



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KRONİK STRESE MARUZ KALAN KÖPEKLERDE TÜKÜRÜK
MİKRORNA SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
BELİRLENMESİ VE BİYOBELİRTEÇ POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zeynep BARS YILDIRIM

GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Bengi ÇINAR

ANKARA

2025

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK STRESE MARUZ KALAN KÖPEKLERDE
TÜKÜRÜK MİKORNA SEVİYELERİNDEKİ
DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ VE
BİYOBELİRTEÇ POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeynep BARS YILDIRIM

GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Bengi ÇINAR

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün TDK-2023-3010 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2025

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kronik Strese Maruz Kalan Köpeklerde Tükürük mikroRNA Seviyelerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi ve Biyobelirteç Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Zeynep BARS YILDIRIM

Tarih: 24.01.2025

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Genetik Anabilim Dalında

Zeynep Bars Yıldırım tarafından hazırlanan

“Kronik Strese Maruz Kalan Köpeklerde Tükürük mikroRNA Seviyelerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi ve Biyobelirteç Potansiyellerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

24.01.2025

İmza

Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Kozet AVANUS

İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa

Raportör

Prof. Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Bengi ÇINAR

Ankara Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Özge ÖZMEN

Ankara Üniversitesi

Üye

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

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Kronik Strese Maruz Kalan Köpeklerde Tükürük mikroRNA Seviyelerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi ve Biyobelirteç Potansiyellerinin Araştırılması

Stres, kanama ve enfeksiyon gibi içsel veya organizmanın mevcut durumunu bozabilecek sosyal, çevresel uyaranlar gibi dışsal bir etken sonucunda homeostazın tehlike altına girmesi olarak adlandırılmaktadır. Organizma bir stres etkeni ile karşılaştığında; sempatik sinir sistemi ve hipotalamik-hipofiz-adrenal ekseninden oluşan bir stres sistemiyle fizyolojik ve davranışsal yanıtlar oluşturur. Verilen yanıtta maruz kalınan stres etkeninin hem büyüklüğü hem de süresi önemli bir rol oynamaktadır. Organizma akut (kısa süreli) strese karşı adaptif yanıtlar oluştururken; kronik (uzun süreli) stres sonucu maladaptif yanıtlar şekillenir. Kronik stres, farklı türlerde enfeksiyon, hastalıklara duyarlılık, kardiyovasküler hastalık, diyabet, obezite, kanser gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilirken, pet hayvanlarında agresyon, artan lokomotor aktivite, stereotipik ve kompulsif davranışlar gibi problemler ile; çiftlik hayvanlarında infertilite ve verimde azalma ile ilişkilendirilmiştir. Köpekler, hayatımızda evcil hayvan olarak yer almalarının yanı sıra; iş köpekleri olarak insanlara birçok profesyonel alanda destek olmaktadır. Kritik görevlerde yer alan bu köpeklerde stresin sağlıklarını etkileyecek seviyede olması performansı ve iş yapabilirliklerini düşürmektedir.

Mevcut literatür, mikroRNA'ların nöroendokrin sistemde önemli roller üstlenerek stres yanıtıyla ilişkili olduklarını ve stresin değerlendirilmesinde biyobelirteç potansiyelleri olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar daha çok kan ve beyin üzerine yoğunlaşmış olsa da invaziv olmayan yöntemlerle ve kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle tükürük mikroRNA'larının strese bağlı durumların değerlendirilmesi için uygun bir kaynak olduğu bildirilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında literatürde kronik stresli olarak kabul edilen iş köpeklerinden eğitim öncesi ve eğitim sonrası olmak üzere iki farklı dönemde alınan tükürük örneklerinden miR-16, -21, -26 ve -144'ün gruplar arasındaki ifade farklılığının RT-qPCR ile araştırılması amaçlanmıştır. Referans gen olarak snU6 kullanılmıştır. Gruplar arasında miR-16 ($p<0,001$), miR-21 ($p=0,002$) ve miR-26'nın ($p=0,034$) ifade seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. miR-16, miR-21 ve miR-26'nın kontrol grubuna kıyasla ifade düzeylerinin sırasıyla 7,02 kat ($p<0,001$), 3,94 kat ($p<0,001$) ve 3,05 kat ($p<0,001$) arttığı gözlemlenmiştir. LC/MS-MS metoduyla köpeklerin kortizol değerleri incelendiğinde ise iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bunun yanı sıra miRNA ifadeleri ve kortizol değerleri arasında bir korelasyon tespit edilmemiştir. Bu araştırma kronik stresli köpeklerde tükürükte mikroRNA ifade profilinin araştırıldığı ve kortizol ile korelasyonunun da değerlendirildiği ilk çalışmadır. Ayrıca davranış değerlendirmesinde C-BARQ metodu kullanılmış olup, kronik stresli köpeklerde eğitilebilirlik kategorisinde artış ($p=0,040$) artış ve yabancıya yönelik saldırganlık kategorisinde azalma ($p=0,007$) belirlenmiştir. Bu bulgunun, köpeklerin aldıkları profesyonel eğitimle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sunulan çalışma köpeklerde kronik stresin epigenetik, fizyolojik, davranışsal verilerle bir bütün olarak incelenmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca kronik stresin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunarak mikroRNA'ların köpeklerde stres biyobelirteci olarak kullanıma potansiyelini ortaya koymuştur.

Anahtar Sözcükler: Biyobelirteç, köpeklerde davranış değerlendirmesi, kronik stres, mikroRNA, tükürük

SUMMARY

Determination of Changes in Saliva microRNA Expression Levels in Dogs Exposed to Chronic Stress and Investigation of Biomarker Potentials

Stress is defined as the threat of homeostasis as a result of an internal factor such as bleeding and infection, or an external factor such as social and environmental stimuli that may affect the current state of the organism. Once the organism exposes a stressor, it creates physiological and behavioral responses through a stress system consisting of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Both the level and duration of the stressor that is exposed play a crucial role in the response to stress. While the organism constitutes adaptive responses to acute (short-term) stress; as a result of chronic (long-term) stress, maladaptive responses. Whereas chronic stress is associated with various diseases such as different types of infections, susceptibility to diseases, cardiovascular disease, diabetes, obesity, cancer, problems such as aggression, increased locomotor activity, stereotypical and compulsive behaviors in pet animals; it has been associated with infertility and decreased productivity in farm animals. Dogs are not only being pets in our lives, they also support people as working dogs in many professional areas. In these dogs, which are involved in critical tasks, stress at levels that affect their health decreases their performance and ability to work.

Current literature shows that miRNAs play important roles in the neuroendocrine system and are associated with the stress response and have biomarker potential in the assessment of stress. Although the studies mostly focused on the blood samples and brain regions, it has been reported that salivary miRNAs are also a suitable source for the evaluation of stress-related conditions due to their non-invasive and easily applicable/obtainable method.

The present thesis aims to investigate the salivary expression of miR-16, -21, -26, and -144 using RT-qPCR between before and after training from working dogs, which are considered chronically stressed in the literature. snU6 was used as the reference gene. It was found that there was a statistically significant difference in the expression levels of miR-16 ($p<0.001$), miR-21 ($p=0.002$), and miR-26 ($p=0.034$) between the groups. The expression levels of miR-16, miR-21, and miR-26 were observed to be increased by 7.02-fold ($p<0.001$), 3.94-fold ($p<0.001$), and 3.05-fold ($p<0.001$), respectively, compared to the control group. When cortisol levels of the dogs were examined by LC/MS-MS, no significant difference was found between the two groups. In addition, no correlation was found between miRNA expressions and cortisol levels. Furthermore, the C-BARQ method was used in behavior assessment, and an increase in the trainability category ($p=0.040$) and a decrease in the stranger-directed fear category ($p=0.007$) were determined in chronically stressed dogs. It is possible that those findings are related to the professional training the dogs received. This is the first study investigating the salivary microRNA expression profile of chronically stressed dogs and evaluate its correlation with cortisol. In this scope, the presented study allows the examination of chronic stress in dogs as a whole with epigenetic, physiological and behavioral data. It also contributed to a better understanding of the molecular mechanisms underlying chronic stress and demonstrated the potential of microRNAs as stress biomarkers in dogs.

Keywords: Behavioral assessment in dogs, biomarker, chronic stress, microRNA, saliva

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler Ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Stres	1
1.1.1. Stresin Sınıflandırması	2
1.1.2. Stres Sistemi	3
1.1.2.1. Sempatomedüller Sistem, SAM	5
1.1.2.2. Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal Eksen, HPA	6
1.1.3. Stresin Organizma Üzerindeki Etkileri	8
1.1.4. Stresin Köpeklerdeki Etkisi	10
1.1.5. Stresin Ölçülmesi ve Değerlendirilmesi	12
1.2. İş Köpekleri	14
1.2.1. İş Köpekleri ve Stres	16
1.3. mikroRNA'lar	17
1.3.1. mikroRNA Biyogenezi	18
1.3.2. miRNA'ların Etki Mekanizmaları ve Görevleri	20
1.3.3. mikroRNA'ların Biyobelirteç Potansiyelleri	21
1.3.4. mikroRNA ve Stres	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Çalışma Materyalinin Oluşturulması	30
2.1.1. Örneklem Grubu	30
2.1.2. Muayene	32
2.1.3. C-BARQ Analizi ve Davranış Değerlendirmesi	32
2.1.4. Tükürük Örneklerinin Toplanması	33
2.2. Kortizol Analizi	34

2.3. RT-qPCR Analizi	35
2.3.1. Total RNA İzolasyonu	35
2.3.2. cDNA Sentezi	36
2.3.3. Aday miRNA Seçimi	36
2.3.4. RT-qPCR Analizi	38
2.4. İstatistiksel Analizler	40
2.5. Biyoinformatik Analizler	41
2.5.1. İfadesinde Farklılık Bulunan miRNA'ların Hedef Gen Tahmini	41
2.5.2. Gen Ontoloji ve Gen Seti Zenginleştirme Analizi	42
3. BULGULAR	43
3.1. Muayene	43
3.2. C-BARQ Analizi ve Davranış Değerlendirmesi	44
3.3. Kortizol Analizi	45
3.4. Total RNA İzolasyonu	45
3.5. RT-qPCR Analizi	47
3.6. İstatistiksel Analizler	50
3.6.1. miRNA ve Kortizol İlişkisi	52
3.6.2. miRNA ifadelerine Cinsiyetin Etkisi	52
3.7. Biyoinformatik Analizler	53
3.7.1. İfadesinde Farklılık Bulunan miRNA'ların Hedef Gen Tahmini	53
3.7.2. Gen Ontoloji ve Gen Seti Zenginleştirme Analizi	56
4.TARTIŞMA	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	76
EKLER	95
Ek1. JAKEM Destek Mektubu	95
Ek2. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	96
Ek3. C-BARQ	98

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, kronik strese maruz kalan köpeklerde tükürük mikroRNA seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi ve bu moleküllerin biyobelirteç olarak potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında iş köpeklerinden alınan tükürük örnekleri kullanılarak, miR-16, miR-21, miR-26 ve miR-144 ifadeleri analiz edilmiş ve kronik stresin bu mikroRNA'lar üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular, kronik stresin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sunmuş ve mikroRNA'ların invaziv olmayan biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Araştırma, hayvan refahı ve stres yönetimi konularında bilimsel bir temel oluşturma hedefiyle gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle tüm doktora hayatım boyunca bana rehberlik eden, akademik gelişime katkı sağlayan ve her zaman yanımda olup desteğini hissettiğim danışman hocam Doç. Dr. Bengi ÇINAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecim boyunca her zaman bilgisi, güler yüzü ve desteğiyle motivasyonumu arttıran Prof. Dr. Yasemin SALGIRLI DEMİRBAŞ'a teşekkür ederim. Doç. Dr. Nüket BİLGİN ve Doç. Dr. Özge ÖZMEN'e doktora öğrenimim boyunca bana sağladıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim. Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, keyifli bir çalışma ortamı sağlayan, dostlukları, bilgi paylaşımları ve destekleri için arkadaşlarım Dr. Sevim İSPARTA, Dr. Öğr. Üyesi Özge Şebnem ÇILDIR, Arş. Gör. Mustafa Yenal AKKURT ve Vet. Hekim Furkan KUTLU'ya teşekkür ederim. Ayrıca hayatımın her alanında sağladığı destek ve dostluğun yanı sıra doktora tezimin her aşamasında da gösterdiği fedakarlığı ve desteği için Kumsal ORKUN'a teşekkürü borç bilirim.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi ile eğitim, sağlık, ortak araştırma ve geliştirme ile bilimsel ve teknik destek protokolü kapsamında tez çalışmam süresince gereksinim duyduğum köpekleri kullanmama olanak tanıyan ve beni en iyi şekilde misafir edip her türlü desteği sağlayan Jandarma Köpek Eğitim Merkezi Komutanlığı (JAKEM)'nda görevli tüm Jandarma personeline ve veteriner hekimlerine teşekkürlerimi sunarım.

2211/A Genel Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı aracılığıyla doktora eğitimimde sağladığı maddi destek için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na; 100/2000 YÖK Doktora Burs

Programı kapsamında sağladığı maddi destek için Yükseköğretim Kurulu (YÖK)’e, tez çalışmamı TDK-2023-3010 numaralı proje kapsamında destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü’ne teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımda var olduğu için şanslı hissettiğim, tüm doktora sürecim boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, motivasyon kaynağım canım eşim Koray’a gösterdiği anlayışı ve inancı için minnettarım. Hayatım boyunca hep yanımda olup, benimle sevinip benimle üzülen, desteklerini her koşulda hissettiğim biricik anneme, biricik babama ve canım aileme sonsuz teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat Derece
3'-UTR	3' Transle Edilmeyen Bölge
α	Alfa
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
AGO	Argonaute Ailesi Proteinleri
AVP	Arginin-vazopressinin
β	Beta
C-BARQ	Köpek Davranış Değerlendirmesi ve Araştırma Anketi
cfa	<i>Canis lupus familiaris</i>
cDNA	Komplementer DNA
c-miRNA	Sirküler miRNA
Cq	Kantitatif Döngü
CRH	Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
CRHR1	Kortikotropin Salgılatıcı Hormon Reseptörü
Δ	Delta
dl	Desilitre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmunosorbent
EIA	Enzim İmmunosorbent
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
g	Yer Çekimi İvmesi Simgesi
GH	Büyüme Hormonu
GnRH	Gonadotropin Salıcı Hormon
GO	Gen Ontoloji
GR	Glukokortikoid Reseptör
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HPA	Hipotalamik- Hipofiz- Adrenal Eksen
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IRC	Reaksiyonlar Arası Kalibratör
JAKEM	Jandarma Köpek Eğitim Merkezi Komutanlığı
KEGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
LC	Lokus Seruleus

LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometresi
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LH	Lüteinize Edici Hormon
LNA	Kilitli Nükleik Asit
miR	Kılavuz miRNA
miR*	Yolcu miRNA
miRNA	MikroRNA
miRNome	Tüm Genom Boyunda miRNA İfade Profili
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı RNA
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
m/z	Kütle/yük
ncRNA	Kodlanmayan RNA
ng	Nanogram
NRT	Ters Transkriptaz Enzimi İçermeyen Negatif Kontrol
NTC	Negatif Kontrol
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
piRNA	PIWI-Etkileşimli RNA
ppb	Milyarda bir parça
pre-miRNA	Öncü miRNA
pri-miRNA	Birincil miRNA
PSS	Periferik Sinir Sistemi
PVN	Paraventriküler Çekirdek
RIA	Radyoimmunosorbent
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RISC	RNA İndüklenmiş Susturucu Kompleksi
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SAM	Sempatomedüller Sistem
SD	Standart Sapma
SH	Standart Hata
snU6	Küçük Nüklear RNA U6
siRNA	Küçük Susturucu/İnterferans RNA
UPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
XPO5	Exportin 5

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. HPA Sistemi	7
Şekil 1.2. HPA negatif geri bildirimi	8
Şekil 1.3. miRNA biyogenezi	19
Şekil 2.1. Köpeklerden tükürük örneklerinin alınması	34
Şekil 2.2. RT-qPCR 96 kuyucuklu plate tasarımı	39
Şekil 2.3. Delta-delta CT Formülü	40
Şekil 3.1. miR-16, miR-21 ve miR-26 için gruplar arası ΔCq boxplot grafiği	48
Şekil 3.2. Çalışılan bir plate için amplifikasyon, erime eğrisi ve erime peak görüntüleri	49
Şekil 3.3. miRNA'ların kontrol ve stres gruplarındaki göreceli ifade seviyelerindeki farklılıklara yönelik boxplot grafiği	50
Şekil 3.4. cfa-miR-16 için miRDB, TargetScan, miRwalk veritabanlarından elde edilen gen sayıları	54
Şekil 3.5. cfa-miR-21 için miRDB, TargetScan, miRwalk veritabanlarından elde edilen gen sayıları	55
Şekil 3.6. cfa-miR-26 için miRDB, TargetScan, miRwalk veritabanlarından elde edilen gen sayıları	55
Şekil 3.7. miR-16 ile ilgili genlerin biyolojik süreçlere göre sınıflandırılması	56
Şekil 3.8. miR-21 ile ilgili genlerin biyolojik süreçlere göre sınıflandırılması	57
Şekil 3.9. miR-26 ile ilgili genlerin biyolojik süreçlere göre sınıflandırılması	57

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. SAM adrenerjik etkisi ve adrenerjik reseptörler	6
Çizelge 2.1. Örnekleme yer alan köpeklerin bilgileri	31
Çizelge 2.2. cDNA sentezi kullanılan reaktifler	36
Çizelge 2.3. Ters transkripsiyon protokolü	36
Çizelge 2.4. Kullanılan primer sekansları	37
Çizelge 2.5. Kullanılan miRNA'ların köpek sekansları	37
Çizelge 2.6. RT-qPCR reaktifleri	38
Çizelge 3.1. Köpeklerin fizyolojik verileri	43
Çizelge 3.2. C-BARQ davranış kategorilerine göre grup ortalamaları	44
Çizelge 3.3. Nanodrop spektrofotometre ölçüm sonuçları	46
Çizelge 3.4. miRNA'lar için Shapiro-Wilk normallik testi	51
Çizelge 3.5. Gruplar arası miRNA ifade farklılıkları	51
Çizelge 3.6. Cinsiyetin miR-16 ifadesi üzerine etkisi	52
Çizelge 3.7. Cinsiyetin miR-21 ifadesi üzerine etkisi	53
Çizelge 3.8. Cinsiyetin miR-26 ifadesi üzerine etkisi	53
Çizelge 3.9. İnsan datalarından elde edilen tahmini hedef gen sayıları ve doğrulanmış hedef gen sayıları	54
Çizelge 3.10. miR-16 Yolak Analizi	59
Çizelge 3.11. miR-21 Yolak Analizi	59
Çizelge 3.12. miR-26 Yolak Analizi	60

1. GİRİŞ

1.1. Stres

Organizma canlılığı boyunca bütün sistemleriyle dinamik bir denge ve uyum içinde yaşamını devam ettirmektedir. Bu denge ve uyum, tarih boyunca çeşitli filozoflar ve bilim insanları tarafından farklı şekillerde ele alınmıştır. Bu kavramları açıklamak canlının doğayla olan ilişkisini ve biyolojik süreçlerin işleyişini anlamada önemli bir rol oynamıştır. Ayrıca yıllar boyunca çeşitli bilim insanları organizmanın iç dengesini nasıl koruduğunu ve bu iç denge bozulduğunda ortaya çıkan durumları incelemişlerdir.

Klasik dönem başlangıcında Heraklitos, durağan, değişmeyen bir durumun normal bir durum olmadığını, her şeyin bir değişim kapasitesi olduğunu öne sürmüştür. Daha sonrasında Empedokles, tüm maddelerin bir denge ve uyum içerisinde olduğunu, bu uyumun canlı organizmaların hayatta kalması için gerekli olduğunu belirtmiştir. Hipokrat ise sağlığı, yaşam elementlerinin uyumu olarak tanımlarken, hastalık kavramını ise yaşam elementlerin uyumsuzluğu olarak tanımlamıştır (Chrousos ve Gold, 1992).

19. yy'da Claude Bernard dinamik fizyolojik iç denge ilkesini açıklayarak organizmanın iç ortamının bir uyum içinde olduğunu belirterek uyum kavramını genişletmiştir (Chrousos ve Gold, 1992). Charles Darwin günümüzde “stresör” olarak adlandırdığımız çeşitli iç ve dış faktörlere karşı verilen tepkilerin farklı canlılarda benzer tepkiler olduğunu fark etmiştir. Örneğin; korku, kızgınlık, soğukta kalma ve birçok hastalık sonucunda vücutta titreme görüldüğünü bildirmiştir (Darwin, 1872).

Cannon (1915), sempatik sinir sistemi üzerine yoğunlaşarak vücudun dış etkenlere verdiği cevapları incelemiştir. Ayrıca “savaş ya da kaç” cevabını tanımlayarak bunu stres yanıtı ile ilişkilendirmiştir (Cannon, 1915). Sonrasında ise "homeostazi" terimini ortaya atarak uyum kavramını duygusal ve fiziksel parametrelerle genişletmiştir (Cannon, 1935).

1930'lu yıllarda stresin babası olarak da bilinen Hans Selye, stres terimini vücudun herhangi bir bölümünde karşı karşıya gelen kuvvetlerin karşılıklı eylemleri olarak tanımlamıştır (Chrousos ve Gold, 1992). Organizmanın strese verdiği yanıtı “Genel Adaptasyon Sendromu” olarak adlandırılan bir model ile açıklamış ve strese neden olan etkilerin çeşidi ne olursa olsun, vücutta spesifik olmayan adaptif reaksiyonlar meydana

geldiğini belirtmiştir. Genel Adaptasyon Sendromu’nu, alarm reaksiyonu, direnç aşaması ve tükenme aşaması olmak üzere üç ayrı aşamada açıklamıştır (Selye, 1946):

1. Alarm Reaksiyonu
2. Direnç Aşaması
3. Tükenme Aşaması

Alarm reaksiyonu, organizmanın uyarana ilk defa maruz kalmasıyla ortaya çıkan spesifik olmayan tüm sistemik olayları içermektedir. Bu aşamada organizma sempatik sinir sistemini aktive ederek “savaş ya da kaç” yanıtı adı verilen, hızlı ve kısa bir tepki vermektedir (Squires, 2010). Organizma etkene sürekli maruz kaldığında bir adaptasyon süreci içerisine girer ve ardından direnç aşamasına geçilir. Bu aşamada vücut maruz kaldığı etkene karşı artan bir direnç sergilerken, diğer stres etkenlerine karşı azalan bir direnç göstermektedir. Tükenme aşamasında ise, adaptasyonun geliştiği uyarana çok uzun süre maruz kalınması sonucunda daha fazla adaptasyon sağlanamadığı görülmektedir (Selye, 1946). Ayrıca Selye (1952), bu tükenme döneminin ölüm ile sonuçlanmaması halinde stres sonucu adaptasyon hastalıkları olarak adlandırdığı çeşitli hastalıkların meydana gelebileceğini belirtmiştir (Selye, 1952).

Selye (1975), stres etmenlerini “eustress” (östress, iyi stres) ve “distress” (distres, kötü stres) olarak ikiye ayırmış ve her stres etkeninin zararlı olmadığını belirtmiştir (Selye, 1975). Homeostazın hafif ve kontrol edilebilir tehlikelerinin hoş giden ve heyecan verici durumlar olarak algılanabileceğini ve entelektüel büyüme ve gelişim için olumlu uyarıcılar olabileceklerini; kontrol edilemeyen, uzamış psikolojik ve fiziksel etmenlerin ise hastalığa yol açabileceğini belirtmiştir (Chrousos ve Gold, 1992; Selye, 1985).

Stres tanımına veteriner hekimliği açısından bakıldığında ise kabul edilen tanımlama Fraser vd. (1975) tarafından ortaya konulmuştur. Bu tanıma göre eğer hayvan içinde bulunduğu çevrenin olumsuz yönleriyle başa çıkmak için fizyolojisinde ve davranışında anormal veya aşırı düzenlemeler yapması gerekiyor ise stres durumu söz konusudur (Fraser vd., 1975).

1.1.1. Stresin Sınıflandırması

Distres kavramı, olumsuz stres etkenlerinin tetiklediği ve organizmaya zarar veren stresi kapsarken, östress kavramı ise pozitif stres etkenlerinin tetiklediği stresi kapsamaktadır

(Seaward, 1999). Ayrıca Hans Selye, homeostazın hafif ve kontrol edilebilir tehlikelerinin, hoş giden ve heyecan verici durumlar olarak algılanabileceğini, entelektüel büyüme ve gelişim için olumlu uyarıcılar olabileceğini belirtirken; kontrol edilemeyen, uzun süreli, psikolojik ve fiziksel etmenlerin ise hastalığa yol açabileceğini belirtmiştir (Chrousos ve Gold, 1992; Selye, 1985).

Hans Selye'den farklı olarak Ewbank (1985) hayvanlarda stresi fizyolojik stres, overstres ve distres olmak üzere üç farklı kategoride ele almıştır. Hayvan için bir zararı olmayan ve hayvanın tamamen adaptasyon gösterdiği stresi fizyolojik stres; hayvana çeşitli zararları olan ve mücadele edebileceği seviyedeki stresi overstres ve son olarak hayvanın uyum sağlayabilmesi mümkün olan ancak hayvana zarar veren ve rahatsızlık verici seviyedeki stresi ise distres olarak tanımlamıştır (Ewbank, 1985).

Stres, stresin kaynağı, strese verilen tepki ve maruz kalınan süreye göre çeşitli kategorilere ayrılmaktadır. Travmatik stres, canlının doğal afet ve şiddet gibi travmatik olaylara maruz kalması sonucu gerçekleşir. Çevresel stres, canlının yaşadığı ortamdaki kirlilik, gürültü gibi olumsuz koşullardan kaynaklanmaktadır. Psikolojik stres, algılanan tehditler, endişe ve negatif düşünceler gibi bilişsel veya duygusal faktörlerden kaynaklanmaktadır. Fizyolojik stres, vücudun homeostazını bozan, hastalık, yaralanma veya beslenme problemlerine bağlı olarak ortaya çıkan stresi ifade etmektedir (Chu vd., 2024). Maruz kalınan süre ele alındığında ise; akut ve kronik stres olarak sınıflandırılabilir. Ani bir şekilde ortaya çıkan ve hızla ortadan kalkan stres akut stres olarak adlandırılırken; günler, haftalar hatta aylar gibi uzamış zaman periyotlarını kapsayan stres ise kronik stres olarak adlandırılmaktadır (Lucassen vd., 2014).

1.1.2. Stres Sistemi

Stres, organizmanın iç ve dış etkilere (stresörlere) maruz kalması sonucunda homeostazın tehlike altına girmesi olarak tanımlanmaktadır (Chrousos, 2009; Chrousos ve Gold, 1992). Bu tehditler, kanama ve enfeksiyon gibi fizyolojik iç faktörler olabileceği gibi, organizmanın mevcut durumunu bozabilecek sosyal ve çevresel uyaranlar gibi dış faktörler de olabilmektedir (Dayas vd., 2001).

Stresörler fiziksel zorlukları kapsayan fizyolojik veya hayvanın vücudunda doğrudan bir fiziksel değişiklik yapmayan psikolojik uyaranlar olabilir. Fizyolojik stresörler, vücut

bütünlüğünü ve fizyolojik dengeyi tehdit eder. Açlık, susuzluk, soğuk ve sıcak havaya maruz kalma, kan şekeri, vücut sıcaklığı, kan basıncı değişimleri fizyolojik stresörlere örnek olarak verilebilir. Duygusal stresörler olarak da adlandırılan psikolojik stresörler öğrenilmiş, duygusal ve bilişsel süreçleri içermektedir. Kısıtlama, yüksek sesler, bir avcıdan saklanma, yetersiz egzersiz ve uyarım, hayvan uyurken ya da yemek yerken rahatsız edilmesi gibi öngörülme sosyal çevre, insan ve diğer hayvanlarla sosyal çatışma psikolojik stres faktörlerindendir (Horwitz ve Mills, 2009).

Organizma, iç dengenin korunması için çeşitli sistemleri içine alan bir yanıt sistemi ile strese yanıt verir (Squires, 2010). Organizmanın stres etkenine verdiği yanıt üç şekilde sonuçlanabilir. İlk olarak yanıt sorunsuz gerçekleşerek organizma bazal homeostazına geri döner. Bu durum “östazis” olarak adlandırılmaktadır. İkinci olarak, stres uzun sürebilir ve/veya strese verilen yanıt yetersiz olabilir. Canlının hayatını devam ettirdiği ancak homeostazın olumsuz olarak etkilendiği, uzun süreli, aşırı ya da yetersiz tepkiler sonucunda oluşan kronik dishomeostazis durumuna ise “allostazis” ya da “kakostazis” adı verilmektedir. Allostazis durumunun sonucunda allostatik yük şekillenir. Allostatik yükün birikmesi sonucu organizmanın hastalıklara yatkın hale gelebileceği belirtilmektedir (McEwen, 1998). Son olarak ise strese verilen yanıt sorunsuz gerçekleşir ve organizma strese karşı direnç kazanır ve “hiperstazis” durumu meydana gelmektedir (Charmandari vd., 2005; Chrousos, 2009).

Organizma, homeostazın korunabilmesi için merkezi sinir sistemini (MSS) ve periferik sinir sistemini (PSS) içine alan bir stres sistemi ile strese yanıt vermektedir. Stres sistemi, hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen, otonom sinir sistemi ile sempatik ve parasempatik sinir öğelerini kapsamaktadır (Nicolaidis vd., 2014). Tüm merkezi sinir sistemi doğrudan veya dolaylı olarak homeostazın devamlılığı için stres yanıtında rol oynamaktadır. MSS’de stres sisteminin ana elemanlarını hipotalamik paraventricüler çekirdek, kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), arginin-vazopressin (AVP) nöronları ile beyin sapındaki merkezi katekolaminerjik nöronlar oluşturmaktadır (Kyrkou ve Tsigos, 2007).

Stres yanıtında beynin kilit bölümü hipotalamustur. Organizma bir stres etkeni ile karşılaştığında; hipotalamus öncülüğünde sempatik sinir sistemi (sempatomedüller sistem, SAM) ve hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen (HPA) aracılığıyla davranışsal ve nöroendokrin yanıtlar oluşturmaktadır (Nicolaidis vd., 2014). Organizma stresle karşılaştığında her iki stres sistemi de etkinleşmektedir. Ancak etkenin süresine göre, stresin yanıtında baskın olan sistem farklılık göstermektedir. Hızlı, akut yanıtlarda sempatik sinir sistemi aracılığıyla savaş ya da

kaç yanıtı oluşturulurken; daha uzun süreli devam eden yanıtlarda ise HPA rol oynayarak, vücut stres etkenine karşı adaptif ya da maladaptif bir yanıt oluşturmaktadır (McEwen, 1998, 2004; Squires, 2010).

1.1.2.1. Sempatomedüller Sistem, SAM

Otonom sinir sistemi beyindeki merkezi otonomik ağ tarafından kontrol edilir ve buradan sinyaller hem sempatik hem parasempatik nöronlara gönderilir. SAM aktivasyonu sonucu adrenal medulladan adrenalin (epinefrin) ve noradrenalin (norepinefrin) salgılanması uyarılır (Horwitz ve Mills, 2009). Salgılanan adrenalin ve noradrenalin merkezi sinir sistemi, düz kaslar ve vücuttaki farklı dokularda α ve β reseptörlerine etki eder. Bu reseptörlerden α -adrenerjik reseptörler vazokonstriksiyona sebep olurken β -adrenerjik reseptörler ise vazodilatasyonu sağlamaktadır (Fox, 2003; Squires, 2010). Farklı organlarda sempatomedüller sistemin adrenerjik etkisi altında meydana gelen değişimler ve bu mekanizmada rol oynayan adrenerjik reseptörler Çizelge 1.1’de özetlenmektedir. Adrenalin ve noradrenalin, glikoz ile yağ asitlerinin depolanmasına, protein sentezinin engellenmesine, kaslardan, karaciğerden ve yağ dokularından glikoz, aminoasit ve serbest yağ asitlerinin salınmasına neden olur. İskelet ve kalp kasına daha fazla kan pompalanarak kalp hızı artırılır. Böylece organizmanın strese odaklanmasını sağlayan, sindirim, büyüme, üreme ve bağışıklık gibi anabolik süreçlerin bastırıldığı hızlı bir hormonal yanıt olan “savaş ya da kaç” tepkisi oluşturulur (Fox, 2003; (Squires, 2010). Tehlikeli durumlarda “savaş ya da kaç” tepkisi sempatik sistem tarafından oluşturulurken; tehlikeli olmayan durumlarda ise parasempatik sistem devreye girerek “dinlen ve sindir” cevabı oluşturulmaktadır (Chaudhuri, 2019; Godoy vd., 2018).

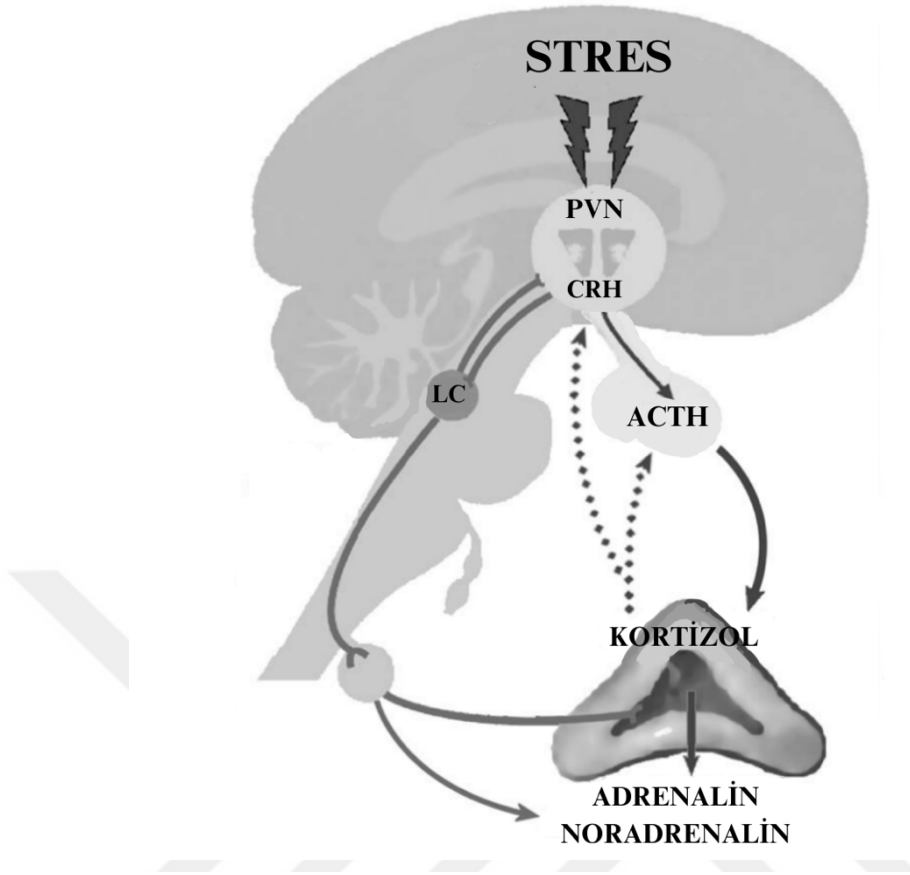
Stres sistemi merkezi sinir sistemindeki, noradrenalin salgılayan ve strese duyarlı sinir lifleri içeren lokus seruleus (LC) gibi periferik bölgelerle iletişim halindedir (Chaudhuri, 2019). Stresörlerin etkisi sonucu LC’de noradrenerjik aktivasyon artar ve hipotalamusta CRH’nın salgılanması artar. Bununla beraber adrenal medulladan periferik noradrenalin salgılanması artar (Koob, 1999). LC-noradrenalin sisteminin hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen ile paralel bir şekilde işleyişi, stres sisteminde hem ileri yönlü hem de kontrol mekanizmasında geri bildirim mekanizmasında yer alması stres yanıtının endokrin, bilişsel ve davranışsal açıdan koordinesinde dikkat çekmektedir (Horwitz ve Mills, 2009; Valentino ve Van Bockstaele, 2008).

Çizelge 1.1. SAM adrenerjik etkisi ve adrenerjik reseptörler

Organ	Sempatomedullar Sistemin Adrenerjik Etkisi	Adrenerjik Reseptör
Göz	İrisin radyal kaslarının kontraksiyonu sonucu pupillerde genişleme	α_1
Kalp	Kalp atış hızında artma ve güçlü kasılmalar	β_1
Cilt ve Visceral Damarlar	Düz kasların kasılması nedeniyle arteriollerin daralması	α_1
Kas Damarları	Sempatik sinir aktivitesi nedeniyle arteriollerin daralması	α_1
	Adrenalin nedeniyle arteriollerin genişlemesi	β_2
Akciğerler	Düz kasların gevşemesi nedeniyle bronşiyollerin genişlemesi	β_2
Mide ve Bağırsak	Sfinkterin kasılması nedeniyle içeriğin geçişinin yavaşlaması	α_1
Karaciğer	Glikojenoliz ve glukozun salınması	α_1, β_2

1.1.2.2. Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal Eksen, HPA

HPA yanıtında, hipotalamik paraventriküler çekirdekten (PVN) CRH'nın hipofizyal portal dolaşıma salınması uyarılır. HPA eksenini ve locus coeruleus-merkezi sinir sistemi birbirleriyle ilişkili sistemlerdir. Bir sistemin aktivasyonu diğer sistemi aktive etmektedir. Örneğin, CRH, birincil işlevi olan adrenokortikotropik hormonunun (ACTH) salınımını uyarmanın yanı sıra LC'yi de aktive ettiği bilinmektedir (Horwitz ve Mills, 2009). Hipotalamustan CRH salınmasını takiben, ön hipofizden ACTH salınımı gerçekleştirilir. Bununla beraber CRH gibi PVN'de sentezlenen arginin-vazopressinin (AVP) de ACTH salınımına sinerjik olarak katkıda bulunur. Dolaşımdaki ACTH adrenal korteksi uyararak, HPA ekseninin son aracıları olan glukokortikoidlerin salgılanması için uyarır (Kyrou ve Tsigos, 2007). Diurnal canlılarda CRH ve AVP normalde, sabah erken saatlerde nabız şeklinde ve sirkadiyen ritimle karakterize, senkronize bir şekilde portal sisteme salgılanan hormonlardır (Androulakis, 2021). Bu ritmin stres sonucu bozulabileceği belirtilmiştir (Kyrou ve Tsigos, 2007).

