



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOLA ABOMAZUM DEPLASMANLI İNEKLERİN OPERASYON
ÖNCESİ VE SONRASI SERUMLARINDA LİPİT
MOBİLİZASYONU VE OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurcanan ASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU

BURDUR-2019

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOLA ABOMAZUM DEPLASMANLI İNEKLERİN OPERASYON
ÖNCESİ VE SONRASI SERUMLARINDA LİPİT
MOBİLİZASYONU VE OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurcanan ASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU
Dr.Öğr.Üyesi Kürşad YİĞİTARSLAN (2. Danışman)

Bu çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 0446-YL-17).

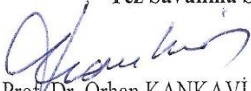
BURDUR-2019

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Nurcanan ASLAN tarafından *Prof. Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU* yönetiminde hazırlanan *Sola Abomazum Deplasmanlı İneklerin Operasyon Öncesi ve Sonrası Serumlarında Lipit Mobilizasyonu ve Oksidatif Stres Parametrelerinin Araştırılması* başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Biyokimya Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

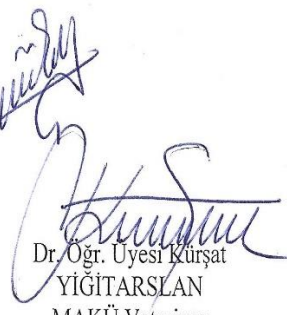
Tez Savunma Sınavı Tarihi 05/04/2019

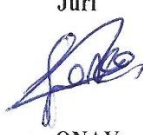

Prof. Dr. Orhan KANKAVI
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Biyokimya A.D.
Başkan

Prof. Dr. Gülcan Avcı
AKU Veteriner Fakültesi
Biyokimya A.D.
Jüri

Prof. Dr. Tülay
BÜYÜKOĞLU
MAKÜ Veteriner
Fakültesi
Biyokimya A.D.
Jüri

Doç. Dr. Gonca OZAN
KOCAMÜFTÜOĞLU
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Biyokimya A.D.
Jüri


Dr. Öğr. Üyesi Kürşat
YİĞİTARSLAN
MAKÜ Veteriner
Fakültesi
Cerrahi A.D.
Jüri


ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 31.05.2019 Tarih ve 20. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Doğa T. MİSİRCİ
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinde ve tüm aşamalarında bilgisini, tecrübesini ve güler yüzünü esirgemeyen, değerli vaktini ayıran, samimiyetinden şüphe etmediğim danışman hocam Prof. Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU'na, tez çalışmamızın hasta ve sağlıklı hayvanlarının belirlenmesi, operasyonların gerçekleştirilmesi ve kanlarının alınması aşamalarındaki yardımlarından dolayı ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Kürşad YİĞİTARSLAN hocama, istatistik analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğr. Gör. Hande ŞENOL hocama, tezin her aşamasında bana destek olan eşim Sayın Ömer Aslan'a, varlıklarından güç aldığım aileme sonsuz teşekkürlerimi ve minnetimi arz ederim.

ETİK BEYAN

Sola Abomazum Deplasmanlı İneklerin Operasyon Öncesi ve Sonrası Serumlarında Lipit Mobilizasyonu ve Oksidatif Stres Parametrelerinin Araştırılması başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Nurcanan ASLAN

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	xi
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Abomazum Deplasmanı	3
2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Oluşumu ve Oksidatif Hasar	4
2.3. Antioksidan Savunma Mekanizmaları ve Oksidatif Stres	6
2.4. Oksidatif Stres Belirteçleri	7
2.4.1. Malondialdehyde (MDA)	8
2.4.2. Total Antioksidan Seviyesi (TAS)	9
2.4.3. Total Oksidan Seviyesi (TOS)	9
2.4.4. Paraoksanaz 1 (PON1)	9
2.5. Süt Sığırlarında Abomazum Deplasmanı (AD) ve Oksidatif Stres	12
2.6. Süt Sığırlarında Abomazum Deplasmanı (AD)ve Biyokimyasal Parametreler	14
3.GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.1.1. Hayvanların Seçimi ve Grupların Oluşturulması	18
3.1.2. Analizlerde Kullanılan Cihazlar	19
3.1.3. Analizlerde Kullanılan Sarf Malzemeler	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Serum Örneklerinin Toplanması	20
3.2.2. Serum Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçülmesi	20
3.2.2.1. Lipit Peroksidasyonunun (LPO)'nun Belirlenmesi (Malondialdehit(MDA)) Tayini	20
3.2.2.2. Paraoksanaz 1 Enzimi /Aristesteraz (PON1/ARES) Aktivite Tayini	22
3.2.2.3. Serum Total Oksidan Seviyesi (TOS) Ölçümü	24
3.2.2.4. Serum Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Ölçümü	25
3.2.3. Serum Lipit Parametrelerinin Ölçümü	26
3.2.3.1. Serum Total Kolesterol Tayini	26
3.2.3.2. Serum HDL Kolesterol Tayini	28
3.2.3.3. Serum LDL Kolesterol Tayini	29
3.2.3.4. Serum Aspartat Transaminaz (AST) Aktivite Tayini	29

3.2.3.5. Serum Serbest Yağ Asidi (SYA) Tayini	31
3.2.3.6. Serum Beta Hidroksi Bütirat (BHBA) Tayini	33
3.2.3.7. Serum Triaçilgliserol (TG) Tayini	35
3.2.3.8. Serum Gamma Glutamil Transferaz (GGT) Aktivite Tayini	35
3.2.3.9. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri	38
4.1.1. Serum TOS Düzeyi	38
4.1.2. Serum MDA Düzeyi	40
4.1.3. Serum TAS Düzeyi	40
4.1.4. Serum PON1/ARES Aktivitesi	41
4.2. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Lipit Parametreleri	42
4.2.1. Serum TG Düzeyi	42
4.2.2. Serum Total Kolesterol Düzeyi	42
4.2.3. Serum HDL Kolesterol Düzeyi	43
4.2.4. Serum LDL-Kolesterol Düzeyi	44
4.2.5. Serum SYA Düzeyi	44
4.2.6. Serum BHBA Düzeyi	46
4.2.7. Serum AST Aktivitesi	46
4.2.8. Serum GGT Aktivitesi	47
4.3. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Oksidatif Stres ve Lipit Parametreleri Arasındaki İlişki	48
5. TARTIŞMA	51
5.1. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri	52
5.2. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Lipit Parametreleri	55
5.3. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Lipit Parametreleri ve Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki İlişki	63
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	MDA'nın keto ve enol formu	8
Şekil 2.2.	Lipit peroksidasyonu (Baerheim,2015)	8
Şekil 2.3.	İnsan serum Paraoksonaz (PON1) enziminin yapısı (Demir ve Beydemir, 2015)	10
Şekil 3.1.	MDA ile TBA'nın reaksiyonu	21
Şekil 3.2.	1,1,3,3 tetraetoksipropan'ın (TEP) MDA'ya dönüşümü	21
Şekil 3.3.	Arilesteraz enziminin fenilasetat ile ölçümünün prensibi (Bergmeyer, 1974)	23
Şekil 3.4.	TAS ölçüm kitinin prensibi (Erel, 2004)	25
Şekil 3.5.	Zak metodunun prensibi	26
Şekil 3.6.	Zak metoduna göre hazırlanan serum total kolesterol standart grafiği	28
Şekil 3.7.	AST enzim aktivitesinin prensibi	29
Şekil 3.8.	Reitman ve Frankel metoduna göre hazırlanan serum AST standart grafiği	31
Şekil 3.9.	Serum BHBA tayini ticari kolorimetrik kit (Cayman, USA) prosedürü	33
Şekil 3.10.	Serum BHBA ticari kolorimetrik kit (Cayman, USA) prosedürüne göre hazırlanan standart grafik	35
Şekil 3.11.	γ -Glutamil Transferaz (GGT) kit ölçüm prensibi	36
Şekil 4.1.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum TOS düzeyindeki değişiklikler	38
Şekil 4.2.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum MDA düzeyindeki değişiklikler	40
Şekil 4.3.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum TAS düzeyindeki değişiklikler	41
Şekil 4.4.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum PON1/ARES düzeyindeki değişiklikler	41
Şekil 4.5.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum TG düzeyindeki değişiklikler	42
Şekil 4.6.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum total kolesterol düzeyindeki değişiklikler	43
Şekil 4.7.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum HDL kolesterol düzeyindeki değişiklikler	43
Şekil 4.8.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum LDL kolesterol düzeyindeki değişiklikler	44
Şekil 4.9.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum SYA düzeyindeki değişiklikler	44
Şekil 4.10.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum BHBA düzeyindeki değişiklikler	46
Şekil 4.11.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum AST aktivitesindeki değişiklikler	47
Şekil 4.12.	LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum GGT aktivitesindeki değişiklikler	47

TABLÖLAR

Tablo 4.1.	Kontrol (Kuru ve Laktasyon dönemi) ve LDA'lı grup süt sığırları arasında oksidatif stres parametrelerindeki değişimler	39
Tablo 4.2.	Kontrol (Kuru ve Laktasyon dönemi) ve LDA'lı grup süt sığırları arasında biyokimyasal lipid parametrelerindeki değişimler	45
Tablo 4.3.	Kontrol grubu (kuru ve laktasyon dönemi) sığırlardaki parametreler arası ilişkiler	49
Tablo 4.4.	LDA'lı gruplardaki (Pre-op, post-op ve post-op 10) parametreler arası ilişkiler	50

SİMGELER ve KISALTMALAR

AD	Abomazum Deplasmanı
ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	Alanin Aminotransferaz
AP	Alkaline Phosphatase
ARES	Arilesteraz
AST	Aspartat Amino Transferaz
BCS	Body Condition Score (Vücut Kondüsyon Skoru)
BHBA	Beta Hidroksi Bütirik Asit
BSMCs	Bovine Abomasum Smooth Muscle Cells (Sığır abomazum düz kas hücreleri)
BUN	Blood Urea Nitrogen (Kan üre azotu)
CAT	Katalaz Enzimi
CRP	C-Reaktif Protein
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNPH	Dinitrofenilhidrazin
FTA	Fosfotungstik Asit
GGT	Gamma Glutamil Transferaz
GLDH	Glutamat Dehidrojenaz
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
HDL	High Density Lipoprotein (Yüksek Dansiteli Lipoprotein)
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IGF1	İnsüline Growth Factor 1 (İnsüline Benzer Büyüme Faktörü 1)
KH₂PO₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
L·	Lipit radikali
LCAT	Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LDA	Left Abomasum Displacement (Sola abomazum deplasmanı)
LDL	Low Density Lipoprotein (Düşük dansiteli lipoprotein)
LH	Poliansature Lipit
LO·	Lipit Alkoksil Radikali
LOO·	Lipit Peroksi Radikali
LOOH·	Lipit Hidroperoksit
LPL	Lipoprotein Lipaz
LPO	Lipit Peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Hidrojen
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Hidrojen
Na-Pht	Sodyum Fosfotungstat
Na₂HPO₄	Dibazik Sodyum Fosfat
NEB	Negatif Enerji Balansı
NO	Nitrik Oksit
·O₂·	Süperoksit Anyonu
OH·	Hidroksil Radikali

OSI	Oksidatif Stres İndeksi
PON1	Paraoksonaz 1 Enzimi
PON1/ARES	Paraoksonaz 1/Arilesteraz
RDA	Right Abomasum Displacement (Sağa abomazum deplasmanı)
ROO·	Peroksil Radikalleri
ROS	Reaktif Oksijen Substantları (Reaktif oksijen türleri)
SAA	Serum Amiloid A
SOD	Süperoksit Dismutaz
SYA	Serbest Yağ Asidi
TAK	Total Antioksidan Kapasitesi
TAS	Total Antioksidan Seviye
TBA	Tiyobarbütirik Asit
TBARS	Tiyobarbütirik Asit Reaktif Substantlar
TEP	Tetra Etoksi Propan
TG	Trigliserit
TOS	Total Oksidan Seviye
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (Çok düşük dansiteli lipoprotein)
WST-1	Water Soluble Tetrazolium Salt 1 (Suda Çözünen Tetrazolium Tuzu 1)

ÖZET

Sola Abomazum Deplasmanlı İneklerin Operasyon Öncesi ve Sonrası Serumlarında Lipit Mobilizasyonu ve Oksidatif Stres Parametrelerinin Araştırılması

Abomazumun sola deplasmanı (LDA), yüksek süt verimli sığırlarda, genellikle erken laktasyon döneminde negatif enerji dengesine bağlı olarak gelişen önemli metabolik hastalıklardan birisidir. Çalışmamızda, operasyon öncesi ve sonrası LDA'lı sığırlarda, lipit mobilizasyonu ve oksidatif stres parametreleri ile bunlar arasındaki ilişkilerin incelenmesi amaçlandı. Çalışmada, LDA'lı (n=16), sığırlar; operasyon öncesi (pre-op LDA)) operasyondan hemen sonra (post-op LDA) ve operasyon sonrası 10.gün (post-op 10 LDA) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Kontrol grubu sığırlar, erken laktasyon (n=8) ve kuru dönemki (n=8) sığırlardan oluşturuldu. Serum TOS ve MDA düzeylerinin pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol gruplara göre arttığı, TAS düzeyleri ve PON1/ARES aktivitelerinin ise azaldığı tespit edildi. Serum total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol düzeylerinin pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol gruplarına göre azaldığı, BHBA düzeyi ile AST ve GGT aktivitelerinin ise arttığı belirlendi. Mevcut çalışmada, LDA'lı süt sığırlarda hastalığın teşhis, tedavi ve prognozunda lipit parametreleriyle birlikte TAS, TOS ve PON1/ARES gibi oksidatif stres parametrelerinin de değerlendirilmesinin yararlı olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Süt Sığırı, Sola Abomazum Deplasmanı, Lipit Mobilizasyonu, Oksidatif Stres

ABSTRACT

Investigation of Lipid Mobilisation and Oxidative Stress Parameters in the Serum Before and After Surgery of Cows with Left Displacement Abomasum

Left Abomasum Displacement (LDA) is one of the most important metabolic diseases which is caused by negative energy balance during early lactation period for high milk efficient cows. The purpose of this study was to investigate the lipid mobilization and oxidative stress parameters in cows with LDA before and after the operation. In this research, cows with LDA (n=16) was divided into three groups that are before operation (pre-op LDA), immediately after the operation (post-op LDA) and 10th day after the operation (post-op 10 LDA). Control groups were formed from cows that are early lactation (n=8) and dry period (n=8). Serum TOS and MDA levels in cows with the pre-op LDA are increased compared to control groups while their TAS levels and PON1/ARES activities are decreased. Serum total cholesterol, HDL cholesterol and LDL cholesterol levels were decreased in cattles with LDA compared to control groups while their BHBA levels, AST and GGT activities were increased. In this study, it has been concluded that in evaluating of the diagnosis, treatment and prognosis of disease in dairy cows with LDA may be used of the oxidative stress parameters such as TAS, TOS and PON1/ARES together with lipid parameters.

Keywords: Dairy Cow, Displacement Abomasum, Lipid Mobilisation, Oxidative Stress

1. GİRİŞ

Yüksek süt verimli sığırların başlıca metabolik bozuklukları, plasentanın atılamaması, abomazum deplasmanı (AD), ketozis, asidozis, yağlı karaciğer, hipokalsemi, hipomagnesemi ve laminitis gibi hastalıklardır (Celi, 2011).

Abomazum Deplasmanı, yüksek süt verimli ineklerde sıkça karşılaşılan ekonomik olarak önemli ve multifaktöriyel sindirim sistemi hastalıklarından birisidir. Çoğunlukla doğum sonrası 2-4 hafta (geçiş dönemi) içinde oluşur. Etiyolojik faktörler, esasen kuru periyotda kısmen başlayan enerji metabolizmasındaki bozukluklardır. Bunun dışında, stres, beslenme ve metabolik bozukluklarla da yakından ilişkilidir. Azalan abomazal kontraktilite, atoni, dilatasyon, azalan ruminal hacim, hipokalsemi, endotoksemi, alkalemi, hipergastrinemi ve hiperinsülinemi deplasman için hazırlayıcı faktörler olabilir. Bu arada genetik yatkınlık da gözardı edilmemelidir. Abomazum deplasmanlarının %80-90'ı, sola abomazum deplasmanlarıdır (LDA). Sola abomazum deplasmanında, abomazum rumene doğru sol ve ventral olarak kayar. Ayrıca omazum, retikulum ve karaciğer de yer değiştirir. (Aly ve ark., 2016; Maden ve ark., 2012; Sezer ve ark., 2012;). LDA'lı birçok sığır yağlı karaciğer ve inflamatuvar bozukluklar ya da mastitis, metritis, plasentanın atılamaması ve bakteriyel enfeksiyonlar (pnömoni vb.) gibi eşzamanlı hastalıklardan etkilenir. Böylece iştah kaybı ve besinsel stres sonucu süt veriminde ani azalmalar görülür. Hastalık süt sığırlarında, tedavi masrafları ve üretim kaybı sebebiyle büyük ekonomik öneme sahiptir. Sola deplasmanlı sığırların %95'i cerrahi müdahale ile düzeltilmesi sonucu tamamen normale dönmektedirler. Cerrahi müdahale çok kabul gören ve AD'nın sebep olduğu finansal kaybı azaltmanın uygun maliyetli bir tedavisidir. Abomazal motilitenin düzeltilmesi, gazın boşalmasına ve abomazumun normal anatomik pozisyonuna dönmesine sebep olur. (Aly ve ark., 2016; Güzelbektas ve ark., 2010; Markiewicz ve ark., 2009).

Reaktif oksijen türleri (ROS), fizyolojik ve patolojik şartlar altında canlı organizmalarda meydana gelirler. Bunlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarla nötralize edilirler. Şayet ROS oluşumu ve antioksidatif sistem arasındaki denge bozulursa oksidatif stres oluşur. Oksidatif stresin savunma mekanizmalarının azalmasında ve hastalıkların gelişiminde temel risk faktörü olduğu

düşünülmektedir. Çiflik hayvanları, özellikle yaşamlarının ilk haftasındaki genç hayvanlar ve geçiş dönemindeki hayvanlar oksidatif stres açısından yüksek risk grubundadırlar. Oksidatif stresin de AD'nın patogenezinde etkili olduğu son yıllarda bildirilmiştir (Celi, 2011; Durgut ve ark., 2016; Fürll ve ark., 2003;)

LDA riskinin arttığı geçiş döneminde, hayvanlar adipoz dokudan yağ mobilizasyonuna sebep olan negatif enerji balansından (NEB) zarar görür ve kanda yüksek konsantrasyonlarda serbest yağ asitleri (SYA)'leri üretilir. Artan SYA, hepatositlerin mitokondrisine girer ve daha sonra enerji üretmek için okside olur. Bunu takiben, SYA'lerinin artan oksidasyonu büyük oranda ROS oluşturur ve lipoperoksit oluşumunda artışa sebep olur. Sonuç olarak, prooksidatif/antioksidatif durumda değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler, immün ve inflamatuvar fonksiyonlar üzerinde negatif bir etki meydana getirir. Bu inflamatuvar cevap gastrointestinal motiliteyi değiştirebilir ve abomazal hipomotiliteyi daha ileri derecede tetikleyebilir (Ghazy ve ark., 2016; Turk ve ark., 2008). Ayrıca LDA'lı sığırlarda iştah kaybı ve buna bağlı olarak artan beta-hidroksi bütirik asit (BHBA) düzeylerinin düz kas hücreleri üzerinde oksidatif stres etkileri gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, BHBA'in sığır LDA'sını da içine alan bazı mide hastalıklarının sebebi olabileceği fikri ileri sürülmüştür (Tian ve ark.2014). Kısacası, laktasyon periyodunda ve özellikle geçiş döneminde sığırlarda lipit metabolizması ve oksidatif stresin düşük enerji dengesine karşılık metabolik adaptasyonun bir parçası olduğu görülmektedir (Turk ve ark., 2013). Bu nedenle LDA'lı sığırların klinik ve laboratuvar bulguları üzerine çalışmalar hastalığın kontrolünde ve komplikasyonlarının önlenmesinde önemli bir role sahiptir. Doğum sonrası dönemdeki sığırların özellikle beslenme durumunu yansıtan bazı biyokimyasal değişiklikler üzerine AD'nın etkisine dair birçok çalışma olmasına rağmen, LDA'lı sığırlarda oksidant-antioksidant durumu değerlendiren sınırlı çalışma mevcuttur (Aly ve ark., 2016).

Bu çalışmada, LDA'lı sığırlarda, operasyon öncesi ve sonrası lipit mobilizasyonu ve bazı oksidatif stres parametrelerinin araştırılması amaçlandı. Böylelikle hastalığın teşhis, tedavi ve prognozuna ilişkin bilgilere katkı sağlanması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Abomasum Deplasmanı

Sığırlarda doğum sonrası periyotta sağlık problemleri, temelde NEB bağlantılı metabolik bozukluklar ve bu bozuklukları takiben immun sistemin baskılanmasına bağlanmaktadır. Süt sığırlarında bu dönemde plasentanın atılamaması, AD, ketozis, asidozis, yağlı karaciğer, hipokalsemi, hipomagnesemi ve laminitis gibi hastalıklara sıkça rastlanılmaktadır (Celi, 2011). Abomasumun özellikle sola deplasmanı (LDA) genellikle doğum sonrası ilk aylarda oluşur. Predispoze faktörler, gebeliğin son haftasında artan serbest yağ asitleri ($SYA > 500 \text{ mikromol/L}$) ve laktasyonun ilk haftasında artan beta-hidroksi bütirat konsantrasyonu ($BHBA > 1200 \text{ mmol/L}$)'dur. Ayrıca, metabolik alkaloz ve hipokalsemi ($Ca < 1.2 \text{ mmol/L}$)'nin gastrointestinal kanal düz kaslarının kontraksiyon yeteneğini daha da azaltması yüzünden risk oluşturduğuna inanılır. Bu durum abomasum için mekanik bir bariyer olarak fonksiyon gören boş rumen ile kombine olarak deplasmanın oluşumuna katkıda bulunur. LDA'lı sığırların %95'i cerrahi ile düzeltilmesi sonrası tamamen normale dönmektedirler, fakat sağa deplasman (RDA) için prognoz daha kötüdür ve %75,5'lik bir oranda düzelme görülür (Markiewicz ve ark., 2009).

AD abdomenin dorsal kısmında yüzen gaz ile dolu abomasumla karakterizedir. Bu durum süt üretiminde azalma, sığırların hastalanması ve bazı durumlarda ölüme sebep olan anoreksia ve kolik'le sonuçlanabilir. LDA vakaları büyük ekonomik kayıplara yol açar. AD'nının patogeneğinde abomasumdaki gazın birikmesi hayatidir. Bu gazın birikmesi, abomasumda artan gaz üretimi ve abomasumun hipomobilitesi yüzünden olabilir. Abomasumda metan ve karbondioksit gazları birikir. Normal abomasumdaki gaz üretimi oral ya da oral olmayan yolla çıkarılarak dengelenir. Abomasumun motilitesi yetersizse gaz birikimi oluşur. Nervus vagus abomasum motilitesinde önemli bir rol oynar. Vagal sinirin etkisi yanında rumen ve abomasumdaki uçucu yağ asitlerinin artan miktarı, endotoksinler, metabolik alkaloz ve düşük kan kalsiyum düzeyleri motilitenin azalmasının olası nedenleri olarak düşünülür (Winden ve Kuiper, 2003).

Başlıca risk periyodu buzağılama sonrası ilk aydır. Özellikle Holstein-Friesian, Jersey ve Guernsey sığırlarda AD daha yaygın görülmektedir (Winden ve Kuiper, 2003) Gebeliğin sonunda kaba yem tüketiminin sınırlanması ve çok miktarda mısır silajı ile beslenme de AD için risk faktörüdür. Rumen doluluğu, rasyonun fiziksel formu ve rumende üretilen uçucu yağ asitlerinin miktarı deplasmanın gelişimiyle sonuçlanan abomasumun hipomobilitesi için temel sebepler olarak düşünülür. Deplasman durumuyla bağlantılı, metabolizmaya ilişkin önemli üç faktör; hipokalsemi, metabolik alkaloz ve NEB'dır. Laktasyonun ikinci haftasında azalan kalsiyum düzeyleri de deplasman öncesi sığırlarda tespit edilmiştir. Hipokalsemi esnasında abomazal duvarın azalan kontraksiyonu abomasal hipomotilitenin öngörülen sebebidir. Metabolik alkaloz paratiroid hormon için reseptörlerin duyarlılığının azalmasıyla hipokalseminin nedeni olabilir. Diğer metabolizma bozukluğu NEB'dır. Her postpartum süt sığırında NEB gelişir. Bununla birlikte her sığırdaki problem oluşmaz. Hastalık genellikle NEB'nın şiddetine ve süresine bağlıdır. Ciddi NEB'nın deplasman için önemli risk faktörlerinden biri olduğu kabul edilmektedir (Winden ve Kuiper, 2003).

