



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**AKKARAMAN KOYUNLARINDA LAKTASYONUN FARKLI
DÖNEMLERİNDE SÜT ANTİOKSİDAN ENZİM
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

REMZİ SONER CENGİZ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Mert PEKCAN**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKKARAMAN KOYUNLARINDA LAKTASYONUN FARKLI
DÖNEMLERİNDE SÜT ANTİOKSİDAN ENZİM
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

REMZİ SONER CENGİZ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mert PEKCAN

ANKARA

2019

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Akkaraman Koyunlarında Laktasyonun Farklı Dönemlerinde Süt Antioksidan Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi” başlıklı tez bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir ve hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup tüm cümleler ve yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: *Remzi Soner CENGİZ*

Tarih: *14.2.2019*

İmza: 

KABUL VE ONAY

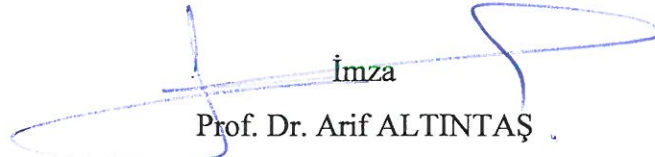
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Biyokimya Anabilim Dalında

Remzi Soner Cengiz tarafından hazırlanan

“Akkaraman Koyun Sütlerinde Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/ OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:14.02.2019


İmza
Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Jüri Başkanı


İmza
Dr. Öğretim Üyesi Özkan DURU
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Raportör


İmza
Doç. Dr. Meri PEKCAN
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Reaktif Nitrojen Türleri	2
1.2. Serbest Radikaller, Özellikleri ve Oksidanlar	3
1.3. Serbest Radikallerin ve Oksidanların Üretimi	4
1.4. Serbest Radikaller ve Oksidanların Yararlı Etkileri	5
1.5. Serbest Radikaller ve Oksidanların Zararlı Etkileri	6
1.6. Antioksidanlar ve Sağlık	7
1.7. Antioksidanların Sınıflandırılması	7
1.8. Antioksidanların Etki Düzeyi	8
1.8.1. Birinci Basamak Savunma Antioksidanları	8
1.8.2. İkinci Basamak Savunma Antioksidanları	10
1.8.3. Üçüncü Basamak Savunma Antioksidanları	11
1.8.4. Dördüncü Basamak Savunma Antioksidanları	11
1.9. Antioksidan Süreci	12
1.10. Oksidatif Stres Düzeyinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	12
1.10.1. Süperoksit Dismutaz	13
1.10.2. Katalaz	14
1.10.3. Glutatyon Peroksidaz	15
1.11. Kaliforniya Mastitis Test	16

2.GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.2. Kullanılan Cihazlar	20
2.3. Etik	21
2.4. Tez Çalışmasında Kullanılacak Hayvan Sayısının Belirlenmesi	21
2.5. Hayvan Materyali, Deney Gruplarının Oluşturulması	21
2.6. Süt Örneklerinin Alınması ve Saklanması	22
2.7. Süt Serumlarının Elde Edilmesi	22
2.8. Çalışılacak Testler ve Metodları	22
2.8.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	23
2.8.2. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü	25
2.8.3. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	27
2.8.4. Toplam Protein Düzeyinin Ölçümü	29
2.8.5. California Mastitis Testi	30
2.9. İstatiksel Analiz	30
3.BULGULAR	31
4.TARTIŞMA	36
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	40
ÖZET	42
SUMMARY	43
KAYNAKLAR	44
EKLER	
Ek-1 Etik Kurul Raporu	49
ÖZGEÇMİŞ	50

ÖNSÖZ

Stres ve organizmanın bu stres karşı oluşturduğu yanıtın ilk defa 1936 yılında Silve tarafından bahsedilmiş ve oksidatif stres kavramı 1985 yılında ‘‘Oksidatif Stres’’ adlı kitapta tanımlanmıştır. O zamandan günümüze kadar geçen süreçte, redoks biyolojisi ve tıbbi alanında pek çok gelişme ortaya çıkmıştır. Oksidatif stres ile ilgili olarak günümüzde birçok alanda araştırmalar yapılmaktadır. Yeni yöntemlerin geliştirilmesi ile bu alanda önemli ölçüde ilerleme kaydedilmiştir.

Gebelik fizyolojik bir süreç olup, yavrunun yeterli gelişimini ve büyümesini sağlamak için enerji ve oksijen gereksiniminde belirgin bir artış ile karakterizedir. Yapılmış olan çalışmalarda da belirtildiği gibi hem ananın hem de yavrunun gebelik sırasında oksidatif strese maruz kaldığı düşünülmektedir. Çalışmamızda, ülkemizdeki koyun varlığının yaklaşık %45’ini oluşturan Akkaraman koyunlarından laktasyonun farklı dönemlerinde alınan süt örneklerinde antioksidan enzim aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca deneyim ve bilgi birikimleriyle, her konuda desteklerini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Mert PEKCAN’a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Arif Altıntaş’a, saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU, Prof. Dr. Tevhide SEL, Prof. Dr. Hamdi UYSAL, Doç. Dr. Görkem KISMALIYA’ya, rahmetli hocam Prof. Dr. Ulvi Reha FİDANCI’ya, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalının, desteklerini esirgemeyen araştırma görevlileri Dr. Ögünç Meral ve Dr. Efe Kurtdede’ye, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Afşin Kocakaya’ya, Gözli Tarım İşletmesi Müdürlüğünün değerli yöneticilerine ve personellerine, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma gönülden saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu günlere ulaşmamda destekleriyle her zaman yanımda olan değerli aileme ve sevgili nişanlıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



SİMGELER ve KISALTMALAR

DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit Çözeltisi
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GRx	Glutatyon Redüktaz
CAT	Katalaz
CMT	Kalifornia Mastitis Test
C-OOH	Kumol Hidroperoksit
MDA	Malondialdehid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH+H ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NBT	Nitroblue Tetrazolium
GSSG	Okside Glutatyon
GSH	Redükte Glutatyon
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	Sodyum-Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz

ŞEKİLLER

Şekil.1.1 Oksidatif Stres, serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik	3
Şekil.1.2. Süperoksit anyonunun diğer reaktiflerin oluşumundaki rolü	5
Şekil 1.3. 1. Basamak Savunma Antioksidanları	10
Şekil.3.1. Gpx Medyan Değerleri 0. Gün İkiz- Tekli Doğumlar	33
Şekil 3.2. Gpx Medyan Değerleri 45. Gün İkiz- Tekli Doğumlar	33
Şekil 3.3. Gpx Medyan Değerleri 0.-45.-90. Günler	34
Şekil 3.4. SOD Medyan Değerleri 0. Gün İkiz- Tekli Doğumlar	34
Şekil.3.5. SOD Medyan Değerleri 45. Gün İkiz- Tekli Doğumlar	35
Şekil.3.6. SOD Medyan Değerleri 0.-45.-90. Günler	35

ÇİZELGELER

Çizelge.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
Çizelge.2.2. Çalışmadan Kullanılan Cihazlar	20
Çizelge.3.1. 0. ve 45. Günlerde İkiz ve Tekli Doğumlara ait GPX-SOD Medyan; Çeyrekler Aralığı (IQR) değerleri	32
Çizelge.3.2. 0., 45., 90. Gün GPX-SOD Medyan; Çeyrekler Aralığı (IQR) değerleri	32



1. GİRİŞ

Yirmi yıldan fazla bir süredir, yapılmış birçok bilimsel çalışmada antioksidanların, beslenme ve sağlık açısından yararları ve serbest radikaller ile aralarında var olan negatif ilişki belirtilmiştir. Oksidatif stresin, birçok hastalığın patogenezesinde ve şekillenmesinde rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Giustarini ve ark., 2009).

Canlının antioksidan savunma sistemiyle serbest radikaller arasındaki dengenin oksidanlar lehine değişmesi oksidatif stres olarak isimlendirilmektedir (Sies, 1991). Oksidatif stres şekillenmesi durumunda organizmanın savunma mekanizmaları (antioksidan mekanizmalar) yeterli olamadığında hücrede oksidatif hasar gelişerek, hücrenin fonksiyonları aksamaktadır, ayrıca bu durum pek çok hastalığın patogenezesinde kritik rol oynamaktadır (Gutteridge, 1995).

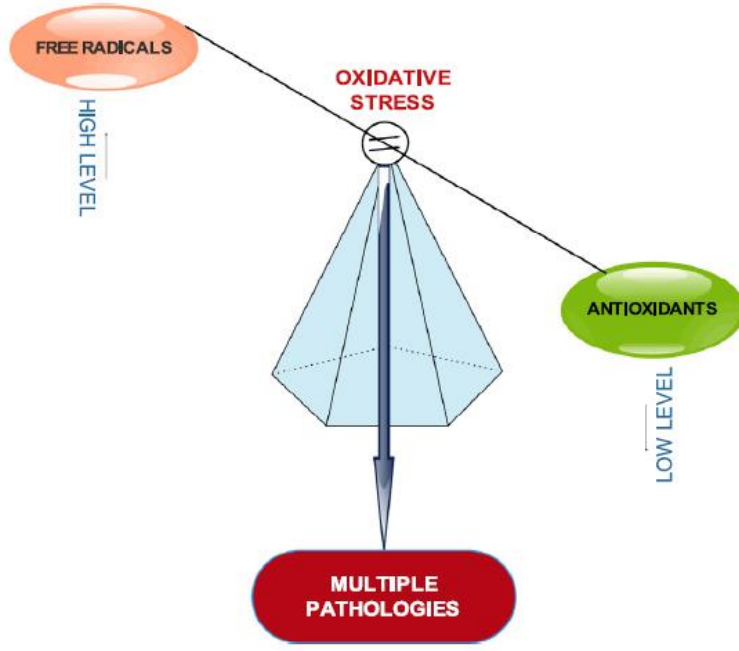
Oksidatif stres biyolojik sistemlerdeki yapı taşlarını olumsuz etkilemesi sebebiyle hücre yapısında önemli hasarlar meydana getirmektedir (Celi, 2011; Sies, 1995). Oksidatif stres durumunda canlının savunma mekanizmaları yetersiz kalırsa, hücrelerde oksidatif hasar gelişir ve hücrenin fonksiyonları önemli derecede aksar. Oksidatif doku hasarı, oksidan moleküllerinin hücrenin temel taşları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimler üzerindeki reaksiyonlarından kaynaklanır (Yu, 1999).

Son yapılan çalışmalarda oksidatif stresin birçok insan ve hayvan hastalığının başlangıcında veya oluşmasında kilit rol oynadığı bildirilmiştir (Ercan ve Fidancı, 2012; Ercan ve ark., 2014; Sordilla ve Aitken, 2009).

Lipid peroksitlerin oluşumu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun, doğumdan sonraki ilk haftalarda enerji azalması ve yağ mobilizasyonunun artmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu reaktif oksijen türleri canlılarda antioksidanlar ile nötralize edilmektedir. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve biyolojik sistemlerin bu reaktif ara ürünlerin temizlenmesinde savunma yeteneği arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olmaktadır (Castillo, 2005).

1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)

Oksijen yaşam için vazgeçilmez bir element olmasının yanı sıra bazı durumlarda canlılar için zararlı etkileri mevcuttur. Hücreler, enerji üretmek için oksijen kullandıkları sırada, ATP üretiminin bir sonucu olarak serbest radikaller oluşur. Bunlar genellikle hücrel redoks olayları sonucu şekillenen Reaktif Nitrojen Türleri (RNS) ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) dir. Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri hücre için, hem olumlu hem de olumsuz olarak etki gösterebilirler. Buradaki hassas olan denge hücre için oldukça önemlidir. Düşük veya orta düzeylerde, ROS ve RNS hücrel yanıt ve hücrenin bağışıklık fonksiyonu üzerinde yararlı etkiler gösterir. Yüksek düzeylerde ise, tüm hücrel yapılara zarar vererek oksidatif stres oluştururlar. Oksijen – serbest radikal teorisi yaklaşık 50 yıldır bilinmektedir. Bununla birlikte antioksidanların canlı organizma için yararlı etkilerinin keşfi ile ilgili çalışmalar son 20 yıllık süreç içerisinde oldukça artmıştır (Lien ve ark., 2008).



Şekil.1.1.Oksidatif Stres, serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

1.2. Serbest Radikaller, Özellikleri ve Oksidanlar

ROS ve RNS, serbest radikalleri ve oksidanlar olarak da adlandırılan diğer radikal olmayan reaktif türevleri tanımlayan terimlerdir. Radikaller radikal olmayan türlere göre daha az stabildir, reaktiviteleri genellikle daha güçlüdür. Dış yörüngesinde, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektronu olan bir moleküle serbest radikal denir (Poljsak ve ark., 2013; Riley, 1994). Serbest radikaller, her bir parçanın bir elektron tutması, bir radikalın diğer bir radikale ayrılması ve ayrıca redoks reaksiyonları yoluyla bir kimyasal bağın kırılması ile oluşur. Serbest radikaller arasında Hidroksil (OH^*), Süperoksit (O_2^{*-}), Nitrik Oksit (NO^*), Azot Dioksit (NO_2^*), Peroksil (ROO^*) ve Lipid Peroksil (LOO^*) sayılabilir. Dolayısıyla, biyolojik serbest radikaller, lipidler, proteinler, DNA gibi çeşitli organik substratlarla reaksiyona girebilecek elektrona sahip olan oldukça kararsız moleküllerdir (Halliwell ve Gutteridge, 2007).

