



**İNEKLERDE GEBE KALMA İLE SUNİ TOHURLAMA ZAMANI SÜT
SOMATİK HÜCRE SAYISI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ**

Ahmet BAŞTÜRK
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Hacı Ahmet ÇELİK
Tez No:2022-023
Afyonkarahisar

**T. C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İNEKLERDE GEBE KALMA İLE SUNİ TOHUMLAMA ZAMANI
SÜT SOMATİK HÜCRE SAYISI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Ahmet BAŞTÜRK**

**Danışman
Prof. Dr. Hacı Ahmet ÇELİK**

Tez No: 2022-023

AFYONKARAHİSAR

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda** Ahmet BAŞTÜRK tarafından hazırlanan “İneklerde Gebe Kalma ile Suni Tohumlama Zamanı Süt Somatik Hücre Sayısı Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 06/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Prof. Dr. Erhan ÖZENÇ

Üye

Prof. Dr. Hacı Ahmet ÇELİK

Üye

Prof. Dr. İbrahim AYDIN

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım

Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

06/07/2022

Ahmet BAŞTÜRK

ÖZET

İNEKLERDE GEBE KALMA İLE SUNİ TOHURLAMA ZAMANI SÜT SOMATİK HÜCRE SAYISI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışma, ineklerde gebe kalma ile suni tohumlama zamanı süt somatik hücre sayısı arasındaki ilişki belirlenmiştir.

Meme bezinin sağlık durumu, follikül çapı, SHS, ve gebelik muayenesini kapsayan çalışma ortaya konulmuştur. Çalışmanın materyalini Afyonkarahisar ili Bolvadin ilçesi ve çevre köylerindeki işletmelerden 50 baş inek oluşturdu. Çalışmada 50 baş östrüs göstermekte olan inekler kullanıldı. İneklerin kızgınlık zamanında sütlerinden CMT yapıldı, SHS sayımı için 10 ml süt alınarak numuneler Afyonkarahisar İl Gıda Kontrol Laboratuvarına gönderildi. Suni tohumlama öncesi follikül çapı ölçüldü. Suni tohumlama yapılan ineklerde 24 saat sonra ovulasyon kontrol edildi. İneklerde tohumlamadan 28-30 gün sonra gebelik kontrolü gerçekleştirildi.

Mastitis pozitif bulunanların süt örneklerinde SHS Mastitis negatif olanlardan önemli derecede yüksek bulundu ($p < 0.0001$).

Ovulatör follikül çapları Mastitis pozitif olanlarda Mastitis negatif olan hayvanlardan daha küçük olarak ölçülmüştür. Grupların ovulatör follikül çapları arasında belirlenen farklılık istatistiki olarak önemli değildi ($p < 0.136$).

Çalışmaya katılan hayvanlarda yapılan ovulasyon kontrolü sonrasında ovulasyon oranlarında bir aksama olmadığı, Mastitis pozitif ve Mastitis negatif olan hayvanlarda bezer ovulasyon oranlarının olduğu gözlemlendi. Çalışmada kullanılan 50 baş inekten 46 başında ovulasyon şekillendi.

Mastitis pozitif olan ineklerde gebelik oranı (% 17,85), Mastitis negatif olan ineklerden (% 54,54) daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0,005$). Tohumlama yapılan 50 baş inekten 17 başı gebe kaldı.

Sonuç olarak; östrüs belirtileri gösteren ve subklinik mastitis bulunan ineklerde yapılan suni tohumlamalardan sonra gebelik oranı önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. İneklerde suni tohumlamaların subklinik mastitisin varlığı araştırılarak yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler; Follikül çapı, Gebelik, İnek, Ovulasyon, Somatik Hücre Sayısı, Suni Tohumlama

SUMMARY

DETERMINATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN CONCEPTION AND THE TIME OF ARTIFICIAL INSEMINATION MILK SOMATIC CELLS IN COWS

In this study, the relationship between conception and milk somatic cell count at the time of artificial insemination in cows was determined.

A wide and comprehensive study covering the health status of the mammary gland, follicle diameter, SHS, and pregnancy examination has been presented. The material of the study consisted of 50 cows from the farms in Afyonkarahisar province, Bolvadin district and surrounding villages. 50 oestrus cows were used in the study. CMT was made from the milk of the cows at the time of estrus, 10 ml of milk was taken and the samples were sent to Afyonkarahisar Provincial Food Control Laboratory for SHS counting. Follicle diameter was measured before artificial insemination. Ovulation control was performed after 24 hours in artificially inseminated cows. Pregnancy control was performed 28-30 days after insemination in cows.

Milk samples of those with positive mastitis were found to be significantly higher than those with negative SHS Mastitis ($p < 0.0001$).

Ovulatory follicle diameters were measured to be smaller in Mastitis-positive animals than in Mastitis-negative animals. The difference between the ovulatory follicle diameters of the groups was not statistically significant ($p < 0.136$).

After the ovulation control in the animals participating in the study, it was observed that there was no disruption in ovulation rates, and similar ovulation rates were observed in Mastitis positive and Mastitis negative animals. Ovulation occurred in 46 heads of 50 cows used in the study.

It was determined that the pregnancy rate (17.85%) in mastitis-positive cows was lower than in Mastitis-negative cows (54.54%).

As a result; It has been observed that the pregnancy rate is significantly reduced after artificial insemination in cows showing signs of estrus and subclinical mastitis. It was concluded that artificial insemination in cows should be done by investigating the presence of subclinical mastitis.

Keyword; Artificial Insemination, Cow, Follicle diameter, Ovulation, Pregnancy Somatic Cell Count

ÖNSÖZ

Dünya çiftlik hayvanları arasında olan ineklerde son yıllarda ortaya çıkan meme hastalıkları ve problemleri süt verimini ve Suni Tohumlama başarısını düşürmekte yani ineklerde gebelik oranı azalmaktadır. İneklerde gebelik oranının azalması her yönden ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu ekonomik kayıplar üretici açısından da büyük yük sayılmaktadır. Her inek için yılda bir buzağı hedefi olan işletmeler birçok sebepler yüzünden bu hedefe ulaşamamaktadır. Bu sebeplerden birisi de Somatik Hücre sayısıdır. Normal işletmelerde SHS ayda bir robatik işletmelerde de ise günlük sayım yapılırken aile tipi işletmelerde böyle bir durum söz konusu değildir. Bu çalışmamızda Somatik Hücre sayısı ile Suni Tohumlama sonrası gebe kalma arasındaki sonuçları araştırdık.

Sunulan bu tez çalışması ile İneklerde Gebe Kalma ile Tohumlama Zamanı Somatik Hücre Sayısı Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi mevcut durumunun ortaya konulması amaçlandı.

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılardan dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hacı Ahmet ÇELİK, hocalarıma ve ayrıca; bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı değerli eşim Esra Nur BAŞTÜRK'e teşekkür ederim.

Veteriner Hekim Ahmet BAŞTÜRK

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	I
SUMMARY	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER ve KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER	VII
ÇİZELGELER	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Mastitis Tanımı	1
1.2. Mastitisin Sınıflandırılması	2
1.3. Mastitislerin Önemi	2
1.4. Mastitisin Reprodüksiyon İlişkisi	3
1.5 Mastitisin Reprodüksiyon Üzerindeki Etki Mekanizması	3
1.6. Sıcaklık etkisi	5
1.7. Enfeksiyon Zamanlamasının Etkisi	5
1.8. Hipotalamik - Hipofiz - Ovaryum Eksenine Etkisi	7
1.9. Korpus Luteum Üzerine Etkisi	8
1.10. Ovulasyon Üzerine Etkisi	9
1.11. Steroid Sentezi Üzerine Etkisi	10
1.12. Oosit Kapasitesi Üzerine Etkisi	12
1.13. Mastitis ve Embriyonik Canlılık	13
1.14. Somatik Hücre Sayısı ile Gebelik Oranı İlişkisi	14
2. MATERYAL ve METOT	17
2.1. Materyal	17
2.1.1. Hayvan Materyali	17
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Ekipman	17
2.1.2.1. Ultrasonografi Cihazı	17
2.1.3. Sarf Malzemeler	17

2.1.3.1. California Mastitis Test Ayracı	18
2.2. Yöntem	18
2.2.1. Genel Sağlık Kontrolü	18
2.2.2. Genital Organların Muayenesi	18
2.2.3. Meme Bezinin Muayenesi	18
2.2.4. Süt Numunesinin Alınması	18
2.2.5. California Mastitis Testi	19
2.2.6. Somatik Hücre Sayısının Belirlenmesi	19
2.2.7. Ultrasonografi Muayene	20
2.2.8. İstatistiksel Analiz	20
3. BULGULAR	21
3.1. Süt Somatik Hücre Sayıları	21
3.2. Ovulatör Follikül Çapları	21
3.3. Ovulasyon Oranları	22
3.4. Gebelik Oranları	22
4. TARTIŞMA	23
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
6. KAYNAKLAR	42
7. EKLER	49
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	49
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER ve KISALTMALAR

%: Yüzde

<: Küçüktür.

>: Büyüktür

CMT: California mastitis test

E. coli: Escherichia coli

E2: Östradiol

FSH: Follikül Stimüle edici Hormon

GDF-9: Growth Differentiation Factor-9

GnRH: Gonadotropin Salıcı Hormon

IFN- δ : İnterferon gamma

IL: İnterlökin

LH: Lüteinleştirici Hormon

LPS: Lipopolisakkarit

MHz: Mega hertz

mm: Milimetre

n: Hayvan sayısı

NO: Nitrik oksit

p: Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri

P4: Progesteron

PGE: Prostaglandin E

PGF_{2 α} : Prostaglandin F_{2 α}

SHS: Somatik hücre sayısı

SPSS: Statistical package for the social sciences paket programı

TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa

TNF- β : Tümör Nekrozis Faktör beta

VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1.1: Mastitisin fertilitiyi etkileyen muhtemel mekanizmaları.	4
Şekil 1.2: Sağılan ineklerde mastitis ile gebelik başına tohumlama sayısı ilişkisi: mastitis teşhis zamanı.	6
Şekil 1.3: Sağlıklı (FF-control), eksojen Gram negatif (G-) E. Coli endotoksini, Gram pozitif (G+) S. Aureus endotoksini verilen ineklerin folliküler sıvılarında olgunlaşan oositlerin gelişim yetenekleri karşılaştırılması.	11
Şekil 1.4: Mastitisin reproduktif sisteme etki mekanizması.	13
Şekil 1.5: Meme bezinin embriyo canlılığını azaltmada etki şekilleri	14
Şekil 1.6: Sağılan ineklerde mastitis ile gebelik başına tohumlama sayısı ilişkisi: enfeksiyon şiddeti.	15
Şekil 3.1: Mastitis negatif ve Mastitis pozitif hayvanlarda somatik hücre sayıları.	21
Şekil 3.2: Mastitis negatif ve Mastitis pozitif olan hayvanların ovulatör follikül çapları.	22
Şekil 3.3: Mastitis negatif ve Mastitis pozitif olan ineklerde belirlenen gebelik oranları.	22

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 1.1: Subklinik mastitisin ineklerde reproduktif süreçte oluşturduğu değişiklikler	16
Çizelge 3.1: Mastitis negatif ve Mastitis pozitif ineklerde somatik hücre sayısı, ovulatör follikül çapı, ovulasyon oranları ve gebe kalma oranları	22



1. GİRİŞ

Süt insanlar için vazgeçilmez bir gıda maddesidir. Damızlık süt ineği çiftliklerinde süt üretim maliyetleri önemli ekonomik faktör olarak dikkati çekmektedir. Sütün normal üretim süreçleri içindeki maliyeti yanında, mastitis sonucunda oluşan ilave maliyet üreticiler üzerinde ekonomik bir baskı oluşturur. Bu nedenle mastitis hastalığının önlenmesine yönelik çabaların önemi artmaktadır.

Mastitisin önlenmesi veya azaltılması süt verimi ile ilgili getirisi yanında, ineklerde üreme faaliyetlerinde de performansa olumlu yansıyacaktır. Çünkü ineklerde klinik veya subklinik mastitisin üreme faaliyetleri üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği ortaya konulmaya başlanmıştır. Mastitisin fertiliteye olumsuz etkisinin ekonomik bir karşılığı da bulunmaktadır. Bu nedenle fertilitede olumlu sonuçlar elde edilebilmesi bir anlamda mastitis ile mücadelenin sonuçlarına da bağlı olacaktır.

Bu tezde mastitisin ineklerde üreme faaliyetlerine etkilerinin ne olabileceği ve muhtemel etkilerinin nasıl oluşabileceği ile ilgili bilgiler verilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Mastitis Tanımı

Mastitis, basit şekilde nedeni ne olursa olsun meme bezinin yangısı olarak tanımlanır. Hastalık; etiyoloji, patogenezi, şiddeti, süresi, prognozu ve tedavisi açısından karmaşık bir yapıya sahiptir. Meme dokusunu saran bağdoku ile fonksiyonel meme dokusunun etkilenmesi sonucu oluşur. Bu nedenle mastitiste meme bezinde yangısal değişiklikleri ile birlikte sütün görünümünde de değişiklik olması gerektiği kabul edilmektedir. Sütteki bu değişiklik ineğin bağışıklık sisteminin enfeksiyon etkenlerine verdiği cevaptan kaynaklanır. Mastitis subklinik şekilde de oluşabilir. Hastalığın bu tipinde meme bezinde ve sütte gözle görülebilir değişiklik olmamasına rağmen meme içinde enfeksiyon vardır (Hudson vd., 2012).

Hastalık bakteri, virus, mycoplasma, maya ve mantarlar tarafından oluşturulur (Wellenberg vd., 2002; Zadoks vd., 2011). Ancak tüm dünyada karşılaşılan önemli mastitis etkenleri; *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus*

uberis, Staphylococcus aureus ve Escherichia coli'dir (Zadoks vd., 2011). Anılan patojenlerin hayvan refahı, süt kalitesi ve verimlilik üzerine olumsuz etkileri söz konusudur. Mastitislerin çok önemli bir kısmı bakteriler tarafından oluşturulsa da oluşan meme yangısı sadece bir sonuç olup, arkasında önemli hazırlayıcı nedenler listesini barındırır. İyi idare edilen ve stres faktörlerinin minimize edildiği, genetik faktörlerin göz ardı edilmediği, barınak hijyeni ve doğru sağıım prosedürlerinin eksiksiz uygulandığı, bu prosedürlere güncel bir aşılama programının eklendiği sürülerde, bu prosedürlerin göz ardı edildiği sürülere göre daha düşük klinik ve subklinik mastitis olgusuyla karşılaşılması beklenir. Sağımın sürülerde ya da bireysel yetiştiricilikte ineklerin hasat zamanı olduğu unutulmamalı, memeyi ve ineği her türlü stresten koruyacak önlemler eksiksiz olarak alınmalıdır (Vural vd., 2016).

1.2. Mastitislerin Sınıflandırılması

Klinik mastitisler olgunun süresine göre perakut, akut, subakut ve kronik mastitis olarak sınıflandırılmaktadır. Perakut mastitiste meme bölümlerinden bir veya birkaçında aniden oluşan şişlik, sıcaklık artışı, sertlik ve ağrı ile karakterize ciddi yangı belirtileri vardır. Normal süt karakteri kaybolmuştur, sulu, seröz, kanlı, flakonlu, kesilmiş süt karakterindedir veya süt pıhtılı olabilir ya da süt tamamen durabilir. Hayvanda genel durum bozuklukları da gözlenir. Akut mastitiste belirtiler perakut forma göre daha hafiftir. Subakut mastitiste perakut ve akut mastitislerde görülen şiddetli genel ve lokal belirtiler görülmez. Kronik mastitisler ise yangısel bozuklukların aylarca hatta bir laktasyondan diğerine kadar memede kaldığı genellikle subklinik seyreden olgulardır (Deveci vd., 1994; Harmon, 1994; Alaçam, 1997).

1.3. Mastitisin Önemi

Mastitis süt ineği yetiştiricilerini etkileyen önemli hastalıklardandır. Mastitis sonucu ortaya çıkan ekonomik zararlar; süt veriminde azalma, bozuk sütün imha edilmesi, süt kalitesinin düşmesi, hayvan tedavi giderleri, veteriner hekimlik hizmetleri giderleri, hayvan değerinde azalma, sürüden uzaklaştırma maliyeti, koruma ve kontrol faaliyetlerinin oluşturduğu giderler şeklinde sıralanmaktadır (Chegini vd., 2016).

Mastitis, hayvan refahı, gıda güvenliği, zoonotik ve ekonomik sorundur. Tüm dünyada süt veriminin düşmesinde en önemli nedendir. Mastitis kontrol programlarının birincil hedefi süt kalitesini ideal düzeyde korumak ve hayvanın genetik kapasitesine uygun olarak yüksek süt verimi elde etmektir (Vural vd., 2016).