Abomasum deplasmanı; tedavi giderleri, premature doğumlar, üreme kaybı ve ölüm yüzünden sütçü sürülerde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Abomasal deplasmanlarının %80-90'ı sola deplasmanlardır. Beslenme LDA'nın etiyolojisinde temel risk faktörü olarak yer alır. Doğum sonrası hastalıklar LDA için risk faktörü olarak bilinmektedir. Komplike olmayan ketozisli sığırlarda LDA riskinin arttığı bildirilmiştir. Plasentanın atılamadığı, hipokalsemili ya da metritisli sığırlarda da sırasıyla LDA riski artar. Bu durum beslenme ve sürü idaresinin postpartum bozuklukları önlediği ve böylece LDA riskini azalttığı sonucunu ortaya koyar. Aksine, LDA'nın da diğer postpartum bozuklukların riskini artırdığı bildirilmiştir. LDA'lı sığırlarda, komplike ketozis, ve metritis riski de artmaktadır. Ayrıca doğum öncesi yüksek plazma SYA konsantrasyonlu sığırlarda da LDA riski artar (Shaver,1997).

2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Oluşumu ve Oksidatif Hasar

Moleküler oksijen tüm aerobik canlılarda yeterli enerji üretimi için elektron akseptörü olarak gereklidir. Serbest radikaller, ya mitokondriyal elektron transport

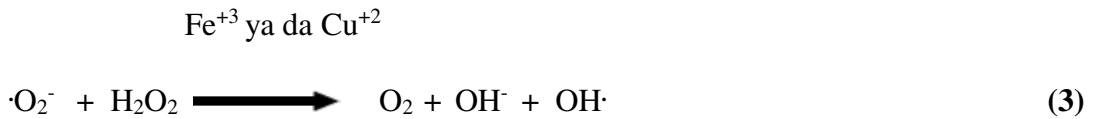
zincirinden ya da NADPH'ın uyarılmasından köken alan hücrel metabolizmanın son ürünü olarak şekillenir. Serbest radikaller, dış orbitalinde en az bir tane ortaklanmamış elektrona sahip moleküller olarak tanımlanır ve oksidasyon redüksiyon reaksiyonları boyunca elektron transferini uyarabilir. ROS, moleküler oksijen ve süperoksit anyonundan ($\cdot\text{O}_2^-$) köken alan serbest radikallerin bir sınıfıdır. Süperoksit anyonu elektron taşıma zincirinden köken alan, çoğunlukla mitokondri içinde üretilen başlıca reaktif oksijen türüdür. Solunum zincirinde, moleküler oksijen bir elektron aldığı anda $\cdot\text{O}_2^-$ şekillenir (**Reaksiyon (1)**). Aktive nötrofil ve makrofajlar $\cdot\text{O}_2^-$ 'nun diğer önemli kaynağıdır ve yangısal reaksiyonlar sırasında NADPH oksidaz tarafından enzimatik olarak şekillenir (Sordillo ve Aitken, 2009).



Süperoksit anyonu ($\cdot\text{O}_2^-$), sonrasında farklı ROS çeşitlerini oluşturmak üzere diğer moleküllerle reaksiyona girebilir. Örneğin, mitokondri iç membranının içinde süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenen bir reaksiyonla (**Reaksiyon (2)**) oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşabilir.



Demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi belirli geçiş elementleri, sırasıyla Haber-Weis (**Reaksiyon (3)**) ve Fenton (**Reaksiyon (4)**) reaksiyonlarıyla çok daha reaktif hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) oluşturmak üzere $\cdot\text{O}_2^-$ ve H_2O_2 ile etkileşime de girebilir.



ROS'un birikimi memeli dokularında ciddi hasarlara yol açabilir. ROS'un temel biyolojik hedefleri lipitler, proteinler, DNA ve diğer makromoleküllerdir. (Sordillo ve Aitken, 2009; Valko ve ark., 2007). Hidroksil radikali, DNA molekülünün tüm bileşenleri ile reaksiyona girerek hem pürin hem pirimidin bazları hem de

deoksiriboz omurgasına zarar verir. En çok çalışılan DNA hasarı 8-hidroksiguanozin (8-OH-G) oluşumudur. Oksidatif hasar sonucu genetik materyalin kalıcı modifikasyonları, mutagenез, karsinogenез ve yaşlanmanın ilk evrelerini oluşturur. ROS sadece DNA üzerinde hasar oluşturmaz, ayrıca oksidasyona duyarlı fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asidi artıklarını içeren diğer hücre bileşenlerini de etkiler. Peroksil radikalleri (ROO $\cdot$) şekillenince, peroksidasyon sürecinin son ürünü olan malondialdehit (MDA) oluşturmak üzere siklizasyon reaksiyonu ile endoperoksitlere dönüşebilir. (Valko ve ark., 2007).

Radikal zincir sürecinin birbirini takip eden reaksiyonlarında, OH $\cdot$ radikali, lipit radikali (L $\cdot$) oluşturmak üzere plazma membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinden bir elektron çıkarabilir. Aerobik şartlar altında L $\cdot$, lipit peroksi radikali (LOO $\cdot$) oluşturmak için moleküler oksijenle reaksiyona girebilir. Biriktiği takdirde LOO $\cdot$, plazma membranındaki komşu yağ asitlerinden bir hidrojenin ayrılmasıyla reaktif lipit hidroperoksitler (LOOH) oluşturarak bir otokatalitik zincir reaksiyonuna sebep olabilir. Bu nedenle LOO $\cdot$, oluşum yerinde yeterli düzeyde azalmazsa lipit peroksidasyon sürecini başlatabilir. OH $\cdot$ radikali, ayrıca DNA molekülünün tüm bileşenlerine oksidant-indükleyici hasara sebep olabilir ve gen mutasyonları ile bozulmuş protein sentezine yol açabilir. OH $\cdot$ 'nin diğer hedefleri proteinlerin amino asit yan zincirleridir. Proteinlerin sistein ve metiyonin artıkları bazı farklı ROS'lar tarafından oksidasyona duyarlıdır ve tiyol grupları arasında disüflitlerin reversibl oluumuna yol açabilir. Proteinlerin tiyol gruplarının oksidatif modifikasyonu proteinlerin fonksiyonu ile sinyal iletimi ve hücrelerin transkripsiyonel oluşumları gibi çok yönlü metabolik etkileri düzenleyebilir. Düşük ROS düzeyleri aslında normal hücre fonksiyonlarını kolaylaştırırken, proteinlerin aşırı oksidasyonu, hücre fonksiyon bozukluğu ya da prematüre protein yıkımına yol açabilir (Sordillo ve Aitken, 2009).

2.3. Antioksidan Savunma Mekanizmaları ve Oksidatif Stres

Metabolizmada ROS üretimine karşılık antioksidan savunma gelişir. Antioksidan savunma, makromoleküllerin oksidasyonunu engeller ya da okside molekülleri indirger. Böylece antioksidanlar genel bir ifadeyle, hedef moleküllerin

oksidatif hasarını geciktiren, önleyen ya da uzaklaştıran bileşikler olarak tanımlanabilir. Antioksidan savunmalar, hücre içinde sentezlenebilir ya da besinlerle alınabilir ve farklı hücre tipleri ile dokularda geçici olarak bulunurlar. Farklı antioksidan savunma mekanizmaları, onların suda ya da lipitlerde çözünürlükleri ya da onların kimyasal/fiziksel özelliklerine göre (enzimatik ya da enzimatik olmayan) sınıflandırılabilirler (Sordillo ve Aitken, 2009).

En etkili antioksidanlar, direk olarak ROS üretimini azaltabilen enzimlerdir. Örneğin, süperoksidin ($\cdot O_2^-$), H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümü SOD ile ya da H_2O_2 ' in su ve moleküler oksijene dönüşümü katalaz (CAT) enzimiyle katalize edilir. Enzimatik olmayan antioksidanlardan tokoferoller, askorbik asit, karotenoidler, lipoik asit ve glutatyonu sayabiliriz (Sordillo ve Aitken, 2009).

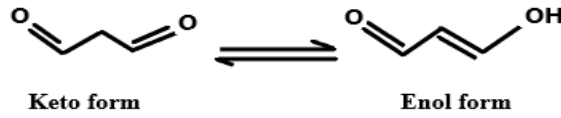
Hem hidrofilik (sitoplazma ve ekstrasellüler sıvılar) hem de lipofilik (membran lipitleri) fazlarda fonksiyon gören çeşitli antioksidanların bulunması oksijen metabolizması esnasında doku bütünlüğünü devam ettirmede önemlidir. Normal fizyolojik şartlarda vücuttaki antioksidan savunma sistemleri, etkili bir nötralizasyon ve eliminasyon ile ROS'u etkisiz hale getirebilir. ROS üretimi; lipitlerin, DNA, proteinler ve diğer makromoleküllerin oksidatif hasarı sonucu oluşan pro-oksidanları nötralize eden antioksidan savunmanın kapasitesini aşarsa oksidatif stres meydana gelir. ROS'un aşırı birikimi, antioksidan savunmanın bozulması ya da her iki durumun meydana gelmesi dengenin bozulmasına yol açar. Böylece hücre hasarı sonucu immün ve inflamatuvar bozukluklara bağlı hastalık tablosu ortaya çıkar (Sordillo ve Aitken, 2009; Baerheim, 2015).

2.4. Oksidatif Stres Belirteçleri

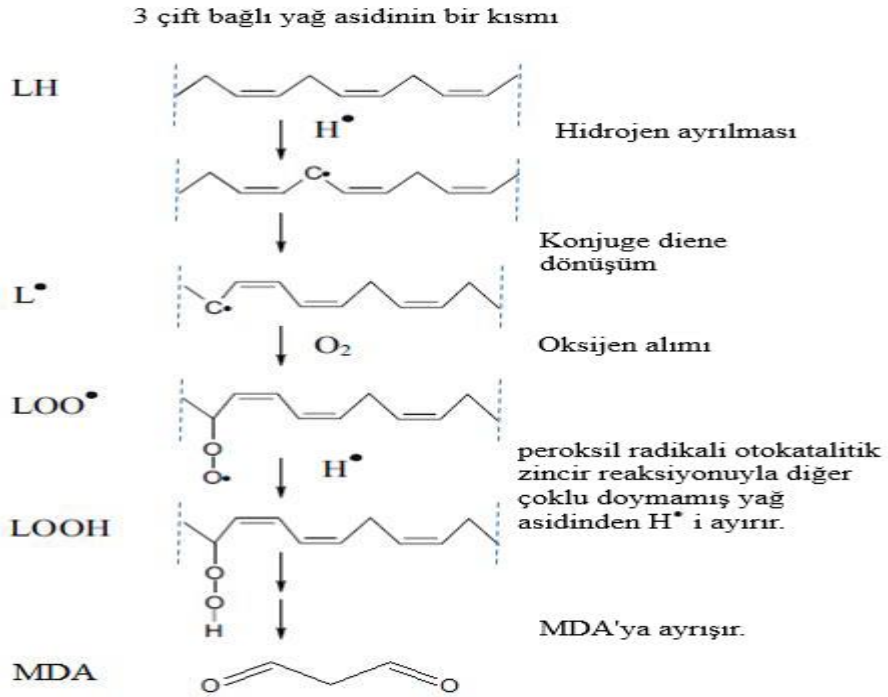
Reaktif oksijen türlerini (ROS) oksidatif stres için bir belirteç olarak kullanmak zordur, çünkü bunlar ölçülme esnasında yeterli stabilizeye sahip değildirler. Bu nedenle, ROS'un stabil metabolitleri ve lipit peroksit son ürünleri ve okside proteinler gibi oksidasyon ürünleri oksidatif stres belirteçleri olarak kullanılır. Malondialdehit (MDA) çok yaygın kullanılan lipit peroksidasyon belirtecidir (Baerheim, 2015).

2.4.1. Malondialdehyde (MDA)

Malondialdehit (MDA), küçük molekül ağırlıklı (72.07 g/mol), uçucu, üç karbonlu bir dialdehitdir. Nötral ya da alkali ortamda genellikle enol formunda bulunur (Şekil 2.1). Fizyolojik pH'da MDA orta düzeyde reaktiftir. DNA ve proteinler üzerinde mutajenik ve atherojenik etkilerinden dolayı yüksek düzeyde toksik olduğu düşünülmektedir. Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonu sonucunda oluşur (Şekil 2.2) ve çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunun çok çalışılan bir son ürünüdür (Baerheim, 2015).



Şekil 2.1. MDA'nın keto ve enol formu



Şekil 2.2. Lipit Peroksidasyonu. LH: poliansature lipit, L• : Karbon merkezli lipit radikali, LOO• : lipit peroksil radikali, LOOH: lipit hidroperoksit. Eğer lipit radikalleri radikal olmayan türlerle reaksiyona girer yada bunları oluşturursa lipit peroksidasyonu sonlanır. Lipit hidroperoksit (LOOH) kolayca lipit alkoksil radikaline (LO•), aldehitlere, alkanlara, lipit epoksitlere ve alkollere dönüşebilir. (Baerheim, 2015).

2.4.2.Total Antioksidan Seviyesi (TAS)

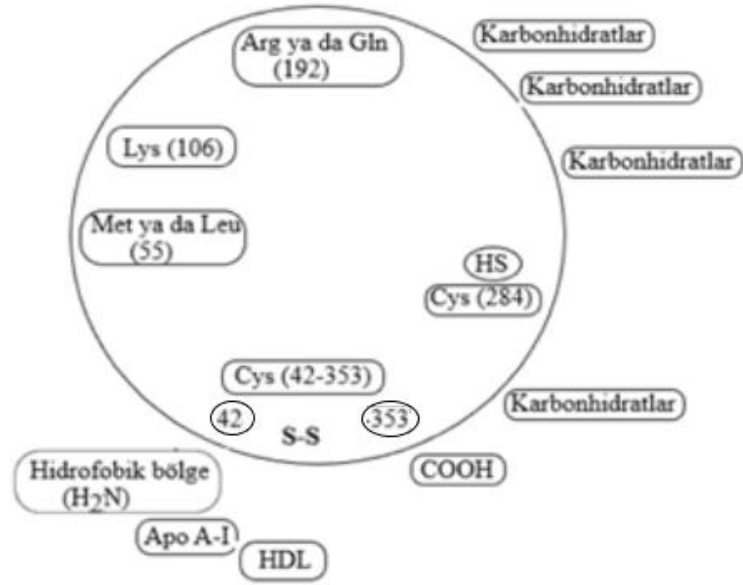
Dokuların antioksidan kapasitesi, ölçülebilen ve total antioksidan kapasiteyi (TAK) hesaplamada kullanılan serbest radikallere karşı savunma sistemindeki özgün bileşenleri ifade etmektedir. Antioksidanların plazma ya da serum konsantrasyonları ayrı ayrı parametreler halinde belirlenebilir, fakat bu yöntem zaman alıcı, yorucu ve pahalı olmakla birlikte komplike teknikler gerektirir. Diğer yandan TAK, Erel (2004), tarafından geliştirilen bir metotla ölçülen serum total antioksidan seviyesini (TAS) yansıtmaktadır. Bu metotta, lipitler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerin güçlü oksidatif hasarına sebep olan potansiyel serbest radikal reaksiyonlarına karşı meydana gelen serum total antioksidan düzeyleri ölçülür (Kayar ve ark., 2015).

2.4.3.Total Oksidan Seviyesi (TOS)

Oksidatif stres birçok hastalıkta ikincil etkili faktördür. Ayrıca, oksidatif stresin sebep olduğu hastalıklardan zarar gören hayvanlarda total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidan seviyesi (TOS) arasında önemli ölçüde bir negatif korelasyon bildirilmiştir. Erel (2005), tarafından geliştirilen bir metotla TOS belirlenmektedir. ROS'a karşı oksidatif savunma mekanizmalarının aktive olmasına rağmen, yeterince etkili olmayabilir ve hastalıkların klinik semptomları ortaya çıkabilir (Kayar ve ark., 2015).

2.4.4. Paraoksonaz 1 (PON1)

Paraoksonaz (arildialkilfosfataz, EC 3.1.8.1), karaciğerde sentezlenen bir kalsiyum bağımlı esterazdır ve organofosfor bileşiklerinin hidrolizini katalize eder. Paraoksonazın önceleri toksikolojide araştırılmasına rağmen, antiatherojenik, antiinflamatorik ve HDL'nin antioksidatif özelliklerindeki rolü son yıllarda önem arz etmiştir. İnsan ve sığır serumunda paraoksonazın N-terminal kısmı apolipoprotein A-I (Apo A-1) ve HDL ile ilişkilidir (**Şekil 2.3**). Paraoksonazın fizyolojik substratları düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) fosfolipitlerini okside eder ve serbest oksijen radikallerinin birikmesiyle sonuçlanan oksidatif olaylar ortaya çıkar. (Aşkar ve Büyükleblebici, 2012; Ekmekçi ve ark., 2004; Turk ve ark.,2004).



Şekil 2.3. İnsan serum paraoksonaz 1 (PON1) enziminin yapısı (Demir ve Beydemir, 2015)

Paraoksanazlar PON1, PON2, PON3 olarak isimlendirilen 3 enzimli bir ailedir. Bu enzimler, doğmasal immuniteye, reaktif moleküllerin detoksifikasyonuna, ilaçların biyoaktivasyonuna, endoplazmik retikulum stresinin hafiflemesine ve hücre proliferasyon/apoptozisinin düzenlenmesine yardımcı olurlar. Ayrıca bu enzimler, oksidatif hasar ve lipid peroksidasyona karşı koruyucu olarak değişik biyokimyasal yollarda çok fonksiyonlu rollere sahiptir. PON1 ailenin en çok çalışılan enzimidir. Bu enzim primer olarak karaciğerde sentezlenir ve esasen serumda HDL ile ilişkili olarak bulunur (Ceron ve ark., 2014).

Serum paraoksonaz 1 (PON1), ayrıca arilesteraz olarak da bilinir, çeşitli aromatik karboksilik asit esterleri ve bazı organofosfatların hidrolizini katalize eden kalsiyum bağımlı bir esterazdır. PON1 43 kDa bir proteindir ve karaciğer tarafından sentezlenir ve salgılanır. İnsan serumunda, PON1 HDL ile yakından ilişkilidir. PON1 enzim aktivitesini ölçmek için, genellikle 2 çeşit substrat kullanılır. Paraoksonaz aktivitesi için paraokson ve arilesteraz aktivitesi için fenil asetat kullanılır. PON1'in organofosfatların hidrolizindeki rollerine ilaveten, LDL oksidasyonuna karşı antioksidan koruma sağladığı da bildirilmiştir. Bu fonksiyon, muhtemelen lipid peroksidi hidrolize etme kapasitesiyle ilişkilidir ve insanlarda aterosklerozisi

önlemede önemlidir. PON1, oksidatif stres esnasında HDL'in fonksiyonunu korumasına da yardım eder (Miyamoto ve ark., 2005).

Arilesteraz aktivitesinin halihazırda HDL fraksiyonu ile ilişkili olduğunun rapor edilmesine rağmen, lipoproteinlerdeki sığır PON1 proteinine dair bilgilerin hala sınırlı olduğu belirtilmiştir. Yaptıkları çalışmada, Miyamoto ve ark. (2005) sığır serumunda aril esteraz ve paraoksonaz aktiviteleri arasında yüksek korelasyon tespit etmişlerdir. Böylece, sığır serumundaki tüm paraoksonaz ve aril esteraz aktivitelerinin PON1'e karşılık geleceği bildirilmiştir. Hem paraoksonaz hem de arilesteraz aktivitelerinin %85'inden fazlası HDL fraksiyonunda belirlenmiştir. HDL boyutunun azalmasıyla paraoksonaz aktivitesi ve PON1 proteininin arttığı ve yaklaşık total paraoksonaz aktivitesinin %60'ının ağır HDL fraksiyonunda dağıldığı gösterilmiştir. PON1'in HDL'nin alt üniteleri arasında farklı dağılımı sığır HDL'sinin fonksiyon ve metabolizmasıyla ilgili olabileceği ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, sığır PON1'in fonksiyonunu aydınlatacak çalışmalara ihtiyaç olduğu da vurgulanmıştır.

Gebeliğin sonu ve erken laktasyondaki süt sığırlarında PON1 aktivitesinde azalma bildirilmiştir. Bu da oksidatif stresin peripartum dönemde değişik bozukluklara sebep olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, serum PON1 aktivitesi bu periyotdaki hastalıkların teşhisi ya da serum antioksidatif kapasite için bir indikatör olarak kullanılabilir (Antončić-Svetina ve ark., 2011; Folnožić ve ark., 2015; Kulka ve ark., 2016; Turk ve ark., 2004; Turk ve ark., 2008 Turk ve ark., 2013).

Farid ve ark. (2013) PON1 aktivitesinin yağlı karaciğerli sığırlarda kontrol grubu sığırlara göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, serum PON1 aktivitesinin tek başına ve standart karaciğer fonksiyon testleriyle kombine şekilde süt sığırlarında yağlı karaciğer hastalığının teşhisinde kullanılabileceği vurgulanmıştır. Bununla birlikte, LDA'lı sığırlarda PON1 aktivitesinin belirlendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

2.5. Süt Sığırlarında Abomazum Deplasmanı (AD) ve Oksidatif Stres

Süt sığırlarının, geçiş periyodu esnasında çeşitli metabolik ve enfeksiyöz hastalıklara laktasyon periyoduna göre çok daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres de geçiş döneminde oluşabilir ve bazı metabolik ve enfeksiyöz hastalıkların oluşumuna katkıda bulunabilir. AD, erken laktasyonda süt sığırlarında çok yaygın görülen enfeksiyöz olmayan hastalıklardan biridir. Böylece, ruminantlarda oksidatif stresin patofizyolojisinin anlaşılması AD ve diğer metabolik hastalıkların tanı ve tedavilerinde antioksidan uygulamalarına imkan sağlayabilecektir.

Fürll ve ark. (2003) doğumdan sonra 1-4 haftalar arası (erken laktasyon) SOD ve TAS'ın arttığını göstermişlerdir. AD'lı sığırlarda SOD aktivitesi sağlıklı sığırlarla karşılaştırıldığında değişmemiştir. LDA'nın düzeltilmesinden sonra SOD aktivitesi hemen azalmıştır. LDA'lı sığırlarda, RDA'lı sığırlara göre daha yüksek TAS konsantrasyonu tespit edilmiştir. AD'nın düzeltilmesinden sonra TAS konsantrasyonunun önemli ölçüde farklılaşmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, yapılan çalışmada AD'lı sığırların yaklaşık %45'inde antioksidatif sistemin baskılandığı (SOD aktivitesi <7000 U/ml) bildirilmiştir.

LDA'lı (n=10) Holstein ırkı sığırlarda operasyon öncesi ve operasyon sonrası 15, 30, 60, 90. dakikalar ve 2,5,10 ve 24 saat sonrası alınan kan serum örneklerinde lipid peroksidasyon parametrelerinden biri olan tiyobarbitürik asit reaktif substantlar [TBARS (MDA)] düzeyleri ölçülmüştür. Cerrahi operasyonun TBARS'ın plazma düzeylerini geçici olarak artırdığı ve en yüksek plazma TBARS düzeylerinin LDA operasyonu sonrası 60 dak. görüldüğü bildirilmiştir. Operasyon sonrası 24. Saatte TBARS düzeyleri operasyon öncesi düzeylere dönmüştür. Sonuçta, LDA operasyonunun lipid peroksidasyonu geçici olarak artırdığı görülmüştür. Bununla birlikte, lipid peroksidasyonundaki değişikliklerin çok belirgin olmaması nedeniyle antioksidan ilavesi gibi önleyici tedbirlere gerek olup olmadığı konusunda yeni araştırmalara gerek olduğu ifade edilmiştir (Mudron ve ark., 2007).

LDA'lı ve sağlıklı sığırlarda serum selenyum, glutatyon peroksidaz (GPx) ve vitamin E analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak, LDA'lı sığırlardaki serum antioksidan

düzeylerinin sağlıklı sığırlara göre daha düşük olduğu ve LDA'lı sığırlara Vit E ve Se enjeksiyonlarının ya da yemlere ilavesinin yararlı olacağı önerilmiştir (Hasanpour ve ark., 2011). AD'lı sığırlarda antioksidatif sistemde değişiklikler tanımlanmıştır. Operasyon öncesi ve operasyon sonrası antioksidan ilavesinin LDA'lı sığırların tedavisinde destekleyici tedavi olarak iyi sonuçlar vererek kullanılabileceği belirtilmiştir (Locher ve ar., 2011).