1.3. Serbest Radikallerin ve Oksidanların Üretimi

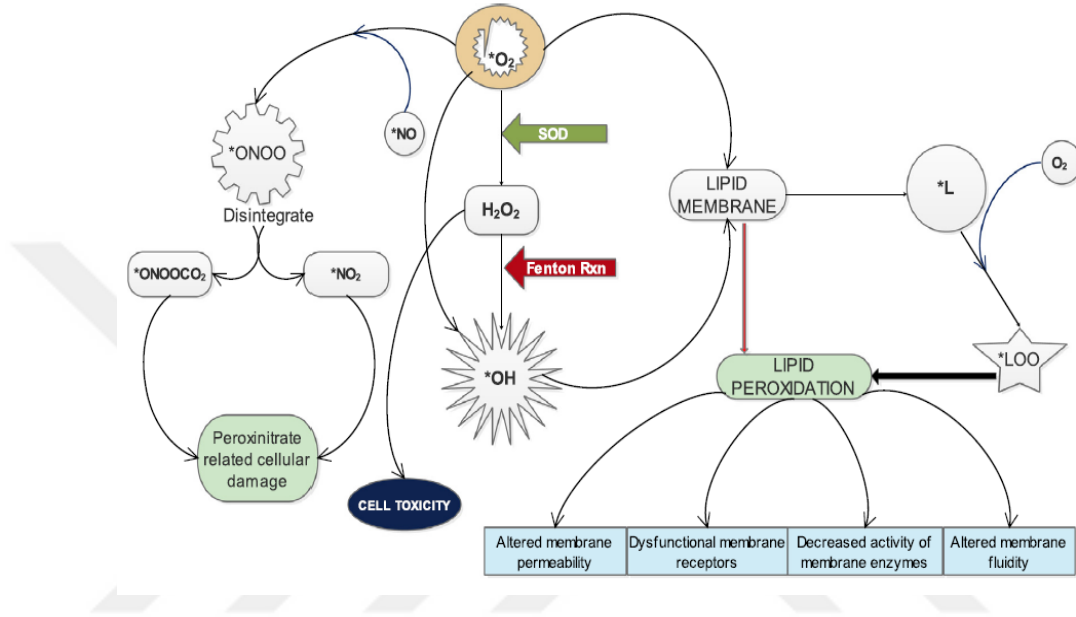
ROS ve RNS oluşumu hücrelerde iki yolla meydana gelebilir: enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar. Serbest radikal üreten enzimatik reaksiyonlar solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P450 sisteminde yer alır (Lien ve ark., 2008).

Örneğin, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$), NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, peroksidazlar gibi çeşitli hücrel oksidaz sistemleri aracılığıyla üretilir. Bunlar oluşturulduktan sonra, hidrojen peroksit, hidroksil radikal (OH^{\bullet}), peroksinitrit ($ONOO^{\bullet-}$), hipokloröz asit ($HOCl^{\bullet}$), vb. gibi çeşitli ROS ve RNS üreten çeşitli reaksiyonlara katılır. H_2O_2 (radikal olmayan) aminoasit oksidaz ve ksantin oksidaz dahil olmak üzere birçok oksidaz enziminin etkisiyle üretilir. Sonucusu hipoksantin ksantin ve ksantinin ürik aside oksidasyonunu katalize eder. *In vivo* olarak en reaktif serbest radikal olan hidroksil radikali (OH^{\bullet}), $O_2 \cdot Fe$ 'nin H_2O_2 ile Fe^{+2} veya Cu^+ (katalizör) varlığında reaksiyonu ile oluşur. Bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak bilinir (Droge, 2002; Valko ve ark., 2004; Valko ve ark., 2007). Hipokloröz asit ($HOCl$), H_2O_2 varlığında klorür iyonlarını oksitleyen nötrofil türevli miyeloperoksidaz tarafından üretilir.

Nitrik oksit sentaz ile L-argininin sitrüline oksidasyonundan biyolojik dokularda nitrik oksit radikali (NO^{\bullet}) oluşur. Serbest radikaller, oksijenin organik bileşiklerle, iyonize radyasyonun oluşması, gibi enzimatik olmayan reaksiyonundan şekillenebilir. Non-enzimatik işlem, mitokondride oksidatif fosforilasyon (yani aerobik solunum) sırasında da meydana gelebilir (Droge, 2002; Genestra, 2007; Valko ve ark., 2007).

ROS ve RNS, endojen veya eksojen kaynaklardan üretilir. Endojen serbest radikaller, bağışıklık hücresi aktivasyonu, iltihaplanma, zihinsel stres, aşırı egzersiz, iskemi, enfeksiyon, kanser, yaşlanma sonucu oluşur. Eksojen ROS / RNS hava ve su kirliliği, sigara dumanı, alkol, ağır veya geçiş metalleri (Cd, Hg, Pb, Fe, As), bazı

ilaçlar (siklosporin, takrolimus, gentamisin, bleomisin), endüstriyel çözücüler, pişirme (füme) sonucu oluşur. Vücuda farklı yollarla nüfuz ettikten sonra, bu eksojen bileşikler serbest radikallere ayrıştırılır veya metabolize edilir (Lien ve ark., 2008).



Şekil.1.2. Süperoksit anyonunun diğer reaktiflerin oluşumundaki rolü (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

1.4. Serbest Radikaller ve Oksidanların Yararlı Etkileri

Düşük veya orta konsantrasyonlarda, ROS ve RNS hücrel yapıların olgunlaşma süreci için gereklidir. Aslında, fagositler (nötrofiller, makrofajlar, monositler), vücudun hastalıklara karşı savunma mekanizmasının bir parçası olarak istilacı patojen mikroorganizmaları yok etmek için serbest radikalleri serbest bırakırlar (Droge, 2002; Young ve Woodside, 2001).

ROS üretiminin bağışıklık sistemi tarafından önemi, granüloamatöz hastalığı olan hastalar tarafından açıkça örneklenmiştir. Bu hastalar, NADPH oksidaz sistemindeki

defekte bağılı olarak süperoksit anyon radikalini üretemezler bu durum çoklu ve kalıcı enfeksiyona yol açar (Droge, 2002; Valko ve ark., 2007).

ROS ve RNS'nin diğere yararlı etkileri, bir dizi hücrese l sinyal sisteminin işlevindeki fizyolojik rolleridir (Genestra, 2007; Halliwell, 2007; Pacher ve ark., 2007). Örneğ in, nitrik oksit (NO), kan akışını, trombozunu ve nöral aktiviteyi modüle etmek için bir hücreler arası habercidir. NO, spesifik olmayan konak savunması ve hücre iç i patojenleri ve tümörleri öldürmek için de önemlidir (Pacher ve ark., 2007).

Serbest radikallerin bir başka yararlı aktivitesi mitojenik yanıtın indüksiyonudur. Kısaca, ROS / RNS düşük veya orta seviyelerde insan sağlığı için hayati önem taşımaktadır (Genestra, 2007; Pacher ve ark., 2007).

1.5. Serbest Radikallerin ve Oksidanların Zararlı Etkileri

Serbest radikaller ve oksidanlar fazla miktarda üretildiğ inde, hücre zarlarını ve proteinler, lipitler, lipoproteinler ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi yapıları ciddi biçimde değıştirebilen, zararlı bir süreç olan oksidatif stres olarak adlandırılan bir fenomen oluştururlar (Lien ve ark., 2008).

Hücreler oluş an serbest radikallerin fazlalığını yeterince yok edemediğ inde oksidatif stres ortaya çıkabilir. Başka bir deyiş le, oksidatif stres, ROS / RNS'nin oluş umu ve nötralizasyonu arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Örneğ in, fazla miktarda hidroksil radikal ve peroksinitrit, lipit peroksidasyonu adı verilen bir iş leml e hücre zarlarına ve lipoproteinlere zarar verebilir. Bu reaksiyon, sitotoksik ve mutajenik olan malondialdehid (MDA) ve konjuge dien bileş iklerinin oluş umuna yol açar. Lipid peroksidasyonu bir radikal zincir reaksiyonu ile meydana gelir, yani bir kez başlatıldığında, hızla yayılır ve çok sayıda lipit molekülü etkiler (Frei, 1997).

Proteinler, ROS / RNS tarafından da zarar görebilir ve bu da yapısal değişikliklere ve enzim aktivitesinin kaybına yol açar (Frei, 1997; Halliwell, 2007). DNA'da oksidatif hasar, mutasyonlara neden olabilen farklı oksidatif DNA lezyonlarının oluşmasına yol açar. Vücudun DNA onarım enzimleri ve / veya antioksidanlar kullanarak bu ataklara karşı koymak için çeşitli mekanizmaları vardır (Lien ve ark., 2008).

1.6. Antioksidanlar ve Sağlık

Vücutta doğal olarak üretilen (endojen antioksidanlar) veya dışarıdan gıdalarla (eksojen antioksidanlar) sağlanan antioksidanlar vasıtasıyla oksidatif stresi önlemeye yönelik çeşitli mekanizmalar yer almaktadır. Antioksidanların rolleri, serbest radikallerin fazlalığını nötralize etmek, hücreleri toksik etkilerine karşı korumak ve hastalıkların önlenmesine katkıda bulunmaktır (Lien ve ark., 2008).

1.7. Antioksidanların Sınıflandırılması

Hücrelerdeki endojen bileşikler, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir. ROS ve RNS'nin nötralizasyonunda doğrudan rol oynayan başlıca antioksidan enzimler şunlardır:

- Süperoksit Dismutaz (SOD),
- Katalaz (CAT),
- Glutatyon Peroksidaz (GPx)
- Glutatyon Reduktaz (GRx)

Serbest radikallere karşı ilk savunma hattı olan SOD, süperoksit anyon radikali (O_2^-)'nin indirgenerek hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşürülmesini katalize eder.

Oluşan oksidan (H_2O_2), katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPx) ile su ve oksijene (O_2) dönüştürülür. Selenoprotein GPx enzimi, indirgenmiş glutatyonu (GSH) oksitlenmiş glutatyon (GSSG) çevirmek suretiyle H_2O_2 'yi ortadan kaldırır. Bir flavoprotein olan glutatyon redüktaz, GSSG'den GSH'yi yeniden üretir. Hidrojen peroksidin yanı sıra GPx, lipit veya non-lipid hidroperoksidleri de azaltır (Droge 2002; Valko ve ark., 2004; Young ve Woodside, 2001).

.Enzimatik olmayan endojen antioksidanlardan olan (lipoik asit, glutatyon, L-ariginin, koenzim Q10, melatonin, ürik asit, bilirubin, metal şelatlama proteinleri, transferrin vb.) vücutta metabolizma ile üretilir. Ekzojen antioksidanlardan olan (E vitamini, C vitamini, karotenoidler, eser metaller (selenyum, manganez, çinko) flavonoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri vb.) gıda veya takviye yoluyla alınabilir (Droge, 2002; Willcox ve ark., 2004).

1.8. Antioksidanların Etki Düzeyi

Canlı sistemlerdeki antioksidan savunma mekanizmasını oluşturan antioksidan molekülleri farklı seviyelerde etki gösterir. Bu seviyeler radikal önleyici, radikal temizleyici ve radikal kaynaklı hasar onarımı olabilir. Savunma hattına dayanarak, antioksidanlar birinci basamak savunma antioksidanları, ikinci basamak savunma antioksidanları, üçüncü basamak savunma antioksidanları ve dördüncü hat savunma antioksidanları olarak dört grupta incelenebilir.

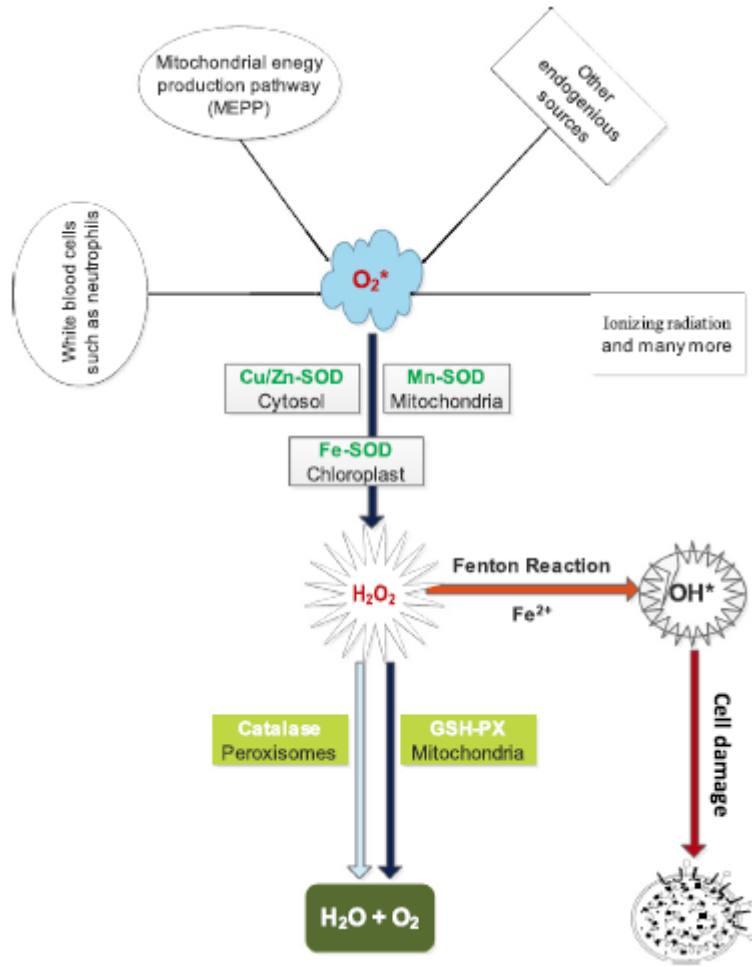
1.8.1. Birinci Basamak Savunma Antioksidanları

Bunlar hücrelerde serbest radikallerin veya reaktif türlerin oluşumunu baskılayan veya önleyen bir antioksidan grubudur.

