

Sütün yaklaşık %87'si su olmakla birlikte sütte bulunan protein, yağ, yağsız kuru madde (YKM), laktoz gibi parametreler süt kalitesinin değerlendirilmesinde büyük oranda sorumlu önemli parametrelerdir. Bununla birlikte sütte doğal olarak bulunan ve epitel hücrelerin yanı sıra bağışıklık ile ilişkili hücrelerden oluşan SHS içeriğine bağlı olarak şekillenen pH, donma noktası ve elektrik iletkenliği gibi parametreler de süt kalitesinin değerlendirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Schukken ve ark. 2003, Bueno ve ark. 2005).

2.2.1. Süt Proteini

Süt kalitesinin değerlendirilmesinde en önemli parametrelerden biri olan süt proteini, yavru sağlığı ve gelişiminin yanı sıra insan beslenmesinde sütü değerli kılan kompozisyonel bir parametredir. Süt proteini sütün kalitesinin ölçülmesinde ve sütün ekonomik değerinin belirlenmesinde önemlidir. Süt içeriğindeki protein oranı türler ve ırklar arasında önemli farklılıklar gösterir (Tremblay ve Gilbert 2009).

Sütün ana proteinlerini kazein ve peynir altı suyu proteini oluşturmaktadır. İnek sütünde bulunan proteinin %80'lik bölümünü yoğurt ve peynir yapımı için büyük öneme sahip olan kazein proteinleri oluşturur (Özek 2015). Sadece sütte bulunan ve sütün beyaz renginin oluşumundan sorumlu olan kazein proteininin alfa-kazein, beta- kazein, gama-kazein ve kappa-kazein dahil 4 ana çeşidi bulunmaktadır (Kazimierska ve Kalinowska-Lis 2021). Sütün kazein fraksiyonu kalsiyum ve fosfor gibi minerallerin taşınması ve bağlanması gibi önemli rollere sahipken, peynir altı suyu fraksiyonu da immünoglobulinler, β -laktoglobulin, α -laktoalbümin gibi antimikrobiyal ajanlar içermesi ile insan sağlığı için önemli rollere sahiptir (Gür ve ark. 2010). Ayrıca, sığır sütündeki protein kompozisyonu insanların ihtiyaç duyduğu histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valin amino asitlerinin tamamını içermesi ile yüksek kaliteli olarak kabul edilmektedir (Davoodi ve ark. 2016).

İnek sütü, içeriğindeki proteinlerin besin değeri ve tıbbi özellikleri sayesinde insan sağlığında önemli rol oynamaktadır (Özek 2015). İnsanlarda çeşitli hastalıkların görülme sıklıklarının azaltılmasında ve önleminde sütün terapötik etkileri ile ilgili potansiyelleri üzerine yoğunlaşmıştır (Gür ve ark. 2010, Davoodi ve ark. 2016). Süt kalitesinin oluşumunda süt proteini kompozisyonunun miRNA'larla ilişkili olduğu güncel çalışmalarda bildirilmektedir (Dinçel ve ark. 2018; Özkan ve ark. 2024).

2.2.2. Süt Yağı

Yağlar organizmada enerji kaynağı olmalarının yanı sıra hücre zarının yapısına katılmak gibi biyolojik fonksiyonları olan ve eter, kloroform ve benzen gibi organik çözücülerde çözünen organik bileşiklerdir (Temiz 2003). Süt proteini gibi süt yağı da süt kalitesinin oluşumunda önemli role sahiptir. Sığır sütünde bulunan yağlar, 2-4 μ m çapında emülsifiye edilmiş globüller halinde bulunur (MacGibbon ve ark. 2006). Süt yağının sentezi birçok faktör tarafından düzenlenir ve sütte bulunan yağ asitlerinin yaklaşık yarısı meme bezinden sentezlenirken diğer yarısı doğrudan kan dolaşımından köken alır (Van Arendonk ve ark. 2010, Iqbal ve ark. 2022). Süt yağı bileşiminde trigliseritler, diaçilgliseroller, fosfolipitler, steroidler ve serbest yağ asitleri yer almaktadır (Lu ve ark. 2016). Süt sahip olduğu kısa, orta ve uzun yağ asidi zincirleri, 400 farklı yağ asidi çeşidi, yağda çözünen vitamin ve biyoaktif lipidlerin varlığı ile karmaşık ve önemli bir enerji kaynağıdır. Süt yağı

ve yağ asidi kompozisyonu sütün kalitesinin oluşumunda önemli bir faktördür (Temiz 2003, Lu ve ark. 2016).

2.2.3. Laktoz

Laktoz, glikoz ve galaktozun glikozidik bağ ile birleşmesi sonucu oluşan ve süt şekeri olarak bilinen disakkarit yapıda bir karbonhidrattır (Antanaitis ve ark. 2021). Laktoz doğada sadece sütte bulunur ve sığır sütü laktoz bakımından zengindir (Costa ve ark. 2019). Sütte bulunan laktoz, enerji kaynağı olarak önemli fonksiyonlara sahip olup süt kalitesi hakkında bilgi veren önemli parametrelerden biridir (Costa ve ark. 2019, Foroutan ve ark. 2019).

Sütte bulunan laktozun ana bileşeni kan glikozudur. Meme epitel hücrelerinde kan glikozundan sentezlenen laktozun sütteki oranı ineklerde genellikle %4,70 civarında olmakla birlikte bu oran %4,10-4,80 arasındadır. Ayrıca, sütteki laktoz oranı laktasyon dönemlerine göre değişiklik gösterebilir (Costa ve ark. 2019). Meme sağlığı sütün laktoz sentezi ve konsantrasyonunda önemli bir faktördür. Yapılan bazı çalışmalarda laktozun süt içeriğindeki bakteri sayısı ile ilişkili olduğu ve SHS'nin yüksek olduğu sütlerde laktoz bileşeninde azalma görüldüğü bildirilmiştir (Alessio ve ark. 2021, Yalçın ve Çakmak 2022).

2.2.4. pH Değeri

pH değeri hidrojen iyonlarının konsantrasyonu ile süt asitliğinin göstergesidir. Süt teknolojisinde sütün pH değeri büyük önem taşır. Süt kalitesi ile yakından ilişkili olan pH değeri meme sağlığı hakkında da fikir veren bir parametredir. Süt pH'sındaki değişikliğin tespit edilmesi ile meme dokusunda şekillenebilecek enfeksiyon hakkında fikir sahibi olunabileceği bildirilmektedir (Düz ve ark. 2021). Zira, mikrobiyal etkinlikler sonucunda laktik asit üretilir. Sütün içeriğindeki laktik asit miktarının fazla olması ile sütün asitlik özelliği artar ve pH düşer. Süt pH'sındaki düşüş ise süt kalitesinin bozulmasına yol açar (Milci ve Yaygın 2004). Çok yüksek bir pH değeri sütle ilgili sorunlara işaret edebildiği gibi düşük pH değerleri de enfeksiyon belirtisi olabilir. Sütün pH değeri türler arasında yüksek bir farklılık göstermemekle birlikte inek sütünün pH değeri 6,60-6,80 aralığındadır (Coşkun ve Çağlar 2013).

2.2.5. Elektrik İletkenliği

Süt içeriğindeki mineral maddelerden dolayı iletken bir maddedir. Sütün bu özelliği kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Sütün yapısında bulunan iyonlara bağlı şekillenen elektrik iletkenliği sütü oluşturan kompozisyonel parametreler ve çevre şartlarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Milci ve Yaygın 2004). Sütün elektrik iletkenliği, tek başına yeterli olmamakla birlikte çiftlik hayvanlarında meme bezi enfeksiyonu gibi süt kompozisyonu ve kalitesini etkileyen hastalıkların teşhisi için kullanılan ekonomik ve kolay parametrelerden biri olarak değerlendirilmektedir (Atasever ve Erdem 2008, Yakan ve ark. 2021). Meme dokusunda şekillenebilecek bir enfeksiyon sütün içeriğinde bulunan magnezyum, kalsiyum ve sodyum gibi iyonların miktarlarının değişmesine neden olmaktadır. Bu durumda sütteki elektrik iletkenliği artabilmektedir. Ayrıca enfeksiyona bağlı artabilecek SHS ile elektrik iletkenliğinin de ilişkili olduğu bildirilmektedir (Yakan ve ark. 2021).

2.2.6. Donma Noktası

Sütün kimyasal kompozisyonu donma noktasını belirlemektedir. Azotlu bileşikler, laktoz, suda eriyen vitaminler ve minerallerden oluşan yağsız kuru madde gibi parametrelere bağlı olarak sütün donma noktası değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca, bu parametre süte su katılıp katılmadığının anlaşılmasında da önemlidir (McCarthy ve Singh 2009). Suda çözünen madde miktarı ile donma noktası ters orantılıdır. Süte su katılması ile sütteki çözünen madde miktarı azalır ve bu duruma bağlı olarak donma noktasında artış görülür (Ilie ve ark. 2010). Laktasyon dönemi, mevsim, beslenme, su tüketimi, meme sağlığı gibi faktörler sütün donma noktasını etkileyebilmektedir. Bununla birlikte sığır sütünün donma noktası -0,522 ile -0,540 °C arasındadır (Henno ve ark. 2008, Zagorska ve Ciprova 2013, Pesce ve ark. 2016).

2.2.7. Somatik Hücre Sayısı

Somatik hücreler sütte doğal olarak bulunan hücrelerdir. Bu hücreler epitel hücrelerin yanı sıra lökosit, makrofaj ve nötrofil gibi bağışıklık ile ilişkili hücrelerden oluşur. Sığırlarda sütteki SHS meme fizyolojisi ve sağlığı hakkında fikir veren dolayısıyla süt kalitesi ile ilişkilendirilen en önemli parametrelerden biridir. Sütteki SHS ineğin sağlık durumu, rasyon içeriği ve laktasyon dönemi gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. İneklerde laktasyon döneminde meme başında oluşan açılmalar meme dokusunu enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Antanaitis ve ark. 2021). Meme dokusunun mikroorganizmalarla enfekte olması sonucu ikincil bir savunma hattı olan dolaşımda bulunan lökositlerin sayısında artış görülür. Bu durumda artan SHS'nin çeşitli yöntemlerle sütteki seviyelerinin belirlenmesi sayesinde meme sağlığı hakkında fikir sahibi olunabilmektedir (Mundan ve ark. 2015).

Yetiştiricilikte iyi yönetim koşulları SHS'nin belirli sınırlar arasında olmasını sağlamaktadır. Ancak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde inek sütündeki SHS'nin değerlendirilmesinde belirlenen eşik değerler farklılık göstermektedir. Avrupa ülkelerinde SHS'nin sütte 200.000 hücre/ml üzerinde olması hastalık belirtisi olarak kabul edilirken, Avustralya'da bu değer 250.000 hücre/ml, Türkiye'de ise 500.000 hücre/ml üzerinde olması durumunda meme dokusunun sağlıklı olmadığı kabul edilmektedir (Anonim 2000, Kıyıcı ve ark. 2016, Ebrahimi ve ark. 2018).

Meme dokusunda meydana gelen enfeksiyon mastitis olarak tanımlanmaktadır. Mastitis fiziksel travmalar, patojen mikroorganizmalar ve diğer faktörlere bağlı olarak şekillenen, ekonomik kayıplarla karakterize önemli bir sağlık sorunudur. Sığırlarda mastitise sıklıkla *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* gibi patojenlerin sebep olduğu bilinmekle birlikte yaklaşık 140 farklı mikroorganizmanın mastitise neden olabileceği bildirilmektedir (Balemi ve ark. 2021). Süt sığırı yetiştiriciliğinde daha sık rastlanan mastitis klinik seyrine göre klinik ve subklinik mastitis olmak üzere iki başlıkta incelenmektedir (Cobirka ve ark. 2020). Klinik mastitis meme dokusunda kızarıklık, şişlik, ağrı, ateş, hassasiyet, iştahsızlık, inflamasyon belirtileri ile karakterizedir. Bu mastitis formunda sütte de renk ve kıvam değişiklikleri şekillenmekte ve kalite kaybı oluşmaktadır (Ebrahimi ve ark. 2018). Klinik mastitis, belirtilerine bağlı olarak kolayca tespit edilebilirken

subklinik mastitis klinik mastitisteki belirtileri göstermeyeceği için teşhis edilmesi zor bir mastitis formudur (Ebrahimi ve ark. 2018, Özkan ve ark. 2024).

Subklinik mastitisin görülme sıklığının sürülerde %50'ye ulaştığı ve klinik mastitisten daha sık görüldüğü bilinmektedir (Özkan ve ark. 2024). Klinik belirti göstermediğinden teşhis edilmesi daha zordur. Subklinik mastitiste tanının konulamaması ya da geç konulması ile hastalık sürü içerisinde hızla yayılabilmektedir. Bu durum sürü sağlığının da bozulmasıyla süt verimlerinde azalma ve süt kalitesinde bozulmayla önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Thomas ve ark. 2018).

Meme sağlığının değerlendirilmesinde sütteki SHS önemli bir parametredir. SHS'ye bağlı olarak reaksiyon veren California mastitis test (CMT) uygulaması da sığır yetiştiriciliğinde meme sağlığının takibi için yaygın olarak kullanılmaktadır. CMT prensip olarak sütteki somatik hücre sayısına bağlı reaksiyon veren bir test yöntemidir. Sütte yapılan bu test ile meme sağlığı hakkında belirli oranlarda fikir sahibi olunabilmektedir (Wang ve ark. 2020).

California mastitis test, dört bölmeli bir kapta CMT kit içeriğinde sunulan özel bir solüsyondan yararlanılarak uygulanır. CMT kitinde bulunan solüsyon somatik hücre sayısı ile orantılı olarak yapılacak testte pıhtılaşan yoğun kıvamlı jel oluşumuna yol açar. Prensip olarak dört farklı meme lobundan alınan sütlerin eklendiği CMT kabına kit içeriğinde bulunan solüsyon eklenerek karışımın kıvamı değerlendirilir. Karışımın su gibi akışkan bir yapıda olması test sonucunun negatif olduğunu gösterir. Bu durumda sütün alındığı meme dokusu sağlıklı kabul edilir. Süt ve CMT solüsyonu karışımının jel kıvamını alması test sonucunun pozitif olduğunu ve sütteki lökosit miktarının fazla olduğunu düşündürür. Bu test ile meme dokusunda inflamasyon olguları değerlendirilebilir (Ashraf ve Imran, 2018). Yöntem az maliyetli ve hızlı sonuç veren bir yöntem olarak meme sağlığının tespiti için kullanılan en yaygın yöntemlerden biri olsa da test sonucu kalitatif ve subjektiftir (Wang ve ark. 2020).