Maden ve ark. (2012), AD'lı süt sığırlarında, MDA düzeyinin arttığını, nitrik oksit (NO) konsantrasyonunun ise azaldığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, AD'lı vakalarda oksidatif stres ve abomazal doku hasarı belirlemişlerdir. Ayrıca, bu sonuçların umut verici olmasına rağmen, bu parametrelerin klinik ve prognostik kullanımı için daha ileri araştırmalar gerektirdiğini vurgulamışlardır. Mamak ve ark. (2013), sağ ve sol AD'lı sığırlarda oksidatif durumu değerlendirmek için MDA ve glutatyon (GSH) parametrelerini ölçmüşlerdir. Sağlıklı ve AD'lı gruplar arasında lipit peroksidasyon belirteci olan MDA'da bir değişiklik belirlenemezken, AD'lı sığırlarda glutatyon (GSH) düzeylerinde kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiştir. Böylece antioksidan terapilerin AD'lı sığırlarda kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Son yıllarda, Durgut ve ark. (2016) LDA ve RDA'lı sığırlarda TOS, TAS ve oksidatif stres indeksi (OSI)'ini Erel (2004 ve 2005) metodlarına göre ilk olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmalarında, RDA'lı sığırlarda LDA'lı sığırlara göre daha yüksek oksidatif stres tespit ederlerken, LDA ve RDA'lı sığırlarda serum antioksidant düzeyinde değişiklik tespit edememişlerdir. LDA'lı sığırlarda özellikle oksidatif etkiler üzerine odaklanan bir araştırmada (Aly ve ark., 2016), hasta grupta oksidan parametrelerden H_2O_2 , NO ve MDA'nın önemli ölçüde arttığı, antioksidan enzimlerden serum katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, oksidatif stresin sığırlarda AD'ın patogeneze katkıda bulunduğu ve bu nedenle antioksidan terapilerin kullanımı hem hastalığı önlemek hem de tedavi etmek için tavsiye edilmiştir.

2.6. Süt Sığırlarda Abomazum Deplasmanı (AD) ve Biyokimyasal Parametreler

Aslan ve ark. (1997), süt sığırlarında AD ile yağlı karaciğerin ilgisini araştırmışlardır. Serum AST, glikoz Mg seviyelerinde çok önemli, ALT, albümin ve Ca düzeylerinde önemli fark bulunurken, alkalen fosfataz (ALP), kolesterol, total bilirubin, trigliserit, total protein ve fosfor düzeylerinde istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Sonuç olarak, çalışılan vakaların karaciğerlerinin histolojik muayenesinde, %83,3 oranında yağlı karaciğer tespit edilmiştir. Böylece, AD'larının etiolojisinde karaciğer yağlanması'nın önemi ortaya konulmuştur.

Geishauser ve ark. (1998), süt sığırlarında LDA'nın teşhisi ve seçilen metabolik parametreler [AST, BHBA, glukoz, kalsiyum, üre ve vücut kondisyon skoru (BCS)] arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Sonuç olarak, doğum sonrası birinci ve ikinci haftalarda artan AST ve BHBA'nın LDA olma ihtimalini de artırdığı ve bu dönemde LDA'nın teşhisi için kullanılabilecek parametreler olduğu vurgulanmıştır. Van Winden ve ark. (2003), postpartum dönemde 16 sığra yağlı karaciğeri tetikleyen diyet uygulamışlar ve bunlardan dört tanesinde LDA belirlemişlerdir. LDA'lı sığırlarda serum kalsiyum, glukoz ve insülin konsantrasyonlarının önemli ölçüde düşük olduğunu, oysa SYA, BHBA konsantrasyonları ve AST aktivitesinin LDA olmayan sığırlara göre arttığını belirlemişlerdir.

Markiewicz ve ark. (2009), 60 LDA ve RDA'lı sığırdaki ve 15 sağlıklı erken laktasyondaki sığırdaki bazı kan biyomedikal indikatörleri karşılaştırmışlardır. Hasta hayvanlarda düşük kolesterol (2 mmol/L'den küçük ya da eşit) ve yüksek SYA (600 μ mol/L'den büyük) ve bilirubin (22 mikromol/L'den büyük) ile yüksek AST aktivitesi (100U/L'den büyük) tespit edilmiştir. Bunlardan sadece kolesterol ve bilirubindeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Cerrahi operasyon sonrası hayatta kalan ve ölen sığırlar arasında SYA, kolesterol, AST, bilirubin ve kan üre azotu (BUN) düzeyleri arasında önemli fark gözlenmemiştir. Operasyon sonrası ölen hayvanlarda (5,05 mmol/L), hayatta kalanlarla (2,93 mmol/L) karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksek glukoz düzeyleri belirlenmiştir.

Bir diğerk çalışmada (Stengärde ve ark, 2010) AD'lı ve sağılıklı kontrol grubu sığırlarda glukoz, insülin, fruktozamin, SYA, BHBA, kolesterol, haptoglobin konsantrasyonları ve AST, glutamat dehidrojenaz (GLDH) enzim aktivitelerindeki farklılıklar araştırılmıştır. AD'lı sığırlarda SYA, BHBA, AST, GLDH ve haptoglobin kontrol sığırlarından daha yüksek, insülin ve kolesterol ise daha düşük ölçülmüştür. Glukoz ve fruktozamin konsantrasyonları her iki grupta da benzer bulunmuştur. Sonuç olarak, AD'lı sığırların kan profillerindeki değışikliklerin negatif enerji dengesi, karaciğerk hasarı ve yangısal bir cevaba işaret ettiğı bildirilmiştir (Stengärde ve ark., 2008; Stengärde, 2010; Stengärde ve ark., 2010; Stengärde ve ark., 2011).

RDA (n=10) ve LDA (n=10) teşhisi konan süt ineklerinin operasyon öncesi ve operasyondan sonra 24 ve 72 saat sonra alınan kan serum örneklerinde bazı biyokimyasal parametreler (TG, LDL, HDL, VLDL, glikoz, BUN, total bilirubin, kolesterol, SYA ve BHBA) karşılaştırılarak değerkendirilmiştir. Sonuç olarak; RDA'lı ineklerde operasyon öncesi serum kan BUN ve glikoz miktarındaki artışlar önemli bulunurken diğerk parametreler bakımından istatistiksel bir fark bulunamamıştır (Sezer ve ark., 2012).

Basiri ve ark. (2013), LDA'lı sığırları, kontrol grubu (doğum öncesi ilk hafta ve doğum sonrası ilk hafta) sığırlarla karşılaştırarak 14 biyokimyasal parametreyi değerkendirmişlerdir. AST ve GGT ve glukoz düzeylerinin, LDA'lı sığırlarda sağılıklı sığırlarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. LDA'lı sığırlarda serum kalsiyum düzeylerinde doğum öncesi bir haftadan LDA teşhis edilinceye kadar azalma tespit edilmiştir. Bu çalışmada SYA ve BHB düzeyleri LDA'lı grupta, doğum sonrası kontrol grubuna göre ve ayrıca doğum sonrası kontrol grubunda doğum öncesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. LDA'lı grupta serum kolesterol düzeyleri, doğum sonrası kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha yüksek belirlenmiştir. Serum trigliserit düzeyleri doğum sonrası kontrol grubu, doğum öncesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ve LDA'lı grupta önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, serum albümin düzeylerinin doğum öncesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında doğum sonrası ve LDA'lı sığırlarda daha düşük bulunmasına rağmen, total protein ve üre düzeyleri kontrol ve LDA'lı gruplar arasında önemli bir fark belirlenememiştir. Bu çalışmada, AST, BHBA, SYA, Ca, Na ve K'ın doğum

sonrası ilk haftada ölçüldüğünde LDA oluşumunun muhtemel belirleyicileri olduğu sonucuna varılmıştır.

Geçiş periyodunda artan BHBA ve SYA düzeyleri AD riskine işaret etmektedir. Buzağılama öncesi son haftada SYA düzeylerinin ve buzağılama sonrası ilk haftada BHBA ve insülin benzeri büyüme faktörü 1(IGF1)'nın doğum sonrası LDA'nın belirteçleri olarak değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Sen ve ark., 2015). Klevenhusen ve ark. (2015), özellikle ikinci laktasyondan sonraki laktasyonlarda LDA'lı sığırlarda serum kalsiyum düzeyi azalırken, SYA ve BHBA konsantrasyonlarının arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca laktasyon sayısına bakmaksızın, LDA'lı sığırlarda AST, GLDH ve serum amiloid A (SAA) düzeylerinin de arttığı bildirilmiştir.

Ghazy ve ark. (2016), LDA'lı sığırlarda operasyon öncesi ve sonrası (3 ve 7. günler) bazı hematolojik ve biyokimyasal parametreleri değerlendirmişlerdir. Serum total protein, albümin, globulin, trigliserit (TG), kolesterol, hepatik enzimler (ALT,AST, GGT), ALP, CRP ve serum elektrolitleri (Na, K) ölçülmüştür. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, operasyon öncesi LDA'lı sığırlarda hipoalbüminemi, hiperglobulinemi, azalan serum TG ve kolesterol belirlenmiştir. Aynı şekilde LDA'lı sığırlarda ALT, AST, GGT, alkalen fosfataz (AP) ve CRP de önemli artış, Na ve K'da azalış tespit edilmiştir. Çalışmada, hematolojik, biyokimyasal, hepatik fonksiyondaki değişiklikler ve LDA'lı sığırlarda yangı reaksiyonlarının cerrahi operasyondan 3 gün sonra iyileştiği, böylece onların fizyolojik durumlarının düzeldiği ve tüm sığırların herhangi bir cerrahi komplikasyon olmaksızın (kısa vadede) operasyondan bir hafta sonra tedavi edildiği sonucuna varılmıştır.

Khalphallah ve ark. (2016), AD'lı süt sığırlarında (n=25), operasyon öncesi (0. gün) ve operasyon sonrası 7. ve 30. günlerde lipit metabolizma profilindeki değişiklikleri belirlemişlerdir. AD'lı sığırlarda SYA ve BHBA değerlerinin belirgin olarak arttığı ortaya konmuştur. Operasyon öncesi AD'lı sığırlarla karşılaştırıldığında özellikle operasyon sonrası 30. günde apo B-100, lesitin:kolesterol açıl transferaz (LCAT) ve kolesterol'ün önemli ölçüde artarak, AST, SYA ve BHBA'in azalarak fizyolojik referans değerlere döndüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, SYA'leri ve apo B-100

arasında negatif bir ilişkinin varlığı ortaya konmuştur. Total kolesterol operasyon öncesi AD'lı gruplarda önemli ölçüde azalmıştır.

Ismael ve ark. (2018), LDA'lı sığırlarda total protein, albümin, globülinler, kolesterol, trigliseritler ve glukoz'un önemli ölçüde azaldığını, üre, kreatinin, ALT, AST ve BHBA'in ise önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir.

Süt sığırlarında sağlıklı bir sürü idaresinde metabolik belirteçlerin önemini vurgulamak için son yıllarda yapılan çalışmalara göre, SYA, kolesterol, BHBA, glikoz, üre, Ca ve P gibi metabolitler ile LDA'nın ilgisi, LDA oluşma riskinin %5,1 olduğu 1,044 sığırdan araştırılmıştır. Bu çalışmada, doğum öncesi 4-10. günlerde $>0,5\text{mEq/L}$ SYA konsantrasyonlu sığırlarda LDA'nın oluşma olasılığının 3,6 kat daha fazla olduğuna ve doğum sonrası BHBA konsantrasyonu $>1,200\mu\text{mol/L}$ olan sığırlarda LDA oluşma ihtimalinin 8 kez daha fazla olduğuna, oysa Ca konsantrasyonunun LDA ile ilişkili olmadığına dikkat çekilmiştir. Doğum sonrası dönemde sığırların %25'inde SYA ya da BHBA konsantrasyonlarının arttığı belirlenmiştir. Kısacası, doğum sonrası BHBA'in SYA konsantrasyonundan çok daha duyarlı ve spesifik bir test olduğu vurgulanmıştır (Madreseh-Ghahfarokhi ve Dehghani-Samani, 2018; Overton ve ark., 2017).

AD'ının doğum sonrası dönemdeki sığırların özellikle beslenme durumunu yansıtan bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisine dair yukarıda belirtildiği üzere birçok çalışma olmasına rağmen, LDA'lı sığırlarda oksidant-antioksidant durumuyla birlikte değerlendiren az sayıda çalışma mevcuttur.

Mevcut çalışmamızın amacı da LDA'lı ve operasyon ile tedavi sonrası ve onuncu günde LDA'lı sığırlarda karaciğer yağlanması ve lipid metabolizmasına yönelik bazı biyokimyasal parametreler ile oksidatif stres parametrelerini, sağlıklı kuru dönem ve erken laktasyon dönemi sığırlarla karşılaştırarak değerlendirmektir. Böylece, LDA'nın teşhis, tedavi ve prognozu hakkında Veteriner Klinisyenlere ışık tutacak fikirler vermek ve ilerde yapılacak çalışmalara da katkıda bulunmak hedeflenmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Hayvanların Seçimi ve Grupların Oluşturulması

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Kliniğine başvuran ve LDA teşhisi konularak operasyona sevk edilen 2,5-3 yaşlarında erken laktasyondaki (laktasyonun 1-3 haftalarındaki) Holstein ırkı sığırlar (n=16) mevcut projenin hasta grubunu oluşturdu. Abomasum deplasmanının klinik tanısında oskültasyon ve osküloperküsyondan yararlanıldı. Bu işlemler 11, 12 ve 13. kostalar düzeyinde interkostal aralıkta ve sol açlık çukurluğunda yapıldı. İlgili bölgenin oskültasyonunda “metalik çınlama”, osküloperküsyonda ise “ping” sesi dinlenerek rutin muayeleri yapıldı. LDA teşhisi konan hayvanlarda, *toggle pin* ile sol paralumbal abomasopeksi tekniği uygulanarak abomasum anatomik situsuna tespit edildi (Wilson, 2008). Bu teknikte öncelikle, sol açlık çukurluğu traş edildi. Bölgenin antisepsi işleminden sonra sol açlık çukurluğunda 20 cm deri ensizyonu yapıldı. Kasların kesilmesi ve peritonun açılması neticesinde abomasuma ulaşıldı. *Desüflasyon kanülü* içine *toggle pin* yerleştirilerek abomasum dorsalinden girildi. *Toggle pin*in abomasum içine gönderilmesi sonrasında içinde bulunan gazın *desüflasyon kanülü*nden dışarı çıkmasına izin verildi. Abomasumun anatomik situsuna indiği anlaşıldığında *desüflasyon kanülü* çıkarıldı. *Toggle pin* ip uçları *gerlach iğnesi* ucunda bulunan delikten geçirildi. Sağ el avuç içine ucuna ip takılı olan *gerlach iğnesi* yerleştirildi. Sol açlık çukurluğundan içeri girilerek median hattın sağ tarafından *gerlach iğnesinin* ucu dışarı çıkarıldı. İğnenin ucundan *toggle pin* ip uçları dışarı çıkarıldı. İp uçlarının arasına gazlı bez koyularak, abomasum median hattın sağ tarafına tespit edildi. Operasyon sonrası beş gün süreyle *i.m* antibiyotik (Redipen enjektabl süspansiyon 100ml/Sanovel) tedavisi yapıldı.

Hasta hayvanlar, operasyon öncesi (pre-op LDA), operasyondan hemen sonra (post-op LDA) ve operasyondan sonraki 10. günde (post-op 10 LDA) üç farklı zamanda takip edildiler. Ayrıca karşılaştırmak amaçlı oluşturulan kontrol grubu,

Burdur yöresi çiftliklerinden klinik olarak sağlıklı Holstein ırkı erken laktasyondaki (n=8) ve kuru dönemdeki (6-9 ay gebe, n=8) sığırlardan oluşturuldu.

Çalışma için, MAKÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığından 02/08/2017 tarih ve 304 sayılı karar ile izin alınmıştır. Ayrıca, çalışmanın maddi desteği Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından karşılanmıştır (Proje No: 0446-YL-17).

3.1.2. Analizlerde Kullanılan Cihazlar

Laboratuvar santrifüjü (NF 200 Nüve, Türkiye), spektrofotometre (UV-1601 Shimadzu, Japonya), mikropate reader (Mindray MR-96A, Çin), pH metre (Hanna HI2020-02, USA), hassas terazi (Radwag AS310.R2, Polonya), vorteks mikser (Stuart, UK), manyetik karıştırıcı (Nukleon NMK 190, Türkiye), otomatik pipetler (Isolab, 100-1000µL, 20-200µL, 2-20µL), otoanalizör (Gesam Chem 200, İtalya), derin dondurucu ve buzdolabı.

3.1.3. Analizlerde Kullanılan Sarf Malzemeler

Demir klorür ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), asetik asit, sülfürik asit, fosfotungstik asit, sodyum hidroksit, magnezyum klorür ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), anhidroz dibazik sodyum fosfat (Na_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), α -ketoglutarik asit (α -KGA), kolesterol, DL-aspartik asit, 2,4dinitrofenilhidrazin, hidroklorik asit, tiyobarbitürik asit (TBA) ve n-bütanol Merck firmasından, 1,1,3,3 tetraetoksipropan (TEP), sodyum pirüvat Sigma-Aldrich firmasından, serum TOS, TAS, PON1/arilesteraz kitleri Rel Assay Diagnostics, Gaziantep/Türkiye; SYA kolorimetrik ölçüm kiti BioVision, USA; BHBA kolorimetrik ölçüm kiti Cayman USA; GGT ve TG otoanalizör kitleri Gesam Chem 200 İtalya; vakumlu jelli kan alma tüpleri (BD vacutainer) ve ependorf tüpleri Nanogen Türkiye firmalarından temin edildi.

3.2. Yöntem

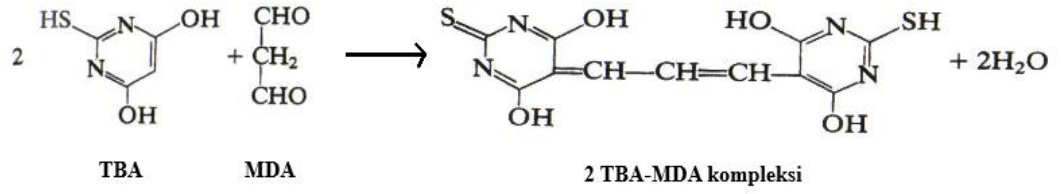
3.2.1. Serum Örneklerinin Toplanması

Hasta hayvanlardan operasyon öncesi (pre-op LDA), operasyondan hemen sonra (post-op LDA) ve operasyondan sonraki 10. günde (post-op10 LDA) jelli vakumlu tüplere v. jugularis'ten kanlar alındı. Aynı şekilde kontrol grubu sığırların kanları da jelli vakumlu tüplerde toplandı. Toplanan kanlar, pıhtılaşmayı takiben 500xg'de 15 dak. santrifüj edilerek serumlar ayrıldı. Serum örnekleri bazı biyokimyasal analizler [total kolesterol (T.Kol), HDL-kolesterol (HDL), LDL-kolesterol (LDL), triaçilgliserol (TG), aspartat amino transferaz (AST), γ -Glutamil Transferaz (GGT), serbest yağ asidi (SYA), β -hidroksi bütirik asit (BHBA)] ile oksidatif stres belirteçlerinin [Lipit peroksidasyonu belirteci olan Malondialdehit (MDA), Total Antioksidan Seviyesi (TAS), Total Oksidan Seviyesi (TOS) ve Paraoksanoz 1/arilesteraz (PON1/ARES)] tayini için -20°C'de depolandı.

3.2.2. Serum Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçümü

3.2.2.1. Lipit Peroksidasyonu (LPO)'nun Belirlenmesi [Malondialdehit (MDA) Tayini]

Prensip: Oksidatif hasara bağlı olarak membran lipidlerinin yıkımlanması sonucu lipid peroksidasyonunun (LPO) bir belirteci olarak açığa çıkan MDA, Satoh (1978) ve Yagi (1984), metotlarından modifiye edilen bir yöntemle ölçüldü. Yöntem, LPO'nun aldehit ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli MDA-TBA₂ kompleksinin 532nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayalıdır (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. MDA ile TBA'nın reaksiyonu

Metodun Ayıraçları:

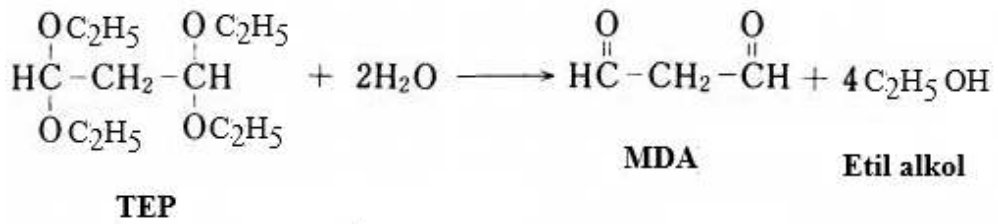
1- Tiyobarbitürik Asit (TBA) Ayıracı [% 0,67 (w/v)]: 0,67g TBA 50ml deiyonize suda eritildi, üzerine 50ml asetik asit ilave edildi ve 1-2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ayıraç günlük olarak hazırlandı.

2- 0,084 N (N/12) H₂SO₄

3- %10 (w/v) Fosfotungstik asit (FTA)

4- n-bütanol

5- Standart (4,1nmol/ml): 1,1,3,3 tetraetoksipropan [TEP, Malonaldehyde bis (diethyl acetal)] ≥96% (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. 1,1,3,3 tetraetoksipropan'ın (TEP) MDA'ya dönüşümü

Serum MDA Düzeyinin Ölçüm Prosedürü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Serum	-	-	0,3
Standart	-	-	-
N/12 H ₂ SO ₄	-	-	2,4
%10 FTA	-	-	0,3

Tüpler vortekslenerek 5 dak. bekletildi ve 3000 rpm’de 10 dak. santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve çökelti bir sonraki basamakta kullanıldı.

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Standart	-	1	-
Deiyonize su	4	3	4
TBA	1	1	1

Tüpler vorteks mikser ile iyice karıştırıldı, ağızlarına cam boncuk kapatılarak kaynar su banyosunda (95°C) 60 dak. bekletildi. Süre sonunda tüpler hızlıca soğutuldu. Kör, standart ve örnek tüplerine 3’er ml n-bütanol ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüpler 3000 rpm’de 10 dak. santrifüj edildikten sonra n-bütanol üst fazı 532 nm’de köre karşı okundu.

Serum MDA Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{MDA (nmol/ml)} = 4,1 \times \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times 1/0,3$$

4,1: Standartın konsantrasyonu

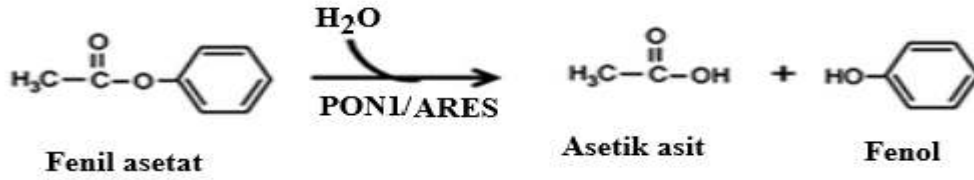
0,3: Alınan örnek hacmi

3.2.2.2. Paraoksonaz 1 /Ariesteraz (PON1/ARES) Aktivite Ölçümü

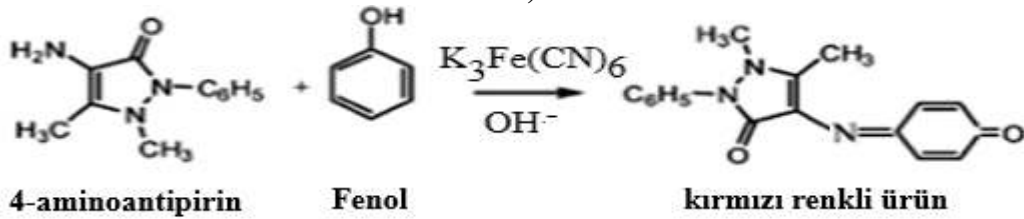
Prensip: Paraoksonazlar (PON) oksidatif hasar ve lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösteren multifonksiyonel enzimlerdir. PON1 bu enzimlerden en çok çalışılanlarındandır. PON1 karaciğerde sentezlenir ve çoğunlukla serumda HDL ile ilişkili olarak bulunur. PON1 farklı aktivitelerle (farklı substratlarla) ölçülebilir. Örneğin, paraoksonaz aktivitesinde substrat olarak paraokson kullanılır, ariesteraz (ARES) aktivitesinde ise substrat olarak fenil asetat ya da 4-p-nitrofenil asetat kullanılır. Çalışmamızda paraokson’dan daha az toksik olduğu için fenil asetat’ı substrat olarak kullanan Rel Assay Diagnostics (Gaziantep/Türkiye) Ariesteraz (ARES) aktivite ölçüm kitini kullanarak PON1 enzim aktivitesini belirledik. Serumdaki PON1, fenil asetatı, fenol ve asetik asit’e hidrolize eder. Oluşan fenol, 4-aminoantipirin ve potasyum ferri siyanürün oksidatif eşleşmesiyle kolorimetrik olarak ölçüldü (Şekil 3.3). Enzimatik aktivite, oluşan fenol’ün molar absorpsiyon katsayısından ($1310\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) hesaplandı. Bir ünite ARES aktivitesi, 1 µmol fenol/dak.

olarak tanımlandı ve kU/L serum olarak ifade edildi (Haagen ve Brock, 1992; Ayar ve ark., 2017).