Serbest radikal haline gelme potansiyeli olan herhangi bir molekülü veya diğer radikallerin üretimini inhibisyon kabiliyetine sahip olup, serbest radikalleri nötralize etmede çok hızlıdır.

Üç anahtar enzim bu grupta yer alır: Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutasyon Peroksidaz. Bu enzimler sırasıyla süperoksit radikalini, parçalama hidrojen peroksitlerini ve hidroperoksitleri zararsız moleküllere (H_2O_2 / alkol ve O_2) dönüştürmede görev alır.

Bu gruptaki antioksidanlar ayrıca, sırasıyla demir ve bakırı şelatlayan veya sekestre eden ve dolayısıyla serbest radikal oluşumunu önleyen transferin ve seruloplazmin gibi metal iyon bağlayıcı proteinleri içerir (Şekil 1.3) (Ighodaro ve Akinloye, 2018).



Şekil 1.3. 1. Basamak Savunma Antioksidanları (Ighadaro ve ark., 2018).

1.8.2. İkinci Basamak Savunma Antioksidanları

Bu antioksidanlar grubuna sıklıkla temizleyici antioksidanlar denir. Zincir başlangıcını engellemek ve zincir yayılma reaksiyonlarını kırmak için aktif radikalleri temizlerler. Serbest radikalleri kendilerine elektron bağışlayarak nötralize eder veya temizlerler ve bu süreçte serbest radikallerin kendileri olurlar ancak daha az zararlı etkiler yaparlar.

Bu “yeni radikaller” kolayca nötralize edilir ve bu gruptaki diğer antioksidanlar tarafından tamamen zararsız hale getirilir. Askorbik asit, ürik asit, hidrofilik olan alfa

tokoferol (E vitamini) ve lipofilik olan ubikuinol içeren antioksidanlar bu kategoriye girer. (Ighodaro ve Akinloye, 2018)

1.8.3. Üçüncü Basamak Savunma Antioksidanları

Serbest radikal hasarı oluştuktan sonra bu gruptaki antioksidanlar devreye girmektedir. Serbest radikallerin biyomoleküllere verdikleri hasarı gideren ve hasarlı hücre zarını sulandıran de novo enzimleridir. Hasarlı DNA, protein ve lipidlerin onarımı için bir grup enzimdir. Ayrıca vücut dokuları için toksik olabilecek birikimlerini önlemek için bir çeşit "temizlik görevi" yaparlar, okside olmuş veya zarar görmüş proteinleri, DNA ve lipidleri tanırlar, yıkarlar ve temizlerler. Yaygın örnekler arasında, hem sitozolde hem de DNA'da bulunan DNA onarım enzimi sistemleri (polimerazlar, glikozilazlar ve nükleazlar), proteolitik enzimler (proteazlar, proteazlar ve peptidazlar) bulunur. (Ighodaro ve Akinloye, 2018)

1.8.4. Dördüncü Basamak Savunma Antioksidanları

Bu antioksidanların etkisi temel olarak serbest radikallerin üretimi için gerekli sinyalleri ve bu serbest radikallerin oluşumunu veya reaksiyonunu önlemek için gerekli sinyalleri kullandıkları bir adaptasyon mekanizmasını içerir (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

Oluşan serbest radikalden üretilen sinyal, uygun bir antioksidanın oluşumunu ve doğru yere taşınmasını sağlar (Niki, 1993).

1.9. Antioksidan Süreci

Bir antioksidan serbest radikali tahrip ettiğinde, bu antioksidanın kendisi oksitlenir. Bu nedenle, antioksidan kaynakları vücutta sürekli olarak restore edilmelidir. Bu nedenle, belirli bir sistemde bir antioksidan serbest radikallere karşı etkili olurken, diğer sistemlerde aynı antioksidan etkisiz olabilir. Ayrıca, bazı durumlarda, bir antioksidan, bir pro-oksidan olarak da işlev görebilir. Toksik ROS / RNS üretebilir (Young ve Woodside, 2001).

Antioksidan süreç iki yoldan biriyle çalışabilir: zincir kırma veya önleme. Zincir kırılması için, bir radikal salındığında veya bir elektron alındığında, ikinci bir radikal oluşur. Sonucusu, aynı hareketi başka bir molekül üzerinde uygular ve oluşan serbest radikal, zincir kırıcı bir antioksidan (Vitamin C, Vitamin E, karotenoidler vb.) ile stabilize olana kadar devam eder veya basitçe bir üreme ürünü haline gelir. Böyle bir zincir reaksiyonunun klasik örneği lipit peroksidasyondur. Önleyici yol için, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi bir antioksidan enzim, örneğin, serbest radikalleri başlatmayı veya bakır ve demir gibi geçiş metali radikallerini stabilize ederek, zincir başlatma hızını azaltarak oksidasyonu önleyebilir (Young ve Woodside, 2001).

1.10. Oksidatif Stres Düzeyinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Oksidatif stresin varlığı üç yoldan biriyle test edilebilir:

- (1) ROS'un doğrudan ölçümü;
- (2) Biyomoleküllerde ortaya çıkan hasarın ölçülmesi;
- (3) Antioksidan seviyelerinin saptanması

Doğrudan ROS ölçümü tercih edilen yöntem gibi görünebilir, ancak birçok reaktif oksijen türü aşırı derecede kararsızdır ve doğrudan ölçmek zordur. Bu nedenle, birçok bilim adamı proteinler, DNA, RNA, lipitler veya diğer biyomoleküller

üzerindeki hasarı ölçmeyi tercih etmektedir. Bu dolaylı bir yaklaşım olsa da, birçok hasar belirleyicisi aşırı derecede stabildir ve bu nedenle oksidatif stresi ölçmek için daha güvenilir bir yöntem sağlar. Başka bir yaklaşım ise, hücrede oluşan ROS'un dengelenmesine hizmet eden antioksidan enzimlerin ve diğer redoks moleküllerinin seviyelerini ölçmektir. Katalaz ve süperoksit dismutaz gibi spesifik antioksidan enzimlerin aktivitesini ölçmek için deneyler mevcuttur. Ek olarak, bazı biyomoleküllerin ve gıda ekstraktlarının antioksidan kapasitesini test edebilen analizler de mevcuttur. Oksidatif stresi ölçmek için analizleri seçme işlemi, ilk olarak incelenecek olan örnek tipini belirleyerek başlamalıdır. Oksidatif stresin birçok belirteçleri vardır, ancak bazı örneklerde (hücreler, dokular, idrar, kan, vb) daha kolay saptanır. (Palmieri ve Splendorio, 2007)

1.10.1. Süperoksit Dismutaz

Canlılarda, antioksidan savunma sisteminin parametreleri olan serum Glutasyon Peroksidaz (GPx), Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimleri enzimatik antioksidan olarak etki gösterir. SOD, oksijen serbest radikallerini oksijene ve daha az toksik olan, hidrojen peroksit'e dönüştürür (Asada, 1976).

Fridovich (1986) tarafından yapılan bir çalışmada manganez, bakır, çinko içeren 3 çeşit SOD olduğu bildirilmiştir, ayrıca sığır sütünde bakır, çinko içeren SOD tespit edilmiştir (Asada, 1976; Korycka-Dahl ve ark., 1979).

Sığır süt serumundaki bakır, çinko SOD enzimi ile, sığır eritrositindeki bakır, çinko SOD enziminin molekül ağırlığı, elektroforetik özellikleri ve spesifik aktivitesi aynıdır (Asada, 1976; Hill, 1975). Yapılan bir çalışmada ise (Kiyosawa ve ark., 1983) insan sütündeki mangan-SOD aktivitesinde tespit edilmiştir.

Sığır SOD enziminin molekül ağırlığı 33 kDa'dır (Evans

ve ark., 1974). Her bir monomeri yaklaşık olarak 153 aminoasit, bir disülfid köprüsü, bir bakır +2 iyonu ve bir çinko +2 iyonu içerir. Bakır +2 iyonu elektron transferinden sorumludur (Fridovich, 1974). SOD rennet ile kazein çöktürüldükten sonra, kısmen yağı alınmış süttten saflaştırılmıştır (Hill, 1975).

Yapılan bir çalışmada (Asada, 1976) SOD'ın süt kremasında bulunmadığı ancak yağsız sütte bulunduğu tespit edilmiştir. Sütteki SOD aktivitesi çeşitli inek ırkları arasında farklılıklar gösterir. Süt serumundaki ortalama SOD aktivitesi Holştayn cinsi ineklerde 0.92 U/ml ve Jerseylerde 1.27 U/ml olarak tespit edilmiştir (Kankare ve Antila, 1982). İnek sütündeki SOD miktarı laktasyon döneminden ve ineğin yaşından etkilenen bir durum değildir. Ayrıca SOD düzeyinde sabah ve akşam sağımlarında yapılan ölçümlerde değişim saptanmamıştır ancak somatik hücre sayısında bu ölçümlerde farklılık saptanmıştır (Hicks, 1980). İnek Sütündeki SOD konsantrasyonu sığır kanından yaklaşık 100 kat daha düşük olduğu saptanmıştır (Hoolbrook ve Hicks, 1978). İnsan sütündeki SOD konsantrasyonu sığır sütünden yaklaşık 2 ile 2.3 kat daha yüksek tespit edilmiştir (Kiyosawa ve ark., 1993).

Serbest radikallerin oluşturduğu yıkıcı etkinin önlenmesinde, SOD enziminin katalaz enzimi ile birlikte incelenmesi gerektiği, yapılan çalışmalarda ileri sürülmüştür. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksit, oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenir (Nageswararao ve ark., 1969).

1.10.2. Katalaz

Organizmanın aerobik hücrelerinde, özellikle karaciğer ve eritrositlerde bol miktarda bulunan bir enzimdir. Kalp, beyin ve iskelet kası ise az miktarda katalaz içerir (Garewal, 1997).

Katalaz hidrojen peroksiti etkin bir biçimde su ve moleküler oksijene ayrışmasını katalize eden en aktif enzimlerdendir. Bu enzim daha çok peroksizomlarda lokalize olmakla birlikte, kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek oranda bulunur (Scibior ve Czechot, 2006).

Katalaz molekülü her biri 60 kDa olan 4 adet alt üniteden oluşmakta olup, toplam molekül ağırlığı 240 kDa'dır. Çiğ sütün ortalama katalaz aktivitesi polaritmetik metodla 1.95 IU/ml olarak belirlenmiş, Kasım ayında toplanan numunelerde Nisan ayına göre katalaz aktivitesi daha yüksek bulunmuştur (Hirvi ve Griffiths, 1998). Read ve ark. (1969) tarafından yapılan çalışmada katalaz aktivitesinin somatik hücre sayısı ile korelasyon içinde olduğunu göstermiştir. Katalaz aktivitesinin somatik hücre sayısı ile korelasyon içinde olduğu ortaya konmuştur.

1.10.3. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon Peroksidaz, hidrojen peroksit dahil pek çok peroksidin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Glutasyon Peroksidaz, H₂O₂'nin yıkımında hidrojen vericisi olarak Glutasyon'u kullanır. Glutasyon'un rejenerasyonu, Glutasyon redüktaz ile katalizlenir. Glutasyon Peroksidaz ayrıca büyük moleüllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden de sorumludur (Gutteridge ve Halliwell, 1997).

Glutasyon Peroksidaz ilk kez 1957 yılında Mills tarafından sığır eritrositlerinde tespit edilmiştir. En iyi bilinenler hücreyel Glutasyon Peroksidaz ve plazma glutasyon peroksidazdır ve bunlar homotetramer yapı olan kovalent olmayan bağa sahip 4 alt üniteden oluşur. Sığır plazma glutasyon peroksidazı 226 aminoasitten oluşan 24860 dalton ağırlığında alt ünitelerden oluşur. Çiğ sütteki glutasyon peroksidaz aktivitesi 12-32 U/ml arasında ölçülmüş ve selenyum konsantrasyonu ile arasında kuvvetli korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar glutasyon peroksidazın sığır sütünde selenyumun biyolojik aktif maddesi olabileceği görüşünü desteklemektedir (Debski ve ark., 1987; Hojo, 1982).