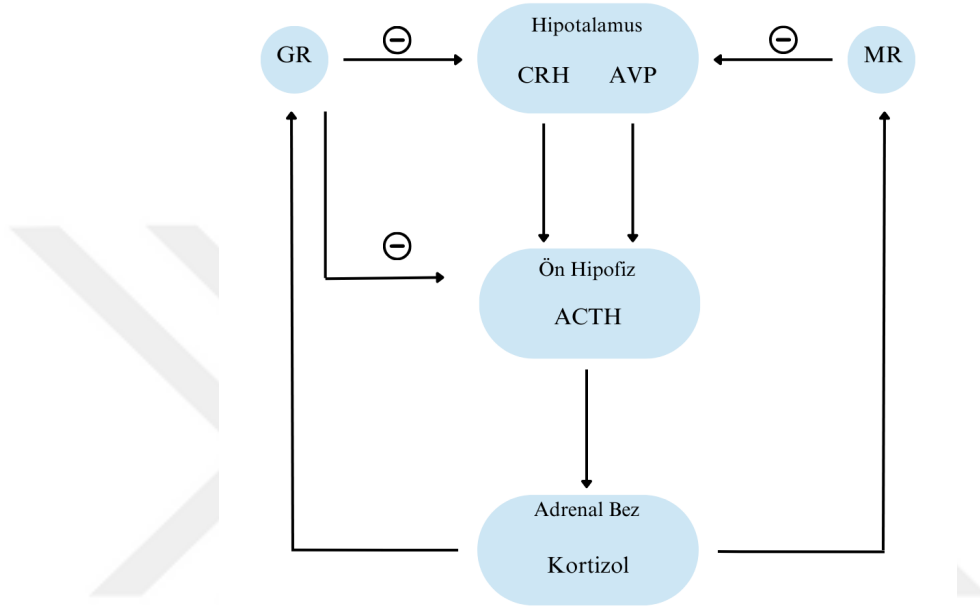


Şekil 1.1. HPA Sistemi

İnsan, köpek, domuz, sığır, koyun ve balık türlerinde majör glukokortikoid kortizol iken ratlarda ve kuşlarda majör glukokortikoid kortikosterondur (Squires, 2010). Strese yanıt olarak glukokortikoidler organizmada çeşitli değişikliklere neden olurlar (Chaudhuri, 2019; Kyrou ve Tsigos, 2007). Bunlardan bazıları;

- Glukoneogenezin uyarılması,
- Hücreler tarafından kullanılan glikoz miktarının azalması,
- Kan şekeri seviyesinin artması,
- Karaciğer ve plazma proteinlerinin artması,
- Kas ve yağ dokusundan yağ asitlerinin mobilizasyonunun artması sonucunda plazmada serbest yağ asidi konsantrasyonunun artması,
- Antienflamatuvar etkiler,
- Bağışıklığın baskılanması,
- Keton cisimciği ve üre üretiminin artmasıdır.

HPA ekseninin aktivitesi, hipotalamus ve ön hipofizdeki mineralokortikoid (MR) ve glukokortikoid reseptörleri (GR) aracılığıyla negatif geri bildirim mekanizması ile kontrol edilir. Dolaşımdaki yüksek kortizol seviyeleri CRH, ACTH ve AVP salınımını baskılar (Tomas vd., 2013). Bu negatif geri bildirim stres yanıtının uygun şekilde sonlandırılması için önemlilik arz etmektedir (Kyrou ve Tsigos, 2007; Kyrou ve Tsigos, 2009; Squires, 2010).



Şekil 1.2. HPA negatif geri bildirimi

1.1.3. Stresin Organizma Üzerindeki Etkileri

Stres insan ve hayvanlarda fizyolojik, nörolojik, davranışsal ve genetik sistemler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Chrousos, 2009). Organizma stres etkeniyle başa çıkmak için bütün bu sistemler ile strese yanıt oluşturmaktadır. Stres yanıtında rol alan temel organ olan beyin, içsel veya dışsal etkilerin bir tehdit unsuru olup olmadığına karar vererek etkene karşı fizyolojik ve davranışsal tepkiler oluşmasını sağlamaktadır (McEwen, 2007). Stresin organizma üzerindeki etkisi, süresi, şiddeti, kontrol edilebilirliği, organizmanın yaşı ve cinsiyeti gibi faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca organizmanın stresle deneyimi, ebeveynlerin stres geçmişi gibi faktörlerin de strese verilen yanıtta önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Hunter vd., 2015).

Strese verilen yanıtta maruz kalınan stres etkeninin hem büyüklüğü hem de kronik olup olmaması önemli bir rol oynamaktadır. Kısa süreli stres adaptif yanıtlara neden olur iken; uzun süreli stres maladaptif yanıtlara neden olmaktadır (Nelson, 2005). Stres sisteminin kronik hiperaktivasyonu sonucunda CRH, AVP ve ACTH'ın hipersekresyonu gerçekleşir ve kortizol seviyesinde yükselme meydana gelir (McEwen, 2016). Kronik streste, artan CRH ve glukokortikoidlerin uzun süreli salınımı organizma için zararlı bir hal almaya başlamaktadır (Charmandari vd., 2005; Nicolaides vd., 2014). Kronik stres sonucunda metabolizma, büyüme, üreme, otoimmün, davranış gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda bozukluklar meydana gelebileceği bildirilmiştir (Kyrou ve Tsigos, 2007; McEwen, 1998). Stres yanıtında organizmanın homeostazı sağlayabilmesi için stres sisteminin aktivasyonunun yanı sıra geçici olarak katabolik, antireprodüktif ve immünsüpresif etkiler de şekillenmektedir (Charmandari vd., 2005).

Kronik stresin hem davranışsal hem de somatik negatif sonuçları olabilmektedir. HPA ekseninin uzun süreli uyarım sonucunda insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) gibi büyüme faktörlerinin ve büyüme hormonu (GH) sekresyonunun baskılanmasına neden olur. Bu da gelişmekte olan organizmalarda büyümenin baskılanmasına yol açar. Kortizol seviyesinin uzun süre yüksek seyretmesi, pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe ederek ve lenfositlerin aktivitesini azaltır ve immün sistemin işlevlerini baskılar. Bu immunosüpresif etki sonucunda yara iyileşmeleri gecikebilir ve inflamasyon şiddetlenir (Reiche vd., 2004). Kronik stres hipotalamustan gonadotropin salıcı hormon (GnRH) salgılanmasını baskılayarak üreme sistemini olumsuz etkilemektedir. Bununla beraber lüteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımı azalır. Sonuç olarak dişilerde ovulasyon problemlerine, kısırlığa; erkeklerde testosteron üretiminde azalmaya, sperm kalitesinin azalmasına sebep olur (Agarwal vd., 2005). Ayrıca kronik stres, visceral obezite, sarkopeni, yüksek seviyede düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve düşük seviyede yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile insülin direnci gibi metabolik sendrom bulguları ile ilişkilidir (Chrousos ve Tsigos, 2006; Kyrou vd., 2006). Bununla beraber, kronik stres artmış SAM aktivitesi ile karakterizedir ve bunun sonucunda kardiyovasküler bozukluklarda artış meydana gelebileceği bildirilmiştir (Dimsdale, 2008; Kyrou ve Tsigos, 2009).

Kronik stresin majör depresif bozukluk, bipolar bozukluk ve travma sonrası stres bozukluğu gibi çeşitli psikiyatrik bozuklukların başlangıcında da önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Davis vd., 2017). HPA ekseninin uzun süreli, aşırı veya yetersiz aktivasyonu, beyinde değişikliklere yol açarak çeşitli psikiyatrik bozuklukların gelişimine zemin

hazırlayabilir (Davis vd., 2017; McEwen, 2004). Tekrarlayan strese maruz kalmanın, şizofreni (Holtzman vd., 2013), bipolar bozukluk (Agnew-Blais ve Danese, 2016), majör depresif bozukluk (Kendler vd., 1999) ve anksiyete bozuklukları (Moreno-Peral vd., 2014) gibi birçok psikiyatrik bozukluk için önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Stres hormonlarının uzun süre salınımı sonucunda korku sistemi harekete geçer ve kaygı, depresyon, anoreksiya, hiperfaji gibi problemlere ve uyku durumunda bozukluklara neden olur (Chrousos, 2009). Hafif derecede stres ve anksiyetenin öğrenmeyi arttırmasına karşın (Cornwell vd., 2012); şiddetli stres ve anksiyetenin, bellek (Shackman vd., 2006), performans (Schwabe vd., 2010), karar verme (Miu vd., 2008) hedefe yönelik performans (Causer vd., 2011) ve öğrenme stratejileri (Hawley vd., 2011) üzerine olumsuz etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur.

1.1.4. Stresin Köpeklerdeki Etkisi

Hayvanların biyolojik ve fizyolojik ihtiyaçlarının karşılanamadığı durumlarda stres meydana gelmektedir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü hayvan refahını, bir hayvanın yaşadığı ve öldüğü koşullarla ilişkili olarak fiziksel ve zihinsel durum olarak tanımlamaktadır (WOAH, 2024). Hayvan refahının değerlendirilmesinde olumlu ve olumsuz durumları da ele alan "Beş Etki Alanı Modeli" geliştirilmiştir (Mellor ve Beausoleil, 2015). Bu model, dördü fonksiyonel değişkenlerle ilgili olmak üzere beş alandan oluşmaktadır. İlk üç alan temel olarak beslenme, çevre ve sağlıkla ilgili sorunlar gibi içsel, fizyolojik ve hayatta kalma ile ilgili faktörlerin varlığına veya yokluğuna odaklanmaktadır. Dördüncü alan ise hayvanların doğal davranışlarını hayatta kalmaları için potansiyel olarak bir zorluk oluşturacak ölçüde kısıtlama potansiyeline sahip çevresel koşullarla bağlantılı faktörleri içermektedir. Duygusal durumlar ise beşinci "zihinsel durum" alanında değerlendirilmektedir. Burada, hayvanın genel duygusal deneyimi değerlendirilerek refah durumuna karar verilir (Mellor ve Beausoleil, 2015). Bu modelden de anlaşılacağı üzere canlının maruz kaldığı iç ve dış stresörler refah durumunu önemli ölçüde etkilemektedir. Bir diğer deyişle stres ve refah tanımı birbiriyle bağlantılı kavramlardır; stres durumunda refah sağlanamazken, refahın olmadığı durumda da stres oluşmaktadır (Veissier ve Boissy, 2007).

Köpeklerde strese maruz kalma, kalp atış hızı, kan basıncı, solunum hızı ve vücut sıcaklığında artış ya da azalışa neden olmaktadır (Beerda vd., 1999; Palestini vd., 2005). Bununla beraber köpeklerde insanlarda da olduğu gibi fiziksel ve psikolojik stres etkenleri sonucunda immun sistemin uyarıldığı görülmüştür (Beerda vd., 1990; Horwitz ve Mills,

2009). Stresin, solunum yolu hastalıkları, bazı bakteriyel enfeksiyonlar ve kanser gibi rahatsızlıkların seyrini kötüleştirebileceği de bilinmektedir (Horwitz ve Mills, 2009).

Stresin köpeklerdeki etkileri sadece fizyolojik değişikliklerle sınırlı kalmayıp, aynı zamanda davranışsal değişikliklere de yol açmaktadır. Akut stres sonucunda bakım beslenme gibi normal davranışların durması veya azalması, işeme, dışkılama, ses çıkarma, titreme gibi korku ve kaygı belirtileri, hareketsizlik, salya artışı, piloereksiyon, nefes nefese kalma, yalanma, esneme, ön pati kaldırma ve düşük vücut postürü ve düşük kuyruk gibi davranışsal belirtiler görülmektedir (Horwitz ve Mills, 2009).

Kronik stresin davranışsal belirtileri akut stres ile karşılaştırıldığında hayvan sahibi için daha az belirgin veya daha az şüphe uyandırıcıdır (Horwitz ve Mills, 2009). Kronik stres sonucunda esneme, koprofaji, vücutta titreme, düşük postür, vokalizasyon, işeme, uykuda artış, ilgisizlik, kendini temizlemede artış, pati kaldırma, azalmış davranış çeşitliliği ve belirgin bir işlevi olmaksızın sürekli olarak tekrarlanan eylemler olarak tanımlanan stereotipik davranışsal bozukluklar görülmektedir (Horwitz ve Mills, 2009; Salgırlı Demirbaş, 2015). Bununla beraber kronik strese verilen yanıtta kronik stresli bir köpeğin ek bir strese maruz kalıp kalmaması da önemlidir. Ek bir strese maruz kalan köpeklerde lokomotor aktivitede artış, vücudun sallanması, yer değiştirmiş davranışlar ve dönme gibi davranışlar görülmektedir (Salgırlı Demirbaş, 2015).

Kronik strese maruz kalma, insanlara benzer şekilde köpeklerde de çeşitli duygusal, davranışsal bozuklukların ortaya çıkmasına neden olduğu bilinmektedir (Dreschel, 2010; Mills vd., 2014). Kronik stres, hayvanın refahını olumsuz etkileyerek “öğrenilmiş çaresizlik” durumuna neden olabilir. Kronik stres durumunda ve daha sonra benzer bir strese maruz kaldıklarında kaçma fırsatlarının olması durumunda bile kaçma eylemini gerçekleştiremedikleri ve stres kaynağından kaçınmanın başarılı olamaması sebebiyle çeşitli davranış bozukluklarının şekillenebileceği de belirtilmiştir (Overmier ve Seligman, 1967). Bunun yanı sıra LC'deki noradrenalin yoğunluğunun azalması stres kaynaklı depresyonun gelişmesine yol açabilmektedir (Horwitz ve Mills, 2009; Overmier ve Seligman, 1967). Uzun süreli strese maruz kalma sonucunda kompulsif davranış bozukluklarının ortaya çıktığı öne sürülmüştür (Goldberger ve Rapoport, 1991; Lindsay, 2013). Kronik stres HPA ekseninin düzensiz hale gelmesine ve aşırı kortikosteroid salınımına neden olarak çeşitli beyin yapılarının etkilenmesine yol açar. Bu durum öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında bozulmalara sebep olur (Horwitz ve Mills, 2009). Passalacqua vd. (2013), anksiyete ile ilişkili davranış

sorunları yaşayan köpeklerin problem çözme yetileri ve yeni nesneye yaklaşma eğilimlerinin diğer köpeklere oranla daha az olduğunu bildirmiştir (Passalacqua vd., 2013).

1.1.5. Stresin Ölçülmesi ve Değerlendirilmesi

Hayvanlarda stres durumunun değerlendirilmesi çeşitli biyokimyasal, fizyolojik analizler ve davranış analizlerini kapsayan multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir. Bu kapsamda stresin tespiti; katekolaminler, glukortikoidler gibi çeşitli hormonların yanı sıra kalp atım hızı, kan basıncı, solunum sayısı ve vücut ısısı gibi çeşitli fizyolojik parametrelerin ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir (Bodnariu, 2008). Katekolaminler genellikle akut stresin göstergesi olarak değerlendirilirken, kortizol subakut ve kronik stresi temsil etmek için kullanılabilir (Gow vd., 2010).

Kortizol ölçümü, köpeklerde stresin değerlendirilmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Batt vd., 2009; Coppola vd., 2006). Kortizol HPA ekseninin stres kaynaklı aktivasyonuna yanıt olarak adrenal kortekste sentezlenmektedir. Kortizol analizi kan, tükürük, idrar ve tüy gibi materyallerden gerçekleştirilebilmektedir. Tükürük ve kan serumundan yapılan analizlerde organizmanın gerçek zamanlı olarak kortizol konsantrasyonunu yansıtmaması nedeniyle akut değişikliklerin etkilerini de görmek mümkündür (Russell vd., 2012). İdrar kortizol ölçümünde ise günlük dalgalanmanın önüne geçmek için 24 saat boyunca toplanan idrar örneği kullanılmaktadır. Saçtan kortizol analizinde ise öngörülen büyüme hızı nedeniyle insanlarda saçın kafa derisine yakın 1 cm'lik kısmının yaklaşık son 1 aylık, sonraki 1 cm'lik kısmın ise bir önceki ayın kortizol üretimine denk geleceği bildirilmiştir (Wennig, 2000). Böylece belirtilen diğer biyolojik materyaller gerçek zamanlı seviyelerin ölçümünde daha dikkat çekerken; tüyden kortizol analizi, daha uzun süreler boyunca sistemik kortizol maruziyetini ortaya koyarak, kronik stresin biyolojik belirteci olarak önemli bir rol oynamaktadır (Russell vd., 2012).

Kortizol analizi çeşitli biyolojik örneklerde immunoanaliz tabanlı testlerden yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi yöntemlerine kadar çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. İmmunosorbent tabanlı yöntemler radyoimmunosorbent (RIA) (Bryan vd., 2013), enzim immunosorbent (EIA) (Bryan vd., 2013) ve enzim bağlantılı immunosorbent (ELISA) (Wojtaś vd., 2020), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) (Regnier vd., 1988) ve LC-MS/MS (Martins-Júnior vd., 2015) gibi yöntemler örnek olarak verilebilir.

Stresin değerlendirilmesinde bir başka yöntem ise köpeğin davranışsal açıdan incelenmesidir. Stresin davranışsal açıdan incelenmesi ise bir uzman tarafından normal ve anormal davranış kalıplarının değerlendirilmesini içermektedir. Davranışsal değerlendirmede ise bir uzmana ihtiyaç duyulması, değerlendirmenin subjektif olması ve zaman gerektirmesi stresin değerlendirilmesinde kritiktir. Bununla beraber, kronik strese ilişkin davranışsal belirtilerin tespiti ve yorumlanması, akut strese kıyasla daha zorlayıcıdır. Köpeklerde strese verilen davranışsal tepkiler normal ve anormal olmak üzere iki farklı kategoride değerlendirilmektedir. Köpeklerin akut ve kronik stres durumlarında farklı davranışsal cevaplar oluşturduğu bilinmektedir. Hayvanlarda kronik stresin davranışsal belirtilerini değerlendirmek oldukça karmaşıktır. Bunun temel nedeni, kronik stres durumunda gözlemlenen davranışların genellikle anormal koşullarda sergilenen normal davranışlar olmasıdır (Friend, 1991). Yani kronik stres durumunda hayvanların verdiği davranışsal tepkilerin, genellikle strese neden olan durumdan bağımsız olarak, normalde sergiledikleri doğal davranışlarla benzer görünebilmektedir. Esneme ve kendini temizleme davranışı buna örnek olarak verilebilir. Stres sonucu görülen anormal davranışsal tepkiler 3 kategoride yer almaktadır: Yer değiştirmiş davranışlar, stereotipik aktiviteler ve halüsinasyon davranışları (Casey, 2002).

Köpeklerin vücut dilinin anlaşılması ve analiz edilmesi de köpeğin duygusal durumu hakkında önemli bilgiler vermektedir (Beerda vd., 1999) Köpeklerin vücut dilinin analiz edilmesi yüz ifadesi, kulak ve ağız duruşları, kuyruk hareketleri, genel vücut postürlerinin bir bütün olarak değerlendirilmesiyle gerçekleştirilir. Bununla beraber, açık alan testi de stres davranışlarının belirlenmesinde kullanılan, köpeğin sosyal olarak izole edilmesi ve yabancı olduğu bir ortamdaki davranışsal tepkilerinin, mizaç özelliklerinin değerlendirildiği bir testtir (Beerda vd., 1999).

Köpeklerle günlük temas halinde olan uygulayıcılar, araştırmacılar ve sıradan kişiler köpeklerin davranış ve karakter farklılıklarının farkındadır. Köpeklerde stresin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerden biri de köpek sahiplerinin doldurduğu anketlerdir. Bu anketler köpeklerin günlük davranışları, genel mizaçları, maruz kaldıkları stres faktörleri ve bunlara verdikleri davranışsal tepkiler hakkında veriler sağlamaktadır. Bu yöntem, diğer fizyolojik ve davranışsal ölçümlerle birlikte kullanıldığında, köpeklerin stres seviyesinin daha bütüncül bir şekilde değerlendirilmesine katkı sunar. Anketlerin standardizasyonu, sonuçların güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır. Örneğin,

Köpek Davranış Değerlendirmesi ve Araştırma Anketi (C-BARQ) rutin olarak kullanılan standardize edilmiş mizaç ve davranış değerlendirme araçlarından birisidir (Hsu ve Serpell, 2003).

1.2. İş Köpekleri

Köpekler, hayatımızda evcil hayvan olarak yer almalarının yanı sıra koyunları güdüp bir araya getirmekten görme engellilere yardım etmeye kadar, toplumun özel ekonomik çıkarları veya bir kesimin ihtiyaçları için büyük önem taşıyan çeşitli görevleri yerine getirmektedir. Özel olarak yetiştirilen ve eğitilen iş köpekleri, insanlara günlük yaşamlarında rehberlik eden ve onları destekleyen yardım köpekleri; güçlü burunlarını kullanarak tehlikeleri veya ilgi çekici kokuları (örneğin patlayıcılar, uyuşturucular, hastalıklar) tespit eden arama ve tespit köpekleri; ayrıca güvenliğimizi sağlamak için askeri ve kolluk kuvvetlerinde görev alan köpeklerdir (Helton, 2009).

Çeşitli şekillerde ve çeşitli işlerde çalışan köpekler, binlerce yıldır insan toplumlarının bir parçası olmuştur. Örneğin köpekler Doğu Sibirya'da 9000 yıl önce kızak çekme (Pitulko ve Kasparov, 2017); antik Roma'da hem çiftlik hayvanlarını koruma hem de avlanma gibi görevlerde yer almaktaydı (Coppinger vd., 1993). Eski dönemlerde insanlar yapay seçim yaparak yüksek performans gösteren köpekleri tercih ederek yavrular arasında istenen özelliklerin yaygınlığını artırmışlardır. Günümüzde modern köpek ırklarıyla karşılaştırıldığında eski iş köpeği popülasyonları genetik olarak çeşitlilik göstermektedir (Chen vd., 2021). Modern köpek yetiştiriciliğinde ise işlevden ziyade daha çok dış görünüş ve soy ağacı tercih edilmiştir (Boyko vd., 2010). Irklar arasında en çok farklılaşan genomik lokuslar, vücut büyüklüğü, kürk özellikleri ve kulak şekli gibi fiziksel özelliklerle ilişkilendirilmiştir. Modern bir köpek ırkındaki tüm köpekler birbirine benzeyebilirken, davranış ve mizaç oldukça değişkendir.

İş köpeği olarak yaygın kullanılan ırklar arasında Alman Çoban Köpeği, Labrador Retriever, Belçika Malinois, Rottweiler ve Border Collie yer almaktadır (Alves vd., 2022; Early vd., 2018). Araştırmalar, Alman Çoban Köpeği ve Rottweiler gibi ırkların, güçlü motivasyonları ve karmaşık görevleri hızlı öğrenme yetenekleri nedeniyle sıklıkla tercih edildiğini göstermektedir (Heberlein vd., 2017; McCartney ve Leavens, 2024). Örneğin, Alman Çoban Köpekleri genellikle polis ve askeri alanlarda kullanılmakta, Labrador Retriever'lar ise hassas koku alma yetenekleri ve dostane doğaları nedeniyle arama ve

kurtarma operasyonlarında istihdam edilmektedir (Alves vd., 2022). Ayrıca, Border Collie gibi çoban köpekleri, çeviklikleri sayesinde hayvan sürülerini yönetmek için ideal olarak değerlendirilmektedir (Early vd., 2018; Konno vd., 2016). Sokak köpekleri veya melez köpeklerin, farklı genetik geçmişleri sayesinde çeşitli çalışma ortamlarına uyum sağlama ve direnç geliştirme potansiyeliyle iş köpeği olarak görev alabilecekleri bildirilmiştir (Gunter vd., 2018; Morrill vd., 2022). Araştırmalar, melez köpeklerin bireysel özelliklere dayalı olarak seçilmeleri durumunda, safkan iş köpekleriyle belirli görevlerde kıyaslanabilir performans gösterebildiklerini ortaya koymaktadır (Bellumori vd., 2013; Pećin vd., 2017). Ayrıca, melez köpeklerde bulunan genetik çeşitliliğin, sağlık ve davranışsal dayanıklılık açısından avantajlar sağlayabileceği, bu özelliklerin iş köpekleri için kritik önemde olduğu belirtilmiştir (Bellumori vd., 2013; Gunter vd., 2018).

İş köpeği özelliklerini kazandıran genetik varyasyonlar modern ırklardan önceye dayandığından, safkan olsun ya da olmasın herhangi bir köpek yüksek performanslı bir iş köpeğinin genetik profilini sergileyebilir ancak bu köpeğin soyağacında yer alan ırklara bağlı olarak değişebilir (Chen vd., 2021). Optimal bir iş köpeği yetiştiriciliğinde özelliklerin karmaşıklığı, soy içi çiftleşme ve diğer istenmeyen sonuçlar nedeniyle son derece zordur. Dikkatli yapılmazsa, seçici yetiştirme popülasyonun genetik çeşitliliğini önemli ölçüde azaltarak hastalık oranlarının artmasına ve yaşam sürelerinin kısalmasına neden olabilir (Yordy vd., 2020). Bunun yanı sıra genetik karmaşıklıkları ve çevresel değişkenlikleri nedeniyle ıslahı zor olan davranışsal özellikler, aynı zamanda en kritik olanlar olabilir (Graham ve Gosling, 2009). Bu zorlukların üstesinden gelmek için genetik bilimi hem istenen özelliklerin optimize edilmesinde hem de genetik çeşitliliğin korunmasında kritik bir rol oynamaktadır.

İş köpeklerinde eğitim, doğum sonrası annesinin yanından ayrılmasıyla başlamaktadır. Öncelikle sosyalizasyon periyodu, sonrasında temel eğitimler ve en son olarak da branş eğitimleri gerçekleştirilir. Sosyalizasyon yaklaşık 2 ila 3 haftadan 12 haftaya kadar süren ve yavruların insanlara ve diğer uyaranlara yaklaşma ve etkileşim halinde olduğu çevresel etkilere karşı özellikle duyarlı oldukları kritik bir gelişim dönemidir. Çevresel uyaranlara maruz kalmanın daha sonraki davranışlar üzerinde derin bir etkiye sahip olduğu, sinaptik plastisitenin arttığı önemli bir dönemdir (Casey ve Bradshaw, 2008). Köpeklerin üç temel mekanizma aracılığıyla öğrendikleri gösterilmiştir: Pavlovian koşullanma, edimsel koşullanma ve sosyal öğrenme (Hall vd., 2021). İş köpeklerinin eğitiminde kullanılan yöntemler bu mekanizmalarla gerçekleştirilmektedir.

Başarılı bir iş köpeği sağlıklı, fiziksel olarak iyi durumda ve yüksek bir seviyede performans gösterebilme yeteneğine sahiptir. Gereken davranışsal, fizyolojik ve yapısal özellikler, köpeğin uzmanlaştığı alana göre değişiklik gösterir. Yüksek performanslı bir iş köpeği, iş türüne bağlı olarak değişen bir dizi zorlu kriteri karşılamak zorundadır. Dayanıklılık, uyum sağlama gibi bazı özellikler neredeyse tüm iş köpekleri için gereklidir, ancak diğer beceriler işin niteliğine özgü olarak değişmektedir (Chen vd., 2021). Örneğin bir arama köpeğinin en önemli özelliği, kaybolan kişilerin aranmasında değil, aynı zamanda patlayıcı maddeler, uyuşturucular ve silahların bulunmasında da kullanılan koku alma duyusudur (Almey ve Nicklin, 1996). Ancak yapılan çalışmalar tespit köpeklerinin performansında fiziksel yeteneklerden ziyade mizaç faktörlerinin birincil belirleyiciler olduğunu göstermektedir (Maejima vd., 2007). Bir rehber köpek, diğer köpekleri korkutan şeylerden korkmamalı veya bu tür şeylere havlamamalıdır. Çalışırken çevresindeki dikkat dağıtıcı unsurları görmezden gelmelidir. Tasma ile çalışırken sabit bir hızda ilerlemeli tasmaını çekitirmemelidir. Geniş bir yelpazede komutları öğrenmesi gereklidir ancak güvenli olmayan komutları görmezden gelme ve bir komut mümkün olmadığında problem çözme yeteneğine sahip olmalıdır (Chen vd., 2021).

1.2.1. İş Köpekleri ve Stres

İş köpekleri fizyolojik ve psikolojik birçok stresle karşı karşıyadırlar. Örneğin yoğun egzersiz yapan köpeklerde hipertermi görülebilir ve sağlıklı bir köpek bu ısı artışını tolere edebilir. Ancak kondisyonu düşük bir köpekte egzersiz veya aşırı çevresel koşullar nedeniyle oluşan aynı derece hipertermi, kaçınılmaz olarak ciddi sistemik hastalıklara yol açabilmektedir. Askeri iş köpeklerinde sıcak çarpması, ölümün (Moore vd., 2001) veya erken emekliliğin (Evans vd., 2007) en yaygın önlenbilir nedenlerinden olarak bildirilmiştir. Bununla beraber egzersize bağlı gastrointestinal hastalıkların ve oksidatif strese bağlı rabdomiyolizin olabileceği de belirtilmiştir (Helton, 2009).

İş köpeklerinde uyarılma, stres gibi olumsuz veya olumlu duygusal durumları kapsamaktadır. Yüksek düzeyde uyarımın, bir görevi yerine getirme becerisine etki edebileceği belirtilmiştir (Lazarowski vd., 2020). Bir görevde başarılı performans için optimal bir uyarılma seviyesi olduğu, artan uyarılmanın performansı belirli bir noktaya kadar iyileştirebileceği (Brady vd., 2018), sonrasında ise performansı olumsuz etkileyeceği bildirilmektedir (Bray vd., 2015). Artan uyarılma sonucunda solunumda ve kalp hızında artış gibi fizyolojik tepkilerle karşılaşılır. Örneğin tespit köpeklerinde artan uyarılma sonucunda

yoğun nefes alıp verme, köpeklerin aynı anda hem koklama hem de nefes alma yeteneğini engelleyerek koku alma kabiliyetini azaltabilmektedir. Artan uyarılmanın öğrenme, hafıza ve karar verme süreçlerini bozabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte, hafif ve orta düzeydeki stresin dinamik ve oldukça değişken ortamlarda çalışan köpekler için kritik olan stres dayanıklılığının gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği de belirtilmektedir (Lazarowski vd., 2020).

İş köpekleri, eğitim süreçleri ve görevleri sırasında karşılaştıkları zorlu koşullar nedeniyle stresli durumlarla sıkça karşılaşmaktadır. Örneğin patlama sesleri, silah sesleri gibi yüksek seviyedeki gürültüler, değişken arazi koşulları, trafik, yolculuk, kalabalık, diğer hayvanlar ve insanlar gibi çeşitli stres faktörlerine maruz kalabilirler. Köpekler, bu tür durumlara donma, geri çekilme ve saldırganlık gibi korku ya da kaygı belirtileriyle yanıt verebilir. Bu tür tepkilerin, köpeklerin görevlerini yerine getirme yeteneklerini olumsuz yönde etkileyebildiği bildirilmiştir (Rooney vd., 2016).

Bu köpeklerde kronik stresin daha fazla gözlemlendiği ve bu durumun da iş yapabilme performanslarını olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Denham vd., 2014; Haverbeke vd., 2008). "İş grubu köpekler" olarak sınıflandırılan ve önemli görevler üstlenen bu köpeklerde, eğitim, günlük yaşam ve çalışma sırasında maruz kalınan yoğun stres hem fiziksel hem de psikolojik sağlık üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Bu etkiler, performansı ve iş yapabilirliği ciddi ölçüde azaltabilmektedir (Lazarowski vd., 2020).

1.3. mikroRNA'lar

Gen ifadesinin düzenlenmesi organizmaların gelişimi, hücrel farklılaşma süreçleri ve çevresel uyarılara uyum sağlama açısından temel bir öneme sahiptir (Jaenisch ve Bird, 2003; Wray vd., 2003). Bu düzenleme, transkripsiyonel basamaktan post-translasyonel basamaklara kadar geniş bir aralıkta gerçekleşebilmektedir. Böylece gen ifadelerini çeşitli düzeylerde değiştirilerek organizmanın uyarılara uygun yanıtlar geliştirerek yaşamsal faaliyetlerinin düzenlenmesine katkıda bulunulur (Szyf vd., 2008).

Epigenetik, DNA dizisinde bir değişim olmaksızın, çeşitli araçlarla gen ifadesindeki değişimleri inceleyen bilim dalıdır. Bu alan, kalıtılabilir epigenetik değişimlerin fenotipik varyasyonlara olan etkilerini anlamamıza yardımcı olur. Epigenetik mekanizmalarda önemli rol oynayan yapılardan biri kodlanmayan RNA (ncRNA)'lardır. ncRNA'lar mRNA veya diğer

epigenetik mekanizmalarla etkileşime girerek gen ifadesinin düzenlenmesinde etkili rol oynamaktadır (Peschansky ve Wahlestedt, 2014). ncRNA'lar transkripsiyonu ve mRNA'nın stabilitesini etkileyerek gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Ökaryot canlılarda çeşitli görevlerde yer alan çok sayıda küçük ncRNA'lar bulunmaktadır. Bu RNA'lar uzunluklarına ve argonaute ailesi proteinleri (AGO) ile etkileşimlerine göre mikroRNA (miRNA), küçük susturucu/interferans RNA (siRNA) ve PIWI-Etkileşimli RNA (piRNA) olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar (Ha ve Kim, 2014). Bu RNA'lar RNA interferans adı verilen transkripsiyon sonrası gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Genellikle mRNA'ların 3' UTR (transle edilmeyen bölge)'lerine bağlanıp translasyonel baskı oluşturarak hedef genin protein seviyesinin azalmasına veya mRNA'ların degradasyonlarına neden olurlar (Bartel, 2009). Özellikle, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğundaki küçük kodlanmayan RNA'lar olan miRNA'lar (Bartel, 2009), hem normal biyolojik süreçlerin hem de çeşitli patolojik süreçlerin düzenlenmesinde etkin rol oynamaktadır (Gilad vd., 2008). miRNA'lar post-transkripsiyonel baskılayıcı olarak hareket edip susturma kompleksi oluşturarak gen ifadesinin düzenlenmesinde rol almaktadır (Collins ve Cheng, 2006).

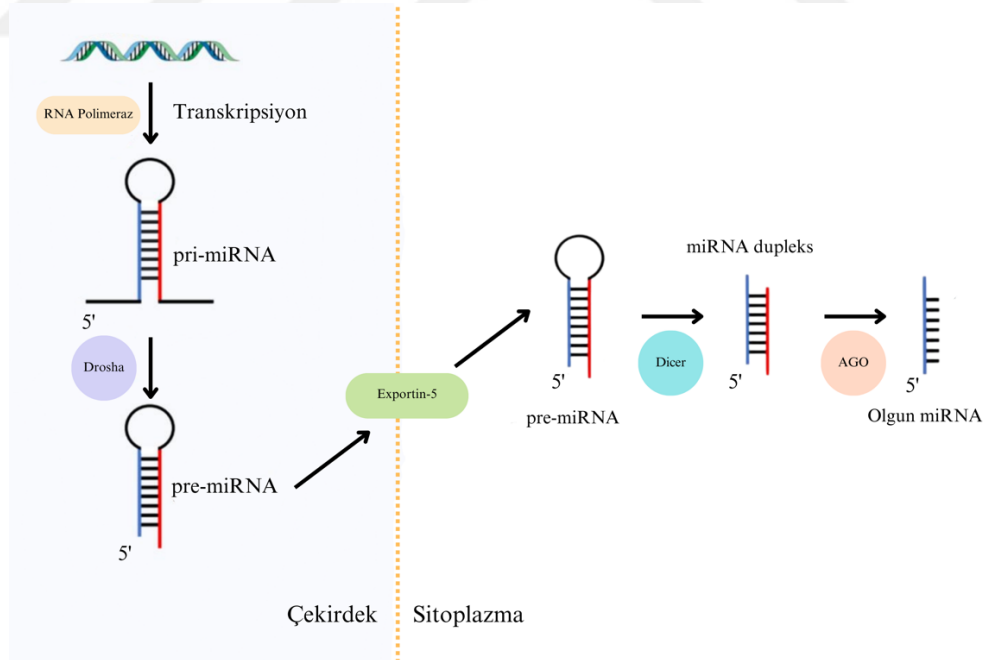
Hücrede belirli bir anda mevcut olan bu epigenetik motifler, genomun aksine hücreye özgüdür ve bu motifler canlının yaşamı boyunca değişiklik gösterebilmektedir. Bu epigenetik değişimler normal gelişmeyi düzenleyebilen ve çevresel sinyallere cevap olarak gen ifadesinde değişiklik üretebilen bir epigenom meydana getirmektedir (Szyf vd., 2008). Epigenetik faktörler, çevresel etkiler tarafından aktif ve esnek bir şekilde değiştirilmektedir. Bu değişikliklerin epigenetiksel açıdan ölçülmesi ile anlamlı ifadeler elde edilmesi sonucunda epigenetik faktörlerin potansiyel biyobelirteç olabilecekleri belirtilmiştir (Stoffel vd., 2020).