Normal fizyolojik şartlarda düşük seviyelerde olan SHS, lökositlerdeki artışa bağlı olarak artmaktadır. Meme sağlığının durumu SHS'nin doğrudan ölçümü ve CMT ile incelenebilmektedir. Ancak subklinik mastitiste SHS ölçümü ile CMT uygulaması doğru teşhis oranını sınırlandırabilmektedir (Abed ve ark. 2021). Her ne kadar mikrobiyolojik

analiz altın standart olarak değerlendirilse de güncel araştırmalarda özellikle moleküler biyobelirteç arayışları ön plana çıkmıştır (Özkan ve ark. 2024).

İnsan sağlığı ile ilgili yapılan biyoteknolojik araştırmalar ve keşiflerde DNA, RNA ve protein gibi moleküller fizyolojik ve patolojik değişikliklerin tespitinde araştırma hedefi olmuştur. Moleküler çalışmaların hayvan yetiştiriciliği ile ilgili çalışmalara entegrasyonu sayesinde çiftlik hayvanlarında verim, kalite ve sağlık ile ilişkili biyobelirteç arayışları hız kazanmıştır. Önceleri kan grupları, DNA, mRNA ve farklı proteinler potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilse de verim, kalite ve hastalık ile ilişkili bu moleküllerin biyobelirteç olarak kullanımında başarı oranları sınırlı olmuştur. Hayvan türlerinde kan gruplarının çok sayıda olması, birden fazla özellikle ilişkilendirilememeleri, DNA düzeyindeki biyobelirteçlerin farklı popülasyon ve çevre şartlarında geçerli olmamaları, mRNA'ların ise uygulanabilirlik ve tekrarlanabilirliklerindeki zorluklar ve proteinlerin kompleks yapıları gibi sınırlayıcı faktörleri bulunmaktadır (Özkan ve Yakan 2018, Antanaitis ve ark. 2021).

Kodlama yapmayan RNA'lar sınıfında kategorize edilen miRNA'lar 18-24 nükleotid uzunluğunda ve türler arasında yüksek oranda korunan RNA molekülleridir. Bu moleküller vücut sıvılarında yüksek oranda stabilite gösterebilme, hücreler arası iletişimde rol oynayabilme, hücre dışı ortama aktif salınabilme özellikleri gösterir. Hastalık, enfeksiyon gibi anormal durumlarda ya da değişen fizyolojik durumlarda farklı seviyelerde eksprese olabilmeleri ile birçok fizyolojik ve patolojik durumun değerlendirilmesinde potansiyel biyobelirteç özelliği taşımaktadır. Gelişen moleküler biyoloji teknolojisi ile miRNA'larla ilgili çalışmaların yapılabilmesi görece daha kolay hale gelmiştir. Bu özellikler farklı biyolojik fonksiyonların anlaşılması ve düzenlenmesinde miRNA'ları potansiyel biyobelirteçler yapmaktadır (O'Brien ve ark. 2018, Do ve ark. 2021).

2.3. MikroRNA: Biyogenezi ve Biyobelirteç Potansiyeli

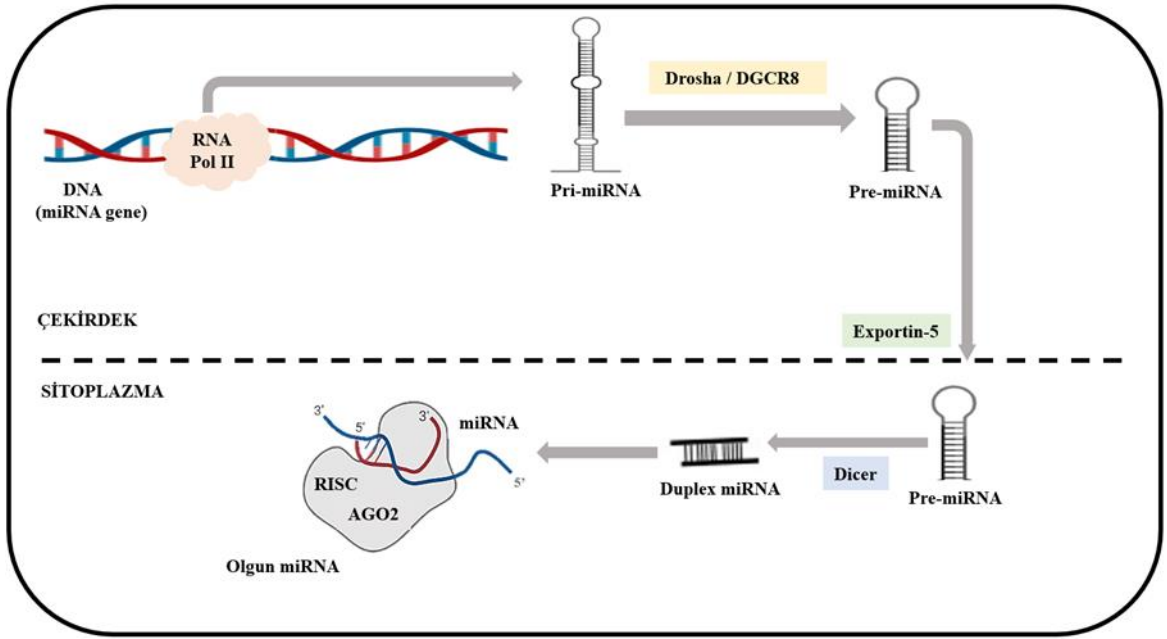
MikroRNA'lar ilk olarak 1993 yılında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) üzerinde yapılan çalışmalar ile tanımlanmıştır (Lee ve ark 1993). İlgili çalışmada *C. elegans*'ta lin-4 olarak isimlendirilen 22 nükleotid uzunluğundaki bir genin protein kodlamadığı ve lin-14 isimli mRNA'ya bağlanarak bu mRNA'nın ifadesinin azalmasını sağladığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar miRNA'ların endojen genlerden transkripte olduğunu ve yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluklarında olduklarını ortaya çıkarmıştır.

Bu RNA'lar türler arasında yüksek oranda korunmuş moleküller olup kodlamayan RNA'lar sınıfında kategorize edilmektedir (Lee ve ark. 1993, Do ve ark. 2021). Homeostazi ile ilişkili hücre farklılaşması, apoptoz, otofaji ve ferroptoz gibi birçok hücresel süreçte görev alan miRNA'lar gen ifadesini, mRNA'ların 3' UTR (3' Untranslated Region) bölgesine bağlanarak düzenlemektedir. Bu bölge ile ilgili miRNA'nın eşleşmesi sonucunda hedef genin ifadesinde baskılanma şekillenmektedir (Kok ve ark. 2018).

Belirli kurallar çerçevesinde isimlendirilen miRNA'lar ait oldukları türün ilk üç harfini ön ek şeklinde alarak isimlendirilirler. Olgun ve öncü miRNA'ların da ayırt edici bir isimlendirme kuralı bulunmaktadır. Öncü miRNA'lar "mir" şeklinde isimlendirilirken (Örneğin mir-183), olgun miRNA'lar "miR" şeklinde isimlendirilir (Örneğin miR-183). Ayrıca, aynı ailenin farklı üyelerinin birbirinden ayırt edilebilmesi için miRNA'lar miR-XXX-a ve miR-XXX-b şeklinde sonda bir harf kullanılarak isimlendirilirler. Bununla birlikte miRNA'lar köken aldıkları uçlara göre de isimlendirilmektedir. Bir miRNA 5' uçtan köken alıyor ise miR-XXX-5p olarak isimlendirilirken, 3' uçtan oluşan miRNA'lar miR-XXX-3p olarak isimlendirilir (Ambros ve ark. 2003).

Gen ifadesinin düzenleyicileri olarak görev yapan miRNA'ların sentezi çekirdek içerisinde ve sitoplazmada olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Çekirdekte Drosha (RNaz III enzimi) ve sitoplazmada Dicer isimli enzimler miRNA öncülerinin parçalanmasında görev alan enzimlerdir. miRNA'ların sentezinin birinci aşaması çekirdek içerisinde RNA polimeraz II aracılığıyla DNA'nın transkripsiyonu ile başlar. DNA'nın transkripsiyonu sonucu saç tokası yapısında ve olgun miRNA dizisini içeren uzun öncül pri-miRNA oluşur.

Oluşan pri-miRNA çekirdek içerisinde Drosha ve onun kofaktörü olan DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8) (Pasha)'ın oluşturduğu kompleks tarafından kesilerek 60-70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA (prekürsör miRNA) haline dönüşür. Pre-miRNA, Exportin-5 adlı taşıyıcı bir protein ile çekirdekten sitoplazmaya taşınır. miRNA sentezinin ikinci aşamasında sitoplazmaya taşınan pre-miRNA'lar ribonükleaz enzimi olan Dicer tarafından yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda kısa çift iplikli dupleks miRNA'lara kesilir. Oluşan dupleks miRNA'lar olgun miRNA dizilerine dönüştürülmek üzere RNA indüklenmiş susturma kompleksinde (RISC) Argonaute (Argonat)'a yüklenerek matür (olgun) formuna dönüşür (Kok ve ark. 2018, Do ve ark. 2021) (Şekil 2.3.1).



Şekil 2.3.1. MikroRNA Biyogenezisi

miRNA'lar birçok doku ve organda bulunur. Ayrıca Argonat proteinlerine bağlanarak yüksek yoğunluklu lipoprotein parçacıkları, eksozomlar ve mikro partiküller tarafından kapsüllenebiliyor olması ile miRNA'lar ekstraselüler ortamda bozulmadan ve kararlı şekilde bulunabilmektedir. Bu durum miRNA'ların kan, idrar ve süt gibi nispeten kolay erişilebilir biyolojik sıvılarda çeşitli fizyolojik ve patolojik durumların tespitinde biyobelirteç olarak kullanım potansiyellerini artırmaktadır (Kok ve ark. 2018, Do ve ark. 2021).

Kan, tükürük, idrar gibi çeşitli vücut sıvılarında bulunduğu bilinen miRNA'ların sütte de bulunduğu bilinmektedir (Do ve ark. 2021). Sütte bulunan miRNA'ların asidik ortamlara, RNaz sindirimine, sıcaklığa ve çoklu donma/çözünme döngülerine karşı dirençli ve kararlı olduğu bildirilmektedir (Lai ve ark. 2017). Sütte bulunan miRNA'ların kararlı ve dirençli yapıları subklinik meme enfeksiyonlarının teşhisinde de biyobelirteç olma potansiyellerinin olduğunu ve süt kalitesinin tespitinde kullanılabileceklerini düşündürmektedir (Cai ve ark. 2018).

Yaygın ve güvenilir olarak kullanılan miRBase veri tabanı verilerine göre sığırlarda tanımlanmış olan olgun miRNA sayısının 1000'in üzerinde olduğu bilinmektedir (miRBase 2024). Yapılan bu tez çalışmasında gerek sığır gerekse diğer memelilerde çalışılan ve süt kalitesi ile meme fizyolojisi üzerinde etkili olabileceği değerlendirilen miR-27a-3p, miR-29B-2, miR-142-5p ve miR-148a isimli miRNA'ların sütteki SHS'ye göre ekspresyon

seviyeleri araştırılmıştır. Ayrıca bu miRNA'ların SHS ve bazı süt kalite parametreleri ile olan ilişkileri incelenmiştir. İlgili miRNA'lar hakkında literatür bilgi aşağıda sunulmuştur.

2.3.1. miR-27a-3p

Birçok tür arasında yüksek oranda korunan ve miR-27 gen ailesinin üyelerinden olan miR-27a-3p karbonhidrat, yağ ve protein sentezi ile ilişkili birçok yolağın düzenlenmesinde rol almaktadır (Luo ve ark. 2020). Ayrıca 20 bazdan oluşan bu miRNA'nın farklı hücre tiplerinde inflamasyon, apoptoz ve hücre proliferasyonu gibi yolaklarda da görevli olduğu tespit edilmiştir (Miretti ve ark. 2013, Luo ve ark. 2020). Yapılan araştırmalar önemli birçok yolakta görev alan miR-27a-3p'nin osteojenik genlerin ekspresyon seviyelerine olan etkileriyle osteoporoz tedavisinde rol oynayabileceğini göstermektedir (Fu ve ark. 2019, Ren ve ark. 2021). Yapılan bir çalışmada sığır meme epitel hücrelerinde miR-27a-3p'nin peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) gibi genlerin aktivitelerini etkileyerek triaçilgliserol sentezi üzerinden lipid metabolizmasında düzenleyici rol oynadığını göstermiştir (Wang ve ark. 2021). İneklerde yapılan çalışmalar PPARG'nın yanı sıra carnitine palmitoyltransferase 1B (CPT1B) ve retinoid x receptor alpha (RXR α) gibi genlerin de miR-27a-3p'nin hedef genleri olduğunu ve bu genler üzerinden enerji metabolizmasını kontrol ettiğini göstermiştir (Lin ve ark. 2013, Li ve ark. 2022). Yapılan bu çalışmada miR-27a-3p'nin SHS'ye göre oluşturulan gruplarda ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ve bu miRNA'nın süt kalite parametreleri ile olan ilişkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2.3.2. miR-29B-2

miR-29 ailesinin (miR-29a, miR-29B-1, miR-29B-2 ve miR-29c) bir üyesi olan miR-29B-2 hücre içerisinde daha çok çekirdekte lokalize olan ve 22 bazdan oluşan bir miRNA'dır. Bu ailenin üyeleri apoptoz, metastaz, hücre döngüsü, hücre yaşlanması, hücre farklılaşması ve hücre çoğalması gibi birçok hücresel süreçte önemli düzenleyici roller üstlenmektedir (Horita ve ark. 2021). Sığırlarda yapılan bazı çalışmalarda üreme ile ilgili süreçlerde görev aldığı tespit edilen miR-29B-2'nin sığırlarda sütte ve kolostrumda da ifade edildiği bildirilmektedir (Xu ve ark. 2018, Melnik ve Schmitz 2017). Sığırlarda mastitis

teşhisinde miRNA'ların potansiyel rollerinin araştırıldığı bir çalışmada miR-29B-2'nin sütte meydana gelen enfeksiyonun belirlenmesinde biyobelirteç olma potansiyeli taşıdığını bildirmektedir (Srikok ve ark. 2020). Türler arasında yüksek homoloji gösteren bu miRNA'nın sığırlarda yapılan başka bir çalışmada süt verimini etkileyebilecek yolların düzenlenmesinde de rol aldığı bildirilmektedir. (Bian ve ark. 2015). miR-29B-2'nin görev aldığı moleküler yollar göz önünde bulundurulduğunda sığırlarda yüksek SHS'li sütteki ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinin önemli olabileceği düşünülmüştür.