Yapılan bir çalışmada glutasyon peroksidaz ile total peroksidaz aktivitesinin ilişkisi insan sütünde %29, sığır sütünde %27, keçi sütünde %65 bulunmuş, Glutasyon peroksidaz aktivitesinin sığır sütünde insan sütüyle yakın oranda olduğu 31-39 U/ml tespit edilmiştir (Bhattacharya ve ark. 1988; Debski ve ark. 1987; Hojo, 1986). Süt ile ilgili yapılan çalışmalarda glutasyon peroksidaz aktivitesi 150-170 ve 92-96 kDa'a karşılık gelen aralıklarda olduğu tespit edilmiştir (Bhattacharya ve ark., 1988; Debski ve ark., 1987).

İnsanlarda anne sütünün laktasyon dönemi boyunca oksidan ve antioksidan aktivitesi araştırılmış ve büyüyen bebeğin antioksidanlara karşı olan ihtiyacının değiştiği ve anne sütündede aynı oranla bu antioksidan enzimlerin düzeylerinin düştüğü belirlenmiştir (Yüksel ve ark., 2015).

Ermiş ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada sigara içen ve içmeyen annelerin sütlerindeki antioksidan durum araştırılmış, çalışma sonucunda sigara içen annelerin serum ve sütlerinde oksidatif stres düzeyinin, sigara içmeyen annelere göre daha fazla olduğu bulunmuştur.

1.11. Kaliforniya Mastitis Testi (CMT)

Mastitis kısaca, meme bezinin yangılanması olarak tanımlanabilir bu durum süt inekçiliğinden en yaygın olarak görülen ve ekonomik kaybın ciddi boyutlara ulaştığı bir hastalıktır (Homan ve Waatiaux, 1996). Hastalık süt veriminde düşme, sütün bileşiminde değişmeye neden olur. Mastitis sonucu şekillenen süt kayıplarının yaklaşık %70-80'i subklinik mastitisten kaynaklanır (Janjen, 1970; Rice, 2006). Subklinik mastitise bağlı olarak sütte şekillenen değişimler, memeye plazma proteinleri geçmesi, iyon konsantrasyonlarında değişme, lokal hücre yıkımı nedeniyle

intrasellüler bileşiklerin süte geçmesi ayrıca sütte somatik hücre sayısının artması şeklinde görülür.

Mastitisli sütlerin elektriksel iletkenliği, iyon konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler sebebiyle yükselmektedir. Meme dokusunda meydana gelen hasara bağlı olarak laktoz ve potasyum konsantrasyonunda düşme şekillenirken, sodyum ve klor iyon konsantrasyonları yükselir (Nielen ve ark., 1992).

Sütteki somatik hücre sayısının tespiti, direk mikroskopi ile olabildiği gibi DNA fitler metodu, Counter, Fossamatik gibi direkt metodlarla da yapılabilmektedir. Ayrıca indirekt olarak CMT ile de yapılabilmektedir. CMT testi ilk kez 1957 yılında Schalm ve Noorlander tarafında geliştirilmiş bir testtir (Daniel ve ark., 1966). CMT sık kullanılan bir metoddur çünkü saha şartlarında uygulanabilme kolaylığı oldukça yüksektir (Baştan ve ark., 1997; Baştan, 2007).

CMT, CMT ayırıcı ile sütteki hücre materyal arasında gerçekleşen reaksiyona dayanır (Aynsheley ve Buol, 1965). Bu testte kullanılan Sodyum-Dodesil Sülfatın (SDS) hücre çekirdeği ve hücre zarını birbirinden ayırması sonucu DNA serbest kalır. Süt örneğindeki DNA miktarının fazlalığına bağlı olarak jelin kıvamı artar (Schalm ve ark., 1971).

Koyunlarda gebelik ve laktasyon dönemi hayvanın doku ve hücrelerinde oksidatif strese meyil oluşturur. Oksidatif stresin birçok belirteci vardır, ancak bazı örneklerde (hücreler, dokular, idrar, kan, süt vb) daha kolay saptanır. Oksidatif stresi ölçme işlemine, öncelikle çalışma materyalini belirleyerek başlamalıdır. Mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında fagositik hücrelerin serbest radikalleri açığa çıkardığı bilinmektedir. Meme enfeksiyonlarına bağlı oluşan oksidatif hasarın hatalı yorumlara yol açabilme ihtimalinden dolayı çalışma örnekleri CMT testi sonucu negatif olanlar arasından oluşturulmuştur.

Dokusal ve hücrel oksidatif stres dolaşım sistemi vasıtasıyla süte de yansıtılabileceği düşüncesiyle, bu çalışmada Konya Gözlu Tarım İşletmesi'nde

yetiştirilen Akkaraman koyunlardan tekli ya da ikiz doğum sonrası 0., 45. ve 90. günlerde alınan süt rneklelerinde oksidatif stres göstergesi bazı enzimlerin (SOD, CAT ve GPx) aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışması Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yürütüldü.

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.1.' de gösterildi.

Çizelge.2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

	Üretici Firma	Katalog Numarası
Na ₂ HPO ₄	Chem Cruz	SC-202342A
NaH ₂ PO ₄	Sigma	7558-79-4
Redükte Glutasyon	Sigma	EG/EC 200-725-4
NaOH	Merck	1.06462.1000
EDTA(C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ 2H ₂ O)	Sigma	092K0060
Na-Azid	Sigma	26628-22-8
Glutasyon redüktaz	Boehringer-Manheim	9001-48-3
NADPH+H ⁺	Merck	2646-71-1
Luperox	Sigma	75-91-2
Kloroform	Sigma	67-66-3
Etanol	Sigma	64-17-5
Ksantin (C ₅ H ₄ N ₄ O ₂)	abcr	69-89-6
SOD Assay Xanthine Oxidase	Cayman	706002-96-96
Amonyum Sülfat	Sigma	7783-20-2
Nitroblue Tetrazolium (NBT)	Sigma	298-83-9

Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma	497-19-8
Sığır Albumin	Sigma	9048-46-8
Bakır Klorür (CuCl ₂ ·2H ₂ O)	Sigma	7447-39-4
KH ₂ PO ₄	Merck	7778-77-0
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Santa Cruz Biotechn.	Sc-203402B
H ₂ O ₂	Sigma	7722-84-1
Bakır(II)-sülfat-5hidrat	Merck	2579373
K-Na Tartarat Tetrahidrat	Merck	A203785023
Sodyum Hidroksit	Merck	B0316462926
Potasyum İyodür	Malline Krodt Kanada	TF.1577

2.2. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 2.2.' de gösterildi.

Çizelge.2.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Üretici Firma	Model
Su Arıtma Cihazı (Ultra saf su)	Millipore	Synergy 185
ELISA Okuyucu	Tecan	Sunrise
Santrifüj	Sigma	3K30
Hassas terazi	Shimadzu	AUW320
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1700 Pharma Spec

2.3. Etik

Tez çalışması için, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvurulmuş olup 21/02/2018 tarihli toplantı, 2018-4-38 sayılı karar numarası ile etik kurul izni alındı.

2.4. Tez Çalışmasında Kullanılacak Hayvan Sayısının Belirlenmesi

Tez çalışmasında kullanılacak koyun sayısı, deney planlaması ve analizi ile ilgili bilgi ve tecrübeler ışığında araştırıldı. En az koyun sayısı; deneyin amacı ve literatür bilgileri doğrultusunda, grup sayısı 2, zaman tekrarı sayısı 3, tekrarlar arası korelasyon 0.6, Tip 1 hata 0.05, Güç 0.8, Etki Büyüklüğü 0.3 parametreleri ile G-Power 3.1 programından yararlanarak hesaplandı. Yapılan analiz sonucunda kullanılması gereken örneklem büyüklüğü toplamda 66 olarak tespit edildi.

2.5. Hayvan Materyali, Deney Gruplarının Oluşturulması

Tez çalışmamızın materyalini Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü Gözlü Tarım İşletmesinde bulunan 116 baş Akkaraman Koyunu oluşturdu. Tez çalışmasında kullanılacak Akkaraman Koyunları aynı sürüde bulunan klinik olarak sağlıklı, vücut ağırlıkları birbirine yakın olan hayvanlardan seçildi. Bütün hayvanlar doğal koşullar altında yarı açık ağılda beslendi. Tüm hayvanların sürekli olarak içme suyuna erişimleri vardı ve mineral tuz blokları yetiştirme periyodu boyunca kullanıldı.

Çiftlikte rutin olarak aşılama protokolleri uygulandı. Çalışma gruplarına dahil olan koyunlarda, herhangi bir hastalık tespit edilenler çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmamızın materyalini oluşturacak Akkaraman koyunlar 2 gruba ayrıldı.

1. çalışma grubu, ilk doğumunu yapan 1 kuzulu koyunlar, 2. çalışma grubu ilk doğumunu yapan iki veya daha fazla kuzulu koyunlardan oluştu.

Çalışma materyalimizi oluşturacak koyunlardan doğumu takiben yavru ağız sütünü tamamen aldıktan sonra (0. Gün), laktasyon döneminin ortasında (45. gün) ve laktasyonun son döneminde (90. gün) olmak üzere toplam 3 kez numune alındı. Toplamda 198 adet süt numunesi elde edildi. Alınan süt numuneleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı Laboratuvarlarında uygun metodlar kullanılarak SOD, Katalaz ve Glutasyon Peroksidaz aktivite ölçümleri yapıldı.

2.6. Süt Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Süt örnekleri alınması için, koyunlar ayakta tutularak meme başı antiseptik solüsyonla (%5 Zefiran) temizlendikten sonra, sağımla ilk süt alınmayıp, ikinci süt 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınır alınmaz soğukta muhafaza edilmiş ve zaman geçirmeden -20°C'lik derin dondurucuya aktarılarak analizlere kadar saklandı.

2.7. Süt Serumlarının Elde Edilmesi

Alınan süt numuneleri 2 ml'lik godelere 2'şer ml alınarak 30 dakika 26000xg'de santrifüj edildi. Üzerinde biriken yağ tabakası uzaklaştırılarak süt serumları toplanıp -20 °C'de saklandı.

2.8. Çalışılacak Testler ve Metodları

2.8.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü

Süperoksit Dismutaz enzim aktiviteleri Sun ve ark. (1988)'nin bildirdikleri yöntemle ölçüldü.

Testin Prensipleri

Enzimatik bir tepkime sonucunda oluşan süperoksit radikallerinin, ortamda bulunan Nitroblue Tetrazolium'u (NBT) indirgemesinin örnekteki SOD tarafından engellenmesi prensibine dayanır. Bu metotta süperoksit radikali üretimi ksantin-ksantin oksidaz enzimatik tepkimesiyle meydana gelir. Bu şekilde meydana gelen süperoksit radikalleri, NBT ile tepkimeye girerek bu maddeyi indirgemesi sonucu maksimum absorbanasını 560 nm'de veren formazon şekillenir. Ortama eklenen enzimin, meydana gelen süperoksit radikallerini dismutasyona uğratması sebebiyle, NBT redüksiyonu yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorban değerleri düşer. Kısaca, formazon şekillenmesinin inhibisyonunun tayin edilmesiyle SOD miktarı indirekt olarak belirlenir.

Kullanılan Çözeltiler

1. Kloroform: Analiz saflığında kullanıldı.
2. Absolut Etanol: Analiz saflığında kullanıldı.
3. Ksantin Stok Çözeltisi (3 mmol/L): 23 mg ksantin ($C_5H_4N_4O_2$) 50 ml'lik balon içerisinde 5 ml 0.1 NaOH ile çözüldü ve tridistile su ile hacim 50 ml'ye tamamlanarak +4°C'de saklandı. Çözelti 10 kat seyreltilerek kullanıldı.
4. Ksantin Oksidaz Enzim Çözeltisi: 25 U/ml aktiviteye sahip ksantin oksidaz enzim çözeltisinden 16 µl alınarak 2ml 2 M amonyum sülfat çözeltisi ile karıştırılarak kullanıldı.

5. Etilendiamintetraasetik Asit Çözeltisi (EDTA) (0.6 mmol/L): 0.233 g EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) tridistile su ile çözüldü oluşan bu karışımın hacmi 1 L'ye tamamlanarak $+4^\circ C$ 'de saklandı.

6. Nitroblue Tetrazolium Çözeltisi (NBT) (0.15 mmol/L): 12.3 mg NBT tridistile su ile çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı ve $+4^\circ C$ 'de saklandı.

7. Sodyum Karbonat Çözeltisi (400mmol/L) : 4.24 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) tridistile su ile çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı ve $+4^\circ C$ 'de saklandı.

8. Sığır Albümin Çözeltisi (1.0 g/L) : 100 mg sığır albümini tridistile su ile çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı ve $+4^\circ C$ 'de saklandı.

9. Bakır Klorür Çözeltisi (0.8 mmol/L) : 13.6 mg bakır klorür ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) tridistile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı ve $+4^\circ C$ 'de saklandı.

10. Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M): 26.4 G amonyum sülfat [$(NH_4)_2SO_4$] tridistile su ile çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı ve $+4^\circ C$ 'de saklandı.

Reaktif Karışımı (20 testlik): 20 ml ksantin çalışma çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6.0 ml sodyum karbonat çözeltisi ve 3.0 ml sığır albümin çözeltisi 100 ml'lik bir erlen içerisinde karıştırıldı.

Testin Yapılışı

Kör ve test işaretli deney tüplerine 2.45 ml reaktif karışımı eklendi. Kör tüpüne 0.5 ml bidistile su eklenerek üzerine süt serumu örneklerinde 1 ml alınıp 0.3 ml kloroform ve 0.5 ml etanol ilave edilerek 3000 RPM'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan berrak kısımdan 0.5 ml alınıp test tüpüne konuldu. Sonra tüplere 50 μ l ksantin oksidaz enzim çözeltisi eklenip karıştırıldı. 20 dakika $25^\circ C$ 'lik su banyosunda inkube edildi. İnkubasyon süresi sonunda 1 ml bakır klorür çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Oluşan rengin absorbanı 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okunarak sonuçlar elde edildi.

Testin Hesaplanması

SOD enzim aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formülden yararlanılarak yüzde inhibisyon hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left[\frac{\text{Körün absorbansı} - \text{Testin absorbansı}}{\text{Körün absorbansı}} \right] \times 100$$

Bir SOD ünitesi, NBT reaksiyonunu % 50 inhibe eden aktivite olarak kabul edildiğinden reaksiyon ortamında bulunan enzim aktiviteleri, bu ünite cinsinden hesaplandı ve U/g-protein olarak değerlendirildi.

2.8.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçümü

Paglia ve Valentine (1967) tarafından bildirilen ölçüm metoduyla glutasyon peroksidaz aktivitesi ölçüldü.

Testin Prensibi:

Glutasyon peroksidaz enziminin aktivitesi, indirgenmiş nikotinamid dinükleotid fosfatın (NADPH+H⁺) glutasyon redüktaz ile oksidasyonuna bağlı olarak ölçüldü. Glutasyonun, kumol hidroperoksit (C-OOH) ile glutasyon peroksidazın katalizörlüğünde, okside glutasyon (GSSG) ve su meydana gelir. Reaksiyon sonucu meydana gelen okside glutasyon, glutasyon redüktaz tarafından NADPH+H⁺ ile tekrar indirgenir. Redükte glutasyon miktarı (GSH) bu reaksiyon sonucu sabit kalır. NADPH+H⁺ ile NADP⁺ a dönüşür.

Kullanılan Çözeltiler

1. Sodyum Fosfat Tampon (PH 7.0) (100 mmol/L): 9 g Na_2HPO_4 ve 7 g NaH_2PO_4 500 ml tridistile suda çözülerek hacimce 500 ml olacak şekilde yapıldı. PH'sı 7.0'a getirilerek $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

2. Redükte Glutasyon (GSH) (20 mmol/L) 30.7 mg redükte glutasyon 5 ml tridistile suda çözülerek 1 N NaOH ile PH'sı 6.0'a ayarlandı. Testten yapılmadan önce hazırlanılarak kullanıldı.

3. EDTA (10 mmol/L): 372 mg EDTA 100 ml tridistile suda çözülerek, $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

4. Na-Azid (NaN_3) (20 mmol/L): 130 mg Na-Azid 100 ml tridistile suda çözülerek $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

5. Glutasyon Redüktaz (10 U/ML) 144 μl enzim ile 5.856 ml tridistile su eklenerek test yapılmadan önce hazırlanılıp kullanıldı.

6. $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (3 mmol/L): 12.5 mg $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 5 ml tampon ile eritilerek çalışmadan önce hazırlanıp kullanıldı.

7. Kumol Hidroperoksit (%80'lik $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$) (12.5 mmol/L): 115 μl C-OOH 50 ml tridistile su eklenerek çalışmadan önce hazırlanıp kullanıldı.

Testin Yapılışı

Kör ve test işaretli iki kuvartz spektrofotometre küveti hazırlandı. Önce kör işaretli küvete 1 ml sodyum fosfat tampon çözeltisi, 0.1 ml EDTA çözeltisi, 0.1 ml Na-Azid çözeltisi, 0.1 ml $\text{NADPH}+\text{H}^+$ çözeltisi, 0.1 ml redükte glutasyon çözeltisi, 0.2 ml glutasyon redüktaz enzim çözeltisi ile 0.2 ml bidistile su ilave edilerek 3 dakika 37°C 'de inkübe edildi. Fotometrede 3 dakika boyunca 366 nm dalga boyunda körün körü için absorbansta şekillenen değişiklikler yazıcı yardımı ile kaydedildi. Kör için aynı kuvartz küvete 0.2 ml C-OOH çözeltisi eklenerek işlem tekrarlandı. Bu işlemten sonra test işaretli kuvartz küvete 1 ml sodyum fosfat tampon çözeltisi, 0.1 ml Na-Azid çözeltisi, 0.1 ml $\text{NADPH}+\text{H}^+$ çözeltisi, 0.1 ml redükte glutasyon çözeltisi, 0.2 ml glutasyon redüktaz çözeltisi ile 0.2 ml süt numunelerinden elde edilen süpernatant konuldu ve tekrar 37°C 'de 3 dakika inkübe edildi. 3 dakika boyunca fotometrede 366

nm dalga boyunda testin körü için absorbansta oluşan değişiklikler kaydedildi. Test için kuvartz küvete 0.2 ml C-OOH çözeltisi ilave edilip ve son işlem tekrarlandı.

Testin Hesaplanması:

Absorbanstaki düşmeye bağlı olarak meydana gelen değişikliklerden aşağıda bulunan formül yardımı ile enzim aktivitesi tesbit edildi.

$$\text{GPx Aktivitesi} = \text{mmol NADPH+H}^+ / \text{dakika} = \frac{\Delta E \times V \times 1000}{\text{Dakika} \times d \times v \times \epsilon}$$

ΔE = Absorbansta meydana gelen düşme/ dakika

V = Küvetin toplam hacmi (2ml)

v = Test hacmi (0.2 ml)

d = Küvet ışık yolu (1 cm)

ϵ = 366 nm'de absorbans sabiti = 3.45 cm² / μmol (37 °)

GPx aktivitesi, nmol NADPH+H⁺ /dakika/ mg- protein olarak değerlendirildi.

2.8.3. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü

Süt serum örneklerinde katalaz enzim aktivitesi Aebi (1983) tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü.

Testin Prensipli

Uygun tampon içerisinde bulunan hidrojen peroksitin, katalaz enzimi etkisi ile yıkımlanmaya uğraması sonucu, bu maddenin 240 nm'de absorbans azalmasının

ölçülmesi esasına dayanır. Katalaz enzim aktivitesi, absorbansta görülen azalma hızı ile doğru orantılıdır.

Kullanılan Çözeltiler

1. Fosfat Tamponu (50 mmol/ L) (pH 7.0): 6,80 g KH_2PO_4 ve 13,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tridistile suda çözülerek 1 litreye tamamlandı ve pH 7.0'a ayarlanılıp +4 °C'de muhafaza edildi.

2. Fosfat tamponunda H_2O_2 çözeltisi (10 mmol/L): %35'lik H_2O_2 çözeltisinden 0.13 ml alınıp önceden hazırlanmış 100 ml fosfat tampon üzerine eklendi. Bu karışım 240 nm'deki absorbanının 0.5 ml olması gerekir. Okunan Absorbans, bu değerden küçük ise H_2O_2 , büyük ise tampon eklenerek absorbanının 0.5 olması sağlandı. H_2O_2 çözeltisi analizden önce taze olarak hazırlandı.

Testin Yapılışı

Her örneğin çalışılmadan önce örnekte bulunması olası olan ve 240 nm'de absorban verebilen maddelerin neden olabileceği absorban yükselmesini saptamak amacıyla kör deney hazırlandı.

Kör deney için kuvarz küvete 2.95 ml fosfat tampon üzerine 50 μl örnek konuldu ve spektrofotometre kör deney olarak kabul edilen bu küvete göre sıfırlandı. Test işaretli kuvarz küvete ise 2.95 ml fosfat tampon içerisinde hazırlanan H_2O_2 çözeltisi konulmuş ve 50 μl örnek ilave edildi. Küvetler alt üst edilerek karışmaları sağlanmış ve zaman geçmeden spektrofotometredeki yerine yerleştirildi. Spektrofotometreden absorbanstaki azalma takip edildi. Absorbansı 0.45'den 0.40'a inmesi için geçen süre tespit edildi ve aşağıdaki formülden yararlanılarak k hız sabiti hesaplandı. Absorbansın 0.45'den 0.40'a inmesi için gerekli sürenin 60 saniyeyi aşması durumunda örnek daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılarak, çok hızlı

düşmesi durumunda ise dilue edilerek test tekrarlandı. Sonuçlar k/g-protein olarak verildi.

Testin hesaplanması:

$$K = \frac{0,01175}{\Delta t} \text{ sn}^{-1}$$

2.8.4. Toplam Protein Düzeyi Ölçümü

Serum Toplam Protein düzeyinin ölçümü otoanalizörde Weichselbaum (1949) tarafından bildirilen biüret metodu ile ölçüldü.

Testin Prensipli

Örnekte bulunan peptid bağları, kuvvetli alkali ortamda bakır iyonları ile biüret isimli menekşe renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan rengin şiddeti örnekteki peptid bağları sayısı ile, kısaca protein miktarı ile doğru orantılıdır.

Kullanılan Çözeltiler

100 ml ayıraç hazırlamak için,

1. 0.15 g Bakır Sülfat Pentahidrat ve 0.6 g Sodyum Potasyum Tartarat hacim 50 ml'ye tamamlanacak şekilde bidistile suda çözüldü.
2. Daha sonra 30 ml %10 NaOH çözeltisinden eklendi ve 20ml bidistile su eklenerek hacim 100 ml'ye tamamlandı

3. Çözeltiye 0.1 g potasyum iyodür eklerek karanlıktı muhafaza edildi. Analizden hemen önce taze olarak biüret ayracı hazırlandı.

2.8.5. California Mastitis Testi (CMT)

California Mastitis Testi Rişvanlı ve Kalkan (2002)'ın tarif ettiği yöntemeye göre uygulandı.

CMT testi, sağımdan hemen önce, meme temizliğinden sonra alınmış süt örneklerine uygulandı. CMT testi çalışma grubuna dahil olan bütün hayvanlara yapıldı.

Test edilecek her süt numunesi için dört gözlü mastitis kabının bir gözü kullanıldı. Bu kuyucuklara eşit miktarda süt koyularak, üzerine eşit oranda CMT ayracı eklendi ve yavaşça çalkalandı.

2.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm veriler PASW Statistics 18 istatistik yazılımı kullanılarak analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro- Wilk testi kullanılarak yapıldı. SOD ve GPx gruplarındaki zamana ve doğum sayısına göre farklar parametrik olmayan Mann-Whitney U ve Kruskal- Wallis testleri ile kontrol edildi. Sonuçlar medyan; çeyrekler açıklığı (IQR) şeklinde ifade edilmiştir. Analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. (Hollander ve ark., 2013)

3. BULGULAR

Çalışmamızda, alınan süt örnekleri doğumu takiben yavru ağız sütünü tamamen aldıktan sonra (0. gün), laktasyonun 45. günü ve 90. günü olarak gruplandırıldı. Doğumdan sonra ve 45. günde koyunlar ikiz ve tek yavrulu olarak iki alt gruba ayrıldı ancak 90. günde işletmenin tüm hayvanları bir araya getirmesi nedeni ile ikiz ve tek yavru olarak ayırım yapabilmek mümkün olmadı. Yapılan istatistik analizler sonucu örnekler normal dağılıma uymadıklarından sonuçlar medyan ve çeyrekler açıklığı (IQR) şeklinde ifade edildi.

Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon peroksidaz enzim aktiviteleri sonucu değerler elde edilebilirken, Katalaz deneyleri sonucu örneklerde herhangi bir aktivite tespit edilemedi. Amonyum sülfat protein çöktürme tekniği ile örnekler konsantre hale getirilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra örnekler fosfat-tuz tamponu çözeltisinde tekrar çözülerek, örnekler tekrar analiz edilmesine rağmen öncekine benzer şekilde Katalaz aktivitesi belirlenemedi.

Süt serumu Glutasyon Peroksidaz aktivitesi, 0. gün için (yavru ağız sütünü tamamen aldıktan sonra) ikiz ve tek yavrulu hayvanların bulunduğu gruplar karşılaştırıldığında, gruplar arasında fark anlamlı bulundu. Günler arasında fark incelendiğinde ise, ikizlik ve tekli doğumdan bağımsız olarak 0.-45.-90. günlerde gruplar arası fark anlamlı tespit edildi ($p<0.05$). Çalışmada 0.- 45. ve 90. günler de aralarında karşılaştırıldığında gruplar arası fark anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Çizelge.3.1. 0. ve 45. Günlerde İkiz ve Tekli Doğumlara Ait GPx-SOD Medyan; Çeyrekler Aralığı (IQR) değerleri.