1.3.1. mikroRNA Biyogenezi

miRNA sekansları genom içerisinde kodlanan ve kodlanmayan çeşitli bölgelerde yer almaktadır (Rodriguez vd., 2004). miRNA genleri genom üzerinde tek veya kümelenmiş bir şekilde bulunurlar ve genellikle bir lokus içerisinde küme oluştururlar. Bu küme miRNA'ların polisistronik olarak transkribe edildiği bilinmektedir (Lee vd., 2002). Bu kümeler aynı anda transkribe edilse bile ayrı şekilde transkripsiyon sonrası modifikasyonlara uğrayabilmektedir (Roush ve Slack, 2008). Bazı miRNA genleri, protein kodlayan genlerin intronlarında bulunur ve konak (host gene) genin promotör bölgesini paylaşırlar. Ayrıca miRNA genlerinin genelde

birden fazla transkripsiyon başlangıç noktasına sahip olduğu ve intronik miRNA'ların promotörünün konakçı genin promotöründen farklı olabileceği gözlemlenmiştir (Monteys vd., 2010).

miRNA biyogenezi çekirdek ve sitoplazmada gerçekleşen, miRNA'nın olgunlaşması ve işlev kazanması için çeşitli enzim ve proteinlerin yer aldığı çok aşamalı bir süreçtir. miRNA genleri RNA Polimeraz II aracılığıyla transkribe edilir ve bu süreç sonucunda olgun miRNA dizisini içeren saç tokası şeklinde birincil miRNA (pri-miRNA) meydana gelir (Lee vd., 2004). pri-miRNA, RNaz III tipi endonükleaz Drosha ve kofaktörü DGCR8 ile oluşan mikropresör adı verilen bir kompleks tarafından kesilir (Lee vd., 2003). Böylece miRNA olgunlaşma süreci başlamış olur. Bu kesim işlemi, öncü miRNA (pre-miRNA) adı verilen yapının oluşumuyla sonuçlanır. Olgunlaşma sürecinin devam edebilmesi için pre-miRNA, exportin 5 (XPO5) aracılığıyla çekirdekte sitoplazmaya taşınır (Yi vd., 2003). Sitoplazmada RNaz III tipi bir başka endonükleaz olan Dicer enzimi pre-miRNA'nın saç tokası yapısındaki terminal halkayı keser ve yaklaşık 22 baz uzunluğunda olgun miRNA duplekslerinin oluşumunu sağlar (Kim vd., 2009). Bu çift zincirli RNA'dan bir iplik degrade olurken diğer iplik ise olgun miRNA olarak kalır (Lee vd., 2004).



Şekil 1.3. miRNA biyogenezi

1.3.2. miRNA'ların Etki Mekanizmaları ve Görevleri

miRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Olgun miRNA, AGO proteinine yüklenerek RNA indüklenmiş susturucu kompleksini (Orsetti vd.) oluşturur (Davis-Dusenbery ve Hata, 2010). RNA interferans sürecinde miRNA, hedef mRNA ile baz eşleşmesi gerçekleştirir. miRNA'ların 5' ucunda yer alan ve "miRNA seed" olarak adlandırılan 2-7 nükleotid uzunluğundaki dizi, hedef mRNA'ların tanınmasında önemli rol oynamaktadır (Bartel, 2009). Hedef mRNA'nın 3'-UTR'lerine bağlanan miRNA, RISC kompleksini indükler mRNA'nın yıkımına veya translasyonun baskılanmasına sebep olur (Davis-Dusenbery ve Hata, 2010; He ve Hannon, 2004; Huntzinger ve Izaurralde, 2011).

Olgun miRNA pre-miRNA'nın 5' ipliğinden ya da 3' ipliğinden oluşabilir: 5' iplikten oluşuyor ise "5p"; 3' iplikten oluşuyor ise "3p" olarak adlandırılır. miRISC yüklemesi için her iplik de seçilebilir genellikle bir iplik baskındır. Argonaute proteinine bağlanan iplik kılavuz miRNA (miR) olarak adlandırılırken diğer iplik ise yolcu miRNA (miR*) olarak adlandırılır (Medley vd., 2021). Bununla beraber miRNA'nın her iki ipliğinin de Argonaute proteinlerine bağlanarak gen ifade düzenlenmesinde yer aldığı da bilinmektedir (Ghildiyal vd., 2009). miRNA isimlendirmesinde harfler (a, b, c) ve rakamlar (-1, -2, -3 gibi) da kullanılmaktadır. Aynı olgun miRNA dizisinin farklı gen veya prekürsör RNA'lardan elde edilmesi durumunda "-1" ve "-2" gibi sayılar kullanılır. Örneğin miR-16-1 ve miR-16-2 aynı olgun miR-16 dizisini kodlayan ancak farklı kromozomlarda yer alan iki ayrı genden ya da iki ayrı öncül/prekürsör RNA'dan köken aldıkları için bu eklerle birbirinden ayrılır. Aynı seed bölgesini içeren ancak sekansları tamamen aynı olmayan miRNA'ların adlandırılmasında ise a, b, c gibi harfler kullanılır. Örneğin miR-16a ve miR-16b, miR-16 ailesine ait benzer seed bölgesine sahip, dolayısıyla işlevsel olarak birbirine benzer ancak olgun sekansta farklılıklara sahip iki farklı varyanttır (Bernardo vd., 2012; Griffiths-Jones vd., 2006).

miRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesinin yanı sıra proliferasyon, farklılaşma, gelişme ve hücre ölümü de dahil olmak üzere temel hücresel süreçlerde rol oynamaktadır (Hafner vd., 2010). Mevcut literatürde kanser (Reddy, 2015), diyabet (McClelland ve Kantharidis, 2013), viral enfeksiyonlar (Sullivan ve Ganem, 2005), nörodejeneratif hastalıklar (Hébert ve De Strooper, 2009), kardiyovasküler bozukluklar (Small vd., 2010) gibi kronik hastalıklarla ilişkili oldukları da tespit edilmiştir.

Bir miRNA, çeşitli mRNA transkriptlerindeki kısmen komplementer bölgeleri hedefleyerek çok sayıda genin translasyonu üzerine etkili olabilmektedir. Biyoinformatik hesaplamalara dayanan tahminler her bir miRNA'nın 200'den fazla transkripti hedefleyebileceğini ve bu transkriptlerin tek bir miRNA tarafından düzenlenebileceğini düşündürmektedir (Lindow ve Gorodkin, 2007). Dolayısıyla tek bir miRNA'nın birden fazla geni düzenleyebilmesi, çeşitli fizyolojik ve patolojik durumların değerlendirilmesinde dikkat çekmektedir (Michael vd., 2010).

1.3.3. mikroRNA'ların Biyobelirteç Potansiyelleri

Biyobelirteç terimi normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik müdahaleler de dahil olmak üzere bir maruziyete veya müdahaleye verilen biyolojik tepkilerin bir göstergesi olarak ölçülen tanımlanmış bir özellik olarak adlandırılmaktadır (FDA-NIH, 2016). Biyobelirteçler diagnostik, farmakodinamik/cevap, prediktif, güvenlik, duyarlılık/risk ve prognostik biyobelirteç gibi birçok alt sınıfta incelenebilmektedir (Califf, 2018). İdeal bir biyobelirtecın invaziv olmayan yöntemlerle elde edilebilmesi, analiz edilen numune de stabilite, doğru ve güvenilir sonuç verme, maliyet etkinliği, hastalığa özgüllük, hastalığı erken tespit edebilme olasılığı, model organizmalardaki patolojilere uygunluk ve hastalığın ilerlemesindeki değişikliklere duyarlı olması gibi belirli kriterleri karşılaması gerekmektedir (Zinovkin ve Sakharov, 2024). Bu kriterler göz önünde bulundurulduğunda, miRNA'lar, özellikle invaziv olmayan biyobelirteçler olarak potansiyelleri sayesinde dikkat çekmektedir.

miRNA'ların değişen çevresel koşullara uyum sağlama sürecinde önemli roller oynadığı, çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Örneğin, miR-7'nin inaktive edildiği sineklerin değişken sıcaklıklara maruz kaldıklarında göz gelişimlerini düzgün bir şekilde tamamlayamadığı gösterilmiştir (Li vd., 2009). Benzer şekilde, miR-14 mutasyonu taşıyan sineklerin yüksek tuzluluğa karşı duyarlı hale geldiği (Xu vd., 2003) ve miR-8'in inaktive edildiği zebra balıklarının ozmotik strese yanıt vermede başarısız olduğu tespit edilmiştir (Flynt vd., 2009). Bu bulgular, miRNA'ların çevresel stres faktörlerine karşı organizmaların adaptasyonunda kritik düzenleyici bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, miRNA fonksiyon bozukluklarının normal koşullarda etkisi görülmesi bile, stres durumlarında organizmaların fizyolojik sorunlar yaşamasına neden olabileceği vurgulanmaktadır. Bu kapsamda kronik stres maruziyetinde miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelleri çalışmanın araştırma sorusunu oluşturmuştur.

miRNA'lar, hücre içinde bulunmalarının yanı sıra sirküler miRNA (c-miRNA) olarak kan, serum, plazma, tükürük gibi hücre dışı ortamlarda eksozom adı verilen mikro veziküllerde bulunabilmeleri nedeniyle de bilimsel çalışmalarda kullanılabilirlik açısından dikkat çekmektedir (Gallo vd., 2012; Kroh vd., 2010). Eksozomlar, protein ile RNA taşınmasında ve hücreler arası iletişimde rol oynayan, endositik membran kökenli, 30–120 nm boyutlarında veziküllerdir (Lin vd., 2015). Lenfositler, trombositler, mast hücreleri, epitel hücreleri, endotel hücreleri, dentritik hücreler ve nöronlar gibi birçok hücre tipinden salınarak kan, idrar, tükürük, amniyotik sıvı, anne sütü, gibi çoğu vücut sıvısında bulunabilmektedirler veziküllerdir (Lin vd., 2015). Bunun yanı sıra çoğu hücre tipinin kültür ortamında bulunabildikleri bildirilmiştir (Théry vd., 2002). Bu sayede miRNA'lar köken aldıkları hücrelerden dolaşıma katılarak komşu veya uzak hücrelerin fizyolojisini etkileyebilmektedir (Zhang ve Peng, 2015). Ayrıca plazma bazlı c-miRNA'lar fosfolipid çift katmanlı kapsüllü veziküllere (Valadi vd., 2007) veya RNA bağlayıcı protein komplekslerine (Gupta vd., 2010) dahil olarak çeşitli tamamlayıcı mekanizmalarla bozulmadan korunabilmektedir. miRNA'ların nispeten daha kararlı moleküller olması, RNaz aktivitesine, pH ve sıcaklık değişimlerine oldukça dayanıklı olmaları da biyobelirteç potansiyelleri açısından önemlidir (Zen ve Zhang, 2012).

Fizyolojik bir uyaran veya yaralanma sonucunda miRNA'ların hedef dokudan aktif ya da pasif olarak dolaşıma aktarıldığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Laterza vd., 2009; Lecchi vd., 2020). Örneğin; uzun süreli ve istikrarlı yapılan egzersizlerde anlamlı bulunan c-miRNA'ların plazmada stabil kaldığı ve akut egzersiz durumundan etkilenmediği, akut yorucu egzersizden hemen sonra anlamlı olarak belirlenen miRNA'ların ise egzersizden 1 saat sonra ciddi düzeyde azaldığı, yani akut durumlarda miRNA yanıtının oldukça dinamik olduğu gösterilmiştir (Baggish vd., 2011).

miRNA'ların organizmada fizyolojik ve patolojik değişimler sonucunda ifade düzeylerinin değişmesi ve birçok biyolojik materyalde tespit edilebilmeleri nedeniyle, miRNA'lar lokal ve sistemik değişikliklerin değerlendirilmesinde dikkat çekmektedir c-miRNA'lar, biyobelirteç olarak ilk defa serum örneklerinde diffüz büyük B hücreli lenfoma hastalarını incelemek için kullanılmıştır (Lawrie vd., 2007). Hastalıkların erken teşhisi, özellikle kanser gibi hastalıkların tedavi başarısını artırmada kritik bir rol oynamaktadır. Örneğin, hastaların kanında 11 adet miRNA ifadesini ölçen ticari bir panel (GastroClear kiti, <https://gastroclear.mirxes.com/>) mide kanserinin erken teşhisinde kullanılmaya başlanmış ve bu durum, miRNA'ların prediktif biyobelirteç potansiyeline dikkat çekmiştir (Kapoor vd.,

2020). Kanser teşhisinde de miRNA'ların etkileyici sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Nappi vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada testiküler germ hücreli tümörü olan 111 hastada miRNA-371'in %100 özgüllük ve %96 duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir (Nappi vd., 2019). Bunun yanı sıra miRNA'lar, kolorektal (Krajewska vd., 2018), kolon (Ogata-Kawata vd., 2014), meme (Kan vd., 2024; McGuire vd., 2015), prostat (Chen vd., 2024; Matin vd., 2018) pankreas (Huang vd., 2024), akciğer (Chen vd., 2017) gibi çeşitli kanser türlerinde teşhis, prognoz ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde önemli biyobelirteçler olarak dikkat çekmekte ve çeşitli panel oluşturma çalışmaları yapılmaktadır.

Yapılan çalışmalar miRNA'ların yalnızca kanser değil, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve diğer birçok hastalığın erken teşhis ve prognozunda önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada miRNA-21 ve miR-132'nin kalp yetmezliğinin prognozunu değerlendirmede önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Bu miRNA seviyelerinin kardiyovasküler ölüm riskini ve hastaların tekrar hastaneye yatış olasılığını gösterebileceği bildirilmiştir (Masson vd., 2018; Zhang vd., 2017). Caggu vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada Parkinson hastalarında kontrol gruplarına kıyasla kanda miRNA-155-5p'nin ifadesinin yüksek miR-146a-5p'nin ifadesinin ise düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, levodopa ile tedavi edilen hastalarda miR-155-5p'nin ifadesinin azaldığı görülmüş ve bu durum, miRNA'nın hastalık prognozu için umut verici bir aday olabileceğini düşündürmüştür (Caggu vd., 2018). Gestasyonel diyabet hastası kadınlarda yapılan bir çalışmada serum örneklerinde kontrol grubuna kıyasla miR-29a, miR-222 ve miR-132'nin ifadelerinde anlamlı farklar olduğu ve bu miRNA'ların gestasyonel diyabetin öngörülmesi için aday biyobelirteçler olabileceği belirtilmiştir (Zhao vd., 2011). İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (HIV) hastalarında, karaciğer hasarının etiyolojisiyle ilişkili olduğu ve bu hastalarda karaciğer hasarı için serumda miRNA-122, miRNA-22 ve miRNA-34a'nın biyobelirteçler olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Anadol vd., 2015). Alzheimer hastalığının erken teşhisi için yapılan bir genoassay çalışmasında serumda miRNA-135a-5p seviyelerinin hasta olan bireylerde ilgili miRNA'nın kontrol grubuna göre yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir (Lin vd., 2024). Elde edilen bulgular miRNA-135a-5p'nin Alzheimerin erken teşhisinde kullanılabilecek umut verici bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir.

miRNA'lar, Northern blot analizi (Valoczi vd., 2004), in situ hibridizasyon (Kloosterman vd., 2006), gerçek zamanlı PCR (Wiegand vd., 2018), mikrodizin analizi (Honda vd., 2013) ve yeni nesil dizileme (Kangsamaksin vd.) (Luo vd., 2016) dahil olmak

üzere çeşitli spesifik ve hassas yaklaşımlar kullanılarak tespit edilebilmektedir. miRNA'ların türler arasında yüksek düzeyde homoloji göstermesi, proteine özgü antikorlara ve türe özgü ilişkilendirmelere gerek kalmadan kolayca tespit edilebilmesi nedeniyle sağlık koşullarına ve hayvan refahına genel ve aynı zamanda derinlemesine bir bakış sağlayabilecek önemli bir moleküler çalışma alanı olduğu belirtilmektedir (Miretti vd., 2020).

1.3.4. mikroRNA ve Stres

Strese verilen yanıtın bireyler arasında farklılık göstermesi, genetik olarak özdeş olan bireylerde bile stres sonucunda farklı fizyolojik ve davranışsal etkiler olması nedeniyle, stres mekanizmalarını ve etkilerini araştıran çalışmaların odağı epigenetik bilimine yönelmiştir (Federenko vd., 2004; Hunter vd., 2015). Stres reaksiyonlarının epigenetik regülasyonunda miRNA'lar önemli bir rol oynamaktadır (Leung ve Sharp, 2010). miRNA'lar hücresel düzeyde homeostazın koruyucularıdır ve transkripsiyon faktörleriyle, proteinlerle etkileşime girerek stres yanıtının düzenlenmesinde görev alırlar. Çeşitli stres etkenlerinin miRNA'ların oluşumuna, miRNA-protein komplekslerinin aktivasyonuna ve mRNA hedeflerinin ifadesinin değişmesine neden olduğu bildirilmiştir (Leung ve Sharp, 2010; Olejniczak vd., 2018). Bunun yanı sıra, miRNA'ların nöroendokrin sistemde; sinaptik plastisite, akson rehberliği, astrosit aktivitesi gibi önemli roller üstlendiği belirtilmektedir (Bartel, 2009; Mor vd., 2011).

Strese maruz kalma sonucunda miRNA'ların ifade edilme seviyelerinde farklılıklar meydana geldiği ilk olarak fareler üzerinde gerçekleştirilen deneyler ile ortaya konmuştur. Akut kısıtlama stresine maruz bırakılan farelerde, kısıtlamadan 24 saat sonra frontal korteks incelendiğinde miR-26b ve let-7a'nın ifadesinde bir artış olduğu görülmüştür (Rinaldi vd., 2010). Ratlarda akut ve kronik stres sonucu amigdala ve hipokampustaki miRNA ifadelerine bakıldığında, akut stres sonrası miR-134 ve miR-183'ün ifadesinin arttığı; kronik stres sonrası ise miR-134 ifadesinin azaldığı, miR-183'ün ifadesinde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir (Meerson vd., 2010). Bu miRNA'ların asetilkolinesterazın alternatif yarışma mekanizmasında yer aldıkları ve dolayısıyla strese yanıtta kolinerjik sistemin aktivitesinde rol oynayabileceği belirtilmiştir. Ayrıca bu iki miRNA'nın da kardiyogenezis ve kardiyovasküler malformasyonlarla ilişkilendirilmiş genleri hedefledikleri belirtilmiştir (Meerson vd., 2010).

Ratlarda kronik sosyal yenilgi stresinin medial prefrontal kortekste etkisinin araştırıldığı bir çalışmada medial prefrontal kortekste pirimidal nöronlarda miR-218'in ifadesinin artması sonucu kronik strese olan direncin arttığı ve bu artışın nöronlardaki stres

kaynaklı morfolojik değişiklikleri önlediği görölmüştür. Ayrıca bu ifade farklılığı kanda incelendiğinde, kronik strese duyarlı olan farelerin miR-218 ifadesinin kontrol ve dirençli gruba göre daha düşük olduğu görölmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda miR-218'in strese karşı duyarlılıkta rol oynadığını ve kandaki seviyesinin strese karşı duyarlılığın belirlenmesi açısından yararlı olabileceği belirtilmiştir (Torres-Berrio vd., 2020). Strese duyarlı ve strese dirençli iki farklı fare hattında yapılan çalışmada miR-1a-3p ve miR-155-5p'nin strese duyarlılık ve dayanıklılık üzerine etkisi araştırılmıştır (Solich vd., 2024). Çalışmada strese dirençli farelere (NET-KO ve SWR/J) bu miRNA dizilerini hedefleyen analoglarını (Agomir); strese duyarlı farelere (C57/BL/6J) ise antagonistik dizilerini (Antagomir) intraserebroventriküler enjeksiyon yoluyla uygulanmış ve uygulamanın etkisi zorunlu yüzme testiyle incelenmiştir. Sonuçlar, strese duyarlı suşun antagomir infüzyonu aracılığıyla strese dayanıklı bir fenotipe dönüştürülebileceğini göstermiştir. Strese dayanıklı suşların ise uygulama sonrası davranışlarında değişiklik görüldüğü belirtilmiştir (Solich vd., 2024). Yapılan çalışmada ayrıca miR-1a-3p'nin çeşitli beyin bölgelerindeki ifadesi incelenmiş ve serebellumdaki ifade değişimlerinin stres tepkisiyle ilişkili olduğu belirtilmiş ve bu miRNA'ların serebellar fonksiyon ve sinaptik plastisite arasında bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir (Solich vd., 2024).

miRNA'ların, stres yanıtının en önemli faktörlerinden biri olan kortizol üretiminin düzenlenmesinde de rol oynadığı gösterilmiştir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada miR-24'ün adrenal korteks içerisindeki aldosteron ve kortizol üretimini düzenlediği; miR-24'ün bu hormonların üretiminde önemli olan 2 enzimi (CYP11B1 ve CYP11B2) hedeflediği ve üretimlerini azalttığı gösterilmiştir (Robertson vd., 2013). Bu sonuçla, strese bağlı olarak miR-24'ün ifade seviyelerinde meydana gelen değişikliklerin, organizmanın strese olan duyarlılığını (direncini) etkileyerek strese karşı adaptasyon mekanizmasını oluşturduğu düşünülmektedir (Wiegand vd., 2017). Uchida vd. (2008) tarafından karşılaştırmalı rat suşlarında yapılan bir başka çalışmada, miRNA-18a'nın ifadesinin arttığı belirtilerek, glukokortikoid reseptör (GR) proteinin ifadesinin azaldığı ve miR-18a'nın GR translasyonunu aşığı regüle ettiğine dikkat çekilmiştir (Uchida vd., 2008). miR-124a'nın da GR ifadesini aşığı regüle ettiği gösterilmiştir (Vreugdenhil vd., 2009). miRNA-34c'nin ise akut ve kronik streste sentral amigdala da yukarı regüle edildiği ve hedeflerinden biri olan kortikotropin salgılatıcı hormon reseptörünün (CRHR1) ifadesini azaltarak anksiyeteyi azalttığı bildirilmiştir (Haramati vd., 2011).

Kronik strese maruz kalmanın ardından, sıklıkla travma sonrası stres bozukluğu ve depresyon gibi psikiyatrik bozukluklar gelişebileceği bilinmektedir. miRNA'ların stres yanıtındaki fizyolojik rolleri nedeniyle stresle ilişkili bozuklukların tedavisi için potansiyel hedefler olabileceği belirtilmiştir (Haramati vd., 2011). miRNA'ların diğer epigenetik ajanlarla etkileşime girdiği ve depresyonun tedavisinde kullanılan ajanların miRNA'ları hedeflediği görülmektedir. Kronik strese maruz kalan farelerde miRNA-124'ün hipokampustaki ifadesinde azalma ve depresyon davranışlarında artış görülmüştür (Higuchi vd., 2016). İmipramin kullanımından sonra ise anormal davranışların ve miRNA-124'ün ifadesinin düzenlendiği gösterilmiştir. Ayrıca, miRNA-124'ün, HDAC4 ve HDAC5'i hedef aldığı bunun yanı sıra HDAC4/5 inhibitörünün intrahipokampal infüzyonu sonucunda antidepresan benzeri etkilere sebep olduğu belirtilmiştir (Higuchi vd., 2016).

miRNA'lar tam kan (Gidron vd., 2010), serum (Balakathiresan vd., 2014), plazma (Tsujiura vd., 2010), sperma (Barceló vd., 2019), tükürük (Michael vd., 2010) gibi birçok vücut sıvısında bulunmaktadır. Kronik psikolojik strese miRNA'ların tam kandaki durumları araştırılan bir çalışmada, tam kanda 11 miRNA tespit edilmiş (miR-15a, -16, -19a, -19b, -26b, -30b, -106b, -126, -142-3p, -144, ve -144*) ve tespit edilen miRNA'lar dört farklı zaman diliminde analiz edip karşılaştırılmıştır. miR-16, -144, ve -144* teki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca bu miRNA'ların çoğunun, incelemenden hemen sonra artış göstererek pik yaptığı ve bir hafta sonra başlangıç seviyesine geri döndüğü bildirilmiştir (Katsuura vd., 2012). Bu miRNA'lardan 6 tanesinin (miR-16, -19a, -19b, -26b, -144, ve -144*) psikolojik strese yanıtla ya da psikiyatrik bozukluklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hunsberger vd., 2009). İnsanlarda kronik akademik stresin araştırıldığı bir çalışmada, sınava hazırlanan tıp öğrencilerinden üç farklı zaman diliminde (sınavdan 2 ay önce, sınavdan 2 gün sonra ve sınavdan 1 ay sonra) periferik kan örnekleri ve kortizol tayini için tükürük örnekleri toplanmıştır (Honda vd., 2013). İstatistiksel olarak sınav stresine anlamlı tepkiler gösteren 7 miRNA (miR-16, -20b, -26b, -29a, -126, -144 ve -144*) tanımlanmış ve miR-16'nın anksiyetenin tespitinde biyobelirteç olabileceğine dikkat çekilmiştir (Honda vd., 2013). Gidron vd. (2010) yaptıkları çalışmada insanlarda tam kanda let7-b ve miR-21'in seviyelerini düşük ve yüksek stres durumlarında karşılaştırmışlar ve miR-21'in psikolojik stres için tam kanda bir biyobelirteç olarak faydalı olabileceğini öne sürmüşlerdir (Gidron vd., 2010).

Mevcut literatürde, köpeklerde kronik stres sonucunda miRNA ifadelerini inceleyen tek çalışma bulunmaktadır (Luo vd., 2016). Luo vd. (2016) tarafından yapılan Chinese Field (n=3

stres grubu, n=3 kontrol grubu) ve beagle (n=3 stres grubu, n=3 kontrol grubu) ırkı köpeklerin yer aldığı çalışmada, kronik stres sonucu hipofiz ve adrenal bezdeki miRNA ifadesinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı karaktere ve stres toleransına sahip bu iki farklı ırk köpeklere elektrik akımı ve hareket kısıtlaması uygulanarak kronik stres oluşturulmuştur. Stres uygulamasından sonra hava embolisi ile öldürülerek adrenal korteks ve hipofiz bezi dokuları alınmıştır. RNA sekansı sonucunda, bu dokularda toplamda 39 miRNA'nın farklı ifade edildiğini ve bu miRNA'lardan 18 tanesinin ortak olduğu belirtilmiştir. Ayrıca köpeklerde miR-205'in hipofiz ve hipokampusta MMD genini yukarı regüle ederek kronik stres altında immun yanıtı güçlendirdiği ortaya konulmuştur (Luo vd., 2016). 2022 yılında yapılan bir çalışmada (Guelfi vd., 2022) ise; arama kurtarma köpeklerinden (n=22) arama kurtarma çalışması öncesi ve sonrası alınan serum örneklerinin tüm genom boyunda miRNA ifade profili (miRNome) yeni nesil dizi analizi gerçekleştirilerek ifade profilleri araştırılmıştır. Analiz sonucunda arama kurtarma çalışması sonrası (akut stres) let-7a ve let-7f miRNA'larının ifadelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Biyoinformatik çalışmalar sonucunda ise bu miRNA'ların hücresel homeostazın sağlanması için p53 sinyal yolağında yer aldığı gösterilmiştir (Guelfi vd., 2022).

Yapılan çalışmalar daha çok kan ve beyin bölgeleri üzerine yoğunlaşmış olsa da tükürük miRNA'larının invaziv olmayan yöntemlerle ve kolay elde edilebilir olması nedeniyle strese bağlı durumların değerlendirilmesi için uygun bir kaynak sağlayabileceğini göstermektedir (Wiegand vd., 2017). Wiegand vd. (2018) insanlarda akut stres sonrası tükürükte 11 adet miRNA'nın ifadesini incelemiş ve miR-20b, -21 ve 26b için anlamlı sonuçlar elde etmiştir. Ayrıca miR-16, miR-134'ün ifade farklılıklarını anlamlıya yakın olduğu belirtilmiştir (Wiegand vd., 2018). Yoshida vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada ise subkronik ve hafif sosyal yenilgi stresine maruz bırakılan farelerde tükürük miRNA ifade profili yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Hafif sosyal yenilgi stresi hayvanlarda depresyon modellemesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Nestler ve Hyman, 2010). Bu çalışmada strese maruz kalan farelerin tükürüğünde yedi miRNA'nın yukarı regüle edildiği, bir miRNA'nın ise aşağı regüle edildiği belirlenmiştir (Yoshida vd., 2022). Bu miRNA'lardan biri olan ve akut miyokard enfarktüsü için biyobelirteç olarak önerilen miR-208b-3p'nin (Liu vd., 2017) bu farelerde yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir (Yoshida vd., 2022). Koyunlarda gerçekleştirilen bir çalışmada sürüye koç katılmadan önce ve sonra tükürük örnekleri toplanarak kortizol analizi gerçekleştirilmiştir (Manenti vd., 2023). Kortizol analizlerine göre kümeleme analizi gerçekleştirilmiş ve koyunlar iki farklı gruba ayrılmıştır. Adaptasyon yanıtıyla ilişkili olan 16 adet miRNA seçilerek RT-qPCR analizi

gerçekleştirilmiştir. Bu miRNA'lerden miR-16b, miR-21, miR-24, miR-26a, miR-27a, miR-99a ve miR-223 tükürükte tespit edilmiştir. İki küme arasında miR-16b ve miR-21'in ifadelerinde anlamlı şekilde farklılık bulunmuş ve bu miRNA'ların stres yanıtındaki rollerine dikkat çekilmiştir (Manenti vd., 2023). Tükürük miRNA'sı doku ve kan ile karşılaştırıldığında stresin değerlendirilmesi ve izlenmesi açısından daha uygun ve invaziv olmayan bir yöntem olduğu için daha avantajlı görünmektedir. Özellikle kronik stres ilişkili literatür incelendiğinde miR-16, -21, -26 ve -144'ün öne çıkması nedeniyle tez çalışmasında aday miRNA olarak tercih edilmişlerdir. Seçim kriterleri detaylı olarak Gereç ve Yöntem bölümünde "2.3.3. Aday miRNA Seçimi" başlığı altında açıklanmıştır.

Sunulan tez çalışmasında literatürde kronik stresli olarak kabul edilen iş köpeklerinden eğitim öncesi (n=27) ve eğitim sonrasında (n=27) alınan tükürük örneklerinden miR-16, -21, -26 ve -144'ün gruplar arasındaki ifade farklılığının araştırılması ve biyobelirteç potansiyellerinin tartışılması amaçlanmıştır. Bu amaçlara yönelik olarak;

- Köpeklerin sağlık muayenelerinin gerçekleştirilmesi,
- Köpek ve köpek kullanıcıları ve eğitmenleri ile gerçekleştirilen davranış konsültasyonları ve C-BARQ değerlendirmelerinin yapılması,
- Kronik stres ve kontrol gruplarından toplanacak tükürük kortizol değerlerinin belirlenmesi,
- Kronik stres ve kontrol gruplarından toplanacak tükürük örneklerinde SYBR Green temelli RT-qPCR gerçekleştirilerek miR-16, -21, -26 ve -144 ifadelerinin belirlenmesi ve iki grup arasında karşılaştırılması,
- İfadesinde farklılık bulunan miRNA'ların, kortizol değerleri ile korelasyonun araştırılması,
- İfadesinde farklılık bulunan miRNA'ların hedef gen ve yolak analizlerinin yapılması hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında aşağıdaki hipotezler test edilmiştir:

1. Kontrol ve stres grupları arasında miR-16, miR-21, miR-26 ve miR-144 ifade düzeylerinde anlamlı bir fark yoktur.
2. Kontrol ve stres grupları arasında miR-16, miR-21, miR-26 ve miR-144 ifade düzeylerine cinsiyetin etkisi yoktur.
3. Kontrol ve stres grupları arasında kortizol değerleri arasında fark yoktur.

4. Kontrol ve stres grupları arasında miR-16, miR-21, miR-26 ve miR-144 ifade düzeyleri ile kortizol değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.
5. Kontrol ve stres grupları arasında C-BARQ davranış değerlendirme değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Sunulan tez kronik stresli köpeklerde tükürükten miRNA ifadesinin araştırılacağı ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Köpeklerde serum ve tükürük kortizol seviyelerinin korelasyonuna ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (Barker vd., 2005; Chmelíková vd., 2020), ancak miRNA ifade profilleri ile karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Kronik stresli olduğu belirlenen köpeklerde tükürük kortizol düzeyleri ile miRNA profilleri arasındaki korelasyon ilk defa karşılaştırılacaktır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Materyalinin Oluşturulması

2.1.1. Örneklem Grubu

Tez çalışmasının örneklemini Nevşehir Jandarma At ve Köpek Eğitim Merkezi Komutanlığı (JAKEM) bünyesinde bulunan ve çeşitli dallarda uzmanlaşmak üzere eğitime tabi tutulan köpeklerden oluşmaktadır (Ek1. JAKEM Destek Mektubu) Örneklemin oluşturulmasına yönelik etik kurul onayı Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Ek2. 24.05.2023 tarih ve 2023-10-97 karar numaralı AÜ-HADYEK Onayı). Örnekler alınmadan önce yetkili kişilere, köpeklerin eğitmen ve kullanıcılarına çalışma ve yapılacak işlemler hakkında bilgilendirme yapılmış; çalışmada materyal kullanımı için onayları kayıt altına alınarak saklanmıştır.

Tez çalışmasının örneklem büyüklüğü G-Power programı kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre %95 güvenirlik, %80 güç ile miRNA ifade oranlarının karşılaştırılacağı 2 gruptan oluşan örneklemde $d=0,8$ etki büyüklüğü kabul edilerek her bir grup başına 26 köpek olmak üzere toplam 52 köpek olarak hesaplanmıştır. Tez çalışmasının örneklemini oluşturmak üzere iki farklı dönemde toplamda 47 köpekten tükürük örnekleri toplanmıştır, ancak köpeklerin kullanıcısı ile göreve çıkması ya da tükürük örneği alımı öncesinde anamnezde yakın zamanda sağlık problemi yaşaması, ilaç kullanımı olduğunun belirtilmesi gibi nedenlerden dolayı bazı köpeklerin eğitim sonrası tükürükleri elde edilememiştir. Toplam 34 adet köpeğin hem eğitim öncesi hem de eğitim sonrası tükürükleri elde edilerek kontrol ve kronik stresli grup oluşturulmuş ve analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda uygun olmayan veriler çalışma kapsamından çıkarılmıştır. Sonuç olarak, analizlerde kullanılan köpek sayısı, grup başına 27 olmak üzere toplam 54 olarak belirlenmiştir.

Örneklem, bomba arama, mayın arama, uyuşturucu madde arama, çay ve tütün tespit, asayiş, operasyon ve iz takip branşlarında, branşlarına göre değişen 14-20 hafta eğitim alan köpeklerden oluşmaktadır. Örneklemde yer alan köpeklerin ırk, yaş, cinsiyet ve branş bilgileri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Her bir köpekten eğitim öncesi ve eğitim sonrası olmak üzere iki ayrı dönemde tükürük örnekleri toplanmıştır. Eğitim öncesi dönemde alınan örnekler kontrol grubunu oluşturmuş ve aynı köpeklerden minimum 14 haftalık branş eğitimi sonrası alınan örneklerle ise kronik stresli grup (deney grubu) oluşturulmuştur.

Çizelge 2.1. Örnekleme yer alan köpeklerin bilgileri

Köpek	ırkı	Cinsiyet	Yaş	Branş
1	Belçika Malinois	Dişi	14 ay	Çay tütün
2	Belçika Malinois	Erkek	12 ay	Bomba Arama
3	Alman Çoban	Dişi	14 ay	Çay tütün
4	Belçika Malinois	Dişi	13 ay	Çay tütün
5	Belçika Malinois	Erkek	14 ay	Operasyon
6	Belçika Malinois	Erkek	14 ay	Uyuşturucu
7	Belçika Malinois	Dişi	11 ay	Mayın
8	Belçika Malinois	Dişi	10 ay	Mayın
9	Alman Çoban	Erkek	12 ay	Mayın
10	Belçika Malinois	Dişi	10 ay	Mayın
11	Belçika Malinois	Dişi	12 ay	Mayın
12	Belçika Malinois	Erkek	14 ay	Uyuşturucu
13	Belçika Malinois	Dişi	11 ay	Uyuşturucu
14	Belçika Malinois	Erkek	15 ay	Çay tütün
15	Labrador	Erkek	12 ay	İz takip
16	Belçika Malinois	Dişi	11 ay	Mayın
17	Labrador	Dişi	12 ay	İz takip
18	Belçika Malinois	Erkek	12 ay	Uyuşturucu
19	Belçika Malinois	Erkek	18 ay	Operasyon
20	Alman Çoban	Erkek	12 ay	Asayiş
21	Belçika Malinois	Erkek	12 ay	Bomba Arama
22	Belçika Malinois	Erkek	12 ay	Uyuşturucu
23	Belçika Malinois	Dişi	10 ay	Mayın
24	Belçika Malinois	Dişi	12 ay	Bomba Arama
25	Labrador	Dişi	12 ay	İz takip
26	Labrador	Dişi	11 ay	Mayın
27	Alman Çoban	Erkek	11 ay	Çay tütün

2.1.2. Muayene

Her bir köpeğin eğitim öncesi ve sonrası olmak üzere baştan kuyruğa muayeneleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan köpeklerin tamamı iş köpeği niteliğinde olup, rutin aralıklarla kapsamlı sağlık kontrollerinden geçirilmektedir. Bu kontroller kapsamında veteriner hekim muayeneleri, tam kan biyokimya analizleri ve diğer tetkikler düzenli olarak yapılmaktadır. Geçmiş bilgileri alınan köpeklerin inspeksiyon bulguları not edilerek fiziksel muayeneleri yapılmıştır. Fiziksel muayenenin yapılmasının ardından köpeklerin temel parametreleri (nabız, solunum sayısı, vücut ısısı, vücut kondisyon skoru) değerlendirilmiş ve araştırmacı bilgi formuna not edilmiştir. Bunlarla beraber her bir köpeğin akciğer ve kalp oskültasyonları yapılmış, oral muayeneleri gerçekleştirilerek stomatit, gingivit gibi durumlar açısından değerlendirilmiştir. Köpeklerde herhangi bir anormalliğin saptanması durumunda ilgili köpek çalışma örneğine dahil edilmemiştir. Ayrıca anamnez bilgisinde antipsikotik ajan, antibiyotik, steroid türevleri, anti-inflamatuar, çeşitli takviye ürünler kullanıldığı belirlenen köpekler de çalışmaya dahil edilmemiş, eğitim sonrası örneklemede ilaç kullandığı bildirilen köpekler ise çalışmadan çıkarılmıştır.