1.4. Mastitisin Reprodüksiyon İlişkisi

Reprodüktif performans sütçü damızlık işletmelerde karlılığı belirleyici temel faktördür (Esslemont, 2003). İneklerde reprodüktif etkinlik tüm dünyada giderek azalmaktadır (Santos vd., 2004). Bu soruna yol açan faktörler daha çok doğum öncesi ve sonrası meydana gelen fizyolojik olaylarda komplikasyonlara neden olurlar. Yeni araştırma bulguları mastitisin etkilerinin sadece meme bezi ile sınırlanamayacağını, genital organlara uzanabileceğini ve bu şekilde reprodüktif verimliliği etkileyebileceğini göstermektedir (Santos vd., 2004; Kumar vd., 2017). Süt sığırcılığının verimini etkileyen birçok faktör vardır, fakat üreme performansı mastitisten olumsuz etkilenen önemli bir hissedardır (Ghani vd., 2019)

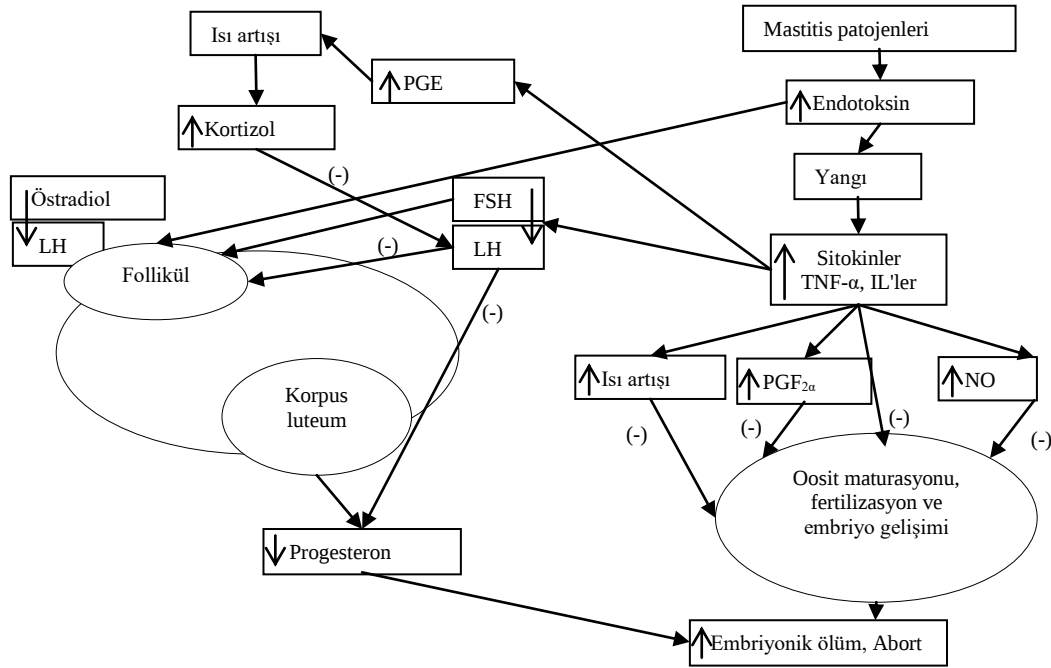
Bağırsak mikroorganizma yükünün androjen ve östrojen seviyelerini önemli ölçüde etkilediği, böylece cinsiyet hormonlarının aracılık ettiği bir dizi fizyolojik süreci değiştirdiği gösterilmiştir (Markle vd., 2013; Baker vd., 2017). Beslenme, bağırsak mikroorganizma yükünün bileşimini değiştirir. Mastitisli inekler genellikle yetersiz beslenmeden ve vitaminler ve iz elementler gibi temel besinlerin eksikliği problemini yaşarlar, bu da bağırsak fonksiyonunda bozulmaya ve enterik disbakteriyozise yol açarak bağışıklık fonksiyonunu baskılar, cinsiyet hormonu seviyelerini değiştirir ve üreme kapasitesinin bozulmasına neden olur.

1.5. Mastitisin Reprodüksiyon Üzerindeki Etki Mekanizması

İneklerde mikroorganizmalar tarafından oluşturulan meme içi enfeksiyon bağışıklık sistemini etkiler ve bağışıklık sisteminin verdiği cevap reprodüktif performansı azaltır (Olechnowicz ve Jaskowski, 2013). Mastitisin; reprodüktif süreçlerde tümör nekroz faktör- α (TNF- α), prostaglandin (PGF_{2 α}) ve nitrik oksit (NO) gibi bileşiklerin üretimini

uyaran sitokinlerin oluşumuna yol açarak etki gösterdiği düşünülmektedir (Ahmadzadeh vd., 2010; Kumar vd., 2017).

Mastitis etkisi sonucunda kan dolaşımına giren kimyasallar reproduktif süreçte oosit gelişimi, embriyo kalitesi ve gelişimi, uterus ortamı ve ovaryum fonksiyonu gibi değişik düzeylerde etkilerini gösterirler. Bahsi geçen kimyasallar arasında, enfekte meme bezlerindeki süttten interlökin (IL) -1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 ve TNF- α izole edilmiştir (Riollet vd., 2001; Chebel, 2007). Ayrıca gramnegatif bakterilerle enfekte olan laktasyondaki ineklerde bakteri hücre duvarı bileşenlerinin (LPS) etkisi ile süt IL-1 β , IL-8 ve TNF- α 'nın konsantrasyonlarında artma olduğu belirlenmiştir (Blum vd., 2000; Soto vd., 2003a; Waller vd., 2003). Mastitis yaşayan ineklerin, TNF- α , IL-1 ve IL-6'nın kan konsantrasyonlarında artış olduğunu bildiren araştırmalar bulunmaktadır (Nakajima vd., 1997; Hoeben vd., 2000). Mastitisin bunların yanında NO konsantrasyonu artırarak PGF_{2 α} metabolitinin kan konsantrasyonunu yükselttiği de bildirilmiştir (Giri vd., 1984; Bouchard vd., 1999; Blum vd., 2000; Hockett vd., 2000). Ortaya konulan tüm bu bulgular, meme bezi enfeksiyonlarının etkisi sonucunda ortaya çıkan bileşiklerle sistemik bir yanıt oluşturarak reproduksiyonu bozabileceğini göstermektedir (Şekil 1.1) (Ahmadzadeh vd., 2010).



Şekil 1.1: Mastitisin fertilitiyi etkileyen muhtemel mekanizmaları (Ahmadzadeh vd., 2010).

1.6. Sıcaklık etkisi

Mastitis şekillenen ineklerde reproduktif verimin azalmasına yol açan muhtemel mekanizmalardan biri, meme bezinin hem gram pozitif hem de gram negatif enfeksiyonlarından kaynaklanabilen vücut sıcaklığının yükselmesidir (Wenz vd., 2001). İn vitro çalışmalar, sıcak stres altında olgunlaştırılan oosit ve embriyoların daha az sayıda blastosist evresine geliştiğini göstermiştir (Edwards ve Hansen, 1997). Ayrıca, sağılan inek ve düvelerin ısı stresine maruz kaldıkları zaman fertilizasyon oranı ve kaliteli embriyo oranı önemli şekilde daha düşük bulunmuştur (Sartori vd., 2003). Bu sıcak stresine maruz kalmanın oositlerin ve embriyoların fertilizasyon ve gelişmesini tehlikeye soktuğunu gösterir. Yüksek vücut ısısının oosit ve embriyo kalitesi ve gelişim üzerindeki direkt etkisi bir yana; sıcaklık artışı üreme performansını dolaylı olarak etkileyebilir, çünkü bu etkiye maruz kalan ineklerde yem tüketimi ve vücut kondüsyonunun olumsuz etkilendiği gözlemlenmiştir (Maltz vd., 1997). Bu nedenle, doğumdan sonraki ilk günlerde bir inekte mastitis ve mastitis etkisiyle ateş yükselmesi gelişirse, ineklerin yem alımının azalması, vücut kondüsyonunda daha fazla kayıp ve daha belirgin negatif enerji dengesi ortaya çıkabilir ve bu durum ovaryumlarda sıklık aktivitenin yeniden başlamasını geciktirebilir (Roth ve Wolfenson, 2016).

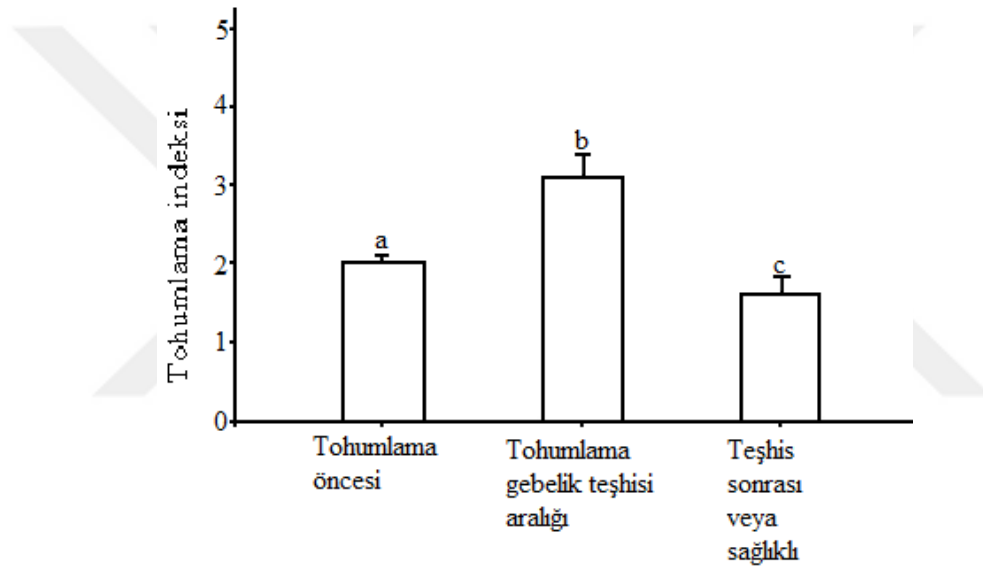
Doğum-ilk tohumlama aralığının uzamasına, doğum sonrasında vücut sıcaklığı artışı sonrasında enerji dengesindeki azalmanın GnRH ve LH salınım düzenini bozması ile ortaya çıkan anovulasyonun yol açabileceği bildirilmiştir. Mastitis neticesinde ısı artışı zararlı etkileri sonucunda zayıf kaliteli oosit veya embriyo üretimi gebe kalma oranını azaltmış ve gebelik başına tohumlama oranını arttırmıştır. Sonuç olarak; mastitisin etkileri ile embriyonik/fötal ölüm veya abort daha uzun doğum gebe kalma aralığı ile karşılaşılmasını doğurmuştur (Hansen vd., 2004).

1.7. Enfeksiyon Zamanlamasının Etkisi

Tohumlama veya aşım zamanıyla mastitis gelişmesi zamanı arasındaki etkileşimi ortaya koymaya yönelik çalışmalarda tohumlamadan hemen önce ve sonrasındaki günlerin en önemli zaman dilimi olduğu ortaya konulmuştur (Ruegg vd., 2015). Tohumlamanın

hemen öncesinden başlayarak gebelik teşhisine kadar devam eden zaman aralığında meydana gelen bir meme enfeksiyonu, reproduktif performansta önemli azalma ile sonuçlanmaktadır (Kumar vd., 2017).

Tohumlama öncesinde veya tohumlama ile gebelik teşhisi aralığında meydana gelen klinik mastitis; ilk tohumlamada gebelik oranında azalma, laktasyon dönemindeki gebelik oranında düşme, daha fazla abort ve sürüden uzaklaştırma şeklinde etki ortaya çıkartır (Barker vd., 1998, Schrick vd., 2001; Santos vd., 2004). Klinik mastitise benzer şekilde tohumlama ile gebelik teşhisi yapılması arasındaki günlerde oluşan subklinik mastitiste de gebelik oranı azalmaktadır (Hansen vd., 2004), (Şekil 1.2) .



Şekil 1.2: Sağılan ineklerde mastitis ile gebelik başına tohumlama sayısı ilişkisi: mastitis teşhis zamanı (Hansen vd., 2004).

Gebelik günlerinin ilerlemesi ile birlikte oluşan mastitisin gebelik üzerine etkisi azalmaktadır ancak, gebelik teşhisi sonrasında meydana gelebilecek bir klinik mastitis gebelik kayıpları oluşturabilecektir. Chebel vd. (2004) tohumlama ile izleyen 45 gün sonrasında oluşan mastitiste sağlıklı ineklere göre 2.8 kat fazla gebelik kaybı oluşabileceği, benzer şekilde gebeliğin ilk 45 günü içinde oluşan klinik masitisinin izleyen 90 gün içinde 2.7 kat fazla abort ile sonuçlanabileceği bildirilmektedir (Risco

vd., 1999). Bu nedenle mastitisin reproduksiyona olumsuz sonuçlarının önlenmesi için etkisinin daha fazla olduğu dönemlere odaklanılması önerilmektedir.

1.8. Hipotalamik - Hipofiz - Ovaryum Eksenine Etkisi

İneklerde reproduktif siklus, hipotalamusta üretilen hormonlar (GnRH, Gonadotropin Salıcı Hormon) ve hipofiz (FSH, Follikül Stimüle edici Hormon ve LH, Lüteinizan Hormon) hormonları ile ovaryumlardan (E2, östradiol ve progesteron, P4), üretilen hormonlarca düzenlenir. Bu hormonlardan birinin üretiminin veya salgılanmasının bozulması süt ineklerinin üreme verimliliğinin olumsuz etkilenmesiyle sonuçlanır (Chebel, 2007).

İneklerde, klinik mastitisin hormonal düzen, folliküler gelişim ve ovulasyon üzerine etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmada, klinik mastitisin normal hormonal düzeni çok sayıda farklı yoldan engellediği belirlenmiştir. Mastitisin; LH'nın pulzatil salınımında azalma, E2 üretiminde düşme oluşturduğu ve bazı hayvanlarda östrüs belirtilerini bloke ettiği gözlenmiştir. Bu etkiler akut klinik mastitisli ineklerde ovulatör LH artışının olmaması ve sonucunda ovulasyonun engellenmesini açıklamaktadır (Chebel, 2007).

Mastitis sırasında üretilen bazı sitokinlerin ovaryum üzerinde doğrudan etkisi vardır. Örneğin, IL-6, estradiol salgısını bloke eder (Spicer ve Alpizar, 1994). Bu da LH salınımını azaltırken, TNF- β ve IFN- δ , korpus luteuma karşı sitotoksiktir (Fairchild vd., 1991; Petroff vd., 2001) ve P4 konsantrasyonlarında azalmaya neden olabilir.

Bazı sitokinlerin LH salınımını azalttığı gösterilmiştir (McCann vd., 2000). Dahası, ineklerin mastitise ve gram negatif bakterilerin salgıladığı endotoksinlere maruz kalması, LH'nin pikini ve dolaşımdaki düzeyini olumsuz etkileyen bir hormon olan kortizolün kan konsantrasyonlarında artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Stoebel vd., 1982; Li ve Wagner, 1983; Padmanabhan vd., 1983). Lüteinleştirici hormon salınımının azalması veya eksikliği; follikül ve oosit gelişim yetersizliği, ovulasyon eksikliği ve suboptimal luteal fonksiyon ile sonuçlanabilir.

(Huszenicza vd., 2005), postpartum dönemde ovaryum aktiviteleri bozukluğu ile mastitis arasındaki ilişki bulunduğunu öne sürmektedir. Bu araştırmacılara göre doğum sonrası ilk 2 hafta için oluşan mastitis olumsuz etki oluşturmazken, 15-28. günlerde oluşan mastitis ilk postpartum ovulasyonu geciktirir, folliküler fazı uzatır ve erken luteolizisi uyarır. Ancak bu gözlenen etkilerin gebelik oranı ve doğum gebe kalma aralığını nasıl etkilediğini açıklamaya yetmeyeceği ifade edilmiştir. Erken laktasyon döneminde subklinik uzun süreli ve kısa süreli klinik mastitisin ineklerde yaklaşık %30 oranında ovulasyon gecikmesine yol açabileceği ileri sürülmüştür (Lavon vd., 2010). Bu bulgular düşük E2 düzeyi ile ilişkili bulunmuştur. Hem E2 düzeyinin düşük olması hem de düşük veya geciken LH pikinin mastitisin folliküler gelişimi direk etkileme mekanizması olarak kabul edilmektedir.

1.9. Korpus Luteum Üzerine Etkisi

Mastitisin tohumlama sonrası CL'un erken luteolizisini uyarması gebeliğin sonlanmasıyla sonuçlanmaktadır. Ancak mastitis sonrası P4 azalması etkisi konusunda görüş birliği bulunmamaktadır. Çok sayıda çalışmada mastitisin uyardığı $PGF_{2\alpha}$ ve muhtemelen $TNF-\alpha$ 'nın CL gerilemesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak, mastitis etkisindeki inekte luteal fonksiyonun bozulması mekanizması ile ilgili bulgular yetersizdir. Bunun nedeni olarak enfeksiyonun karmaşık doğası düşünülmektedir. Enfeksiyonun klinik veya subklinik olması, gram pozitif veya gram negatif etkenlerden kaynaklanması gibi farklılıklar etki şeklini karmaşıklaştırmaktadır (Wolfenson vd., 2015).

Damar içi E. coli LPS'i enjeksiyonu yapılarak gerçekleştirilen bir çalışmada P4 düzeyinde azalma ve CL çapında küçülme belirlenmiştir. Buna karşılık LPS'nin meme içi verilmesinin ise erken luteal gerilemeye yol açmadığı ve P4 düzeyini azaltmadığı da belirlenmiştir (Wolfenson vd., 2015). Luteal fonksiyon üzerine gram pozitif bakterilerin de etkisiz olduğu bulunmuştur. Deneysel enfeksiyonlarda bu şekilde sonuçlara ulaşılmasına rağmen gram negatif etkenlerden kaynaklanan doğal enfeksiyonlarda östrüsler arası sürenin değiştiği bildirilmektedir (Santos vd., 2004, Wolfenson vd., 2015). Gram negatif enfeksiyon izole edilen hayvanlarda daha fazla premature luteolizis

etkisi ile kısa luteal faz süresi gözlenmiştir. Klinik mastitisli ineklerde P4 düzeyi ve CL çapında etkilenme gözlenirken, subklinik mastitiste bu etki gözlenmemiştir. Nitekim tırnak sorunu yaşayan ve SHS düzeyi yükselen ineklerde P4 düzeyinin etkilenmediği belirlenmiştir (Wolfenson vd., 2015).

Gerçekleştirilen bir çalışmada E.coli mastitisinden etkilenen ineklerde etkilenmeyen ineklere göre P4 düzeyi farklı bulunmamıştır. Hayvanlarda P4'un erken azalması gözlenmemiştir. Sadece % 5.5 düzeyinde erken östrüs gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak E.coli mastitisi ile östrüsler arası sürenin ilişkisinin önemli düzeyde olduğu ileri sürülmüştür. Ancak araştırmacılar bu çalışmada mastitis teşhis sırasında tüm hayvanlara PGF_{2α} salınımını ve sonucunda ve CL regresyonunu engelleyebileceğini düşündükleri non-steroid ilaç verildiğini de bildirmektedir (Wolfenson vd., 2015).