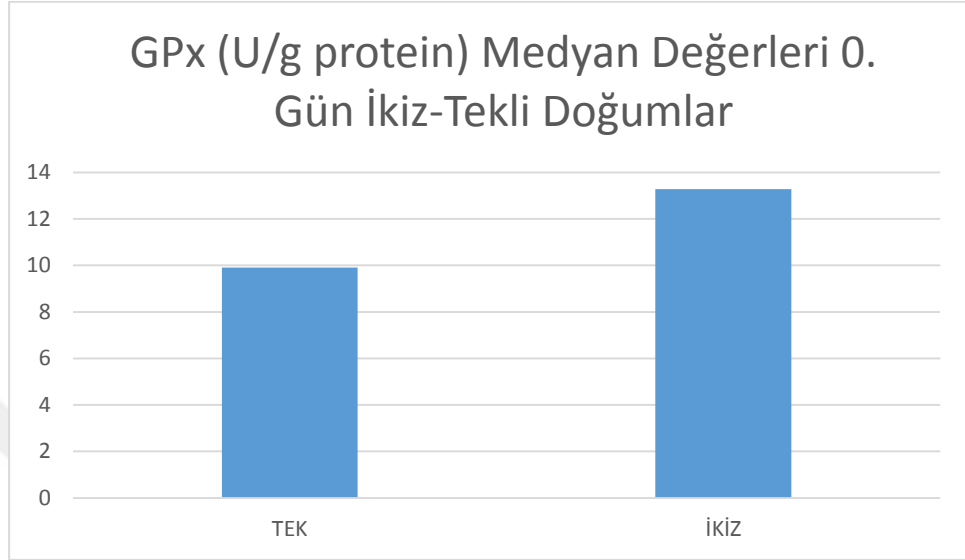
		GPx (U/ g protein) Medyan; IQR	SOD (U/g protein) Medyan; IQR
0.GÜN	TEK	9,913; 7,088 ^a n: 30	0,09827; 0,08824 ^a n:23
	İKİZ	13,381; 10,239 ^b n:31	0,10196; 0,15459 ^a n:26
45.GÜN	TEK	10,958; 7,67 ^{ab} n:30	0,0824; 0,07736 ^a n:26
	İKİZ	10,092; 9,221 ^{ab} n:31	0,0957; 0,06702 ^a n:28

^{a,b} aynı sütündeki farklı harfleri taşıyan gruplar arası fark istatistiksel açıdan önemlidir p<0,05.

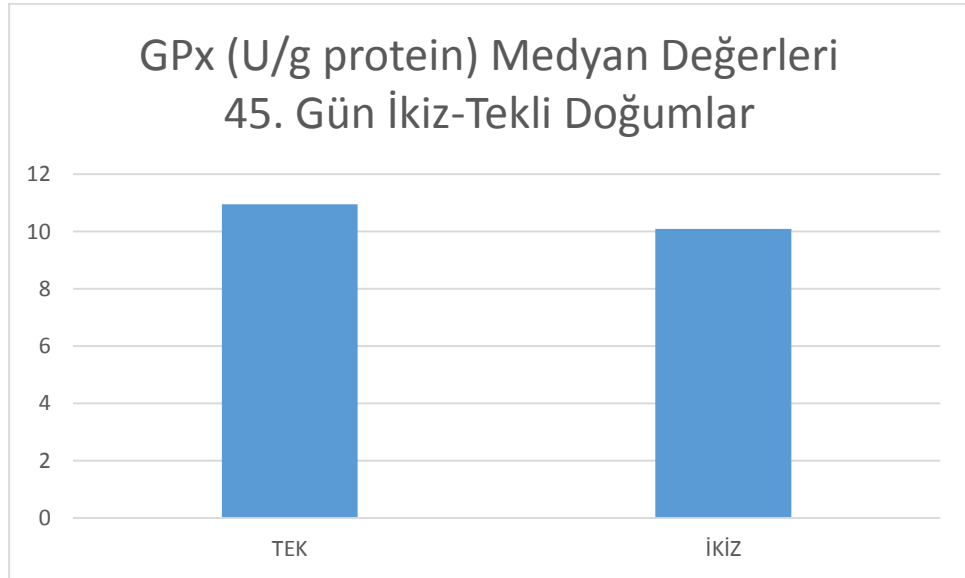
Çizelge.3.2. 0., 45., 90. Gün GPx-SOD Medyan; Çeyrekler Aralığı (IQR) değerleri.

	GPx (U/g protein) Medyan;IQR	SOD (U/g protein) Medyan;IQR
0.GÜN	11,315; 8,03 ^a n:61	0,0982; 0,10316 ^a n:49
45.GÜN	10,530; 8,25 ^b n:61	0,0860; 0,06638 ^a n:54
90.GÜN	22,739; 18,832 ^c n:59	0,0707; 0,09285 ^a n:52

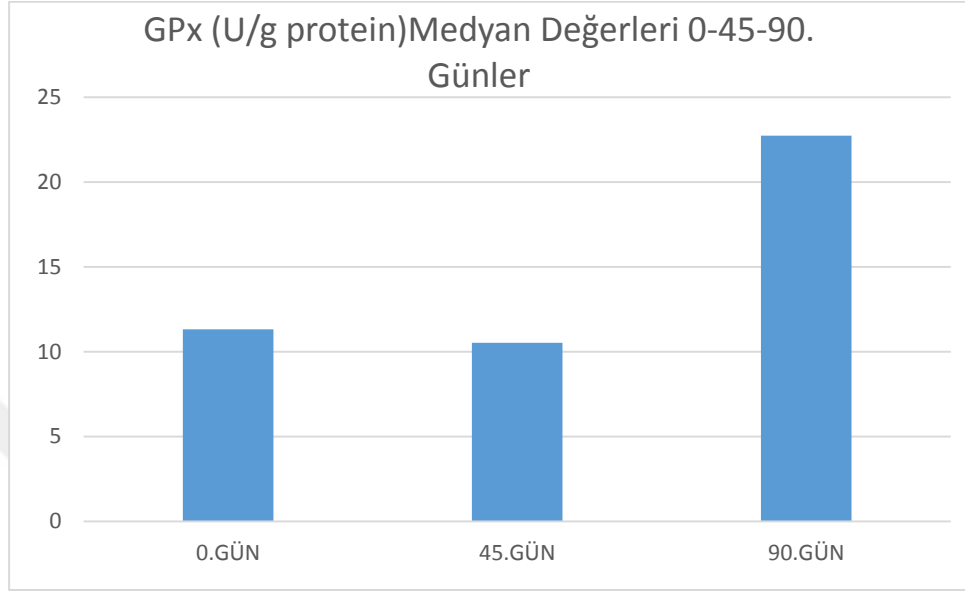
^{a,b,c} aynı sütündeki farklı harfleri taşıyan gruplar arası fark istatistiksel açıdan önemlidir p<0,05.



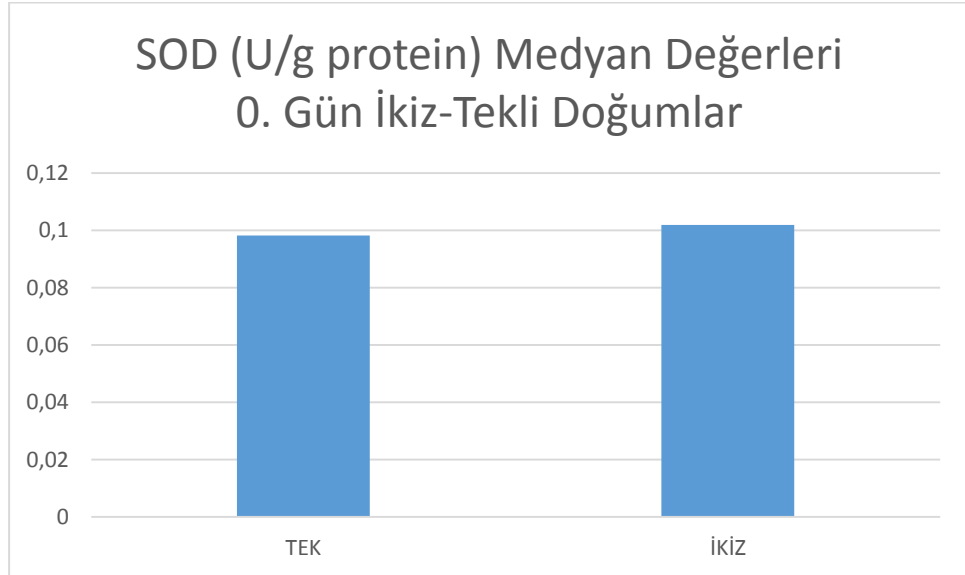
Şekil.3.1. GPx Medyan Değerleri 0. Gün İkiz-Tekli Doğumlar.



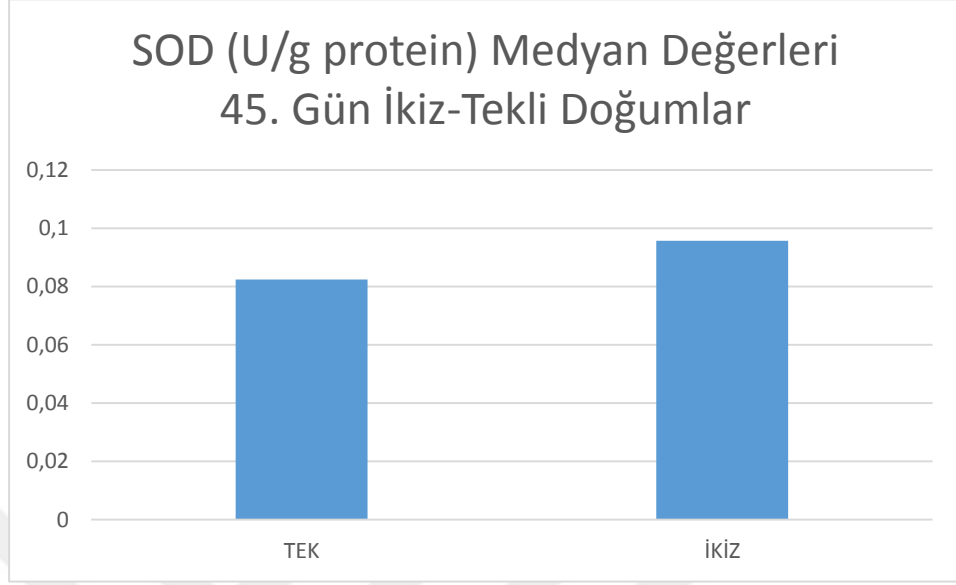
Şekil.3.2. GPx Medyan Değerleri 45. Gün İkiz-Tekli Doğumlar.



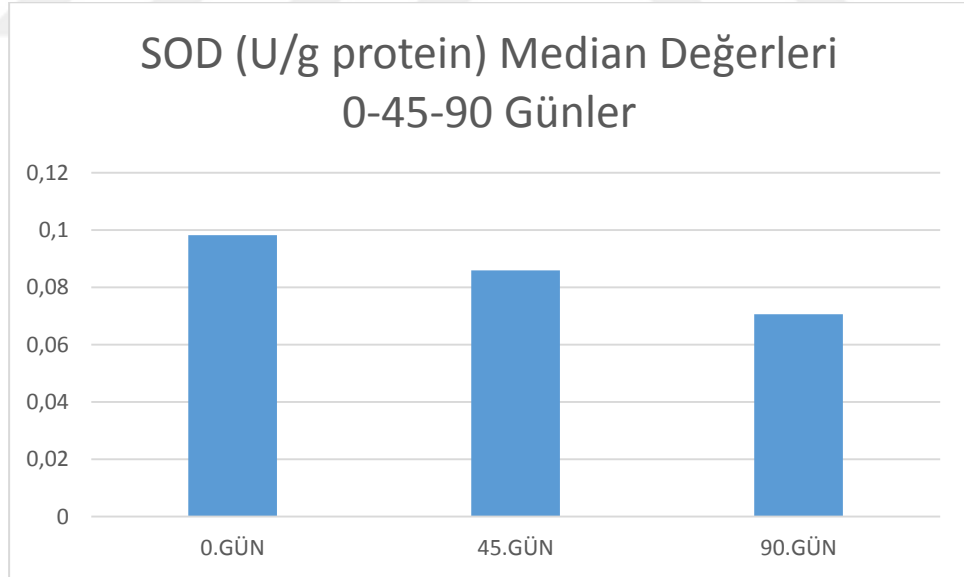
Şekil.3.3. GPx Medyan Değerleri 0.-45.-90. Günler.



Şekil.3.4. SOD Medyan Değerleri 0.Gün İkiz-Tekli Doğumlar.



Şekil.3.5. SOD Medyan Değerleri 45. Gün İkiz-Tekli Doğumlar.



Şekil.3.6. SOD Medyan Değerleri 0.-45.-90. Günler.

4. TARTIŞMA

Son yıllarda oksidatif stres ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Silve ve ark, tarafından oksidatif stresin tanımlanmasından sonra günümüze kadar geçen sürede oksidatif stres ve hastalıklar ve fizyolojik durumlar üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu tez çalışmasında oksidatif stres düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan Süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz ve Katalaz enzim düzeyleri, Akkaraman koyunlarında ikiz ve tek yavrulu doğumlarda, doğumu takiben yavru ağız sütünü tamamen aldıktan sonra, 45. ve 90. günlerde değerlendirilmiştir.