2.1.3. C-BARQ Analizi ve Davranış Değerlendirmesi

Köpek Davranış Değerlendirmesi ve Araştırma Anketi C-BARQ rutin olarak kullanılan standardize edilmiş mizaç ve davranış değerlendirme araçlarından biridir (Hsu ve Serpell, 2003). Bu anket kapsamında köpekler eğitilebilirlik, saldırganlık, korku-anksiyete, ayrılma ile ilişkili davranış, heyecanlanma-uyarılma, aşırı bağlılık ve dikkat çekme ve diğer davranışlar olmak üzere 7 farklı bölümde 101 soruda değerlendirilmiştir (Ek3. C-BARQ). Ankette sorular 0=hiçbir zaman, 1=nadiren 2=bazen, 3=genellikle ve 4=her zaman ve gözlemlenmedi/uygulanmaz olarak cevaplanmaktadır (Hsu ve Serpell, 2003). Bu anket sonucunda; köpekler on dört davranışsal faktör kapsamında puanlanarak değerlendirilmektedir:

1. Yabancıya yönelik saldırganlık
2. Sahibine yönelik saldırganlık
3. Köpeğe yönelik saldırganlık
4. Köpek rekabeti
5. Yabancıya yönelik korku
6. Sosyal olmayan korku

7. Köpeğe yönelik korku
8. Ayrılıkla ilgili davranışlar
9. Bağlanma ve dikkat çekme
10. Eğitilebilirlik
11. Kovalama
12. Heyecanlanma/uyarılma
13. Dokunma hassasiyeti
14. Enerji Seviyesi

C-BARQ formları köpek eğitmenleri tarafından eğitim öncesi ve eğitim sonrası olmak üzere 2 defa doldurulmuştur. Ayrıca köpek eğitmenleri ile köpeklerin kendi ortamlarında davranış konsültasyonları gerçekleştirilmiştir. Köpeğin kronik stres grubuna alınması için duygusal durumunun görüşme boyunca negatifte kalması, temel ihtiyaçlarda belirlenen eksikliklerin olması ve C-BARQ ile değerlendirmede eğitilebilirlik kategorisi dışındaki herhangi bir bölümde 3 ve üzeri skor ortalaması (Kaur vd., 2022) kriterlerinin herhangi birisinin sağlanması yeterli olmaktadır. Eğitim sonrası iş köpekleri, aldıkları uzun süreli ve düzenli eğitim periyodu sonrası literatür bilgileri göz önünde bulundurularak kronik stres grubuna dahil edilmişlerdir (Haverbeke vd., 2008). Bu anket, köpeklerin mizaç ve davranışlarının detaylı bir şekilde değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. C-BARQ sonuçları, köpeklerin davranış profillerini analiz ederek, kronik stres belirtilerini desteklemekten ziyade, eğitim öncesi ve sonrası dönemlerde köpeklerin mizaçlarını ve davranışsal özelliklerini daha iyi anlamak amacıyla kullanılmıştır.

2.1.4. Tükürük Örneklerinin Toplanması

Tükürük örneklerinin toplanması, bazal kortizol seviyelerini yansıtabilecek şekilde saat 10.00- 12.00 arasında ve stres oluşturmamak amacıyla kendi ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Tükürük örneklerinin kontaminasyonunu engellemek amacıyla, köpeklerin tükürük örneklerinin alınmasından iki saat öncesine kadar mama yememeleri, bir saat öncesine kadar da su içmemeleri hakkında köpek eğitmenleri ve kullanıcıları bilgilendirilmiştir.

Tükürük örneklerinin toplanması için Salivette® ticari özel numune tüpleri kullanılmıştır. Bu tüplerin içerisindeki pamuk tampon hemostatik pens yardımı ile köpeğin diş eti ve yanak arasında kalan bölgede 5 dakika boyunca tutularak tükürüğün pamuk tampona emdirilmesi sağlanmıştır (Şekil 2.1). Örnek alımında herhangi bir aksaklık olması durumunda

ek süre tanınmaksızın tüm işlem belirlenen toplam 5 dakikalık süre içerisinde tamamlanmıştır. Ayrıca, aynı köpekten aynı gün içerisinde ardışık örnekleme yapılmamış; her bir örnekleme işlemi bağımsız ve tek seferlik olarak gerçekleştirilmiştir. Tükürük örnekleri alındıktan sonra laboratuvara ulaştırılana kadar kırık buz dolu kutu içinde tutulmuştur. Alınan örnekler laboratuvar ortamına getirilerek 6000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Böylelikle pamuk tampona emdirilen tükürüklerin dış tüpe toplanması sağlanmıştır. Elde edilen tükürüklerin miktarları en az 500µl olacak şekilde 1.5 ml tüplere aktarılmıştır. Eksik kalan örnekler için başka bir gün aynı koşullar altında örnekleme tekrarlanmıştır. Bütün örnekler bir sonraki analize kadar -80°C’de saklanmıştır.



Şekil 2.1. Köpeklerden tükürük örneklerinin alınması

2.2. Kortizol Analizi

Kortizol düzeylerinin belirlenmesi amacıyla sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS) tekniği kullanılmıştır. LC-MS/MS ultra performanslı sıvı kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) cihazı sayesinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan örnek moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Kütle spektrometreleri molekülleri iyonizasyon işlemi ile yüklü iyonize moleküller haline dönüştürmektedir. Birinci kuadrupol filtre molekülleri m/z (kütle/yük) oranına göre ayırmaktadır. Bu ayırmanın ardından yüksek

saflıkta azot (collision gaz) kullanılarak moleküller parçalanmaktadır. İkinci kuadrupol filtrede ise parçalanma sonucu oluşan iyonları analiz ederek teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır. Bu analiz Thermo Scientific™ Quantum Access Max cihazı kullanılarak hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

Tükürük örnekleri +4°C’de 5000g’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Analizde santrifüj sonucu elde edilen üst faz kullanılmıştır. Örnek hazırlama aşamasında, 100 µL tükürük örneği bir ependorf tüpe alınarak üzerine 200 µl çöktürme reaktifi eklenmiştir. Çöktürme reaktifinin hazırlanmasında, metanol içerisinde 10 ppb düzeyinde hazırlanmış cortisol-d4 izotopu ile çinko sülfat (ZnSO₄, 0,3 M) 4:1 oranında karıştırılmıştır. Tüp, yaklaşık 30 saniye vorteksenerek 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz dikkatlice alınarak LC-MS/MS analizine hazırlanmıştır. Analizde, Mobil Faz A olarak su, Mobil Faz B olarak ise metanol kullanılmıştır. Cihazdaki akış hızı (flow rate) 0,3 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Kromatografik değerlendirmeler Xcalibur yazılımı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

2.3. RT-qPCR Analizi

2.3.1. Total RNA İzolasyonu

RNase AWAY™ (ThermoFisher Scientific) ile uygulamanın gerçekleştirileceği laboratuvar ortamı ve laboratuvar ekipmanının temizliği sağlanmıştır. RNA-stabilizasyonu sağlanması amacıyla -80°C’de saklanan tükürük örnekleri buz üzerinde yavaşça çözündürülmüştür. Daha sonra +4°C’de 5000g’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst fazdan 200µl RNA izolasyonu için ayrılmış, kalan tükürük örnekleri ise B planı dahilinde yedek olarak -80°C’de saklanmıştır.

Total RNA izolasyonu silika kolon bazlı bir ticari bir kit olan miRNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak üreticinin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA’lar NanoDrop ND2000 spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific) ile farklı dalga boylarında ölçülerek saflık ve kalite açısından değerlendirilmiştir.

2.3.2. cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonu sonrası örneklerden hızlıca cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ticari bir ters transkripsiyon kiti olan miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) kullanılmış ve üreticinin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için kullanılan reaktifler ve miktarları Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. cDNA sentezi kullanılan reaktifler

Reaktif	Miktar (µl)
5x miRCURY RT Reaksiyon Tamponu	2
RNazsız Su	5
10x miRCURY RT Enzim	1
RNA (5ng/µl)	2
Toplam	10

Bütün reaksiyonlar RNA degradasyon riskini en aza indirmek için buz üzerinde çalışılmıştır. Her bir total RNA izolatının konsantrasyonu 5ng/µl olacak şekilde RNaz içermeyen su kullanılarak dilüe edilmiştir. Reaksiyonda ters transkripsiyon protokolü ise Çizelge 2.3’te verilmiştir. Ters transkripsiyon işlemi gerçekleştirilen örnekler bir sonraki analize kadar -20°C’de saklanmıştır.

Çizelge 2.3. Ters transkripsiyon protokolü

Aşama	Süre	Sıcaklık
Ters transkripsiyon	60 dakika	42°C
Enzim İnaktivasyonu	5 dakika	95°C
Soğutma	-	4°C

2.3.3. Aday miRNA Seçimi

Literatür bilgileri göz önüne alındığında aday miRNA’lar miR-16, -21, -26 ve -144 olarak seçilmiştir. Kronik stres sonucunda insanlarda kanda miR-16 ve miR-144 ifadelerinde anlamlı bir değişiklik bulunması (Katsuura vd., 2012) bununla beraber tükürükte ifade ediliyor olmaları ve akut stres için anlamlı bir farklılık bulunmaması (Wiegand vd., 2018) dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmada miR-16’nın kortizol yanıtından daha fazla anksiyete ile ilişkili

olabileceğini ve biyobelirteç potansiyeline sahip olduğunu belirtilmiştir (Honda vd., 2013). Köpeklerde kronik stres sonucu adrenal korteks ve hipofiz bezinde miR-144'ün ifadesinde anlamlı bir değişim olduğu bildirilmiştir (Luo vd., 2016). miR-144'ün eritrositlerde oksidatif stres toleransının düzenlenmesinde yer aldığı bildirilmiştir (Sangokoya vd., 2010). Bununla beraber miR-16 ve miR-144'ün doğal stresörlere maruz kaldıktan sonra inflamasyona karşı sitokin cevabının negatif düzenleyicilerinden biri olabileceği belirtilmiştir (Katsuura vd., 2012). Diğer iki miRNA gibi miR-21 ve miR-26 'nın da insanlarda kronik stres sonucunda ifadesinde anlamlı bir değişiklik bulunması (Gidron vd., 2010; Honda vd., 2013) ve bununla beraber tükürükte ifade ediliyor olmaları (Wiegand vd., 2018) dikkat çekmektedir. İnsanlarda yapılan çalışma sonucu miR-21'in psikolojik stres için tam kanda bir biyobelirteç olarak faydalı olabileceği de belirtilmiştir (Gidron vd., 2010). miR-26'nın nörojenезle ilişkili olduğu (Dill vd., 2012) ve psikiyatrik bozukluklarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Hunsberger vd., 2009). miRNA'ların kantitatif değerlendirilmesinde referans gen olarak "snU6" geni (Wiegand vd., 2018) seçilmiştir. miRBase veri tabanından elde edilen aday miRNA sekansları Çizelge 2.4'de sunulmuştur. Ticari optimize primerlerde miR-16-5p, miR-21-5p ve miR-26a-5p için insana özgü olan primerler kullanılmış ve bu primerler köpeklerde (*Canis familiaris*, cfa) aynı miRNA'ların olgun miRNA'larını hedeflemektedir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.4. Kullanılan primer sekansları

Erişim Numarası	miRNA	Sekans
MIMAT0000069	miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG
MIMAT0000076	miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
MIMAT0000082	miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
MIMAT0006734	miR-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACUAG

Çizelge 2.5. Kullanılan miRNA'ların köpek sekansları

Erişim Numarası	miRNA	Sekans
MIMAT0006648	cfa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG
MIMAT0006741	cfa-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
MIMAT0006595	cfa-miR-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU

2.3.4. RT-qPCR Analizi

Seçilen miRNA ifadelerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla SYBR Green aracılı gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi miRCURY LNA SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Germany) ticari kiti kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. miRNA'ların amplifikasyonu amacıyla optimize primerleri içeren ticari kit miRCURY LNA miRNA Custom PCR Assay (Qiagen) kullanılmıştır. Bu primerler kilitli nükleik asit (LNA) teknolojisiyle üretilmiş primerlerdir. Liyofilize gelen primerler üreticinin talimatlarına göre sulandırılarak alikotlanmıştır. Alikotlanan primerler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Analizde kullanılacak olan cDNA'lar 1/60 oranında sulandırılmıştır. Her bir primer için Çizelge 2.6'de verilen toplam 10µl reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Her bir platete toplam 3 köpeğin eğitim öncesi ve sonrası örnekleri yer almaktadır. Hazırlanan plateler 3000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve Biorad CFX Connect cihazında çalışılmıştır.

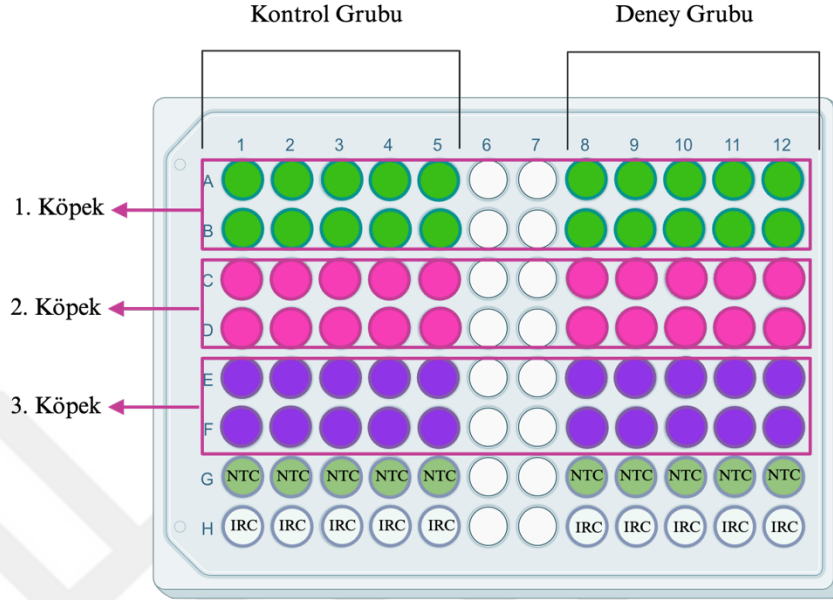
Çizelge 2.6. RT-qPCR reaktifleri

Reaktif	Miktar (µl)
2x SYBR Green Master Mix	5
PCR Primer Mix	1
cDNA	3
Rnazsız Su	1
Toplam	10

Uygulanan protokol, başlangıçta 95°C 2 dakika, 95°C 10 saniye denatürasyon, ardından 56°C'de 60 saniye hibridizasyon ve uzama aşamalarından oluşmaktadır. Son aşamada ise 60°C ile 95°C arasında bir sıcaklık aralığında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analiziyle elde edilen ürünlerin özgüllüğü değerlendirilmiş ve hedef bölge kontrolü gerçekleştirilmiştir.

Analizlerin güvenilirliğini ve etkinliğini değerlendirmek amacıyla şablonsuz negatif kontrol (NTC) reaksiyonları ile ters transkriptaz enzimi içermeyen negatif kontrol (NRT) reaksiyonları eklenmiştir. Tüm örnekler iki tekrarlı çalışılmıştır. Ayrıca çalışılan reaksiyonlar arası varyasyonu önlemek amacıyla, her plate üzerinde teknik tekrarlarıyla birlikte kullanılan tek bir örnek spesifik bir kalibratör olarak kullanılmıştır (Ruiz-Villalba vd., 2021). Reaksiyonlar arası kalibratör (IRC), her bir plakaya iki tekrar halinde yüklenmiştir. Örnek

plate tasarımı Şekil 2.2’de gösterilmektedir. Çalışılan miRNA’ların kantitatif değerlendirmesinde normalizasyon için “snU6” geni (Wiegand vd., 2018) kullanılmıştır.



Şekil 2.2. RT-qPCR 96 kuyucuklu plate tasarımı

Bir plate toplam üç köpeğin eğitim öncesi ve eğitim sonrası biyolojik örneklerini incelemek üzere tasarlanmıştır. A ve B sıraları birinci köpeğin; C ve D sıraları ikinci köpeğin; E ve F sıraları ise üçüncü köpeğin eğitim öncesi ve sonrası gruplarını ve bunların teknik replikalarını temsil etmektedir. Birinci sütundan beşinci sütuna kadar ve sekizinci sütundan 12. sütuna kadar sırasıyla miR-16, miR21, miR-26, miR-144 ve snu6 test edilmiştir. G sırasındaki kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanılmıştır. H sırası ise inter-run calibrator ve teknik replikasını içermektedir.

RT-qPCR reaksiyonunun kantitatif analizi için kantitatif döngü (Cq) değeri kullanılmıştır (Bustin vd., 2009). Bu doğrultuda, her örnek 2 tekrarlı olarak çalışılmış ve bu iki tekrarın Cq değerlerinin ortalaması kullanılmıştır. RT-qPCR sonucu göreceli ifade farklılıkları her bir örnek ve referans gen için elde edilen ortalama Cq değerleri kullanılarak $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ formülü (Livak ve Schmittgen, 2001) ile analiz edilmiştir. İlk olarak her bir örneğin Cq değerinden referans genin Cq değeri çıkarılarak ΔCq değeri hesaplanmıştır. Ardından kontrol grubunun ΔCq değerinin ortalaması alınarak $\Delta\Delta Cq$ değeri hesaplanmıştır. Bu amaçla her bir örneğin ΔCq değerinden kontrol grubunun ortalama ΔCq değeri çıkarılmıştır. Böylelikle normalize edilmiş gen ifade düzeyleri elde edilmiştir. Bu işlemler her bir aday miRNA için gerçekleştirilmiştir ve her bir örneğin $\Delta\Delta Cq$ değerleri elde edilmiştir. Son olarak her bir miRNA’nın ifade edilme düzeylerinin belirlenmesi amacıyla $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ formülüne göre

miRNA ifade seviyelerindeki kat değişimi hesaplanmıştır. Kullanılan formüller şekil 2.3’de verilmiştir.

IRC’lerin değerlendirilmesinde her bir plateden elde edilen miRNA16, miRNA21, miRNA26 ve snu6 için Cq değerleri plateler arasında karşılaştırılmıştır. Elde edilen Cq değerlerinin ortalamaları ve standart hataları hesaplanarak değerlendirilmiştir.

$$\begin{aligned}\Delta Cq &= Cq(\text{Örnek}) - Cq(\text{Housekeeping}) \\ \Delta\Delta Cq &= \Delta Cq(\text{Örnek}) - \Delta Cq(\text{Kontrol}) \\ \text{Kat Değişimi RQ}(\text{Örnek}) &= 2^{\Delta\Delta Cq}\end{aligned}$$

şekil 2.3. Delta-delta CT Formülü

2.4. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics Version 30.0 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Her bir deney grubu için normalize edilmiş ifade verilerinin normal dağılıma uygunluğunu belirlemek amacıyla Shapiro-Wilk normallik testi uygulanmıştır. p değerinin 0,05’ten yüksek olması, verilerin normal dağılım gösterdiğini ifade etmektedir. Kontrol ve stres grubu arasında aday miRNA ifade farklılıklarının belirlenmesi amacıyla istatistiksel analizi için bağımlı t-testi uygulanmıştır. İfade farklılıkları için $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Bütün istatistiksel analizlerde ΔCq değeri kullanılmıştır. Ayrıca cinsiyetin miRNA ifadesi üzerine etkileri de iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ile araştırılmıştır. Kortizol analizi ve miRNA ifadeleri arasındaki korelasyon ise Spearman korelasyon analiziyle araştırılmıştır. Tez kapsamında, kontrol ve stres gruplarına ilişkin aşağıdaki null hipotezler (H_0) tanımlanmış ve istatistiksel testlerle değerlendirilmiştir:

6. Kontrol ve stres grupları arasında miR-16, miR-21 ve miR-26 ifade düzeylerinde anlamlı bir fark yoktur.
7. Kontrol ve stres grupları arasında miR-16, miR-21 ve miR-26 ifade düzeylerine cinsiyetin etkisi yoktur.
8. Kontrol ve stres grupları arasında kortizol değerleri arasında fark yoktur.

9. Kontrol ve stres grupları arasında miR-16, miR-21 ve miR-26 ifade düzeyleri ile kortizol değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.
10. Kontrol ve stres grupları arasında C-BARQ davranış değerlendirme değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_q}$ sonuçları arasında aşırı uç değerlerin etkisini minimize etmek ve verilerin dağılımını daha iyi anlamak amacıyla IQR (Interquartile Range) yöntemi kullanılarak filtrelenmiştir. Bu amaçla, veri setinde yer alan tüm değerler küçükten büyüğe doğru sıralanmıştır. Verilerin %25'lik kısmını ayıran medyan değeri Birinci Çeyrek (Q1) olarak verilerin %75'lik kısmını ayıran medyan değeri ise Üçüncü Çeyrek (Q3) olarak hesaplanmıştır. Q3 ile Q1 arasındaki fark, IQR (Interquartile Range) olarak tanımlanmış ve $IQR = Q3 - Q1$ formülü ile hesaplanmıştır. Aşırı uç değerlerin tespitinde ise, alt sınır $Q1 - 1,5 \times IQR$ formülü ile; üst sınır $Q3 + 1,5 \times IQR$ formülü ile hesaplanmış ve bu sınırların dışında kalan tüm veri noktaları, potansiyel aşırı uç değerler olarak değerlendirilmiştir. Belirlenen alt ve üst sınırların dışında kalan değerler veri setinden çıkarılmış ve gen ifadesi analizlerinde dağılımı bozan değerlerin etkisi ortadan kaldırılmıştır. Bu yöntemle yapılan analizler, gen ekspresyon verilerinin daha homojen bir dağılım göstermesini sağlamıştır. Filtreleme işlemi, özellikle küçük örneklem gruplarında daha doğru sonuçlar elde etmek adına önemli bir adımdır. Elde edilen temizlenmiş $2^{-\Delta\Delta C_q}$ sonuçlarını içeren veri seti, gruplar arası gen ifadesi farklılığın incelenmesi için Wilcoxon işaretli sıra testinde analize tabi tutulmuş, $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

2.5. Biyoinformatik Analizler

2.5.1. İfadesinde Farklılık Bulunan miRNA'ların Hedef Gen Tahmini

cfa-miR-16, cfa-miR-21 ve cfa-miR26'nın hedeflediği genlerin belirlenmesinde miRDB, TargetScan ve miRwalk veri tabanları kullanılmıştır. Her bir miRNA için veri tabanlarından elde edilen hedef genler kullanılarak tüm veri tabanlarında ortak olan genler çıkarılmıştır. Elde edilen verilerin Venn diagramları Venny 2.1.0 çevrimiçi aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.5.2. Gen Ontoloji ve Gen Seti Zenginleştirme Analizi

Her bir miRNA için kullanılan veri tabanlarında ortak bulunan hedef genlerinin Gen Ontoloji (GO) analizleri DAVID 2021 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>) çevrim içi veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler biyolojik fonksiyon, hücresel komponent ve moleküler fonksiyon alt başlıklarında yapılmıştır.

Bütün ortak genler için WebGestalt (WEB-Based Gene Set Analysis Toolkit) (<https://2024.webgestalt.org/>) çevrim içi aracı kullanılarak, Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) veri tabanı üzerinden yapılmıştır.



3. BULGULAR

3.1. Muayene

Kalp atım sayısı, solunum sayısı ve vücut sıcaklığı olmak üzere üç fizyolojik parametrede ölçüm yapılmıştır. Ancak stres grubundaki 27 köpekten dördünde kalp atım ölçümü gerçekleştirilemediğinden, bu parametre için $n=23$ olarak değerlendirilmiştir. Bu durum, söz konusu köpeklerde ölçüm esnasında uygun veri alınmasını engelleyen uygulama güçlükleri sebebiyle meydana gelmiştir. Değerlendirmeler ek bir stres oluşturmaması amacıyla tekrarlanmamıştır. Köpeklerin kalp atım sayısı, solunum sayısı ve vücut sıcaklıklarının grup ortalamaları standart sapmaları (SD) ve standart hataları (SH) Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Köpeklerin fizyolojik verileri

Fizyolojik Veriler	n	Kontrol Grubu			n	Stres Grubu		
		Ortalama	SD	SH		Ortalama	SD	SH
Kalp Atım Sayısı	27	132,50	33,416	6,821	23	107,67	21,874	4,465
Solunum Sayısı	27	65,814	42,752	8,227	27	113,19	52,346	10,07
Vücut Sıcaklığı	27	37,8	0,573	0,011	27	38,25	0,510	0,098

SD: Standart deviasyon, SH: Standart hatayı temsil etmektedir.

Fizyolojik verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında vücut sıcaklığı ve solunum sayısı için Wilcoxon işaretli sıra testi, kalp atım sayısı için ise bağımlı t-testi gerçekleştirilmiştir. Eğitim öncesi ve eğitim sonrası kalp atım sayılarının ortalamaları sırasıyla $132,50 \pm 33,42$ ve $107,67 \pm 21,87$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, eğitim öncesi ve sonrası kalp atım sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,001$). Ayrıca, eğitim öncesi ve eğitim sonrası kalp atım sayıları arasındaki ilişki orta düzeyde pozitif bir korelasyon göstermiştir ($r = 0,416$, $p = 0,043$).

Vücut sıcaklıkları incelendiğinde altı köpekte, eğitim sonrası vücut sıcaklığı eğitim öncesinden daha düşük çıkmıştır. 19 köpekte, eğitim sonrası vücut sıcaklığı eğitim öncesinden daha yüksek çıkmıştır. İki köpekte ise eğitim öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları eşittir. Wilcoxon İşaretli Sıra Testi sonuçları, eğitim öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir ($Z = -2,791$, $p = 0,005$). Eğitim sonrası vücut sıcaklıklarının eğitim öncesine kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Solunum sayıları incelendiğinde, 20 köpekte solunum sayısı artarken, yedi köpekte azalma görülmüş; hiçbir köpekte eğitim öncesi ve sonrası solunum sayıları eşit bulunmamıştır. Wilcoxon İşaretli Sıra Testi sonuçları, eğitim öncesi ve sonrası solunum sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir ($Z = -2,896$, $p = 0,004$).

3.2. C-BARQ Analizi ve Davranış Değerlendirmesi

Ankette sorular 0=hiçbir zaman, 1=nadiren 2=bazen, 3=genellikle ve 4=her zaman ve gözlemlenmedi/uygulanmaz (Hsu ve Serpell, 2003) olarak köpek kullanıcıları tarafından eğitim öncesi ve eğitim sonrası olmak üzere iki kez cevaplanmıştır. Bu anket kapsamında 54 köpeğe ait eksiksiz anket verisi elde edilmiş; her bir köpek 14 davranışsal faktör kapsamında puanlanarak değerlendirilmiştir. Değerlendirilen davranışsal faktörler için grup ortalamaları standart sapmaları ve standart hataları Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. C-BARQ davranış kategorilerine göre grup ortalamaları

Davranış Kategorisi	Kontrol Grubu			Stres Grubu		
	Ort	SD	SH	Ort	SD	SH
Yabancıya yönelik saldırganlık	1,6	1,09	0,223	1,417	1,238	0,253
Sahibine yönelik saldırganlık	1,28	1,108	0,226	1,293	1,089	0,222
Diğer köpeklere yönelik saldırganlık	1,69	1,323	0,27	1,854	1,26	0,257
Diğer köpeklere yönelik korku	1,46	0,966	0,201	1,455	0,933	0,191
Tanıdık köpeklere saldırganlık	2,28	0,781	0,159	1,469	0,959	0,196
Eğitilebilirlik	1,33	0,994	0,203	2,504	0,768	0,157
Kovalama davranışı	1,25	0,707	0,144	1,729	0,612	0,125
Yabancıya yönelik korku	1,06	0,648	0,132	1,083	0,896	0,183
Sosyal olmayan korku	1,69	0,656	0,134	1,008	0,594	0,121
Ayrılıkla ilgili davranışlar	1,07	0,788	0,161	1,131	0,777	0,159
Dokunma hassasiyeti	1,08	1,188	0,242	1,135	1,061	0,217
Heyecanlanma/uyarılma	1,94	0,812	0,166	1,875	0,971	0,198
Bağlanma ve dikkat çekme	2,08	1,167	0,238	2,379	1,061	0,195
Enerji Seviyesi	2,33	8,851	0,174	2,25	0,989	0,202

Ort: Ortalama, SD: Standart deviasyon, SH: Standart hatayı temsil etmektedir.

C-BARQ sonucu elde edilen veriler kontrol ve stresli grup arasında Wilcoxon işaretli sıra testi ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda kontrol ve stres grubu arasında anlamlı bulunan değişkenler ve bu farkların yönü ortaya konulmuştur. Yabancıya yönelik saldırganlık ve eğitilebilirlik kategorilerinde iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Yabancıya yönelik saldırganlık kategorisinde kontrol grubu değerleri stresli gruba göre anlamlı derecede daha büyüktür ($Z = -2,677$, $p = 0,007$). Eğitilebilirlik kategorisinde de aynı şekilde stres grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek değerler göstermektedir ($Z = -2,053$, $p = 0,040$).

Yukarıdaki bulgular, kontrol ve stres grubu arasında bazı davranış değişkenlerinde anlamlı farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer faktörler açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

3.3. Kortizol Analizi

Eğitim öncesi kortizol düzeyi için ortalama $0,043 \pm 0,050$ $\mu\text{g/dl}$ olarak hesaplanmıştır ve standart hata 0,010'dur. Eğitim sonrası kortizol düzeyi ise ortalama $0,045 \pm 0,040$ $\mu\text{g/dl}$ ve standart hata 0,008 olarak bulunmuştur. Eğitim öncesi ve sonrası kortizol düzeylerindeki değişimi değerlendirmek için Wilcoxon işaretli sıra testi uygulanmıştır. Analiz sonucu eğitim öncesi ve sonrası kortizol düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($Z = -0,400$, $p = 0,689$). Gruplar arası kortizol seviyelerinde ortalama olarak küçük bir artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

3.4. Total RNA İzolasyonu

Köpeklerin hem eğitim öncesi (kontrol grubu) hem de eğitim sonrası (stres grubu) alınan tükürük örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. NanoDrop ND2000 spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific) ölçümleri sonucu elde edilen miktarlar ve 260/280 değerleri Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Nanodrop spektrofotometre ölçüm sonuçları

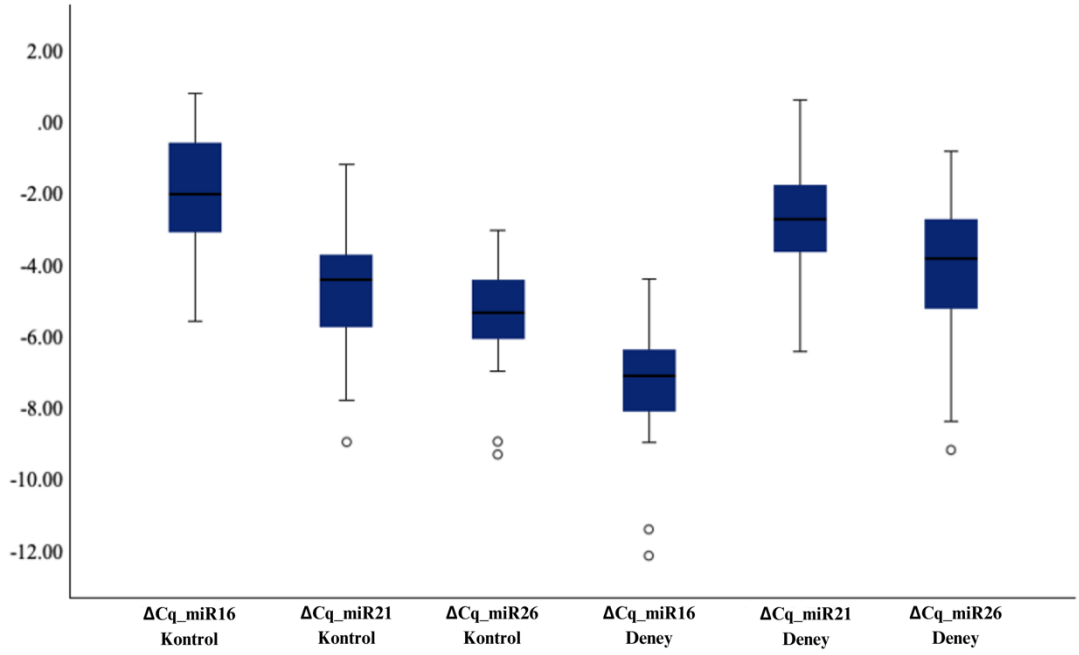
Köpek	Eğitim Öncesi		Eğitim Sonrası	
	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280
1	114,5	1,98	34,3	1,99
2	41,6	2,011	41,9	1,94
3	20,2	1,97	15,9	2,04
4	96,5	1,87	39,8	1,97
5	28,8	1,93	41,1	1,96
6	35,7	1,97	31,5	1,94
7	20,3	2	11,2	1,87
8	62,7	1,96	63,9	1,95
9	36,3	1,67	16,5	1,93
10	42,4	1,97	23,3	1,84
11	34,6	1,86	56,1	2,01
12	18,8	1,97	22	2,03
13	27,9	1,99	66	2,03
14	14,1	1,89	51,4	1,99
15	40	1,97	26,2	2,02
16	72,7	1,94	34,8	1,98
17	34	1,93	67	1,95
18	62,7	2	25,3	1,97
19	53,1	1,88	29,4	1,61
20	20,6	1,92	64,7	1,91
21	62,7	2	34	2,02
22	30,1	2,05	46,7	1,91
23	27,3	1,95	35,4	1,93
24	42,5	1,96	50,2	1,94
25	36,2	1,94	24,6	2,02
26	39,6	1,78	14,7	2,21
27	60,2	1,93	41	2,02

3.5. RT-qPCR Analizi

Her bir plate üzerinde üç köpek örneği çalışılmış olup, toplamda 11 adet plate analiz edilmiştir. Ters transkripsiyon ve PCR reaksiyonlarının verimlilik ve güvenilirlik değerlendirmeleri sırasında, tüm kuyucuklarda yalnızca nükleazsız su içeren NTC'lerde Cq değerleri elde edilememiştir, bu da herhangi bir kontaminasyon olmadığını doğrulamaktadır. Ayrıca, NRT (ters transkriptaz enzimi içermeyen) örneklerinde de Cq değeri elde edilememiştir. Bu sonuçlar, ters transkripsiyon ve PCR reaksiyonlarının güvenilirliğini kanıtlamaktadır. Ek olarak, gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi, plateler arası değişkenlikten kaçınmak için her plate, her miRNA için NTC ve IRC örnekleri teknik replikaları ile çalışılmıştır. Tüm platelerdeki tüm NTC kuyucuklarından Cq değerleri belirlenememiş olup bu durum sonuçların yüksek kalitesini göstermektedir.

RT-qPCR analizleri 33 köpek için gerçekleştirilmiş olup referans gen olarak kullanılan snu6 yükseltgenmesinden sonuç alınamadığından analizler 27 köpek ile devam etmiştir. Analizler sonucunda miR-144 için kontrol grubundan 6 köpekte 32-36 aralığında değişen Cq değerleri elde edilirken stres grubunda ifadenin aşırı düşük olması nedeniyle güvenilir Cq değerleri elde edilememiştir. Bu durum, miR-144 için istatistiksel olarak anlamlı ve tekrar edilebilir verilerin sağlanmasını engellediğinden, söz konusu miRNA ileri analizlerden çıkarılmıştır. Sonuç olarak her bir grupta 27 adet olmak üzere toplam 54 köpeğin miR-16, miR-21 ve miR-26 için Cq değerleri elde edilmiştir. Çalışılan bir plate için amplifikasyon, melting curve (erime eğrisi) ve melting peak görüntüleri Şekil 3.2'de sunulmuştur.

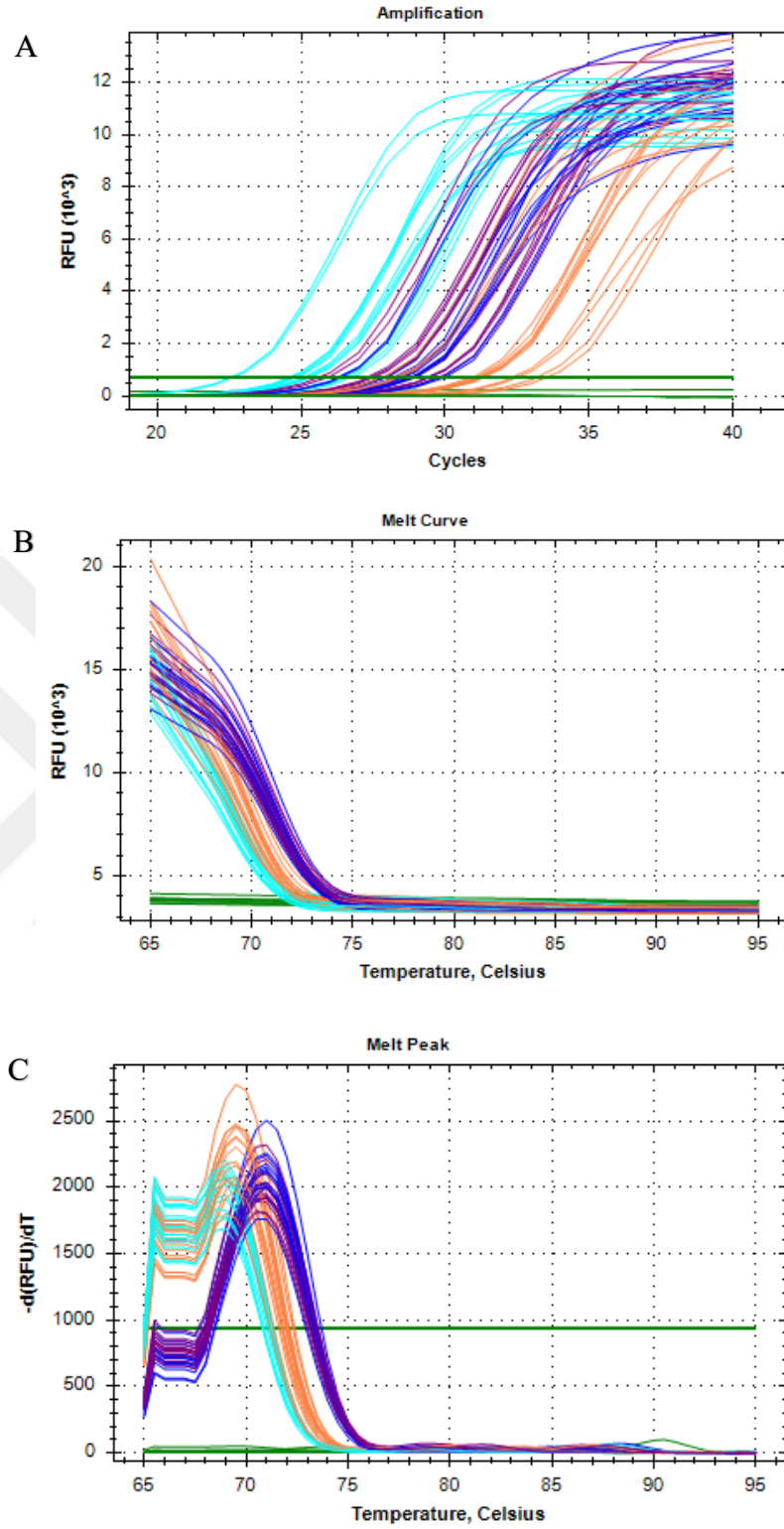
miRNA ifadelerinin belirlenmesi amacıyla örneklerde miR-16, miR-21 ve miR-26 için ortalama Cq değeri, ΔCq , $\Delta\Delta Cq$ ve $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen ΔCq değerleri Şekil 3.1'de boxplot grafiği şeklinde sunulmuştur. Grafik, her bir hedef miRNA için kontrol ve stres gruplarındaki varyasyonları ve medyan değerlerini karşılaştırmalı olarak göstermektedir. Veriler, her grubun dağılımını ve olası uç değerleri yansıtmaktadır. Standart hata çubukları ve uç değerler de grafikte belirtilmiştir.