Tüm bulguların klinik mastitisin düşük fertilite nedeni olan premature luteal regresyon üzerine neredeyse önemsiz etkisi sonucunda CL kaynaklı olmayıp, embriyo ile ilişkili olduğunu gösterdiği vurgulanmıştır (Wolfenson vd., 2015).

1.10. Ovulasyon Üzerine Etkisi

Klinik ve subklinik olguların CL üzerindeki etkisinde olduğu gibi ovulasyon üzerine de farklı şekilde etkileyebileceği ileri sürülmektedir. Folliküler faz sırasında tohumlama öncesinde şekillenmiş klinik mastitis olgularının pulsatil LH sekresyonunu önemli şekilde azalttığı, östrüse yakın düşük E2 sekresyonunayol açtığı ve sonrasında LH pikinde ve ovulasyonda gecikmeye neden olduğu belirlenmiştir. Ancak bu etkiler akut, kısa süreli ve deneysel patojenik etki, endotoksin veya bakterinin meme içi verilmesiyle oluşturulmuştur. Belirlenen bu etkilerin subklinik ve aylar süren uzun süreli olgularda aynı şekilde yorumlanamayacağı ileri sürülmüştür. Subklinik mastitisin ovulasyon üzerine etkisini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada; subklinik enfekte ineklerde östrüs-ovulasyon aralığının normal sağlıklı ineklere (28.5 saat) göre uzadığı (56 saat) belirlenmiştir. Aynı zamanda ovulasyon gecikmesi bulunan mastitisli ineklerde östrüse yakın dönemde E2 düzeyi %50 oranında düşük bulunmuştur. Klinik mastitislerde ayrıca GnRH ve LH sekresyonunu baskılayan kortizol düzeyinde keskin yükselme ile

sonuçlanan glikokortikoid sisteminin aktive edildiği belirlenmiştir. Ancak kortizol düzeyi subklinik mastitisli ineklerde etkilenmediği görülmüş, bunun sonucunda subklinik mastitisli ineklerde LH pulzatil salınımında değişiklik oluşmadığı ileri sürülmüştür. Pulzatil salınımında değişiklik gözlenmemesine rağmen ovulasyon gecikmesi bulunan subklinik mastitisli ineklerde preovulatör LH piki seviyesinde %30 düzeyinde bir azalma, pik oluşumunda azalma veya pik oluşumunun engellenmesi gözlemlendiği bildirilmektedir (Wolfenson vd., 2015).

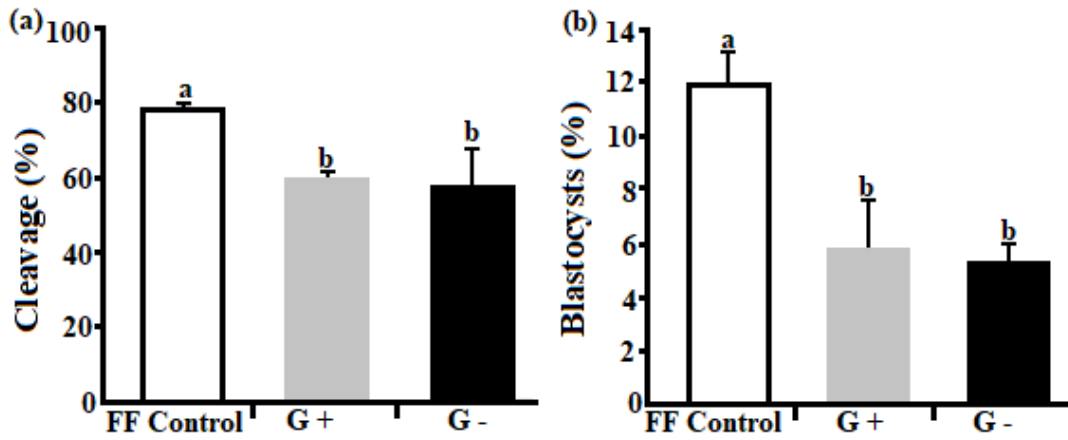
Çalışmaların sonuçları; subklinik, uzun süreli mastitisli ineklerin yaklaşık 1/3'ünde E2'nin düşük seviyede salınımı ve LH pikinin düşük seviyede şekillenmesi veya oluşmaması sonucunda ovulasyon gecikmesi oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. Östrüse yakın dönemde dolaşımdaki E2'nin düşük seviyede olması GnRH sekresyonu üzerine olan pozitif etkisinin azalması, neticesinde de LH'nın preovulatör salınım düzeninin değişmesiyle sonuçlanır.

Eksojen bakteri LPS'i verilen hayvanlarda östrüsler arası sürede uzama gözlenmiştir. Endotoksine maruz kalma LH pik seviyesinde azalma ve LH pik oluşumunda gecikme veya LH pik oluşumunu tamamen engelleme şeklinde etki göstermiştir. Araştırmacılara göre (Lavon vd., 2008) LH pik oluşumundaki düzensizlik, hayvanlarda % 30 oranında ovulasyonda gecikmeye yol açmıştır, bu gecikme ise luteal P4 düzeyindeki yükselmeyi geciktirmiştir. Ortaya konulan etkilerin fertilizasyon eksikliğini ortaya çıkarabileceği ileri sürülmüştür. Nitekim ovulasyon sonrası P4 yükselmesindeki gecikmenin zayıf embriyonik gelişim ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Progesteron gebeliğin şekillenmesi ve östrüs siklusunun düzenlenmesinden sorumludur. Progesteron başarılı embriyonik gelişim için gerekli olan endometriyal sekresyonun gerçekleşmesini sağlar (Mann ve Lamming, 2001).

1.11. Steroid Sentezi Üzerine Etkisi

Subklinik mastitisli ineklerde yürütülen bir çalışmada, preovulatör folliküllerin sıvısı toplanarak ve granuloza ile teka hücrelerinin izolasyonu yapılması neticesinde enfekte olan ve olmayan hayvanlar arasında açık, net bir farklılık görülmüştür. Hayvanların

1/3'ünde normal, enfekte olmayan hayvanlara göre folliküler sıvıda daha düşük E2 ve androstenoidin düzeyi ölçülürken geri kalanında normal seviye belirlenmiştir. Bahsedilen 1/3' etkilenme oranı ovulasyon gecikmesi ve normal ovulasyon gösteren hayvanlarda da bulunmuştur (Lavon vd., 2010). Granulosa hücrelerinde E2 düzeyinin, teka hücrelerinde ise androstenoidlerin düşük düzeyde ölçülmesi steroidojenik enzimlerin ve LH reseptörlerinin azalması ile ilişkili bulunmuştur. Bu bulguların deneysel şartlarda oluşturulan enfeksiyonda da oluşup oluşmadığının kontrol edildiği çalışmada senkronize edilen ineklere meme içi gram pozitif bakteri toksini verilmesi sonrasında lokal veya sistemik yangı belirtilerinin oluşmadığı, sadece SHS'nin yükseldiği olguda hayvanların yaklaşık %40'ında folliküler sıvı steroid düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada subklinik mastitisin folliküler gelişimi baskıladığı belirlenmiştir. Buna göre; subklinik mastitis ovaryum küçük follikül ve erken antral follikül popülasyonunu bozar, sonucunda haftalar sonra gelişen büyük preovulator folliküllerdeki düşük steroid seviyesine yol açar (Wolfenson vd., 2015).



Şekil 1.3: Sağlıklı (FF-control), eksojen Gram negatif (G-) E. Coli endotoksini, Gram pozitif (G+) S. Aureus endotoksini verilen ineklerin folliküler sıvılarında olgunlaşan oositlerin gelişim yetenekleri karşılaştırılması. a) fertilizasyondan 42-44 saat sonra oositin 2-4 hücreye cleavage yüzdesi, b) fertilizasyondan 8 gün sonra blastosist aşamasına gelişen embriyo oranı (Roth vd., 2016).

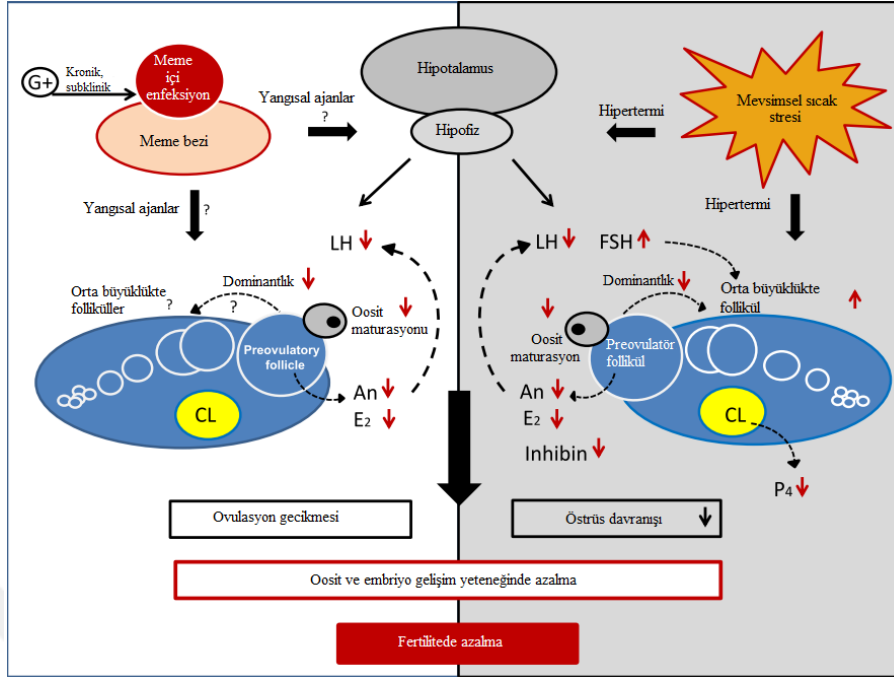
1.12. Oosit Kapasitesi Üzerine Etkisi

Oosit in vitro kültür ortamında maturasyon esnasında $PGF_{2\alpha}$ gibi yangısal ajanların ilave edilmesi blastosist oluşum oranını azaltmaktadır (Soto vd., 2003a, Hansen vd., 2004). Benzer şekilde maturasyon sırasında $TNF-\alpha$ ilavesi de blastosist oluşumunun azalmasına

yol açar. Ancak oositin fertilizasyonundan sonra TNF- α ilavesi apoptozise giden blastomer sayısını arttırır.

Mastitisli ineklerin folliküler sıvısının oosit maturasyonu mediumu olarak kullanıldığı çalışmada gram pozitif veya gram negatif etkenlerin toksinlerinin cleavage ve blastosit oluşumunu azalttığı ortaya konulmuştur (Asaf vd., 2014), (Şekil 1.3). Mastitisli ineklerin oositlerinin toplanarak in vitro embriyo üretiminin yapıldığı çalışmada blastosit oranının orta ve yüksek SHS'li hayvanların oositlerinde düşük SHS'li ineklere göre dikkat çekici şekilde düşük bulunmuştur. Bu çalışma oosit toplanmasından 3 ay önce mastitis teşhisi konulan hayvanlarda gerçekleştirildiği için araştırmacılar mastitisin germinal vezikül dönemindeki oosit havuzunda bulunan oositlere etki ederek gelişimlerini bozduğunu vurgulamaktadırlar (Rahman vd., 2012; Roth vd., 2013). Günümüzde gelişiminin erken dönemindeki folliküllerin mastitise duyarlı oldukları ileri sürülmektedir (Wolfenson vd., 2015).

Sığır oositlerinin TNF- α varlığında maturasyonu, fertilize oositlerin blastosist aşamasına gelişim oranının azalmasına neden olmuştur (Soto vd., 2003a). Ayrıca, TNF- α , PGF_{2 α} veya NO varlığında kültüre edilen embriyolarda apoptotik hücre oranında veya blastosist evresine gelişim geriliğinde artış gösterilmiştir (Pampfer vd., 1994; Wu vd., 1999; Chen vd., 2001; Soto vd., 2003b). Progesteron ile takviye edilen ineklere PGF_{2 α} verilmesi, düşük kalitede embriyolar ve düşük gebelik oranları ile sonuçlanarak PGF_{2 α} 'nın embriyo gelişimi üzerinde direkt bir etkiye sahip olabileceği düşüncesini güçlendirmiştir (Buford vd., 1996; Roth ve Wolfenson, 2016), (Şekil 1.4).



Şekil 1.4: Mastitisin reproduktif sisteme etki mekanizması (Roth ve Wolfenson, 2016).

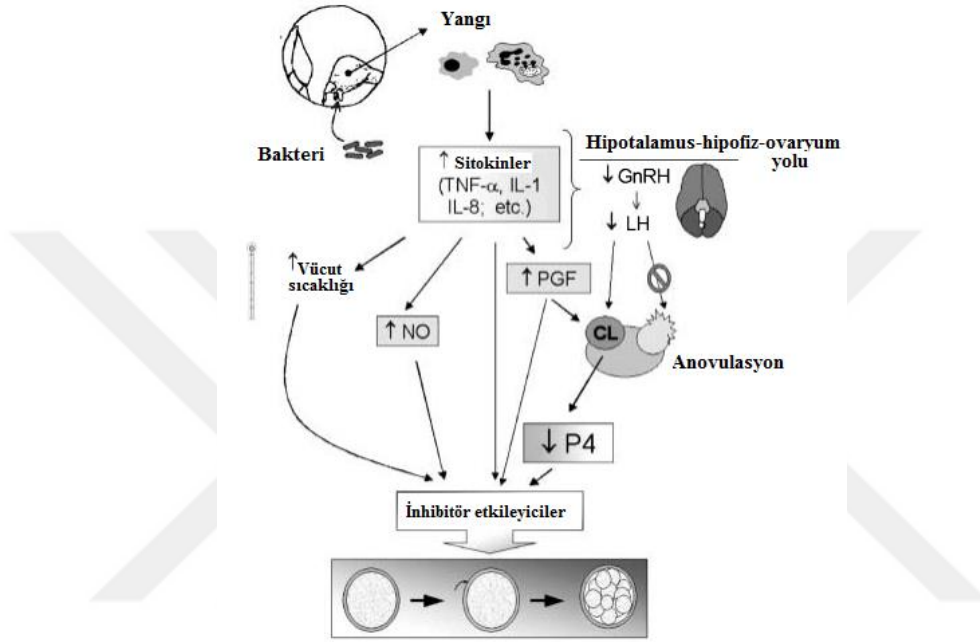
1.13. Mastitis ve Embriyonik Canlılık

Meme bezindeki enfeksiyonun kapsamlı bir etki ile embriyonik canlılığı azalttığı ortaya konulmuştur (Şekil 1.5). Sitokin düzeyindeki artışla birlikte yükselen vücut ısısı oosit maturasyonunu ve embriyo gelişimini geciktirir. Vücut sıcaklığı artışı oosit ve embriyo gelişim kapasitesini direk olarak değiştirdiği gibi besin maddesi alımını azaltarak dolaylı olarak ta etki göstermektedir (Hansen vd., 2004).

Endometriyum tarafından üretilen $PGF_{2\alpha}$, bir embriyo yoksa östrüs siklusunun sonunda ortaya çıkan lüteolizisten sorumludur. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ üretiminin $TNF-\beta$ ve $IL-1c$ gibi sitokinler tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (Davidson vd., 1995; Skarzynski vd., 2000). Bu nedenle; mastit, embriyonik/fetal ölümle sonuçlanabilecek $PGF_{2\alpha}$ 'nın salgılanmasına ve dolayısıyla erken luteolizde bir artışa neden olabileceği ileri sürülmüştür (Hansen vd., 2004).

Mastitisli ineklerdeki gözlemler reproduktif kanal dışındaki yangısal veya immun cevabın aktivasyonun embriyonik ölüme yol açabileceği yönündedir (Olechnowicz ve

Jaskowski, 2013). Hansen vd. (2004)'ne göre meme bezinin bakterilerce enfeksiyonu yangısal cevabı veya immün cevabı aktive eden bakteriyel kaynaklı lipopolisakkarit proteoglikan veya diğer moleküllerin salınımına neden olur. Bu salınım meme bezinden sitokinlerin sentezini ve lenf düğümleri aracılığı ile drenajını artırır. Belirli sitokinler direk olarak oosit ve embriyo fonksiyonunu engelleyici etkiye sahiptirler (Olechnowicz ve Jaskowski, 2013).



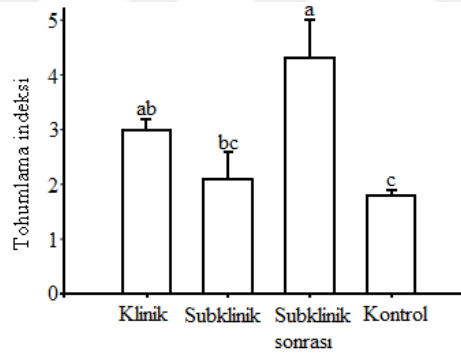
Şekil 1.5: Meme bezinin embriyo canlılığını azaltmada etki şekilleri (Hansen vd., 2004).

1.14. Somatik Hücre Sayısı ile Gebelik Oranı İlişkisi

Hem klinik mastitisin hem de subklinik mastitis reproduktif olaylarla negatif şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak özellikle subklinik mastitis çalışmalarında ortaya çıkan farklı sonuçlar olgunun tanım farklılığından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Nitekim bazı araştırmacılar subklinik mastitis olgularını SHS'nin 200.000 hücre/ml'den fazla durumları için kabul ederken bazıları ise 150.000 hücre/ml fazla olguları subklinik mastitis olarak kabul etmektedir (Ruegg vd., 2015).