2.3.3. miR-142-5p

miR-142-5p, 20 bazdan oluşan ve miR-142 ailesinin üyelerinden olan bir miRNA'dır. Yapılan çalışmalar bu ailenin üyeleri olan miR-142-3p ve miR-142-5p'nin birçok fizyolojik süreçte rol oynadıklarını ortaya koymuştur (Salilew-Wondim ve ark. 2014, Sun ve ark. 2015, Mobuchon ve ark. 2017). Yao ve ark. (2019) miR-142-5p'nin inflamasyon yolağında görevli bazı genlerin aktivitelerini düzenlediğini bu yüzden çeşitli patolojik durumlar için biyobelirteç olabileceğini belirtmiştir. Yapılan bir çalışmada sığırlarda sütteki SHS'nin 200.000 hücre/ml'den az olması durumunda sütteki miR-142-5p seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (Stefanon ve ark. 2023). Farelerde yapılan bazı araştırmalarda miR-142-5p'nin adipogenezde rol aldığı ortaya konulmuştur (Chartoumpekis ve ark. 2012). Sığırlarda yapılan başka bir çalışmada ise miR-142-5p'nin inflamasyon yolağının regülasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Tzelos ve ark. 2022). Süt sığırlarında farklı rasyon uygulamalarının araştırıldığı bir çalışmada miR-142-5p aktivitesinin rasyon içeriğinden etkilendiği ve enerji metabolizması ile ilişkili olabileceği tespit edilmiştir (Mobuchon ve ark. 2017). Yapılan bu çalışmada ise hem sütteki SHS hem de süt kompozisyon parametreleri ile miR-142-5p arasındaki ilişkilerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

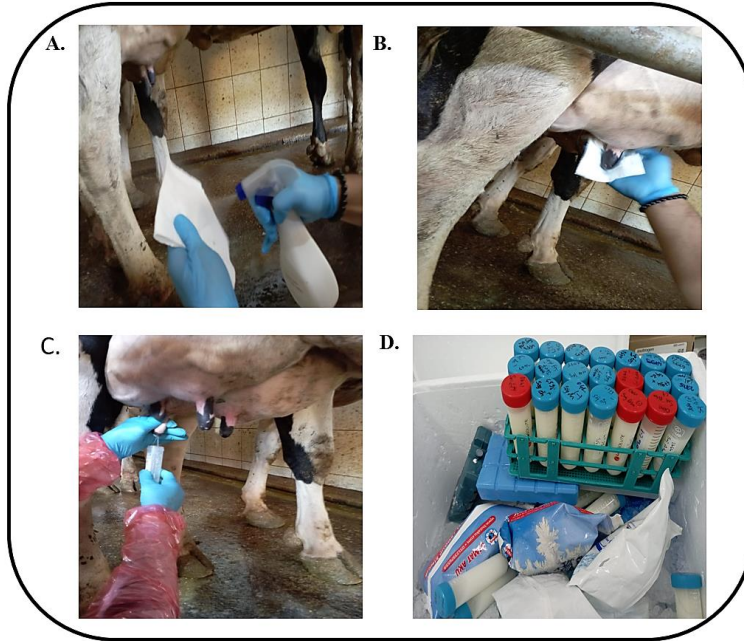
2.3.4. miR-148a

Hayvan yetiştiriciliğinde yapılan uygulamaların moleküler düzeydeki etkilerini inceleyen çalışmalar artmıştır. Çiftlik hayvanlarında yapılan çalışmalar da miR-148a'nın sütte diğer miRNA'lara kıyasla sütte daha çok miktarda bulunduğunu belirtilmiştir (Cai ve ark. 2018, Iqbal ve ark. 2022). Bu miRNA türler arasında yüksek oranda korunmuş, ruminantlarda PPAR'lar gibi yağ asidi metabolizması ile ilişkili yollar üzerinden sütteki yağ oranı ve yağ asidi profilinin düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir (Chen ve ark. 2017, Iqbal ve ark. 2022). Yapılan bir çalışmada sığırlarda meme bezi gelişimi ile sütteki protein oranlarının miR-148a ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Muroya ve ark. 2016). Meme bezinde yoğun olarak ifade edilen miR-148a, vücudun enfeksiyon sürecinde vermiş olduğu inflamatuvar yanıt sürecinde ve adipogenez gibi süreçlerin yanı sıra laktasyon sürecinde çok sayıda genin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Chen ve ark. 2017, Okumura ve ark. 2021, Li ve ark. 2022). Bu bağlamda çalışmada sığır sütünde SHS'ye bağlı aktivitesi araştırılan bu miRNA'nın süt kompozisyon parametreleri ile olan ilişkilerinin belirlenmesinin önemli olabileceği değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması ve CMT (California Mastitis Test) Uygulaması

Bu çalışmanın hayvan materyalini Kayseri ilinde 200 baştan fazla sağmal ineği olan özel bir işletmede bulunan orta laktasyon dönemindeki Holştayn ırkı inekler oluşturmıştır. Hayvanlardan örnek alımı öncesi dört meme lobu %70'lik etil alkol kullanılarak temizlenmiş ve tek kullanımlık kâğıt havlular ile silinmiştir (Şekil 3.1.1). California Mastitis Test uygulaması, hayvanlardan ilk sıkım süt dışarı atıldıktan sonra alınan 2 ml süt örneği ve her birinin üzerine eşit miktarda CMT solüsyonu eklenerek yapılmıştır. Süt örneği ve CMT solüsyonu eklenen CMT kabı dairesel hareketlerle çalkalanarak süt ve CMT solüsyonunun karışması sağlanmıştır. Süt örneği ile karışan CMT solüsyonu akışkanlık durumuna bakılarak CMT sonuçları yorumlanmıştır (Tablo 3.1.1).

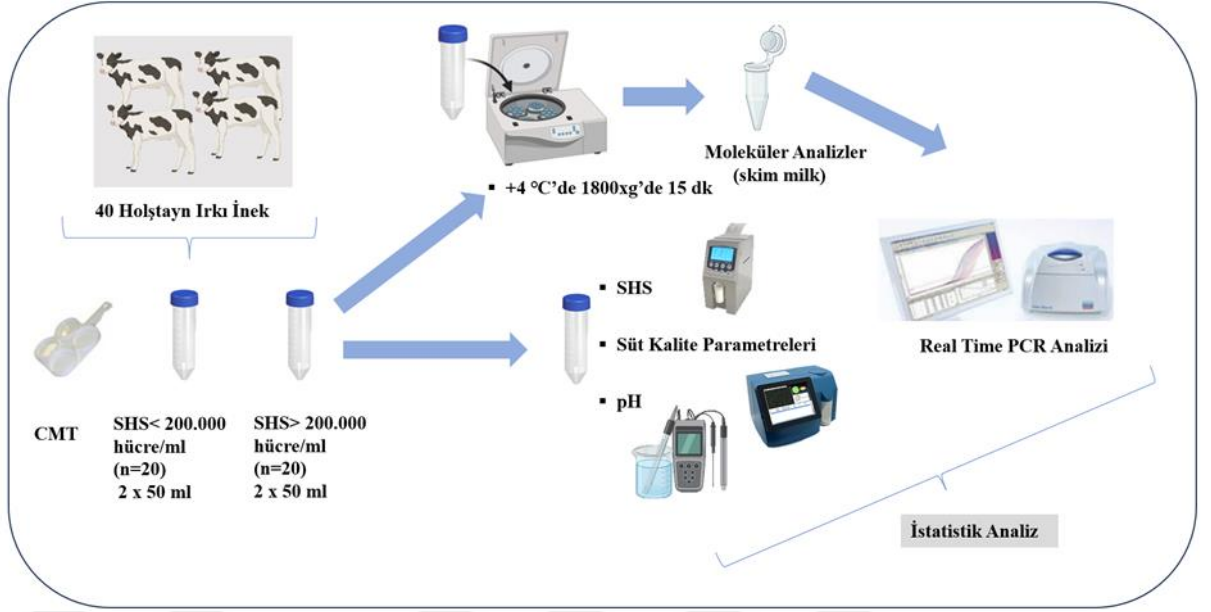


Şekil 3.1.1. A. Meme Loblarının %70'lik Alkol ile Temizlenmesi, **B.** Meme Loblarının Tek Kullanımlık Kâğıt Havlular ile Silinmesi, **C.** Örneklerin Toplanması, **D.** Toplanan Örneklerin Soğuk Zincirde Muhafaza Edilmesi

Tablo 3.1.1. Somatik Hücre Sayısının Jel Kıvamına Göre Yorumlanan CMT Skoru

CMT SKORU	ORTALAMA SHS ARALIĞI (Hücre/ml)	JEL KIVAMI
Negatif	0-200.000	Kıvamlaşma Görülmez
Şüpheli	200.000-400.000	Hafif Kıvamlaşma Görülür
+1	400.000-1. 200.000	Düşük Düzeyde Kıvamlaşma Görülür
+2	1. 200.000-5. 000.000	Orta Düzeyde Kıvamlaşma Görülür
+3	>5. 000.000	Yoğun Düzeyde Kıvamlaşma Görülür

Sabah sağımı öncesi alınan süt örnekleriyle SHS'si 200.000 hücre/ml altı (n=20) ve üstü (n=20) iki grup oluşturulmuştur. Hayvanlardan 100'er ml süt örneği (2 x 50 ml falkon) steril şartlar altında toplanmıştır. Alınan süt örneklerinin muhafaza edildiği falkonlardan biri SHS, pH ve temel süt kalite parametrelerinin (protein, laktoz, yağ, YKM, elektrik iletkenliği ve donma noktası) tespiti için kullanılmıştır. Diğerleri ise moleküler analizler (miRNA seviyelerinin tespiti) için kullanılmıştır (Şekil 3.1.2). Toplanan süt örneklerinin SHS ve pH değerleri zaman kaybetmeden ölçülmüştür. Daha sonra örnekler temel süt kalite parametrelerinin tespiti ve moleküler analizler için soğuk zincirde laboratuvara nakledilmiştir.



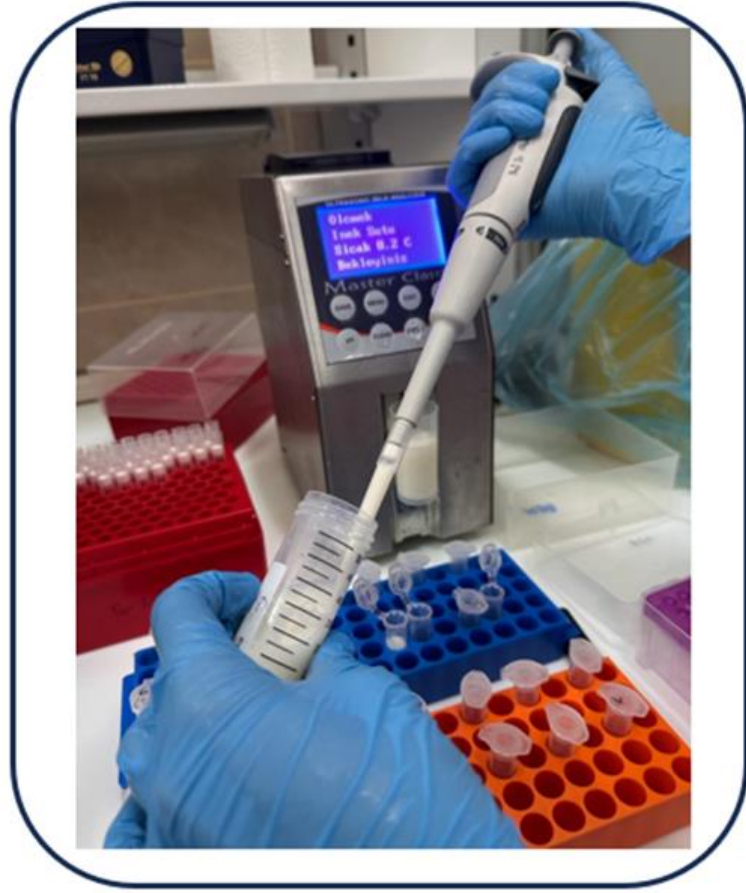
Şekil 3.1.2. Saha ve Laboratuvar İş Akışı

Çalışmanın pH ölçümü pH metre cihazı (Hanna pH metre, HI83141, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümlere başlamadan önce cihazın kalibrasyonu yapılmıştır. Ölçümler örneklerden alınan ve homojen olduğuna emin olunan 10 ml süt örneğine cihazın elektrot çubuğu daldırılarak yapılmıştır. Her bir örneğin ölçümü sonrasında elektrotlar saf su ile yıkanmıştır ve cihazın kullanım talimatına uygun olarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada toplanılan süt örneklerinin somatik hücre sayımı, somatik hücre sayım cihazı (Lactoscan SCC 6010, Bulgaristan) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Cihazın gereken kalibrasyon işlemleri yapıldıktan sonra SHS ölçüm kiti içinde bulunan ve boyalı gelen ependorfun içine örneklerden alınan 100 µl eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra homojen şekilde karışan örneklerden 8 µl alınmıştır ve ölçüm yapması için cihaz kartuşuna yüklenmiştir. Ölçümler yapılarak somatik hücre sayıları tespit edilmiştir.