Şekil 3.1. miR-16, miR-21 ve miR-26 için gruplar arası ΔCq boxplot grafiği

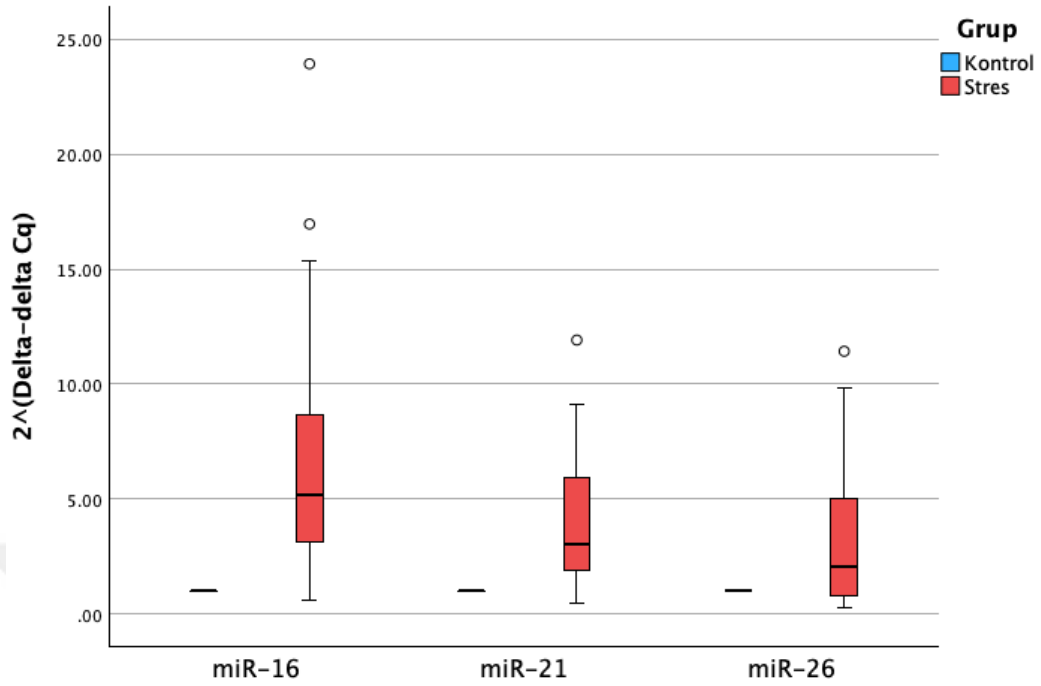
Platelerdeki teknik varyasyonları kontrol etmek ve ifade verilerini normalize etmek amacıyla IRC kullanılmıştır. Her bir plate üzerinde aynı referans örnek iki tekrarlı olacak şekilde çalışılmış ve miRNA16, miRNA21, miRNA26 ve snu6 için Cq değerleri elde edilmiştir. Bu Cq değerlerinin ortalamaları ve standart hataları miRNA16 için $24,166 \pm 0,087$; miRNA21 için $21,071 \pm 0,071$; miRNA26 için $24,848 \pm 0,077$; snu6 için $26,643 \pm 0,109$ olarak hesaplanmıştır. Cq değerleri arasındaki düşük standart hata değerleri tüm platelerde tutarlı bir şekilde çalışıldığını ve teknik varyasyonların minimum düzeyde olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar çalışmanın güvenilirliğini desteklemiş ve farklı platelerdeki sonuçların doğru bir şekilde normalize edildiğini göstermiştir.

Şekil 3.3'te stres koşulları arasında miR-16, miR-21 ve miR-26 için hesaplanan bağıl gen ifade düzeylerini ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) göstermektedir. Analiz sonucunda miR-16, miR-21 ve miR-26'nın kontrol grubuna kıyasla ifade düzeylerinin sırasıyla 7,02 kat ($p < 0,001$), 3,94 kat ($p < 0,001$) ve 3,05 kat ($p < 0,001$) arttığı gözlemlenmiştir. Veriler, her miRNA için ortalama değerler ile görselleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Çalışılan bir plate için amplifikasyon, erime eğrisi ve erime peak görüntüleri

(A) amplifikasyon, (B) melting curve, (C) melting peak grafikleri. Kırmızı renk miR-16'yı, turkuaz miR-21'i, mor renk miR-26'yı, turuncu renk ise snU6'yı temsil etmektedir.



Şekil 3.3. miRNA'ların kontrol ve stres gruplarındaki göreceli ifade seviyelerindeki farklılıklara yönelik boxplot grafiği

Kutunun içinde gösterilen kalın yatay çizgi, verinin medyanını, kutunun dışında uzanan çizgiler (whiskers), veri içinde kabul edilebilir sınırları (IQR), çizgilerin dışında kalan yuvarlaklar ise uç değerleri temsil etmektedir.

3.6. İstatistiksel Analizler

Her bir deney grubu için normalize edilmiş gen ekspresyon verilerinin normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla Shapiro-Wilk normallik testi uygulanmış ve her bir miRNA ve deney grupları için normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. $p > 0,05$ normal dağılım olarak kabul edilmiştir. Her bir miRNA ve deney grupları için elde edilen değerler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Bu çalışmada, kontrol ve stres grupları arasında ΔCq değerleri kullanılarak miR-16, miR-21 ve miR-26 ifade değişimlerini değerlendirmek amacıyla örnekler için bağımlı t-testi uygulanmıştır. Analiz sonuçları, ΔCq_{miR16} , ΔCq_{miR21} ve ΔCq_{miR26} için ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir. Ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla miR-16 için kontrol grubu: $-1,99 (\pm 1,77)$, stres grubu: $-4,50 (\pm 1,83)$; miR-21 için kontrol grubu: $-5,40 (\pm 1,54)$, stres grubu: $-7,28 (\pm 1,78)$; son olarak miR-26 için kontrol grubu: $-2,73 (\pm 1,72)$, stres grubu: $-4,04 (\pm 1,99)$ olarak bulunmuştur. Analiz sonucu tüm miRNA'ların stres grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde ifade edildiği

gösterilmiştir. Gruplar arasındaki korelasyonlar incelendiğinde ise miR-16 ($r=-0,393$, $p=0,043$) ve miR-21 ($r=-0,404$, $p=0,037$) için negatif düzeyde anlamlı olduğunu gösterirken; miR-26 ($r=-0,358$, $p=0,066$) için anlamlı değildir.

Çizelge 3.4. miRNA'lar için Shapiro-Wilk normallik testi

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	p
$\Delta Cq_{miR16_Kontrol}$	0,959	27	0,349
ΔCq_{miR16_Deney}	0,967	27	0,526
$\Delta Cq_{miR21_Kontrol}$	0,940	27	0,124
ΔCq_{miR21_Deney}	0,929	27	0,064
$\Delta Cq_{miR26_Kontrol}$	0,982	27	0,907
ΔCq_{miR26_Deney}	0,949	27	0,201

“Kontrol ve stres grupları arasında miR-16, miR-21 ve miR-26 ifade düzeylerinde anlamlı bir fark yoktur.” hipotezi test edildiğinde; kontrol ve stres grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). miR-16 için $p<0,001$; miR-21 için $p=0,002$ ve miR-26 için $p=0,034$ değerleri bulunmuştur. Bu sonuçlar, kontrol ve stres grupları arasında bu miRNA'ların ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Gruplar arası miRNA ifade farklılıkları

	n	Ortalama	t	Two-Sided p
miR-16 Kontrol- Stres	54	2,51	4,343	<0,001
miR-21 Kontrol- Stres	54	1,87	3,490	0,002
miR-26 Kontrol- Stres	54	1,31	2,231	0,034

Analizin etki büyüklüğünü değerlendirmek için Cohen's d değerleri hesaplanmıştır. Değerlendirme sonucu, Cohen's d değeri 0,836 olan miR-16 için büyük, 0,672 olan miR-21 için orta ve 0,429 olan miR-26 için ise küçük bir etki büyüklüğü söz konusudur.

3.6.1. miRNA ve Kortizol İlişkisi

“Kontrol ve stres grupları arasında miR-16, miR-21 ve miR-26 ifade düzeyleri ile kortizol değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.” hipotezi test edildiğinde ise Spearman korelasyonu sonuçları miR-16 için iki değişken arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını göstermiştir ($\rho = 0,037$, $p = 0,862$). miR-21 ($\rho = -0,040$, $p = 0,853$) ve miR-26 için de ($\rho = -0,046$, $p = 0,831$) kortizol değerleri ile anlamlı ilişki bulunamamıştır. Bu bulgular, kortizol değişimi ile ilgili miRNA ifade değişiklikleri arasında doğrudan bir ilişki olmadığını göstermektedir.

3.6.2. miRNA ifadelerine Cinsiyetin Etkisi

“Kontrol ve stres grupları arasında miR-16, miR-21 ve miR-26 ifade düzeylerine cinsiyetin etkisi yoktur.” hipotezinin test edilmesi amacıyla ΔCq değerleri kullanılarak tek faktör tekrarlı iki yönlü varyans analizi (ANOVA) analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, cinsiyetin miRNA ifadelerine doğrudan etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Bu durum, erkek ve dişi grupları arasında miRNA ifade seviyelerinde genel bir farklılık olmadığını göstermektedir.

Cinsiyetin miR-16 ifadesi üzerindeki etkisi incelendiğinde ($F(1, 25) = 1,524$, $p = 0,228$) erkek ve dişi köpekler arasında miR-16 ifade seviyelerinde anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir. Ayrıca, deney grupları (kontrol ve stres) ile cinsiyet arasındaki etkileşim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($F(1, 25) = 2,391$, $p = 0,135$).

Çizelge 3.6. Cinsiyetin miR-16 ifadesi üzerine etkisi

Cinsiyet	n	$\Delta Cq_miR16_Kontrol$	n	ΔCq_miR16_Deney	Zaman	p	
		Arit. Ort. $\pm$ SH		Arit. Ort. $\pm$ SH		Cinsiyet	Z*C
1	13	-2,6885 $\pm$,4476	13	-4,2971 $\pm$.4478	<0,001	0,228	0,135
2	14	-1,3487 $\pm$,4580	14	-4,7021 $\pm$.5491			

Arit. Ort: Aritmetik Ortalamayı, SH: Standart hatayı temsil etmektedir.

Çizelge 3.7. Cinsiyetin miR-21 ifadesi üzerine etkisi

Cinsiyet	n	$\Delta Cq_{miR21_Kontrol}$	n	ΔCq_{miR21_Deney}	Zaman	p	
		Arit. Ort. $\pm$ SH		Arit. Ort. $\pm$ SH		Cinsiyet	Z*C
1	13	-6,003 $\pm$,4396	13	-7,172 $\pm$,5179	0,02	0,186	0,212
2	14	-4,851 $\pm$,3530	14	-7,382 $\pm$,4742			

Arit. Ort: Aritmetik Ortalamayı, SH: Standart hatayı temsil etmektedir.

Cinsiyetin miR-21 ifadesi üzerindeki etkisi incelendiğinde $F(1, 25) = 1,849$, $p = 0,186$) erkek ve dişi köpekler arasında miR-21 ifade seviyelerinde anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir. Ayrıca, deney grupları (kontrol ve stres) ile cinsiyet arasındaki etkileşim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($F(1, 25) = 1.643$, $p = 0,212$).

Çizelge 3.8. Cinsiyetin miR-26 ifadesi üzerine etkisi

Cinsiyet	n	$\Delta Cq_{miR26_Kontrol}$	n	ΔCq_{miR26_Deney}	Zaman	p	
		Arit. Ort. $\pm$ SH		Arit. Ort. $\pm$ SH		Cinsiyet	Z*C
1	13	-3,397 $\pm$,4396	13	-3,688 $\pm$,5248	0,033	0,486	0,095
2	14	-2,120 $\pm$,4076	14	-4,385 $\pm$,5572			

Arit. Ort: Aritmetik Ortalamayı, SH: Standart hatayı temsil etmektedir.

miR-26 ifadesi üzerindeki etkisi incelendiğinde ise ($F(1, 25) = 0,499$, $p = 0,486$) erkek ve dişi köpekler arasında miR-26 ifade seviyelerinde anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir. Ayrıca, deney grupları (kontrol ve stres) ile cinsiyet arasındaki etkileşim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($F(1, 25) = 3,020$, $p = 0,095$).

3.7. Biyoinformatik Analizler

3.7.1. İfadesinde Farklılık Bulunan miRNA'ların Hedef Gen Tahmini

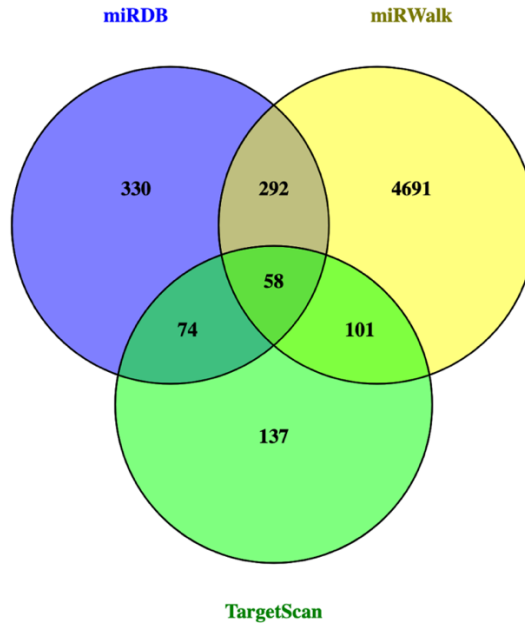
cfa-miR-16, cfa-miR-21 ve cfa-miR26'nın hedef genlerinin belirlenmesinde kullanılan miRDB, TargetScan, miRwalk veritabanlarının her birinden elde edilen ve ortak olan gen sayıları sırasıyla Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da sunulmuştur. Venn diagramları Venny 2.1.0 çevrimiçi aracı kullanılarak yapılmıştır.

cfa-miR-16 için, miRDB veri tabanında 754 gen, TargetScan veri tabanında 390 gen, miRwalk veri tabanında 8848 gen bulunmuştur. Bu genlerden 58 tanesinin taranan veri

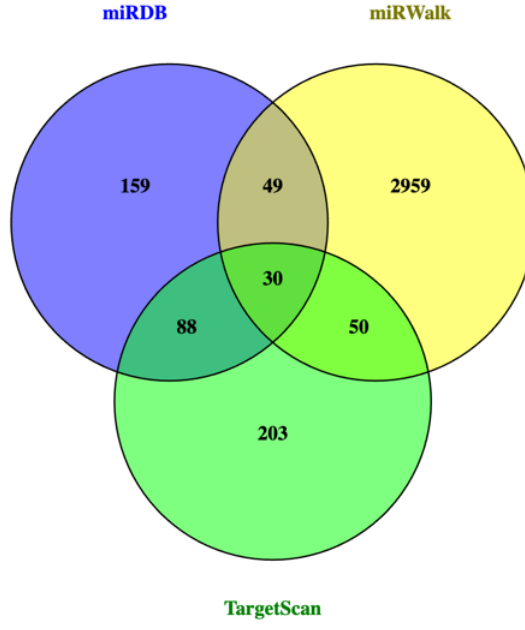
tabanlarında ortak olduğu belirlenmiştir. cfa-miR-21 için, miRDB veri tabanında 326 gen, TargetScan veri tabanında 371 gen, miRwalk veri tabanında 5311 gen bulunmuştur. Bu genlerden 30 tanesi taranan veri tabanlarında ortak olduğu belirlenmiştir. cfa-miR-26 için, miRDB veri tabanında 326 gen, TargetScan veri tabanında 772 gen, miRwalk veri tabanında 8472 gen bulunmuştur. Bu genlerden 117 tanesi taranan veri tabanlarında ortak olduğu belirlenmiştir. Bu veri tabanları köpek için tahmini hedef gen sayısını vermektedir. Doğrulanmış hedef gen sayılarını veren miRTarBase veri tabanı bulunmaktadır ancak bu veri tabanı köpek verisi içermemektedir. Belirlenen genlerden ne kadarının doğrulanmış hedef gen olduğunun gösterilmesi için homoloji gösteren insan datasından yararlanılmıştır (Çizelge 3.6). Bunun için miRWalk veri tabanında elde edilen verilere miRTarBase filtresi uygulanmış ve doğrulanmış hedef genler listelenmiştir.

Çizelge 3.9. İnsan datalarından elde edilen tahmini hedef gen sayıları ve doğrulanmış hedef gen sayıları

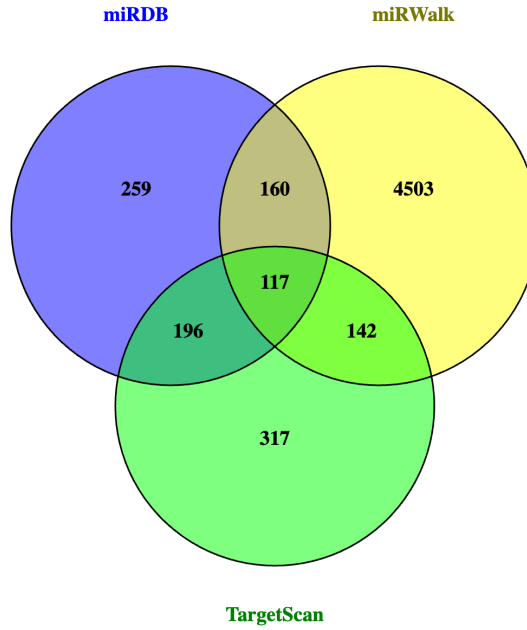
miRNA	Tahmini Hedef Gen Sayısı	Doğrulanmış Hedef Gen Sayısı
hsa-miR-16-5p	1610	298
hsa-miR-21-5p	900	86
hsa-miR-26a-5p	1848	93



Şekil 3.4. cfa-miR-16 için miRDB, TargetScan, miRwalk veritabanlarından elde edilen gen sayıları



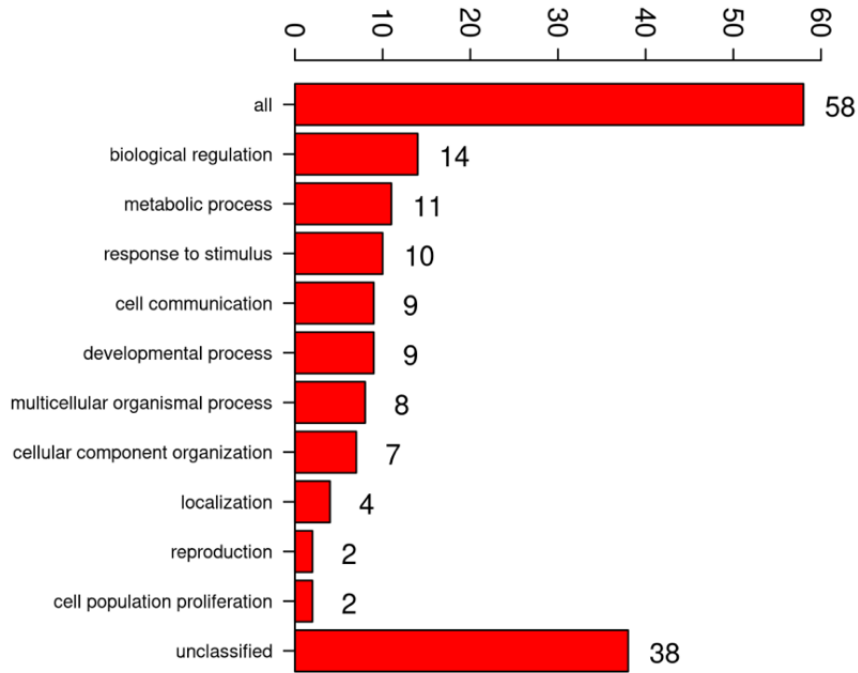
Şekil 3.5. cfa-miR-21 için miRDB, TargetScan, miRwalk veritabanlarından elde edilen gen sayıları



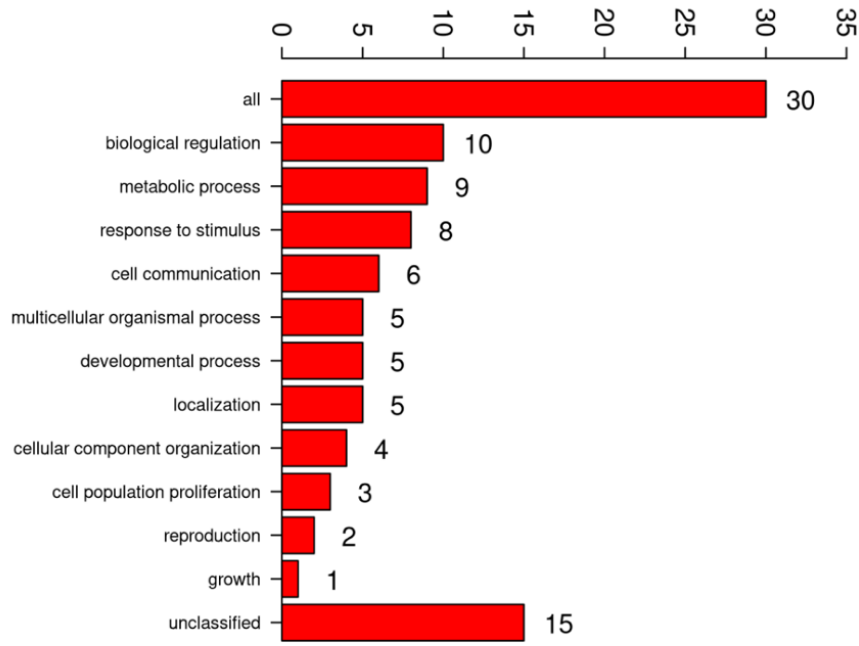
Şekil 3.6. cfa-miR-26 için miRDB, TargetScan, miRwalk veritabanlarından elde edilen gen sayıları

3.7.2. Gen Ontoloji ve Gen Seti Zenginleştirme Analizi

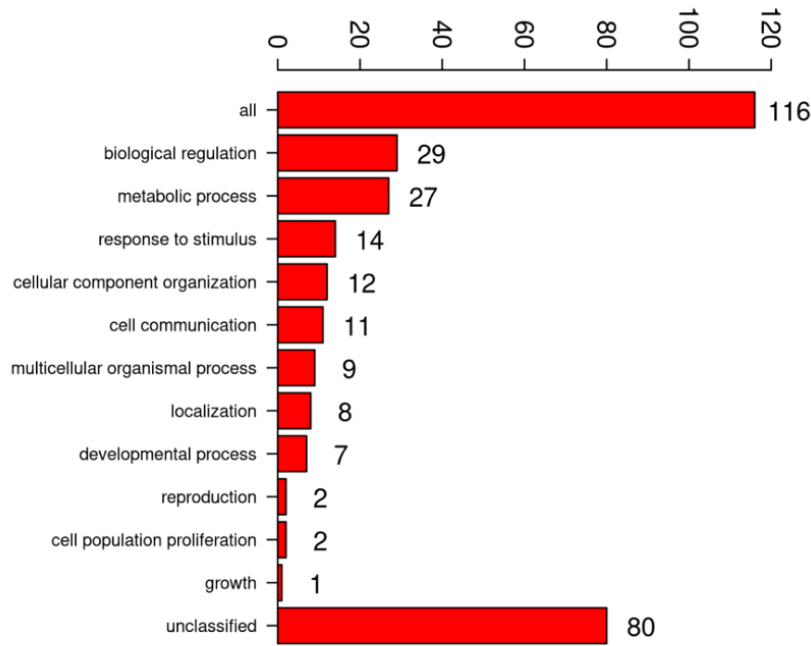
Gen Ontoloji analiz sonuçlarına göre miR-16 için biyolojik fonksiyon kategorisinde başlıca protein ubiquitinasyonunda; hücresel komponent kategorisinde başlıca nükleusta, moleküler fonksiyon kategorisinde başlıca protein kinaz bağlanması aktivitesinde yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.7). Gen Ontoloji analiz sonuçlarına göre miR-21 için biyolojik fonksiyon kategorisinde başlıca protein ubiquitinasyonunda; hücresel komponent kategorisinde RNA Polimeraz II transkripsiyon regülatör kompleksinde ve sitozol kategorisinde yer almaktadır. Moleküler fonksiyon kategorisinde başlıca DNA-binding transkripsiyon faktör aktivitesinde yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.8). Gen Ontoloji analiz sonuçlarına göre miR-26 için biyolojik fonksiyon kategorisinde başlıca fosforilasyon ve protein fosforilasyonunda; hücresel komponent kategorisinde başlıca nükleus ve sitoplazmada; moleküler fonksiyon kategorisinde başlıca protein bağlanması aktivitesinde yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.9).



Şekil 3.7. miR-16 ile ilgili genlerin biyolojik süreçlere göre sınıflandırılması



Şekil 3.8. miR-21 ile ilgili genlerin biyolojik süreçlere göre sınıflandırılması



Şekil 3.9. miR-26 ile ilgili genlerin biyolojik süreçlere göre sınıflandırılması

Bütün ortak genler için WebGestalt (WEB-Based Gene Set Analysis Toolkit) (<https://2024.webgestalt.org/>) çevrim içi aracı kullanılarak yolak zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir. Yolak zenginleştirme analizi KEGG veri tabanı üzerinden yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık değerlendirmesinde p-değeri için $<0,05$ ve Yanlış Keşif Oranı (FDR) için $<0,05$ kriterleri esas alınmıştır. Bu kriterlere göre miR-21 için hücre sayısının korunmasıyla ilgili yolakta JAG1, NFIB ve STAT3 genleri; kök hücre farklılaşması yolağında JAG1, LRP6 ve STAT3 genleri; RNA metabolik sürecinin düzenlenmesinde ise JAG1, LRP6, STAT3, MEF2C, NFIB ve PAN3 genleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Çizelge 3.10. miR-16 Yolak Analizi

Yolak	p	FDR	Genler
Vitamin B6 metabolizması	0,027	1	PSAT1
Yağ asidi biyosentezi	0,002	1	ACSL4, FASN
Çok hücreli organizma süreçleri	0,004	1	ASH1L, ACSL4
Yağ asidi metabolizması	0,022	1	ACSL4, FASN
Aktin filamentine dayalı süreç	0,024	1	ARHGAP18, DIXDC1, PPM1E
Ubikuitin aracılı proteoliz	0,025	1	CDC27, FBXW7, UBE2B
Hücre döngüsü	0,025	1	CDC27, CHEK1, PPP2R5C
Akson rehberliği	0,034	1	PLXNC1, SEM3D, SEMA6D
Hücre hareketliliği	0,060	1	ARHGAP18, ASH1L, DIXDC1, SEMA6D
Protein modifikasyon süreci	0,034	1	ARIH1, ARRDC4, BAG5, INPP5J, UBE2V1

Çizelge 3.11. miR-21 Yolak Analizi

Yolak	p	FDR	Genler
Hücre sayısının korunması	0,00009	0,033072	JAG1, NFIB, STAT3
Kök hücre farklılaşması	0,0001	0,033072	JAG1, LRP6, STAT3
RNA metabolik sürecinin pozitif düzenlenmesi	0,0001	0,033072	JAG1, LRP6, STAT3, MEF2C, NFIB, PAN3
Gelişimsel sürecin negatif düzenlenmesi	0,00039	0,058507	JAG1, NFIB, STAT3, SPRY2
Duyusal sistem gelişimi	0,0007	0,088180	JAG1, NFIB, STAT3
Tüp oluşumu	0,001	0,094450	JAG1, NFIB, STAT3, SPRY2
Morfogenezle ilgili anatomik yapı oluşumu	0,001	0,094450	LRP6, NFIB, SPRY2, STAT3
Nörotrofin sinyal yolu	0,001	0,094450	FASLG, MAP3K1, NTF3
MAPK sinyal yolu	0,001	0,11205	FASLG, MAP3K1, NTF3, MEF2C
Hareketlilik	0,001	0,11205	AP1AR, JAG1, SPRY2, STAT3

Çizelge 3.12. miR-26 Yolak Analizi

Yolak	p	FDR	Genler
Hücre adezyon molekülleri	0,00227	1	CDH2, ITGA6, ITGB8, NCAM2, PTPRD
Wnt sinyal yolu	0,0044	1	CCND2, GSK3B, PLCB1, PPP3CB, TBL1XR1
Akson rehberliği	0,0063	1	EPHA7, GSK3B, PPP3CB, SRGAP1, TRPC3
Fosforilasyon	0,00813	1	CDK8, DAPK1, ERBB4, FNIP1, PIM1, PRKCD
Aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiyopatisi	0,01613	1	CDH2, ITGA6, ITGB8
IL-17 sinyal yolu	0,0194	1	GSK3B, MAPK6, TAB3
Azot metabolik sürecinin negatif düzenlenmesi	0,0213	1	EIF2S1, FNIP1, PAX5, PHF20L1, RBM46, TBL1XR1, ZNF148
Otofaji	0,021389	1	DAPK1, EIF2S1, PRKCD, VPS33A
Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolu	0,027678	1	PIM1, PLCB1, PRKCD
Virion	0,0379	1	NCAM2

4.TARTIŞMA

Köpekler, evcil hayvan olarak sosyal yaşantımızda yer almakla beraber, aynı zamanda sınır güvenliği, narkotik, patlayıcı tespiti ve arama-kurtarma gibi kritik alanlarda özel eğitilmiş iş köpekleri olarak da önemli görevler üstlenirler. Ancak, bu köpeklerde kronik stresin daha yaygın olduğu ve bu durumun iş performanslarını olumsuz etkilediği belirlenmiştir (Denham vd., 2014; Haverbeke vd., 2008). "İş grubu köpekler" kategorisinde yer alan ve hayati roller üstlenen bu köpeklerin, eğitim süreçlerinde, günlük yaşamlarında ve görevleri sırasında maruz kaldıkları stresin, fiziksel ve psikolojik sağlıklarını olumsuz etkileyerek performanslarında düşüşe yol açtığı gözlemlenmiştir.

Mevcut literatür halen birçok türde stres düzeyini doğrudan ölçebilecek araştırma yöntemlerinden yoksundur (Kumar vd., 2018). Veteriner hekimlikte hayvanların stres durumlarını ölçmek için çeşitli yöntemler denenmektedir. Hayvanların kendi stres durumlarını sözlü olarak ifade etmesi mümkün olmadığı için yaşamsal belirti değişiklikleri, davranışsal sinyaller ve biyobelirteçler gibi dolaylı yöntemler gereklidir. Köpeklerde stres durumunun değerlendirilmesi çeşitli biyokimyasal, fizyolojik analizler ve davranış analizlerini kapsayan multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir. Rutinde stresin tespiti ve değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan parametre kortizol ölçümüdür (Hellhammer vd., 2009; Russell vd., 2012). Mevcut literatürde kortizol analizi için çeşitli materyaller kullanılmaktadır. Ancak kullanılan materyallerin çeşitli limitasyonları mevcuttur. Örneğin idrar kortizol ölçümünde günlük dalgalanmaların önüne geçebilmek için tüm gün boyunca toplanan idrar örnekleri kullanılmaktadır. Kan serumundan yapılan analizlerde organizmanın gerçek zamanlı olarak kortizol konsantrasyonunu yansıtmaması nedeniyle daha çok akut değişikliklerin etkileri görülmektedir (Russell vd., 2012). Bununla beraber kan alımında invaziv yöntemler ağrıya sebep olabilir ve akut strese ve kortizol seviyesinde kısa süreli yükselmeye neden olabilir (Righi vd., 2019). Bununla beraber belirtilen diğer biyolojik materyaller gerçek zamanlı seviyelerin ölçümünde daha dikkat çekerken; tüyden kortizol analizi, daha uzun süreler boyunca sistemik kortizol maruziyetini ortaya koyarak, kronik stresin biyolojik belirteci olarak önemli bir rol oynamaktadır (Russell vd., 2012). Ancak tüydeki kortizol değerinin tüy renginden (Bennett ve Hayssen, 2010), kimyasallarla maruziyetten (Sauve vd., 2007), tüyün alındığı vücut bölgesinden (Macbeth vd., 2010) ve yıkama sıklığı ile hijyen problemlerinden (Hamel vd., 2011) etkilendiği belirlenmiştir. Bu materyallerin limitasyonları göz önüne alındığında, non-invaziv bir yöntem ve daha az ağırlı ve stresli bir yöntem olan tükürük örnekleme, aynı zamanda miRNA ifade profillerinin çalışılacağı materyalle uyumlu olması

nedeniyle tercih edilmiştir (Schöberl vd., 2017). Stresin belirlenmesinde SAM ve HPA hormonları stres biyobelirteci olarak kullanılmalarına rağmen bu hormonlardaki günlük dalgalanmalar, uyarılar, malaptif etkilere neden olmaları gibi sınırlamalar mevcuttur ve yeni belirteçlerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır (Jeong vd., 2020).

Kortizol analizi çeşitli biyolojik örneklerde immünoanaliz tabanlı testlerden yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi yöntemlerine kadar çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Kortizol analizi için rutinde en yaygın kullanılan yöntem ELISA'dır. ELISA yöntemi, kolay uygulanabilirliği, basit analiz tekniğine sahip olması ve minimum beceri ile bilgi gerektirmesi nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir. Sunulan tez çalışmasında ise kortizol analizi LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. LC-MS/MS yönteminin köpeklerde tükürük kortizolü tayini için etkili bir yöntem olduğu ve düşük konsantrasyonlarda dahi oldukça yüksek doğruluk sağladığı gösterilmiştir (Meunier vd., 2021). Bu yöntem ELISA yöntemine göre daha maliyetli bir yöntem olmasına rağmen yüksek hassasiyeti ve seçiciliği, karmaşık biyolojik materyallerde bile çok düşük konsantrasyonların hızlı bir şekilde analizini mümkün kılmaktadır (Boolani vd., 2019).

Mevcut literatürde kortizolün kronik stres durumundaki seviyeleri hakkında tartışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalarda kronik stresin yüksek kortizol seviyeleri ile ilişkili olduğu belirtilirken (Charmandari vd., 2005; Chrousos, 2009) bazı çalışmalarda ise stres sistemindeki maladaptif etkiler sonucunda kronik stres düşük kortizol seviyeleri (Yehuda vd., 1990; Zoladz ve Diamond, 2013) ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, kortizol ölçümünün kronik stresin tespitinde güvenilir bir parametre olmadığı düşünülmektedir. Bunun altında yatan faktörlerin örneğin toplanma şekli, transportu, saklanması ve analizi sırasında bir örneklik olmayışı ve gereken hassasiyetin gösterilmeyişi olabilir. Sunulan tez çalışmasında bu durum göz önüne alınarak, her iki örnek toplama döneminde aynı zaman aralığı seçilmiş olup, örneklerin transportu ve saklama koşulları bir örnek yapılmıştır.

Sunulan tez çalışmasında gruplar arası kortizol seviyelerinde ortalama olarak küçük bir artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Stres seviyelerinin değerlendirilmesi sürecinde, kortizol düzeylerinin çeşitli akut ve kronik hastalıkların varlığı nedeniyle etkilenebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Kortizol, vücudun stres yanıtında merkezi bir rol oynayan bir hormon olup hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda önemli değişiklikler gösterebilmektedir. Örneğin, epilepsi hastalarında fenobarbital ve potasyum bromür gibi antiepileptik ilaçların kullanımı sonucunda kortizol seviyelerinde belirgin bir

düşüş gözlemlenmiştir (Packer vd., 2019). Stres ve diğer somatik durumlar, kortizol seviyeleri üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu için, kortizol seviyelerinin değerlendirilmesi sırasında hastanın klinik durumu ve tedavi geçmişi detaylı bir şekilde incelenmeli, daha dikkatli bir ayırıcı tanı yapılması gerekmektedir. Sunulan tez çalışmasında hem kortizol hem de miRNA analizlerinde dışsal faktörlerin etkisi minimize edilmesi amacıyla yakın zamanda herhangi bir sebeple tedavi gören, ilaç kullanan köpekler çalışma dışı bırakılmıştır.

Köpek davranışlarını ölçmek için çeşitli araçlar geliştirilmiştir. Bunlardan birisi köpek sahibi için bir anket kullanarak günlük davranışların değerlendirilmesine odaklanan köpek davranış değerlendirme ve araştırma anketidir. Sunulan tez çalışmasında da C-BARQ analizi gerçekleştirilmiş olup, kontrol ve stres grubu arasında bazı davranış değişkenlerinde anlamlı farklılıklar olduğu ortaya koyulmuştur. Gruplar arasında yabancıya yönelik saldırganlık ve eğitilebilirlik kategorilerinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Eğitilebilirlik kategorisinde stres grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek değerler göstermektedir ($p = 0,040$). Bir köpeğin yeni bir davranışı veya görevi öğrenme hızı ve kolaylığı, yani eğitilebilirlik, hızlı öğrenmenin daha hızlı ve dolayısıyla daha verimli bir eğitime yol açması nedeniyle açıkça önemli bir özelliktir. Ödül arzusunun daha fazla olması, göreve olan dikkati artıracak, motivasyonu devam ettirecek ve böylece eğitim verimliliğini artıracaktır. Bu nedenle, eğitilebilirlik, dikkat gibi öğrenme süreçleri ve değişen koşullara duyarlılık gereksinimi gibi çeşitli diğer süreçleri de içeren çok boyutlu bir yapı olabilir. Dolayısıyla, eğitilebilirlik yalnızca hızlı öğrenme yeteneğini değil, aynı zamanda köpeğin görev başarısını ve uyum sağlama kapasitesini de etkileyen kritik bir özellik olarak değerlendirilebilir. Yabancıya yönelik saldırganlık kategorisinde de aynı şekilde kontrol grubu değerleri stresli gruba göre anlamlı derecede daha büyüktür ($p = 0,007$). Yabancıya yönelik saldırganlığın eğitim sonrası azalması beklenebilir, çünkü eğitim süreçleri genellikle köpeklerin sosyalizasyon becerilerini geliştirmeyi, kontrol edilemeyen saldırganlık gibi istenmeyen davranışları azaltmayı ve çevresel uyaranlara karşı daha sakin tepkiler vermelerini hedeflemektedir. Bununla beraber kronik stresin köpeklerde saldırganlık gibi aktif davranışları baskılayarak daha pasif ve içe dönük davranışlara yol açabileceği düşünülmektedir.