Aşım öncesinde subklinik veya klinik mastitisli ineklerde sağlıklı ineklere göre ilk tohumlama zamanında artma, açık günlerde uzama ve tohumlama sayısında artış olduğu belirlenmiştir (Schrack vd., 2001). İlk tohumlama ile gebelik teşhisi arasında

semptomların subklinikten klinik belirtilere doğru değişmesinin reproduktif performansa önemli oranda etkisi vardır ve fertilitede azalma ile sonuçlanır. Somatik hücre sayısının gebelik oranında etkisini belirlemeye yönelik çalışmada tohumlama öncesi yüksek SHS, tedavi sonucu düşük SHS, tohumlama sonrası yüksek SHS ve kronik yüksek SHS enfeksiyonları olgularının tümünde gebe kalma oranında azalma tespit edildiği, ancak en fazla azalmanın kronik enfeksiyon olgularında olduğu bildirilmiştir. Tohumlama öncesi veya sonrası SHS artışı ile reproduktif performans azalması pozitif ilişkili bulunmuştur (Lavon vd., 2011; Hudson vd., 2012). Araştırmacılar (Lavon vd., 2011), tohumlama sürecinde oluşan SHS artışının gebe kalma oranını azalttığını, bu etkinin SHS arttıkça daha dikkat çekici olduğunu bildirmektedir. Aynı araştırmacılar tohumlamadan 10 gün önce 1.000.000 hücre/ml oluşması durumunda gebe kalmanın önemli oranda azaldığını bildirmektedir. Yangının şiddeti fertilitedeki azalmanın derecesi ile ilişkili bulunmuştur. Hudson vd. (2012), tohumlama sonrası 1-30 gün içinde SHS 200.000-399.000 olan ineklerde gebelik oranında %18 azalma bildirilmiştir. Hayvanlarda SHS>399.000 hücre/ml olduğu durumlarda ise gebelik oranında %26 azalma gözlemlendiği bildirilmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6: Sağılan ineklerde mastitis ile gebelik başına tohumlama sayısı ilişkisi: enfeksiyon şiddeti (Hansen vd., 2004).

Nguyen vd. (2011), tarafından yüksek SHS (200.000 ile 500.000 arası) sahip ineklerde SHS düşük (50.000-200.000) ineklere daha yüksek oranda luteal faz uzaması (postpartum ovaryum aktivitesinde anormallik) gözlemlendiğini bildirmektedirler. Postpartum dönemdeki yüksek SHS reproduktif performansta azalmaya yol açar. Mastitis tarafından oluşan gebelik başına tohum sayısının artışı mastitisin östrüste ovulasyonu engellemesi, fertilizasyon yetersizliği veya embriyonik ölüm oluşması ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Ruegg vd., 2015).

Meme içi enfeksiyonun subklinik formu genellikle SHS'de uzun süreli orta derecede bir artış ile karakterize kronik bir hastalıktır ve lokal veya sistemik yangı belirtisi yoktur. Hastalığın bu formu meme içine yerleştikten sonra birkaç ay boyunca devam eder (Schukken vd., 2003).

Çizelge 1.1: Subklinik mastitisin ineklerde reproduktif süreçte oluşturduğu değişiklikler (Wolfenson vd., 2015)

Hipofiz	Pulzatil LH	Etkilenmez
	Preovulatör LH piki	Düşük ve hayvanların 1/3'ünde gecikme
Adrenal	Kortizol	Etkilenmez
	Ovulasyon	Hayvanların 1/3'ünde gecikme
Preovulatör follikül	Foliküler steroid sentezi	Hayvanların 1/3'ünde düşük östradiol ve androstenoidin
	Gen bulunuşu	Teka ve granuloza hücrelerinde steroidojenik gen ve LH reseptör azalışı
Folikül gelişimi	Orta çaplı (6-9mm)	Uyarılmış enfeksiyonda azalır, doğal enfeksiyonda artar
Korpus luteum	Erken luteal regresyon ve progesteron	Etkilenmez
Oosit	Mastitisli inekin folliküler sıvısında maturasyon	Az blastosit oluşumu, maturasyon bozulması, apoptozis artışı, düşük GDF-9
	Mastitli inekten maturasyon öncesi toplama	GV safhasındaki oositin bozulması, az sayıda blastosit oluşumu

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Sunulan araştırma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29/09/2020 Tarih ve 49533702/302 sayılı onayı alındıktan sonra yürütüldü.

2.1.1. Hayvan Materyali

Araştırma Afyonkarahisar bölgesi, Bolvadin ilçesi ile civar köylerinde süt inekçiliği yapılan aile tipi işletmelerde yürütüldü. Genital organlarında klinik bir sorun bulunmayan, patolojik vaginal akıntısı olmayan, en son doğumu üzerinden 50 günden fazla zaman geçmiş olan 50 inek baş kullanıldı. Araştırma farklı ırklardan (Holstein, İsviçre Esmeri, Simmental) ve farklı yaşlardan hayvanlar üzerinde yürütüldü. Hayvanlardan 22 başı CMT negatif olanlardan seçildi (Mastitis negatif grup) (n=22). Geri kalan 28 baş CMT pozitif olanlardan, subklinik mastitis bulunan ineklerden seçilerek çalışmaya dahil edildi (Mastitis pozitif grup).

Vücut kondisyon skorlarının birbirlerine yakın olmasına özen gösterildi. Vücut kondisyon skoru 3-4 olan hayvanlar çalışmaya alınırken, bunun dışındaki skorlarda olan hayvanlar değerlendirilmeye alınmadı. Çalışma 2021 yılı Şubat ve Mayıs aylarında yürütüldü.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Ekipman

2.1.2.1. Ultrasonografi Cihazı

Genital organların durumunun tespiti gerçekleştirildi. Bu muayenelerde real time, B mod, 4-8 MHz linear array problu cihaz (DP 20, Mindray, China) ve Hasvet 3100 kullanıldı.

2.1.3. Sarf Malzemeler

2.1.3.1. California Mastitis Test Ayıracı

Tohumlama amacıyla gidilen işletmelerde tohumlama işleminin gerçekleştirilmesinden önce meme sağlığı değerlendirildi. Meme bezlerinde mastitis olup olmadığının kontrolü amacıyla CMT ayıracı (Kerba test, Kerbl) ve CMT test kapları kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Genel Sağlık Kontrolü

Tüm hayvanlar genel klinik muayeneden geçirildi. Her hangi bir sağlık sorunu bulunmayan sığırlar rektal palpasyonla muayene edildi.

2.2.2. Genital Organların Muayenesi

İneklerin östrüste oldukları teyit edildi. Herhangi bir patolojik olgunun olup olmadığı kontrol edildi.

2.2.3. Meme Bezinin Muayenesi

Çalışmada kullanılacak hayvanlarda meme bezi muayene edilerek sağlık durumu değerlendirildi. Meme loblarında kızarıklık, ısı artışı, ağrı gibi yangıyı gösteren belirtiler inspeksiyonla araştırıldı. Meme bezi palpe edilerek yapısal bozukluk olanlar, meme bezinde apse oluşumu, sertlik vb. anormal oluşumlar araştırıldı. Bu muayeneler sonrasında yapısal bozukluk tespit edilen inekler çalışmaya dahil edilmedi.

2.2.4. Süt Numunesinin Alınması

Yapısal bozukluk bulunmayan ineklerin memelerinden süt numuneleri alınarak kontrol edildi.

Bu kontrol sonrasında subklinik mastitis belirlenen hayvanlar çalışmaya katıldı. Araştırmaya dahil edilen ineklerden CMT uygulaması ve SHS belirlenmesi için süt numuneleri alındı. Öncelikle meme başları su ile yıkandı ve kirler uzaklaştırıldı, yıkama

sonrası tek kullanımlık kağıt havlu ile kurulandı. Meme başları pamuk ve alkol ile silinerek dezenfekte edildi. İlk üç çekimlik süt farklı bir kaba sağılarak uzaklaştırıldı. Süt numuneleri steril numune kaplarına alındı. Alınan süt numuneleri soğuk zincir altında Afyonkarahisar İl Gıda Kontrol Laboratuvarına iletildi.

2.2.5. California Mastitis Testi

Tüm hayvanlara CMT kontrolü uygulandı. Test dört bölümlü plastik kaplar ve CMT solüsyonu kullanılarak gerçekleştirildi. Meme loblarının her birinden 2 ml süt bölmelerine alındı ve üzerine eşit miktarda indikatör olarak CMT solüsyonu konuldu. Test kabı bu esnada dairesel hareketler yapılarak süt ve ayıracın karışması sağlandı. Dairesel hareketler yanında kap eğimli tutularak karışımın bir yöne doğru akması sağlandı ve bu esnada jel oluşumu izlenerek değerlendirildi. Oluşan karışımın rengine ve jel oluşumuna bakılarak süttün lökosit sayısı ve pH değeri derecelendirildi. Test skorları negatif (-), şüpheli, +1, +2 ve +3 olarak yorumlandı (Schalm vd., 1971). Test değerlendirmesi sonrasında skoru $\leq$ +1, +2 ve +3 olarak belirlenen meme lobları subklinik mastitisli, negatif olan lobları ise enfekte olmamış olarak değerlendirildi. Bir meme lobunda subklinik mastitis saptananlar subklinik mastitisli inek olarak kabul edildi (Tolosa vd., 2013).

2.2.6. Somatik Hücre Sayısının Belirlenmesi

Somatik hücre sayısının belirlenmesi Tarım ve Orman Bakanlığı, Afyonkarahisar Gıda Kontrol Laboratuvarında gerçekleştirildi. Kalifornia mastitis testi uygulanmasından sonra steril kaplara alınan süt numuneleri ortalama 1 saat içerisinde soğuk zincir altında laboratuvara iletildi.

Analizler, NucleoCounter® SCC-100™ (ChemoMetec, Denmark) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Cihazın çalışma prensibi; Epifluoresan mikroskopik incelemeyle yapılan konvensiyonel hücre sayımının, yeni teknolojiyle birlikte geliştirilmesi esasına dayanır. Somatik hücrelerin hücre çekirdeğine bağlı propidyum iyodür (PI) floresan boyadan sinyal algılayacak şekilde entegre edilmiş floresans mikroskopisine göre

dizayn edilmiştir. Sonuçların, numunenin hücre konsantrasyonunu direk olarak temsil ettiği ileri sürülmektedir.

2.2.7. Ultrasonografik Muayene

Çalışmaya dahil edilen tüm hayvanlar ultrason muayenesi gerçekleştirildi. Muayenelerde öncelikle hayvanların gebe olup olmadıkları ortaya konuldu. Gebe olmadıkları teyit edilen hayvanlarda ovaryumlar görüntülendi. Ovulatör follikülün bulunduğu ovaryum belirlenerek kayıt edildi. Görüntüleme sırasında ovulatör follikül en büyük çapı elde edilecek şekilde görüntü donduruldu. Ultrason cihazının özelliği ile çapı ölçüldü ve kayıt edildi.

Ultrason ile görüntülenen folliküller tohumlamadan 24 saat sonra tekrar yapılan muayene ile görüntülenerek ovulasyon olup olmadığı ortaya konuldu.

Çalışmada kullanılan hayvanlarda tohumlama sonrası 28-30. günlerde ultrasonografik muayene ile gebelik teşhisi yapıldı ve buna göre değerlendirmeler yapıldı.

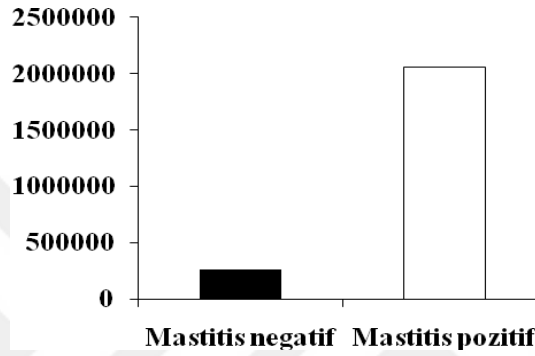
2.2.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada verilerin analizi Windows SPSS 20.0 Paket Programı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ile yapıldı. Matitis negatif ve Mastitis pozitif hayvanların folikül çapı, somatik hücre sayısı ve gebe kalma oranı istatistiksel olarak değerlendirildi. Somatik hücre sayısı ile follikül çaplarının analizinde t testi uygulandı. Hayvanların gebelik oranlarının karşılaştırılması kıkare testi ile yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Süt Somatik Hücre Sayıları

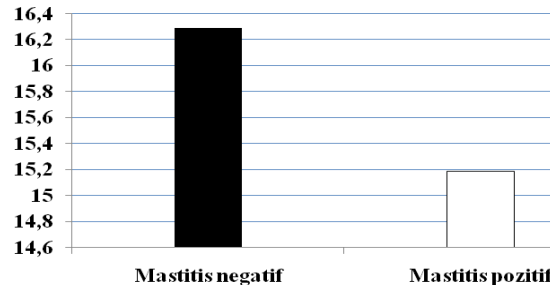
Hayvanlarda tohumlamadan hemen önce gerçekleştirilen CMT uygulamasında Mastitis pozitif bulunanların süt örneklerinde somatik hücre sayısı Mastitis negatif olanlardan önemli derecede yüksek bulundu ($p < 0.0001$) (Çizelge 3.1). Çalışmada kullanılan hayvanlardan alınan süt örneklerinde ölçülen somatik hücre sayıları Şekil 3.1'de verildi.



Şekil 3.1: Mastitis negatif ve Mastitis pozitif hayvanlarda somatik hücre sayıları

3.2. Ovulator Follikül Çapları

Çalışmada kullanılan hayvanlardan ultrasonografik muayene ile tohumlamadan hemen önce follikül çapları belirlenmiştir. Buna göre Mastitis negatif olan hayvanlarda ovulator follikül çapları Mastitis pozitif olanlardan daha büyük olarak ölçülmüştür. Mastitis negatif ve Mastitis pozitif olan hayvanların ovulator follikül çapları Şekil 3.2'de sunulmuştur. Grupların ovulator follikül çapları arasında belirlenen farklılık istatistiki olarak önemli değildi ($p < 0.136$).



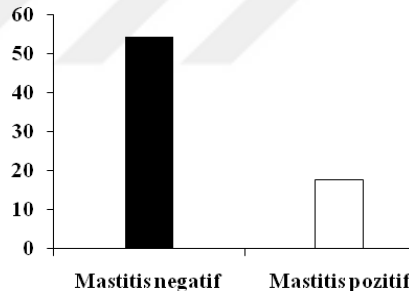
Şekil 3.2: Mastitis negatif ve Mastitis pozitif olan hayvanların ovulator follikül çapları

3.3. Ovulasyon Oranları

Çalışmaya katılan hayvanlarda yapılan ovulasyon kontrolü sonrasında ovulasyon oranlarında bir aksama olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Mastitis negatif ve Mastitis pozitif olan hayvanlarda bezer ovulasyon oranlarının olduğu gözlemlendi. Hayvanların ovulasyon oranları Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

3.4. Gebelik Oranları

Sunulan araştırmada tohumlanan hayvanlara tohumlama sonrası 28-30. Günlerde ultrasonografik yöntemle gebelik muayenesi yapıldı. Bu muayeneler sonrasında Mastitis negatif olan inekler ile Mastitis pozitif olan ineklerdeki gebe kalma sayılarının önemli şekilde farklı olduğu belirlendi ($p<0,005$), (Çizelge 3.1). Mastitis hastalığının olması ineklerde gebe kalma oranında azalmaya yol açtığı gözlemlendi. Mastitis pozitif olan ineklerde gebelik oranı Mastitis negatif ineklerden önemli derecede düşük olduğu tespit edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Mastitis negatif ve Mastitis pozitif olan ineklerde belirlenen gebelik oranları

Çizelge 3.1: Mastitis negatif ve Mastitis pozitif ineklerde somatik hücre sayısı, ovulatör follikül çapı, ovulasyon oranları ve gebe kalma oranları

	Mastitis negatif (n=22)	Mastitis pozitif (n=28)	P
Somatik hücre sayısı (hücre/ml)	256955±116867	2058143±1506619	<0,0001
Ovulatör follikül çapı (mm)	16,29±2,81	15,19±2,05	<0,136
Ovulasyon oranı (%)	90,90 (20/22)	96,42 (27/28)	>0,05
Gebelik oranı (%)	54,54 (12/22)	17,85 (5/28)	<0,005

4. TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan hayvanların süt SHS'ları arasında önemli fark bulundu. Somatik hücre sayısı sütte mililitre başına toplam hücre sayısıdır. Sütteki somatik hücreler meme bezindeki yangı ile mücadele için ineğin bağışıklık sistemi tarafından üretilen ve kandan süte geçen lökosit ve lenfositler ile meme dokusu ve kanallarındaki epitel hücre artıklarından oluşur. Meme bezindeki yangının şiddeti arttıkça sütteki lökositlerin sayısı artar. Süt SHS tek bir inekte veya sürüde (tank sütü değerlendirilmesiyle) mastitis derecesinin dolaylı bir göstergesidir (Looper, 2013). Süt somatik hücre sayısı değişik yöntemlerle izlenebilir. Bu yöntemlerden sahada uygulaması kolay olan biri CMT'dir. Bu test sütteki hücre sayısının kabaca belirlendiği basit ve kullanışlı bir testtir, sütteki SHS ile ilişkilidir ve mastitis olgularında pozitif sonuç verir. Günümüzde sütteki somatik hücre sayısını otomatik olarak sayımını yapan cihazlar geliştirilmiş olmasına rağmen CMT hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Sunulan araştırmada hayvanlarda tohumlamadan hemen önce gerçekleştirilen CMT uygulamasında, pozitif bulunanların süt örneklerinde SHS Mastitis negatif olanlardan önemli derecede yüksek bulundu ($p < 0.0001$). Buna göre CMT testinin süt SHS değişikliklerini göstermede etkili olduğu ortaya konulmuştur.

Süt SHS meme sağlığını izlemeye önemli bir kriter olmakla birlikte yaş, ırk, laktasyon, siklus dönemi, beslenme, enfeksiyon bulunuşu ve mastitise yol açan bakteri türleri gibi bir çok faktör bu sayıyı etkileyebilir (Busato vd., 2000).