3.2. Temel Süt Kalite Parametrelerinin Ölçümü

Sütün bileşenleri olan ve süt kalitesinden de sorumlu olduğu bilinen yağ (%), protein (%), laktoz (%), yağsız kuru madde (%), donma noktası ve iletkenlik (µS/cm) değerlerinin ölçümü Milkotester Master Classic M2 P1 (Bulgaristan) cihazı ile her bir örnekten birer kez ölçüm yapılarak tespit edilmiş ve kaydedilmiştir (Şekil 3.2.1).



Şekil 3.2.1. Milkotester Master Classic M2 P1 (Bulgaristan) cihazı ile süt bileşenlerinin ölçümü

3.3. Total RNA İzolasyonu

Laboratuvara nakledilen süt örnekleri +4 °C’de 3000 xg’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası örneklerin -20 °C’de 10 dakika süreyle bekletilmesi ile oluşan krema tabakası spatül yardımı ile steril bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Krema tabakasının altında kalan ara-faz (skim milk tabakası) somatik hücrelere değmeden alınarak -80 °C’de muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu -80 °C’de muhafaza edilen skim milk örneklerinden modifiye edilmiş Trizol yöntemine göre yapılmıştır (Rio ve ark. 2010, Özkan ve ark. 2024). Bu amaçla, 1000 µl Trizol (ThermoFisher, ABD, Kat. no: 15596018) üzerine 250 µl hacminde skim milk örnekleri eklenmiştir. Skim milk ile trizol vortekslenerek homojenize edilmiş ve örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında örneklerin üzerine 200 µl kloroform eklenerek alt üst edilip, oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Ardından +4 °C’de 12.000 xg’de 15 dakika santrifüj ile faz ayrımı sağlanmıştır. Oluşan aköz faz

önceden etiketlenmiş steril ependorf tüplere alınıp üzerine 400 µl izopropil alkol eklenerek alt üst edilmiştir. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler +4 °C'de 12.000 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant faz uzaklaştırılarak örnekler üzerine 1000 µl %75'lik etil alkol ilave edilmiştir. Sonrasında +4 °C'de 7.500 xg'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılarak örnekler laminer flow kabini içerisinde oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. RNA pelletleri 15 µl nükleaz içermeyen su ile sulandırılarak nükleik asit ölçerde (Merinton-SMA 1000, Çin) saflık ve konsantrasyon bakımından değerlendirilmiştir. Saflık ve konsantrasyon bakımından uygun olmayan örneklerde RNA izolasyonu tekrarlanmıştır.

3.4. Poliadenilasyon ve cDNA Sentezi

İzolasyon sonrası elde edilen Total RNA içerisinde bulunan miRNA'lara Poly(A) kuyruğu bağlanması Poly(A) Polymerase kiti (ABM, Kanada, Kat. no: E017) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 500 ng RNA üzerine, 5 µl 5x Poly(A) Polymerase Yeast Reaction Buffer, 2,5 µl MnCl₂ (25 mM) 1,25 µl ATP (adenozin trifosfat) (10 mM), 1 µl Poly(A) Polymerase Yeast (1 U/µl), 0,3 µM RNA) eklenerek toplam 25 µl hacim olacak şekilde soğuk blok üzerinde nükleaz içermeyen su ile sulandırılmıştır. Karışım hazırlandıktan sonra kısaca santrifüj edilip 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Poly(A) aktivitesinin durdurulması 65 °C'de 20 dakika inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Poly(A) kuyruğu eklenmiş miRNA'lardan cDNA sentezi, OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti (ABM, Kanada, Kat. no: G236) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 10 µl Poly(A) eklenmiş örnekler 4 µl 5x RT Buffer, 1 µl dNTP, 1 µl oligo(dT) primer ve 1 µl RTase enzimi eklenmiştir. Ardından nükleaz içermeyen su ile toplam hacim 20 µl'ye ayarlanmıştır. cDNA sentezi, 50 °C'de 15 dakika inkübasyon süresi ile gerçekleştirilmiş ve ardından 85 °C'de 5 dakika inkübasyon ile reaksiyon durdurulmuştur. Elde edilen cDNA'lar 10 kat sulandırılarak qPCR reaksiyonuna kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.5. Real Time PCR Uygulamaları

Hedef miRNA'ların amplifikasyonu Real Time PCR (Rotor Gene Q MDx 5plex HRM, Qiagen, ABD) cihazı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon için SYBR Green I boya içeren kit (Power SYBR Green PCR Master, Thermo Fisher Scientific, ABD, Kat No: 4368702) kullanılmış ve her örnek duplike olarak çalışılmıştır. Reaksiyon 95 °C'de 10 dk denatürasyonu takiben 50 kez tekrarlanan 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 30 saniyelik aşamalardan oluşacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerde hedef miRNA'ların seviyelerinin belirlenmesinde housekeeping olarak U6 kullanılmıştır. Primerlerin tasarımı için miRbase veri tabanı (www.mirbase.org) referans alınmıştır.

Çizelge 3.5.1. Amplifikasyonu Yapılan Nükleik Asitlerin Primer Dizileri

RNA	Primer	AD (°C)
Bta-miR-27a-3p	5'-TTCACAGTGGCTAAGTTCCG-3'	63.20
Bta-miR-29b-2	5'-TAGCACCATTGAAATCAGTGT-3'	57.00
Bta-miR-142-5p	5'-CATAAAGTAGAAAGCACTAC-3'	55.00
Bta-miR-148a	5'-TCAGTGCACTACAGAACTTTGT-3'	57.50
U6	5'-GCAGGGGCCATGCTAATCTTCTCTGTATCG-3'	57.50

AD: Annealing derecesi

3.6.İstatiksel Analizler

Çalışma öncesinde gerekli minimum örneklem büyüklüğünün belirlenmesi için literatür taraması yapılarak ve tip 1 hata olasılığı (α) = 0.05, güç (1- β) = 0.80 kriterleri kullanılarak, süt kalite parametrelerinin gruplar arasındaki farklılığının ve süt kalite parametreleri ile belirlenen miRNA seviyeleri arasındaki ilişkilerin değerlendirildiği araştırma düzeninde etki büyüklüğü (d)=0.91 kabul edilmek üzere, toplamda minimum 40 baş inekten alınan süt örneğinin çalışmada yer almasının uygun olacağı hesaplanmıştır. Güç analizinin yapılmasında PASS 11 ve G*Power Version 3.1.9.2 istatistik programlarından yararlanılmıştır. Gen ekspresyon sonuçları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemiyle belirlenerek kat değişimi olarak belirlenmiştir.

Elde edilecek değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce, normallik yönünden Shapiro Wilk testi, varyansların homojenliği yönünden Levene testi ile incelenmiştir. Çalışmada, ölçülen süt kalite parametrelerinin gruplar arasındaki farklılığının araştırılmasında varsayımları sağlayan değişkenler için iki ortalama arasındaki farkın önem testi (Student t testi) yöntemi, varsayımları sağlamayanlar için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Süt kalite parametreleri ile miRNA seviyeleri arasındaki ilişkinin gücü ve yönü Spearman korelasyon katsayısı ile tespit edilmiştir. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 23.0 istatistik paket programı ile gerçekleştirilmiş, $P < 0.05$ kriteri dikkate alınarak değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Gruplarda Somatik Hücre Sayısı ile Bazı Süt Kalite Parametrelerinin Seviyeleri

Somatik hücre sayısı bulgularına göre oluşturulan gruplarda YSHS grubundaki örneklerin tamamında CMT testinin pozitif olduğu kaydedilmiştir (CMT skoru: 1.91 ± 0.17). Toplanan örneklerin tamamının ortalama SHS değeri yaklaşık 320 bin hücre/ml olarak tespit edilmiştir ($318.05 \pm 44.34 \times 1000$). Bununla birlikte Düşük Somatik Hücre Sayısı (DSHS) grubunda ortalama SHS değeri yaklaşık 60 bin hücre/ml olurken, Yüksek Somatik Hücre Sayısı (YSHS) grubunda yaklaşık 540 bin hücre/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.1).

Çizelge 4.1.1. Örneklerdeki SHS'nin Gruplara Göre Dağılımı (X1000)

Parametre	Grup	Ortalama	Std. Hata	Std. Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum
SHS	DSHS	60.16	12.86	56.07	38.00	12.00	194.00
	YSHS	540.77	41.95	196.77	534.50	210.00	863.00
	DSHS+ YSHS	318.05	44.34	283.93	256.00	12.00	863.00

DSHS: Düşük Somatik Hücre Sayısı grubu, **YSHS:** Yüksek Somatik Hücre Sayısı

Sütte ölçülen protein, laktoz, yağ, YKM, pH ve donma noktası parametrelerinin gruplarda benzer seviyelerde olduğu, elektrik iletkenliği bakımından YSHS grubunun anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P < 0.001$) (Çizelge 4.1.2).

Çizelge 4.1.2. Temel Süt Kalite Parametrelerinin Gruplara Göre Değişim Bulguları

Parametre	DSHS	YSHS	P
Protein (%)	3.33±0.05	3.32±0.03	0.805 ¹
Laktoz (%)	5.02±0.07	5.00±0.04	0.780 ¹
Yağ (%)	2.21±0.35	1.75±0.09	0.714 ²
YKM (%)	9.13±0.13	9.15±0.07	0.896 ¹
pH	6.71±0.02	6.74±0.01	0.142 ¹
Elektrik İletkenliği (µS/cm)	4.68±0.02	4.76±0.02	0.001 ¹
Donma Noktası (%)	-0.58±0.01	-0.58±0,01	0.648 ¹

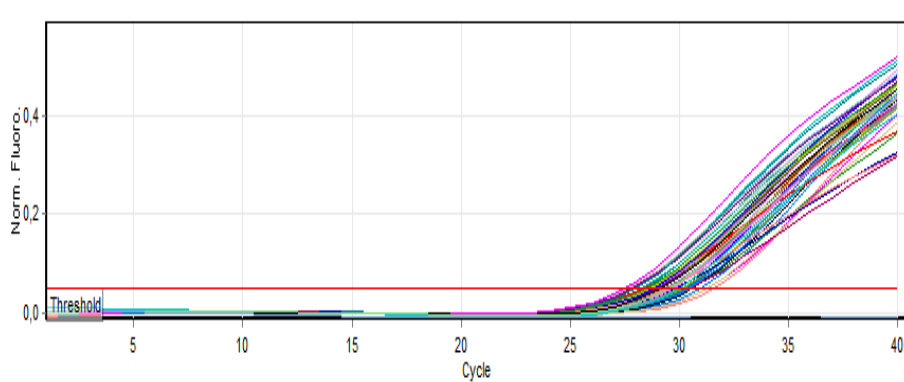
¹: Student t test, ²: Mann-Whitney U test **DSHS:** Düşük Somatik Hücre Sayısı grubu, **YSHS:** Yüksek Somatik Hücre Sayısı, **YKM:** Yağsız Kuru Madde

4.2. Total RNA İzolasyonu Bulguları

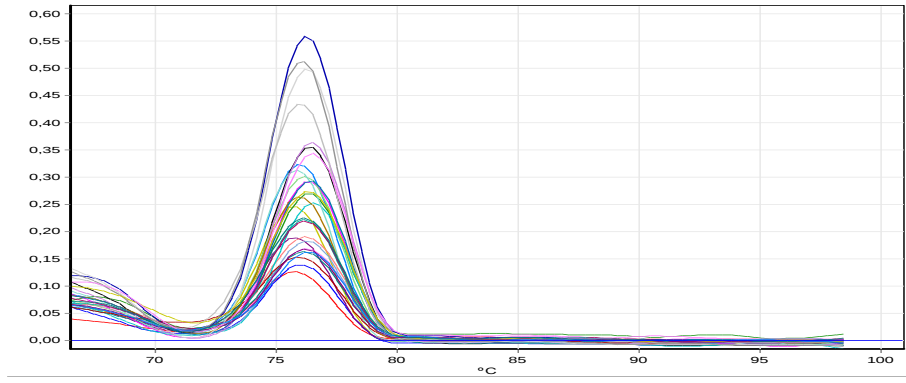
Toplanan örneklerden izole edilen total RNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri bakımından poliadenilasyon, cDNA sentezi ve qPCR uygulamaları için uygun oldukları değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre örneklerdeki nükleik asit konsantrasyonu yaklaşık 150 ng/µl (152.63 ± 17.12) olarak tespit edilirken A_{260} / A_{280} oranlarının >1.80 (1.83 ± 0.03) olduğu belirlenmiştir.

4.3. Real Time PCR Uygulaması Bulguları

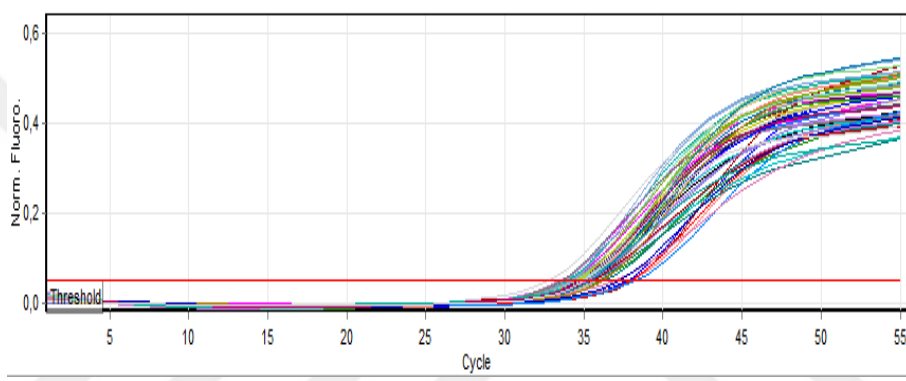
Hedef miRNA'larla housekeeping RNA'nın qPCR'da elde edilen Ct ve erime eğrisi grafikleri Şekil 4.3.1- Şekil 4.3.10'da verilmiştir.