C-BARQ, köpeklerin davranış değerlendirmesinde güvenilir bir yöntem olarak görülmekle birlikte ankete dayalı değerlendirmeler köpek sahibinin beyanına bağlı olduğu için bazı dezavantajları olabilmektedir. Köpek sahibinin gözlem yeteneği, anketi doldururken gösterilen özen ve ciddiyet, anket sonuçlarının doğruluğu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca, köpek sahipleri, köpekleriyle duygusal bir bağa sahip olduklarından, köpeğin

davranışlarını değerlendirmede taraflı olabilirler. Örneğin, sahipler köpeklerinin olumsuz davranışlarını dikkate almayabilir veya olumlu davranışlarını öne çıkarabilir. Bu durum, objektif bir değerlendirme yapılmasını zorlaştırabilmektedir.

Tüm bunlar göz önüne alındığında hayvanların yaşam kalitesini ve refahını değerlendirmek için objektif, ölçülebilir ve tutarlı laboratuvar analizlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Giriş kısmında da bahsedildiği üzere miRNA'lar çeşitli avantajları nedeniyle potansiyel biyobelirteç olarak ilgi görmektedir. Kanser (Kan vd., 2024), karaciğer hastalıkları (Anadol vd., 2015), diyabet (Zhao vd., 2011) gibi durumlar ile hastalıkların erken teşhisinde (Kapoor vd., 2020), prognozunun belirlenmesinde (Zhang vd., 2018) ve tedaviye yanıtın izlenmesinde (Caggiu vd., 2018) spesifik miRNA profilleri tanımlanmış ve bunların biyobelirteç potansiyellerine dikkat çekilmiştir. miRNA'ların stres reaksiyonlarını aydınlatmanın yanı sıra stres reaksiyonlarının değerlendirilmesinde, stresin teşhisinde, önlenmesinde ve uygulanan tedavilerin değerlendirilmesinde biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Gidron vd., 2010; Wiegand vd., 2017).

Mevcut literatürde köpeklerde kronik stres ve miRNA ilişkisini inceleyen tek çalışma bulunmaktadır (Luo vd., 2016). Ancak bu çalışma, elektrik şoku ve hareket kısıtlaması gibi invaziv yöntemler ile hava embolisi yoluyla ötenazi uygulaması nedeniyle etik açıdan problem yaratmaktadır. Bununla beraber çalışmanın grupları her iki köpek ırkı (Chinese Field ve Beagle) için yalnızca üçer stres ve üçer kontrol örneği ile sınırlı olup bu küçük örneklem büyüklüğü sonuçların genellenebilirliği ve istatistiksel gücü açısından önemli bir dezavantajdır. Sunulan tez çalışması kronik stresli köpeklerde tükürükten miRNA ifadesinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Tez çalışmasında tükürük gibi invaziv olmayan bir biyolojik materyalin kullanılması, hem hayvan refahının ön planda tutulmasını sağlamakta hem de geniş ölçekli çalışmalarda daha uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ayrıca örneklem büyüklüğü grup başına 27 köpekten (%95 güvenilirlik, %80 güç, $d=0,8$) oluşmaktadır. Bu yaklaşım, etik kaygıları en aza indirerek istatistiksel gücü yüksek sonuçlar elde etme olanağı sunmakta ve literatürdeki bilgi boşluğunu daha sağlam bir veri setiyle doldurma hedefini desteklemektedir.

Sunulan tez çalışmasında gruplar arasında tükürük miR-16, miR-21, miR-26 ve miR-144 ifadeleri snU6 referans genine göreceli olarak hesaplanmıştır. Köpeklerde miRNA ifade analizlerinde snU6'nın çeşitli çalışmalarda farklı dokularda referans olarak kullanıldığı görülmektedir (Elshafie vd., 2021; Konstantinidis vd., 2020; Ramadan vd., 2022; Ren vd.,

2022). Bu tez çalışmasında köpeklerde snU6'nın tükürük örneklerinde de referans gen olarak ilk kez değerlendirilmesi, bu genin köpek tükürük örneklerinde miRNA ifade analizinde uygun bir referans gen olarak kullanılabileceğini destekler niteliktedir.

Sunulan tez çalışmasında, stres grubu miR-16 ifade düzeylerinin kontrol grubuna oranla 7,02 kat yukarı regüle ($p<0,001$) olduğu belirlenmiştir. Katsuura vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada insanlarda kronik akademik stres sonucu kandan yapılan miRNA analizinde elde edilen sonuçlar tez bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Çalışmada, tez çalışmasıyla tutarlı bir şekilde miR-16 ifadelerinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (Katsuura vd., 2012). Bununla beraber kandan psikolojik stres faktörlerine güçlü yanıtlar verdiği bilinen (Segerstrom ve Miller, 2004) ve 3-UTR'lerinin miR-16'nın bağlanma bölgelerini içeren interlökin-6 (Cai vd., 2012) ile interferon- γ seviyelerinin kronik stres durumunda daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Katsuura vd., 2012). Honda vd. (2013) insan kan örneklerinde akademik strese maruziyetin inceledikleri çalışmalarında, kronik strese bağlı olarak miR-16 seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar sunulan tez çalışmasının sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Kronik stres durumunda bağışıklık sistemi olumsuz şekilde etkilenmektedir. Uzun süre yüksek seyreden kortizol seviyeleri, pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini baskılayarak ve lenfosit aktivitesini azaltarak bağışıklık sisteminin işlevlerini zayıflatır. Bu bağlamda, tez çalışmasında kronik stresli köpeklerde miR-16 seviyelerinin daha yüksek bulunması dikkat çekicidir. Kronik stresin neden olduğu dengesiz immün yanıt, organizmada hem baskılanmış bir savunma sistemine hem de bozulmuş inflammatuar süreçlerin ortaya çıkmasına neden olur. Kronik stresin tetiklediği inflamasyon yanıtını baskılamak amacıyla miR-16'nın ifadesinin artabileceği düşünülmektedir. Kronik stres koşullarında yüksek kortizolün neden olduğu immunosupresif etkinin yanı sıra miR-16 ifade seviyelerindeki artışın pro-inflamatuar sitokin üretiminin baskılanmasında rol oynayarak organizmanın bağışıklık yanıtında bir denge oluşturulmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu durum, organizmanın kronik stres koşullarına adaptasyon mekanizması olarak değerlendirilebilir.

Stres koşullarının miRNA'ların biyogenezini, mRNA hedeflerinin ifadesini ve miRNA-protein komplekslerinin aktivitelerini değiştirebileceği bilinmektedir (Leung ve Sharp, 2010). Stres sonucu miRNA ifadesinin çeşitli aşamalarda çeşitli proteinler tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Zhang ve Peng, 2015). Stres sonucu miRNA ifadesinin transkripsiyonel düzenlenmesinin bir örneği, ökaryotlarda genom bütünlüğünü korumak için evrimsel olarak

korunmuş bir sistem olan DNA hasar tepkisidir (Zhang ve Peng, 2015). Çevresel stresi algılayan ve miRNA seviyelerinin düzenlenmesinde etkin rol alan faktörlerden biri de genomik gardiyan olarak da bilinen, hücre bölünmesinin düzenlenmesinde rol oynayan, DNA tamir mekanizmasında rol oynayan tümör baskılayıcı p53 proteindir (Leung ve Sharp 2010; Zhang ve Peng, 2015). p53 proteinin ilgili tezin aday miRNA'larından biri olan miR-16'nın da yer aldığı bazı miRNA ifadelerinin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir (Suzuki vd., 2009). miR-16'nın aşırı ifade edilmesi, hücre proliferasyon hızını azaltır. Kronik stresin yarattığı fizyolojik baskı, DNA hasar tepkisinin veya p53 aracılı yolların aktive olmasına katkıda bulunabilir. Bu sayede miR-16'nın artan ifadesi hem hücre proliferasyonunun kontrolüne hem de stres kaynaklı dengesiz inflamatuvar yanıtın düzenlenmesine aracılık edebilir. Bu bilgiler de kronik stres koşullarında gözlenen miR-16 artışının organizmanın hücre ve moleküler düzeyde geliştirdiği bir adaptasyon mekanizması düşüncesini destekler niteliktedir.

Kronik stres, travma sonrası stres bozukluğu ve depresyon gibi psikiyatrik bozuklukların gelişimine katkıda bulunan önemli bir risk faktörüdür. Sunulan tez çalışmasındaki ifadesinde anlamlı farklılıklar tespit edilen miR-16'nın stresin biyolojik temelindeki kritik rolünü destekleyen literatürle uyumludur. miR-16'nın antidepresan tedavilerin terapötik etkilerinde yer aldığı ve serotonin taşıyıcı genini hedefleyerek serotonerjik sistem üzerinde düzenleyici bir rol oynadığı gösterilmiştir. miR-16'nın seçici serotonin geri alım inhibitörü antidepresan tedavileri sonrası serotonerjik raphe nükleuslarında ifadesinde artış; noradrenerjik lokus seruleus ve hipokampusta ise ifadesinde azalma olduğu gösterilmiştir (Baudry vd., 2010; Launay vd., 2011; Yang vd., 2017). Bu bulgular, miR-16'nın merkezi sinir sistemi düzeyinde stres ve depresyonla ilişkili nöroplastisite ve nörogenez süreçlerini düzenlediğini göstermektedir. Sunulan tez çalışmasında kronik stresin periferik bir biyobelirteci olarak miR-16'nın tükürükteki artışı, bu miRNA'nın yalnızca merkezi sinir sistemi içinde değil, aynı zamanda sistemik düzeyde de stres yanıtında düzenleyici bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, literatürde miR-16'nın terapötik etkilerle bağlantılı olduğu ve nöroprotektif süreçlerde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, depresyon modeli oluşturulmuş sıçanlarda raphe nükleusuna miR-16 enjekte edilmesinin antidepresan etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Launay vd., 2011). Benzer şekilde, dişi sıçanlarda anti-miR-16'nın intraserebroventriküler enjeksiyonu sonucunda depresif benzeri davranışların ortaya çıkması, bu mikroRNA'nın davranışsal fenotipler üzerindeki etkisini vurgulamaktadır (Song vd., 2015). Ayrıca, miR-16'nın BDNF gibi nörotrofik faktörleri hedeflemesi, bu mikroRNA'nın özellikle hipokampal nörogenez ve depresyonla

ilişkili süreçlerdeki önemini daha da öne çıkarmaktadır (Launay vd., 2011; Yang vd., 2017). Bu bilgiler ışığında sunulan tez çalışmasında tükürükteki miR-16 artışının, stresin vücutta yaygın biyolojik etkilerini yansıtan potansiyel bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, stres grubu miR-21 ifade düzeylerinin kontrol grubuna oranla 3,94 kat yukarı regüle ($p<0,001$) olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, literatürde miR-21 ifade seviyeleri ile stres türü arasındaki ilişki farklılıklar göstermektedir. Beech vd. (2014) insanlarda akut psikolojik stresin tetiklenmesinden bir saat sonra tam kanda miR-21 ifadesinin arttığını bildirmiştir. Wiegand vd. (2018) yaptığı çalışmada ise akut psikolojik sosyal strese yanıt olarak insanlarda miR-21 ifadesinde azalma ve miR-16 için anlamlılık seviyesine yakın değişiklikler görülmüştür (Wiegand vd., 2018). Gidron vd. (2010) de kısa süreli akademik stresin kandaki miR-21 ifadesinin azaldığını göstermiştir. Bu çelişkili sonuçlar, miR-21'in düzenlenmesinde stres türü (akut veya kronik), stres süresi ve kullanılan örnekleme (kan veya tükürük) gibi faktörlerin önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Literatürde miR-21'in reaktif oksijen türleri ve oksidatif stresle ilişkili olduğu, hücrel stres yanıtı mekanizmalarını düzenlediği bildirilmiştir (Zhang vd., 2012). Kronik stresin oksidatif stresin gelişmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, kronik stresin sürekli düşük düzeyde bir oksidatif stres yanıtı tetiklediği ve bunun miR-21 ifadesinde artışa yol açabileceği değerlendirilebilir. Buna karşın, akut stres altında miR-21'in azalması, hücrel yanıtın hızlı bir adaptasyon sürecini yansıtır olabilir. Akut stres sırasında miR-21'in azalması, hızlı bir adaptif yanıtı temsil ediyor olabilirken, kronik stres altında artışı, uzun vadeli stres adaptasyon süreçlerinin bir göstergesi olabilir.

Koyunlarda yapılan bir çalışmada (Manenti vd., 2023), tükürük örneklerinde miR-16b ve miR-21'in ifadelerinde adaptasyon yanıtı ve stresle ilişkilendirilen anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Benzer şekilde, tez çalışmasında köpeklerde miR-16 ve miR-21'in ifadelerinde gözlemlenen değişiklikler ve yukarıda bahsedilen örnekler doğrultusunda bu miRNA'ların stresin biyolojik süreçlerinde türler arasında ortak bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, kronik stresin miR-21'in ifadesinin artmasına neden olarak uzun vadeli adaptasyon süreçlerini desteklediği fikrini güçlendirmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, stres grubu miR-26a ifade düzeylerinin kontrol grubuna oranla 3,05 kat yukarı regüle ($p<0,001$) olduğu belirlenmiştir. Honda vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada kronik stres durumunda miR-26b ifade seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Ancak miR-26a ifadesinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Tez çalışmasında ise aynı ailenin farklı bir üyesi olan miR-26a ifadesinde farklılık tespit edilmiştir. Benzer aileye sahip olan iki miRNA üyesinin (miR-26a ve miR-26b) farklı koşullar ve farklı türlerde kronik stres sonucunda farklı biçimlerde ifade edilmiş olmaları dikkat çekicidir. Aynı miRNA ailesindeki üyeler genellikle benzer tohum dizileri paylaşmakta ve benzer biyolojik yolları etkileyebilmektedir. Bununla birlikte, aynı miRNA ailesindeki farklı üyelerin ifade edilme seviyeleri birbirinden bağımsız olarak, tür, doku spesifikliği, stresin süresi ve şiddeti gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bu durumun bir çelişki yaratmadığı gibi stresin miRNA ailesi içindeki farklı üyelerinin ifadelerini nasıl etkilediğine dair farklı bir bakış açısı sunmaktadır.

Tez çalışması kapsamında miR-16 ve miR-26a için zenginleştirme ve yolak analizleri yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı genler bulunamamıştır ($p > 0,05$ ve $FDR > 0,05$). Köpek genom çalışmaları ve veri tabanlarının kapsamı, insan rat gibi türlere oranla daha kısıtlıdır ve bu nedenle analizler doğrulanmış genler yerine tahmini genler üzerinde gerçekleştirilmektedir. İlerleyen dönemlerde, yapılan çalışmaların ve veri tabanlarına veri girişlerinin artması ile daha doğru tahminlerin yapılabileceği düşünülmektedir. miR-21 için zenginleştirme ve yolak analizleri yapıldığında Jagged Canonical Notch Ligand 1 (JAG1), Nuclear Factor I B (NFIB), Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3), LDL Receptor Related Protein 6 (LRP6), Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C) ve Poly(A) Specific Ribonuclease Subunit PAN3 (PAN3) genleri istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$ ve $FDR < 0,05$) bulunmuştur.

JAG1 geni Notch sinyal yolunun en önemli etkileşim moleküllerinden biridir (Grochowski vd., 2016). Notch sinyal yolu, bir dizi hücrel sürecin düzenlenmesinde rol oynayan ve evrimsel olarak yüksek düzeyde korunmuş bir yoldur (Shi vd., 2023). Bu süreçler hücre çoğalması, apoptoz, farklılaşma, doku homeostazının sürdürülmesi ve immün regülasyonu içerir (Shi vd., 2023; Zhou vd., 2022). Ayrıca Notch yolunun bloke edilmesinin tümör kan damarı yapısını bozduğunu ve tümör metastazını desteklediği bildirilmiştir (Kangsamaksin vd., 2015). miR-21, apoptozu inhibe ederek ve hücrel yaşam sürecini destekleyen ve böylece tümör progresyonunu artıran bir onkogen olarak tanımlanmaktadır (Peng vd., 2024). miR-21'in JAG1'in 3-UTR bölgesini hedefleyerek genin ifadesinin baskılanmasına yol açtığı çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Mei, 2019; Selcuklu vd., 2012; Zhou vd., 2018). Bu durum miR-21'in JAG1'i aşağı regüle ederek Notch sinyal yolunu modüle edebileceğini göstermesi açısından önemlidir. Bir köpek atriyal fibrilasyon modelinde, miR-21/JAG1 yolağının atriyal fibrozisi teşvik ettiği ve atriyal fibrilasyon insidansını artırdığı

gösterilmiştir (Mei, 2019). miR-21'in JAG1'i hedef alarak kardiyak fibroblasttan miyofibroblasta dönüşümü ve miyokardiyal fibrozun oluşumuna etki ettiği gösterilmiştir (Zhou vd., 2018). miR-21'in monosit kaynaklı dendritik hücre farklılaşması sırasında JAG1'i hedeflediği de gösterilmiştir (Hashimi vd., 2009).

NFIB geni merkezi sinir sisteminde glial ve nöronal farklılaşmada önemli bir rol oynamaktadır (Harris vd., 2015). Kronik hafif stresin sıçanlarda frontal kortekste ve farelerde PFC ve amigdalada NFIB ifadesini artırması nedeniyle HPA eksenini işleviyle ilişkilendirilmiştir (Lisowski vd., 2013; Orsetti vd., 2009). Ayrıca NFIB'nin baskılanması sonucu apoptoz ve inflamasyonun arttığı gösterilmiştir (Wu vd., 2024b). NFIB miR-21'in doğrudan hedefidir. miR-21 genin mRNA'sını hedef alarak translasyonunu baskılar (Fujita vd., 2008). Bu etkileşim, hücresel farklılaşma ve yaşlanma gibi farklı biyolojik süreçlerde ve hastalıkların oluşum mekanizmalarında önemli bir rol oynamaktadır (Dellago vd., 2013; Fujita vd., 2008; Wu vd., 2024a). Ayrıca miR-21 ve NFIB arasında çift yönlü negatif geri bildirim mekanizması olduğu gösterilmiştir. miR-21'in NFIB'nin translasyonunu baskılayarak aynı zamanda NFIB'nin miR-21'in promotörüne bağlanarak miR-21'in transkripsiyonunu negatif düzenlediği belirtilmiştir (Fujita vd., 2008).

STAT3 geninin hem akut hem de kronik strese duyarlı bir sensör olarak işlev gördüğü; bu sayede oksidatif hasara veya hücreölüm sinyallerine karşı koruyucu mekanizmalarda ve bununla beraber mikrotübüllerin veya kromatinin yapısal stabilitesini sürdürmede rol oynadığı gösterilmiştir (Zouein vd., 2013). STAT3'ün hipertansiyon, gebelik ve ileri yaş gibi kronik stres koşullarında kalbi koruduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Kalp yetmezliği, yaşlanma ve diyabetle birlikte kalpteki STAT3 seviyelerinin ve aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (Zouein vd., 2015). Yapılan bir çalışmada kronik stresin ardından IL-10/STAT3 ekseninin belirgin şekilde aktive olduğunu gösterilmiş ve bu yolağın kronik stres kaynaklı bağışıklık baskılanmasının düzenlenmesi için önemli olduğu vurgulanmıştır (Hu vd., 2014). STAT3, miR-21'in promotör bölgelerine doğrudan bağlanarak çeşitli kanser türlerinde ifadesini etkilemektedir. Bu etkileşime IL-6 gibi sitokinlerin neden olduğu belirtilmiştir (Löffler vd., 2007). STAT3/miR-21 eksenini, kanser ve enflamasyonda kritik bir yolak olup, miR-21 aracılı tümör baskılayıcıların ve onkojenik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynarlar (Löffler vd., 2007; Ou vd., 2014).

Lrp6, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve göçü gibi temel biyolojik süreçlerde kritik rol oynayan bir proteindir (Wang vd., 2019). Sosyal yenilgi stres modeli oluşturulan duyarlı

ve dirençli farelerde hipokampal proteinlerin incelendiği bir çalışmada dirençli farelerde depresyonla ilişkili olan Lrp6 geninin kontrol grubuna göre yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (He vd., 2018). Fare kalbinde Lrp6 eksikliğinin miyokard enfarktüsü boyutunun küçülmesine ve kalp fonksiyonunun iyileşmesine neden olduğu belirtilmiştir (Wu vd., 2021).

MEF2C kas farklılaşması, nöronal işlevler, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlarda kritik roller oynayan bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmaktadır (Caetano vd., 2023; Yelamanchili vd., 2010). Yetişkin farelerde MEF2C öğrenme ve hafızada kritik öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Barbosa vd., 2008). Kronik kısıtlama stresi sonucu erkek farelerin piramidal nöronlarında Mef2c'nin yukarı regüle edilmesinin, anksiyete benzeri davranışları önemli ölçüde azalttığı; aksine, aşağı regüle edilmesinin bu tür davranışları tetiklediği gösterilmiştir. Mef2c'nin yukarı regülasyonundan kaynaklanan anksiyolitik etkinin, artmış nöronal uyarılabilirlik ve güçlenmiş sinaptik iletim ile ilişkili olduğu belirlenmiş ve Mef2c'yi erkek farelerde anksiyete ile ilgili süreçlerin kritik bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Hong vd., 2024). Kronik kısıtlama stresine maruz bırakılan ratlarda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hipokampüste Mef2c mRNA ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (Alzuri vd., 2023). miR-21'in MEF2C ifadesini aşağı regüle ettiği bir düzenleyici etkileşimle karakterize edilmektedir. Yapılan bir çalışmada miR-21'in insan nöronlarında MEF2C'yi spesifik olarak hedef aldığını rapor ederek, miR-21'in sinir sistemindeki MEF2C seviyelerini modüle etmedeki önemli rolünü desteklemiştir (Zlabinger vd., 2019). Bu etkileşim, özellikle miR-21 ve MEF2C ifadesinde değişim gözlemlenen nörodejeneratif hastalıklar bağlamında büyük önem taşımaktadır (Yelamanchili vd., 2010; Zlabinger vd., 2019).

PAN3, mRNA degradasyonunda görev alarak mRNA'nın poli(A) kuyruklarını kısaltan bir kompleks oluşturur. PAN3'ün, miRNA kaynaklı susturma kompleksindeki GW182 proteiniyle kurulan etkileşim aracılığıyla belirli transkriptlerde yer alabileceği de bildirilmiştir (Braun vd., 2011; Christie vd., 2013).

Sunulan tez çalışmasında gruplar arasında anlamlı ifade değişimi bulunan miRNA'ların köpeklerde farklı çalışmalarda da anlamlı değişimler sergilediği gösterilmiş ve tanısal ve prognostik potansiyelleri ortaya konulmuştur. İdiyopatik epilepsili köpeklerde yapılan bir çalışmada, tedaviye dirençli ve duyarlı gruplar arasında plazma miR-16 seviyelerinde anlamlı farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir (García-Gracia vd., 2024). Köpeklerde inflamatuvar bağırsak hastalığı ile ilgili bir çalışmada, sağlıklı köpeklere kıyasla hasta olan köpeklerde

kolonik mukozada ve serumda miR-16, miR-21 ifadesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Konstantinidis vd., 2020). Köpeklerde oral kaviteden elde edilen malign melanom dokularında miR-16 ve miR-21 ifadelerinin anlamlı şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Ushio vd., 2019). Malign invaziv ürotelyal karsinomlu köpekler üzerinde gerçekleştirilmiş ve miR-16 ifadesinin bu tümörlerde yüksek olduğu tespit edilmiştir (Vinall vd., 2012). Köpeklerde malign meme tümörlerinde yapılan bir çalışmada miR-16'nın köpek duktal karsinomlarında anlamlı bir şekilde aşağı regüle olduğu, buna karşın miR-21'in köpek tübüler papiller karsinomlarında anlamlı bir şekilde yukarı regüle olduğu ortaya konmuştur (Boggs vd., 2008).

Tez çalışmasında, miR-16, miR-21 ve miR-26a'nın kronik stresle ilişkili biyobelirteçler olarak potansiyelleri değerlendirilmiştir. Ancak miRNA'ların biyobelirteç olarak değerlendirilmesi sırasında bazı hususlara dikkat edilmelidir. Duyarlılık ve özgüllük biyobelirteçlerin temel özelliklerindendir. Duyarlılık hastalık varlığında pozitif sonuç olarak tanımlanırken, özgüllük ise hastalık yokluğunda negatif sonuç anlamına gelmektedir. miRNA'ların yüksek duyarlılığını ve özgüllüğünü bildiren bazı çalışmalar vardır (Nappi vd., 2019) Ancak bununla birlikte, organizma herhangi bir patolojiye spesifik olmayan bir yanıt verebilir ve bu da özgüllüğü riske atmaktadır. Örneğin, miRNA-20a, miRNA-21, miRNA-155 ve miRNA-126 seviyesi çok sayıda patolojide değiştiği bildirilmiştir ve bu da onların spesifik biyobelirteçler olarak değerlendirilmesinde soru işaretlerine sebep olmaktadır (Backes vd., 2016). Sunulan tez çalışmasında gruplar arasında anlamlı farklılıklara sahip olan miRNA-21'in ifade seviyelerinin 29 farklı hastalıkta değiştiği gösterilmiştir (Jenike ve Halushka, 2021). Bu durum belirli bir hastalığa özgüllüğün olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, bir miRNA biyobelirteci seçerken, bu miRNA'nın diğer patolojilerdeki ifadesi dikkate alınmalıdır.

Cinsiyetin miR-16, miR-21 ve miR-26 ifadesi üzerindeki etkisi incelendiğinde erkek ve dişi köpekler arasında miRNA'ların ifade seviyelerinde anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Ayrıca, deney grupları (kontrol ve stres) ile cinsiyet arasındaki etkileşim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç, zaman içinde gözlenen miRNA ifade düzeyi değişiminin cinsiyete göre farklılaşmadığını, başka bir deyişle, miRNA seviyelerindeki değişim eğiliminin dişiler ve erkekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ayrıma yol açmadığını göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasında, kontrol ve stres grupları arasında, RT-qPCR analizleri sonucunda miR-144 için kontrol grubundan altı köpekte 32-36 aralığında değişen Cq değerleri

elde edilirken stres grubunda miR-144 için Cq değerleri elde edilememiştir. Bu durum, ilgili miRNA'nın bazı köpeklerin örneklerinde alışmamasıyla, ancak diğer köpeklerin örneklerinde başarılı bir şekilde amplifikasyon göstermesiyle dikkat çekmiştir. İlgili miRNA'nın bazı köpeklerde amplifikasyon göstermemesinin, biyolojik varyasyon, düşük hedef RNA konsantrasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, miR-144 analiz kapsamı dışında bırakılmış ve yalnızca tüm örneklerde güvenilir sonuçlar veren miRNA'lar değerlendirmeye alınmıştır. Bu durum, çalışmanın genel sonuçlarının doğruluğunu ve güvenilirliğini koruma amacıyla gerçekleştirilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kronik stresin fizyolojik, psikolojik ve davranış üzerine önemli etkileri olduğu insanlar da dahil birçok türde iyi bilinmektedir. Organizmanın iç dengesini tehdit eden bu etkene verilen yanıt, çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmaların rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Yapılan çalışmalar sonucunda stres reaksiyonlarının epigenetik regülasyonunda miRNA'ların önemli bir rol oynadığının belirlenmesi (Leung ve Sharp, 2010), miRNA'ların tüm vücut sıvılarında bulunmaları (Michael vd., 2010), invaziv olmayan yollarla elde edilebilmeleri (Wiegand vd., 2017) ve çeşitli etkilere bağlı olarak ifade profillerinde farklılıklar meydana gelmesi (Laterza vd., 2009) stresle ilgili çalışmalarda miRNA'ların araştırılmasını değerli kılmaktadır.

Bu tez kapsamında ilk kez, köpeklerde kronik stres koşullarında tükürük miRNA ifadeleri incelenmiştir. İş köpeklerinin kullanıldığı bu çalışmada köpeklerin 14-20 haftalık eğitimlerinden önce ve sonra tükürük örnekleri alınarak örneklem oluşturulmuştur. Bu gruplar arasında miRNA ifadeleri ve kortizol seviyeleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar gruplar arasında miR-16, miR-21 ve miR-26 ifade seviyelerinde anlamlı bir artış olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle miR-16, ifade düzeyindeki belirgin artış ve çeşitli biyolojik mekanizmalardaki rolleri sebebiyle dikkat çekmektedir. Bununla beraber tükürük kortizol seviyelerinde anlamlı bir fark elde edilememiştir. Stresin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan kortizol seviyesinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmamasına rağmen miRNA ifadelerinde güçlü farklar gözlenmesi dikkat çekicidir. Bu bulgular, mevcut literatürdeki kortizol bilgileri de göz önüne alındığında sirküler miRNA'ların özellikle sunulan çalışma materyali de olan non-invaziv bir metotla elde edilebilen tükürük miRNA'larının potansiyel biyobelirteç olabilirliğini dikkat çekici kılmaktadır. miRNA'ların türler arasında yüksek düzeyde homoloji göstermesi, proteine özgü antikorlara ve türe özgü ilişkilendirmelere gerek kalmadan kolayca tespit edilebilmesi nedeniyle sağlık koşullarına ve hayvan refahına genel ve aynı zamanda derinlemesine bir bakış sağlayabilecek önemli bir moleküler çalışma alanı olduğu belirtilmektedir (Miretti vd., 2020). Bununla birlikte tez çalışmasında kortizol seviyelerinde gruplar arasında ve miRNA ifadeleri ile anlamlı bir ilişkinin bulunmaması, stresin biyokimyasal belirteçlerle sınırlı kalmadan, epigenetik biyobelirteçlerle de kapsamlı bir biçimde ele alınması gerektiğini vurgulamaktadır. Tez çalışması kapsamında elde edilen bilgilerin ışığında, farklı ırk ve stres düzeylerini kapsayacak şekilde daha geniş örneklem büyüklükleriyle ve mikrodizin, yeni nesil sekanslama gibi daha geniş teknikler ile çalışılarak bu konuya daha derin bakış açısı sağlanacağı ve elde edilecek bulguların güvenilirliği ve genellenebilirliği açısından büyük önem taşıyacağı

düşünülmektedir. Ayrıca miRNA'ların evrimsel olarak korunmuş olmaları ve türler arasında gösterdikleri yüksek homoloji, çalışmadan elde edilen bulguların farklı türlerde de uygulanabilmesine yönelik transkripsiyonel araştırmalara katkı sağlayabilecektir.

Sunulan tez çalışması köpeklerde kronik stresin epigenetik, fizyolojik ve davranışsal verilerle bir bütün olarak incelenmesine olanak sağlayarak bu alandaki bilgilere anlamlı bir katkıda bulunmaktadır. Elde edilen bu veriler, kronik stresin köpeklerde sadece davranışsal veya fizyolojik tepkilerle sınırlı kalmayıp, miRNA ifadelerinde de değişikliklere sebep olduğunu destekler niteliktedir. Stres ilişkili miRNA'ların varlığı ve bunların ifade profillerindeki değişimlerin belirlenmesi, kronik stresin mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına, veteriner bilimleri ve hayvan refahı başta olmak üzere çok çeşitli alanlarda multidisipliner araştırmaların oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

Doğal afetler, toplumdaki dezavantajlı bireylerin ihtiyaçları, sınır güvenliği, terör gibi siyasi dinamikler uzman iş köpeklerine yönelik talebin artış sebepleri arasında gösterilebilir. Ancak bu artış, beraberinde nitelikli eğitmen eksikliği, uygun barınma ve bakım koşulları, etik sorumluluklar gibi sorunları da gün yüzüne çıkarmaktadır. Etik açıdan bakıldığında, köpeklerin refahı ve insanlara hizmet etme kapasitesi arasındaki dengenin de korunması son derece önemlidir. İş köpeklerini seçme, eğitme ve görevlendirmenin yüksek maliyetleri göz önüne alındığında, iş köpeklerini eğitmekle ilgilenen kurumların karşı karşıya olduğu en önemli sorun, davranışlardaki varyasyonu deneysel olarak ölçmek ve davranışlardaki farklılıkların çalışma ortamlarında sonraki performansı nasıl öngördüğünü anlamaktır (Sinn vd., 2010). İş köpeklerinin farklı alanlardaki görevleri, onları yoğun insan etkileşimi ve kalabalık ortamlara maruz bırakmaktadır. Bu tür ortamlarda bulunmak, köpekler açısından zihinsel ve duygusal bakımdan yıpratıcı olabilir. Örneğin, kalabalık alanlarda patlayıcı madde arayan bir polis köpeği hem yüksek seslere hem de sürekli değişen görsel ve koku uyarıcılarına maruz kalmaktadır. Benzer şekilde terapi köpekleri, birden fazla birey ile etkileşim kurduklarında, farklı duygu durumları olan insanlarla sürekli temas halinde oldukları için strese neden olabilecek çoklu uyaranlarla karşılaşır. Bunun yanında, bu köpeklerin fiziksel ve zihinsel olarak zorlu görevleri yerine getirmeleri beklenmektedir. Bu süreç, köpeğin hem bedensel hem de zihinsel enerjisini büyük ölçüde tüketir. İş köpeklerinin stres nedeniyle bilişsel ve davranışsal süreçlerinin etkilenmesi, görevlerini yerine getirme kabiliyetlerini sınırlandırabilir ve bu durum, iş köpeklerinin verimliliği ve görev başarısını doğrudan etkileyebilir. Bu bağlamda, stresin öğrenme ve hafıza süreçlerini olumsuz etkilediği göz önüne alındığında, iş köpeklerinin stresle başa çıkma mekanizmalarının güçlendirilmesi ve stres

kaynaklarının azaltılmasına yönelik stratejiler geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu kapsamda sunulan tez çalışmasının da sonuçları göz önüne alındığında, köpeklerin stres değerlendirmeleri için daha güvenilir biyobelirteçlerin araştırılması önem arz etmektedir. miRNA'ların duyarlılık ve özgüllüğünü artırmayı hedefleyen çok parametrelili biyobelirteç panellerinin oluşturulması, stresin erken teşhisinde daha güvenilir ve hassas ölçüm imkanı sunacaktır.