İneklerde östrüs siklusunun farklı dönemlerinin SHS'na etkisini belirlemeye yönelik araştırmalar yapılmıştır. Östrüsün süt SHS'na etkisine yönelik bildirilen sonuçlar tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar östrojenlerin SHS'nı arttırdığını bildirirken (Haenlein ve Krauss, 1974), bazıları ise (Anderson vd., 1983), östrüs siklusunun süt SHS'na bir etkisinin olmadığını ileri sürmektedirler. Son zamanda yapılan bir araştırmada östrüs siklusu dönemlerinin meme bezi aktivitesini etkilediği belirlenmiştir (Alvarado vd., 2018). Östrüs siklusu dönemleri süt bileşenleri düzeylerinde değişikliğe neden olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmada ineklerde SHS'nın diöstrüsten proöstrüs dönemine kadar düzenli şekilde arttığı, ancak sonraki dönemler olan östrüs ve metöstrüs dönemlerinde düzenli şekilde azaldığı ve diöstrüsteki başlangıç seviyesine indiği

belirlenmiştir (Alvarado vd., 2018). Östrüs ile proöstrüs ve metöstrüs dönemleri arasında fark belirlenmemiştir. Araştırmacılar SHS sayısında oluşan bu değişim östrüsten 1 gün önce pik yapan meme bezinde seviyesi artan östrojene bağlamaktadırlar. Nitekim eksojen östrojen implantı verilen hayvanlarda SHS'ında önemli bir artış olduğu bildirilmektedir (Lammers vd., 1999). Sunulan araştırmada süt örnekleri östrüs belirtileri gösteren ve suni tohumlama yapılması istenen ineklerden alındı. İneklerin SHS'ları farklı bulundu. Hücre sayıları arasında fark olmasına rağmen östrüslerin gözlenmesi östrüs belirtilerinin ortaya çıkmasında SHS'nın etkisinin olmadığı şeklinde değerlendirilebilir. Ayrıca östrüs gününün SHS'na etkisinin olmaması sunulan araştırmadaki hayvanlar arasındaki SHS yüksek olmasının nedeni enfeksiyon kaynaklı olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir.

Çalışmada kullanılan Mastitis negatif olan hayvanlarda ovulatör follikül çapları Mastitis pozitif olanlardan daha büyük olarak ölçülmüştür. Ancak grupların ovulatör follikül çapları arasında belirlenen farklılık istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p < 0.136$). Klinik veya subklinik mastitis endokrin düzeni ve folliküler gelişimi değiştirerek reproduktif başarıyı etkiler. Klinik veya subklinik mastitisin reproduksiyon üzerine etkisi follikül düzeyinde ortaya çıktığı ileri sürülmesine rağmen bu etkinin oluşmasıyla ilgili ortaya konulan bilgiler tartışmalıdır. Kimi araştırmacılar (Rahman vd., 2012), folliküler gelişimi tüm süreçte etkilediğini bildirmesine rağmen diğerleri (Schrick vd., 2001) bu etkinin sadece primer ve sekonder folliküler aşamasında görüldüğünü, ileri aşamadaki folliküllerde etkisinin olmadığını ileri sürmektedir.

Antral follikül sayısı folliküllerin ve oositlerin sağlık göstergesidir. Fertilite yüksek antral follikül sayısına sahip ineklerde, düşük antral folliküllü ineklerden daha yüksek belirlenmiştir. Bu nedenle yangısal olayların etkisiyle ortaya çıkan primordial follikül azalması sütçü ineklerde fertilitenin kalıcı olarak olumsuz etkilenmesiyle sonuçlanabilir. Primordial folliküller hayvanlarda pubertastan ölüme kadar oosit üretim havuzudur. Oksidatif stres ve enfeksiyon aynı zamanda primordial follikülleri premature aktive ederek havuzdan ayrılmaya yol açabilir. Aktive olan folliküllerin yaşamı atreziye uğrama veya ovulasyona gitme olarak iki muhtemel şekilde sonlanır. Sığır ovaryum korteksine bakteri LPS uygulanmasıyla primordial folliküllerin sayısında akut bir

azalma oluşturulmuştur. Primordial folliküllerin havuzdan erken ayrılması reproduktif yaşam sürecini olumsuz etkiler (Furman vd., 2014, Sheldon 2015, Santos vd., 2018). Kronik mastitis ile ovaryum fonksiyonlarındaki değişim arasında bir ilişkinin varlığını gösteren verilere ulaşılmıştır. Bu bulgu hem klinik hem de subklinik mastitisin fertilité üzerine olumsuz etkisini bildiren verileri desteklemektedir. Araştırmacılara göre fertilité üzerine olan bu olumsuz etki ovaryum ve follikülde meydana gelen değişimleri kapsamaktadır. Lavon vd. (2011)'e göre kronik meme içi enfeksiyon follikülogeneze gelişim sürecinin farklı dönemlerinde hasar verebilmektedir. Rahman vd. (2012)'nin araştırma sonuçları da follikülogenezin mastitis tarafından etkilendiği bilgisini desteklemektedir. Bu araştırmaya göre hem primer aşamadan sekonder aşamaya geçiş, hem de en büyük follikül gelişimi kronik enfeksiyon bulunan ineklerde daha az etkin bulunmuştur. Sunulan araştırmada ovulatör folliküllerin çapları arasında fark olmamasının nedeni hastalığın kronik aşamada olmaması olabilir. Çünkü folliküllerin uzun süreli enfeksiyonlardan olumsuz etkilenmesi söz konusudur.

Mastitisin ovaryum üzerine etkisi mikroskopik düzeyde de belirlenmiştir (Rahman vd., 2012). Folliküller bireysel olarak sadece antrum şekillenmesinden ve teka interna ve eksterna farklılaşması gerçekleştikten sonra damarsal destek ile çevrelenmiştir. Bu nedenle kortikal stromada bulunan primordial ve primer folliküller damar desteğinden yoksundurlar. Primordial follikül aktivasyonunun ve primer follikülün erken preantral aşamaya dönüşümünde damarsal desteğe yakınlığın bulunuşunu içerdiği düşünülmektedir. Kapiller damar ağına yakınlığın erken folliküler gelişimin muhtemel mekanizmalarından biri olduğu ileri sürülmektedir. Bu süreç başlıca direk olarak endotel hücrelerinden üretilen VEGF gibi büyüme faktörleri ile sitokinler gibi ovaryum içi faktörlerin kontrolü altındadır. Nitekim Yang ve Fortune (2007), tarafından invitro şartlarda kültür medyumuna VEGF ilavesi primer folliküllerin sekonder aşamaya geçişini 7 kat arttırdığı belirlenmiştir. Sığır ovaryumunda gelişimi kan kaynaklı faktörlere bağlı sekonder folliküller damar yatağı azalmasına karşı primordial ve primer folliküllerden daha duyarlı bulunmuştur. Araştırmada orta büyüklükteki (1-7 mm) folliküller üzerine etkinin olmadığı bulunmuştur (Rahman vd., 2012). Kronik mastitisli hayvanlarda ovaryumda folliküllerle ilişkili olarak damar yatak azalması belirlenmiştir. Ovaryum korteksinde vasküler yatak azalması ile birlikte görülen ovaryum stromasında

fibrotik değişim mastitisle ilişkili bulunmuştur. Araştırıcılara göre (Rahman vd., 2012) bu azalma primer follik lerin sekonder follikül aşamasına ilerleme kapasitesinde azalmaya neden olabilir.

Meme bezinin yangısı esnasında yangı  nc  sitokinleri salgılayan dolaşımdaki lökosit miktarında artış olur. Bu sitokinler folliküler sıvı kompozisyonunu, oosit gelişmesini ve oosit ve kumulus hücrelerinde özel gen bulunuşunu etkileyebilir. Yangı  nc  sitokinleri folliküler gelişim esnasında oositlerin gelişimi ve olgunlaşması hormon etkisine, özel genlerin miktar ve varlığı ile follikül sıvısındaki yapıların varlığına bağlı olduğu için oosit gelişim yeteneğini olumsuz olarak etkileyebilir (Santos vd., 2018). Nitekim mastitis esnasında GDF-9 geninin bulunuşunun da olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Mastitis etkisinde bulunan ineklerin ovaryum yapılarında damarsal yatakta azalma, fibrotik dokuda artış yanında GDF-9 gibi oosit spesifik faktörlerde bir değişiklik olur. Bu faktörlerin tümü follik logenezisin düzenlenmesinde temel elementlerdir ve bir bölümüyle kronik mastitisin fertilit yi baskılamasını açıklayabilir. Growth differentiation Factor 9 follikülogenez, oogenez ve ovulasyonun tüm süreçlerinde bulunur ve bu nedenle fertilit de önemli role sahiptir. Mastitisin oosit üzerine etkilerinin doğrulanması için follik logenezisin erken dönemlerinde GDF-9 bulunuşu değerlendirilmiştir. Birçok memeli türünde GDF-9, granuloza hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmaya izin veren etkisi ile erken foliküler gelişim için zorunlu olduğu düşünülmektedir. Bu genin bulunmamasının ovaryum büyüklüğünün azalmasına, foliküler gelişimin primer folikül aşamasında durmasına ve herhangi bir korpus luteumun olmamasına neden olduğu bildirilmiştir. Eksiklik durumunda granuloza hücrelerinin proliferatif yeteneği önemli ölçüde azalır. Böylece oosit gelişimini destekleyen granuloza hücre katmanı çoğalamaz ve tek katmanlı olur. Birincil katman atipik ve asimetrik geliştikten sonra her hangi bir somatik hücre şekillenmesi gerçekleşmez. Sonuçta follikül atretik hale gelir ve dejenere olur. Folikül gelişiminin sonraki aşamalarının tipik özelliği kumulus hücre katmanının ortaya çıkmasıdır. GDF-9, normal foliküler gelişimde karakteristik bir süreç olan kumulus hücre katmanının genişlemesine hyaluronik asit açısından zengin bir hücre dışı matris formasyonuna izin vererek neden olur. GDF-9 bulunuşunun engellenmesi, kumulus hücre genişlemesinin olmaması ile sonuçlanır.

Eksojen toksin verilerek oluşturulan mastitis olgularının aksine doğal oluşan subklinik mastitiste dominantlığın baskılanması sonucu orta büyüklükteki follikül sayısında bir artış gözlenmiştir. Orta büyüklükteki folliküllerin aksine preovulatör folliküllerin büyümesinin ve çapının doğal veya uyarılmış enfeksiyon sonucu oluşan mastitisten etkilenmediği de belirlenmiştir. (Lavon vd., 2010; Lavon vd., 2011; Furman vd., 2014). Aynı görüş sağlıklı ve mastitisli ineklerde yaptığı araştırmada subklinik mastitisin dominant follikülün ve ovulatör follikülün çapı ve folliküler büyümeyi olumsuz etkilemediğini belirleyen Santos vd. (2018), tarafından da bildirilmektedir. Mastitis preantral ve orta büyüklükteki folliküllerde büyümeyi azaltırken bu etkinin mastitisli ineklerdeki fertilité azalmasıyla ilişkisi açıklığa kavuşturulamamıştır (Riollet vd., 2001). Subklinik mastitisin folliküler büyüme üzerine etkisi tartışmalıdır. Mastitisin follikül gelişimine etkisi folliküler gelişim sürecinin tüm aşamalarında aynı şekilde ortaya çıkmadığı anlaşılmaktadır. Folliküler gelişimi olumsuz etkilediğini (Rahman vd., 2012) ileri süren araştırmalar yanında etkilemediğini (Lavon vd., 2010, Santos vd., 2018) ileri süren araştırmalar da bulunmaktadır. Preovulatör ve ovulatör follikül gelişimini etkilediğini ileri süren araştırmalar meme içi toksin verilerek oluşturulan deneysel çalışmalardır. Doğal enfeksiyon sonucunda folliküler gelişimin büyük ve ovulatör follikül aşamasında olumsuz etkilenmediği düşünülmektedir. Nitekim doğal mastitis enfeksiyonlarında folliküler sıvı steroid düzeyi azalmasıyla ilişkili olarak oluşan follikül dominantlık azalması tarafından oluşturulan orta büyüklükteki folliküllerde artış ortaya konulmuştur.

Subklinik mastitisin follikül gelişimine etkisinin enfeksiyonun şiddetine bağlı olduğu düşünülmektedir. Şiddetli şekilde kronik mastitisten etkilenen ineklerde çapı 1-3 mm ve 4-7 mm olan folliküller enfeksiyondan etkilenmezken >8 mm olan preantral follikül sayısında azalma ortaya çıkmaktadır. Bu bulgu kan damarı yoğunluğunda bir azalma ve oositte temel follikül gelişim faktörlerinden olan GDF-9 faktör bulunuş azalması ile ilişkili bulunmuştur. Mastitis enfeksiyonunda kaynaklanan toksinlerin orta büyüklükteki follikül sayısında azalmadan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Preovulatör folliküllerde büyüme ve gelişme mastitisten etkilenme görülmemiştir. Mastitisin aksine postpartum uterus enfeksiyonlarında dominant folikül büyüme ve gelişmesinde azalma belirlenmiştir. Yazarlara göre mastitis preantral ve orta büyüklükteki folliküllerde

gelişmeyi olumsuz etkilemektedir ancak bu etkinin fertilite azalmasıyla ilişkisi bilinmemektedir (Rahman vd., 2012).

Enfeksiyonun şiddeti kadar etki süresinin de sonuçlar üzerindeki farklılıklardan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Subklinik mastitisin ovaryum üzerinde etkisini uzun süreli varlığıyla gösterdiği ortaya konulmuştur. Akut stres olgularında bir kaç saat içinde yükselen kan sitokin düzeyinin 48 saat içinde normale döndüğü oysa subklinik mastitis durumunda enfeksiyonun varlığının bir kaç hafta veya aylarca sürebileceği değerlendirilmiştir (Furman vd., 2014).

Kontrollü deneysel yöntemle Gram negatif bakteri ve Gram pozitif bakteri toksinleri verilerek oluşturulan uzun süreli subklinik mastitisin folliküler cevaba etkisinin değerlendirildiği araştırmada, Gram pozitif bakteri toksinlerince oluşturulan subklinik mastitis sonucunda folliküler büyüme dinamiklerinin zayıfladığı belirlenmiştir. Ortaya çıkarılan bu etki toksine maruz kalmanın folliküllerin erken döneminde olumsuz etkilendiğini gösterdiği ileri sürülmüştür. Uyarılmış subklinik mastitisin etkisiyle orta büyüklükteki folliküllerin sayısında azalma oluşmasına rağmen preovulator folliküllerin büyüme oranlarında ve büyüklüklerinde bir etki gözlenmediği belirtilmektedir. Erken antral dönemdeki küçük folliküller maruz kaldıkları subklinik mastitisin negatif etkisine daha duyarlıdır. Bu olumsuz etkilenmenin folliküllerdeki steroid sentezinin azalmasına bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Küçük çaplı follikülerden elde edilen granuloza hücrelerinin daha düşük E2 ürettiği belirlenmiştir (Furman vd., 2014). Subklinik mastitiste toksine maruz kalma follikülogenezis sırasında küçük folliküllerin fonksiyonunu bozar. Bu fonksiyon bozulmasının etkisi daha ileri aşamalarındaki preovulator folliküllerde de kendini göstermeye devam eder. Ancak hayvanlar arasında bireysel bir varyasyon olduğu bildirilmektedir.

Gram pozitif bakteri toksinlerince uyarılan subklinik mastitisin folliküler steroid sentezine etkisinin daha çok bireysel inek faktörlerine bağlı olduğu ifade edilmektedir. Araştırmacılara göre bakteri inokülasyon, LPS verilmesi, kortizol bağlantılı stres gibi faktörlerinde ineklerde bireysel farklılıkların bulunduğu bildirilmiştir. Bireyler arasındaki farklılıkların kökeninin ise genetik farklılıklara dayandırılabilen ileri

sürülmektedir. Nitekim meme bezi epitel hücrelerinin 18. Otosom üzerinde Q alleli bulunduran bireylerin q alleli bulunduranlara göre E coli veya S. Aureusa maruz kalmaya daha güçlü ve daha hızlı reaksiyon verdikleri belirlenmiştir (Furman vd., 2014).

Sunulan araştırmada Lavon vd. (2010) ve Furman vd. (2014) tarafından bildirilenlerle uyumlu şekilde ovulatör folliküllerin çaplarının mastitisten etkilenmediği ortaya konulmuştur. Mandalar üzerinde gerçekleştirilen bir araştırmada ineklerde bizim belirlediğimizden farklı olarak ovulatör follikül çapının etkilendiği ileri sürülmektedir. Araştırmacılar (Mansour vd., 2017) mastitis bulunmayan mandalarda ovulatör follikül çapı subklinik ve klinik mastitis bulunanlardan daha büyük belirlenmiştir. Gebe kalan mandaların ovulatör follikül çapı gebe kalmayanlardan büyük çaplı olduğu gözlenmiştir. Mandalarda küçük çaplı folliküle sahip olanların gebelik oranının büyük çaplı olanlardan daha düşük olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Çalışmaya katılan hayvanlarda yapılan tohumlama sonrasında ovulasyon gerçekleşip gerçekleşmediği belirlendi. Ovulasyon tohumlamadan 24 saat sonra gerçekleştirilen ultrasonografik muayene ile tespit edildi. Buna göre Mastitis negatif hayvanlarda ovulasyon oranı (% 96,42) Mastitis pozitif hayvanlardan (% 90,90) daha yüksek olduğu görüldü. Mastitis negatif olan ve Mastitis pozitif olan hayvanların ovulasyon oranları arasında fark olmasına rağmen grupların ovulasyon oranları arasındaki bu fark önemli değildi.