1)



2)



Şekil 3.3. Arilesteraz enziminin fenil asetat ile ölçümünün prensibi (Bergmeyer, 1974)

PON1/ARES Kit Ayıraçları

- 1- Dilüent Solüsyon (30ml)
- 2- Ayıraç 1 (Deiyonize su)
- 3- Ayıraç 2 (8ml)
- 4- Ayıraç 3 (15ml)

PON1/ARES Kit Prosedürü

Serumlar 1/100 oranında dilüent solüsyonla sulandırıldı.

Sulandırılmış serum	6 µL
Ayıraç 1(deiyonize su)	520 µL
Ayıraç 2	20 µL
Ayıraç 3	160 µL

İyice karıştırıldı, 3-4 dak. oda ısısında bekletildi ve havaya karşı absorbans sıfır ayarı yapılarak 548nm’de ölçümler yapıldı.

PON1/ARES Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

ARES (kU/L) = Örneğin absorbansı x faktör (1316)

3.2.2.3. Serum Total Oksidan Seviyesi (TOS) Ölçümü

Prensip: Serum TOS ölçümünde kolorimetrik Rel Assay Diagnostics (Gaziantep/Türkiye) kiti kullanıldı. Kit prensibine göre, serumdaki oksidanlar, ferröz (Fe^{+2})-o-dianizidin kompleksini ferrik iyonlara (Fe^{+3}) okside eder. Oksidasyon reaksiyonu, ortamda bulunan gliserol molekülleriyle arttırılır. Ferrik iyonları (Fe^{+3}) asidik ortamdaki Ksilenol orange ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu, örnekte bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarıyla ilişkilidir. Ölçüm hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kalibre edildi ve sonuçlar litrede mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$) olarak açıklandı (Erel, 2005).

TOS Kit Ayraçları

Ayıraç 1 (Tampon Solüsyonu, H_2SO_4)	25mM, pH 1.75
Ayıraç 2 (Substrat Solüsyonu)	H_2SO_4 (25mM, pH 1.75) Ferröz (Fe^{+2}) iyonu (5 mM) o-dianisidine (10 nM)
Standart	H_2O_2 (10 $\mu\text{mol/L}$)

TOS Kit Prosedürü

	Örnek (Serum)Tüpü	Standart Tüpü
Serum	45 μL	45 μL
R₁	300 μL	300 μL

Tüpler iyice karıştırıldı, 30sn sonra 530nm’de ilk absorbans değeri okundu (A1).

R₂	15 μL	15 μL
----------------------	------------------	------------------

Tüpler iyice karıştırıldı, 10 dak. oda ısısında bekletildikten sonra 530 nm’de ikinci absorbans değeri okundu (A2).

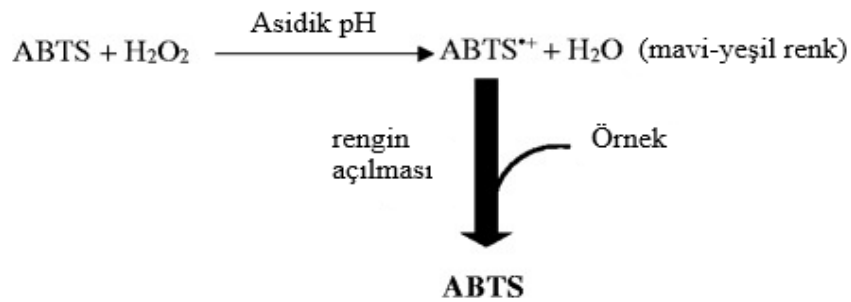
TOS’un Hesaplanması

A2-A1 = Standart ya da örneğin Δ Absorbansı

$$\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Eq./L}) = \frac{\Delta \text{ Absorbans } \text{Örnek}}{\Delta \text{ Absorbans Standart}} \times 10 (\text{Standartın konsantrasyonu})$$

3.2.2.4. Serum Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Ölçümü

Prensip: Serum TAS ölçümünde kolorimetrik Rel Assay Diagnostics (Gaziantep/Türkiye) kiti kullanıldı. Kit çok yaygın olarak kullanılan 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS^{•+})'a dayalı bir metotla çalışır. Bu metoda göre indirgenmiş renksiz bir molekül olan ABST, asidik ortamda (asetat tamponu 30 mmol/L, pH 3,6) sadece hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanarak karakteristik mavi yeşil renkli ABTS^{•+}'ye okside olur (Şekil 3.4). Yüksek pH'da çok konsantre asetat tamponu ile dilüe edildiğinde (asetat tamponu 0,4 mol/L pH 5,8) renk kendiliğinden ve yavaşça açılır. Örnekte antioksidan varlığında, antioksidanın konsantrasyonuna göre orantısal olarak rengin açılma oranı artar. Spektrofotometrik olarak 660nm'deki absorbans değişimi belirlenir. Örnekteki TAS konsantrasyonu rengin açılma oranıyla ters orantılıdır. Reaksiyon hızı, TAS ölçümlerinde standart olarak sıkça kullanılan Trolox (vitamin E'nin suda çözünen bir analogu) ile kalibre edildi ve sonuçlar mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edildi (Erel, 2004).



Şekil 3.4. TAS ölçüm kitinin prensibi (Erel, 2004).

TAS Kit Ayıraçları

Ayıraç 1	Tampon solüsyonu (Asetat Tamponu) 0,4 mol/L pH 5,8
Ayıraç 2	Prokromojen Solüsyon (ABTS) 30 mmol/L
Standart	Trolox (1 mmol/L)

TAS Kit Prosedürü

	Örnek Tüpü	Standart Tüpü	Kör Tüpü
Standart (1mmol Trolox Equiv./L)	-	30 µL	-
Deiyonize su	-	-	30 µL
Örnek (serum)	30 µL	-	-
R1	500 µL	500 µL	500 µL
R2	75 µL	75 µL	75 µL

Tüpler iyice karıştırılır, 30 saniye sonra 660nm’de absorbans değeri okunur. (A1)

Tüpler iyice karıştırıldı ve 10 dak. sonra 660 nm’de absorbans değeri okundu (A2).

TAS’ın Hesaplanması

A2-A1 = Standart ya da örneğin Δ Absorbansı

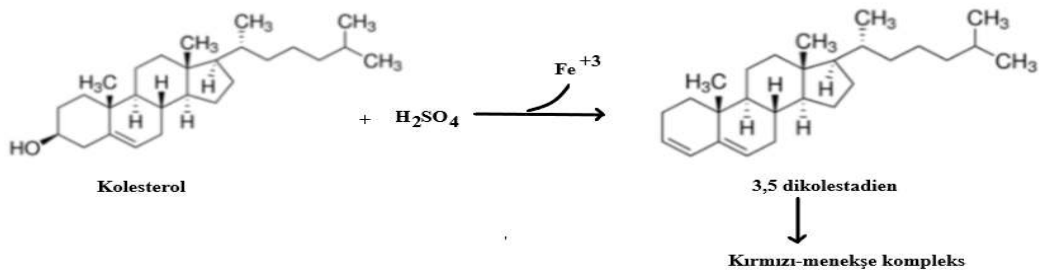
$$[(\Delta \text{ Abs Kör}) - (\Delta \text{ Abs Örnek})]$$

$$\text{TAS (mmol Trolox Equiv./L)} = \frac{[(\Delta \text{ Abs Kör}) - (\Delta \text{ Abs Standart})]}{[(\Delta \text{ Abs Örnek}) - (\Delta \text{ Abs Standart})]}$$

3.2.3. Serum Lipit Parametrelerinin Ölçümü

3.2.3.1. Serum Total Kolesterol Tayini (Zak Metodu)

Prensip: Serum total kolesterol tayini kolorimetrik olarak Zak (1957), metoduna göre yapıldı. Metoda göre, ilk olarak serum proteinler FeCl₃-asetik asit ayırıcının ilavesiyle çöktürüldü. Proteinsiz filtrat konsantre H₂SO₄ ile muamele edildi. Konsantre H₂SO₄ varlığında serumdaki kolesterol, 3,5 dikolestadien oluşturmak üzere dehidre olur ve Fe⁺³ iyonlarının katalitik etkisiyle kırmızı-menekşe renkli bir kompleks oluşturur. Bu renkli kompleksin absorbansı 560 nm’de ölçüldü (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Zak metodunun prensibi

Serum Total Kolesterol Ayırıcıları

1- FeCl₃ Ayırıcı: 140 mg FeCl₃. 6H₂O, 100ml glasiyal asetik asit içinde çözüldü ve koyu renkli cam kapaklı şişede oda ısısında saklandı.

2- Konsantre H₂SO₄

3- Glasiyal Asetik asit

4- Kolesterol stok standardı (%100mg): 100mg saf kolesterol, 100ml konsantre asetik asit içinde çözüldü.

5- Çalışma standardı (%10 mg): 10 ml stok standart alındı ve 100ml'ye konsantre asetik asit ile sulandırılarak çalışma standartı hazırlandı.

Serum Total Kolesterol Prosedürü

Öncelikle serum örneklerinin 50µL'sine 2ml FeCl₃ ayırıcı eklendi, iyice karıştırıldı ve 2500rpm'de 10 dak. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatantlarda aşağıdaki işlemler uygulandı:

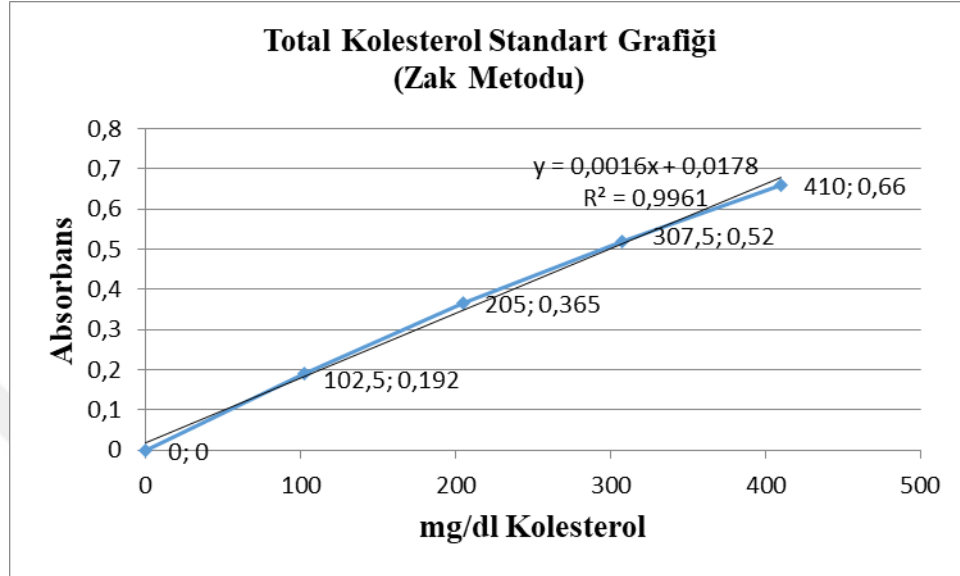
	Örnek Tüpü	Kör Tüpü
Süpernatant	1ml	-
FeCl₃ Ayırıcı	-	1ml
Glasiyal Asetik asit	1ml	1ml
Konsantre H₂SO₄	1ml	1ml

Tüpler iyice karıştırıldı, 30 dak. sonra köre karşı spektrofotometrede 560nm'de absorbans değeri okundu. Sonuçlar standart grafik denkleminde göre %mg olarak hesaplandı.

Total Kolesterol Standart Grafiğinin Hazırlanması

Tüpler	Çalışma Standartı (%10mg)	FeCl ₃ Ayırıcı	Asetik asit	H ₂ SO ₄	Kolesterol(% mg)
Kör	-	2 ml	2 ml	2 ml	0
1	0,5 ml	2 ml	1,5 ml	2 ml	102,5
2	1 ml	2 ml	1ml	2 ml	205
3	1,5 ml	2 ml	0,5 ml	2 ml	307,5
4	2 ml	2 ml	-	2 ml	410

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 30 dak. oda ısısında bekletildi ve köre karşı 560nm’de absorbans değerleri okundu. Absorbans değerlerine karşılık gelen ve %mg kolesterol değerlerinin standart grafiği çizildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Zak metoduna göre hazırlanan serum total kolesterol standart grafiği

3.2.3.2. Serum HDL Kolesterol Tayini

Prensip: Serum HDL-kolesterol’ü Warnick ve ark. (1985)’nın metoduna göre yapıldı. Bu metotda fosfotungstik asit-Mg⁺² ayırıcı ile serum VLDL ve LDL kolesterolü çöktürüldü ve süpernatantda kalan HDL kolesterolü kolorimetrik olarak Zak (1957) metoduna göre tayin edildi.

Serum HDL-Kolesterol Tayini Ayıraçları

1-Sodyum Fosfotungstat (Na-PhT) Ayırıcı (%4): 4gr fosfatungstat 50ml deiyonize suda çözüldü. 16ml 1 M NaOH ilave edildi ve HCl ile pH 7,4’e ayarlandı. Çözelti deiyonize su ile 100ml’ye tamamlandı.

2- MgCl₂. 6H₂O (2 mol/L)

3- Kombine ayıraç: 20ml MgCl₂ ile 80ml Na-PhT (1 kısım MgCl₂/4 kısım NaPhT) karıştırılarak 100 ml kombine ayıraç hazırlandı ve 4 °C de saklandı.

Serum HDL-Kolesterol Prosedürü

1ml serum'a 100 µl kombine ayraç ilave edildi ve hemen karıştırıldı. Oda ısısında 5dak. bekletildi ve 9000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatantda yukarıda belirtilen Zak metoduna göre kolesterol analiziyle HDL-kolesterolü belirlendi.

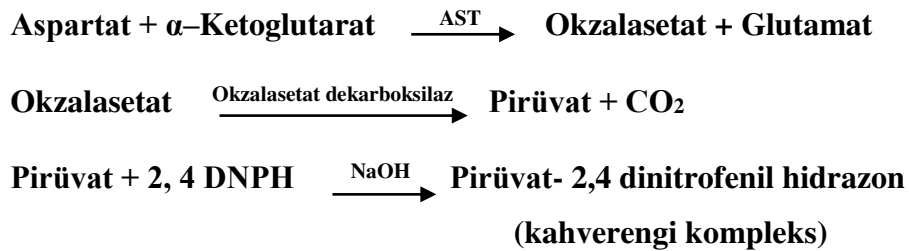
3.2.3.3. Serum LDL-Kolesterol Tayini

Serum LDL-kolesterol tayini Friedewald ve ark. (1972)'nin metoduna göre aşağıdaki formülden hesaplandı:

Serum LDL-Kolesterol (mg/dl): Total Kolesterol – (HDL-kolesterol) + Triglicerit/5

3.2.3.4. Serum Aspartat Transaminaz (AST) Enzim Aktivite Tayini

Prensip: Serumdaki transaminazlar amino grubunu amino asitten α-keto asite transfer ederler. Reaksiyondaki substratlar α-ketoglutarik asit ve aspartat, ürünler ise glutamat ve okzalasetat'dır. Okzalasetat, kendiliğinden okzalasetat dekarboksilaz enzimiyle pirüvata dönüşür. Oluşan pirüvat okzalasetat miktarıyla orantılıdır. Pirüvat, 2-4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile alkali ortamda kahverengi hidrazon kompleksi oluşturur (Şekil 3.7). Oluşan rengin yoğunluğu enzimin aktivitesi ile ilişkilidir (Reitman ve Frankel, 1957).



Şekil 3.7. AST enzim aktivitesinin prensibi

Serum AST Enzim Aktivite Tayini Ayıraçları

1- Fosfat Tamponu, pH:7,4: 11,92gr anhidroz dibazik sodyum fosfat (Na₂HPO₄) ve 2,18gr anhidroz monobazik potasyum fosfat (KH₂HO₄) bir miktar deiyonize suda çözüldü ve 1000ml'ye tamamlanarak buzdolabında saklandı.

2- AST substrat: 0,0584gr α -ketoglutarik asit (α -KGA, oxoglutarat) ve 5,32gr DL-aspartik asit 250ml'lik behere ilave edildi, 40 ml 1N NaOH eklendi ve karıştırıldı. Damla damla 1 N NaOH ile pH $7,4 \pm 0,1$ 'e ayarlandı. Solüsyon 200ml'lik bir balona fosfat tamponu pH 7,4 ile yıkanarak aktarıldı ve 200ml'ye buffer ile tamamlandı. Çözelti buzdolabında saklandı.

3- Renk ayıracı: 0,0396gr 2,4 dinitrofenil hidrazin, 200ml 1N HCl içinde çözüldü ve buzdolabında saklandı.

4- NaOH (0,4 N): 16gr NaOH 1000ml deiyonize suda çözülerek hazırlandı.

Serum AST Enzim Aktivite Tayin Prosedürü

	Kör Tüpü	Örnek Tüpü
AST substrat	500 μ L	500 μ L
	Tüplerin ısısı 37 °C'ye getirilir.	
Serum	-	100 μ L
Deiyonize su	100 μ L	
	Tüpler yavaşça karıştırıldı ve 37 °C'de 1 saat bekletildi.	
Renk ayıracı	500 μ L	500 μ L
	Tüpler yavaşça karıştırıldı ve 20 dak. bekletildi.	
NaOH (0,4 N)	5 ml	5 ml

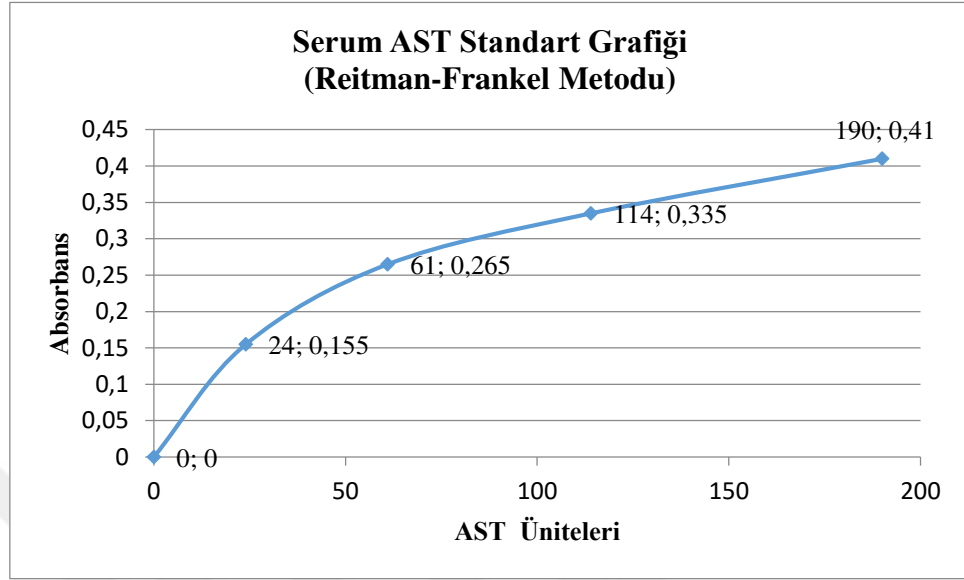
Tüpler iyice karıştırıldı ve en az 5 dak. bekletildi. Deney sonunda oluşan renkli kompleksin absorbansı 505 nm'de okundu. Oluşan renk en az 60 dak. stabildir.

Serum AST Enzim Aktivitesi Standart Grafiğinin Hazırlanması

Piruvat Standartı (1,8mmol/L): 20mg saf sodyum piruvat 100ml fosfat tamponunda (pH=7,4) çözülür. Standart eğri aşağıdaki şekilde hazırlanır:

Tüpler	Standart (ml)	ASTsubstrat (ml)	Deiyonize su	AST (U/ml)
1	0	1	0,2	Kör
2	0,1	0,9	0,2	24
3	0,2	0,8	0,2	61
4	0,3	0,7	0,2	114
5	0,4	0,6	0,2	190

Tüpler karıştırıldı ve yukardaki deney prosedürü takip edildi. Tüplerin absorbans değerlerine karşılık gelen U/ml değerlerini içeren standart grafik çizildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Reitman ve Frankel metoduna göre hazırlanan serum AST standart grafiği

AST Aktivitesinin Hesaplanması

Son olarak, grafikten hesaplanan U/ml değerleri 0,48 ile çarpılarak U/L değerleri hesaplandı.

$$\text{AST Aktivitesi (U/L)} = \text{U/ml} \times 0,48$$

3.2.3.5. Serum Serbest Yağ Asidi (SYA) Tayini

Prensip: Serum serbest yağ asidi tayini kolorimetrik kit (Biovision, USA) prosedürüne göre yapıldı. Kullandığımız kit biyolojik sıvılarda uzun zincirli yağ asitlerini belirlemek için elverişli ve duyarlı, enzim bazlı bir metota göre çalışmaktadır. Bu metotta, yağ asitleri, renk oluşumuyla eşzamanlı olarak okside olan CoA türevlerine çevrilir. Oktanoat (C-8) ve daha uzun yağ asitleri kolorimetrik olarak 570nm’de ya da florometrik olarak 535/587 nm’de belirlenir (ölçüm sınırı 2µM).

SYA Kit Ayıraçları

1- Yağ asidi ölçüm tamponu	25 ml
2- Yağ asidi probu (DMSO içinde)	200 µl
3- Açıl-CoA sentetaz (ACS) ayıracı	1 vial
4- Enzim karışımı	1 vial
5- Güçlendirici	200 µl
6- Palmitik asit standartı (1nmol/ µl)	300 µl

Kit -20 °C’de ışıktan korunarak depolandı.

SYA Kit Prosedürü

Serumlar 1/10 oranında sulandırılarak çalışıldı. Ölçümlerde 96’lık mikroplyt kullanıldı. Kısaca aşağıdaki gibi yapıldı;

- 1- 5µL serum + 45 µL yağ asidi ölçüm tamponu karıştırıldı.
- 2- 2µL ACS ayıracı eklendi, iyice karıştırıldı ve 37°C’de 30 dak. bekletildi.
- 3- 50µL reaksiyon karışımı ilave edildi, karıştırıldı ve 37°C’de 30 dak. ışıktan korunarak bekletildi.

Reaksiyon Karışımı:

- 44 µL ölçüm tamponu
- 2 µL Yağ asidi probu
- 2 µL enzim karışımı
- 2 µL güçlendirici

4-Son olarak ELISA okuyucusunda (Mindray MR-96A, Çin) 450/630 nm’de okumalar gerçekleştirildi.

Serum SYA Konsantrasyonunun Hesaplanması

Kit prosedüründeki standart grafik denkleminde ($y = 0,5949x + 0,0394$) nmol/kuyucuk değerleri bulundu ve serum SYA konsantrasyonu da aşağıdaki formülden mM olarak hesaplandı ve son olarak µM olarak ifade edildi.