Uzman iş köpeklerine artan ihtiyaç, günümüzün karmaşık toplumsal ve siyasi gereksinimlerinin bir yansıması olarak değerlendirilebilir. Rehberlik, terapi, güvenlik ve arama-kurtarma gibi farklı alanlarda hizmet veren bu köpekler; bireylerin yaşam kalitesini yükseltmekle kalmaz, aynı zamanda toplumsal dayanışmayı ve güvenlik hissini artırmaktadır (Bray vd., 2021). Bu köpeklerin eğitim ve bakım süreçlerinin titizlikle yürütülmesi, köpeklerin fiziksel ve psikolojik sağlığının korunması bu alandaki ilerlemenin sürdürülmesi için kritiktir. Uzman iş köpekleri hem bireysel hem de toplumsal düzeyde sağladığı faydalar nedeniyle gelecekte de giderek önem kazanmaya devam edecektir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, A., Gupta, S. & Sharma, R.K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Agnew-Blais, J. and Danese, A. (2016). Childhood maltreatment and unfavourable clinical outcomes in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(4), 342-349. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00544-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00544-1)
- Almey, H. and Nicklin, S. (1996). How does your dog smell. *A review of canine olfaction. J. Defence Sci*, 1, 345-352.
- Alves, J.C.A., Jorge, P.I.F. & dos Santos, A.M.M.P. (2022). A survey on the orthopedic and functional assessment in a Portuguese population of police working dogs. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03221-8>
- Alzuri, S.E., Rosas, N.M., Hlavacova, N., Jezova, D. & Fuchsova, B. (2023). Role of miR-124-3p in regulatory mechanisms of Gpm6a expression in the hippocampus of chronically stressed rats. *Journal of Neurochemistry*, 165(4), 603-621. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jnc.15810>
- Androulakis, I.P. (2021). Circadian rhythms and the HPA axis: A systems view. *WIREs Mechanisms of Disease*, 13(4), e1518. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wsbm.1518>
- Backes, C., Meese, E. & Keller, A. (2016). Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 20(6), 509-518. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0221-4>
- Baggish, A.L., Hale, A., Weiner, R.B., Lewis, G.D., Systrom, D., Wang, F., Wang, T.J. & Chan, S.Y. (2011). Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *The Journal of Physiology*, 589(16), 3983-3994. <https://doi.org/https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.213363>
- Balakathiresan, N.S., Chandran, R., Bhomia, M., Jia, M., Li, H. & Maheshwari, R.K. (2014). Serum and amygdala microRNA signatures of posttraumatic stress: Fear correlation and biomarker potential. *Journal of Psychiatric Research*, 57, 65-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.05.020>
- Barbosa, A.C., Kim, M.S., Ertunc, M., Adachi, M., Nelson, E.D., McAnally, J., Richardson, J.A., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., Bassel-Duby, R. & Olson, E.N. (2008). MEF2C, a transcription factor that facilitates learning and memory by negative regulation of synapse numbers and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(27), 9391-9396. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802679105>
- Barceló, M., Castells, M., Bassas, L., Vigués, F. & Larriba, S. (2019). Semen miRNAs Contained in Exosomes as Non-Invasive Biomarkers for Prostate Cancer Diagnosis. *Scientific Reports*, 9(1), 13772. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50172-6>
- Barker, S.B., Knisely, J.S., McCain, N.L. & Best, A.M. (2005). Measuring Stress and Immune Response in Healthcare Professionals following Interaction with a Therapy Dog: A Pilot Study. *Psychological Reports*, 96(3), 713-729. <https://doi.org/10.2466/pr0.96.3.713-729>
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>

- Batt, L.S., Batt, M.S., Baguley, J.A. & McGreevy, P.D. (2009). The relationships between motor lateralization, salivary cortisol concentrations and behavior in dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 4(6), 216-222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jveb.2009.02.001>
- Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.-M. & Kellermann, O. (2010). MiR-16 Targets the Serotonin Transporter: A New Facet for Adaptive Responses to Antidepressants. *Science*, 329(5998), 1537-1541. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1193692>
- Beech, R.D., Leffert, J.J., Lin, A., Hong, K.A., Hansen, J., Umlauf, S., Mane, S., Zhao, H. and Sinha, R. (2014), Stress-Related Alcohol Consumption in Heavy Drinkers Correlates with Expression of miR-10a, miR-21, and Components of the TAR-RNA-Binding Protein-Associated Complex. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(11), 2743-2753. <https://doi.org/10.1111/acer.12549>
- Beerda, B., Schilder, M.B.H., Bernadina, W., Van Hooff, J.A.R.A.M., De Vries, H.W. & Mol, J.A. (1999). Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. II. Hormonal and Immunological Responses. *Physiology & Behavior*, 66(2), 243-254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00290-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00290-X)
- Bellumori, T.P., Famula, T.R., Bannasch, D.L., Belanger, J.M. & Oberbauer, A.M. (2013). Prevalence of inherited disorders among mixed-breed and purebred dogs: 27,254 cases (1995–2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242(11), 1549-1555. <https://doi.org/10.2460/javma.242.11.1549>
- Bennett, A. and Hayssen, V. (2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology*, 39(3), 171-180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.04.003>
- Bernardo, B.C., Charchar, F.J., Lin, R.C.Y. & McMullen, J.R. (2012). A MicroRNA Guide for Clinicians and Basic Scientists: Background and Experimental Techniques. *Heart, Lung and Circulation*, 21(3), 131-142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hlc.2011.11.002>
- Bodnariu, A. (2008). Indicators of stress and stress assessment in dogs. *Lucr Stiint Med Vet*, 41, 20-26.
- Boggs, R.M., Wright, Z.M., Stickney, M.J., Porter, W.W. & Murphy, K.E. (2008). MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mammalian Genome*, 19(7), 561-569. <https://doi.org/10.1007/s00335-008-9128-7>
- Boolani, A., Channaveerappa, D., Dupree, E.J., Jayathirtha, M., Aslebagh, R., Grobe, S., Wilkinson, T. & Darie, C.C. (2019). Trends in Analysis of Cortisol and Its Derivatives. In A. G. Woods & C. C. Darie (Eds.), *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research* (pp. 649-664). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15950-4_39
- Boyko, A.R., Quignon, P., Li, L., Schoenebeck, J.J., Degenhardt, J.D., Lohmueller, K.E., Zhao, K., Brisbin, A., Parker, H.G., vonHoldt, B.M., Cargill, M., Auton, A., Reynolds, A., Elkahoul, A.G., Castelano, M., Mosher, D.S., Sutter, N.B., Johnson, G.S., Novembre, J., . . . Ostrander, E.A. (2010). A Simple Genetic Architecture Underlies Morphological Variation in Dogs. *PLOS Biology*, 8(8), e1000451. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000451>
- Brady, K., Cracknell, N., Zulch, H. & Mills, D.S. (2018). Factors associated with long-term success in working police dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 207, 67-72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.07.003>
- Braun, Joerg E., Huntzinger, E., Fauser, M. & Izaurralde, E. (2011). GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylase Complexes to miRNA Targets. *Molecular Cell*, 44(1), 120-133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.007>

- Bray, E.E., MacLean, E.L. & Hare, B.A. (2015). Increasing arousal enhances inhibitory control in calm but not excitable dogs. *Animal Cognition*, 18(6), 1317-1329. <https://doi.org/10.1007/s10071-015-0901-1>
- Bray, E.E., Otto, C.M., Udell, M.A.R., Hall, N.J., Johnston, A.M. & MacLean, E.L. (2021). Enhancing the Selection and Performance of Working Dogs [Review]. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.644431>
- Bryan, H.M., Adams, A.G., Invik, R.M., Wynne-Edwards, K.E. & Smits, J.E. (2013). Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 52(2), 189-196.
- Caetano, S., Garcia, A.R., Figueira, I. & Brito, M.A. (2023). MEF2C and miR-194-5p: New Players in Triple Negative Breast Cancer Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*, 24(18). <https://doi.org/10.3390/ijms241814297>
- Caggiu, E., Paulus, K., Mameli, G., Arru, G., Sechi, G.P. & Sechi, L.A. (2018). Differential expression of miRNA 155 and miRNA 146a in Parkinson's disease patients. *eNeurologicalSci*, 13, 1-4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ensci.2018.09.002>
- Califf, R.M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 213-221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Cannon, W.B. (1915). *Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage*. D. Appleton and company.
- Cannon, W.B. (1935). Stress and strains of homeostasis. *Am. J. Med. Sci.*, 189, 1-14. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571980074606878592>
- Casey, R. (2002). Fear and stress. *BSAVA manual of canine and feline behavioural medicine*, 144-153.
- Casey, R.A. and Bradshaw, J.W.S. (2008). The effects of additional socialisation for kittens in a rescue centre on their behaviour and suitability as a pet. *Applied Animal Behaviour Science*, 114(1), 196-205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.01.003>
- Causer, J., Holmes, P.S., Smith, N.C. & Williams, A.M. (2011). Anxiety, movement kinematics, and visual attention in elite-level performers. *Emotion*, 11(3), 595.
- Charmandari, E., Tsigos, C. & Chrousos, G. (2005). ENDOCRINOLOGY OF THE STRESS RESPONSE1. *Annual Review of Physiology*, 67(Volume 67, 2005), 259-284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>
- Chaudhuri, A. (2019). Pathophysiology of stress: a review. *International Journal of Research and Review*, 6(5), 199-213.
- Chen, F.L., Zimmermann, M., Hekman, J.P., Lord, K.A., Logan, B., Russenberger, J., Leighton, E.A. & Karlsson, E.K. (2021). Advancing Genetic Selection and Behavioral Genomics of Working Dogs Through Collaborative Science [Review]. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.662429>
- Chen, S., Lu, C., Lin, S., Sun, C., Wen, Z., Ge, Z., Chen, W., Li, Y., Zhang, P., Wu, Y., Wang, W., Zhou, H., Li, X., Lai, Y. & Li, H. (2024). A panel based on three-miRNAs as diagnostic biomarker for prostate cancer [Original Research]. *Frontiers in Genetics*, 15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2024.1371441>
- Chen, Y., Min, L., Ren, C., Xu, X., Yang, J., Sun, X., Wang, T., Wang, F., Sun, C. & Zhang, X. (2017). miRNA-148a serves as a prognostic factor and suppresses migration and invasion through

- Wnt1 in non-small cell lung cancer. *PLOS ONE*, 12(2), e0171751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171751>
- Chmelíková, E., Bolechová, P., Chaloupková, H., Svobodová, I., Jovičić, M. & Sedmíková, M. (2020). Salivary cortisol as a marker of acute stress in dogs: a review. *Domestic Animal Endocrinology*, 72, 106428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106428>
- Christie, M., Boland, A., Huntzinger, E., Weichenrieder, O. & Izaurralde, E. (2013). Structure of the PAN3 Pseudokinase Reveals the Basis for Interactions with the PAN2 Deadenylation and the GW182 Proteins. *Molecular Cell*, 51(3), 360-373. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.011>
- Chrousos, G.P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374-381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
- Chrousos, G.P. and Gold, P.W. (1992). The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *JAMA*, 267(9), 1244-1252. <https://doi.org/10.1001/jama.1992.03480090092034>
- Chrousos, G.P. and Tsigos, C. (2006). *Stress, obesity, and metabolic syndrome*. Blackwell Pub. on behalf of the New York Academy of Sciences.
- Chu, B., Marwaha, K., Sanvictores, T., Awosika, A.O. & Ayers, D. (2024). Physiology, stress reaction. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Collins, R.E. and Cheng, X. (2006). Structural and biochemical advances in mammalian RNAi. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(5), 1251-1266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcb.21069>
- Coppola, C.L., Grandin, T. & Enns, R.M. (2006). Human interaction and cortisol: Can human contact reduce stress for shelter dogs? *Physiology & Behavior*, 87(3), 537-541. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.12.001>
- Cornwell, B.R., Mueller, S.C., Kaplan, R., Grillon, C. & Ernst, M. (2012). Anxiety, a benefit and detriment to cognition: Behavioral and magnetoencephalographic evidence from a mixed-saccade task. *Brain and Cognition*, 78(3), 257-267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bandc.2012.01.002>
- Darwin, C. (1872). *The expression of the emotions in man and animals*. John Murray.
- Davis, M.T., Holmes, S.E., Pietrzak, R.H. & Esterlis, I. (2017). Neurobiology of Chronic Stress-Related Psychiatric Disorders: Evidence from Molecular Imaging Studies. *Chronic Stress*, 1, 2470547017710916. <https://doi.org/10.1177/2470547017710916>
- Davis-Dusenbery, B.N. and Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *The Journal of Biochemistry*, 148(4), 381-392. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq096>
- Dayas, C.V., Buller, K.M., Crane, J.W., Xu, Y. & Day, T.A. (2001). Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *European Journal of Neuroscience*, 14(7), 1143-1152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01733.x>
- Dellago, H., Preschitz-Kammerhofer, B., Terlecki-Zaniewicz, L., Schreiner, C., Fortschegger, K., Chang, M.W.-F., Hackl, M., Monteforte, R., Kühnel, H., Schosserer, M., Gruber, F., Tschachler, E., Scheideler, M., Grillari-Voglauer, R., Grillari, J. & Wieser, M. (2013). High levels of oncomiR-21 contribute to the senescence-induced growth arrest in normal human cells and its knock-down increases the replicative lifespan. *Aging Cell*, 12(3), 446-458. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/accel.12069>

- Denham, H.D.C., Bradshaw, J.W.S. & Rooney, N.J. (2014). Repetitive behaviour in kennelled domestic dog: Stereotypical or not? *Physiology & Behavior*, 128, 288-294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.007>
- Dill, H., Linder, B., Fehr, A. & Fischer, U. (2012). Intronic miR-26b controls neuronal differentiation by repressing its host transcript, ctdsp2. *Genes & development*, 26(1), 25-30.
- Dimsdale, J.E. (2008). Psychological Stress and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(13), 1237-1246. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.12.024>
- Dreschel, N.A. (2010). The effects of fear and anxiety on health and lifespan in pet dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 125(3), 157-162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.04.003>
- Early, J.B., Arnott, E.A., Mascord, L.J., van Rooy, D., McGreevy, P.D. & Wade, C.M. (2018). Work-type influences perceived livestock herding success in Australian Working Kelpies. *Canine Genetics and Epidemiology*, 5(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40575-018-0063-y>
- Elshafie, N.O., Nascimento, N.C.d., Lichti, N.I., Kasinski, A.L., Childress, M.O. & Santos, A.P.d. (2021). MicroRNA Biomarkers in Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 58(1), 34-41. <https://doi.org/10.1177/0300985820967902>
- Evans, R.I., Herbold, J.R., Bradshaw, B.S. & Moore, G.E. (2007). Causes for discharge of military working dogs from service: 268 cases (2000–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231(8), 1215-1220. <https://doi.org/10.2460/javma.231.8.1215>
- Ewbank, R. (1985). Behavioral Responses to Stress in Farm Animals. In G. P. Moberg (Ed.), *Animal Stress* (pp. 71-79). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7544-6_5
- FDA-NIH, B.W.G. (2016). *BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource*. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/
- Federenko, I.S., Nagamine, M., Hellhammer, D.H., Wadhwa, P.D. & Wüst, S. (2004). The Heritability of Hypothalamus Pituitary Adrenal Axis Responses to Psychosocial Stress Is Context Dependent. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(12), 6244-6250. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0981>
- Flynt, A.S., Thatcher, E.J., Burkewitz, K., Li, N., Liu, Y. & Patton, J.G. (2009). miR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos. *Journal of Cell Biology*, 185(1), 115-127. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807026>
- Fraser, D., Fraser, A.F. & Ritchie, J.S.D. (1975). The Term “Stress” in a Veterinary Context. *British Veterinary Journal*, 131(6), 653-662. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)35136-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)35136-9)
- Friend, T.H. (1991). Behavioral Aspects of Stress1. *Journal of Dairy Science*, 74(1), 292-303. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78173-3](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78173-3)
- Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K. & Iba, H. (2008). miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 378(3), 492-504. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.015>
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. & Illei, G.G. (2012). The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *PLOS ONE*, 7(3), e30679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030679>

- García-Gracia, M., Moreno-Martinez, L., Hernaiz, A., Usón, S., Moral, J., Sanz-Rubio, D., Zaragoza, P., Palacio, J., Rosado, B., Osta, R., García-Belenguer, S. & Martín Burriel, I. (2024). Analysis of Plasma-Derived Exosomal MicroRNAs as Potential Biomarkers for Canine Idiopathic Epilepsy. *Animals*, 14(2), 252. <https://www.mdpi.com/2076-2615/14/2/252>
- Gidron, Y., De Zwaan, M., Quint, K. & Ocker, M. (2010). Influence of stress and health-behaviour on miRNA expression. *Mol Med Rep*, 3(3), 455-457. https://doi.org/10.3892/mmr_00000279
- Gilad, S., Meiri, E., Yagev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholakh, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y. & Chajut, A. (2008). Serum MicroRNAs Are Promising Novel Biomarkers. *PLOS ONE*, 3(9), e3148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003148>
- Godoy, L.D., Rossignoli, M.T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N. & de Lima Umeoka, E.H. (2018). A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications [Review]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127>
- Goldberger, E. and Rapoport, J. (1991). Canine acral lick dermatitis: response to the antiobsessional drug clomipramine.
- Gow, R., Thomson, S., Rieder, M., Van Uum, S. & Koren, G. (2010). An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Science International*, 196(1), 32-37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.040>
- Graham, L.T. and Gosling, S.D. (2009). Temperament and personality in working dogs. *Canine Ergonomics: The Science of Working Dogs*. CRC Press, New York, 63-81.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A. & Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_1), D140-D144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj112>
- Guelfi, G., Iaboni, M., Sansone, A., Capaccia, C., Santoro, M.M. & Diverio, S. (2022). Extracellular circulating miRNAs as stress-related signature to search and rescue dogs. *Scientific Reports*, 12(1), 3213. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07131-5>
- Gunter, L.M., Barber, R.T. & Wynne, C.D.L. (2018). A canine identity crisis: Genetic breed heritage testing of shelter dogs. *PLOS ONE*, 13(8), e0202633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202633>
- Gupta, S.K., Bang, C. & Thum, T. (2010). Circulating MicroRNAs as Biomarkers and Potential Paracrine Mediators of Cardiovascular Disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 3(5), 484-488. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.958363>
- Ha, M. and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509-524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A.-C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G.S., Dewell, S., Zavolan, M. & Tuschl, T. (2010). Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell*, 141(1), 129-141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.009>
- Hall, N.J., Johnston, A.M., Bray, E.E., Otto, C.M., MacLean, E.L. & Udell, M.A.R. (2021). Working dog training for the twenty-first century. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 646022.

- Haramati, S., Navon, I., Issler, O., Ezra-Nevo, G., Gil, S., Zwang, R., Hornstein, E. & Chen, A. (2011). microRNA as Repressors of Stress-Induced Anxiety: The Case of Amygdalar miR-34. *The Journal of Neuroscience*, 31(40), 14191-14203. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1673-11.2011>
- Harris, L., Genovesi, L.A., Gronostajski, R.M., Wainwright, B.J. & Piper, M. (2015). Nuclear factor one transcription factors: Divergent functions in developmental versus adult stem cell populations. *Developmental Dynamics*, 244(3), 227-238. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24182>
- Hashimi, S.T., Fulcher, J.A., Chang, M.H., Gov, L., Wang, S. & Lee, B. (2009). MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood*, 114(2), 404-414. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-179150>
- Haverbeke, A., Diederich, C., Depiereux, E. & Giffroy, J.M. (2008). Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. *Physiology & Behavior*, 93(1), 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.07.014>
- Hawley, W.R., Grissom, E.M. & Dohanich, G.P. (2011). The relationships between trait anxiety, place recognition memory, and learning strategy. *Behavioural Brain Research*, 216(2), 525-530. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.028>
- He, L. and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522-531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
- He, Y., Li, W., Tian, Y., Chen, X., Cheng, K., Xu, K., Li, C., Wang, H., Qu, C., Wang, C., Li, P., Chen, H. & Xie, P. (2018). iTRAQ-based proteomics suggests LRP6, NPY and NPY2R perturbation in the hippocampus involved in CSDS may induce resilience and susceptibility. *Life Sciences*, 211, 102-117. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.016>
- Heberlein, M.T.E., Turner, D.C. & Manser, M.B. (2017). Dogs' (Canis familiaris) attention to human perception: Influence of breed groups and life experiences. *Journal of Comparative Psychology*, 131(1), 19-29. <https://doi.org/10.1037/com0000050>
- Hébert, S.S. and De Strooper, B. (2009). Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences*, 32(4), 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.12.003>
- Hellhammer, D.H., Wüst, S. & Kudielka, B.M. (2009). Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, 34(2), 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.026>
- Helton, W.S. (2009). *Canine Ergonomics: The Science of Working Dpgs (1st ed.)*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420079920>
- Higuchi, F., Uchida, S., Yamagata, H., Abe-Higuchi, N., Hobara, T., Hara, K., Kobayashi, A., Shintaku, T., Itoh, Y., Suzuki, T. & Watanabe, Y. (2016). Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 36(27), 7253. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0319-16.2016>
- Holtzman, C.W., Trotman, H.D., Goulding, S.M., Ryan, A.T., MacDonald, A.N., Shapiro, D.I., Brasfield, J.L. & Walker, E.F. (2013). Stress and neurodevelopmental processes in the emergence of psychosis. *Neuroscience*, 249, 172-191. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.017>
- Honda, M., Kuwano, Y., Katsuura-Kamano, S., Kamezaki, Y., Fujita, K., Akaike, Y., Kano, S., Nishida, K., Masuda, K. & Rokutan, K. (2013). Chronic Academic Stress Increases a Group of

microRNAs in Peripheral Blood. *PLOS ONE*, 8(10), e75960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075960>

- Hong, Y., Hu, J., Zhang, S., Liu, J., Yan, F., Yang, H. & Hu, H. (2024). Integrative analysis identifies region- and sex-specific gene networks and *Mef2c* as a mediator of anxiety-like behavior. *Cell Reports*, 43(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114455>
- Horwitz, D. and Mills, D. (2009). *BSAVA manual of canine and feline behavioural medicine*. University of Lincoln.
- Hsu, Y. and Serpell, J.A. (2003). Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(9), 1293-1300.
- Hu, D., Wan, L., Chen, M., Caudle, Y., LeSage, G., Li, Q. & Yin, D. (2014). Essential role of IL-10/STAT3 in chronic stress-induced immune suppression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 36, 118-127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.10.016>
- Huang, J., Gao, G., Ge, Y., Liu, J., Cui, H., Zheng, R., Wang, J., Wang, S., Go, V.L., Hu, S., Liu, Y., Yang, M., Sun, Y., Shang, D., Tian, Y., Zhang, Z., Xiang, Z., Wang, H., Guo, J. & Xiao, G.G. (2024). Development of a Serum-Based MicroRNA Signature for Early Detection of Pancreatic Cancer: A Multicenter Cohort Study. *Digestive Diseases and Sciences*, 69(4), 1263-1273. <https://doi.org/10.1007/s10620-024-08338-4>
- Hunsberger, J.G., Austin, D.R., Chen, G. & Manji, H.K. (2009). MicroRNAs in Mental Health: From Biological Underpinnings to Potential Therapies. *NeuroMolecular Medicine*, 11(3), 173-182. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8070-5>
- Hunter, R.G., Gagnidze, K., McEwen, B.S. & Pfaff, D.W. (2015). Stress and the dynamic genome: Steroids, epigenetics, and the transposome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), 6828-6833. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411260111>
- Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 99-110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33(3), 245-254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>
- Jenike, A.E. and Halushka, M.K. (2021). miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomarker Research*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00272-1>
- Jeong, Y.-K., Oh, Y.-I., Song, K.-H. & Seo, K.W. (2020). Evaluation of salivary vasopressin as an acute stress biomarker in healthy dogs with stress due to noise and environmental challenges. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 331. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02555-5>
- Kan, J.-Y., Shih, S.-L., Yang, S.-F., Chu, P.-Y., Chen, F.-M., Li, C.-L., Wu, Y.-C., Yeh, Y.-T., Hou, M.-F. & Chiang, C.-P. (2024). Exosomal microRNA-92b Is a Diagnostic Biomarker in Breast Cancer and Targets Survival-Related MTSS1L to Promote Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1295. <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/2/1295>
- Kangsamaksin, T., Murtomaki, A., Kofler, N.M., Cuervo, H., Chaudhri, R.A., Tattersall, I.W., Rosenstiel, P.E., Shawber, C.J. & Kitajewski, J. (2015). NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth. *Cancer Discov*, 5(2), 182-197. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-14-0650>

- Kapoor, R., So, J.B.Y., Zhu, F., Too, H.-P., Yeoh, K.-G. & Yoong, J.S.-Y. (2020). Evaluating the Use of microRNA Blood Tests for Gastric Cancer Screening in a Stratified Population-Level Screening Program: An Early Model-Based Cost-Effectiveness Analysis. *Value in Health*, 23(9), 1171-1179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jval.2020.04.1829>
- Katsuura, S., Kuwano, Y., Yamagishi, N., Kurokawa, K., Kajita, K., Akaike, Y., Nishida, K., Masuda, K., Tanahashi, T. & Rokutan, K. (2012). MicroRNAs miR-144/144* and miR-16 in peripheral blood are potential biomarkers for naturalistic stress in healthy Japanese medical students. *Neuroscience Letters*, 516(1), 79-84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.062>
- Kaur, J., Seshadri, S., Golla, K.H. & Sampara, P. (2022). Efficacy and safety of standardized Ashwagandha (*Withania somnifera*) root extract on reducing stress and anxiety in domestic dogs: A randomized controlled trial. *Journal of Veterinary Behavior*, 51, 8-15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jveb.2022.03.002>
- Kendler, K.S., Karkowski, L.M. & Prescott, C.A. (1999). Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression. *American Journal of Psychiatry*, 156(6), 837-841. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.6.837>
- Kim, V.N., Han, J. & Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126-139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>
- Konno, A., Romero, T., Inoue-Murayama, M., Saito, A. & Hasegawa, T. (2016). Dog Breed Differences in Visual Communication with Humans. *PLOS ONE*, 11(10), e0164760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164760>
- Konstantinidis, A.O., Pardali, D., Adamama-Moraitou, K.K., Gazouli, M., Dovas, C.I., Legaki, E., Brellou, G.D., Savvas, I., Jergens, A.E., Rallis, T.S. & Allenspach, K. (2020). Colonic mucosal and serum expression of microRNAs in canine large intestinal inflammatory bowel disease. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02287-6>
- Krajewska, J.B., Fichna, J. & Mosińska, P. (2018). One step ahead: miRNA-34 in colon cancer-future diagnostic and therapeutic tool? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 132, 1-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.09.006>
- Kroh, E.M., Parkin, R.K., Mitchell, P.S. & Tewari, M. (2010). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50(4), 298-301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.032>
- Kumar, R., Kalra, P. & Lall, A.K. (2018, 2018//). Mental Fatigue Quantification by Physiological and Neurophysiological Techniques: An Overview. *Ergonomics in Caring for People*, Singapore.
- Kyrou, I., Chrousos, G.P. & Tsigos, C. (2006). Stress, Visceral Obesity, and Metabolic Complications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1083(1), 77-110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1196/annals.1367.008>
- Kyrou, I. and Tsigos, C. (2007). Stress Mechanisms and Metabolic Complications. *Horm Metab Res*, 39(06), 430-438. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981462>
- Kyrou, I. and Tsigos, C. (2009). Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(6), 787-793. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.08.007>
- Laterza, O.F., Lim, L., Garrett-Engle, P.W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W.K., Johnson, J.M., Sina, J.F., Fare, T.L., Sistare, F.D. & Glaab, W.E. (2009). Plasma MicroRNAs as Sensitive and

Specific Biomarkers of Tissue Injury. *Clinical Chemistry*, 55(11), 1977-1983. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.131797>

- Launay, J.M., Mouillet-Richard, S., Baudry, A., Pietri, M. & Kellermann, O. (2011). Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Translational Psychiatry*, 1(11), e56-e56. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.54>
- Lawrie, C.H., Soneji, S., Marafioti, T., Cooper, C.D.O., Palazzo, S., Paterson, J.C., Cattani, H., Enver, T., Mager, R., Boulwood, J., Wainscoat, J.S. & Hatton, C.S.R. (2007). MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *International Journal of Cancer*, 121(5), 1156-1161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.22800>
- Lazarowski, L., Waggoner, L.P., Krichbaum, S., Singletary, M., Haney, P.S., Rogers, B. & Angle, C. (2020). Selecting Dogs for Explosives Detection: Behavioral Characteristics [Review]. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00597>
- Lecchi, C., Zamarian, V., Gini, C., Avanzini, C., Polloni, A., Rota Nodari, S. & Ceciliani, F. (2020). Salivary microRNAs are potential biomarkers for the accurate and precise identification of inflammatory response after tail docking and castration in piglets. *Journal of animal science*, 98(5), skaa153. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa153>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. & Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. & Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17), 4663-4670-4670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. & Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051-4060-4060. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Leung, A.K.L. and Sharp, P.A. (2010). MicroRNA Functions in Stress Responses. *Molecular Cell*, 40(2), 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.027>
- Li, X., Cassidy, J.J., Reinke, C.A., Fischboeck, S. & Carthew, R.W. (2009). A MicroRNA Imparts Robustness against Environmental Fluctuation during Development. *Cell*, 137(2), 273-282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.058>
- Lin, C.-W., Huang, J.-H., Lin, P.-H., Chen, T.-B., Wang, L.-M., Huang, Y.-C. & Chen, K.-L. (2024). Ultrasensitive miRNA-135a-5p Biochip for Early Alzheimer's Disease Detection Utilizing Magneto-Optical Faraday Effect and Magnetoplasmonic Nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2024.137134>
- Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X.-M., Xu, Y.-M., Huang, L.-F. & Wang, X.-Z. (2015). Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal*, 2015(1), 657086. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2015/657086>
- Lindow, M. and Gorodkin, J. (2007). Principles and Limitations of Computational MicroRNA Gene and Target Finding. *DNA and Cell Biology*, 26(5), 339-351. <https://doi.org/10.1089/dna.2006.0551>
- Lindsay, S.R. (2013). *Handbook of applied dog behavior and training, procedures and protocols* (Vol. 3). John Wiley & Sons.

- Lisowski, P., Wieczorek, M., Goscik, J., Juszczak, G.R., Stankiewicz, A.M., Zwierzchowski, L. & Swiergiel, A.H. (2013). Effects of Chronic Stress on Prefrontal Cortex Transcriptome in Mice Displaying Different Genetic Backgrounds. *Journal of Molecular Neuroscience*, 50(1), 33-57. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9850-1>
- Liu, X., Yuan, L., Chen, F., Zhang, L., Chen, X., Yang, C. & Han, Z. (2017). Circulating miR-208b: A Potentially Sensitive and Reliable Biomarker for the Diagnosis and Prognosis of Acute Myocardial Infarction. *Clinical laboratory*, 63(1), 101-109. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2016.160632>
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Löffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., Stocsits, C., Hackermüller, J., Kretzschmar, A.K., Burger, R., Gramatzki, M., Blumert, C., Bauer, K., Cvijic, H., Ullmann, A.K., Stadler, P.F. & Horn, F. (2007). Interleukin-6-dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*, 110(4), 1330-1333. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-081133>
- Lucassen, P.J., Pruessner, J., Sousa, N., Almeida, O.F.X., Van Dam, A.M., Rajkowska, G., Swaab, D.F. & Czéh, B. (2014). Neuropathology of stress. *Acta Neuropathologica*, 127(1), 109-135. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1223-5>
- Luo, W., Fang, M., Xu, H., Xing, H., Fu, J. & Nie, Q. (2016). Comparison of miRNA expression profiles in pituitary-adrenal axis between Beagle and Chinese Field dogs after chronic stress exposure. *PeerJ*, 4, e1682.
- Maejima, M., Inoue-Murayama, M., Tonosaki, K., Matsuura, N., Kato, S., Saito, Y., Weiss, A., Murayama, Y. & Ito, S.i. (2007). Traits and genotypes may predict the successful training of drug detection dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 107(3), 287-298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.10.005>
- Manenti, I., Viola, I., Ala, U., Cornale, P., Macchi, E., Toschi, P., Martignani, E., Baratta, M. & Miretti, S. (2023). Adaptation Response in Sheep: Ewes in Different Cortisol Clusters Reveal Changes in the Expression of Salivary miRNAs. *Animals*, 13(20).
- Martins-Júnior, H.A., Simas, R.C., Brolio, M.P., Ferreira, C.R., Perecin, F., Nogueira, G.d.P., Miglino, M.A., Martins, D.S., Eberlin, M.N. & Ambrósio, C.E. (2015). Profiles of Steroid Hormones in Canine X-Linked Muscular Dystrophy via Stable Isotope Dilution LC-MS/MS. *PLOS ONE*, 10(5), e0126585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126585>
- Masson, S., Batkai, S., Beermann, J., Bär, C., Pfanne, A., Thum, S., Magnoli, M., Balconi, G., Nicolosi, G.L., Tavazzi, L., Latini, R. & Thum, T. (2018). Circulating microRNA-132 levels improve risk prediction for heart failure hospitalization in patients with chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 20(1), 78-85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejhf.961>
- Matin, F., Jeet, V., Moya, L., Selth, L.A., Chambers, S., Yeadon, T., Saunders, P., Eckert, A., Heathcote, P., Wood, G., Malone, G., Samaratunga, H., Collins, A., Turner, M., Kerr, K., Clements, J.A., Batra, J. & Australian Prostate Cancer, B. (2018). A Plasma Biomarker Panel of Four MicroRNAs for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Scientific Reports*, 8(1), 6653. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24424-w>
- McCartney, J.M. and Leavens, D.A. (2024). The Role of Life History and Familiarity in Performance of Working and Non-Working Dogs (*Canis lupus familiaris*) in a Point-Following Task. *Animals*, 14(4), 573. <https://www.mdpi.com/2076-2615/14/4/573>

- McClelland, A.D. and Kantharidis, P. (2013). microRNA in the development of diabetic complications. *Clinical Science*, 126(2), 95-110. <https://doi.org/10.1042/CS20130079>
- McEwen, B.S. (1998). Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840(1), 33-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x>
- McEwen, B.S. (2004). Protection and Damage from Acute and Chronic Stress: Allostasis and Allostatic Overload and Relevance to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032(1), 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1196/annals.1314.001>
- McEwen, B.S. (2007). Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiological Reviews*, 87(3), 873-904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>
- McEwen, B.S. (2016). In pursuit of resilience: stress, epigenetics, and brain plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1373(1), 56-64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nyas.13020>
- McGuire, A., Brown, J.A.L. & Kerin, M.J. (2015). Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(1), 145-155. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9551-7>
- Medley, J.C., Panzade, G. & Zinovyeva, A.Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *WIREs RNA*, 12(3), e1627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wrna.1627>
- Meerson, A., Cacheaux, L., Goosens, K.A., Sapolsky, R.M., Soreq, H. & Kaufer, D. (2010). Changes in Brain MicroRNAs Contribute to Cholinergic Stress Reactions. *Journal of Molecular Neuroscience*, 40(1), 47-55. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9252-1>
- Mei, B.Y., Song, Liu, Hai; Li, Wei; Liang, Mengya; Chen, Guangxian; Wu, Zongkai. (2019). Mechanism of microRNA-21/JAG1 pathway in chronic atrial fibrillation Beagle model induced by right atrial appendix tachy-pacing. *Chinese Medical Journal*, 132(17). <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2019.09.013>
- Mellor, D.J. and Beausoleil, N.J. (2015). Extending the 'Five Domains' model for animal welfare assessment to incorporate positive welfare states. *Animal Welfare*, 24(3), 241-253. <https://doi.org/10.7120/09627286.24.3.241>
- Meunier, S., Groessl, M., Reusch, C., Boretti, F. & Sieber-Ruckstuhl, N. (2021). Salivary cortisol in healthy dogs: a randomized cross-over study to evaluate different saliva stimulation methods and their effects on saliva volume and cortisol concentration. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02890-1>
- Michael, A., Bajracharya, S.D., Yuen, P.S.T., Zhou, H., Star, R.A., Illei, G.G. & Alevizos, I. (2010). Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases*, 16(1), 34-38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01604.x>
- Mills, D., Karagiannis, C. & Zulch, H. (2014). Stress—Its Effects on Health and Behavior: A Guide for Practitioners. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 44(3), 525-541. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.01.005>
- Miretti, S., Lecchi, C., Ceciliani, F. & Baratta, M. (2020). MicroRNAs as Biomarkers for Animal Health and Welfare in Livestock [Review]. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.578193>

- Miu, A.C., Heilman, R.M. & Houser, D. (2008). Anxiety impairs decision-making: Psychophysiological evidence from an Iowa Gambling Task. *Biological Psychology*, 77(3), 353-358. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2007.11.010>
- Moore, G.E., Burkman, K.D., Carter, M.N. & Peterson, M.R. (2001). Causes of death or reasons for euthanasia in military working dogs: 927 cases (1993–1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(2), 209-214. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.209>
- Mor, E., Cabilly, Y., Goldshmit, Y., Zalts, H., Modai, S., Edry, L., Elroy-Stein, O. & Shomron, N. (2011). Species-specific microRNA roles elucidated following astrocyte activation. *Nucleic Acids Research*, 39(9), 3710-3723. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1325>
- Moreno-Peral, P., Conejo-Cerón, S., Motrico, E., Rodríguez-Morejón, A., Fernández, A., García-Campayo, J., Roca, M., Serrano-Blanco, A., Rubio-Valera, M. & Ángel Bellón, J. (2014). Risk factors for the onset of panic and generalised anxiety disorders in the general adult population: A systematic review of cohort studies. *Journal of Affective Disorders*, 168, 337-348. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.06.021>
- Morrill, K., Hekman, J., Li, X., McClure, J., Logan, B., Goodman, L., Gao, M., Dong, Y., Alonso, M., Carmichael, E., Snyder-Mackler, N., Alonso, J., Noh, H.J., Johnson, J., Koltookian, M., Lieu, C., Megquier, K., Swofford, R., Turner-Maier, J., . . . Karlsson, E.K. (2022). Ancestry-inclusive dog genomics challenges popular breed stereotypes. *Science*, 376(6592), eabk0639. <https://doi.org/doi:10.1126/science.abk0639>
- Nappi, L., Thi, M., Lum, A., Huntsman, D., Eigl, B.J., Martin, C., O'Neil, B., Maughan, B.L., Chi, K., So, A., Black, P.C., Gleave, M., Wyatt, A.W., Lavoie, J.M., Khalaf, D., Bell, R., Daneshmand, S., Hamilton, R.J., Leao, R.R.N., . . . Kollmannsberger, C. (2019). Developing a Highly Specific Biomarker for Germ Cell Malignancies: Plasma miR371 Expression Across the Germ Cell Malignancy Spectrum. *Journal of Clinical Oncology*, 37(33), 3090-3098. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.02057>
- Nelson, R.J. (2005). *An introduction to behavioral endocrinology*, 3rd ed. Sinauer Associates.
- Nestler, E.J. and Hyman, S.E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1161-1169. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>
- Nicolaides, N.C., Kyratzi, E., Lamprokostopoulou, A., Chrousos, G.P. & Charmandari, E. (2014). Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22(1-2), 6-19. <https://doi.org/10.1159/000362736>
- Ogata-Kawata, H., Izumiya, M., Kurioka, D., Honma, Y., Yamada, Y., Furuta, K., Gunji, T., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Watanabe, M., Nakagama, H., Yokota, J., Kohno, T. & Tsuchiya, N. (2014). Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. *PLOS ONE*, 9(4), e92921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092921>
- Olejniczak, M., Kotowska-Zimmer, A. & Krzyzosiak, W. (2018). Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 177-191. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2591-0>
- Orsetti, M., Brisco, F.D., Rinaldi, M., Dallorto, D. & Ghi, P. (2009). Some molecular effectors of antidepressant action of quetiapine revealed by DNA microarray in the frontal cortex of anhedonic rats. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19(8). https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/fulltext/2009/08000/some_molecular_effectors_of_antidepressant_action.4.aspx

- Ou, H., Li, Y. & Kang, M. (2014). Activation of miR-21 by STAT3 Induces Proliferation and Suppresses Apoptosis in Nasopharyngeal Carcinoma by Targeting PTEN Gene. *PLOS ONE*, 9(11), e109929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109929>
- Overmier, J.B. and Seligman, M.E. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63(1), 28-33. <https://doi.org/10.1037/h0024166>
- Palestrini, C., Previde, E.P., Spiezio, C. & Verga, M. (2005). Heart rate and behavioural responses of dogs in the Ainsworth's Strange Situation: A pilot study. *Applied Animal Behaviour Science*, 94(1), 75-88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.02.005>
- Passalacqua, C., Marshall-Pescini, S., Merola, I., Palestrini, C. & Previde, E.P. (2013). Different problem-solving strategies in dogs diagnosed with anxiety-related disorders and control dogs in an unsolvable task paradigm. *Applied Animal Behaviour Science*, 147(1), 139-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.05.003>
- Pećin, M., Lipar, M., Kos, J., Smolec, O., Kreszinger, M. & Stejskal, M. (2017). Breed, gender, age and reproductive status in relation to the predisposition for cranial cruciate ligament rupture in 117 dogs treated by a single surgeon (2010-2015)-a short communication. *Veterinarski arhiv*, 87(6), 783-789.
- Peng, G., Deosthale, P., Pianeta, R., Messersmith, H.M. & Plotkin, L.I. (2024). Sex dimorphic response to osteocyte miR21 deletion in murine calvaria bone as determined by RNAseq analysis. *JBMR Plus*, 8(6), ziae054. <https://doi.org/10.1093/jbmrpl/ziae054>
- Peschansky, V.J. and Wahlestedt, C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*, 9(1), 3-12. <https://doi.org/10.4161/epi.27473>
- Pitulko, V.V. and Kasparov, A.K. (2017). Archaeological dogs from the Early Holocene Zhokhov site in the Eastern Siberian Arctic. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 13, 491-515. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.04.003>
- Ramadan, E.S., Salem, N.Y., Emam, I.A., AbdelKader, N.A., Farghali, H.A. & Khattab, M.S. (2022). MicroRNA-21 expression, serum tumor markers, and immunohistochemistry in canine mammary tumors. *Veterinary Research Communications*, 46(2), 377-388. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09861-9>
- Reddy, K.B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*, 15(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0185-1>
- Regnier, A., Alvinerie, M. & Toutain, P.L. (1988). Clinical Evaluation of Combined Dexamethasone Suppression/ACTH Stimulation Testing in Dogs with Hyperadrenocorticism, using HPLC for Plasma Cortisol Determination. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 35(1-10), 409-416. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1988.tb00053.x>
- Reiche, E.M.V., Nunes, S.O.V. & Morimoto, H.K. (2004). Stress, depression, the immune system, and cancer. *The Lancet Oncology*, 5(10), 617-625. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01597-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01597-9)
- Ren, X., Fan, Y., Shi, D., Xu, E. & Liu, Y. (2022). MicroRNA-124 inhibits canine mammary carcinoma cell proliferation, migration and invasion by targeting CDH2. *Research in Veterinary Science*, 146, 5-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.03.004>
- Righi, C., Menchetti, L., Orlandi, R., Moscati, L., Mancini, S. & Diverio, S. (2019). Welfare Assessment in Shelter Dogs by Using Physiological and Immunological Parameters. *Animals*, 9(6), 340. <https://www.mdpi.com/2076-2615/9/6/340>