Ovulasyon kontrolü ineklerde klinik olarak direk veya dolaylı yoldan olmak üzere 2 şekilde yapılabilir. Direk yöntem ovulasyonun rektal veya ultrasonografi ile doğrulanmasıdır (Giordano, 2007). Bu yöntemde ovulatör follikülün yerleştiği ovaryumun daha önceden bilinmesi gereklidir. Dolaylı yöntem ise siklusun ilerleyen günlerinde ovaryumlardan birinde korpus luteumun varlığının belirlenmesidir. Sunulan araştırmada ovulasyon ultrasonografik muayene ile kontrol edildi ve doğrulandı.

Ovulasyon, primordial foliküllerin aktivasyonu ile başlayan ve döllenebilen olgun bir oositin salınması ve korpus luteumun oluşumu ile sonuçlanan olaylar zinciridir. Ovulasyon, ovaryumda bir dizi olayı başlatan, apikal folikül duvarının yırtılmasından,

hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesinden ve hücre farklılaşmasından sorumlu olan çok sayıda ve farklı parakrin/otokrin faktör ve enzim üretiminden sorumlu hipofiz LH artışı tarafından tetiklenir. Ovulasyon sürecinin anlaşılması, inek fertilitesiyle ilgili sorunları anlamak ve hayvan yetiştiriciliğine uygulanan teknolojileri geliştirmek için önemlidir.

Beslenme ve bakım şartlarının iyileştirilmesi, tohumlama, embriyo transferi ile elde edilen genetik ilerleme sonucu sütçü işletmelerde verimlilik sürekli artmaktadır. Bu artış sonucu süt verimi dikkati çeken şekilde yükselmiştir. Ancak süt verimindeki bu artış sonucu doğum aralığında uzama meydana gelmiştir. Bahsedilen reproduktif performans azalmasının bir nedeni östrüs belirtilerinin zayıflaması ve östrüs süresinin kısalması olarak ileri sürülmüştür. Bu nedenler tohumlama başarısızlığında artma, uygun tohumlama zamanının kaçırılması ve sonucunda gebe kalma oranında azalma ile doğum aralığında uzama sonucunu ortaya çıkarmıştır (Rayos ve Redondo, 2015).

Suni tohumlama uygulamasının başarıyla sonuçlanmasında tohumlamanın uygun zamanda yapılması önemlidir. Böylece yüksek fertilite oranına ulaşmada etkili olan spermin, ovulasyon öncesi dişi genital kanalında uygun zamanda ve sürede depolanması sağlanmış olur. Oosit ve sperm hücreleri kısa yaşam süresine sahiptir. Bu nedenle gebeliğin oluşması için sınırlı zamanları bulunmaktadır. İnek erken tohumlanırsa ovulasyon gerçekleşinceye kadar sperm yaşlanacaktır ve oositi dölleyemeyecektir. Aksine tohumlama geç yapılacak olursa yumurta yaşlanacağı için fertilizasyon ve canlı embriyo oluşması mümkün olmayacaktır (Roelofs, 2005). Suni tohumlama zamanlamasında bozulmaya yol açan ovulasyon gecikmesi döl tutma sorunu ortaya çıkmasına yol açar (Rayos ve Redondo, 2015). Ovulasyon gecikmesinde östrüs ile ovulasyon aralığında uzama oluşur. Ovulasyon zamanını değişik faktörler etkilemektedir. Beslenme ve bakım şartları ile çevresel etkiler ovulasyon gecikmesi oluşturabilir. Östrüs oluşumu, LH piki zamanlaması ile LH salınım miktarı arasındaki uyumsuzluklar ovulasyon gecikmesi oluşturabilir (Rayos ve Redondo, 2015). Sunulan çalışmada hayvanların ovulasyon oranları arasında fark olmamasına rağmen gebe kalma oranları arasında oluşan farklılık gebe kalma üzerine başka faktörlerin olumsuz etkisine bağlanabilir.

Mastitisin ineklerde ovulasyon üzerine olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Rahman vd., 2012; Sheldon 2015). Ancak bu bildirimde bulunan araştırmacılar daha çok klinik mastitisin etkisi üzerinde durmaktadırlar. Subklinik mastitisin ovulasyon üzerine etkisinin bulunmadığını bildiren araştırmalar yanında olumsuz etkilediğini bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır.

Foliküler faz sırasında tohumlama öncesinde şekillenmiş klinik mastitis olgularının pulsatil LH sekresyonunu önemli şekilde azalttığı, östrüse yakın düşük E2 sekresyonuna yol açtığı ve sonrasında LH pikinde ve ovulasyonda gecikmeye neden olduğu belirlenmiştir. Ancak bu etkiler akut, kısa süreli ve deneysel patojenik etki, endotoksin veya bakterinin meme içi verilmesiyle oluşturulmuştur. Klinik mastitislerde GnRH ve LH sekresyonunu baskılayan kortizol düzeyinde yükselme ile sonuçlanan glikokortikoid sisteminin aktive edildiği belirlenmiştir. Mastitisin; LH'nın pulzatil salınımında azalma, E2 üretiminde düşme oluşturduğu ve bazı hayvanlarda östrüs belirtilerini bloke ettiği gözlenmiştir. Araştırmacılara göre bu etkiler akut klinik mastitisli ineklerde ovulatör LH artışının olmaması ve sonucunda ovulasyonun engellenmesini açıklamaktadır (Chebel, 2007).

Belirlenen bu etkilerin subklinik ve aylar süren uzun süreli olgularda aynı şekilde yorumlanamayacağı ileri sürülmüştür. Klinik mastitislerde GnRH ve LH sekresyonunu baskılayan kortizol düzeyinin subklinik mastitisli ineklerde etkilenmediği görülmüş, bunun sonucunda subklinik mastitisli ineklerde LH pulzatil salınımında değişiklik oluşmadığı ileri sürülmüştür. Pulzatil salınımında değişiklik gözlenmemesine rağmen ovulasyon gecikmesi bulunan subklinik mastitisli ineklerde preovulatör LH piki seviyesinde %30 düzeyinde bir azalma, pik oluşumunda azalma veya pik oluşumunun engellenmesi gözlemlendiği bildirilmektedir (Wolfenson vd., 2015).

Subklinik mastitisin ovulasyon üzerine etkisini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada; (Giordano, 2007) subklinik enfekte ineklerde östrüs-ovulasyon aralığının normal sağlıklı ineklere (28.5 saat) göre uzadığı (56 saat) belirlenmiştir. Aynı zamanda ovulasyon gecikmesi bulunan mastitisli ineklerde östrüse yakın dönemde E2 düzeyi %50 oranında düşük bulunmuştur.

Araştırmacıların ileri sürdüklerine göre akut bir klinik meme içi enfeksiyonun östrus ve potansiyel ovulasyona yakın bir yerde indüklenmesi sonucu ovulasyon zamanlamasını etkili bir şekilde değiştirebileceğini veya tamamen engelleyebileceğini göstermektedir. Klinik mastitis durumunda kanda LPS ve TNF- α düzeyinde artış oluşur. Kanda düzeyi yükselen LPS ve TNF- α ovaryum granuloza hücrelerinde E2 üretimini olumsuz etkiler. Östradiol östrus ve ovulasyon süreçlerinde merkezi bir rol oynar. Östradiol üretiminin engellenmesi östrus ve ovulasyonun fizyolojik düzeninde değişimlere neden olur (Isobe vd., 2014). Araştırmacılara göre LPS'ye maruz kalma zamanı ve şiddeti ovulasyonu etkileyip etkilememesine yol açmaktadır. Siklusun folliküler döneminde intrauterin veya intravenöz LPS uygulanması inek veya koyunlarda pulsatil LH sekresyonunu bastırarak ovulasyonu geciktirdiği veya önlediği belirlenmiştir. Östrüsün başlangıcındaki ineklerde meme içi veya damar içi akut bir LPS uygulanmasının, pulsatil LH veya E2 konsantrasyonlarını değiştirmediği, ancak LH artışını engelleyerek ovulasyonu geciktirdiği bildirilmiştir (Battaglia vd., 2000; Lavon vd., 2008).

Subklinik meme içi enfeksiyona neden olan patojen bakterilerin LPS salgılamasına göre ovulasyon üzerine etkisi değişebileceği düşünülmektedir (Battaglia vd., 2000; Lavon vd., 2008). Meme içi LPS oluşumuna neden olmayan enfeksiyonlarda ovulasyon etkilenmemesi, aksine LPS salınımına yol açan patojenlerce oluşturulan enfeksiyonlarda ise ovulasyonun olumsuz etkilenmesi beklenebilir. Sunulan araştırmada subklinik mastitisli ineklerle mastitis bulunmayan inekler arasında ovulasyon oranlarının farklı bulunmamasının nedeni her iki grupta da LPS etkisini ortaya koyacak bakterilerin enfeksiyona yol açmamış olması olabilir.

Sunulan araştırmada kullanılan hayvanlara tohumlama sonrası 28-30. günlerde ultrasonografik yöntemle gebelik muayenesi yapıldı. Tohumlamadan sonra 28-30 günlerde gebelik durumunu transrektal ultrasonografi kullanarak değerlendirilmesinin oldukça duyarlı ve spesifik olduğu bildirilmektedir (Fricke, 2002). Gebelik teşhisi tek bir kişi tarafından yapıldı ve yetersiz sonuçlar elde edildiğinde, inekler 1 hafta sonra yeniden muayene edildi. Bu nedenle, gebelik durumunun yanlış sınıflandırılmasının bu çalışmanın sonuçlarını olumsuz etkilemediği anlaşılmıştır.

Gebelik teşhisi sonrasında Mastitis negatif olan inekler ile Mastitis pozitif olan inekler arasında gebe kalma oranlarının önemli şekilde farklı olduğu belirlendi ($p<0,005$).

Mastitis hastalığının olması ineklerde gebe kalma oranında azalmaya yol açtığı gözlemlendi. Mastitis pozitif olan ineklerde gebelik oranı Mastitis negatif ineklerden önemli derecede düşük olduğu tespit edildi.

Yeni şekillenen bir embriyonun geleceği belirsizdir. Süt sığırlarında gebelik oranı son yıllarda azalmaktadır. Çok faktörlü olduğu düşünülen bu problemde embriyonun hayatta kalmasına ve ölümüne aracılık eden karmaşık mekanizmalar ortaya çıkarılmaya devam edilmektedir. Son zamanlarda sığırlarda yapılan çalışmalar, üreme sistemi dışındaki sistemlerden kaynaklanan enfeksiyöz hastalıkların gebelik oranlarının düşmesine neden olabileceği fikrinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Araştırmacılara göre enfeksiyöz hastalıkla ilişkili yangısal veya bağışıklık yanıtları diğer etkileri yanında fertilizasyon başarısızlığına ve embriyonik mortaliteye neden olabilir. Sığırlarda reproduksiyonu etkileyen enfeksiyöz hastalıklardan biri de mastitistir.

Mastitisin üremeye etkisi; hastalığın üreme süreçlerine göre oluşum zamanına, enfeksiyonun şiddetine (subklinik veya klinik enfeksiyon) ve enfeksiyonu oluşturan etkene (Gram negatif veya Gram pozitif etken) göre değişebileceği bildirilmiştir. Mastitin üremeye etkisi folikül gelişimi, ovulasyon, tohumlama, gebe kalma, erken embriyo gelişimi, implantasyon veya diğer üreme süreçlerinde ortaya çıkabilir (Fuenzalida vd., 2015; Dolecheck vd., 2019).

Sığırlarda invitro oosit maturasyon vasatına TNF- α 'nın fertilizasyondan sonra ilave edilmesinin daha sonraki süreçlerde gerçekleşecek olan cleavage oranını değiştirmediği bildirilmiştir. Bunun aksine TNF- α 'nın fertilizasyon öncesi ilave edilmesi durumunda blastosist gelişen oosit oranında azalma oluşmuştur. Fertilizasyon sonrası embriyolara TNF- α ilave edildiğinde blastosist gelişme oranı etkilenmezken apoptik blastosist oranında artış olduğu belirlenmiştir. Bu şekilde apoptozis uyarıcı etkisi nedeniyle TNF- α iç katman hücre sayısında azalmasına katkı yapmış olabileceği düşünülmektedir (Hansen vd., 2004). Ayrıca ortaya konulan bu bulgular enfeksiyon zamanına göre etki şiddetinin değişebileceği bildirimiyle uyumludur. Enfeksiyonun oluşum zamanı tohumlama öncesi, tohumlama sonrası şeklinde ele alınarak yapılan araştırmada tohumlama sonrası mastitis teşhisi konan inekler ile mastitis olmayan inekler arasında

gebe kalma riskinde bir fark olmadığı bulunmuştur. Buna karşılık tohumlama öncesi mastitis teşhisi konusunda mastitisli ineklerin aynı dönemde mastitisli olmayan ineklere göre daha düşük gebe kalma riskine sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, araştırmacılara göre biyolojik olarak mastitisin hem tohumlama öncesi (ineğin fizyolojik gebe kalma yeteneğini veya oosit gelişimini etkileyerek) hem de tohumlama sonrası (embriyoya müdahale ederek) gebelik oluşumu üzerinde olumsuz etkileri olabileceği beklenebilir (Dolecheck vd., 2019). Sunulan çalışmada hayvanlar tohumlama zamanında olanlardan seçildi. Ortaya çıkan mastitisli ineklerdeki gebe kalma oranı azalması araştırmacıların enfeksiyon oluşum zamanının etkisiyle ilgili bildirimleriyle uyumlu bulunmuştur.

Meme bezinde bulunan bakteriler değişik sitokinleri salarak ve reproduktif organları etkileyen immun cevabı uyarak (Bannerman, 2009) reproduktif kanal dokusunu olumsuz etkileyebilen değişik biyoaktif moleküllerin üretimine yol açabilir. Enfekte meme bezindeki süt kaynaklı hücreler IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-10 ve IL-12, TNF- α , NO ve PGF_{2 α} artışına neden olurlar. Nitekim Escherichia coli bakterisi ve endotoksini verilerek yapılan deneysel bir çalışmada meme içi uygulama sonrasında süt NO düzeyinde 10-11 katı artış olduğu bildirilmiştir. Süt NO artışını 96-149 katı süt TNF- α artışının izlediği tespit edilmiştir. Süt TNF- α artışını kan düzeyinde de artış izlediği gözlenmiştir (Blum vd., 2000). Bu moleküllerden TNF- α , NO ve PGF_{2 α} oosit üzerine veya gelişen embriyo üzerine olan etkileriyle embriyonik büyümeyi etkileyebilirler (Slebozinski vd., 2002; Hansen vd., 2004).

Meme bezindeki enfeksiyonun kapsamlı bir etki mekanizması ile embriyonik canlılığı azalttığı ortaya konulmuştur (Hansen vd., 2004). Mastitis, embriyonik/fetal ölümle sonuçlanabilecek PGF_{2 α} 'nın salgılanmasına ve sonrasında erken luteolizde bir artışa neden olabileceği ileri sürülmüştür (Hansen vd., 2004). Hansen vd. (2004)'ne göre meme bezinin enfeksiyonu, yangısal cevabı veya immun cevabı aktive eden bakteriyel kaynaklı LPS, proteoglikan veya diğer moleküllerin salınımına neden olur. Bu salınım meme bezinden sitokinlerin sentezini ve lenf düğümleri aracılığı ile drenajını artırır. Belirli sitokinler direk olarak oosit ve embriyo fonksiyonunu engelleyici etkiye sahiptirler (Olechnowicz ve Jaskowski, 2013).

TNF- α , 212 aminoasidin kullanımıyla oluşmuş, üç monomerli, çan şeklinde bir transmembran glikoproteini şeklinde yapıya sahiptir. Membrana bağlı proprotein şeklinde sentezlenmesi sonrası TNF- α dönüştürücü enzim tarafından monomerlere çevrilmekte ve çözünebilir TNF- α molekülü şeklinde dolaşıma bırakılmaktadır (Vilcek, 2008). Hem membranöz hem de çözünebilir TNF biyolojik olarak aktiftir (Tseng vd., 2018). Normal immün yanıtta TNF- α proinflamatuvar etki göstermektedir. TNF- α 'nın inflamatuvar hastalıkların seyri sırasında değişik evrelerde çeşitli hücrelerde farklı şekilde ortaya çıkan pleiotropik etkileri görüldüğü bildirilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda enfeksiyonlara karşı savunmada organizmayı aktive ederken, yüksek konsantrasyonlarda yangı ve doku hasarı yaptığı kaydedilmiştir.

TNF- α , temelde monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenen bir çeşit glikoproteindir. Doku hasarı sonrası kanda ilk saptanabilen sitokindir. İlişkili olduğu hastalıklarda inflamasyonun başlamasında ve devam ettirilmesinde etkilidir. Çeşitli indükleyiciler tarafından sentez ve salınımı başlatılır. Öncelikli uyaran bakteri lipopolisakkaritleridir. Deneysel meme içi E. Coli lipopolisakkariti verilen ineklerde kan TNF- α düzeyi yükseltilmiştir (Hansen vd., 2004). Kendisi tarafından da salınımı indüklenen glikoprotein salınımında; Gram pozitif bakteri, parazit, virüs ve tümör hücreleri, immün kompleks oluşumu, kompleman sistemi aktivasyonu, interlökin (IL)-1, IL-2 ve interferon- γ ile artış oluşturulduğu gözlenmiştir.

TNF- α , akut yangıda enfeksiyon bölgesine nötrofil ve makrofajların yapışmasına aracılık ettiği söylenmektedir. Siklooksijenaz-2 ve prostaglandin üretiminde artış sağlamak ve hipotalamusa etki ederek vücut ısısında artış oluşturmaktadır. TNF- α 'nın bir diğer önemli etkisinin enerji metabolizmanın düzenlenmesi üzerine olduğu ortaya konulmuştur. Molekül lipoprotein lipaz inhibe ederek kaşeksiye giden olaylar zincirine dahil olmaktadır.