Serum SYA konsantrasyonu (C) = (SYA/V) x D (nmol/µL ya da mM)

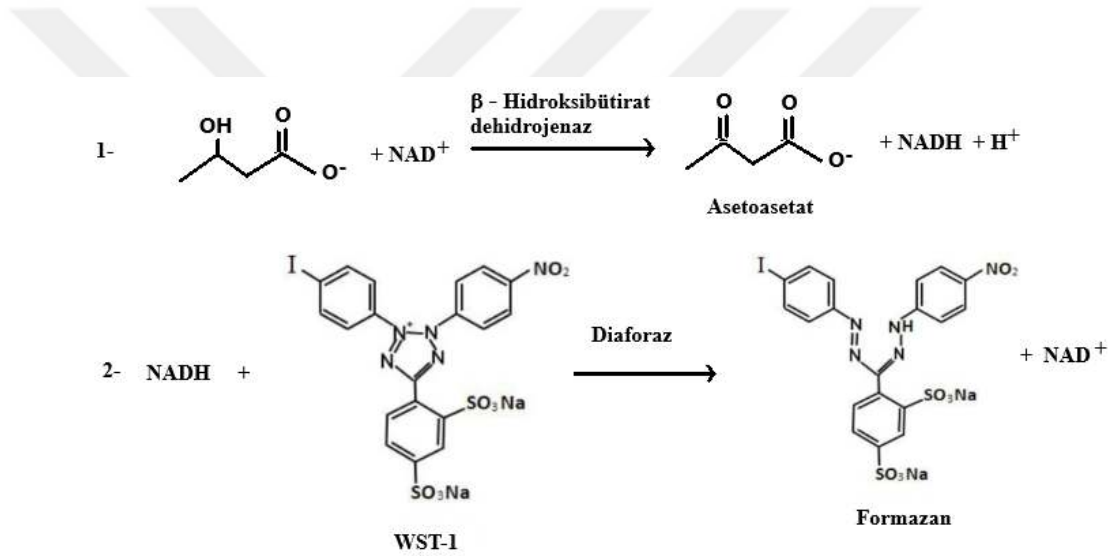
SYA : Standart grafik denkleminde hesaplanan SYA miktarı (nmol/kuyucuk)

V: Reaksiyon karışımındaki örnek hacmi (µL)

D: Örnek sulandırma faktörü

3.2.3.6. Serum Beta-Hidroksi Bütirat (BHBA) Tayini

Prensip: Serum BHBA tayini ticari kolorimetrik kit (Cayman, USA) prosedürüne göre yapıldı. Kitin çalışma prensibi, beta-hidroksi bütiratın (BHBA), beta hidroksi bütirat dehidrojenaz enzimiyle asetoasetat'a oksidasyonuna dayalıdır. Oksidasyonla eşzamanlı olarak, kofaktör NAD^+ , NADH 'a indirgenir. Diaforaz varlığında NADH kolorimetrik dedektör, suda çözünen tetrazolium tuzu (WST-1) ile reaksiyona girer ve NADH ile kolayca indirgenerek 445-455 nm'de maksimum absorbans veren portakal sarısı formazan boyası oluşur. Boyanın absorbansı BHBA konsantrasyonuyla direkt olarak orantılıdır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Serum BHBA tayini ticari kolorimetrik kit (Cayman, USA) prosedürü

Serum BHBA Kit Ayıraçları

1- BHBA Ölçüm Tamponu (25 ml): Şişe 100mM Tris-HCl, pH 8,5 içermektedir. Oda ısısına getirilen tampon ayıraç ve örneklerin dilüsyonu için kullanıldı. Eritilmiş tampon 4 °C'de 6 ay stabildir.

2- BHBA Standartı: Liyofilize standart 1ml BHBA ölçüm tamponu ile sulandırıldı. Hazırlanan standart 1mM konsantrasyonundadır ve buz içinde 6 saat stabildir.

3- BHBA Enzim Solüsyonu: Liyofilize enzim, 2,4 ml BHBA ölçüm tamponu ile sulandırıldı. Yapılandırılan enzim solüsyonu buz içinde 2 saat stabildir.

4- BHBA Kolorimetrik Dedektör: Şişe, 125µL WST-1 solüsyonunu içerir.

5- Developer Solüsyon: Çözülen enzim solüsyonunun 1 şişesine BHBA kolorimetrik dedektörün 100 µL'si ilave edilerek hazırlandı. Hazırlanan solüsyon 1 saat stabildir.

Serum BHBA Kit Prosedürü

Serumlar kullanmadan önce ölçüm tamponu ile 1/10 sulandırıldı. Ölçümde 96'lık mikroplyet kullanıldı. Pleytin ilk 2 sırasına standart çözeltilerden 50 µL ilave edildi. Diğer kuyucuklara 1/10 dilüe serumlardan 50 µL ilave edildi. Kullanılan tüm kuyucuklara developer solüsyonunun 50 µL'si ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Pleyt karanlıkta 25°C'de 30dak. bekletildi. Süre sonunda ELISA pleyt okuyucuda 450nm'de absorbans değerleri kaydedildi.

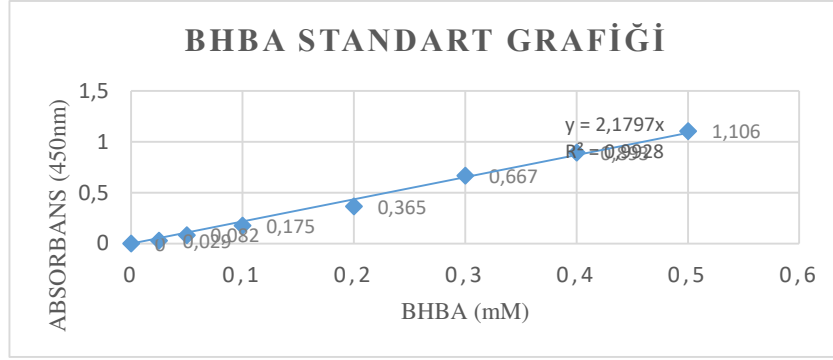
Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Sekiz tüp alındı ve A-H'a kadar numaralandırıldı. Tablo 1'de tanımlandığı gibi her bir tüpe 1mM BHBA standart solüsyonundan ve ölçüm tamponundan aşağıdaki gibi ilave edildi (dilüe standartlar 1-2 saatten fazla bekletilmemelidir).

Tüpler	BHBA Stok Solüsyonu (µL)	Ölçüm Tamponu (µL)	BHBA konsantrasyonu (mM)
A	0	200	0
B	5	195	0,025
C	10	190	0,05
D	20	180	0,1
E	40	160	0,2
F	60	140	0,3
G	80	120	0,4
H	100	100	0,5

Serum BHBA Konsantrasyonunu Hesaplanması

Standart konsantrasyonu 0mM olan A tüpünün absorbans değeri hem kendisinden hem de diğer standart ve örnek değerlerinden çıkarıldı. Çalışılan her bir standart değer hesaplandı ve BHBA standart grafiği çizildi. Sonuçlar standart grafikteki doğru denkleminde hesaplandı ve sulandırma katsayısı ile (1/10) çarpıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Serum BHBA ticari kolorimetrik kit (Cayman, USA) prosedürüne göre hazırlanan standart grafik

3.2.3.7. Serum Triasilgliserol (TG) Analizi

Prensip: TG'ler, lipoprotein lipaz (LPL) enzimiyle yağ asidi ve gliserole hidroliz olur ve gliserol de gliserol kinaz (GK), ATP ve gliserol 3-P-oksidad (GPO) aracılığıyla, dihidroksi aseton fosfat ve H₂O₂'e çevrilir. Peroksidad (POD) enzimiyle H₂O₂, 4-aminofenazon ve 4-fenol klorid ile reaksiyona girerek renkli kompleks oluşturur. Oluşan rengin yoğunluğu örnekteki TG'in konsantrasyonuyla orantılıdır.

Serum TG Kit Ayırıcıları

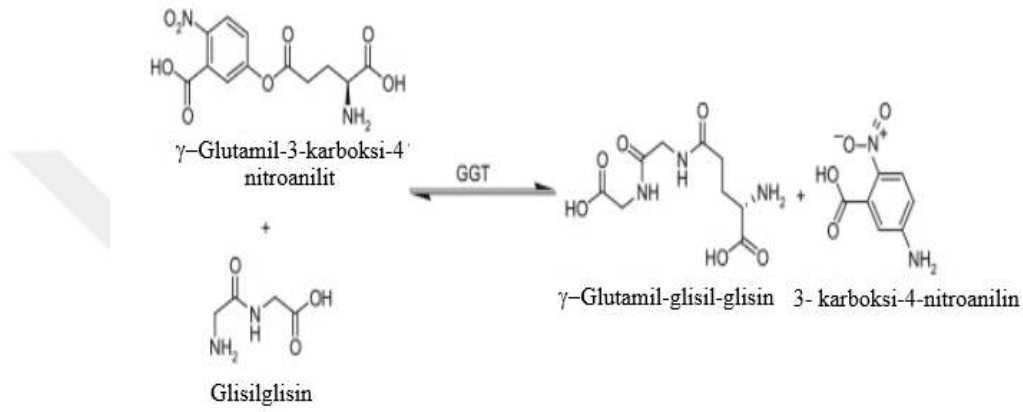
R1	PIPES tamponu	100.0 mmol/l
	Fenol	16.0 mmol/l
	Lipoprotein lipaz (LPL)	≥ 4000U/l
	Gliserol kinaz (GK)	≥ 2000 U/l
	Peroksidad	≥2500 U/l
	ATP	0.8 mmol/l
	4- aminofenazon	1.4 mmol/l
	Gliserol 3-P-oksidad	≥ 2000 U/l

Kit ayırıcı ile Gesan Chem 200 (Italy) otoanalizörde TG ölçümü, 510 nm'de 37 °C'de yapıldı.

3.2.3.8. Serum γ-Glutamil Transferaz (GGT) Aktivite Tayini

Prensip: Membrana bağlı bir enzim olan GGT, glutatyon gibi γ-glutamil peptitlerden, γ-glutamil gruplarının diğer peptit ve amino asitlere transferini katalize

eder. GGT, karaciğer, böbrek, pankreas ve barsaklarda yüksek aktiviteye sahiptir. Önceleri, GGT'nin kolestasis ile ilişkili hepatobiliyer sistem hastalıklarının serum belirteci olduğu düşünülürken, günümüzde hayvanlarda karaciğer hastalıklarının teşhisinde kullanılmaktadır. Enzimatik reaksiyonda, γ -glutamil grubu, γ -glutamil karboksi nitroanilit'den, GGT enzimiyle glisilglisine transfer edilir (Şekil 3.11). Absorbansdaki artış serum GGT aktivitesiyle direk orantılıdır.



Şekil 3.11. γ -Glutamil Transferaz (GGT) kit ölçüm prensibi

Serum GGT Kit Ayıraçları

R1	Goods tamponu pH8.25	350.0 mmol/l
	Glisilglisin	180.0 mmol/l
R2	L- γ -glutamil 3-karboksi 4- nitroanilit	20.0 mmol/l

Kit ayıracı ile Gesan Chem 200 (Italy) otoanalizörde GGT ölçümü, 405 nm'de 37 °C'de yapıldı.

3.2.3.9. İstatistiksel Analiz

Araştırmanın verileri SPSS 24.0 paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma, medyan (minimum ve maksimum değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Normal dağılıma uygunluğun incelenmesinde Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Üç grup arasında anlamlı farklılık olduğunda ikili karşılaştırmalar için Tukey ve Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi uygulandı. Bağımlı grup karşılaştırmalarında, parametrik test varsayımları sağlandığında Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Friedman Testi kullanıldı. Üç ölçüm arasında anlamlı farklılık olduğunda ikili karşılaştırmalar için Bonferroni yöntemi ve Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı. Ayrıca sayısal değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Pearson Korelasyon analizi uygulandı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ anlamlı farklılık kabul edildi.

4. BULGULAR

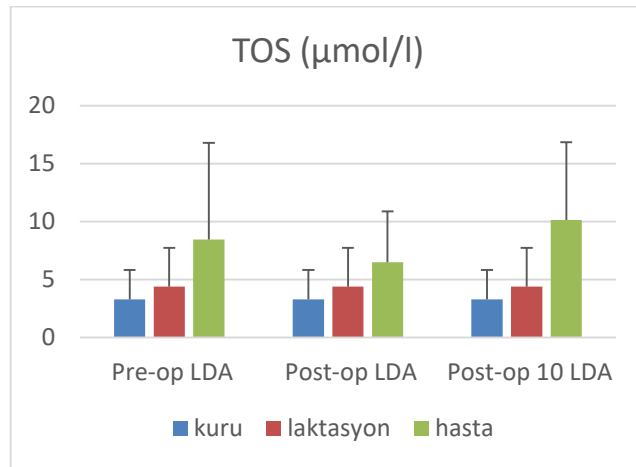
Yapılan çalışmada, LDA'lı (n=16) sığırlar; operasyon öncesi (pre-op LDA), operasyondan hemen sonra (post-op LDA) ve operasyon sonrası 10.gün (post-op10 LDA) olmak üzere 3 grup halinde incelendi. Kontrol grubu olarak da erken laktasyonda (n=8) ve kuru dönemde (n=8) sağlıklı sığırlardan oluşan 2 grup seçildi. Ölçülen parametreler için LDA'lı gruplar (3 grup) kendi aralarında ve kontrol grupları (2 grup) ile ayrı ayrı karşılaştırıldı.

4.1. LDA'lı Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri

LDA'lı ve kontrol grubu sığırlarda, lipid peroksidasyon belirteci olarak MDA ve TOS, antioksidan parametre olarak da PON1/ARES ve TAS parametreleri değerlendirildi (Tablo 4.1).

4.1.1. Serum TOS Düzeyi

Serum TOS düzeylerinde LDA'lı gruplarda kontrol gruplarına göre artış gözlemlendi, fakat sadece post-op 10 LDA'lı grupta bu artış istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,008$) bulundu. LDA'lı gruplar arasında ise anlamlı ($p=0,364$) bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum TOS düzeyindeki değişiklikler

Tablo 4.1. Kontrol (Kuru ve Laktasyon dönemi) ve LDA'lı grup süt sıgırları arasında oksidatif stres parametrelerindeki değişimler

		kuru dönem (kontrol 1)	laktasyon dönemi (kontrol 2)	Pre-op LDA (hasta 1)	Post-op LDA (hasta 2)	Post-op10 LDA (hasta 3)	p1	p2	p3	p4
TOS ($\mu\text{mol/l}$)	A.O $\pm$ S.S	3,29 $\pm$ 2,53	4,4 $\pm$ 3,33	8,47 $\pm$ 8,33	6,51 $\pm$ 4,37	10,13 $\pm$ 6,73	0.173 (kk=3.507)	0.131 (F=2.184)	0.008* (F=5.817)	0.364 (F2=1.045)
	Med (min-maks)	2,29 (0,29 - 7,94)	4,8 (0,29 - 8,82)	5,74 (1,47 - 28,53)	5,61 (0,59 - 15,88)	9,59 (0,59 - 24,41)	-	-	α ; β	-
TAS (mmol/l)	A.O $\pm$ S.S	0,8 $\pm$ 0,41	0,84 $\pm$ 0,3	0,25 $\pm$ 0,14	0,64 $\pm$ 0,2	0,85 $\pm$ 0,11	0.0001* (kk=20.235)	0.367 (kk=2.006)	0.569 (kk=1.127)	0.0001* (F2=62.09)
	Med (min-maks)	0,58 (0,43 - 1,56)	0,82 (0,36 - 1,31)	0,23 (0,08 - 0,63)	0,72 (0,23 - 0,84)	0,84 (0,67 - 1,14)	α ; β	-	-	φ ; ψ ; γ
PON1/ ARES (kU/l)	A.O $\pm$ S.S	943,24 $\pm$ 116,49	996,87 $\pm$ 175,32	740,99 $\pm$ 105,66	1784,17 $\pm$ 307,36	3072,53 $\pm$ 205,29	0.0001* (kk=15.897)	0.0001* (kk=23.348)	0.0001* (F=544.349)	0.0001* (F2=404.6)
	Med (min-maks)	942,26 (779,07 - 1092,28)	983,71 (776,44 - 1219,93)	719,19 (629,05 - 985,68)	1877,93 (1234,41 - 2156,92)	3103,13 (2675,43 - 3358,43)	α ; β	α ; β	α ; β	φ ; ψ ; γ
MDA ($\mu\text{mol/l}$)	A.O $\pm$ S.S	1,92 $\pm$ 0,58	2,35 $\pm$ 2,13	4,79 $\pm$ 3,14	1,66 $\pm$ 0,36	3 $\pm$ 1,84	0.002* (kk=12.712)	0.47 (kk=1.511)	0.085 (kk=4.93)	0.0001* (kk2=20.85)
	Med (min-maks)	2,13 (1,14 - 2,6)	1,72 (0,73 - 7,38)	3,38 (1,77 - 13,42)	1,66 (1,04 - 2,08)	2,44 (1,35 - 8,01)	α ; β	-	-	φ ; γ

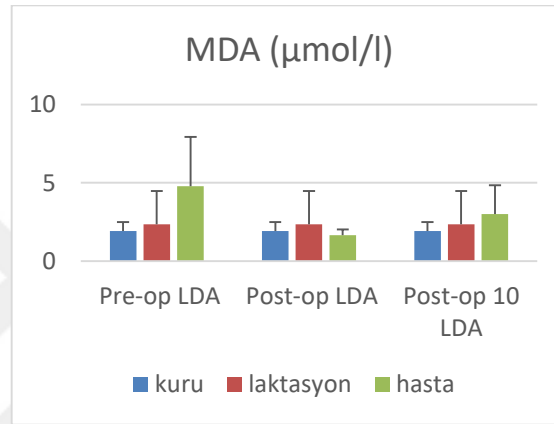
*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; p1: kontrol 1 - kontrol 2 – Pre-op LDA arası farklılık; p2: kontrol 1 - kontrol 2 – Post-op LDA arası farklılık; p3: kontrol 1 - kontrol 2 – Post-op10 LDA arası farklılık; p4: Sadece Hasta (Pre - Post - 10. gün) gruplar arası farklılık;

α : Kuru dönem kontrol – LDA'lı gruplar arası farklılık; β : Laktasyon dönem kontrol – LDA'Lı gruplar arası farklılık; δ : Kuru dönem kontrol –Laktasyon dönemi kontrol arası farklılık; φ : Hasta grup pre-op– hasta grup post-op arası farklılık; ψ : Hasta grup pre-op– hasta grup post-op10 arası farklılık; γ : Hasta grup post-op– hasta grup post-op10 arası farklılık;

kk: Kruskal Wallis Varyans Analizi; F: Tek Yönlü Varyans Analizi; kk2: Friedman Testi; F2: Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi

4.1.2. Serum MDA Düzeyi

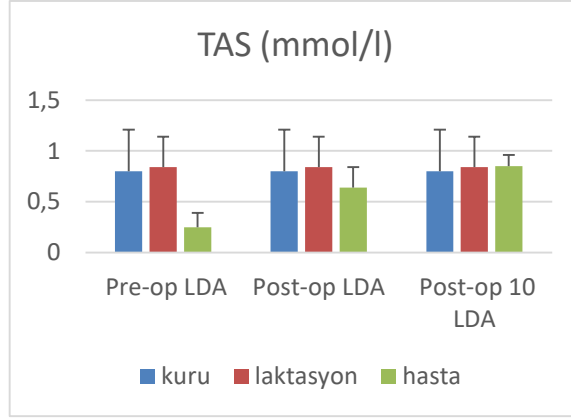
Pre-op LDA'lı sığırlarda MDA düzeylerinin, kontrol gruplarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı ($p=0,002$) tespit edildi. Operasyondan hemen sonra (post-op LDA) MDA düzeyi önemli ölçüde azalarak kontrol grubu düzeylerine gerilerken, post-op 10 LDA'lı grupta tekrar arttığı, fakat yine de kontrol grubu değerlerinde seyrettiği belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum MDA düzeyindeki değişiklikler

4.1.3. Serum TAS Düzeyi

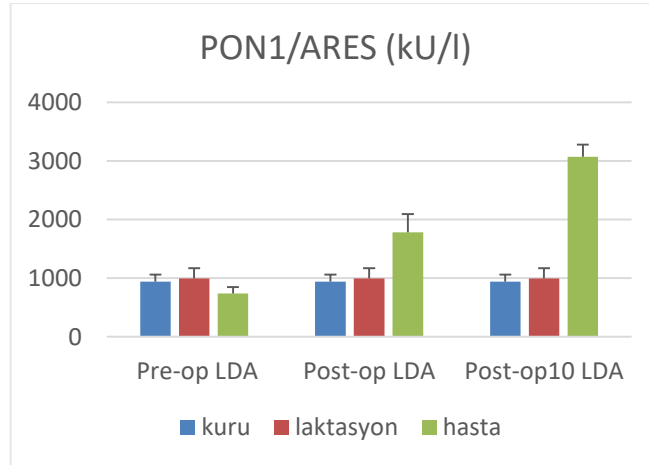
Serum TAS değerlerinde, pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol gruplarına göre önemli ölçüde azalma ($p=0,0001$) belirlendi ve operasyon sonrası LDA'lı sığırlarda (post-op LDA ve post-op 10 LDA) giderek arttığı ve post-op 10 LDA'lı grupta kontrol grubu değerlere ulaştığı tespit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum TAS düzeyindeki değişiklikler

4.1.4. PON1/ARES Aktivitesi

Pre-op LDA'lı sığırlarda, PON1/ARES değerleri ise kontrol grubuna göre önemli ölçüde ($p=0,0001$) azaldı ve operasyon sonrası gruplarda (post-op LDA ve post-op 10 LDA) giderek önemli bir artış ($p=0,0001$) gösterdi. Ayrıca, operasyon sonrası LDA'lı sığırlarda PON1/ARES aktivitesindeki bu artışın kontrol grubu değerlerinin de üzerine çıktığı gözlemlendi (Şekil 4.4).



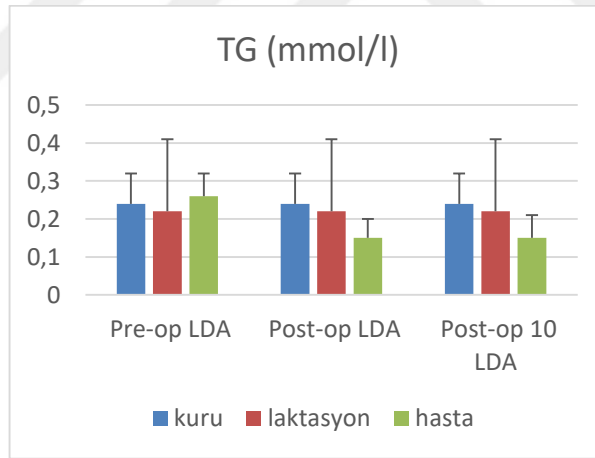
Şekil 4.4. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum PON1/ARES düzeyindeki değişiklikler

4.2. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Lipit Parametreleri

Yapılan çalışmada, LDA'lı ve kontrol grubu sığırlarda, lipit metabolizmasına ve karaciğer yağlanması yönelik biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler araştırıldı. Bu kapsamda, serum TG, total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, SYA ve BHBA değerleri ile karaciğer enzimlerinden AST ve GGT aktiviteleri değerlendirildi (Tablo 4.2).

4.2.1. Serum TG Düzeyi

Serum TG konsantrasyonları, pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında önemsiz bir artış gösterdi ve post-op 10 LDA'lı sığırlarda, kuru dönem sığırlara göre önemli ölçüde azalırken, laktasyon dönemi değerlerinde seyrettiği gözlemlendi. LDA'lı 3 grup kendi arasında karşılaştırıldığında, operasyon sonrası her iki grupta da pre-op LDA'lı gruba göre önemli bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.5).