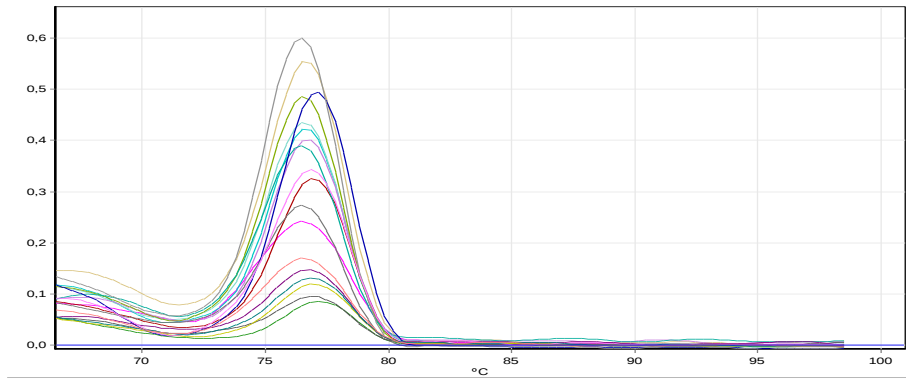
Şekil 4.3.1. Örneklerde miR-27a-3p Ct Grafiği



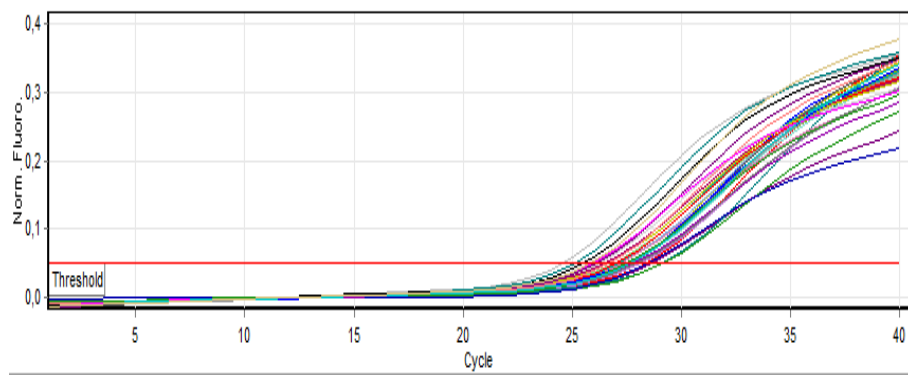
Şekil 4.3.2. Örneklerde miR-27a-3p Erime Eğrisi Grafiği



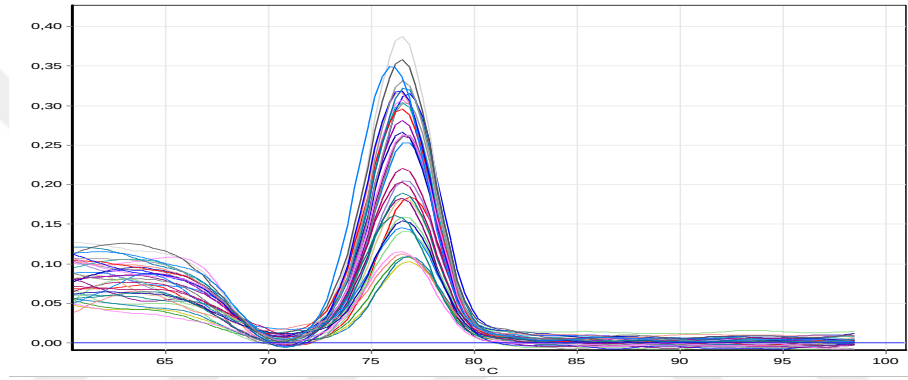
Şekil 4.3.3. Örneklerde miR-29B-2 Ct Grafiği



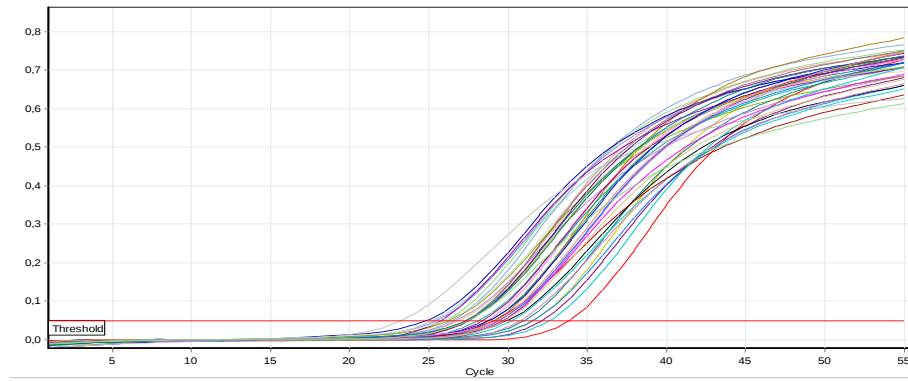
Şekil 4.3.4. Örneklerde miR-29B-2 Erime Eğrisi Grafiği



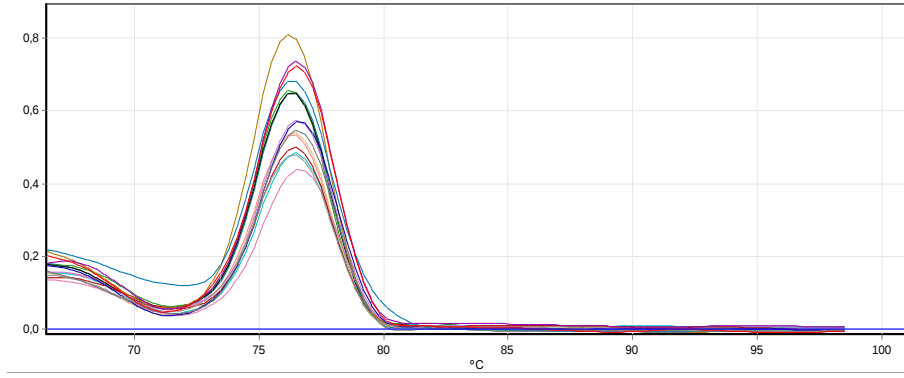
Şekil 4.3.5. Örneklerde miR-142-5p Ct Grafiği



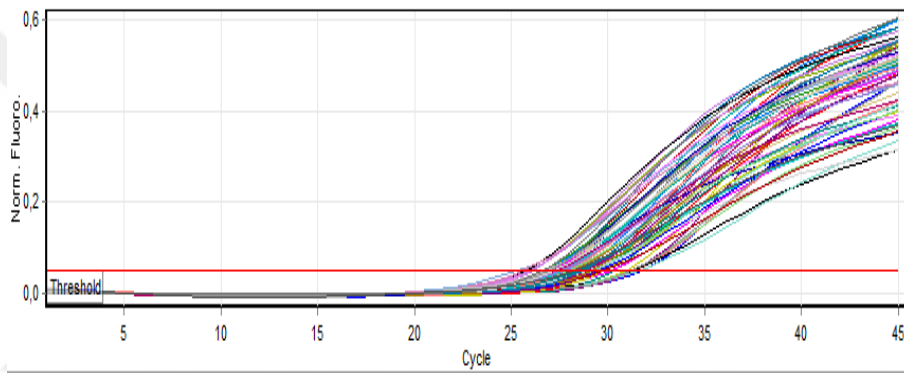
Şekil 4.3.6. Örneklerde miR-142-5p Erime Eğrisi Grafiği



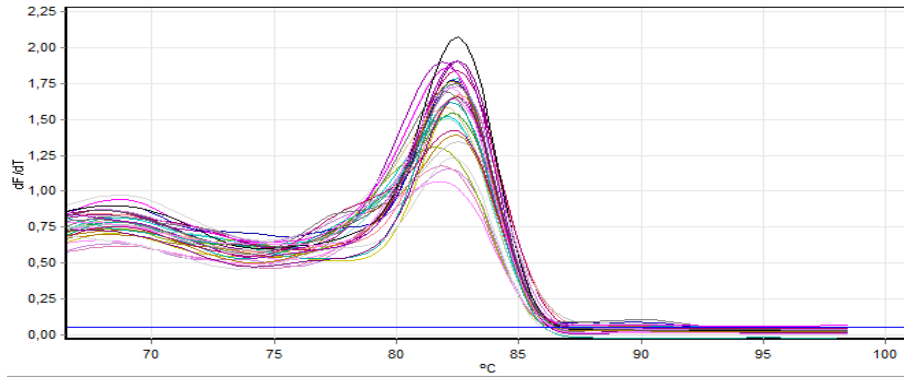
Şekil 4.3.7. Örneklerde miR-148a Ct Grafiği



Şekil 4.3.8. Örneklerde miR-148a Erime Eğrisi Grafiği



Şekil 4.3.9. Örneklerde U6 Ct Grafiği



Şekil 4.3.10. Örneklerde U6 Erime Eğrisi Grafiği

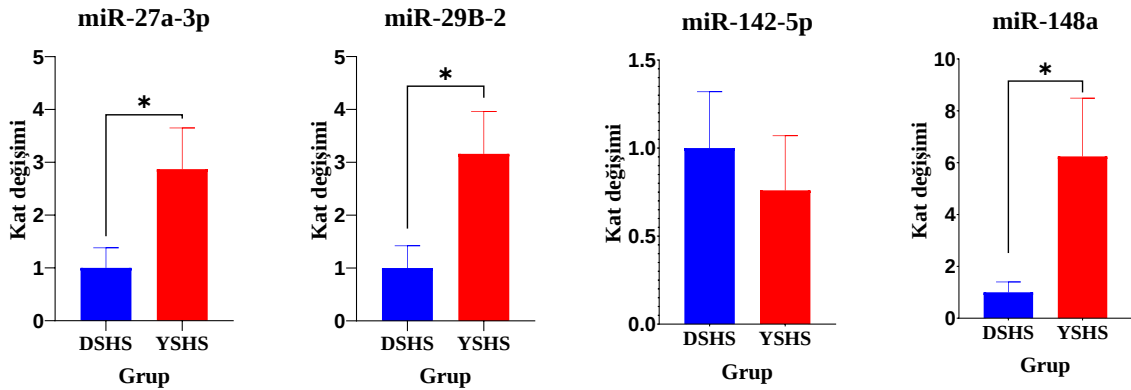
4.4. Gruplardaki miRNA Ekspresyon Seviyeleri

YSHS grubundaki örneklerde miR-27a-3p seviyelerinin DSHS grubuna kıyasla yaklaşık olarak 3 kat daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). Benzer şekilde YSHS grubu miR-29B-2 seviyelerin 3 kattan fazla upregüle olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Gruplardaki miR-142-5p ekspresyon seviyeleri benzer bulunurken, miR-148a seviyelerinin YSHS grubunda DSHS grubuna kıyasla 6 kattan fazla upregüle olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.4.1 ve Şekil 4.4.1).

Çizelge 4.4.1. miRNA Ekspresyon Sonuçları (Ortalama $\pm$ Std. Hata)

miRNA	DSHS	YSHS	P
miR-27a-3p	1.00 $\pm$ 0.38	2.87 $\pm$ 0.78	0.038
miR-29B-2	1.00 $\pm$ 0.42	3.16 $\pm$ 0.80	0.023
miR-142-5p	1.00 $\pm$ 0.32	0.76 $\pm$ 0.31	0.584
miR-148a	1.00 $\pm$ 0.40	6.24 $\pm$ 2.25	0.031

DSHS: Düşük Somatik Hücre Sayısı grubu, YSHS: Yüksek Somatik Hücre Sayısı grubu



Şekil 4.4.1. Örneklerdeki miR-27a-3p, miR-29B-2, miR-148a ve miR-142-5p ve Gen Ekspresyon Seviyeleri DSHS: Düşük Somatik Hücre Sayısı, YSHS: Yüksek Somatik Hücre Sayısı, *: $P<0,05$

Çalışmada gruplarda aktivitesi araştırılan miRNA'lar ile incelenen kompozisyonel parametreler arasında anlamlı korelasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Sütte SHS'ye göre ekspresyon seviyeleri araştırılan miR-27a-3p ile miR-29B-2 ($r: 0.583$; $P<0.001$), miR-148a ($r: 0.629$; $P<0.001$) ve elektrik iletkenliği ($r: 0.316$; $P<0.05$) arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Ayrıca, miR-29B-2 ve miR-148a ($r: 0.605$; $P<0.001$), SHS ($r: 0.366$; $P<0.05$), yağ

(r : 0.319; $P < 0.05$) ve elektrik iletkenliği (r : 0.390; $P < 0.05$) parametreleri arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Sütteki miR-142-5p aktivitesinin sût proteini ile negatif korele olduğu (r : -0.311; $P < 0.05$), miR-148a ile SHS'nin ise pozitif korele olduğu tespit edilmiştir (r : 0.441; $P < 0.01$). Temel kompozisyonel parametreler arasında da anlamlı pozitif ve negatif korelasyon tespit edilmiş ve korelasyon bulguları Çizelge 4.4.2'de sunulmuştur.



Çizelge 4.4.2. İncelenen Parametreler ve miRNA'lar Arasındaki Korelasyon Bulguları

	miR-27a-3p	miR-29B-2	miR-142-5p	miR-148a	SHS	pH	Yağ	YKM	Protein	Laktoz	DN	Eİ
miR-27a-3p	1	0,583***	0,122	0,629***	0,275	-0,125	0,188	-0,144	-0,162	-0,198	0,169	0,316*
miR-29B-2		1	0,100	0,605***	0,366*	0,057	0,319*	-0,203	-0,235	-0,243	0,207	0,390*
miR-142-5p			1	-0,060	-0,252	0,001	0,158	-0,236	-0,311*	-0,282	0,212	-0,205
miR-148a				1	0,441**	0,216	0,172	0,082	0,028	0,042	-0,077	0,308
SHS					1	0,233	0,117	-0,261	-0,268	-0,308	0,256	0,637***
pH						1	-0,213	0,336*	0,269	0,327*	-0,342*	0,076
Yağ							1	-0,337*	-0,339*	-0,364*	0,229	0,011
YKM								1	0,975***	0,985***	-0,982***	-0,157
Protein									1	0,974***	-0,955***	-0,162
Laktoz										1	-0,966***	-0,160
DN											1	0,149
Eİ												1

SHS: Somatik Hücre Sayısı ; YKM: Yağsız Kuru Madde ; DN: Donma Noktası; Eİ: Elektrik İletkenliği; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001

5. TARTIŞMA

Süt, hayvancılık endüstrisinin önde gelen ürünlerindendir. Dünyada üretilen sütün çok büyük bir kısmı sığır yetiştiriciliğinden sağlanmaktadır (Çoban ve Tüzemen 2007, FAO 2024). İnek sütü besleyici değeri, kompozisyonel yapısı ve süt ürünlerinin üretiminde temel ham madde oluşu gibi sebeplerden dolayı önemli bir hayvansal üründür. Kaliteli ve sağlıklı süt üretimi için seleksiyon ve yetiştiricilik uygulamaları ile süt sığırı yetiştiriciliğinde önemli ilerlemeler sağlanmıştır (Özkan ve Yakan 2017).