- Rinaldi, A., Vincenti, S., De Vito, F., Bozzoni, I., Oliverio, A., Presutti, C., Fragapane, P. & Mele, A. (2010). Stress induces region specific alterations in microRNAs expression in mice. *Behavioural Brain Research*, 208(1), 265-269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.012>
- Robertson, S., MacKenzie, S.M., Alvarez-Madrazo, S., Diver, L.A., Lin, J., Stewart, P.M., Fraser, R., Connell, J.M. & Davies, E. (2013). MicroRNA-24 Is a Novel Regulator of Aldosterone and Cortisol Production in the Human Adrenal Cortex. *Hypertension*, 62(3), 572-578. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01102>
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, 14(10a), 1902-1910.
- Rooney, N.J., Clark, C.C.A. & Casey, R.A. (2016). Minimizing fear and anxiety in working dogs: A review. *Journal of Veterinary Behavior*, 16, 53-64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jveb.2016.11.001>
- Roush, S. and Slack, F.J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, 18(10), 505-516. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M. & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37(5), 589-601. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.009>
- Salgırlı Demirbaş, Y. (2015). Stresin Köpeklerde Davranış Üzerine Etkileri. *Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute*, 3(1), 34-42. <https://dergipark.org.tr/en/pub/maeusabed/issue/19415/206507>
- Sangokoya, C., Telen, M.J. & Chi, J.-T. (2010). microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood*, 116(20), 4338-4348. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214817>
- Schöberl, I., Wedl, M., Beetz, A. & Kotrschal, K. (2017). Psychobiological Factors Affecting Cortisol Variability in Human-Dog Dyads. *PLOS ONE*, 12(2), e0170707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170707>
- Schwabe, L., Tegenthoff, M., Höffken, O. & Wolf, O.T. (2010). Concurrent Glucocorticoid and Noradrenergic Activity Shifts Instrumental Behavior from Goal-Directed to Habitual Control. *The Journal of Neuroscience*, 30(24), 8190. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0734-10.2010>
- Seaward, B.L. (1999). *Managing Stress: Principles and Strategies for Health and Wellbeing*. Jones & Bartlett Publisher.
- Segerstrom, S.C. and Miller, G.E. (2004). Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychological bulletin*, 130(4), 601.
- Selcuklu, S.D., Donoghue, M.T.A., Kerin, M.J. & Spillane, C. (2012). Regulatory interplay between miR-21, JAG1 and 17beta-estradiol (E2) in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(2), 234-239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.074>
- Selye, H. (1946). THE GENERAL ADAPTATION SYNDROME AND THE DISEASES OF ADAPTATION1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 6(2), 117-230. <https://doi.org/10.1210/jcem-6-2-117>

- Selye, H. (1952). Allergy and the General Adaptation Syndrome. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 3(4), 267-278. <https://doi.org/10.1159/000227975>
- Selye, H. (1975). Stress and distress. *Comprehensive therapy*, 1(8), 9-13. <http://europepmc.org/abstract/MED/1222562>
- Selye, H. (1985). The nature of stress. *Basal facts*, 7(1), 3-11. <http://europepmc.org/abstract/MED/2990402>
- Shackman, A.J., Sarinopoulos, I., Maxwell, J.S., Pizzagalli, D.A., Lavric, A. & Davidson, R.J. (2006). Anxiety selectively disrupts visuospatial working memory. *Emotion*, 6(1), 40-61. <https://doi.org/10.1037/1528-3542.6.1.40>
- Shi, B., Ge, F., Cai, L., Yang, Y., Guo, X., Wu, R., Fan, Z., Cao, B., Wang, N., Si, Y., Lin, X., Dong, W. & Sun, H. (2023). Significance of NotchScore and JAG1 in predicting prognosis and immune response of low-grade glioma [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1247288>
- Sinn, D.L., Gosling, S.D. & Hilliard, S. (2010). Personality and performance in military working dogs: Reliability and predictive validity of behavioral tests. *Applied Animal Behaviour Science*, 127(1), 51-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.08.007>
- Small, E.M., Frost, R.J.A. & Olson, E.N. (2010). MicroRNAs Add a New Dimension to Cardiovascular Disease. *Circulation*, 121(8), 1022-1032. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.889048>
- Solich, J., Kolasa, M., Faron-Górecka, A., Pabian, P., Latocha, K., Korlatowicz, A. & Dziedzicka-Wasylewska, M. (2024). Modulating Stress Susceptibility and Resilience: Insights from miRNA Manipulation and Neural Mechanisms in Mice. *Molecular Neurobiology*, 61(9), 6135-6147. <https://doi.org/10.1007/s12035-024-03922-1>
- Song, M.-F., Dong, J.-Z., Wang, Y.-W., He, J., Ju, X., Zhang, L., Zhang, Y.-H., Shi, J.-F. & Lv, Y.-Y. (2015). CSF miR-16 is decreased in major depression patients and its neutralization in rats induces depression-like behaviors via a serotonin transmitter system. *Journal of Affective Disorders*, 178, 25-31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.02.022>
- Squires, E. J. (2010). Effects on animal behaviour, health and welfare. In E. J. Squires editor (Ed.), (pp. 235-272). Wallingford
- Stoffel, M., Gardini, E., Ehrental, Johannes C., Abbruzzese, E. & Ditzen, B. (2020). Evaluation of Stress Management and Stress Prevention Using Epigenetic Markers. *Verhaltenstherapie*, 32(Suppl. 1), 5-13. <https://doi.org/10.1159/000506323>
- Sullivan, C.S. and Ganem, D. (2005). MicroRNAs and Viral Infection. *Molecular Cell*, 20(1), 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.012>
- Szyf, M., McGowan, P. & Meaney, M.J. (2008). The social environment and the epigenome. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49(1), 46-60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/em.20357>
- Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2(8), 569-579. <https://doi.org/10.1038/nri855>
- Tomas, C., Newton, J. & Watson, S. (2013). A Review of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Chronic Fatigue Syndrome. *International Scholarly Research Notices*, 2013(1), 784520. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2013/784520>

- Torres-Berrio, A., Nouel, D., Cuesta, S., Parise, E.M., Restrepo-Lozano, J.M., Larochelle, P., Nestler, E.J. & Flores, C. (2020). MiR-218: a molecular switch and potential biomarker of susceptibility to stress. *Molecular Psychiatry*, 25(5), 951-964. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0421-5>
- Tsujiura, M., Ichikawa, D., Komatsu, S., Shiozaki, A., Takeshita, H., Kosuga, T., Konishi, H., Morimura, R., Deguchi, K., Fujiwara, H., Okamoto, K. & Otsuji, E. (2010). Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *British Journal of Cancer*, 102(7), 1174-1179. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605608>
- Uchida, S., Nishida, A., Hara, K., Kamemoto, T., Suetsugi, M., Fujimoto, M., Watanuki, T., Wakabayashi, Y., Otsuki, K., McEwen, B.S. & Watanabe, Y. (2008). Characterization of the vulnerability to repeated stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. *European Journal of Neuroscience*, 27(9), 2250-2261. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06218.x>
- Ushio, N., Rahman, M.M., Maemura, T., Lai, Y.C., Iwanaga, T., Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Momoi, Y. & Miura, N. (2019). Identification of dysregulated microRNAs in canine malignant melanoma. *Oncol Lett*, 17(1), 1080-1088. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9692>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J. & Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654-659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Valentino, R.J. and Van Bockstaele, E. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *European Journal of Pharmacology*, 583(2), 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.062>
- Veissier, I. and Boissy, A. (2007). Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. *Physiology & Behavior*, 92(3), 429-433. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.11.008>
- Vinall, R.L., Kent, M.S. & deVere White, R.W. (2012). Expression of microRNAs in urinary bladder samples obtained from dogs with grossly normal bladders, inflammatory bladder disease, or transitional cell carcinoma. *American Journal of Veterinary Research*, 73(10), 1626-1633. <https://doi.org/10.2460/ajvr.73.10.1626>
- Vreugdenhil, E., Verissimo, C.S.L., Mariman, R., Kamphorst, J.T., Barbosa, J.S., Zweers, T., Champagne, D.L., Schouten, T., Meijer, O.C., Ron de Kloet, E. & Fitzsimons, C.P. (2009). MicroRNA 18 and 124a Down-Regulate the Glucocorticoid Receptor: Implications for Glucocorticoid Responsiveness in the Brain. *Endocrinology*, 150(5), 2220-2228. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1335>
- Wennig, R. (2000). Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International*, 107(1), 5-12. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00146-2](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00146-2)
- Wiegand, C., Heusser, P., Klinger, C., Cysarz, D., Büssing, A., Ostermann, T. & Savelsbergh, A. (2018). Stress-associated changes in salivary microRNAs can be detected in response to the Trier Social Stress Test: An exploratory study. *Scientific Reports*, 8(1), 7112. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25554-x>
- Wiegand, C., Savelsbergh, A. & Heusser, P. (2017). MicroRNAs in Psychological Stress Reactions and Their Use as Stress-Associated Biomarkers, Especially in Human Saliva. *Biomedicine Hub*, 2(3), 1-15. <https://doi.org/10.1159/000481126>

- WOAH, W.O.f.A.H. (2024). *Introduction to the Recommendations for Animal Welfare*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2023/chapitre_aw_introduction.pdf
- Wojtaś, J., Karpiński, M. & Czyżowski, P. (2020). Salivary Cortisol Interactions in Search and Rescue Dogs and Their Handlers. *Animals*, 10(4), 595. <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/4/595>
- Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V. & Romano, L.A. (2003). The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 20(9), 1377-1419. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg140>
- Wu, Y., Zhao, J., Cui, C., Zhang, Y., Zhu, Q., Han, S., Yang, C. & Yin, H. (2024a). MiRNA-21-5p induces chicken hepatic lipogenesis by targeting NFIB and KLF3 to suppress the PI3K/AKT signaling pathway. *Journal of animal science*, 102. <https://doi.org/10.1093/jas/skae055>
- Wu, Y., Zhao, J., Cui, C., Zhang, Y., Zhu, Q., Han, S., Yang, C. & Yin, H. (2024b). MiRNA-21-5p induces chicken hepatic lipogenesis by targeting NFIB and KLF3 to suppress the PI3K/AKT signaling pathway. *Journal of animal science*, 102, skae055. <https://doi.org/10.1093/jas/skae055>
- Wu, Y., Zhou, L., Liu, H., Duan, R., Zhou, H., Zhang, F., He, X., Lu, D., Xiong, K., Xiong, M., Zhuang, J., Liu, Y., Li, L., Liang, D. & Chen, Y.-H. (2021). LRP6 downregulation promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Cell Research*, 31(4), 450-462. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00411-7>
- Xu, P., Vernooy, S.Y., Guo, M. & Hay, B.A. (2003). The Drosophila MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. *Current Biology*, 13(9), 790-795. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00250-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00250-1)
- Yang, Y., Hu, Z., Du, X., Davies, H., Huo, X. & Fang, M. (2017). miR-16 and Fluoxetine Both Reverse Autophagic and Apoptotic Change in Chronic Unpredictable Mild Stress Model Rats [Original Research]. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00428>
- Yehuda, R., Southwick, S.M., Nussbaum, G., Wahby, V., Giller, E.L., Jr. & Mason, J.W. (1990). Low Urinary Cortisol Excretion in Patients with Posttraumatic Stress Disorder. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 178(6). https://journals.lww.com/jonmd/fulltext/1990/06000/low_urinary_cortisol_excretion_in_patients_with.4.aspx
- Yelamanchili, S.V., Chaudhuri, A.D., Chen, L.N., Xiong, H. & Fox, H.S. (2010). MicroRNA-21 dysregulates the expression of MEF2C in neurons in monkey and human SIV/HIV neurological disease. *Cell Death Dis*, 1(9), e77. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.56>
- Yordy, J., Kraus, C., Hayward, J.J., White, M.E., Shannon, L.M., Creevy, K.E., Promislow, D.E.L. & Boyko, A.R. (2020). Body size, inbreeding, and lifespan in domestic dogs. *Conservation Genetics*, 21(1), 137-148. <https://doi.org/10.1007/s10592-019-01240-x>
- Yoshida, Y., Yajima, Y., Kawakami, K., Nakamura, S.-i., Tsukahara, T., Oishi, K. & Toyoda, A. (2022). Salivary microRNA and Metabolic Profiles in a Mouse Model of Subchronic and Mild Social Defeat Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22).
- Zen, K. and Zhang, C.-Y. (2012). Circulating MicroRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Medicinal Research Reviews*, 32(2), 326-348. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/med.20215>

- Zhang, C. and Peng, G. (2015). Non-coding RNAs: An emerging player in DNA damage response. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 763, 202-211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.11.003>
- Zhang, J., Xing, Q., Zhou, X., Li, J., Li, Y., Zhang, L., Zhou, Q. & Tang, B. (2017). Circulating miRNA-21 is a promising biomarker for heart failure. *Mol Med Rep*, 16(5), 7766-7774. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7575>
- Zhao, C., Dong, J., Jiang, T., Shi, Z., Yu, B., Zhu, Y., Chen, D., Xu, J., Huo, R., Dai, J., Xia, Y., Pan, S., Hu, Z. & Sha, J. (2011). Early Second-Trimester Serum MiRNA Profiling Predicts Gestational Diabetes Mellitus. *PLOS ONE*, 6(8), e23925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023925>
- Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K. & Chu, Q. (2022). Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1), 95. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00934-y>
- Zhou, X.L., Xu, H., Liu, Z.B., Wu, Q.C., Zhu, R.R. & Liu, J.C. (2018). miR-21 promotes cardiac fibroblast-to-myofibroblast transformation and myocardial fibrosis by targeting Jagged1. *J Cell Mol Med*, 22(8), 3816-3824. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13654>
- Zinovkin, R.A. and Sakharov, I.Y. (2024). Challenges of using microRNAs as potential disease biomarkers. A review. *Microchemical Journal*, 206, 111379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111379>
- Zlabinger, K., Spannbaauer, A., Traxler, D., Gugerell, A., Lukovic, D., Winkler, J., Mester-Tonczar, J., Podesser, B. & Gyöngyösi, M. (2019). MiR-21, MiR-29a, GATA4, and MEF2c Expression Changes in Endothelin-1 and Angiotensin II Cardiac Hypertrophy Stimulated Isl-1+Sca-1+c-kit⁺ Porcine Cardiac Progenitor Cells In Vitro. *Cells*, 8(11), 1416. <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/11/1416>
- Zoladz, P.R. and Diamond, D.M. (2013). Current status on behavioral and biological markers of PTSD: A search for clarity in a conflicting literature. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(5), 860-895. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.03.024>
- Zouein, F.A., Altara, R., Chen, Q., Lesnefsky, E.J., Kurdi, M. & Booz, G.W. (2015). Pivotal Importance of STAT3 in Protecting the Heart from Acute and Chronic Stress: New Advancement and Unresolved Issues [Review]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2015.00036>
- Zouein, F.A., Kurdi, M.O. & Booz, G.W. (2013). Dancing Rhinos in Stilettos. In: JAK-STAT.

EKLER

Ek1. JAKEM Destek Mektubu

T.C.
İÇİŞLERİ BAKANLIĞI
Jandarma Genel Komutanlığı
Nevşehir Jandarma At ve Köpek Eğitim Merkezi Komutanlığı

Sayı : E-20262170-030.99-21810524
Konu : Bilimsel Araştırma ve Proje Çalışması İzin Talebi

08 Eylül 2023

JANDARMA LOJİSTİK KOMUTANLIĞINA

İlgi : Jandarma At ve Köpek Eğitim Merkezi Komutanlığı ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Arasında Eğitim, Sağlık, Ortak Araştırma ve Geliştirme ile Bilimsel ve Teknik Destek Protokolü.

1. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Genetik Ana Bilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Bengi Çınar Kul tarafından, iş köpeklerinde sık görülen kronik stresin değerlendirilmesi ve genetik mekanizmaların araştırılması amacıyla yürütülecek proje kapsamında, sorumlu eğitmenlerin gözetiminde ve kontrolünde JAKEM K.ıgı bünyesinde bulunan görev köpeklerinin dahil edilmesi Ek'te sunulan dilekçe ile talep edilmiştir.
2. Bu kapsamda; JAKEM K.ıgı ve Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi arasında imzalanan ilgi protokol kapsamında yapılacak olan bilimsel araştırma projesi çalışmalarına eğitim ve işbirliği esasları çerçevesinde bünyemizde bulunan görev köpeklerinin dahil edilmesinin faydalı olacağı değerlendirilmiş olup, söz konusu talebe ilişkin gerekli iznin verilmesini tensip ve emirlerine arz ederim.

Ek2. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı



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

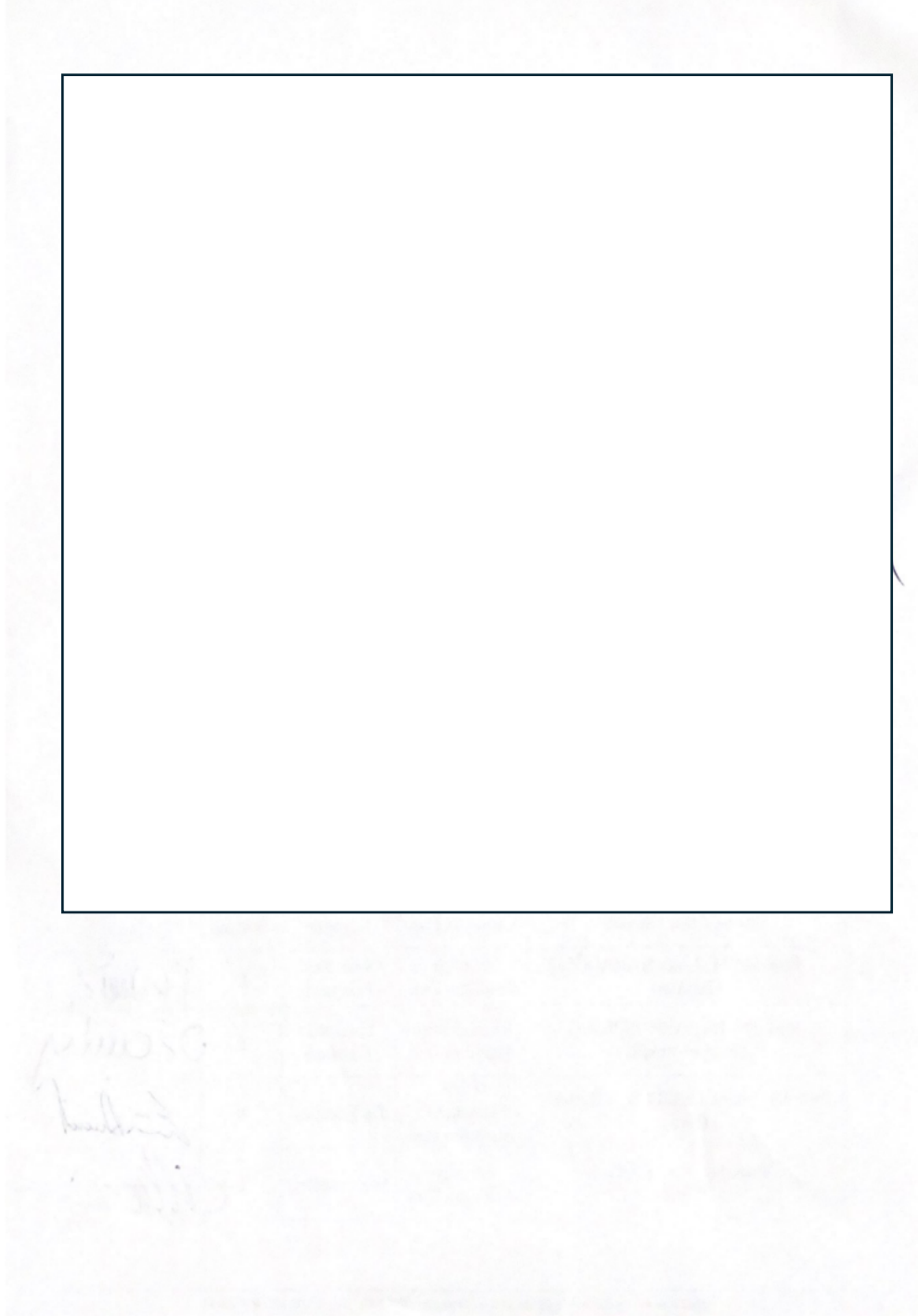
TOPLANTI TARİHİ : 26/04/2023
TOPLANTI NO : 2023-8
DOSYA NO : 2021-136
KARAR NO : 2023-8-80

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL'un yaptığı; araştırmacı olarak Doç. Dr. Yasemin SALGIRLI DEMİRBAŞ, Vet. Hek. Zeynep BARS YILDIRIM ve Vet. Hek. Sevim ISPARTA'nın katıldığı "Kronik Strese Maruz Kalan Köpeklerde Tükürük mikroRNA Seviyelerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi ve Biyobelirteç Potansiyellerinin Araştırılması" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzun 22.12.2021 tarihli toplantısında değerlendirilerek izne tabi olmadığı yönünde karara bağlanmıştır (Karar no:2021-22-197).

Proje Yürütücüsü tarafından Kurulumuza verilen 11.04.2023 tarih ve 237270 sayılı dilekçe ile projede kullanılan köpek sayısının 40'dan 52'ye çıkarılması, söz konusu köpeklerden kan alımının ilave edilmesi ve mikrodizin analizi yerine aday mikroRNA yaklaşımı sunulması yönündeki değişikliklerin Kurulumuz tarafından değerlendirilmesi talep edilmektedir.

Söz konusu dilekçe, Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 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 11 (5) maddesi kapsamında değerlendirilmiş ve projede kullanılan köpek sayısının 40'dan 52'ye çıkarılmasının, söz konusu köpeklerden kan alımının ilave edilmesinin ve mikrodizin analizi yerine aday mikroRNA yaklaşımı sunulması yönündeki değişikliklerin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Ek2. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı



Ek3. C-BARQ

DAVRANIŞ DEĞERLENDİRME ANKETİ

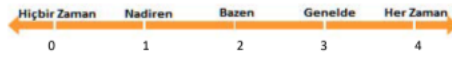
Takip eden sayfalardaki sorular, köpeğinizin yakın geçmişte nasıl bir davranış modeli sergilediğini açıklamanıza yardımcı olmak için tasarlanmıştır. Araştırmalar, bu soruların çoğunun, köpek mizacındaki varyasyonun çoğunu tanımlayan ve farklı cins, ırk ve yaştaki köpekler arasında nispeten tutarlı olan on üç ana davranışsal özellik veya faktör kümesinde toplanabileceğini veya yoğunlaştırılabileceğini göstermiştir:

1. Yabancıya yönelik saldırganlık
2. Sahibine yönelik saldırganlık
3. Köpeğe yönelik saldırganlık / korku
4. Eğitilebilirlik
5. Kovalama davranışı
6. Yabancılardan korkma
7. Sosyal olmayan korku
8. Köpeğe yönelik korku
9. Ayrılma ile ilgili davranışlar
10. Dokunma duyarlılığı
11. Heyecanlanma/uyarılma
12. Aşırı bağıllık veya dikkat çekme
13. Enerji

Lütfen tüm soruları cevaplamaya çalışın. Açıklanan durumla ilgili köpeğinizi daha önce hiç gözlemediyseniz, sadece "gözlemlenmedi / uygulanamaz" seçeneğini kullanın.

Bölüm 1: Eğitilebilirlik

Bazı köpekler diğerlerine göre daha kolay eğitilebilirler. Lütfen aşağıdaki skalada köpeğiniz için uygun olan rakamı yazarak köpeğinizin her bir durum için ne derece eğitilebilir ve itaatkâr olduğunu belirtiniz.



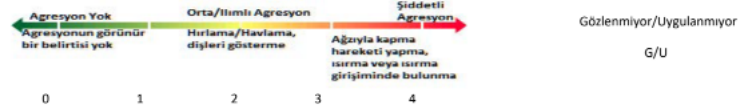
1. Tamasızken çağırdığımda hemen yanıma gelir.	
2. "Otur"komutuna hemen uyar.	
3. "Bekle" komutuna hemen uyar.	
4. Söylediğiniz veya yaptığınız her şeye ilgiyle katılır/her şeyi ilgiyle dinler.	
5. Düzeltme veya cezaya cevap vermek konusunda yavaştır.	
6. Yeni numaralar veya görevler öğrenme konusunda yavaştır.	
7. Kolayca ilginç yerler, sesler veya kokulardan dolayı dikkati dağılır.	
8. Çubukları, topları veya nesneleri getirir veya getirmeye çalışır.	

Ek3. C-BARQ

C-BARQ

Bölüm 2: Saldırganlık

Bazı köpekler zaman zaman saldırgan davranışlar sergilerler. Köpeklerde orta derecede saldırganlığın tipik belirtileri arasında havlama, hırlama ve diş gösterme bulunur. Daha ciddi saldırganlık genellikle kapma, öne doğru saldırı, ısırma veya ısırma denemelerini içerir. Lütfen aşağıdaki skalada köpeğiniz için uygun olan rakamı yazarak köpeğinizin her bir durum için ne derece saldırgan bir davranış sergileme eğilimi olduğunu belirtiniz.



9. Sizin tarafınızdan veya diğer aile bireyleri tarafından sözlü olarak düzeltildiğinde veya cezalandırıldığında(azarlamak, bağırarak, vb.)	
10. Tasmaıyla yürürken/egzersiz yaparken yabancı bir yetişkin doğrudan yaklaştığında	
11. Tasmaıyla yürürken/egzersiz yaparken yabancı bir çocuk doğrudan yaklaştığında	
12. Arabanızdayken yabancı insanlar köpeğinize yaklaştığında (Örneğin benzin istasyonundayken)	
13. Oyuncaklar, kemikler veya diğer başka objeler aile bireyleri tarafından köpeğinizin önünden alındığında	
14. Aile bireyleri tarafından banyo yaptırıldığında veya tarandığında	
15. Ev içindeyken yabancı bir kişi size veya ailenizin bir başka üyesine yaklaştığında	
16. Evden uzaktayken yabancı bir kişi size veya ailenizin bir başka üyesine yaklaştığında	
17. Köpeğiniz yemek yerken aile bireyleri doğrudan yaklaştığında	
18. Postacı veya başka teslimat görevlileri evinize yaklaştığında	
19. Köpeğinizin yiyecekleri aile bireyleri tarafından önünden alındığında	
20. Köpeğiniz dışarıdayken veya bahçedeyken tanımadığınız insanlar evinizin önünden geçerken	
21. Tanımadığınız bir kişi köpeğinize dokunduğunda veya sevmeye çalıştığında	
22. Köpeğiniz dışarıdayken veya bahçedeyken koşu yapanlar, bisiklete binenler, paten kayanlar veya kaykaycılar evinizin önünden geçerken	
23. Köpeğiniz tasmaıyla yürürken/egzersiz yaparken yabancı bir erkek köpek doğrudan yaklaştığında	
24. Köpeğiniz tasmaıyla yürürken/egzersiz yaparken yabancı bir dişi köpek doğrudan yaklaştığında	
25. Aile bireylerinden birisi köpeğinize dik dik baktığında	
26. Yabancı köpekler evinize geldiğinde	
27. Bahçenize kediler, sincaplar veya diğer hayvanlar girdiğinde	
28. Yabancı insanlar evinize geldiğinde	

Ek3. C-BARQ

C-BARQ

29. Başka(yabancı) bir köpek havladığında, hırladığında veya hamle yaptığında	
30. Aile bireyleri üzerinden atlayarak yürüdüğünde	
31. Köpeğinizin gizlice aldığı/çalduğu yiyeceğin veya bir nesnenin sizin tarafınızdan veya aile üyelerinden biri tarafından geri alınması durumunda	
32. Tanıdık bir köpek evinize geldiğinde	
33. Başka bir (tanıdık) ev köpeği, köpeğinizin en çok sevdiği dinlenme / uyuma yerine yaklaştığında	
34. Başka bir (tanıdık) ev köpeği, yemek yerken köpeğinize yaklaştığında	
35. Başka bir (tanıdık) ev köpeği, köpeğinizin en sevdiği oyuncak, kemik, vb. nesnelerle oynarken/kemirirken yaklaştığında	

Köpeğinizin bazen saldırgan olduğu başka durumlar var mı? Eğer varsa, lütfen kısaca açıklayınız:

Bölüm 3: Korku ve Anksiyete (Kaygı)

Köpekler bazen belirli seslere, nesnelere, kişilere veya durumlara maruz kaldıklarında endişe veya korku belirtileri gösterir. Hafif-orta şiddetli korkuya ilişkin davranışın tipik belirtileri şunlardır: göz temasından kaçınmak, korkulan nesneden kaçınmak, kuyruğun aşağıya inmesi veya bacakların arasına sıkışması, inlemek ve sızlanmak, donmak, sallanmak ve titremek. Aşırı derecede şiddetli korkuya ilişkin davranış abartılı bir şekilde korkudan sinme ve/veya kaçmak için güçlü bir girişim, geri çekilme veya korkulan nesneden, insandan ya da durumdan saklanma ile karakterizedir. Lütfen aşağıdaki skalada köpeğiniz için uygun olan rakamı yazarak köpeğinizin her bir durum için ne derece korkuya ilişkin davranış sergileme eğilimi olduğunu belirtiniz.



36. Evinizden uzakta olduğunuzda tanımadığınız bir yetişkin doğrudan size yaklaştığında.	
37. Evinizden uzakta olduğunuzda tanımadığınız bir çocuk doğrudan size yaklaştığında.	
38. Ani veya yüksek seslere karşılık olarak (örneğin, elektrikli süpürgesi, araba motor sesi, geri tepmesi, yol yapım makineleri, yere düşürülen nesneler, vb.)	
39. Tanımadığınız insanlar evinizi ziyaret ettiğinde.	
40. Yabancı birisi köpeğinize dokunduğunda veya köpeğinizi sevmeye çalıştığında.	
41. Yoğun trafikte.	
42. Kaldırımda veya kaldırımın yakınında garip veya yabancı gelen nesnelere karşılık olarak (Ör; Plastik çöp poşetleri, yapraklar, yerdeki çöpler, vb.)	
43. Bir veteriner hekim tarafından muayene edildiğinde / tedavi edildiğinde.	
44. Gök gürültülü fırtına, havai fişek gösterileri ya da benzer olaylar sırasında.	

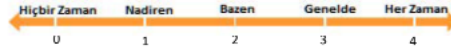
Ek3. C-BARQ

C-BARQ

45. Aynı veya daha büyük boyda yabancı bir köpek doğrudan yaklaştığında.	
46. Daha küçük boyda yabancı bir köpek doğrudan yaklaştığında.	
47. Köpeğiniz ilk defa yabancı olduğu durumlarla karşılaştığında(Ör; ilk araba gezisi, ilk defa asansöre binmek, veteriner kliniğine ilk defa gidiş, vb.)	
48. Rüzgara veya rüzgarda uçan nesnelere karşılık olarak.	
49. Ailenin bir üyesi tarafından tırnakları kesildiğinde.	
50. Ailenin bir üyesi tarafından tarandığında veya yıkandığında.	
51. Aile bireyleri üzerinden atlayarak yürüdüğünde(?)When stepped over by a member of the household.	
52. Ailenin bir üyesi tarafından patileri kurulandığında.	
53. Yabancı köpekler evinize geldiğinde.	
54. Yabancı bir köpek havladığında, hırladığında veya hamle yaptığında.	

Bölüm 4: Ayrılma ile İlişkili Davranış

Bazı köpekler, yalnızca kısa süre için bile olsa, yalnız bırakıldığında anksiyete veya anormal davranış belirtileri gösterir. Yakın geçmişe baktığınızda, köpeğinizin yalnız kaldığında veya yalnız bırakıldığında ayrılma ile ilgili aşağıdaki davranış belirtilerini ne sıklıkla gösterdiğini belirtiniz:



55. Sallanma, titreme.	
56. Aşırı tükürük salgısı.	
57. Huzursuzluk, gerginlik, volta atıp durma(sürekli hareket halinde olma).	
58. Ağlamaya benzer inleme, mızızlanma.	
59. Havlama.	
60. Uluma.	
61. Kapı, zemin, pencere, perde vb. yerleri çiğneme, kazma veya eşeleme	
62. İştahsızlık.	

Köpeğinizin kaygılı ya da endişeli olduğu başka durumlar var mı? Eğer varsa, lütfen kısaca açıklayınız:

Bölüm 5: Heyecanlanma/Uyarılma

Bazı köpekler, bulundukları ortamdaki ani veya potansiyel olarak heyecan verici ve rahatsızlık verici olaylara nispeten az tepki gösterirken, diğerleri en küçük yenilikte bile oldukça fazla heyecanlanır. Hafif - orta derecede uyarılma/heyecanlanma belirtileri arasında uyanıklık,sürekli tetikte olma, yenilik kaynağına doğru hareket etme ve kısa aralıklarla havlama bulunur. Aşırı uyarılma/heyecanlanma aşırı tepki gösterme eğilimi ile karakterize edilir.

Ek3. C-BARQ

C-BARQ

Heyecanlanan köpek en ufak bir rahatsızlıkta havlar ya da isterik bir şekilde kesik kesik acı bir sesle havlar, herhangi bir uyarı/heyecan kaynağına doğru aceleyle koşuşturur ve sakinleşmesi çok zordur. Lütfen aşağıdaki skalada köpeğiniz için uygun olan rakamı yazarak köpeğinizin her bir durum için ne derece heyecanlandığını/uyarıldığını belirtiniz.



63. Kısa bir aradan sonra siz veya ailenin diğer üyeleri eve geldiğinde.	
64. Sizinle veya ailenin diğer üyeleriyle oynarken.	
65. Kapı çaldığında.	
66. Yürüyüşe çıkmadan hemen önce.	
67. Arabayla gezintiyeye çıkmadan hemen önce.	
68. Evinize misafir geldiğinde.	

Köpeğinizin bazen aşırı heyecanlandığı başka durumlar var mı? Eğer varsa, lütfen kısaca açıklayınız:

Bölüm 6: Aşırı Bağlılık ve Dikkat Çekme

Çoğu köpek insanlara güçlü bir şekilde bağlanır ve bazıları onlardan çok fazla ilgi ve şefkat ister. Yakın geçmişte baktığınızda, köpeğinizin aşağıdaki bağlılık ve dikkat çekmeye yönelik davranış belirtilerinin her birini ne sıklıkta gösterdiğini belirtin:



69. Aile bireylerinin belirli bir üyesi için güçlü bir bağlanma gösterir.	
70. Sizi (ya da ailenin diğer üyelerini) evdeyken bir odadan diğer odaya takip etme eğilimindedir.	
71. Otururken size (veya başkalarına) yakın veya sizinle temas halinde olma eğilimindedir.	
72. Otururken dikkat çekmek için sizi dürtme, burnuyla sürtünme veya pati ile dürtme eğilimindedir.	
73. Siz (veya başkaları) başka biri için sevgi gösterdiğiniz zaman tedirgin olur (sızlanır, üzerinize atlar, araya girmeye çalışır).	
74. Siz (ya da başkaları) başka bir köpek ya da hayvan için sevgi gösterdiğinizde, tedirgin olur (sızlanır, üzerinize atlar, araya girmeye çalışır).	

Ek3. C-BARQ

C-BARQ

Bölüm 7: Diğer

Köpekler, bu ankette ele alınanlara ek olarak çeşitli davranış problemleri sergilerler. Yakın geçmişte baktığınızda, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini ne sıklıkta gösterdiğini belirtin:



Gözlenmiyor/Uygulanmıyor
G/U

75. Fırsat tanındığında kedileri kovalar.	
76. Fırsat tanındığında kuşları kovalar.	
77. Fırsat tanındığında sincapları, tavşanları ve diğer küçük hayvanları kovalar.	
78. Fırsat tanındığında evden ya da evin bahçesinden kaçır.	
79. Hayvan dışkılarında veya diğer "kötü kokan" maddelerde yuvarlanır.	
80. Kendi dışkısını veya diğer hayvanların dışkısını yer.	
81. Uygunsuz nesneleri çiğner.	
82. Eşyaların, mobilyaların veya insanların üzerine biner.	
83. İnsanlar yemek yerken devamlı olarak yemek için ısrarcı bir şekilde davranır.	
84. Yemek çalar.	
85. Merdivende gergin ya da korkmuştur.	
86. Tasması takılı olduğunda tasma kayışını oldukça sert bir şekilde çeker.	
87. Evinizdeki eşyalara / mobilyalara karşı idrar yapar.	
88. Yaklaştığınızda, sevdiğinizde, ellediğinizde veya kucağınıza aldığınızda idrarını yapar.	
89. Gün boyu veya gece yalnız kaldığında idrarını yapar.	
90. Gün boyu veya gece yalnız kaldığında dışkısını yapar.	
91. Hiperaktif, huzursuz, sakinleşme konusunda problem yaşar.	
92. Oyuncu, yavru bir köpeğe benzeyen karakterinin oluşu, gürültücü.	
93. Aktif, enerjik, sürekli hareket halinde.	
94. Gözle görülmeyen şeylere gözlerini dikerek dikkatli bir şekilde bakar.	
95. Sinekleri (gözle görülmeyen/hayali) ısırmaya çalışır, havada kapma hareketi yapar.	
96. Kendi kuyruğunu kovalar.	
97. Gölgele, ışıklı noktaları vb. kovalar / takip eder.	
98. Paniğe kapıldığında veya heyecanlandığında ısrarla havlar.	
99. Kendisini aşırı derecede yalar.	
100. İnsanları veya nesneleri aşırı derecede yalar.	
101. Bunların dışında tuhaf, garip veya tekrarlayıp duran davranışlar gösterir. *	

* Kısaca açıklayınız:

©2015 James A. Serpell. All rights reserved. University of Pennsylvania Vet Med