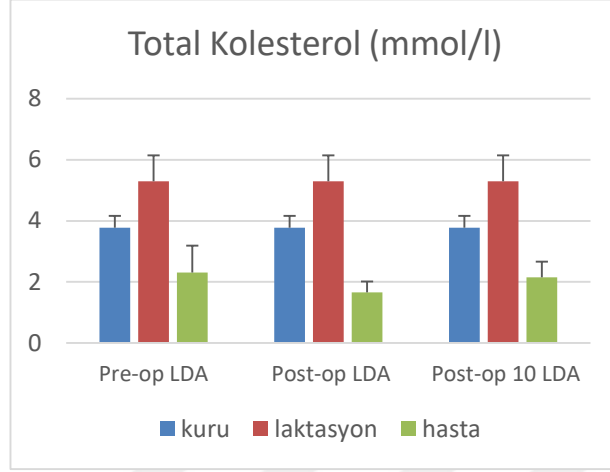


Şekil 4.5. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum TG düzeyindeki değişiklikler

4.2.2. Serum Total Kolesterol Düzeyi

Serum total kolesterol düzeyleri, pre-op LDA'lı grupta kontrol gruplarına göre önemli ölçüde ($p=0,0001$) azaldı. Laktasyon dönemi sığırlarda, kuru dönem sığırlara göre daha yüksek kolesterol düzeyleri tespit edildi. Ayrıca post-op LDA'lı sığırlarda

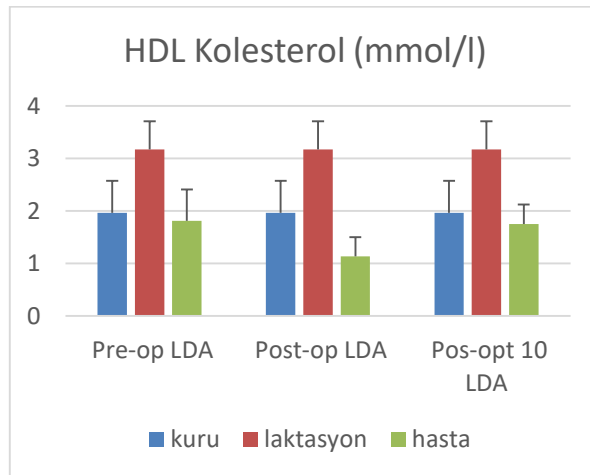
total kolesterolün pre-op LDA'lı sığırlara göre azaldığı ve post-op 10 LDA'lı grupta arttığı, fakat kontrol grubu değerlere erişemediği gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum total kolesterol düzeyindeki değişiklikler

4.2.3. Serum HDL-Kolesterol Düzeyi

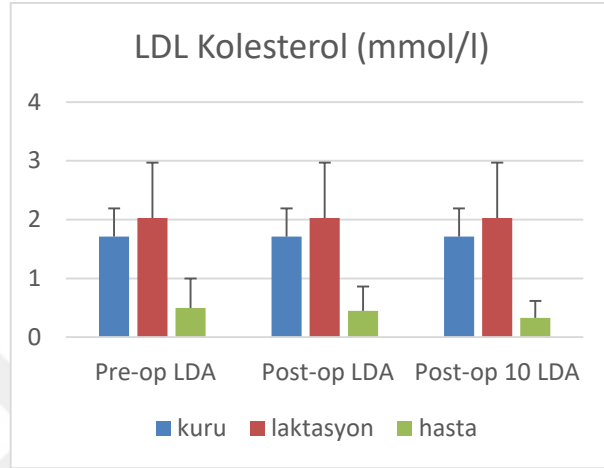
Serum HDL-kolesterolünde de laktasyon dönemi sığırlarda, kuru dönem sığırlara göre artış gözlemlendi. Pre-op LDA'lı sığırlarda laktasyon dönemine göre azalma tespit edildi. Post-op LDA'lı grupta daha da azalan HDL-kolesterolü, post-op10 LDA'lı grupta artarak pre-op LDA'lı değerlere eriştiği, fakat sağlıklı laktasyon dönemi değerlere ulaşamadığı belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum HDL kolesterol düzeyindeki değişiklikler

4.2.4. Serum LDL-Kolesterol Düzeyi

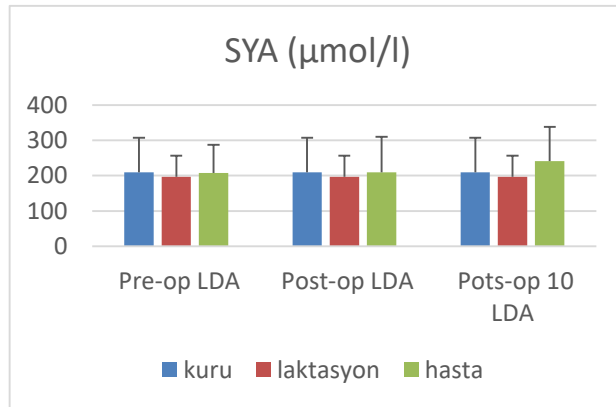
Serum LDL kolesterol düzeylerinde tüm LDA'lı gruplarda, kontrol gruplara göre azalma tespit edildi. LDA'lı gruplar (pre, post ve 10. gün) arasında ise önemli bir fark tespit edilemedi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum LDL kolesterol düzeyindeki değişiklikler

4.2.5. Serum SYA Düzeyi

Serum SYA düzeyleri bakımından sağlıklı ve LDA'lı gruplar arasında önemli bir fark tespit edilemedi. Sadece, pre-op LDA'lı grupta, laktasyon dönemi sağlıklı gruba göre ve post-op10 LDA'lı grupta tüm gruplara göre istatistiksel olarak önemsiz bir artış gözlemlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum SYA düzeyindeki değişiklikler

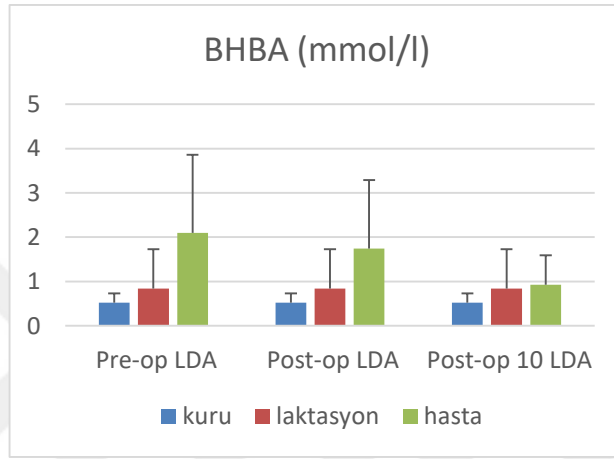
Tablo 4.2. Kontrol (Kuru ve Laktasyon dönemi) ve LDA'lı grup süt sığırları arasında biyokimyasal lipid parametrelerindeki değişimler

		Kuru dönem	Laktasyon dönemi	Pre-op LDA	Post-op LDA	Post-op 10 LDA	p1	p2	p3	p4
TG (mmol/l)	A.O ± S.S	0,24 ± 0,08	0,22 ± 0,19	0,26 ± 0,06	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,06	0.142 (kk=3.899)	0.055 (kk=5.795)	0.021* (kk=7.771)	0.0001* (F2=17.538)
	Med	0,22	0,16	0,28	0,16	0,13	-	-	α	φ; ψ
	(min - maks)	(0,17 - 0,43)	(0,05 - 0,64)	(0,13 - 0,36)	(0,07 - 0,23)	(0,09 - 0,31)				
T-kol (mmol/l)	A.O ± S.S	3,77 ± 0,39	5,3 ± 0,85	2,31 ± 0,88	1,66 ± 0,35	2,15 ± 0,51	0.0001* (F=39.815)	0.0001* (kk=26.027)	0.0001* (kk=25.46)	0.001* (F2=8.373)
	Med	3,78	5,24	2,13	1,6	2,08	δ; α; β	α; β	α; β	φ; γ
	(min - maks)	(3,03 - 4,26)	(4,24 - 6,43)	(1,18 - 4,57)	(1,22 - 2,3)	(1,62 - 3,6)				
HDL-kol (mmol/l)	A.O ± S.S	1,96 ± 0,61	3,17 ± 0,54	1,81 ± 0,6	1,13 ± 0,37	1,75 ± 0,37	0.001* (kk=13.604)	0.0001* (kk=21.412)	0.0001* (kk=15.582)	0.0001* (F2=13.157)
	Med	1,99	3,17	1,73	1,12	1,74	β; δ	β	β; δ	φ; γ
	(min - maks)	(1,27 - 2,67)	(2,19 - 3,86)	(1,04 - 3,27)	(0,63 - 1,85)	(0,99 - 2,45)				
LDL-kol (mmol/l)	A.O ± S.S	1,71 ± 0,48	2,03 ± 0,94	0,5 ± 0,5	0,45 ± 0,41	0,33 ± 0,29	0.0001* (kk=18.00)	0.0001* (kk=19.884)	0.0001* (kk=21.61)	0.74 (kk2=0.603)
	Med	1,71	2,11	0,34	0,35	0,25	α; β	α; β	α; β	-
	(min - maks)	(1 - 2,3)	(0,51 - 3,27)	(0,01 - 1,7)	(0,02 - 1,61)	(0,02 - 1,04)				
AST (U/l)	A.O ± S.S	8,98 ± 0,67	7,61 ± 0,88	21,84 ± 13,01	18,96 ± 13,23	10,95 ± 4,53	0.0001* (kk=24.713)	0.0001* (kk=16.478)	0.041* (kk=6.366)	0.001* (kk2=13.238)
	Med	8,66	7,84	15,84	14,16	10,56	α; β	β	β	φ; ψ
	(min - maks)	(8,4 - 10,33)	(6,47 - 8,92)	(9,6 - 45,6)	(7,68 - 45,6)	(6,72 - 24)				
GGT (U/l)	A.O ± S.S	16,53 ± 5,97	22,78 ± 3,61	34,5 ± 20,52	35,87 ± 21,67	31,37 ± 14,36	0.036* (kk=6.673)	0.046* (kk=6.141)	0.036* (kk=6.675)	0.074 (F2=2.842)
	Med	14,74	23,76	24,74	23,76	22,95	α	α	α	-
	(min - maks)	(10,4 - 25,43)	(15,26 - 26,59)	(13,99 - 80,46)	(12,83 - 77,92)	(15,95 - 57,34)				
SYA (μmol/l)	A.O ± S.S	209 ± 98,24	196,88 ± 59,73	207,38 ± 79,54	209,06 ± 101,22	241,38 ± 96,82	0.882 (kk=0.252)	0.949 (F=0.052)	0.472 (F=0.772)	0.108 (F2=2.401)
	Med	209	215	215	229	256	-	-	-	-
	(min - maks)	(75 - 330)	(75 - 262)	(35 - 316)	(21 - 424)	(75 - 384)				
BHBA (mmol/l)	A.O ± S.S	0,52 ± 0,21	0,84 ± 0,89	2,1 ± 1,76	1,74 ± 1,55	0,93 ± 0,66	0.033* (kk=6.801)	0.235 (kk=2.895)	0.489 (kk=1.43)	0.01* (kk2=9.125)
	Med	0,57	0,57	1,54	1,35	0,85	α	-	-	ψ
	(min - maks)	(0,18 - 0,87)	(0,38 - 3,04)	(0,18 - 5,37)	(0,24 - 4,98)	(0,28 - 2,43)				

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; p1: kontrol 1 - kontrol 2 – Pre-op LDA arası farklılık; p2: kontrol 1 - kontrol 2 – Post-op LDA arası farklılık; p3: kontrol 1 - kontrol 2 – Post-op10 arası farklılık; p4: Sadece Hasta (Pre - Post – Post 10. gün) ölçümleri arası farklılık; α: Kuru dönem kontrol – Hasta gruplar arası farklılık; β: Laktasyon dönemi kontrol - Hasta gruplar arası farklılık; δ: Kuru dönem kontrol –Laktasyon dönemi kontrol arası farklılık; φ: Hasta grup pre-op LDA– hasta grup post-op LDA arası farklılık; ψ: Hasta grup pre-op LDA– hasta grup post-op 10 LDA ölçüm arası farklılık; γ: Hasta grup post op-LDA– hasta grup post-op 10 arası farklılık; kk: Kruskal Wallis Varyans Analizi; F: Tek Yönlü Varyans Analizi; kk2: Friedman Testi; F2: Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi

4.2.6. Serum BHBA Düzeyi

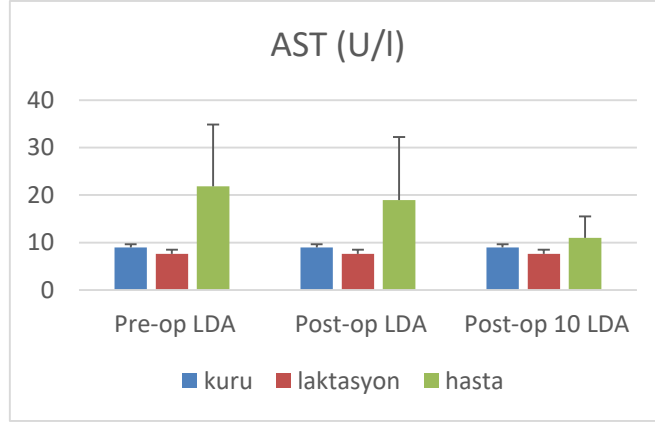
Serum BHBA düzeyinin ise pre-op LDA'lı sığırlarda, kuru dönem sağlıklı sığırlara göre arttığı ve operasyon sonrası gruplarda (post-op ve post-op10) giderek azalarak post-op 10 LDA'lı grupta kontrol gruplarındaki değerlere döndüğü tespit edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum BHBA düzeyindeki değişiklikler

4.2.7. Serum AST Aktivitesi

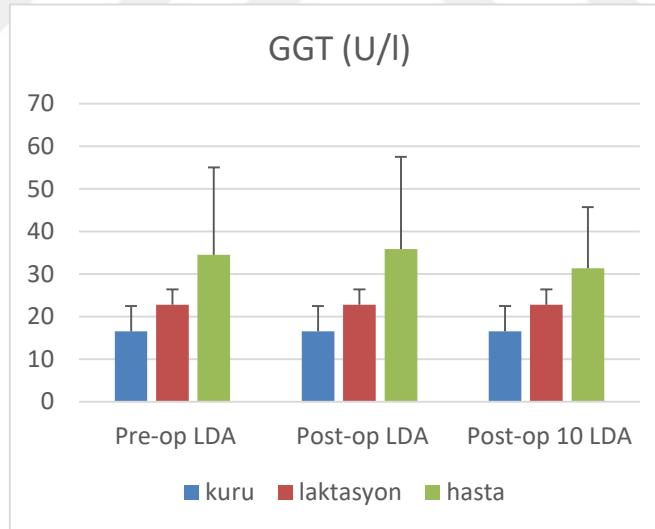
Karaciğer enzimlerinden olan serum AST aktivitesinin pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol grubu sığırlara göre önemli ölçüde (0,0001) yükseldiği ve operasyon sonrası her 2 grupta giderek azaldığı gözlemlendi. Post-op 10 LDA'lı grupta, laktasyon dönemi sağlıklı sığırlara göre hala yüksek olmasına rağmen kuru dönem kontrol grubu değerlerine döndüğü belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum AST aktivitesindeki değişiklikler

4.2.8. Serum GGT Aktivitesi

Serum GGT aktivitesi bakımından ise tüm LDA'lı gruplarda sağlıklı kuru döneme göre artış tespit edildi. Ayrıca serum GGT aktivitesinde sağlıklı laktasyon dönemi ile LDA'lı gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. LDA'lı gruplar ve kontrol grupları arasında serum GGT aktivitesindeki değişiklikler

4.3. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Oksidatif Stres ve Lipit Parametreleri Arasındaki İlişki

Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de kontrol grupları ve hasta gruplarda bakılan parametreler arasında bir ilişkinin olup olmadığına bakıldığında özet olarak,

- 1-Sağlıklı kuru dönem ve post-op LDA'lı sığırlarda HDL kolesterolü ile LDL kolesterolü arasında negatif bir ilişki,
- 2-Laktasyon dönemi sağlıklı sığırlarda PON1/ARES ile T-kolesterol ve LDL kolesterol arasında pozitif bir ilişki,
- 3- Laktasyon dönemi sağlıklı ve tüm LDA'lı sığırlarda T-kolesterol ve LDL kolesterolü arasında pozitif bir ilişki,
- 4- HDL-kolesterol ve TOS arasında, pre-op LDA'lı sığırlar ve post-op 10 LDA'lı sığırlarda negatif, post-op LDA'lı sığırlarda ise aksine pozitif bir ilişki,
- 5- Pre-op ve post-op LDA'lı sığırlarda HDL kolesterol ve AST arasında negatif ilişki,
- 6- Pre-op ve post-op 10 LDA'lı sığırlarda AST ve TOS arasında pozitif ilişki,
- 7- Ayrıca pre-op LDA'lı sığırlarda AST ile TAS arasında negatif ilişki,
- 8- Kuru dönem sağlıklı sığırlarda, GGT ve TOS arasında ve total kolesterol ile BHBA arasında pozitif ilişki,
- 9- Post-op LDA'lı sığırlarda MDA ve PON1/ARES ve LDL kolesterolü ile AST arasında pozitif ilişki tespit edilmiştir.

Tablo 4.3. Kontrol grubu (kuru ve laktasyon dönemi) sığırlardaki parametreler arası ilişkiler

	Kuru dönem (kontrol 1) (n=8)													Laktasyon dönemi (kontrol 2) (n=8)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	$\frac{1}{2}$	
1. TG	1												1. TG	1												
2. T-kol	0	1											2. T-kol	0	1											
3. HDL	0	0	1										3. HDL	-	0	1										
4. LDL	0	0	-	1									4. LDL	0	+	0	1									
5. AST	0	0	0	0	1								5. AST	-	0	0	0	1								
6. GGT	0	0	0	0	0	1							6. GGT	0	0	0	0	0	1							
7. SYA	0	0	0	0	0	0	1						7. SYA	0	0	0	0	0	0	1						
8. BHBA	0	+	0	0	0	0	0	1					8. BHBA	0	0	0	0	0	--	0	1					
9. TOS	0	0	0	0	0	++	0	0	1				9. TOS	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
10.TAS	0	0	0	-	0	0	0	0	0	1			10.TAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
11.PON1/ARE S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1		11. PON1/ARES	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	1		
12. MDA	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	1	12. MDA	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1	

++: pozitif yönde korelasyon ($p<0.01$); +: pozitif yönde korelasyon ($p<0.05$); 0: istatistiksel olarak anlamlı ilişki mevcut değil; --: negatif yönde korelasyon ($p<0.01$); -: negatif yönde korelasyon ($p<0.05$)

Tablo 4.4. LDA'lı gruplardaki (Pre-op , post-op ve post-op 10) parametreler arası ilişkiler

Pre-op LDA	hasta (n=16)												Post-op LDA	hasta (n=16)												Post-op 10 LDA	hasta (n=16)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	¹ ₀	¹ ₁	¹ ₂		1	2	3	4	5	6	7	8	9	¹ ₀	¹ ₁	¹ ₂		1	2	3	4	5	6	7	8	9	¹ ₀	¹ ₁	¹ ₁₂
1. TG	1												1. TG	1												1. TG	1											
2. T-kol	0	1											2. T-kol	0	1											2. T-kol	0	1										
3. HDL	0	⁺ ₊	1										3. HDL	0	0	1										3. HDL	0	⁺ ₊	1									
4. LDL	0	⁺ ₊	0	1									4. LDL	0	⁺ ₊	-	1									4. LDL	0	⁺ ₊	0	1								
5. AST	0	-	--	0	1								5. AST	0	0	-	⁺ ₊	1								5. AST	0	0	-	0	1							
6. GGT	0	0	0	0	0	1							6. GGT	0	0	0	0	0	1							6. GGT	0	0	0	0	0	1						
7.SYA	0	0	0	0	0	0	1						7.SYA	0	0	0	0	0	0	1						7.SYA	0	0	0	0	-	0	1					
8. BHBA	0	0	0	0	0	0	0	1					8. BHBA	0	0	0	0	0	0	0	1					8. BHBA	0	0	0	0	0	0	0	1				
9. TOS	0	-	-	0	⁺ ₊	0	0	0	1				9. TOS	0	0	⁺ ₊	0	0	0	0	0	1				9. TOS	0	0	-	0	⁺ ₊	0	-	0	1			
10.TAS	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1			10.TAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			10.TAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
11.PON1/A RES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		11.PON1/ ARES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		11.PON1/A RES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
12.MDA	0	⁺ ₊	⁺ ₊	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12.MDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⁺ ₊	1	12.MDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

++: pozitif yönde korelasyon (p<0.01); +: pozitif yönde korelasyon (p<0.05); 0: istatistiksel olarak anlamlı ilişki mevcut değil; --: negatif yönde korelasyon (p<0.01); -: negatif yönde korelasyon (p<0.05)

5. TARTIŞMA

Abomazum deplasmanı, özellikle LDA, yüksek süt verimli ineklerin ekonomik olarak önemli, multifaktöriyel bir hastalığıdır ve %80-%90 oranında doğum sonrası 3-4 hafta içinde meydana gelir. Süt sığırlarında görülen abomazum hastalıkları çoğunlukla; stres, beslenme ve metabolik bozukluklar ile yakından ilişkilidir. Hastalık süt sığırlarında, tedavi masrafları ve üretim kaybı sebebiyle büyük ekonomik öneme sahiptir. Yağlı karaciğer, ketozis ve hipokalsemi gibi hastalıkların AD için risk faktörleri olmasına rağmen, AD'nın oluşum sebebi etiyoloji ya da fizyopatoloji çalışmalarıyla aydınlığa kavuşturulamamıştır (Maden ve ark.,2012). AD'dan etkilenen sığırların klinik ve laboratuvar bulguları üzerine çalışmalar hastalığın kontrolünde ve komplikasyonların önlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu hastalık serumda birçok biyokimyasal değişikliklere sebep olabilir. AD'nın oluşumunda stres faktörü etkili olduğundan, bu durum oksidatif aktiviteyle belirlenmektedir ve sığırlarda serum antioksidan durumun değerlendirilmesi de özel bir öneme sahip olmaktadır (Hasanpour ve ark., 2011). Doğum sonrası dönemdeki sığırların özellikle beslenme durumunu yansıtan bazı biyokimyasal parametreler üzerine AD'nın etkisine dair birçok çalışma (Antanaitis ve ark., 2014; Basiri ve ark., 2013; Dezfouli ve ark., 2013; Ghazy ve ark., 2016; Geishauser ve ark., 1998; Imhasly ve ark., 2014; LeBlanc ve ark., 2005; Markiewicz ve ark., 2009; ; Rohn ve ark., 2004a; Rohn ve ark., 2004b; Sen ve ark., 2015; Stengärde ve ark., 2010; Stengärde ve ark., 2011; Sezer ve ark., 2012) olmasına rağmen, LDA'lı sığırlarda oksidant-antioksidant durumu değerlendiren birkaç çalışma (Hasanpour ve ark., 2011; Aly ve ark., 2016; Durgut ve ark., 2016; Maden ve ark., 2012; Mamak ve ark., 2013) mevcuttur. Bu çalışmaların umut verici olmasına rağmen, yeni teşhis ve tedavi parametrelerin klinik ve prognostik kullanımı için daha ileri araştırmalar gerekmektedir.

Mevcut çalışmada, LDA'lı sığırlarda operasyon öncesi ve sonrası bazı serum lipid parametreleri ile oksidatif stres parametrelerinin sağlıklı sığırlarla karşılaştırarak araştırılması amaçlandı.

5.1. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Oksidatif Stres Parametreleri

Mudron ve ark. (2007), LDA'lı (n=10) Holstein sığırlarda operasyon öncesi ve operasyon sonrası 15, 30, 60, 90. dakikalar ve 2,5,10 ve 24 saat sonrası alınan kan serum örneklerinde lipit peroksidasyon parametrelerinden biri olan MDA düzeylerini tespit etmişlerdir. Cerrahi operasyonun MDA'nın plazma düzeylerini geçici olarak artırdığını ve LDA operasyonu sonrası 60. dakikada en yüksek plazma MDA düzeylerini tanımlamışlardır. Operasyon sonrası 24. saatte MDA düzeylerinin operasyon öncesi düzeylere döndüğünü gözlemlemişlerdir. Maden ve ark. (2012), LDA'lı süt sığırlarında, MDA düzeyinin arttığını, NO konsantrasyonunun ise azaldığını tespit etmişlerdir. Aynı şekilde, Aly ve ark. (2016), LDA'lı sığırlarda MDA'nın önemli ölçüde arttığını, Mamak ve ark. (2013), ise RDA ve LDA'lı sığırlar ile sağlıklı gruplar karşılaştırıldığında MDA'da bir değişiklik belirleyememişlerdir.

Son yıllarda, Durgut ve ark. (2016) RDA ve LDA'lı sığırlarda TOS, TAS ve oksidatif stres indeksini (OSI) Erel (2004 ve 2005)'in metodlarına göre ilk olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada, LDA'lı sığırlarda TOS, TAS ve OSI değerlerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında değişmediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, LDA'lı ve kontrol grubu sığırlarda oksidan parametrelerden TOS ve MDA düzeylerindeki değişiklikler araştırıldı. Durgut ve ark. (2016)'nın kullandığı metodu kullanarak yaptığımız çalışmada, serum TOS düzeylerinin LDA'lı gruplarda, özellikle de post-op10 LDA'lı grupta kontrol gruplarına göre artış gösterdiği tespit edildi. Diğer bir oksidasyon belirteci olan MDA düzeylerinin ise pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı ($p=0,002$) ve post-op gruplarda azalarak kontrol grubu değerlere döndüğü belirlendi. Sonuçlar paralellik göstermekle birlikte, lipit peroksidasyon belirteci olan MDA düzeylerindeki artışların istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre, LDA'nın lipit peroksidasyonuna ve iskemik hasara yol açtığı düşünülebilir.

Çalışmamızda ayrıca antioksidan parametrelerden TAS düzeyi ve PON1 aktiviteleri araştırıldı. PON1 oksidasyona karşı koruyucu olduğu için oksidatif streste, negatif akut faz protein olarak düşünüldüğünde yangıda ve karaciğerde sentezlendiğinden karaciğer hastalıklarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. PON1, insan hekimliğinde geniş çaplı çalışılmasına rağmen, veteriner hekimlikte daha sınırlı düzeyde sığırlarda çalışılmıştır ve PON1'in fonksiyonunu aydınlatacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. PON1 paraoksanaz aktivitesi (substrat olarak paraokson kullanılır), arilesteraz aktivitesi (bir fosforlu olmayan aril ester substrat olarak kullanılır) ya da laktonaz aktivitesi (laktonlar substrat olarak kullanılır) ile belirlenebilmektedir. Veteriner hekimlikte, sığırlarda yağlı karaciğerin teşhisi için dihidrokumarin, fenil asetat ve paraokson aktiviteleri arasında benzer teşhis performansı belirlenmiştir. Bu durumda, daha az toksik, daha ucuz ve laboratuvar şartlarına kolay adapte olabilen substratın seçilmesi gerektiği bildirilmiştir (Ceron ve ark., 2014). Bu sebeple mevcut çalışmamızda çok toksik olan paraokson substratı yerine daha az zararlı olan fenil asetat substratının kullanıldığı arilesteraz (ARES) aktivitesi ölçülerek PON1/ARES aktivite tayini yapılmıştır.

Ahmadi ve ark. (2016), PON1 aktivitesinin yağlı karaciğerli sığırlarda azaldığını, fakat bu azalmanın önemli olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, Farid ve ark. (2013) PON1 aktivitesinin yağlı karaciğerli sığırlarda kontrol grubu sığırlara göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir.