Süt sığırı yetiştiriciliğinde sık rastlanan mastitis, verim ve kalite kaybıyla karakterize önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (Özkan ve ark. 2024). Klinik mastitis teşhisi kolay bir mastitis formu olmasına rağmen süt sığırı yetiştiriciliğinde sık rastlanan subklinik mastitis klinik belirti göstermediği için tespit edilmesi kolay değildir ve sütte kalite kaybına yol açabilmektedir. Hayvan sağlığı ve yetiştiricilik ekonomisi için önemli olumsuz etkileri olan subklinik mastitis gibi hastalıkların izlenmesinde ve kontrolünde sütte doğal olarak bulunan somatik hücrelerle ilişkili CMT uygulaması ve sütte doğrudan SHS'nin tespiti gibi uygulamalar önerilmektedir (Garcia ve ark. 2023).

Sütte bulunan somatik hücreler, epitel hücreler ve lökositlerden oluşmaktadır. Meme dokusundaki herhangi bir inflamasyon durumu lökositlerin artışına bağlı olarak sütteki SHS'nin artışına yol açmaktadır. Dolayısıyla sütteki SHS meme sağlığı ve süt kalitesinin değerlendirilmesi bakımından önemlidir (Balemi ve ark. 2021). Sağlıklı inek sütünde SHS'nin ülkelere göre değişiklik gösterdiği bilinmekle birlikte 200.000 hücre/ml ve altında olması gerektiği önerilmektedir. Bununla birlikte Türkiye'de izin verilen sınırın 500.000 hücre/ml olduğu belirtilmektedir (Bulca ve ark. 2016). Bu çalışmada CMT pozitif ve SHS skoru 200.000 hücre/ml'den yüksek olan süt örneklerinde kompozisyonel parametrelerle bazı miRNA'ların aktivitesi araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında SHS'ye göre oluşturulan gruplardan DSHS grubunda SHS'nin yaklaşık 60.000 hücre/ml olduğu bununla birlikte YSHS grubunda yaklaşık 540.000 hücre/ml olduğu belirlenmiştir. Bu gruplarda süt proteininin benzer oranlarda olduğu tespit edilmiştir. Bilindiği gibi esansiyel aminoasit içeriği, kazeinler ve peynir altı süt fraksiyonları ile süt proteinleri süt kalitesinin oluşumunda önde gelen kompozisyonel parametrelerdendir (Özek 2015, Kazimierska ve Kalinowska-Lis 2021). Mastitis sonucu süt protein oranının ve

içeriğinin olumsuz yönde etkilendiği bildirilse de bu çalışmada gruplarda belirlenen süt proteini oranları DSHS grubundaki ineklerin sütünde bulunan protein oranına benzer seviyelerde bulunmuştur (Tiantong ve ark. 2023). İnek sütünde CMT ve SHS uygulamaları mastitis şüphesinin değerlendirilmesinde kullanılsa da bu uygulamaların meme sağlığı ve süt kalitesinin tespitinde yeterli parametreler olamayacağı değerlendirilmiştir (Alkan ve ark. 2014, Özkan ve ark. 2024). Çalışmada gruplarda süt proteini gibi süt yağı, laktoz ve yağsız kuru madde oranlarının da benzer seviyelerde oldukları belirlenmiştir.

Süt yağı, süt kalitesinin değerlendirilmesinde ve sütün fiyatlandırılmasında ön planda olmakla birlikte bu çalışmada her iki gruptaki süt yağı oranlarının benzer ancak sağlıklı normal inek sütündeki yağ oranından düşük olduğu değerlendirilmiştir. Süt yağı oranı genetik ve çevre şartlarının etkisi altında şekillenmektedir (Özek 2015). Süt yağı oranının işletmeden alınan örneklerde beklenilenden düşük olma sebebinin rasyon ve yetiştiricilik uygulamaları gibi faktörlere bağlı şekillenmiş olabileceği düşünülmüştür. Zira, kaba/konsantre yem oranı, rasyon içeriği, rasyon partikül boyutu, beslenme sıklığı ve laktasyon dönemi gibi durumların süt yağı oranını etkileyebildiği bilinmektedir (Atalay 2019, Bauman ve Griinari 2001).

Yapılan bazı çalışmalarda SHS'nin sütteki laktoz oranının azalmasıyla ilişkili olabileceği bildirilse de bu çalışmada YSHS grubunda laktoz oranının DSHS grubuna benzer olduğu belirlenmiştir (Cinar ve ark. Serbester 2015, Alessio ve ark. 2021). Gruplardaki yağsız kuru madde oranındaki benzerliğin de yağ, protein ve laktoz gibi katı maddelerdeki benzerlikten kaynaklanmış olabileceği söylenebilir.

Sütün pH değeri süt kalitesinin tespit edilmesinde önemli bir parametredir. Nötre yakın pH değeri sütün sağlıklı olduğunu düşündürmekle birlikte düşük pH süt asitliğinin yüksek olduğunu göstermektedir (Poghossian ve ark. 2019). Sağlıklı ve kaliteli inek sütünün ortalama pH değerinin 6,60-6,80 aralığında olması gerektiği bilinmektedir (Coşkun ve Çağlar 2013). Çalışma bulgularımız literatürle uyumlu olarak belirtilen referans aralıkta bulunmuştur. Gruplar arasında ise anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Elektrik iletkenliği, süt ve süt ürünlerinin üretim teknolojisinde, süt kalitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir uygulamadır. Sütün içeriğindeki kompozisyonel parametrelerin yanı sıra, mineral maddeler ve iyonlar süte farklı düzeylerde elektriksel iletkenlik özelliği kazandırmaktadır (Yakan ve ark. 2021). Meme sağlığı ile sütün elektrik iletkenliği arasında ilişki olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Atasever ve

Erdem 2008, Düz ve ark. 2021). Çalışma bulgularımızda elektrik iletkenliğinin gruplar arasında anlamlı bir fark gösterdiği tespit edilmiştir.

Süt içerisinde eriyik halde bulunan maddeler sütün donma noktasının düşmesine neden olmaktadır. Böylece sütün donma noktası süte su ya da bir başka maddenin ilave edilip edilmediği hakkında fikir vermektedir. Süte su ilave edilmesi sütün donma noktasında artışa sebep olurken, süt asitliğindeki artış donma noktasının düşmesine sebep olmaktadır (Ilie ve ark. 2010). Süt kompozisyonlarından biri olan süt yağı, süt içerisinde emülsifiye halde bulunuyor olup sütün donma noktasını önemli ölçüde etkilememektedir. Aynı şekilde sütün protein kompozisyonu da sütün donma noktasına herhangi bir etki göstermemektedir (Pesce ve ark. 2016). Sütün ozmotik basıncına etki eden bir faktörün sütün donma noktasına da etki ettiği bilinmektedir. Bu faktörlerden biri olan laktoz miktarı sütün donma noktasına etki etmektedir. Aynı şekilde ozmotik basıncı oluşturan mineral maddelerin sütteki miktarı da sütün donma noktasını etkilemektedir (Konar 1982, Zagorska ve Ciprova 2013, Pesce ve ark. 2016). Sütün en sabit fiziksel özelliklerinden biri olarak bilinen sütün donma noktası çığ sığır sütünde -0,522 ile -0,540 °C arasında olup çalışma bulgularımız literatürle uyumlu olarak belirtilen referans aralığında bulunmuştur. Bununla birlikte gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında SHS'ye göre aktivitesi araştırılan miR-27a-3p'nin YSHS grubunda yaklaşık 3 kat upregüle olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada miR-27a-3p'nin CMT (+) süt örneklerinde bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde upregüle olduğu tespit edilmiştir (Özkan ve ark. 2024). miR-27a-3p'nin inflamasyon ve apoptoz gibi moleküler yollarda görev aldığı bilinmektedir (Luo ve ark. 2020). Elektrik iletkenliği ile pozitif korele olan bu miRNA'nın SHS ile doğrudan bir korelasyona sahip olmadığı belirlenmiştir. Isı stresi gibi farklı çevre şartlarında sığır meme epitel hücrelerinde bu miRNA'nın aktivitesinin değiştiği belirtilmektedir (Wang ve ark. 2023). Ayrıca, yapılan çalışmalarda miR-27a-3p'nin özellikle gram negatif bakterilerle enfekte mastitis olgularında artabileceği ve patojen kaynaklı subklinik mastitis vakalarında biyobelirteç olabileceği bildirilmektedir (Wang ve ark. 2020, Özkan ve ark. 2024). Bu çalışmada elde edilen bulgular, literatürdeki çalışmalara benzer şekilde CMT ve SHS'nin meme dokusunun sağlığını değerlendirmede yeterli olmayacağını göstermektedir (Wang ve ark. 2020, Wang ve ark. 2021, Özkan ve ark. 2024). Her ne kadar bazı çalışmalar miR-27a-3p'nin süt proteini ve süt yağı gibi kompozisyonel parametrelerle ilişkili olduğunu bu yüzden süt kalitesinde önemli

olacağını bildirirse de bu çalışma bulgularında miR-27a-3p ile protein, yağ ve laktoz gibi kompozisyonel parametreler arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır (Wang ve ark. 2021, Duman ve ark. 2022, Wang ve ark. 2023). Bu yüzden sığırlarda genetik ve çevre faktörleri göz önünde bulundurularak bu miRNA'nın araştırılacağı daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Sütte ifade edildiği bildirilen miR-29B-2'nin mastitis, metritis gibi inflamasyon durumlarında aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Kasimanickam ve Kasteliç 2016, Srikok ve ark. 2020). Yapılan bir çalışmada miR-29B-2'nin sığırlarda mastitis tespitinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Srikok ve ark. 2020). Bu çalışmada YSHS grubunda miR-29B-2'nin 3 kattan fazla upregüle olduğu ve bu miRNA'nın patojen spesifik mastitiste upregüle olduğu belirtilen miR-27a-3p ile pozitif korele olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada miR-29B-2'nin miR-148a'nın yanı sıra SHS, yağ ve elektrik iletkenliği parametreleriyle de pozitif korelasyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular miR-29B-2'nin yüksek somatik hücre sayısı ile karakterize subklinik mastitisle ve süt kalitesi ile ilişkili olabileceğini ve bu parametrelerin değerlendirilmesinde biyobelirteç potansiyeli taşıyabileceğini düşündürmektedir. İnflamasyon yolağının merkezinde rol alan NF-kB ile ilişkili olduğu belirtilen bu miRNA'nın subklinik mastitis ve süt kalitesi ile ilişkisinin araştırılacağı daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu değerlendirilmiştir (Ma ve ark. 2011).

Yapılan çalışmalar bu çalışmanın hedef miRNA'larından olan miR-142-5p'nin rasyon içeriğine bağlı olarak ifade düzeylerinin değiştiğini göstermektedir (Muroya ve ark. 2016, Mobuchon ve ark. 2017). Lu ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada sığır meme epitel hücrelerinde miR-142-5p'nin hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi yolaklarda yer alan genlerin ifade düzeylerini etkilediği ve sığırlarda BAG5 (B-cell Activation Gene 5) gibi genleri hedef alarak mastitiste proinflamatuvar etkinlik gösterebileceği belirtilmiştir (Lu ve ark. 2021). Süt ineklerinde yapılan bir çalışmada düşük SHS'nin 200.000 hücre/ml olması durumunda miR-142-5p ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Stefanon ve ark. 2023). Bununla birlikte yapılan bu çalışmada miR-142-5p'nin SHS'ye göre oluşturulan gruplarda benzer ekspresyon paternleri gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumda DSHS ve YSHS gruplarındaki SHS oranları göz önünde bulundurularak geniş SHS aralıklarında bu miRNA'nın değerlendirilmesi gerektiği fikri oluşmuştur. Adipogenez gibi enerji metabolizmasıyla da ilişkili olduğu belirtilen miR-142-5p'nin süt proteini ile negatif korelasyona sahip olduğu belirlenmiştir (Chartoumpekis ve ark. 2012, Mobuchon ve ark.

2017). Gerek bu çalışma gerekse belirtilen çalışmalar doğrultusunda süt kalitesi ile ilişkili olabileceği değerlendirilen miR-142-5p'nin SHS'ye bağlı aktivite gösterebileceği bununla birlikte SHS oranının bu durumu etkileyen önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca süt kalitesine olan etkileri ile ilgili daha fazla çalışmaya gerek olduğu değerlendirilmiştir.

Hedef miRNA'lardan olan miR-148a'nın YSHS grubunda DSHS grubuna kıyasla 6 kattan fazla ifade edildiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada miR-148a'nın anti inflamatuvar etkinlik gösterdiği ve *Escherichia coli* ile *Staphylococcus aureus* ile enfekte meme dokusunda inflamasyonda aktivitesinin değiştiği bildirilmiştir (Hasankhani ve ark. 2023). Bununla birlikte başka bir çalışmada *Staphylococcus spp.* ile enfekte meme dokusunda subklinik mastitiste aktivitesi değişmezken *Streptococcus spp.* kaynaklı subklinik mastitiste ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Özkan ve ark. 2024). Ayrıca, Srikok ve ark. (2020) miR-148a ekspresyon seviyelerinin mastitisli hayvanlarda downregüle olduğunu bildirmiştir. Sütte en bol bulunan miRNA'lardan olan miR-148a'nın enfeksiyon kaynağına bağlı olarak aktivitesinin değişebileceği göz önünde bulundurulduğunda spesifik olmayan subklinik mastitis için biyobelirteç olma potansiyelinin zayıf olabileceği değerlendirilmiştir (Cai ve ark. 2018). Bu çalışmadan elde edilen bulgular miR-148a'nın sütteki SHS ile pozitif korele olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda CMT ve SHS'nin yanı sıra miR-148a'nın da süt kalitesi ve meme sağlığını değerlendirilmede tek başına yeterli bir parametre olamayacağı düşünülmüştür.