TNF- α embriyonik kök hücrelerde farklılaşma potansiyelini bozar, iç hücre katmanında hücre sayısını azaltır, nükleer lizisi arttırarak embriyolarda yaşama oranlarını düşürür, Granulosa ve Teka hücrelerinde steroid sekresyonunda bozulmaya yol açar (Soto vd.,

2003b). Molekölün granulosa hücrelerinde steroid sekresyonunu ve aromataz aktivitesini etkileyerek oosit fonksiyonunu etkilediği bildirilmiştir (Deb vd., 2011). Steroid üretimindeki azalma, folikül sıvısının bileşimini değiştirebilir, bu da foliküllerde gelişen oositlerin ortamını bozarak fertilizasyon ve embriyonik gelişimi olumsuz etkileyebilir.

Cullor (1990) mastitis olgularında salgılanan endotoksinlerin luteolizisi başlatabileceğini ve yangısal mediyatörlerin salınımıyla gebelik oranının ve erken embriyonik yaşamın etkileyebileceğini bildirmiştir. Moore ve O'Connor (1993), Gram negatif mastitis patojenlerinin PGF_{2α} üretimini uyarabileceğini, bunun daha sonra luteal regresyona neden olabileceğini ifade etmişlerdir. Meme içi verilen E.coli endotoksini süt PGF_{2α} seviyesinde artışa yol açmıştır. PGF_{2α}'nın sentezlenmesi sitokinlerin düzenlemesi etkisi altındadır. Mastitis esnasında kanda düzeyi artan TNF-α ve IL-1α'nın endometrial PGF_{2α} sentezinde artışa yol açabileceği bildirilmiştir (Skarzynski vd., 2000). Bu molekülün sığırlarda embriyo gelişimine olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir. Molekül hem P4 düzeyini etkileyerek hem de direk embriyoyu etkileyerek gebelik oranını değiştirir. Gebelik esnasında sığırlara PGF_{2α} verilmesi embriyonik gelişimi bozarak gebelik oranını azaltır. Ayrıca embriyo gelişimini bloke edecek şekilde etki gösterir. Oosit maturasyonun bozan PGF_{2α} morula dönemindeki embriyolarda farklı gelişim aşamalarının düzenini bozarak etkisini ortaya koyar.

Mastitis olgusunda ortaya çıkan NO, oosit gelişimi ve embriyo canlılığını etkiler. Molekül proapoptik gen bulunuşunu artırır, ovaryumda follikül ve oosit sayısını azaltır ve embriyonik hücrelerde apoptozisi uyarır (Soto vd., 2003a; Soto vd., 2003b). Ortamda NO artışı sadece blastosist gelişiminin engellenmesiyle değil aynı zamanda embriyo implantasyonunun anormal gerçekleşmesi ve bunun sonucunda abort riskini arttırarak olumsuz etkisini ortaya çıkarır (Wang vd., 2021). Artan NO seviyesi erken embriyonik ölümle ilişkili bulunmuştur. Kültür ortamına NO vericisi ilavesi sığır embriyolarında blastosist gelişiminin engellenmesiyle sonuçlanmıştır.

Mastitis hastalığının ineklerde reproduksiyon üzerine etkisinin enfeksiyonun şiddetine göre değişebileceği aktarılmaktadır. Buna göre klinik mastitis olgularında etki daha

dikkat çekici bulunurken subklinik mastitis olgularında değişik düzeylerde bulgular bildirilmiştir.

Subklinik mastitis şiddeti CMT ile ayrılarak gerçekleştirilen araştırmada +2 ve +3 enfeksiyon bulunan ineklerde +1 ve negatif olan ineklere göre gebelik oranı önemli şekilde düşük belirlenmiştir (Miranda vd., 2019).

Mastitis sadece ineklerde değil mandalarda da reproduksiyonu olumsuz etkilemektedir. Nitekim Mohsen vd. (2016) mandalar üzerinde yaptıkları araştırmada subklinik mastitisli manda ineklerinde gebelik oranını (44.45%) mastitis bulunmayanlardan (60.87%) daha düşük bulmuşlardır. Araştırmacılar göre subklinik mastitisli manda ineklerindeki gebelik oranı klinik mastitisli hayvanlardan (16%) daha yüksektir.

Ayanoğlu vd. (2018) mastitis bulunan ineklerde gebelik kaybını %5 oranında belirlemişlerdir. Sunulan araştırmamızda subklinik mastitisli ineklerde gebelik oranı Ayanoğlu vd. (2018) tarafında bildirilenden farklı olarak daha fazla etkilendiği ortaya çıkarılmıştır. Ayanoğlu vd. (2018) bildirdiği sonuç tohumlama sonrası gebelik teşhisi konulan hayvanlarda 50 ila 90. günler arasında yapılan kontrollerde elde edilmiştir. Araştırmalar mastitisin gebelik üzerine etkisinin tohumlamaya yakın dönemlerde daha belirgin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sadeghi vd. (2021)'na göre tohumlamadan 30 gün önce ve 30 gün sonra oluşan mastitis gebelik üzerine etkisi belirlenmezken bu günler içindeki hücre artışı gebelik oranını olumsuz etkilemektedir. Miranda vd. (2019) tarafından tohumlama zamanına daha yakın olan tohumlama sonrası 30 ile 60 günler arasında gebelik kayıpları (%12), tohumlama zamanına daha uzak olan 60 ile 90 günler arasında oluşandan (%5) daha yüksek belirlenmiştir. Bu nedenle Ayanoğlu vd. (2018) tarafından gebelik oranının daha az etkilenmesinin nedeni enfeksiyonun etkilerini daha az ortaya çıktığı dönemde izlemeleri olabilir.

Mastitisin oluşum zamanının gebelik üzerine etkisinin gözlendiği araştırmada enfeksiyon etkisine maruz kalmamış embriyonun transfer edildiği ineklerde gelişen subklinik mastitis olgusunun gebe kalma üzerine olumsuz etkileri gözlenmemiştir. Yangısal reaksiyonların etkisine maruz kalmayan oositlerden elde edilen yedi günlük

embriyonun transfer edildiği hayvanlarda sağlıklı hayvanlar ile subklinik mastitisli hayvanlar arasında gebelik kayıpları açısından fark bulunmadığı ortaya konulmuştur (Dalanezi vd., 2020).

Sadeghi vd. (2021) subklinik mastitisli ineklerde yaptıkları araştırmada mililitrede 200.000 den daha az hücre bulunan ineklerde gebelik oranının 200.000 den fazla olanlardan daha yüksek olarak belirlediklerini bildirmektedirler. Benzer şekilde; Hudson vd. (2012) subklinik mastitisin gebe kalma ihtimali üzerine etkisinin 399.000 hücre/ml seviyesine kadar önemsiz olduğunu ancak bu düzeyden sonra olumsuz sonuçların görülebileceği ileri sürülmektedir. Yaptığımız çalışmada Hudson vd. (2012) ve Sadeghi vd. (2021) ile uyumlu olarak süt SCC arttıkça gebelik oranının azaldığı gözlemlendi.

Fuenzalida vd. (2015)'na göre hem süt SHS düzeyi hem de klinik mastitis şiddeti enfeksiyonun reproduksiyon üzerine olan etkisinin farklı şekilde olmasına yol açar. Süt SHS arttıkça mastitisin olumsuz etkisi daha fazla ortaya çıkmaktadır (Fuenzalida vd., 2015).

Barker vd. (1998), klinik mastitisin ortaya çıkması ile üreme performansı arasındaki zamansal ilişkinin önemi hakkında yaptıkları araştırmada en büyük risk dönemini tohumlamadan hemen önce veya tohumlama ile gebelik teşhisi arasındaki dönem olarak tanımladılar. Daha sonra gerçekleştirilen çalışmalar, tohumlamadan hemen önceki ve sonraki dönemde mastitisin ortaya çıkmasının, daha erken veya daha sonra ortaya çıkan mastitis ile karşılaştırıldığında gebelik olasılığında daha büyük azalmalar ile ilişkili olduğunu doğrulamıştır (Santos vd., 2004; Hudson vd., 2012). Sunulan araştırmada tohumlama zamanında enfeksiyonun gebelik üzerine etkisi belirlenmiştir. Ortaya konulan gebelik oranı azalmasının yüksek olmasının nedeni enfeksiyonun etkisinin en yüksek hissedildiği dönemde çalışılması olabileceği düşünülmektedir.

Klinik mastitisin gebe kalma üzerine etkisinin tohumlamaya yakın zamanlarda ortaya çıkan enfeksiyon olgularında daha belirgin olduğu Hertl vd. (2010) tarafından ortaya konulmuştur. Tohumlamadan 15 veya daha fazla gün önce ya da 36 gün veya daha fazla süre sonra oluşan klinik mastitislerin gebe kalmaya etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir

(Hertl vd., 2010). Araştırmacılara göre tohumlamadan önceki 14 gün içinde veya sonraki 35 gün içinde oluşan mastitisler enfeksiyon tipi ve oluşum zamanına bağlı olarak önemli şekilde gebelik oranını etkilemektedir. Tohumlamalar sonrası klinik mastitis gelişen hayvanlarda Hernandez vd. (2012) 28-50. gün aralığında, Chebel vd. (2004) 31-45. günlerde daha yüksek oranda gebelik kaybı yaşayacaklarını bildirmektedirler. Benzer şekilde Marques vd. (2015)'na göre klinik mastitis multipar veya primipar ineklerde sabit zamanlı tohumlamalardan 30 ile 60 gün sonraki aralıkta gebelik oranını etkilemektedir.

Subklinik ve klinik mastitisin reproduktif performans üzerine etkisinin derecesi olaya neden olan patojenlerin prevalansına göre farklılık gösterebilir (Fuenzalida vd., 2015). Klinik mastitisin hafif şiddetli olgularında %30 azalma yapacak şekilde belirlenirken, orta şiddetli olgularda gebelik oranında %50 azalma tespit edilmiştir (Fuenzalida vd., 2015).

Sağlıklı ineklerle kıyaslandığında gebelik oranı klinik mastitisli ineklerde %40-50 oranında azalmıştır. Gram negatif etkenle enfekte hayvanlarda gebelik oranının olumsuz etkilenmesi Gram pozitif etkenle klinik olarak enfekte hayvanlardan daha fazla olmuştur (Fuenzalida vd., 2015).

Mastitis enfeksiyonu oluşum zamanı gibi enfeksiyona yol açan etken özellikleri de farklı şekillerde gebeliği etkilemektedir. İlk tohumlama gebelik oranı klinik mastitise yol açan etken ile ilişkili bulunmuştur. Gram pozitif etken veya Gram negatif etkenlerce oluşturulan enfeksiyonlarda gebelik oranı sağlıklı ya da etken izole edilemeyenlerden daha düşük olarak belirlenmiştir (Fuenzalida vd., 2015).

Gram negatif etkenlerin oluşturduğu mastitis gebe kalma oranını daha fazla olumsuz etkilemektedir. Bu etkinin nedeni olarak Gram negatif etkenlerce salınan lipopolisakkaritler ileri sürülmektedir. Mastitise neden olan etkenlerden lipopolisakkarit artışına yol açanlar bulunmaktadır. İneklerde lipopolisakkaritin oosit gelişimini geciktirdiği (Soto vd., 2003a), granuloza hücrelerinden E2 salınımını azalttığı (Williams vd., 2008), ovulasyonu inhibe ettiği (Williams vd., 2008), oositlerin erken apoptozisine

yol açtığı (Zhao vd., 2019), tuba uterinayı etkileyerek erken embriyo ölümünü kolaylaştırdığı (İbrahim vd., 2015), oositlerde sitoplazma olgunlaşmasını geciktirerek embriyonik gelişimsel değişikliklere neden olduğu (Magata ve Shimizu, 2017), gebeliğin sürdürülmesinde olumsuz etkilere sahip olduğu (Bromfield vd., 2015; Campos vd., 2018) ve primordial ovaryum follikül havuzunu azalttığı (Bromfield ve Sheldon, 2013) ortaya konulmuştur. Lipopolisakkaritin bahsedilen etkileri ilk tohumlama başarısızlığından, gebelik kayıplarından ve fertilité üzerindeki uzun vadeli etkilerden sorumlu tutulmaktadır (Dalanezi vd., 2020).

İneklerde büyük mastitis patojenleri tarafından oluşturulan mastitiste, küçük mastitis etkenleri tarafından oluşturan mastitise göre reproduktif performans daha düşük düzeyde bulunmuştur. Benzer şekilde gram negatif etkenlerce oluşturulan mastitis, gram pozitif etkenlerce oluşturulan mastitis göre reproduktif performansı daha şiddetli olumsuz etkilemektedir. Küçük mastitis etkenleri ile gram pozitif etkenlerce oluşturulan mastitis enfeksiyonu üremeyi aynı şekilde etkilediği gözlenmiştir. Bu etki hiç bir zaman gram negatif etkenler ile büyük patojenlerin etki düzeyine ulaşmadığı bildirilmektedir (Dalanezi vd., 2020).

Mastitisli ineklerde yapılan mikrobiyolojik analizlerde bakteriyolojik kültür sonucu negatif olgularla karşılaşılabileceği bildirilmektedir. Negatif kültür sonuçlarıyla karşılaşılmamasının nedeni olarak immun sistemin meme içi enfeksiyonu tamamen yok etmesi veya bakteri sayısının laboratuvarlarca belirlenebilen sınırın altına düşmesi olarak ileri sürülmektedir (Ruegg ve Erskine, 2014). Fuenzalida vd., (2015) tarafından kültür sonucu negatif olan klinik mastitisli hayvanlarda gebelik oranının, kültür sonucu pozitif olan klinik mastitisli hayvanlar gibi olumsuz etkilenmediğini bildirilmektedir. Araştırmacılara göre bu durumun nedeni enfeksiyonun yangısal mediatörler veya metabolitlerin dolaşıma salınmasından önce immun yanıt tarafından yok edilmesidir (Fuenzalida vd., 2015). Kültür negatif hayvanlarda gebelik oranının sağlıklı hayvanlar düzeyinde oluşmasının gözlenmesi enfeksiyonun etiyolojisinden immun cevabın derecesinin daha önemli olduğunu akla getirmektedir. İneğin cevap verme hızı, etkinliği ve cevabın süresi klinik mastitisin gebe kalma üzerine etki düzeyini belirlemektedir (Fuenzalida vd., 2015).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. İneklerde saha şartlarında tohumlama zamanında önemli oranda subklinik mastitis problemi bulunmaktadır.
2. Meme bezinde subklinik mastitis bulunması ineklerde östrüs belirtilerinin oluşmasını olumsuz etkilemez.
3. Tohumlama zamanı sütün CMT ile kontrol edilmesi subklinik mastitisin teşhis edilmesinde etkilidir.
4. Östrüs belirtileri gösteren ve subklinik mastitis bulunan ineklerde yapılan suni tohumlamalardan sonra gebelik oranı önemli ölçüde azalmaktadır.

Sonuç olarak; östrüs gösteren ineklerde meme bezi kontrol edilmeden yapılan suni tohumlamalardan elde edilecek gebelik oranının düşük olacağı için tohumlamaların subklinik mastitis varlığı araştırılarak yapılması gerektiği kanaati oluşmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Ahmadzadeh, A., McGuire, M. A., Dalton, J. C. (2010). Interaction between clinical mastitis, other diseases and reproductive performance in dairy cows. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 22: 83-95.
- Alaçam, E. (1997). Meme hastalıkları. Editörler: Alaçam E. ve Şahal M. Sığır hastalıkları. 1. Baskı, MedisanYayınevi, Ankara, sayfa 389-425.
- Alvarado, H. T., Vazquez, A. I., Campos, G. D. L., Tempelman, R. J., Gabai, G., Cecchinato, A., Bittante, G. (2018). Changes in milk characteristics and fatty acid profile during the estrous cycle in dairy cows. *J Dairy Sci*, 101: 9135–9153.
- Anderson, K. L., Smith A.R., Spahr, S. L., Gustafsson, B. K., Hixon, J. E., Weston, P. G., Jaster, E. H., Shanks, R. D., Whitmore, H. L. (1983). Influence of the estrous cycle on selected biochemical and cytologic characteristics of milk of cows with subclinical mastitis. *Am J Vet Res*, 44: 677–680.
- Asaf, S., Leitner, G., Furman, O., Lavon, Y., Kalo, D., Wolfenson, D., Roth, Z. (2014). Effects of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Reproduction*, 147: 33– 43.
- Ayanoğlu, K., Alkan, H., Tekeli, T. (2018). İneklerde gebeliğin erken dönemlerinde oluşan mastitislerin değerlendirilmesi. *Journal of Bahri Dagdas Animal Research*, 7(2): 1-6.
- Baker, J., Al-Nakkash, M. L., Herbst- Kralovetz, M. M. (2017). Estrogen-gut microbiome axis: Physiological and clinical implications. *Maturitas*, 103: 45– 53.
- Bannerman, D. D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J Anim Sci*, 13: 10– 25.
- Barker, A. R., Schrick, F. N., Lewis, M. J., Dowlen, H., Oliver, S. P. (1998). Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *J Dairy Sci*, 81: 1285– 1290.
- Battaglia, D. F., Krasa, H. B., Padmanabhan, V., Viguie, C., Karsch, F. J. (2000). Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. *Biol Reprod*, 62: 45–53.
- Blum, J., Dosogne, H., Vangrocnwgcghe, F., Hammon, H., Bruckmaier, R., Burvenich, C. (2000). Tumor necrosis-a and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *E. Coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domest Anim Endocrinol*, 19: 223-235.
- Bouchard, L., Blais, S., Desrosiers, C., Zhao, X., Lacasse, P. (1999). Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. *J Dairy Sci*, 82: 2574-2581.
- Bromfield, J. J., Santos, J. E. P., Block, J., Williams, R. S., Sheldon, I. M. (2015). Uterine infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow. *J Anim Sci*, 93: 2021–2033.
- Bromfield, J. J., Sheldon, I. M. (2013). Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. *Biol Reprod*, 88(4): 98, 1–9.
- Buford, W. I., Ahmad, N., Schrick, F. N., Butcher, R. L., Lewis, P. E., Inskeep, E. K. (1996). Embryotoxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. *Biol Reprod*, 54: 531–537.
- Busato, A., Trachsel, P., Schallibaum, M., Blum, J. W. (2000). Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Prev Vet Med*, 44: 205–220.