Gebeliğin sonu ve erken laktasyondaki süt sığırlarında PON1 aktivitesinde azalma bildirilmiştir. Bu da oksidatif stresin peripartum dönemde değişik bozukluklara sebep olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, serum PON1 aktivitesi bu periyotdaki hastalıkların teşhisi ya da serum antioksidatif kapasite için bir indikatör olarak kullanılabileceği çeşitli çalışmalarda dile getirilmiştir. (Antončić-Svetina ve ark., 2011; Folnožić ve ark., 2015; Kulka ve ark., 2016; Turk ve ark., 2004; Turk ve ark., 2008; Turk ve ark., 2013).

Literatür taramalarımız sonucu LDA'lı sığırlarda PON1 aktivitesinin araştırıldığı makaleye rastlanılmadı. Bu anlamda bir ilk olan çalışmamızda, LDA'lı

sığırlarda PON1/ARES aktivitesinin pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde ($p=0,0001$) azaldığı ve operasyon sonrası gruplarda (post-op LDA ve post-op 10 LDA) giderek arttığı hatta kontrol değerlerinin üzerine çıktığı gözlemlendi. Ayrıca yağlı karaciğerli sığırlarda PON1 azalmasının başlıca nedenlerinin, karaciğer ve serumda artan proinflatuvar sitokinler ($TNF-\alpha$), serbest radikal konsantrasyonlarının artması ve PON1'in lipit peroksitlerin hidrolizi sonrası inaktif olması ile HDL'in yapı ve kompozisyonundaki değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Ahmadi ve ark.,2016). Böylece, çalışmamız LDA'lı sığırlardaki PON1 aktivitesindeki azalmanın karaciğer fonksiyon testleriyle ve lipit peroksidasyon parametreleriyle birlikte değerlendirildiğinde LDA'lı sığırlarında yağlı karaciğer oluşumunun teşhisinde kullanılabileceğini öngörmektedir.

Fürll ve ark. (2003), doğumdan sonra 1-4 haftalar arası (erken laktasyon) sağlıklı sığırlarda TAS'ın arttığını ve AD'lı sığırlarda antioksidan sistemin yaklaşık %45 baskılandığını bildirmişlerdir. LDA'lı sığırlarda, RDA'lı sığırlara göre daha yüksek TAS konsantrasyonu tespit etmişlerdir. AD'nin düzeltilmesinden sonra TAS konsantrasyonunun önemli ölçüde farklılaşmadığını gözlemlemişlerdir.

LDA'lı sığırlardaki serum antioksidan düzeylerinin (GPx ve Se) sağlıklı sığırlara göre daha düşük olduğu ve LDA'lı sığırlara Vit E ve Se enjeksiyonlarının ya da yemlere ilavesinin yararlı olacağı önerilmiştir (Hasanpour ve ark., 2011). Ayrıca, operasyon öncesi ve operasyon sonrası antioksidan ilavesinin LDA'lı sığırların tedavisinde destekleyici tedavi olarak iyi sonuçlar vererek kullanılabileceği belirtilmiştir (Aly ve ark., 2016; Locher ve ark., 2011).

Çalışmamızda, TAS düzeylerinin pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol gruplarına göre (kuru ve erken laktasyon) önemli ölçüde azaldığı ve post-op 10 LDA'lı sığırlarda kontrol grubu değerlere eriştiği belirlendi. Erel (2004 ve 2005)'in metodlarına göre Durgut ve ark. (2016) RDA ve LDA'lı sığırlarda ilk defa yapıldığını ifade ettikleri çalışmalarında, TAS değerlerinde kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında bir fark bulamadıklarını belirtmişlerdir. Bu anlamda bizim çalışmamız da aynı metot ve kit kullanılarak yapılan ikinci çalışma olmaktadır. Sonuçlar yukardaki diğer

alışmalarla uyumlu olmakla birlikte, bu konuda yetersiz çalışma mevcut olup yeni çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşnlmektedir. Sonuçlarımızı göre LDA'lı sığırlarda TAS düzeylerinin belirlenmesi hastalığın teşhisi ve tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir.

Ayrıca, geçiş döneminde PON1 aktivitesi ile total kolesterol, HDL-kolesterol ve trigliserit arasında pozitif korelasyon, SYA, BHBA ve bilirubin ile negatif korelasyon tespit etmişlerdir. Bu durum da PON1 aktivitesinin lipit metabolizmasına göre değiştiiğine işaret etmektedir. TAS konsantrasyonunun sadece total kolesterol, HDL-kolesterol ve PON1 ile ilişkili olduğu, fakat SYA ve BHBA ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir. Bu durumda PON1 aktivitesinin TAS'dan daha fazla enerji eksikliğinden etkilendiği sonucuna varmışlardır (Türk ve ark.,2013). Bizim alışmamızda da laktasyon dönemi sığırlarda PON1/ARES ile T.kolesterol ve LDL kolesterol arasında pozitif korelasyon tespit edildi. Kısacası, PON1 aktivitesinin lipit metabolizmasındaki değişikliklerle bağlantılı olduğu düşünülebilir.

5.2. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon ncesi ve Sonrası Lipit Parametreleri

LeBlanc (2010) ve McArt ve ark. (2013), yaptıkları derlemelerde, doğum öncesi (pre-partum, kuru dönem) süt sığırlarında yüksek SYA konsantrasyonu ve onun AD'ı ile ilişkileri üzerine araştırmaları özetlemişlerdir. Buna göre, kuru dönem SYA artışı genellikle $\geq 0,3-0,5$ mEq/L değerlerinde tanımlanmış ve AD' riski ile ilişkilendirilmiştir. Doğum sonrası (post-partum, erken laktasyon) SYA konsantrasyonu ($\geq 0,7$ mEq/L) artan sığırlarda da AD riskinin normal post-partum SYA konsantrasyonuna sahip sığırlardan daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca, kuru dönem sığırlarda artan BHBA ($\geq 0,6-0,8$ mmol/L) konsantrasyonunun AD'nın oluşma riskini yaklaşık 4 kat artırdığı, erken laktasyon dönemi artan BHBA (1-1,4 mmol/L) konsantrasyonlarının da AD'nın oluşma riskinin bir göstergesi olduğu bildirilmiştir. Doğum sonrası 3-6 haftalar arası (erken laktasyon) sığırların glukoz ihtiyaçları karaciğerin glukoneojenik kapasitesini açar (tip 1 hiperketonemi) ve BHBA konsantrasyonu artar. Sonuç olarak, pahalı ve iddialı bir doğum sonrası tarama testi olan SYA lmlerinin NEB'in sürü içinde değerlendirilmesinde en iyi test olduğu

ileri sürülmüştür. Ayrıca bu testin özellikle sürüde kuru dönemde yüksek SYA konsantrasyonuna sahip, doğum yapma sayısı fazla olan ve güç doğum yapan genç hayvanlarda uygulanmasının uygun olacağı ifade edilmiştir.

Ayrıca Puppel ve Kuczyńska (2016), geçiş dönemi sığırlarda NEB'in bir belirteci olarak SYA ve BHBA düzeylerinin arttığını, De Koster ve ark. (2018) da doğum sonrası periyotda serum SYA ve BHBA düzeylerinin arttığını, fakat düşük vücut kondisyon kaybı olan sığırlarla, yüksek vücut kondisyon kaybı olan sığırlar arasında bir fark olmadığını bildirilmişlerdir.

Laktasyondaki (erken, orta ve geç laktasyon) süt sığırlarında, plazma asetat, BHBA, SYA ve glukoz düzeyleri belirlenmiştir. Erken laktasyonda, asetat ve glukoz düzeylerinde azalmayla birlikte SYA düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Orta ve geç laktasyondaki çoğu sığırdan BHBA, SYA düzeylerinden bağımsız olarak artmasına rağmen, erken laktasyondaki çoğu sığırdan SYA düzeyleriyle bağlantılı olarak BHBA'nın orantılı artışları belirlenmiştir. Özellikle erken laktasyonda, glukoz düzeylerinin azaldığı hayvanlarda plazma BHBA düzeyleri artmıştır. Plazma asetat düzeyleri BHBA düzeyleriyle pozitif ilişkiliyken, glukoz düzeyleriyle ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Yüksek SYA düzeyi ve SYA/BHBA oranının artması NEB'in olduğu durumlarda gözlenmiştir. Bu durum erken laktasyondaki ketojenizde SYA'lerinin önemini vurgulamaktadır (Sato ve ark., 1999).

Türk ve ark. (2013), SYA konsantrasyonunun doğum öncesi ilk haftada artmaya başladığını, buzağılamada ve doğum sonrası dört haftaya kadar 0,4 mmol/L'nin üzerindeki değerlere eriştiği, doğum sonrası ikinci haftada ise maksimum değerlere eriştiğini bildirmişlerdir. Kuru dönemde, SYA konsantrasyonunun 0,4mmol/L'nin üzerinde ve doğum sonrası 0,6 mmol/L'nin üzerinde olmasının hastalık riskinin artışıyla ilgili olduğu bildirilmiştir. Enerji durumunu değerlendirmede, SYA'lerine ilaveten diğer önemli parametre karbonhidrat düzeyi azaldığında periferik dokulara enerji sağlayan BHBA düzeyleridir. Ayrıca, BHBA süt yağ sentezinde de kullanılır. BHBA konsantrasyonunun buzağılamada artmaya başladığı, doğum sonrası dört haftaya kadar önemli derecede arttığı ve dördüncü

haftada 1.0 mmol/L pik değeri verdiği gösterilmiştir. Lipit mobilizasyonu, özellikle TG, total kolesterol ve HDL-kolesterolü içeren kan lipit konsantrasyonunu yansıtır. Triglicerit konsantrasyonu buzağılamada önemli ölçüde azalır ve laktasyonun sekizinci haftasına kadar en düşük konsantrasyonda seyreder. TG'deki azalma, doğum sonrası SYA artışıyla ilişkilidir ve bu iki parametre arasında önemli bir ters ilişki vardır. Bu durum muhtemelen karaciğerde TG birikimine ve süt yağı sentezi ve sekresyonu için meme bezleri tarafından TG'lerin alınımına bağlanmıştır. Serum TG konsantrasyonu, erken laktasyonda en düşük konsantrasyonda ve kuru dönemde de en yüksek konsantrasyondadır. Total kolesterol ve HDL-kolesterol konsantrasyonları doğuma yakın dönemde (kuru) önemli ölçüde azaldığı ve doğum öncesi ilk haftada en düşük değerleri aldığı bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada (Khalphallah ve ark., 2016), total kolesterolün operasyon öncesi AD'lı gruplarda önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda da, erken laktasyondaki sağlıklı sığırlarda BHBA konsantrasyonunun kuru döneme göre arttığı, aksine SYA konsantrasyonunun ise kuru dönem sağlıklı sığırlarda laktasyon dönemine göre arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, erken laktasyondaki sağlıklı sığırlarda serum TG konsantrasyonunda kuru döneme göre önemsiz bir artış, total kolesterol ve HDL kolesterol düzeylerinde ise önemli, LDL kolesterolde ise önemsiz bir artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar da Turk ve ark. (2013)'nin sonuçlarıyla uyumludur. Bu durum da, muhtemelen laktasyonla birlikte süt yağı sentezi ve sekresyonunun artışına bağlı olabilir.

LDA'lı sığırlarda, kolesterol esteri ve fosfolipit konsantrasyonlarında azalış, SYA konsantrasyonunda artış belirlenmiştir (Katoh, 2002). SYA'leri serum albumini ile bağlanarak karaciğere taşınır. Karaciğere dahil olan SYA'leri TG'lere çevrilir ve VLDL olarak salgılanır ya da alternatif olarak mitokondri ve preoksizomlarda okside olur. Sığırlarda; ratlarda ve insanlardakinin aksine yağ asidi sentezi karaciğer yerine adipoz dokuda gerçekleşir. Bu nedenle VLDL olarak hepatik TG salgılama kabiliyeti ruminant olmayanlar ile karşılaştırıldığında sığırlarda oldukça düşüktür. Bu eşsiz özellik, kısmen niçin yağlı karaciğerin süt sığırları için hayati bir durum olduğunu

açıklar. SYA oksidasyonu için hepatik aktivitenin ruminantlar ve non-ruminantlar arasında benzer olduğu görülür. Karaciğer tarafından alınan SYA'lerinin miktarı, TG olarak salgılanan ve karaciğerde okside olan miktarı aşarsa, TG'ler karaciğerde birikir ve yağlı karaciğer gelişir. Sığırlarda, kolesterol ve fosfolipid konsantrasyonları insanlardakiyle benzer olmakla birlikte TG konsantrasyonu oldukça düşüktür (insanlardakinin yaklaşık 1/10). Sınırlı VLDL sekresyonuna ilaveten, düşük TG konsantrasyonu lipid metabolizmasında rumenin etkisini düşündürür. Sığır beslenmesinde lipit içeriği düşüktür (%5'den az) ve temel enerji kaynağı ince barsaklar tarafından absorbe edilen doymuş uzun zincirli yağ asitlerinden ziyade rumende üretilen uçucu yağ asitleridir.

Bizim çalışmamızda, pre-op LDA'lı sığırların SYA düzeylerinde sağlıklı laktasyon dönemi sığırlara göre önemsiz bir artış ve post-op10 LDA'lı grupta ise tüm hasta ve sağlıklı gruplara göre önemsiz bir artış tespit edildi. Diğer çalışmaların aksine SYA düzeyleri bakımından tüm çalışma grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenememiştir. Bu sonuçlar, Markiewicz ve ark. (2009),'nın LDA ve RDA'lı sığırların, erken laktasyondaki kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksek, fakat istatistik olarak önemsiz olarak belirledikleri SYA düzeyleri ile uyumlu bulunmuştur. Bu araştırmada sadece bilirubin ve kolesterol düzeylerinde anlamlı farklılıklar belirlenmiştir. Bu durumda, SYA ölçümlerinin çalışılan metot ve kitlelere bağlı olarak daha değişken olduğu sonucuna varılabilir.

Qu ve ark. (2013), serum kolesterolünün kontrol ve LDA'lı sığırlarda zamana bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Kolesterol konsantrasyonunun doğum sonrası 3. güne kadar iki grup arasında benzer, fakat diğer periyotlarda (doğum sonrası 56. güne kadar olan süreç) LDA'lı sığırlarda daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Özellikle yüksek dansiteli lipoproteinlerde (HDL) bulunan kolesterol, lipoprotein konsantrasyonunun bir indikatörüdür. Yağlı beslenme ve besin kısıtlaması lipit transportunu artırdığı için kolesterol konsantrasyonları artar, oysa ateş ve yangı-ilişkili hastalıklar, özellikle karaciğer bozuklukları, lipit transportunu bozarak kolesterolü azaltır. Khalphallah ve ark. (2016), total kolesterolün operasyon öncesi AD'lı

gruplarda önemli ölçüde azaldığını ve bunun azalan besin alımına bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sezer ve ark. (2012), operasyon öncesi ve sonrası (24. saat ve 72. saat) LDA'lı sığırlarda serum kolesterol değerlerini fizyolojik sınırların (65-220mg/dl) alt değerlerinde (76-82 mg/dl) belirlemişler ve bunun karaciğer yağlanmasıyla ya da anatomik değişiklik ve pankreas paraneşimindeki dolaşım bozukluğuyla ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Aynı çalışmada serum LDL değerlerinde gruplar arasında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Belirlenen LDL değerlerinin normal değerlerin altında olduğunu bildirmişlerdir. Bunun da karaciğer yağlanması ve VLDL'nin LDL'ye dönüşümünün azalmasına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Serum HDL değerleri de gruplar arasında önemli farklılık göstermemiş, fakat normal değerlerden düşük olduğu ve bunun da karaciğer yağlanmasıyla ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Operasyon öncesi ve sonrası LDA'lı sığırlarda serum TG konsantrasyonu bakımından önemli bir fark tespit edilememiştir. Ayrıca, operasyon öncesi ve sonrası sığırlarda SYA değerleri normal değerlerden (0,35-0,70 mmol/L) yüksek bulunmuştur (1.07-1.16 mmol/L). Bunun da enerji açığı ve yağların mobilizasyonundan ileri geldiği belirtilmiştir. Serum BHBA değerlerinin LDA'lı sığırlarda operasyon öncesi ve operasyondan sonraki 24. saatte normal değerlerden yüksek olduğu ve operasyon sonrası 72. saate istatistiksel olarak önemsiz de olsa azaldığı gözlenmiştir. Klevenhusen ve ark. (2015), da LDA'lı sığırlarda SYA, SYA/kolesterol oranı ve BHBA konsantrasyonlarının sağlıklı sığırlara göre önemli ölçüde arttığını, serum kolesterol düzeylerinin ise değişmediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda da, önceki çalışmalarla uyumlu olarak BHBA düzeylerinin pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol grubuna göre arttığı, operasyon sonrası gruplarda giderek azaldığı ve post-op 10 LDA'lı sığırlarda kontrol grubu seviyelerine düştüğü gözlemlendi. Bu durum da, erken laktasyon dönemindeki LDA'lı sığırlarda, süt sekresyonu ve süt yağı sentezi için enerji ihtiyacının artması sonucu oluşan NEB'e cevaben adipoz dokudan lipit mobilizasyonu sonucu kanda en çok bulunan keton cisimlerinden BHBA'nın konsantrasyonunun artışıyla açıklanabilir. Böylece periferik dokuların enerji ihtiyacı karşılanır. Post-op 10 LDA'lı sığırlarda BHBA'nın kontrol grubu değerlere geri

dönmesi de tedavinin etkinliğinin değerlendirmesi açısından önemli bir bulgudur. Benzer olarak, Antanaitis ve ark. (2014), LDA'lı sığırlardan operasyon öncesi, operasyon sonrası 7, 14 ve 21. günlerde serum BHBA konsantrasyonundaki değişiklikleri tespit etmişlerdir. Sonuçta, LDA'lı sığırlarda BHBA konsantrasyonlarının kontrol sığırlarına göre yüksek olduğunu ve operasyondan 21 gün sonra BHBA düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir.

Geçiş dönemi sürü idaresinde ve özellikle LDA riskine karşı buzağılama öncesi ilk haftada SYA konsantrasyonlarına, buzağılama sonrası ilk hafta BHBA konsantrasyonlarına odaklanılması gerektiği bildirilmiştir (LeBlanc ve ark., 2005). Sonuçlarımız da bunu destekler nitelikte olup, SYA'lerinden ziyade BHBA konsantrasyonunun geçiş dönemi sığırlarda ve LDA'lı sığırlarda etkili bir kontrol parametresi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Durgut ve ark. (2016), AD'lı sığırlarda, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında serum total kolesterol, HDL ve LDL kolesterol düzeylerinde önemli bir azalış, serum TG düzeylerinde ise artış tespit etmişlerdir. Sevinç ve ark. (2002), ise sağlıklı sığırlarla karşılaştırıldığında AD'lı sığırlarda HDL-kolesterol düzeyinin azaldığını, LDL-kolesterol, VLDL-kolesterol, TG ve glukoz düzeylerinde ise önemli bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Mevcut çalışmamızda, serum total kolesterol, HDL ve LDL kolesterol düzeyleri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında pre-op LDA'lı sığırlarda önemli ölçüde azaldığı, TG düzeyinde ise önemsiz bir artma olduğu gözlemlendi. Post-op 10 LDA'lı sığırlarda, total kolesterol, HDL ve LDL kolesterolünde pre-op LDA'lı sığırlara göre bir değişiklik gözlenmezken, TG düzeyinde önemli bir azalma gözlemlendi. Post-op 10 LDA'lı sığırlarda serum TG düzeyindeki bu azalma az da olsa serum SYA konsantrasyonundaki artışa bağlanabilir. Pre-op LDA'lı sığırlarda serum total kolesterol, HDL ve LDL kolesterol düzeylerinin azalması lipoprotein metabolizmasının bozulduğunun göstergesidir. Ayrıca post-op 10 LDA'lı sığırlarda bu lipid parametrelerinin hala normal değerlere dönmemesi de dikkat çekicidir.

Antanaitis ve ark. (2014), LDA'lı sığırlarda AST konsantrasyonlarının kontrol sığırlarına göre arttığını ve operasyondan sonraki 21. günde azaldığını tespit

etmişlerdir. Sevinç ve ark. (2002), sağlıklı sığırlarla karşılaştırıldığında AD'lı sığırlarda serum AST ve GGT düzeylerinin önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Serum AST aktivitesi yağlı karaciğerle oldukça ilişkilidir, fakat bu enzim hepatik dokular için spesifik değildir. GGT ise karaciğer dokusuna çok spesifiktir, fakat yağlı karaciğer ile bu enzimin ilişkisi çok yüksek değildir. Böylece, GGT ve AST aktivite tayini ve karaciğer biyopsisinin AD'lı sığırlarda karaciğer fonksiyonunu değerlendirmede yararlı olacağı sonucuna varmışlardır.

Guzelbektas ve ark. (2010), AD'lı sığırların serum AST aktivitesini sağlıklı sığırlarla karşılaştırdıklarında önemli bir farklılık belirleyemezken, GGT aktivitesinin LDA'lı sığırlarda arttığını ortaya koymuşlardır. Dezfouli ve ark. (2013), da LDA'lı sığırlarda, kontrol grubuna göre serum AST aktivitesinde önemli artış tespit etmişlerdir. Puppel ve Kuczyńska (2016)'nın derleme makalelerinde GGT ve AST konsantrasyonlarının AD'lı sığırlarda karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesinde yararlı olduğunu ve AD'lı vakalarda bu iki parametrenin önemli artış sergilediğini bildirmişlerdir. Böylece, karaciğer yağlanması ve karaciğer hasarıyla deplasmanın ilişkisinin doğrulandığını ifade etmişlerdir. Ayrıca, GGT, AST ve bilirubin konsantrasyonlarının doğru analizinin yapılabilmesi için total kolesterol ve SYA konsantrasyonlarıyla bağlantılı olarak yorumlanması gerektiğine de dikkat çekmişlerdir. Maden ve ark. (2012), LDA'lı sığırlarda AST aktivitesinin, erken laktasyondaki kontrol grubu sığırlara göre arttığını, fakat GGT aktivitesinde bir değişiklik olmadığını gözlemlemişlerdir.

Klevenhusen ve ark. (2015), LDA'lı sığırlarda serum karaciğer enzimlerinden AST, GGT ve GLDH'ın da önemli ölçüde yükseldiğini tespit etmişlerdir. Serum GGT ve GLDH artışları LDA'lı sığırlarda, muhtemelen karaciğer yağlanmasına yol açan karaciğer hücre hasarına işaret edebilir. İlaveten, AST aktivitesindeki artışın, kas proteinlerinin mobilizasyonu ya da glukoz öncül molekülü olan glikojenik amino asitlerin salınımı için proteinlerin yıkımlanması sonucu olduğu tahmin edilmiştir. Bu durum LDA'lı sığırlarda düşük süt protein konsantrasyonunun belirlenmesiyle desteklenmiştir. Van Winden ve ark. (2003), LDA'nın klinik teşhisi öncesi 10 gün boyunca, SYA, BHBA konsantrasyonu ve AST aktivitesinin LDA gelişmeyen

sığırlarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığını gözlemlemişlerdir. Bu preklinik değişimlerin LDA'nın patogeneğinde önemli bir rol oynayabileceğini, fakat LDA ve bu parametreler arasında nedensel bir ilişkinin olup olmadığının kesin olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, doğum sonrası sığırların NEB ile ilişkili olan BHBA ve AST aktivitelerinin LDA'nın gelişimini belirlemede kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Kandaki AST aktivitesindeki artışın, glukoz prekürsörü olarak glikojenik amino asitleri serbestleştirmek için kaslardan proteinlerin mobilizasyonu sonucu olduğu tahmin edilmektedir.

Yıldız ve ark. (2019), laktasyon döneminin ikinci haftasında 189 sığır örneğinin metabolik profil test sonuçlarını retrospektif olarak değerlendirmişlerdir. Kan BHBA seviyesi 1mmol/L'nin üstünde olan hayvanlar (grup 1) ile 1mmol/L'den düşük olanlar (grup 2) karşılaştırıldığında grup 1'in GGT, AST ve kalsiyum düzeylerinin grup 2'den anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer metabolik parametreler (BUN, fosfor, magnezyum, total protein ve kolesterol) arasında önemli farklılık bulunamamıştır. BHBA düzeyinin glukoz ile negatif, AST ve GGT ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak BHBA değeri 1 mmol/L ve üzeri çıktığı durumlarda karaciğer ile ilişkili hasarı gösteren enzimlerin de artmaya başladığı gözlenmiştir.