Bu çalışma ile temel süt kalite parametrelerinin de birbirleriyle anlamlı korelasyon gösterdiği anlaşılmıştır. Çalışma bulgularımız, süt teknolojisinde ve süt kalitesinin değerlendirilmesinde büyük öneme sahip pH değerinin, YKM, laktoz ve donma noktası ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte çalışma bulguları YKM'nin protein, laktoz ve donma noktası ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada YKM'nin büyük miktarda laktoz ve proteinden oluştuğu ve YKM ile aralarında yüksek miktarda korelasyon gösterebileceği belirtilmiştir (Özkan ve ark. 2020). Yine aynı çalışmada süt pH'sı ile donma noktası arasında korelasyon olduğu belirtilmiştir. Farklı sıcaklık ve pH değerlerinin süt protein kompozisyonunda bozulmaya neden olacağı bilinmekle birlikte bu çalışmada süt pH değeri, protein ve elektrik iletkenliği arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir (Özkan ve ark. 2020).

Sütün yapısında bulunan iyonlar tarafından belirlenen elektrik iletkenliğinin sıcaklık, laktasyon dönemi ve sütün içeriğindeki diğer bileşenler tarafından farklı düzeylerde etkilendiği bilinmektedir (Milci ve Yaygın 2004). Çalışma bulguları sütteki elektrik iletkenliğinin SHS ile ilişkili olduğunu gösterse de bu parametre süt kalitesini etkileyen temel süt kompozisyon parametreleri ile ilişkili bulunmamıştır. Süt elektrik iletkenliğinin sığır mastitisinin erken teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği bilinmektedir. Elde edilen bulgular literatürle uyumlu olup süt elektrik iletkenliği ve SHS arasında anlamlı bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Sütteki ozmotik dengenin ana düzenleyicisi ve enerji kaynağı olan laktozun, süt kalitesi hakkında bilgi verdiği bilinmektedir (Forsbäck ve ark. 2010). Alessio ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada sütün yağ ve protein içeriğinin laktoz miktarı ile ilişkili olmadığı ve SHS sayısı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Alessio ve ark. 2021). Yapılan bir başka çalışmada laktoz oranının yağ ve protein oranı ile çok düşük ilişkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Costa ve ark. 2019). Mastitis 'ten etkilendiği bilinen laktoz oranının mastitisli sütte azaldığı ve bu sütlerde SHS'nin arttığı belirtilmiştir (Antanaitis ve ark. 2024). Bu çalışmada ise laktoz yağ, protein, YKM oranları ile ilişkili bulunurken SHS ile arasında korelasyon bulunmamıştır. Elde edilen bulgular ve literatür bilgi ışığında bu parametreler arasındaki korelasyonun ırk, laktasyon dönemi, laktasyon sayısı, patojen gibi genetik ve çevre faktörlerine bağlı olarak değişebileceği anlaşılmıştır.

6. SONUÇ

Somatik hücre sayısı ve CMT, meme sağlığı ve süt kalitesinin değerlendirilmesinde rutinde kullanılan önemli uygulamalar olarak bilinmektedir. Bu çalışma sonuçlarına ve literatürdeki mevcut çalışmalara bakılarak SHS ve CMT uygulamalarının meme dokusunun sağlığı ve süt kalitesinin değerlendirilmesinde tek başına güvenilir ve yeterli olmadığı değerlendirilmiştir. Bu nedenle güncel araştırmalar ile güvenilir, ekonomik ve hızlı sonuç veren yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışma sonuçları doğrultusunda miR-27a-3p, miR-29B-2 ve miR-148a'nın süt kalitesinde meydana gelebilecek değişimin ortaya konulmasında, süt kalitesinin tespitinde ve iyileştirilmesinde biyobelirteç ve hedef olma potansiyellerinin olduğu değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları ve literatürdeki çalışmalar hedef miRNA'lardan biri olan miR-142-5p'nin SHS'ye bağlı aktivite gösterebileceği fakat SHS oranının bu aktivite düzeyini etkileyebileceği düşünülmüştür. miR142-5p'nin SHS ve süt kalitesi ile ilişkisinin daha iyi anlaşılması için SHS aralığının daha geniş tutulacağı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hedef miRNA'ların SHS ve temel süt kalite parametreleri ile ilişkisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve süt kalitesinin tespitinde biyobelirteç olabilme potansiyeli taşıyan yeni miRNA'ların tespit edilmesi için genetik ve çevre faktörleri göz önünde bulundurulacağı daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu düşünülmüştür.

7. KAYNAKÇA

1. **Abed, A. H., Menshaw, A. M. S., Zeinhom, M. M. A., Hossain, D., Khalifa, E., Wareth, G., & Awad, M. F. (2021).** Subclinical Mastitis in Selected Bovine Dairy Herds in North Upper Egypt: Assessment of Prevalence, Causative Bacterial Pathogens, Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Genes. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061175>.
2. **Alessio, D. R. M., Velho, J. P., McManus, C. M., Knob, D. A., Vancin, F. R., Antunes, G. V., ... & Neto, A. T. (2021).** Lactose and its relationship with other milk constituents, somatic cell count, and total bacterial count. *Livestock Science*, 252, 104678.
3. **Alkan, H., Baştan, A., Salar, S., Özdal, M. ve Kaymaz, M. (2014).** Sağlıklı ve enfekte ineklerde kuru dönemde California Mastitis Testi, somatik hücre sayımı ve mikrobiyolojik inceleme sonuçlarının karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 61 (3), 179-183.
4. **Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., & Tuschl, T. (2003).** A uniform system for microRNA annotation. *RNA* (New York, N.Y.), 9(3), 277-279. <https://doi.org/10.1261/rna.2183803>.
5. **Anonim 2000.** Türk Gıda Kodeksi – Çiğ süt ve ısıtılmış içme sütleri tebliği. Resmi gazete. 14.02.2000/23964. Tebliğ No: 2000-6.
6. **Antanaitis, R., Džermeikaitė, K., Krištolaitytė, J., Girdauskaitė, A., Arlauskaitė, S., Tolkačiovaitė, K., & Baumgartner, W. (2024).** The Relation between Milk Lactose Concentration and the Rumination, Feeding, and Locomotion Behavior of Early-Lactation Dairy Cows. *Animals*, 14(6), 836.
7. **Antanaitis, R., Juozaitienė, V., Jonike, V., Baumgartner, W., & Paulauskas, A. (2021).** Milk lactose as a biomarker of subclinical mastitis in dairy cows. *Animals*, 11(6), 1736.
8. **Atasever, S., & Erdem, H. (2008).** Süt Sığırlarında Mastitis ile Sütün Elektriksel İletkenliği Arasındaki İlişkiler. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(2), 131-136.
9. **Aytekin, İ., & Boztepe, S. (2014).** Süt sığırlarında somatik hücre sayısı, önemi ve etki eden faktörler. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2(3), 112-121.
10. **Balemi, A., Gumi, B., Amenu, K., Girma, S., Gebbru, M. U., Tekle, M., ... & Kerro Dego, O. (2021).** Prevalence of mastitis and antibiotic resistance of bacterial isolates from CMT positive milk samples obtained from dairy cows, camels, and goats in two pastoral districts in Southern Ethiopia. *Animals*, 11(6), 1530.
11. **Baştan A (2002)** İneklerde Meme Hastalıkları ve Mastitis. Hatipoğlu Basımevi, Ankara, S: 33:83.
12. **Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2001).** Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 70(1-2), 15-29.
13. **Bian, Y., Lei, Y., Wang, C., Wang, J., Wang, L., Liu, L., ... & Li, Q. (2015).** Epigenetic regulation of miR-29s affects the lactation activity of dairy cow mammary epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, 230(9), 2152-2163.
14. **Brito, L.F., Bédère, N., Douhard, F., Oliveira, H.R., Arnal, M., Peñagaricano, F., Schinckel, A.P., Baes, C.F., Miglior, F. 2021.** “Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world”, *Animal*, 15, 100292.
15. **Bueno, V. F. F., Mesquita, A. J. D., Nicolau, E. S., Oliveira, A. N. D., Oliveira, J. P. D., Neves, R. B. S., ... & Thomaz, L. W. (2005).** Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural*, 35, 848-854.
16. **Bulca, S., Duran, M., & Koç, A. (2016).** Çiğ inek sütü somatik hücre sayısının yoğurdun duyuşal özellikleri üzerine etkileri. *Akademik Gıda*, 14(2), 151-157.
17. **Cai, M., He, H., Jia, X., Chen, S., Wang, J., Shi, Y., Liu, B., Xiao, W., Lai, S. 2018.** “Genome-wide microRNA profiling of bovine milk-derived exosomes infected with *Staphylococcus aureus*”, *Cell Stress and Chaperones*, 23, 663-72.
18. **Chartoumpekis, D. V., Zaravinos, A., Ziros, P. G., Iskrenova, R. P., Psyrogiannis, A. I., Kyriazopoulou, V. E., & Habeos, I. G. (2012).** Differential expression of microRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PloS one*, 7(4), e34872.
19. **Chen, Z., Luo, J., Sun, S., Cao, D., Shi, H., & Loo, J. J. (2017).** miR-148a and miR-17-5p synergistically regulate milk TAG synthesis via PPARGC1A and PPARA in goat mammary epithelial cells. *RNA biology*, 14(3), 326-338.
20. **Cinar, M., Serbest, U., Ceyhan, A., & Gorgulu, M. (2015).** Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 14(1), 3646.
21. **Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020).** Epidemiology and classification of mastitis. *Animals*, 10(12), 2212.

22. **Costa, A., Lopez-Villalobos, N., Sneddon, N. W., Shalloo, L., Franzoi, M., De Marchi, M., & Penasa, M. (2019).** Invited review: Milk lactose—Current status and future challenges in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 102(7), 5883-5898.
23. **Coşkun, H., & Çağlar, A. (2013).** Süt Teknolojisinde pH'nın Önemi, Süt ve Süt Ürünlerinde Ölçülmesi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(1).
24. **Çoban, Ö., & Tüzemen, N. (2007).** Siyah alaca ve esmer ineklerde subklinik mastitis için risk faktörleri. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26(1-2), 27-31.
25. **Davoodi, S. H., Shahbazi, R., Esmaceli, S., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A., Jazayeri, S., & Taslimi, A. (2016).** Health-Related Aspects of Milk Proteins. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 15(3), 573-591.
26. **Diñçel, D., Ardıçlı, S., Şamlı, H., & Balcı, F. (2018).** Sığır, Keçi ve Koyunlarda MikroRNA'ların (miRNA) Meme Bezi Gelişimi ve Süt Üretimine Etkisi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 3(3), 124-130.
27. **Do, D. N., Dudemaine, P. L., Mathur, M., Suravajhala, P., Zhao, X., Ibeagha-Awemu, E. M. 2021.** "MiRNA regulatory functions in farm animal diseases, and biomarker potentials for effective therapies", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3080.
28. **Duman, E., Özmen, Ö., & Kul, S. (2022).** Oar-miR-16b and oar-miR-27a: Negatively correlated with milk yield and milk protein in sheep. *Animal Biotechnology*, 33(7), 1466-1479.
29. **Ebrahimie, E., Ebrahimi, F., Ebrahimi, M., Tomlinson, S., & Petrovski, K. R. (2018).** A large-scale study of indicators of sub-clinical mastitis in dairy cattle by attribute weighting analysis of milk composition features: highlighting the predictive power of lactose and electrical conductivity. *Journal of dairy research*, 85(2), 193-200.
30. **FAO (2024).** Food and Agriculture Organization, <https://www.fao.org/home/en/> Son erişim tarihi: 04/03/2024
31. **Foroutan, A., Guo, A. C., Vazquez-Fresno, R., Lipfert, M., Zhang, L., Zheng, J., ... & Wishart, D. S. (2019).** Chemical composition of commercial cow's milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(17), 4897-4914.
32. **Forsbäck, L., Lindmark-Månsson, H., Andrén, A., Åkerstedt, M., Andrée, L., & Svennersten-Sjaunja, K. (2010).** Day-to-day variation in milk yield and milk composition at the udder-quarter level. *Journal of dairy science*, 93(8), 3569-3577.
33. **Fox, PF (2008).** Süt: genel bakış. Süt proteinleri, 1-54.
34. **Fu, Y. C., Zhao, S. R., Zhu, B. H., Guo, S. S., & Wang, X. X. (2019).** MiRNA-27a-3p promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through targeting ATF3. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 23.
35. **Garcia, S. N., Mpatwenumugabo, J. P. M., Ntampaka, P., Nandi, S., & Cullor, J. S. (2023).** A one health framework to advance food safety and security: An on-farm case study in the Rwandan dairy sector. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, 16, 100531. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100531>
36. **Godber, O. F., & Wall, R. (2014).** Livestock and food security: vulnerability to population growth and climate change. *Global change biology*, 20(10), 3092-3102.
37. **Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., & Yıldırım, M. (2010).** Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 8(1), 23-31.
38. **Hasankhani, A., Bakherad, M., Bahrani, A., Shahrababak, H. M., Pecho, R. D. C., & Shahrababak, M. M. (2023).** Integrated analysis of inflammatory mRNAs, miRNAs, and lncRNAs elucidates the molecular interactome behind bovine mastitis. *Scientific reports*, 13(1), 13826. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41116-2>
39. **Henno, M., Ots, M., Jõudu, I., Kaart, T., & Kärt, O. (2008).** Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. *International Dairy Journal*, 18(2), 210-215.
40. **Horita, M., Farquharson, C., & Stephen, L. A. (2021).** The role of miR-29 family in disease. *Journal of cellular biochemistry*, 122(7), 696-715. <https://doi.org/10.1002/jcb.29896>
41. **Ilie, LI, Tudor, L. ve Galis, AM (2010).** Sütün donma noktası değerini etkileyen başlıca faktörlere ilişkin araştırmalar. *Lucr. Aziz Med. Veteriner. Temeşvar*, 43 (2), 228-234.
42. **Iqbal, A., Yu, H., Jiang, P., & Zhao, Z. (2022).** Deciphering the Key Regulatory Roles of KLF6 and Bta-miR-148a on Milk Fat Metabolism in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Genes*, 13(10), 1828.
43. **Kasimanickam V, Kastelic J.** Circulating cell-free mature microRNAs and their target gene prediction in bovine metritis. *Sci Rep.* 2016 Jul 11;6:29509. doi: 10.1038/srep29509. PMID: 27404038; PMCID: PMC4941693.