- Campos, C. C., Hartling, I., Kaur, M., Fernandes, A. C. C., Santos, R. M., Cerri, R. L. A. (2018). Intramammary infusion of lipopolysaccharide promotes inflammation and alters endometrial gene expression in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 101: 10440–10455.
- Chebel, R. C. (2007). Mastitis effects on reproduction. NMC Regional Meeting Proceedings, California.
- Chebel, R. C., Santos J. E. P., Reynolds J. P., Cerri R. L. A., Juchem S. O., Overton M. (2004). Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 84: 239–255.
- Chegini, A., Hossein-zadeh, N. G., Hosseini-moghadam, H., Shadparvar, A. A. (2016). Factors affecting clinical mastitis and effects of clinical mastitis on reproductive performance of Holstein cows. *Revue Méd Vét*, 167: 145-153.
- Chen H. W., Jiang W. S., Tzeng C. R. (2001). Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril*, 75: 1163–1171.
- Cullor, J. S. (1990). Mastitis and its influences upon reproductive performance in dairy cattle. In: Proc. Int. Symp. Bovine mastitis, Indianapolis. Madison.
- Dalanezi, F. M., Joaquim, S. F., Guimaraes, F. F., Guerra, S. T., Lopes, B. C., Schmidt, E., Cerri, R., Langoni, H. (2020). Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. *J Dairy Sci*, 103:3648– 3655.
- Davidson, J. A., Tiemann, U., Betts, J. G., Hansen, P. J. (2001). DNA synthesis and prostaglandin secretion by bovine endometrial cells as regulated by interleukin-1. *Reprod Fertil Dev*, 7: 1037–1043.
- Deb, R., Kumar, A., Chakraborty, S., Verma, A. K., Tiwari, R., Dhama, K., Singh, U., Kumar, S. (2013). Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: A review. *Pak J Biol Sci*, 16:1653–61.
- Deveci, H., Apaydın, A. M., Kalkan, C., Öcal, H. (1994) Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. Birinci Baskı, F.Ü. Basımevi, Elazığ.
- Dolecheck, K. A., Garcia- Guerra, A., Moraes, L. E. (2019). Quantifying the effects of mastitis on the reproductive performance of dairy cows: A meta- analysis. *J Dairy Sci.* 102: 8454–8477.
- Edwards, J. L., Hansen, P. J. (1997). Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev*, 46: 138-145.
- Esslemont, R. J. (2003). The costs of poor fertility and what to do about reducing them. *Cattle Pract*, 11: 237–250.
- Fairchild, D. L., Pate, J. L. (1991). Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon- γ . *Biol Reprod*, 44: 357–363.
- Fricke, P. M. (2002). Scanning the future ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J Dairy Sci*, 85: 1918-1926.
- Fuenzalida, M. J., Fricke, P. M., Ruegg, P. L. (2015). The association between occurrence and severity of subclinical and clinical mastitis on pregnancies per artificial insemination at first service of Holstein cows. *J Dairy Sci*, 98(6): 3791-805.
- Furman, O., Leitner, G., Roth, Z., Lavon, Y., Jacoby, S., Wolfenson, D. (2014). Experimental model of toxin-induced subclinical mastitis and its effect on disruption of follicular function in cows. *Theriogenology*, 82:1165-1172.

- Ghani, M. W., Bin, L., Birmani, M. W., Nawab, A., Cun, L. G., Ye, L., Mei, X. (2019). Impact of Subclinical Mastitis on Reproductive Performance of Dairy Animals. *Int J Vet Sci Res*, 5(2): 48–57.
- Giordano, J. O. (2007). Possible strategies to increase ovulatory follicle size and reduce time to ovulation in lactating dairy cows, University of Tennessee, M.S. Thesis, Knoxville.
- Giri, S. N., Chen, Z., Carroll, E. J., Mueller, R., Schiedt, M. J., Panico, L. (1984). Role of prostaglandins in pathogenesis of bovine mastitis induced by *Escherichia coli* endotoxin. *Am J Vet Res*, 45: 586–591.
- Haenlein, G. F. W., Krauss, W. C. (1974). Effects of single injections of diethylstilbestrol on milk composition and counts of leucocytes in milk of Holstein-Friesian cattle. *Z Tierphysiol Tierernaehr Futtermittelkd*, 34: 50-60.
- Hansen, P., Soto, P., Natzke, R. (2004). Mastitis and fertility in cattle – Possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol*, 51: 294-301.
- Harmon, R. J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci*, 77(7): 2103-2112.
- Hernandez, J. A., Risco, C. A., Lima, F. S., Santos, J. E. (2012). Observed and expected combined effects of clinical mastitis and low body condition on pregnancy loss in dairy cows. *Theriogenology*, 77: 115–121.
- Hertl, J. A., Gröhn, Y. T., Leach, J. D. G., Bar, D., Bennett, G. J., González, R. N., Rauch, B. J., Welcome, F., Tauer, L. W., Schukken Y. H. (2010). Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*, 93: 1551–1560.
- Hockett, M. E., Almeida, R. A., Rohrbach, N. R., Oliver, S. P., Dowlen, H. H. Schrick, F. N. (2005). Effects of induced clinical mastitis during preovulation on endocrine and follicular function. *J Dairy Sci*, 88: 2422–2431.
- Hoeben, D., Burvenich, C., Trevisi, E., Bertoni, G., Hamann, J., Bruckmaier, R. M., Blum, J. W. (2000). Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J Dairy Res*, 67: 503–514.
- Hudson, C. D., Bradley, A. J., Breen J. E., Green, M. J. (2012). Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom dairy cows. *J Dairy Sci*, 95: 3683–3697.
- Huszenicza, G., Janosi, S., Kulcsar, M., Korodi P., Reiczigel, J., Katai L., Peters, A. R., Rensis, F. De. (2005). Effects of clinical mastitis on ovarian function in post-partum dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 40: 199-204.
- Ibrahim, S., Salilew-Wondim, D., Rings, F., Hoelker, M., Neuhoff, C., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., Tesfaye, D. (2015). Expression pattern of inflammatory response genes and their regulatory MicroRNAs in bovine oviductal cells in response to lipopolysaccharide: Implication for early embryonic development. *PLoS One*, 10: e0119388.
- Isobe, N., Iwamoto, C., Kubato, H., Yoshimura, Y. (2014). Relationship between the somatic cell count in milk and reproductive function in peripartum dairy cows. *J Reprod Dev*, 60: 433–437.
- Kumar, N., Manimaran A., Sivaram, M., Kumaresan, A., Jeyaku-mar, S., Sreela, L., Mooventhan, P., Rajendran, D. (2017). Influ-ence of clinical mastitis and its treatment

- outcome on reproductive performance in crossbred cows: A retrospective study. *Vet World*, 10: 485–492.
- Lammers, B. P., Heinrichs, A. J., Kensing R. S. (1999). The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on estimates of mammary development and subsequent reproduction and milk production. *J Dairy Sci*, 82: 1753–1764.
- Lavon Y., Leitner, G., Goshen, T., Braw-Tal, R., Jacoby, S., Wolfenson, D. (2008). Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology*, 70: 956–967.
- Lavon, Y., Ezra, E., Leitner, G., Wolfenson, D. (2011). Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *J Dairy Sci*, 94: 4538–4545.
- Lavon, Y., Leitner, G., Voet, H., Wolfenson, D. (2010). naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *J Dairy Sci*, 93: 911–921.
- Li, P. S., Wagner, W. C. (1983). In vivo and in vitro studies on the effect of adrenocorticotrophic hormone or cortisol on the pituitary response to gonadotropin releasing hormone. *Biol Reprod*, 29: 25–37.
- Looper, M. (2013). Reducing somatic cell count in dairy cattle. University of Arkansas System Division of Agriculture Extension and Research, FSA4002.
- Magata, F., Shimizu, T. (2017). Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. *Reprod Toxicol*, 71: 1–7.
- Maltz, E., Devir, S., Metz, J. H. M., Hogeveen, H. (1997). The body weight of the dairy cow: I. Introductory study into body weight changes in dairy cows as a management aid. *Livestock Prod Science*, 48: 175–86.
- Mann, G. E., Lamming, G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reprod*, 121: 175–180.
- Mansour, M. M., Zeitoun, M. M., Hussein, F. M. (2017). Mastitis outcomes on pre-ovulatory follicle diameter, estradiol concentrations, subsequent luteal profiles and conception rate in Buffaloes. *Anim Reprod Sci*, 181: 159–166.
- Markle, J. G. M., Frank, D. N., Mortin-Toth, S., Robertson, C. E., Feazel, L. M., Rolle-Kampczyk, U., von Bergen, M., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., Danska, J. S. (2013). Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, 339: 1084–1088.
- Marques, T. C., Leao, K. M., Rodrigues, M. C., Silva, N. C., da Silva, R. P. (2015). Reproductive performance of dairy cows affected by endometritis, pododermatitis and mastitis. *Afr J Biotechnol*, 14(28): 2265–2269.
- McCann, S. M., Kimura, M., Karanth, S., Yu, W. H., Mastro-nardi, C. A., Rettori, V. (2000). The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. *Ann NY Acad Sci*, 917: 4–18.
- Miranda, S., Albuja, C., Tribulo, H. (2019). Association between subclinical mastitis with early loss of gestation in a dairy cow herd. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 30(2): 44–51.

- Mohsen, M. M., Hendawy, A. O., Zeitoun, M. M. (2016). Effect of mastitis on luteal function and pregnancy rates in buffaloes. *Theriogenology*, 86: 1189-1194.
- Moore, D. A., O'Connor, M. L. (1993). Coliform mastitis: its possible effects on reproduction in dairy cattle. *Proc Natl Mastitis Counc*, 162-166.
- Nakajima, Y., Mikami, O., Yoshioka, M., Motoi, Y., Ito, T., Ishikawa, Y., Fuse, M., Nakano, K., Yasukawa, K. (1997). Elevated levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis. *Res Vet Sci*, 62(3): 297-298.
- Nguyen, T. C., Nakao, T., Gautam, G., Su, L., Ranasinghe, R., Yusuf, M. (2011). Relationship between milk somatic cell count and postpartum ovarian cyclicity and fertility in dairy cows. *Acta Vet Hung*, 59: 349-362.
- Olechnowicz, J., Jaskowski, J. M. (2013). A connection between mastitis during early lactation and reproductive performance of dairy cows. *Ann Anim Sci*, 13: 435-448.
- Padmanabhan, V., Keech, C., Convey, E. M. (1983). Cortisol inhibits and adrenocorticotropin has no effect on luteinizing hormone-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone from bovine pituitary cells in vitro. *Endocrinology*, 112: 1782-1787.
- Pampfer, S., Wu, Y. D., Vanderheyden, I., De Hertogh, R. (1994). Expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptors and selective effect of TNF- α on the inner cell mass in mouse blastocyst. *Endocrinology*, 134: 206-212.
- Petroff, M. G., Petroff, B., K., Pate, J. L. (2001). Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. *Reprod*, 121: 753-760.
- Rahman, M. M., Mazzilli M., Pennarossa, G., Brevini, T., Zecconi, A., Gandolfi, F. (2012). Chronic mastitis is associated with altered ovarian follicle development in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 95: 1885-1893.
- Rayos, A., Redondo, M. J. H. (2015). Comparative conception rate of artificially inseminated dairy cattle after natural and induced estrus. *Philipp J Vet Med*, 52(2): 107-112.
- Riollet, C., Rainard, P., Poutrel, B. (2001). Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci*, 84: 1077-1084.
- Risco, C. A., Donovan, G. A., Hernandez, J. (1999). Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. *J Dairy Sci*, 82(8): 1684-1689.
- Roelofs, J. B. (2005). When to inseminate the cow? Insemination, ovulation and fertilization in dairy cattle. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Roth, Z., Dvir, A., Kalo, D., Lavon, Y., Krifucks, O., Wolfenson, D., Leitner, G. (2013). Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes. *J Dairy Sci*, 96: 6499-6505.
- Roth, Z., Wolfenson, D. (2016). Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. *Dom Anim Endocrinol*, 56: 218-222.
- Ruegg P. L., Fuenzalida, M. J., Fricke, P. M. (2015). The association between occurrence and severity of subclinical and clinical mastitis on pregnancies per artificial insemination at first service of Holstein cows. *J Dairy Sci*, 98: 3791-3805.
- Ruegg, P. L., Erskine, R. J. (2014). Mammary Gland Health. sf. 1015-1043 in Large Animal Internal Medicine. 5th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, MO.
- Sadeghi, H., Yanez, U., De Prado, A. I., Gharagozlou, F., Becerra, J. J., Herradon, P. G., Pena, A. I., Quintela, L. A. (2021). Short communication: Effect of subclinical mastitis on

- reproductive performance of Holstein dairy cows in the Northwest of Spain. *Span J Agric Res*, 19(4): 1-8.
- Santos, G., Bottino, M., Santos, A., Simões, L., Souza, J., Ferreira, M., Silveira, J., Avila, A., Bride, A., Sales, J. (2018). Subclinical mastitis interferes with ovulation, oocyte and granulosa cell quality in dairy cows. *Theriogenology*, 119: 214-219.
- Santos, J. E., Cerri, R. L., Ballou, M. A., Higginbotham, G. E., Kirk J. H. (2004). Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 80: 31-45.
- Sartori, R., Gumen, A., Guenther, J. N., Souza, A. H., Wiltbank, M. C. (2003). Comparison of artificial insemination (AI) versus embryo transfer (ET) in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 65(7): 1311-21.
- Schalm, O. W., Carroll, E. J., Jain, N. C. (1971). Number and types of somatic cells in normal and mastitic milk. In: Schalm, O.W., Carroll, E.J., Jain, N.C. (Eds.), *Bovine Mastitis*. Lea Febiger, Philadelphia, pp. 94–127.
- Schrack, F. N., Hockett, M. E., Saxton A. M., Lewis M. J., Dowlen, H. H., Oliver, S. P. (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J Dairy Sci*, 84: 1407-1412.
- Schukken, Y. H., Wilson, D. J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., Gonzalez, R. N. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res*, 34: 579– 596.
- Sheldon I. M. (2015). Milk somatic cell counts and pregnancy rates in dairy cattle. *Vet Rec*, 176(16): 409-10.
- Skarzynski, D. J., Miyamoto, Y., Okuda, K. (2000). Production of prostaglandin f(2 α) by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor alpha: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biol Reprod*, 62: 1116–1120.
- Slebodzinski, A. B., Malinowski, E., Lipczak, W. (2002). Concentrations of triiodothyronine (T₃), tumour necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in milk from healthy and naturally infected quarters of cows. *Res Vet Sci*, 72(1): 17-21.
- Soto, P., Natzke, R. P., Hansen, P. J. (2003a). Actions of tumor necrosis factor- α on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol*, 50: 380– 388.
- Soto, P., Natzke, R. P., Hansen, P. J. (2003b). Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: Actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F₂ α , and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol*, 50: 263– 272.
- Spicer, L. J., Alpizar, E. (1994). Effects of cytokines on FSH-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle. *Dom Anim Endocrin*, 11:25-34.
- Stoebel, D. P., Moberg, G. P. (1982). Effect of adrenocorticotropin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behavior of cows. *J Dairy Sci*, 65:1016–1024.
- Tolosa, T., Verbeke, J., Piepers, S., Supre, K., De Vliegher, S. (2013). Risk factors associated with subclinical mastitis as detected by California Mastitis Test in smallholder dairy farms in Jimma, Ethiopia using multilevel modelling. *Prev Vet Med*, 112:68-75.
- Tseng W. Y., Huang, Y. S., Lin, H. H., Luo, S. F., McCann, F., McNamee, K., Clanchy, F., Williams, R. (2018). TNFR signalling and its clinical implications. *Cytokine*, 101:19-25.
- Vilcek, J. (2018). First demonstration of the role of TNF in the pathogenesis of disease. *J Immunol*, 181:5-6.

- Vural, M. R., Ergün, Y., Özenç, E. (2016). Büyük ruminantlarda mastitis, In: Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları, Eds: Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. 1. Baskı, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., Malatya. s: 149 -247.
- Waller, K. P., Colditz, I. G., Ostensson, K. (2003). Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res Vet Sci*, 74: 31–36.
- Wang, N., Zhou, C., Basang, W., Zhu, Y., Wang, X., Li, C., Chen, L., Zhou, X. (2021). Mechanisms by which mastitis affects reproduction in dairy cow: a review. *Reprod Domest Anim*, 56: 1165–1175.
- Wellenberg, G. J., Wan Der Poel, W. H. M., Van Oirschot, J. T. (2002). Viral infections and bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 88 (1): 27-45.
- Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., McSweeney, K. D., Dinsmore, R. P., Goodell, G., Callan, R. J. (2001). Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, 219: 976-981.
- Williams, E. J., Sibley, K., Miller, A. N., Lane, E. A., Fishwick, J., Nash, D. M., Herath, S., England, G. C., Dobson, H., Sheldon, I. M. (2008). The effect of Escherichia coli lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha on ovarian function. *Am J Reprod Immunol*, 60: 462–473.
- Wolfenson, D., Leitner, G., Lavon, Y. (2015). The disruptive effects of mastitis on reproduction and fertility in dairy cows. *Ital J Anim Sci*, 14: 4125.
- Wuu, Y. D., Pampfer, S., Becquet, P., Vanderheyden, I., Lee, K. H., De Hertogh, R. (1999). Tumor necrosis factor decreases the viability of mouse blastocyst in vitro and in vivo. *Biol Reprod*, 60: 479–483.
- Yang, M. Y., Fortune, J. E. (2007). Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Mol Reprod Dev*, 74: 1095–1104.
- Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y. H. (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 4: 357-372.
- Zhao, S., Pang, Y., Zhao, X., Du, W., Hao, H., Zhu, H. (2019). Detrimental effects of lipopolysaccharides on maturation of bovine oocytes. *Asian-Australas J Anim Sci*, 32: 1112–1121.