Laktasyon süresince, süt üretimine bağlı olarak enerji gereksinimi artmaktadır. Organizmanın bu koşullara uyumu artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest oksijen radikallerinin (FOS) oluşumu ile sonuçlanan metabolik olaylara yansır ve bununla birlikte normal şartlar altında, redoks homeostazı vücutta korunmaya çalışılır. Ruminantlarda, normal fizyolojik koşullar altında, antioksidan sistemin kapasitesi genellikle metabolik işlemler sırasında ortaya çıkan ROS'u nötralize etmek ve ortadan kaldırmak için yeterlidir. Redoks homeostazının sürdürülmesi periparturient ve pik laktasyon dönemleri için kritik önemde olduğu yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir. (Büyükoğlu ve Aslan, 2018; Tabakoğlu ve Durgut, 2013)

Yapılan ölçümler sonucunda, GPx değerleri yönünden 0. günde medyan değerleri, tek yavrulu hayvanların olduğu grupta 9,91 U/ g protein ikiz yavrulu hayvanların olduğu grupta medyan değeri 13,281 U/g protein olarak ölçülmüştür. 45. günde yapılan ölçümlerde ise ikiz ve tek yavrulu anaların sütlerindeki GPx düzeyleri incelenmiş aralarındaki fark istatistik yönden anlamlı çıkmamıştır, bu durumun ikiz yavruların gelişiminden kaynaklanan enerji açığı ve buna bağlı şekillenen oksidatif stresten olabileceği ya da laktasyon başlamasından sonra geçen sürede, meme dokusunun redoks homeostazının sağlanmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

GPx düzeyleri ikiz ya da tekli doğumdan bağımsız değerlendirildiğinde, 0., 45. ve 90. günlerde birbirlerinden istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklı olduğu görülmektedir, hatta 90. gün medyan değeri diğerlerine nazaran daha yüksek düzeyde ölçülmüş olup, bu farklılığın hayvanların kuru döneme geçiş aşamasına girmeleri ve buna bağlı şekillenen oksidatif değişimlere karşı meme dokusunun adaptasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

SOD düzeyleri tek yavrulu hayvanların olduğu grupta 0. günde 45. güne göre hafif düzeyde daha yüksek ölçülmüştür. 0.günde ikiz yavrulu hayvanların olduğu grupta ise, 45. gün ile kıyaslandığında bu farkın daha da azaldığı dikkat çekmektedir. SOD değerleri istatistik açıdan değerlendirildiğinde gruplar arası farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Pilarczyk ve ark., (2012) tarafından yapılan çalışmada, Holştayn cinsi ineklerde laktasyonun farklı dönemlerinde serum Glutasyon Peroksidaz aktivitesi araştırılmıştır. Kuru dönemde serumdaki ortalama GPx aktivitesi laktasyondaki ineklere göre iki kat daha düşüktü. ($p \leq 0.01$) Erken laktasyonda ilk yavruya doğan düvelere ve çok sayıda yavru doğuran ineklere kıyasla dört kat daha düşük bulunmuştur ($p \leq 0.01$). Birlikte analiz edilen tüm inekler için GPx aktivitesi ile serum selenyum konsantrasyonu arasında anlamlı bir ortalama ve pozitif korelasyon (0.46) bulunmuştur. Laktasyonun ilk dönemi sırasında ineklerin serumunda bulunan GPx aktivitesi, reaktif oksijen türlerinin ve bunların türevlerinin oluşumunun bu sırada daha yüksek olduğunu gösterebilir. Diğer dönemlere kıyasla bu dönemde, ineklerde oksidatif stres riskinin daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Ancak çalışmamızda 90.gün GPx değeri, 0. ve 45. günlerdeki GPx değerlerine göre daha yüksek düzeyde ölçülmüştür (Şekil.3.3.). Ayrıca tek kuzulu Akkaraman Koyunlarında GPx düzeyi, iki kuzulu koyunlara göre daha düşük düzeyde ölçülmüştür. Bu durumun ikiz yavrusu olan analarda, tek yavrulu olanlara göre meme bölgesinin daha fazla uyarıldığını ve daha fazla süt verdiğini bundan dolayı GPx düzeyinin daha yüksek çıkmış olabileceği kanısındayız.

Son birkaç yılda, serbest radikal hasarının tespiti ve vücudun buna karşı savunması, klinik tıpta metabolik durumun değerlendirilmesinde tamamlayıcı bir araç olarak giderek daha önemli hale gelmiştir. Castillo-Castañeda (2019), tarafından yapılan çalışmada 108 anneden doğum sonrası ikinci haftada alınan süt örnekleri gebelik sayısına göre ve vücut kitle indeksine göre gruplandırılmış elde edilen sonuçlarda anne sütündeki GPx, SOD ve GST aktivitesinde, gebelik sayısına göre anlamlı artışlar gözlemlendiği bildirilmiş ve elde edilen GPx sonuçlarının çalışmamızdaki değerlerle örtüştüğü saptanmıştır. Bu durumun da art arda gebelik ve emzirme dönemlerindeki metabolik hızın değişmesine bağlı olarak şekillenebileceği düşünülmektedir.

Castillo, (2005) tarafından yapılan çalışmada geç gebelik ve laktasyon başlangıcında oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla malondialdehit (MDA) ve lipid peroksidasyonunun bozunma ürünü ve toplam antioksidan durumu (TAS) düzeyleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak gebeliğin sonu ve erken laktasyon dönemi ile ilişkili karakteristik metabolik değişiklikler tespit edilmiştir. MDA ve TAS, hayvanın fizyolojik durumunun doğru bir yansımasını sağlamıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda lipid peroksidasyonunun doğuma yakın ve doğumun hemen sonrası arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın bulguları ile kendi çalışmamızdaki GPx sonuçları değerlendirildiğinde; parametreler aynı olmasa da bunlardaki artış oksidatif stres ile ilişkilendirildiğinden her iki çalışmanın bulguları paralellik arz etmektedir.

Çalışmamızda Katalaz analiz sonuçları incelendiğinde, enzim aktivitesinin belirlenemediği görülmektedir. Sığır sütleri ile geçmişte yapılan çalışmalar ve kaynaklar incelendiğinde sağlıklı sığır sütlerinde Katalaz aktivitesinin tespit edilmesine rağmen oldukça düşük olduğu fakat şekillenen meme yangısına bağlı olarak bu aktivitenin arttığından bahsedilmektedir. Katalaz aktivitesinin kaynağı olarak da yangı hücreleri ya da mikroorganizmalar gösterilmektedir (Nageswararao ve ark., 1965; Janzen ve Cook, 1967; Nageswararao ve ark., 1969; Fox ve ark., 2015). Günümüze kadar yapılan çalışmalar tarandığında; sağlıklı koyun sütlerinde Katalaz aktivitesinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmaya dahil

edilen örnekler CMT analiz sonucu negatif olanlar arasından seçildiğinden Katalaz enzim aktivitesinin tespit edilememesi bu durumla ilişkilendirilebilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Oksidatif stres birçok insan ve hayvan hastalığının başlangıcında veya ilerlemesinde kilit rol oynamaktadır. Lipid peroksidlerin oluşumu ve reaktif oksijen türleri, doğumdan sonraki ilk haftalarda enerji açığının ve dolayısıyla yağ yıkımının artması ile ilişkilidir. Bu reaktif oksijen türleri canlı organizmadaki yeterli antioksidanlar ile nötralize edilir. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve biyolojik sistemlerin bu reaktif ara ürünlerin temizlenmesinde savunma yeteneği arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olur.

Gebelik ve laktasyon döneminde antioksidan sistem dengesi ve bunun korunması, hem ana hem de yavru için önemlidir. Bu nedenle çalışmada doğum sonrası kolostrum alımından hemen sonra, 45. ve 90. günlerde sütlere yansıyan oksidatif- antioksidatif sistemin değerlendirilmesine yönelik olarak SOD, GPx ve Katalaz düzeyleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda, ikiz yavrulu anaların 0. gün GPx düzeyleri tek yavrulu analara göre daha anlamlı düzeyde yüksek çıkmış olup ($p \leq 0.05$), doğan yavru sayısından bağımsız dönemler arası farklar değerlendirildiğinde 0., 45. ve 90. günde gruplar arası fark istatistiksel yönden önemlidir. Antioksidatif enzim düzeylerindeki bu değişimin memenin antioksidan savunma sisteminin adaptasyonu ile ilişki olduğu kanısına varılmıştır.

İkiz yavru doğuranlarda, oksidatif stres düzeyinin daha yüksek olması nedeniyle, bu hayvanlara antioksidan takviyesinin yararlı olabileceği ve buna yönelik yeni çalışmaların uygun olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışma ile, laktasyon başlangıcı ile antioksidan yem katkılarının tercih edilmesinin sonraki dönemlerde oksidatif stres düzeyinin düşük düzeyde

tutulabilmesine ve oluşabilecek birçok olumsuz durumun önüne geçilmesinde önem taşıyabileceği kanaatine varılmıştır.



ÖZET

Akkaraman Koyun Sütlerinde Antioksidan Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Akkaraman koyunu Türkiye’de mevcut koyun varlığımızın yaklaşık %45’ini oluşturan yerli koyun ırklarımızdandır. Bu ırkın süt verimi yaklaşık olarak 50-60 kg, laktasyon süresi 140-150 gündür. Sütte antioksidan enzim aktivitesi pek çok çalışmada değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada sütün doğum sonrası, laktasyonun 45. ve 90. günlerinde antioksidan enzim aktivitesi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Konya Gözlü Tarım İşletmesi’nde bulunan Akkaraman koyunlarından doğum sonrası 0. 45. ve 90. günlerde alınan süt çalışma materyalini oluşturmuştur. Süt örneklerinde SOD, GPx ve katalaz aktiviteleri belirlenmiştir.

Gebelik fizyolojik bir süreç olup, yavrunun yeterli gelişimini ve büyümesini sağlamak için enerji ve oksijen gereksiniminde belirgin bir artış ile karakterizedir. Buna bağlı olarak hem ana hem de yavrunun gebelik ve sonrasında oksidatif strese maruz kaldığı düşünülmektedir.

Yapılan ölçümler sonucunda, GPx enzim aktivitesi doğan yavru sayısından bağımsız olarak (0.-45.-90. günlerde) anlamlı çıkmıştır ($p \leq 0.05$). 0.-45.-90. günlerde medyan ve çeyrekler açıklığı değerleri sırasıyla, 11,315;8,03, 10,530;8,25 ve 22,739;18,832 olarak ölçülmüştür. Doğan yavru sayısına göre yapılan gruplandırmada 0. gün ikiz ve tekli doğum grupları arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). 0. gün tek ve ikiz yavrulu doğumlarda ise medyan ve çeyrekler açıklığı değerleri sırasıyla, 9,913;7,088 ve 13,281;10,239, U/g protein olarak belirlenmiştir. 45. günde istatistiksel fark olmayıp bu değerler sırasıyla 10,958;7,67 ve 10,092;9,221 U/g protein olarak belirlenmiştir. SOD enzim aktivitesi yönünden gruplar arası fark anlamlı çıkmamıştır. 0.-45.-90. günlerde medyan ve çeyrekler açıklığı değerleri sırasıyla, 0,0982; 0,10316, 0,0860;0,6638, 0,707; 0,9285 olarak belirlenmiştir. 0. gün tek ve ikiz yavrulu doğumlarda medyan ve çeyrekler açıklığı değerleri sırasıyla, 0,09827;00824 ve 0,10196; 0;15459, 45. gün tek ve ikiz yavrulu doğumlarda medyan ve çeyrekler açıklığı değerleri sırasıyla, 0,0824; 07736 0,0957; 06702 U/g protein olarak ölçülmüştür.

Çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda, GPx enzim aktivitelerinde, özellikle laktasyonun 90. günündeki değişimin memenin antioksidan savunma sisteminin adaptasyonu ile ilişkili olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar Sözcükler:Akkaraman, Antioksidan Enzim, Glutatyon Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz

SUMMARY

Determination of Antioxidant Enzyme Activity in Akkaraman Sheep Milk

Akkaraman sheep population existing in Turkey constitutes approximately 45% of native breeds. Milk yield of this breed is approximately 50-60 kg and lactation time is 140-150 days. Antioxidant enzyme activities in milk have been evaluated in many studies.

In this study, antioxidant enzyme activity was evaluated at the beginning and on the 45th and 90th days of lactation. Akkaraman sheep raised in the Konya Gözlü Agricultural Facility and their milk samples obtained after birth, 45th and 90th days after delivery consisted of the study material. SOD, GPx and catalase activities were determined in these milk samples.

Pregnancy is a physiological process characterized by a significant increase in energy and oxygen demand to ensure adequate development and growth of the offspring. Accordingly, both mother and offspring are thought to be exposed to oxidative stress during and after pregnancy.