44. **Kazimierska, K., & Kalinowska-Lis, U. (2021).** Milk Proteins-Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(11), 3253. <https://doi.org/10.3390/molecules26113253>
45. **Kıyıcı, J. M., Kaliber, M., Uzkülekci, H. H., Sekmen, A. E., Uzunyol, A., & Gülünç, A. (2016).** Süt İneklerinde Memenin Fenotipik Özelliği ve Süt Kalitesi Arasındaki İlişki. *Journal of the Institute of Science & Technology/Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(4).
46. **Kok, M. G. M., De Ronde, M. W. J., Moerland, P. D., Ruijter, J. M., Creemers, E. E., Pinto-Sietsma, S. J. 2018.** “Small sample sizes in high-throughput miRNA screens: a common pitfall for the identification of miRNA biomarkers”, *Biomolecular Detection and Quantification*, 15, 1-5.
47. **Komarek, A. M., Dunston, S., Enahoro, D., Godfray, H. C. J., Herrero, M., Mason-D'Croz, D., ... & Willenbockel, D. (2021).** Income, consumer preferences, and the future of livestock-derived food demand. *Global Environmental Change*, 70, 102343.
48. **Konar, A. (1982).** İnek, koyun ve keçi sütlerinin, donma noktası depresyonu “süte su katılarak yapılan hilenin saptanması”. *Gıda*, 7(2).
49. **Kul, E., Erdem, H., & Atasever, S. (2006).** Süt Sığırlarında Farklı Meme Özelliklerinin Mastitis ve Süt Somatik Hücre Sayısı Üzerine Etkileri. *J. of Fac. of Agric., OMU*, 21(3), 350-356.
50. **Lai YC, Fujikawa T, Maemura T, Ando T, Kitahara G, Endo Y, Yamato O, Koiwa M, Kubota C, Miura N.** Inflammation-related microRNA expression level in the bovine milk is affected by mastitis. *PLoS One*. 2017 May 17;12(5):e0177182. doi: 10.1371/journal.pone.0177182. PMID: 28520748; PMCID: PMC5435311.
51. **Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. 1993.** “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*”, *Cell*, 75(5), 843-854.
52. **Li, X., Tang, X., Li, K., & Lu, L. (2022).** Evaluation of Serum MicroRNAs (miR-9-5p, miR-17-5p, and miR-148a-3p) as Potential Biomarkers of Breast Cancer. *BioMed Research International*, 2022.
53. **Lin, X. Z., Luo, J., Zhang, L. P., Wang, W., Shi, H. B., & Zhu, J. J. (2013).** MiR-27a suppresses triglyceride accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. *Gene*, 521(1), 15-23.
54. **Lu, J., Gu, B., Lu, W., Liu, J., & Lu, J. (2021).** miR-142-5p regulates lipopolysaccharide-induced bovine epithelial cell proliferation and apoptosis via targeting BAG5. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(6), 1-11.
55. **Lu, J., van Hooijdonk, T., Boeren, S., Vervoort, J., & Hettinga, K. (2014).** Identification of lipid synthesis and secretion proteins in bovine milk. *Journal of dairy research*, 81(1), 65-72.
56. **Lu, J., Wang, X., Zhang, W., Liu, L., Pang, X., Zhang, S., & Lv, J. (2016).** Comparative proteomics of milk fat globule membrane in different species reveals variations in lactation and nutrition. *Food chemistry*, 196, 665-672.
57. **Luo, Y., Yang, J., Zhang, C., Jin, Y., Pan, H., Liu, L., ... & Li, Q. (2020).** Up-regulation of miR-27a promotes monocyte-mediated inflammatory responses in Kawasaki disease by inhibiting function of B10 cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 107(1), 133-144.
58. **Ma, X., Becker Buscaglia, L. E., Barker, J. R., & Li, Y. (2011).** MicroRNAs in NF-κB signaling. *Journal of molecular cell biology*, 3(3), 159-166.
59. **MacGibbon, A., Taylor, M., Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (2006).** Advanced dairy chemistry volume 2 lipids.
60. **McCarthy, O. J., & Singh, H. (2009).** Physico-chemical properties of milk. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, 691-758.
61. **Melnik, B. C., & Schmitz, G. (2017).** Milk's Role as an Epigenetic Regulator in Health and Disease. *Diseases* (Basel, Switzerland), 5(1), 12. <https://doi.org/10.3390/diseases5010012>
62. **Milci, S., & Yaygın, H. (2004).** Elektrik iletkenliği ölçüm tekniğinin süt teknolojisindeki uygulama alanları. *Akademik Gıda*, 2(5), 24-28.
63. **Miretti, S., Martignani, E., Accornero, P., & Baratta, M. (2013).** Functional effect of mir-27b on myostatin expression: a relationship in Piedmontese cattle with double-muscle phenotype. *BMC genomics*, 14, 194. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-194>
64. **Mobuchon, L., Le Guillou, S., Marthey, S., Laubier, J., Laloë, D., Bes, S., Le Provost, F., & Leroux, C. (2017).** Sunflower oil supplementation affects the expression of miR-20a-5p and miR-142-5p in the lactating bovine mammary gland. *PloS one*, 12(12), e0185511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185511>
65. **Mundan, D., Meral, B. A., Demir, A., & Doğaner, M. (2015).** Süt sığırı işletmelerinde sütteki toplam bakteri ve somatik hücre sayısının ekonomik açıdan değerlendirilmesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4(2), 84-89.

66. Muroya, S., Shibata, M., Hayashi, M., Oe, M., & Ojima, K. (2016). Differences in Circulating microRNAs between Grazing and Grain-Fed Wagyu Cattle Are Associated with Altered Expression of Intramuscular microRNA, the Potential Target PTEN, and Lipogenic Genes. *PloS one*, 11(9), e0162496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162496>
67. Mürüvvet, Düz, Doğan, Y. N., & Doğan, İ. (2021). İnek Sütlerinde Somatik Hücre Sayısı ile Süt Amiloid A, Elektriksel İletkenlik ve pH Arasındaki İlişkiler. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(2), 457-463.
68. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C. 2018. "Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation", *Frontiers in Endocrinology*, 9, 402.
69. Okumura, S., Hirano, Y., & Komatsu, Y. (2021). Stable duplex-linked antisense targeting miR-148a inhibits breast cancer cell proliferation. *Scientific reports*, 11(1), 11467.
70. Özek, K. (2015). Süt sığırlarında süt kompozisyonunu etkileyen faktörler ve besleme-süt kompozisyonu ilişkisi. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 4(2), 37-45.
71. Özel, A. G. G. (2008). Tüketicilerin Süt Tercihinde Etkili Olan Faktörlerin İncelenmesine Yönelik Bir Araştırma. *Süleyman Demirel Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 13(3), 227-240.
72. Özkan, H., & Yakan, A. (2017). Genomic Selection in Animal Breeding: Past, Present. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 57(2), 112-117.
73. Özkan, H., Keçeli, H. H., Kaya, U., Dalkiran, S., Yüksel, M., Tek, E., & Yakan, A. (2024). Considering potential roles of selected MicroRNAs in evaluating subclinical mastitis and Milk quality in California mastitis test (+) and infected bovine milk. *Animal Science Journal*, 95(1), e13959.
74. Özkan, H., Yakan, A., Çamdeviren, B., & Karaaslan, İ. (2020). Milk Traits of Damascus Goats at Different Lactation Stages: 1. Somatic Cell Counts and Milk Quality Parameters. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(3), 318-324.
75. Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M. ve Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 88-113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>
76. Pesce, A., Salzano, C., De Felice, A., Garofalo, F., Liguori, S., De Santo, A., ... & Guarino, A. (2016). Monitoring the freezing point of buffalo milk. *Italian journal of food safety*, 5(2).
77. Poghosian, A., Geissler, H., & Schöning, M. J. (2019). Rapid methods and sensors for milk quality monitoring and spoilage detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 140, 111272.
78. Ren, L. R., Yao, R. B., Wang, S. Y., Gong, X. D., Xu, J. T., & Yang, K. S. (2021). MiR-27a-3p promotes the osteogenic differentiation by activating CRY2/ERK1/2 axis. *Molecular Medicine*, 27, 1-11.
79. Salilew-Wondim, D., Ahmad, I., Gebremedhn, S., Sahadevan, S., Hossain, M. M., Rings, F., ... & Tesfaye, D. (2014). The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle. *PloS one*, 9(9), e106795.
80. Schukken, Y., Wilson, D., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., & Gonzalez, R. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary research*, 34(5), 579-596.
81. Srikok, S., Patchanee, P., Boonyayatra, S., & Chuammitri, P. (2020). Potential role of MicroRNA as a diagnostic tool in the detection of bovine mastitis. *Preventive veterinary medicine*, 182, 105101.
82. Stefanon, B., Cintio, M., Sgorlon, S., Scarsella, E., Licastro, D., Zecconi, A., & Colitti, M. (2023). Regulatory Role of microRNA of Milk Exosomes in Mastitis of Dairy Cows. *Animals*, 13(5), 821.
83. Sun, J., Aswath, K., Schroeder, S. G., Lippolis, J. D., Reinhardt, T. A., & Sonstegard, T. S. (2015). MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC genomics*, 16, 806. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2044-9>
84. Svennersten-Sjaunja, K., & Olsson, K. (2005). Endocrinology of milk production. *Domestic animal endocrinology*, 29(2), 241-258.
85. Şahin, O., Kaygısız, A., & Yılmaz, İ. (2022). Türkiye’de Sığır Yetiştiricilerinin İrk Tercihleri ve Nedenleri. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 8(1), 151-165.
86. Temiz, H. (2003). Süt Lipidlerinin Bazı Özellikleri. *Gıda*, 28(6).
87. Tiantong, A., Eardmusic, S., Arunvipas, P., Lee, J. W., & Inyawilert, W. (2023). The influence of subclinical mastitis on the protein composition and protease activities of raw milk from lactating Thai-crossbred dairy cows. *Veterinary World*, 16(6), 1363.
88. Tremblay, A. ve Gilbert, JA (2009). Süt ürünleri, insülin direnci sendromu ve tip 2 diyabet. *Amerikan Beslenme Koleji Dergisi*, 28 (sup1), 91S-102S.
89. Turan, Z., Şanver, D., & Öztürk, K. (2017). Türkiye’de hayvancılık sektöründen süt inekçiliğinin önemi ve yurt içi hasılaya katkısı ve de dış ülkelerle karşılaştırılması. *Ömer Halisdemir Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 10(3), 60-74.

90. Tzelos, T., Ho, W., Charmana, V. I., Lee, S., & Donadeu, F. X. (2022). MiRNAs in milk can be used towards early prediction of mammary gland inflammation in cattle. *Scientific reports*, 12(1), 5131. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09214-9>
91. Van Arendonk, J. A. M., van Valenberg, H. J. F., & Bovenhuis, H. (2010). Exploiting genetic variation in milk-fat composition of milk from dairy cows. *Improving the Safety and Quality of Milk*, 197-222.
92. Vitenberga-Verza, Z., Pilmane, M., Šerstņova, K., Melderis, I., Gontar, Ļ., Kochański, M., Drutowska, A., Maróti, G., & Prieto-Simón, B. (2022). Identification of Inflammatory and Regulatory Cytokines IL-1 α -, IL-4-, IL-6-, IL-12-, IL-13-, IL-17A-, TNF- α -, and IFN- γ -Producing Cells in the Milk of Dairy Cows with Subclinical and Clinical Mastitis. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(3), 372. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030372>
93. Wang, M. Q., Zhou, C. H., Cong, S., Han, D. X., Wang, C. J., Tian, Y., ... & Yuan, B. (2021). Lipopolysaccharide inhibits triglyceride synthesis in dairy cow mammary epithelial cells by upregulating miR-27a-3p, which targets the PPAR γ gene. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 989-1001.
94. Wang, Y., Wu, J., Xia, S. W., Zhao, F., Ding, Q., Ye, X. M., Zhong, J. F., Chen, K. L., & Wang, H. L. (2023). miR-27a-3p relieves heat stress-induced mitochondrial damage and aberrant milk protein synthesis through MEK/ERK pathway in BMECs. *Cell stress & chaperones*, 28(3), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s12192-023-01334-z>
95. Weiss, D., Weinfurter, M., & Bruckmaier, R. M. (2004). Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *Journal of dairy science*, 87(10), 3280-3289.
96. Xu, M. Q., Jiang, H., Zhang, L. Q., Sun, X. L., Luo, D., Fu, Y., Gao, Y., Yuan, B., & Zhang, J. B. (2018). MiR-29b affects the secretion of PROG and promotes the proliferation of bovine corpus luteum cells. *PloS one*, 13(4), e0195562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195562>
97. Yakan, A., Özkan, H., Çamdeviren, B., Kaya, U., Karaaslan, İ., & Dalkiran, S. (2021). Expression patterns of major genes in fatty acid synthesis, inflammation, oxidative stress pathways from colostrum to milk in Damascus goats. *Scientific Reports*, 11(1), 1-10.
98. Yakan, A., Özkan, H., ŞAKAR, A. E., Ünal, N., & Özbeyaz, C. (2018). Gene expression levels in some candidate genes for mastitis resistance, milk yield, and milk quality of goats reared under different feeding systems. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 42(1), 18-28.
99. Yalçın, H., & Çakmak, T. (2022). İnek sütlerinde somatik hücre sayısı ve bazı parametrelerin araştırılması. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 12(1), 81-87.
100. Yao, R., Xu, L., Wei, B., Qian, Z., Wang, J., Hui, H., & Sun, Y. (2019). miR-142-5p regulates pancreatic cancer cell proliferation and apoptosis by regulation of RAP1A. *Pathology-Research and Practice*, 215(6), 152416.
101. Zagorska, J., & Ciprovica, I. (2013). Evaluation of factors affecting freezing point of milk. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 7(2), 106-111.

ÖZGEÇMİŞ

İlköğretim ve lise öğrenimlerini Hatay’da tamamladı. 2021 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden mezun oldu. 2022 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalı’nda Yüksek lisans eğitimine başladı.