As a result of the measurements, GPx enzyme activity was significant (0.-45.-90 days) regardless the number of offspring ($p \leq 0.05$) on 0.45th and 90th days, the median and interquartile range values were 11,315, 8,03, 10,530; 8.25 and 22.739;18,832 U/g protein respectively. At the beginning of lactation, the difference between twin and single birth groups was statistically significant ($p \leq 0.05$). On day 0, median and interquartile range values were for single and twin delivered animals; 9.913;7,088 and 13,281;10,239 U/g protein respectively. On the 45th day, there was no statistical difference among the groups ($p > 0.05$) and these values were 10,958;7,67, 10,092;9,221 U/g protein, respectively. There was no significant difference between all groups in terms of SOD enzyme activity. 0.-45.-90. days, number of delivery independent the median and interquartile range values were 0.0982; 0,10316, 0,0860; 0,6638 and 0,707; 0,9285 respectively. At the beginning of lactation for single and twin deliveries, median and quartile range values were found as 0.09827; 00824 and 0.10196; 0, 15459 while on the 45th day, the median and interquartile range values for single and twins were 0.0824; 07736 and 0,0957;06702 U/g protein.

According to the findings obtained in the study, GPx enzyme activities, especially the change on the 90th day of lactation is associated with the adaptation of the breast tissue and the response of antioxidant defense system.

Keywords: Akkaraman, Antioxidant Enzymes, Glutathione Peroxidase, Superoxid Dismutase

KAYNAKLAR

AEBI HE (1983). Catalase in: HU Bermayer (Hrsy). Methods of enzymatic analysis. *Verlag Chemie; Weinheim*, Bd. **III**, 273-286

AYNSHELEY L H, BUOL J M (1965). The use of direct test as an indication of subclinical mastitis in dairy cattle *Vet Rec*, **77**: 379-382.

BAŞTAN A, KAYMAZ M, FINİK M, ERÜNAL N (1997). İneklerde subklinik mastitislerin elektriksel iletkenlik somatik hücre sayısı ve California Mastitis Test ile Saptanması. *AÜ Vet Fak Derg*, **44**: 1-6.

BAŞTAN A (2007). İneklerde Meme Hastalıkları 2. Baskı, Ankara: Alp Ofset Matb.

BHATTACHARYA ID, PİCCIANO MF, MİLNER JA (1988). Characteristics of human milk glutathione peroxidase. *Biological Trace Element Research* **18**; 59-70.

BÜYÜKOĞLU T, ASLAN N (2018). Oksidatif stres ve geçiş dönemi süt sığırlarında oksidatif stresin etkileri, *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, **9(2)**:33-41

CASTILLO C (2005). Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows, *The Veterinary Journal*, **169**:286–292.

CASTILLO C- CASTANEDA P (2019). Micronutrient content and antioxidant enzyme activities in human breast Milk, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **51** 36–41.

CELI P (2011). Biomarkers of oxidative stress in ruminant Medicine. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **33**, 233-240.

CHATTERJEE M, SALUJA R, KANNEGANTI S (2007). Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol. Biol*, **53**: 84-93.

DANIEL R C, W BARNUM D A, RENNIE J C (1966). Variation in modified California Mastitis Test Scores in dairy cattle. *J. Dairy Sci*, **49**: 1226-1229.

DEBSKİ B, PİCCANO MF, MİLNER JA (1987). Selenium content and distribution of human, cow and goat milk. *Journal of Nutrition* **117**:1091-1097.

DROGE W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Review. *Physiol. Rev*, **82**: 47-95.

ERCAN N, FİDANCI UR (2012). Pyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2' deoksiguanizin (8-OHdG) düzeyleri. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, **59**, 163-168.

ERCAN N, TUZCU N, BAŞBUĞ O (2014). The Evaluation Of Important Biomarkers in Healty Cattle, *Kafkas Üni Vet Fak Derg*, **20**, 749-755.

ERMİŞ B (2005) Influence of Smoking on Serum and Milk Malondialdehyde, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Antioxidant Potential Levels in Mothers at the Postpartum Seventh Day, *Humana Press Inc*, (1-3)-0027

EVANS HJ, STEINMANN HM, HİLL RL (1974). Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Isolation and characterisation of tryptic, cyanogen bromide and maleylated tryptic peptides. *Journal of Biological Chemistry* **249**; 7315-7325.

FOX PF, UNIACKE-LOWE T, MCSWEENEY PLH, MAHONY JAO (2015). Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer, 2nd Ed. 547-548.

FREI B (1997). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins. Linus Pauling Institute. Oregon State University. <http://lpi.oregonstate.edu/f-w97/reactive.html>.

GAREWAL HS (1997). Antioxidants and disease prevention. Florida: CRC Press LLC: 3-19.

GENESTRA M (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. *Cell Signal*, **19**: 1807-1819.

GIUSTARINI D, DALLE-DONNE I, TSIKAS D, ROSSI R (2009). Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **46**:241-281.

GUTTERIDGE JMC (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem*, **41**:1819-1828.

HALLIWELL B (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans*, **35**: 1147-1150.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC (2007). Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford, UK: Clarendon Press.

HİLL RD (1975). Superoxide Dismutase Activity in Bovine Milk. *Australian Journal of Dairy Technology* **30**, 26-28.

HİRVI Y, GRIFFİTHS MW (1988). Milk catalase activity as an indicator of thermization treatments used in the manufacture of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* **81**; 338-345.

HOLLANDER M, WOLFE D, CHICKEN E (2013). Nonparametric Statistical Methods, Wiley

HOMAN EJ, WAATIAUX MA (1996). Technical Dairy Guide: Lactation and Milking. 2nd ed. Publication: TDG-L-092995-E The Babcock Institute or Int. Dairy Research and Development. Univ. of Wisconsin, Madison, WI.

HOOLBROOK JJ, HICKS CL (1978). Variation of superoxide dismutase in bovine milk. *Journal of Dairy Science* **61**; 1072-1077.

IGHODARO OM, AKINLOYE OA (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine* **54**: 287–293.

JANJEN JJ, WC COOK (1967). A simple quantitative catalase procedure for abnormal milk. *Journal of Milk and Food Technology*, 30(7): 205-207

JANJEN JJ (1970). Economic losses resulting from mastitis. A review. *J Dairy Sci*, **53**, 1151-1161.

KANKARE V, ANTILA V (1982). The Effect of Xanthine Oxidase and Superoxide Dismutase as well as Cell Counts on the Oxidation of Fat in Bovine Milk. *Finnish Journal of Dairy Science* **2**, 32-40.

KIYOSAWA I, MATUYAMA J, NYUI S, YOSHIDA K (1993). Cu, Zn and Mn-superoxide dismutase concentration in human colostrum and mature milk. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **57**, 676-677.

KORYCKA-DAHL M, RICHARDSON T, HICKS CL (1979). Superoxide Dismutase Activity in Bovine Milk Serum. *Journal of Food Protection* **42**; 867-871

LIEN AI, PHAM-HUY, HUA HE, CHUONG PHAM-HUY (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health *Int J Biomed Sci*, **4** (2): 89-96.

LINDMARK-MANSSON H, AKESSON B (2000). Antioxidative factors in milk, *British Journal of Nutrition*, **84**; 103-S110.

MILLS GC (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry* **229**; 189-197.

NAGESWARARAO G, BLOBEL H, DERBYSHIRE JB (1965). Catalase test for abnormal milk. I. Techniques and factors affecting the test 1. *Journal of Dairy Science*, **48**(10), 1290-1294.

NAGESWARARAO G, DERBYSHIRE JB, BERMAN DT (1969). Sources and mechanism of catalase activity in the catalase test for abnormal milk, *Journal of Milk and Food Technology*, **32** (7), 261-264.

NIELEN M, DELUYKEN H, SCHUKKEN YH, BRAND A (1992). Electrical Conductivity of milk: Measurement, modifiers, and meta analysis of mastitis detection performance. *J Dairy Sci*, **75**: 606-614.

NIKI E (1993). Antioxidant defenses in eukaryotic cells. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, eds. Free radicals: from basic science to medicine. Basel, Switzerland: *Birkhauser Verlag*: 365–373.

PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, **87**: 315-424.

PAGLIE DE, VALANTINE VN (1967). Studies on Qualitative and Quantative Characterization of Eeythrocyte Glutathion Peroxidase. *J.Lab.Clin. Met*, **70**: 158-169

PALMIERÌ B, SPLENDORÌO (2007). Oxidative Stress Tests: Overview on Reability and Use: Part 1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **11**: 309-342

POLJSAK B, SUPUT D, MILISAV I (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants, *Oxid. Med. Cell. Longev.* Article ID 956792, **11**.

READ RB, REYES AL, BRADSHAW JG, PEELER JT (1969). Evaluation of seven procedures for detection of abnormal milk due to mastitis. *Journal of Dairy Science* **52**; 1359-1367

RICE DN. Mastitis Control. <http://www.Ianr.unl.edu/pubs/dairy/g506.html>, 1996. Erişim tarihi: 23.03.2018.

RILEY PA (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol*, **65**: 27-33.

RIŞVANLI A, KALKAN C (2002). Sütçü ineklerde yaş ve ırkın subklinik mastitisli memelerin sütlerindeki somatik hücre sayıları ile mikrobiyolojik izolasyon oranlarına etkisi. *YYÜ Vet Fak Derg*, **13**; 84-87.

SCHALM, WD CARROL, EJ NAIN NC (1971). Bovine Mastitis, Lea Febiger, Philidelphia, 94-124.

SCIBIOR D, CZECHOT H (2006). Catalase: Structure, properties, functions. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **60**: 170-180.

SIES H (1991). Oxidative Stress, Orinaldo: Academic Press LTD.

SORDILLA LM, AITKEN SI (2009). Impact of oxidative stress on health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, **128**, 104-109.

SUN Y, OBERLEY LW, LI Y (1988). A simple for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.*, **34**: 497-500

TABAKOĞLU E, DURGUT R (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Derg*, 3(1) 69-75

VALKO M, IZAKOVIC M, MAZUR M, RHODES CJ (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem*, **266**: 37-56.

VALKO M, LIEBFRITZ D, MONCOLA J, CRONIN MD (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, **39**: 44-84.

YOUNG I, WOODSIDE J (2001). Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, **54**: 176-186.

YU BP (1999). Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties, *Mech. Ageing Dev.*, **111**: 73-87.

YÜKSEL S (2015). Oxidant and antioxidant status of human breast milk during lactation period, *Dairy Sci. & Technol* **95**:295–302.

WEICHSELBAUM TE (1949). An accurate and rapid method for the determination of protein in small amounts of blood, serum and plasma. *Am. J. Clin. Pathol.*, **10**: 40-49

WILLCOX JK, ASH SL, CATIGNANI GL (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. Review. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr*, **44**: 275-295.

EKLER

Ek.1. Etik Kurul Raporu



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI



TOPLANTI TARİHİ : 21/02/2018
TOPLANTI NO : 2018-4
DOSYA NO : 2018-36
KARAR NO : 2018-4-38

Yürüttüğü Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Mert Pekcan'ın yaptığı; araştırmacı olarak Arş.Gör.Dr.Afşin Kocakaya ve Vet.Hek.Remzi Soner Cengiz'in katıldığı "Akkaraman Koyunlarında Laktasyonun Farklı Dönemlerinde Süt Antioksidan Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenerek Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 7. maddesinin (h) fıkrası kapsamında ele alınmış olup çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Doç.Dr.Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	—
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve	Veteriner Fakültesi	E	—

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan/ANKARA Telefon : 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks : 0 (312) 212 60 49

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Remzi Soner CENGİZ

Doğum Tarihi: 29.04.1992

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Bekar

İletişim: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

snrcengiz@gmail.com 05550412911

II. Eğitimi

Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2010-2016

Lise: Alparslan Anadolu Lisesi- Ankara 2006-2010

III. Ünvanları

Veteriner Hekim, 2016

IV. Mesleki Deneyim

Feed-X Yem Katkı Maddeleri: 2018-

VI. Yayınları

Sunumlar

VII. Cengiz R.S., Gök A., Kurtdede E., Kısmalı G., Sel T., “The Antiproliferative Effect of Alpha Tocopherol in F98 Cell Culture” 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, 8-11 November 2017, Kayseri / Turkey

VI.II. Gök A., Kurtdede E., Cengiz R.S., Kısmalı G., Sel T., "The Effect of Tocopherol- α on the Cell Viability in Caco-2 Cell Line." 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, 8-11 November 2017, Kayseri / Turkey

VI.III. Cengiz, R.S., Kurtdede E., Gök A, Gulendag E, Kısmalı G, "The Antiproliferative Effect of EGCG in F98 Cell Culture" 2nd International Pharma Symposium Series, 11-13 October Ankara / Turkey

VI.IV. Kurtdede E., Cengiz R.S., Gök A., Kaya U., Kısmalı G, "The Effects of Slymarin On The Cell Viability in F98 Cell Culture" International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology, 25-29 October 2017 Sarajevo/ Bosnia and Herzegovina

VI.IV. Balkan BM, Kısmalı G, Cengiz S, Sel T, "The Effects of Hormonal Treatment on Cell Viability in F98 Cell Line" 3rd International Congress on Advances in Veterinary Science and Technics, September 5-9, Belgrade/ Serbia