Mevcut çalışmamızda da yukarıdaki literatürlerle uyumlu olarak serum AST aktivitesinin pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol grubu sığırlara göre önemli ölçüde arttığı ve post-op 10 LDA'lı sığırlarda azalarak kuru dönem kontrol grubu değerlere döndüğü, fakat laktasyon dönemi kontrol grubuna göre yüksek kaldığı gözlemlendi. Serum GGT aktivitesi bakımından ise tüm LDA'lı gruplarda sağlıklı kuru döneme göre artış tespit edilmesine rağmen, sağlıklı laktasyon dönemi sığırlar ile LDA'lı gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir artış belirlenemedi. Ayrıca laktasyon dönemi sağlıklı sığırlarda GGT aktivitesi kuru dönem sağlıklı sığırlara göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Bu durum erken laktasyon döneminde lipid mobilizasyonunun artmasına bağlı olarak serum GGT değerlerinin kuru döneme göre daha yüksek olmasına bağlanabilir. Ayrıca, Klevenhusen ve ark. (2015)'nin da belirttiği üzere, LDA'lı sığırlarda serum GGT artışı

muhtemelen karaciğer yağlanması yol açan karaciğer hücre hasarına işaret edebilir. İlavenen, AST aktivitesindeki artışın, kas proteinlerinin mobilizasyonu ya da glukoz öncül molekülü olan glikojenik amino asitlerin salınımı için proteinlerin yıkımlanması sonucu olduğu tahmin edilebilir. Bir başka araştırmada (Imhasly ve ark., 2014), bu karaciğer enzimlerinin karaciğer yağlanması için spesifik olmadığını ve bu nedenle de geçiş dönemi hastalıklarının teşhisini doğrulamada yetersiz olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, LDA'lı sığırlarda AST ve GGT artışının hepatik hasara, TG ve kolesterol azalışının da karaciğer fonksiyon bozukluğuna ve böylece protein ve lipit metabolizmasının zarar gördüğüne işaret etmektedir sonucu da çıkarılabilir (Ghazy ve ark.,2016). Farid ve ark. (2013)'da yağlı karaciğerli sığırlarda serum AST, SYA, BHBA, total bilirubin ve TG değerlerinin arttığını, T.kolesterol, HDL, VLDL, LDL, fosfolipit ve albümin değerlerinin ise azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, sağlıklı ve LDA'lı sığırlarda analizi yapılan parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde, genel olarak gruplarda total kolesterol ile LDL kolesterolü'nün birbirini pozitif olarak desteklediği göze çarpmaktadır. Buna göre sığırlarda LDA ile karaciğer yağlanmasının bağlantılı olduğu tekrar ifade edilebilir.

5.3. LDA'lı Süt Sığırlarında Operasyon Öncesi ve Sonrası Lipit Parametreleri ve Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki İlişki

Mudron ve ark. (1997), karaciğer TG'i >20mg olan LDA'lı sığırlarda, AST ve GLDH aktivitelerin ile serum SYA ve BHBA düzeylerindeki artışın karaciğer fonksiyon bozukluğunu yansıttığına işaret etmişlerdir. Ayrıca karaciğerde lipit peroksidasyonunu MDA oluşumuyla değerlendirmişler ve çalışmalarında karaciğer MDA ile TG düzeyleri arasında pozitif korelasyon belirlemişlerdir. Bizim sonuçlarımıza göre de, LDA'lı sığırlarda TG düzeylerinde önemsiz de olsa bir artışla birlikte serum MDA düzeyinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca LDA'lı sığırlarda, total kolesterol ve HDL kolesterolü azalırken MDA düzeylerinin arttığı gözlenmiştir.

Bu durum da SYA'lerinin karaciğer tarafından alımının artması sonucunda, hücre ölümüne yol açan lipit peroksidasyonunun arttığını göstermektedir. Artan lipit

peroksidasyonu da sığır karaciğerinde TG birikimine bağlı olabilir. Bunun sonucunda da karaciğerde lipoprotein metabolizması bozukluğuna bağlı olarak HDL ve LDL kolesterolü de azalmaktadır.

Sığır abomazum düz kas hücreleri (BSMCs) farklı konsantrasyonlarda BHBA ile muamele edildiğinde, endoplazmik retikulum ve mitokondriya aracılıklı apoptotik hücre ölümünü tetiklediği ve ROS üretimini artırdığı gözlemlenmiştir. Bu durum da, BHBA'le tetiklenen BSMCs'lerin apoptozisinin oksidatif strese duyarlı hücre sinyalinin aktivasyonu ile gerçekleştiği bilgisini doğrular. SOD ve CAT gibi antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH gibi enzimatik olmayan antioksidan moleküllerin düzeyleri ile lipit peroksidasyonu (MDA) değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, BHBA'in antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve GSH düzeylerini önemli ölçüde azaltırken, lipit peroksidasyonunu artırdığı ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar, oksidatif stresin BHBA'le tetiklenen apoptoziste rol oynadığını göstermiştir (Tian ve ark., 2014).

Bizim çalışmamızda da, bu çalışmayı destekler nitelikte pre-op LDA'lı sığırlarda BHBA konsantrasyonu artarken, TAS düzeyinin önemli ölçüde azaldığı, TOS düzeyinin de istatistiksel olarak önemsiz de olsa arttığı tespit edildi. TAS ve TOS ölçümlerini destekler nitelikte pre-op LDA'lı sığırlarda belirlenen spesifik oksidatif stres belirteçlerinden PON1/ARES'in (antioksidan) önemli düzeyde azaldığı, MDA (oksidan)'nın ise önemli ölçüde arttığı belirlendi. Ayrıca, pre-op LDA'lı sığırlarda TOS ile AST arasında pozitif, TAS ile AST arasında da negatif korelasyon gözlemlendi. İlave olarak, HDL ve total kolesterol ile TOS arasında da negatif korelasyon belirlendi.

Değişen lipit metabolizması, artan SYA konsantrasyonu ve oksidatif stres; ketozis, yağlı karaciğer ve AD gibi enerji ilişkili metabolik hastalıkların gelişimine sebep olur. Bu hastalıklar genellikle, ketozis ve yağlı karaciğere yol açan aşırı lipolizisin bir sonucudur. Yağ infiltrasyonu, amonyağı üreye çeviren karaciğer hücrelerine zarar verir. Amonyak, karaciğerin propiyonik asidi glukoza çevirme kabiliyetini azaltır. Böylece karaciğerde yağ birikimine bağlı glukoneogenez bozulur. Karaciğer fonksiyonlarının TG birikimiyle zarar görmesinin mekanizmaları tam

olarak açıklanamamıştır. Muhtemelen, safra akışı ya da sekresyonunun azalması ve oksidatif stresin artışı bu mekanizmalarda etkili olabilir. Yağlı karaciğerin önlenmesi için kritik zamanın buzağılama öncesi ve sonrası bir haftalık periyot olduğu bildirilmiştir. Bu dönemde sığırlar yağlı karaciğer ve onunla ilişkili hastalıklara çok duyarlıdırlar (Vargová ve ark., 2013).

Farid ve ark.,(2013), yağlı karaciğer belirteçleri arasında SYA, BHBA, AST ve lipit profilinin elverişli teşhis parametreleri olduğunu ve PON1 ile kombinasyonunun da yüksek duyarlılık ve spesifite kazandıracağını vurgulamışlardır. Mevcut çalışmamızda, laktasyon dönemi sağlıklı sığırlarda PON1/ARES ile total kolesterol ve LDL kolesterol arasında pozitif korelasyon tespit edildi. Bu sonuca göre PON1/ARES laktasyon dönemi sağlıklı ineklerde önemli bir sürü tarama parametresi olarak kullanılabilir. Ayrıca, pre-op LDA'lı sığırlarda AST, GGT, BHBA konsantrasyonlarının artışı, T.kolesterol, HDL ve LDL kolesterol azalışlarına ilaveten PON1/ARES'in de azaldığı gözlemlendi. Bu nedenle, PON1/ARES'in lipit profili ve karaciğer enzimleriyle bağlantılı olduğu ve yağlı karaciğer ile ona bağlı gelişen LDA'nın teşhisinde destek parametrelerinden biri olabileceği sonucuna varıldı.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mevcut çalışmamızda, LDA'lı sığırlarda (pre-op, post-op ve post-op 10) bazı lipit mobilizasyon parametreleri ve oksidatif stres parametreleri sağlıklı kontrol grubu (kuru ve erken laktasyon dönemi) sığırlar ile karşılaştırılarak araştırıldı. Araştırmanın sonuçları kısaca aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1- LDA'lı ve kontrol grubu süt sığırlarında oksidan durumu belirlemek için, araştırmalarda sıkça kullanılan bir lipit peroksidasyon belirteci olan MDA ile henüz Veteriner Hekimliği alanında yeni bir oksidan parametre olan TOS düzeyleri belirlendi. Böylece, kullandığımız TOS kitinin yerli üretim (Rel Assay/Türkiye) olması, maliyetinin düşük olması ve kullanımının da kolay olması sebebiyle MDA ile karşılaştırılarak doğruluğu ve pratikliği de araştırıldı. Her iki parametre de pre-op LDA'lı sığırlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artış gösterdi. Fakat MDA düzeylerindeki artışın istatistiksel olarak daha anlamlı olması ve post-op 10. günde azalarak kontrol değerlerine dönmesi, MDA sonuçlarını teşhis ve tedavide daha etkin konuma getirmektedir.

2- LDA'lı ve kontrol grubu süt sığırlarında antioksidan durumu belirlemek için TAS düzeyi ve PON1 aktiviteleri belirlendi. Her iki parametrede de Veteriner Hekimlik alanında çok yeni ve çalışılmaya açık belirteçlerdir. Çalışmada, PON1 enzim aktivite tayininde daha az toksik olan fenil asetat substratının kullanıldığı yerli arilesteraz kiti (Rel Assay/Türkiye) tercih edildi. Ayrıca, kullandığımız kitteki fenil asetat substratının insan, sığır, koyun ve keçiler de düşük paraokson konsantrasyonlu örneklerde aktivite azalması göstermeden sonuç verdiği de bildirilmiştir (Ceron ve ark. 2014). Sonuç olarak, pre-op LDA'lı sığırlarda PON1/ARES aktivitesinin kontrol gruplara göre önemli ölçüde azaldığı ve operasyon sonrası da giderek arttığı, aynı durumun TAS düzeylerinde de geçerli olduğu gözlemlendi. Buna göre, LDA'lı sığırların teşhis ve tedavisine ışık tutmak amaçlı antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde her iki parametrenin de elverişli olduğu söylenebilir.

3- LDA'lı ve kontrol grubu süt sığırlarında, başlıca serum biyokimyasal lipit mobilizasyon parametreleri (TG, T.kolesterol, HDL, LDL kolesterol, SYA, BHBA,

AST ve GGT) değeriendirildi. Pre-op LDA'lı sığırlarda, serum TG, SYA, BHBA düzeyleri ile AST ve GGT aktiviteleri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında önemli düzeyde artarken (sadece TG ve SYA artışları istatistiksel olarak önemsiz), total kolesterol, LDL ve HDL kolesterol düzeylerinin azaldığı tespit edildi. Bu sonuçlara göre LDA'lı sığırlarda karaciğer lipit, protein ve lipoprotein metabolizması bozulmakta ve keton cisimlerinin üretimi artmaktadır.

4- LDA'lı ve kontrol grubu süt sığırlarında serum biyokimyasal lipit ve oksidatif stres parametreleri bir bütün olarak değeriendirildiğinde, total kolesterol, HDL ve LDL kolesterol azalışlarına, TG, SYA ve BHBA, GGT ve AST artışlarına TOS ve MDA artışları ile PON1/ARES ve TAS azalışlarının da eşlik ettiği gözlemlendi. Böylece, LDA'lı sığırlarda oksidanların artması ve buna karşın antioksidanların da azalması sonucu oluşan oksidatif stresin lipit metabolizmasıyla ilişkili olduğu sonucuna varıldı.

Elde edilen bu sonuçlara göre, LDA'lı süt sığırlarında hastalığın teşhis, tedavi ve prognozunda lipit parametreleriyle birlikte TAS, TOS ve PON1/ARES gibi oksidatif stres parametrelerin de kullanılabileceği tespit edildi. Çalışmamızın Veteriner Hekimlik alanında henüz yeni ve araştırmaya açık olan bu oksidatif stres parametreleri ile ilgili yapılacak daha kapsamlı araştırmalara da öncülük edeceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, kuru dönem, erken laktasyon ve operasyon sonrası gerek yemlerle gerekse parenteral antioksidan takviyelerinin de hastalığın prognozunda ve tedavisinde etkili olabileceği görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

Ahmadi M, Safi S, Mortazavi P, Rokni N (2016). Evaluation of the enzyme changes in different grades of fatty liver syndrome in dairy cows. *IJPRAS*, **5**(3), 476–488.

Aly MA, Saleh NS, Allam TS, Keshta HG (2016). Evaluation of clinical, serum biochemical and oxidant-antioxidant profiles in dairy Cows with left abomasal displacement. *Asian J Anim Vet Adv.*, **11**(4), 242–247.

Antanaitis R, Stoškus R, Televičius M (2014). Change of biochemical parameters in cows with abomasal displacement after omentopexy, *Žemės Ūkio Mokslai.*, **4**, 237–241.

Antončić-Svetina M, Turk R, Svetina A, Gereš D, Rekić B, Juretić D (2011). Lipid status, paraoxonase-1 activity and metabolic parameters in serum of heifers and lactating cows related to oxidative stress. *Res Vet Sci.*, **90**(2), 298–300.

Aslan V, Ok M, Boydak M, Şen İ, Birdane FM, Alkan F (1997). Süt ineklerinde abomazum deplasmanlarının yağlı karaciğer sendromu ile ilgisi. *Vet. Bil. Derg.*, **13**(2), 77-82.

Aşkar TK, Büyükleblebici O (2012). *Paraoxonase: a new biochemical marker of oxidant-antioxidant status in atherosclerosis.* In: Lushchak V, ed. *Oxidative Stress-Molecular Mechanisms and Biological Effects.* Rijeka, Croatia: InTech Press, p: 145–154.

Ayar G, Atmaca YM, Alışık M, Erel Ö (2017). Effects of paraoxonase, arylesterase, ceruloplasmin, catalase, and myeloperoxidase activities on prognosis in pediatric patients with sepsis. *Clin Biochem.*, **50**(7–8), 414–417.

Baerheim L (2015). *Detection of oxidative stress in tissue homogenate from krill exposed to oil.* Thesis of Master Degree, University of Stavanger, Norway.

Basiri N, Safi S, Norouzian I, Rahimi Foroushani A (2013). Evaluation of biochemical parameters for the prediction of left displaced abomasum in dairy cows using the logistic regression model. *Comp Clinl Path.*, **22**(3), 431–439.

Bergmeyer HU (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol.2, 2nd Edition, Academic Press, Inc. New York and London, p:807-810.

Celi P (2011). *Oxidative Stress in Ruminants*. In: Mandelker L., Vajdovich P. (Eds) *Studies on Veterinary Medicine. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Humana Press, Totowa, NJ, p.191-223.

Ceron JJ, Tecles F, Tvarijonaviciute A (2014). Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Vet Res.*, **10**, 1-11.

De Koster J, Strieder-Barboza C, de Souza J, Lock AL, Contreras GA (2018). Short communication: Effects of body fat mobilization on macrophage infiltration in adipose tissue of early lactation dairy cows. *J Dairy Sci.*, **101**(8), 7608–7613.

Demir Y, Beydemir Ş (2015). Purification, refolding, and characterization of recombinant human paraoxonase-1. *Turk J Chem.*, **39**, 764-776.

Dezfouli MM, Eftekhari Z, Sadeghian S, Bahounar A, Jeloudari M (2013). Evaluation of hematological and biochemical profiles in dairy cows with left displacement of the abomasum, *Comp Clin Pathol.*, **22**, 175–179.

Durgut R, Ozturk AS, Ozturk OH, Guzel M (2016). Evaluation of oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in cattle with displacement of the abomasum. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, **63**(5), 137–141.

Ekmekçi ÖB, Donma O, Ekmekçi H (2004). Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **35**(2), 78–82.

Erel O (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.*, **37**, 112–119.

Erel O (2005): A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.*, **38**, 1103-1111.

Farid AS, Honkawa K, Fath EM, Nonaka N, Horii Y (2013). Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. *BMC Vet Res.*, **9**, 73.

Folnožić I, Turk R, Duričić D, Vince S, Pleadin J, Flegar-Meštrić Z, Valpotic H, Dobranic T, Gracner D, Samardžija M (2015). Influence of body condition on serum metabolic indicators of lipid mobilization and oxidative stress in dairy cows during the transition period. *Reprod Domest Anim.*, **50**(6), 910–917.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.*, **18**(6), 499–502.

Fürll M, Dabbagh MN, Kirbach H, Nauruschat C, Sattler T, Wilken H (2003). *The anti-oxidative state before and after a diagnosed abomasal displacement in cows.* *Acta Vet Scand.*, 44 (Suppl 1), Abstracts – Oral presentations at 11th ICPD, Frederiksberg, Denmark, 12-16 August 2001, p:211-213.

Geishauser T, Leslie K, Duffield T, Sandals D, Edge V (1998). The association between selected metabolic parameters and left abomasal displacement in dairy cows. *J Vet Med.*, **45**, 499-511.

Ghazy A, Gomaa N, Nasr N (2016). Hematological and biochemical evaluation in holstein-friesian cows before and after surgical correction of left abomasal displacement on-filed condition. *Alexandria J Vet Sci.*, **49**(1), 138-146.

Guzelbektes H, Sen I, Ok M, Constable PD, Boydak M, Coskun A (2010). Serum amyloid a and haptoglobin concentrations and liver fat percentage in lactating dairy cows with abomasal displacement. *J Vet Intern Med.*, **24**, 213–219.

Haagen L, Brock A (1992). A New automated method for phenotyping arylesterase (EC 3.1.1.2) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by phenyl acetate. *Clin Chem Lab Med.*, **30**(7), 391–396.

Hasanpour A, Saranjam N, Tabrizi BA (2011). Antioxidant concentration status in the serum of cows with left displacement abomasom. *Glob Vet.*, **7**(5), 478–481.

Imhasly S, Naegeli H, Baumann S, von Bergen M, Luch A, Jungnickel H, Potratz S, Gerspach C (2014). Metabolomic biomarkers correlating with hepatic lipidosis in dairy cows. *BMC Vet Res.*, **10**(1), 122-130.

Ismael M, Elshahawy I, Abdullaziz I (2018). New insights on left displaced abomasum in dairy cows. *AJVS*, **56**(1), 127-136.

Katoh N (2002). Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J Vet Med Sci.*, **64**(4), 293–307.

Kayar A, Dokuzeylul B, Kandemir FM, Kirbas A, Bayrakal A, Or ME (2015). Total oxidant and antioxidant capacities, nitric oxide and malondialdehyde levels in cats seropositive for the feline coronavirus. *Vet Med-Czech.*, **60**(5), 274–281.

Khalphallah A, Aamer AA, Oikawa S, Nakada K, Abdelall T, Katoh H, Elmeligy E (2016). Diagnostic and prognostic significance of lipid profiles in holstein dairy cattle with displaced abomasum : before and after surgical operation. *J Adv Vet Res.*, **6**(1), 7-17.

Klevenhusen F, Humer E, Metzler-Zebeli B, Podstatzky-Lichtenstein L, Wittek T, Zebeli Q (2015). Metabolic profile and inflammatory responses in dairy cows with left displaced abomasum kept under small-scaled farm conditions. *Animals*, **5**(4), 1021–1033.

Kulka M, Kolodziejska-Lesisz J, Klucinski W (2016). Serum paraoxonase 1 (PON1) activity and lipid metabolism parameters changes in different production cycle periods of Holstein-Friesian, Polish Red and Norwegian breeds. *Pol J Vet Sci.*, **19**(1), 165-173.

LeBlanc S (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Develop.*, **56**, 29-35.

LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF (2005). Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *J Dairy Sci.*, **88**(1), 159–170.

Locher L, Sattler T, Wittek T (2011). Relevance, measurement and assessment of the antioxidative status in farm animals. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*, **124**(9-10), 419-31.

Maden M, Ozturk AS, Bulbul A, Avci GE, Yazar E (2012). Acute-phase proteins, oxidative stress and enzyme activities of blood serum and peritoneal fluid in cattle with abomasal displacement. *J Vet Intern Med.*, **26**(6), 1470–1475.

Madreseh-Ghahfarokhi S, Dehghani-Samani A (2018). Blood metabolic profile tests at dairy cattle farms as useful tools for animal health. *BJVM*, (online first), 1-20.

Mamak N, Devrim AK, Aksit H, Aytekin I, Yildiz R (2013). Levels of antioxidant substances, acute phase response and lipid peroxidation in the left and right abomasum displacement in cows. *Pol J Vet Sci.*, **16**(4), 731–733.

Markiewicz H, Gehrke M, Malinowski E (2009). Selected biochemical blood compounds in cows with abomasum displacement. *J Vet Sci.*, **12**(4), 515-518.

McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR, Overton TR, Ospina PA (2013). Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Vet J.*, **198**(3), 560–570.

Miyamoto T, Takahashi Y, Oohashi T, Sato K, Oikawa S (2005). Bovine paraoxonase 1 activities in serum and distribution in lipoproteins. *J Vet Med Sci.*, **67**(3), 243–8.

Mudron P, Herzog K, Höltershinken M, Rehage J (2007). Effects of abdominal surgery on thiobarbituric acid reactive substances and plasma anti-oxidative capacity in dairy cows. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*, **54**(8), 441–444.

Mudron P, Rehage J, Sallmann HP, Mertens M, Scholz H, Kovac G (1997). Plasma and liver α -tocopherol in dairy cows with left abomasal displacement and fatty liver. *J Vet Med A.*, **44**(1–10), 91–97.

Overton TR, McArt JAA, Nydam DV (2017). A 100-year review: metabolic health indicators and management of dairy cattle. *J Dairy Sci.*, **100**(12), 10398–10417.

Puppel K, Kuczyńska B (2016). Metabolic profiles of cow's blood; a review. *J Sci Food Agric.*, **96**(13), 4321–4328.

Qu Y, Lytle K, Traber MG, Bobe G (2013). Depleted serum vitamin E concentrations precede left displaced abomasum in early-lactation dairy cows. *J Dairy Sci.*, **96**(5), 3012–3022.

Reitman S, Frankel S (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.*, **28**, 56-63.

Rohn M, Tenhagen BA, Hofmann W (2004a). Survival of dairy cows after surgery to correct abomasal displacement: 1. Clinical and laboratory parameters and overall survival. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*, **51**(6), 294–299.

Rohn M, Tenhagen BA, Hofmann W (2004b). Survival of dairy cows after surgery to correct abomasal displacement: 2. Association of clinical and laboratory parameters with survival in cows with left abomasal displacement. *J Vet Med.*, **51**, 294–299.

Sato H, Matsumoto M, Hanasaka S (1999). Relations between plasma acetate, 3-hydroxybutyrate, FFA, glucose levels and energy nutrition in lactating dairy cows. *J Vet Med Sci.*, **61**(5), 447–451.

Satoh K (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta.*, **90**, 37-43.

Sen I, Wittek T, Guzelbektes H (2015). Metabolic indicators and risk factors of left displaced abomasum in dairy cattle. *Eurasian J Vet Sci.*, **31** (2), 63-69.

Sevinc M, Ok M, Basoglu A (2002). Liver function in dairy cows with Abomasal Displacement. *Rev. Med. Vet.*, **153**, 477-480.

Sezer K, Kabu M, Yiğitarslan K, Karakurum MÇ (2012). Abomazum deplasmanlı süt ineklerinde pre ve post-operatif bazı biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması. *F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.*, **26**(3), 175–181.

Shaver RD (1997). Nutritional risk factors in the etiology of left displaced abomasum in dairy cows: a review. *J Dairy Sci.*, **80**(10), 2449–2453.

Sordillo, L. M., Aitken, S. L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol and Immunop.*, **128**(1–3), 104–109.

Stengärde L (2010). *Displaced abomasum and ketosis in dairy cows. blood profiles and risk factors.* Thesis of Doctoral Degree, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Stengärde L, Holtenius K, Emanuelson U, Hultgren J, Niskanen R, Tråvén M (2011). Blood parameters in Swedish dairy herds with high or low incidence of displaced abomasum or ketosis. *Vet J.*, **190**(1), 124–130.

Stengärde L, Holtenius K, Tråvén M, Hultgren J, Niskanen R, Emanuelson U (2010). Blood profiles in dairy cows with displaced abomasum. *J Dairy Sci.*, **93**(10), 4691–4699.

Stengärde L, Tråvén M, Emanuelson U, Holtenius K, Hultgren J, Niskanen R (2008). Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis. *Acta Vet Scand.*, **50**(1), 31.

Tian W, Wei T, Li B, Wang Z, Zhang N, Xie G (2014). Pathway of programmed cell death and oxidative stress induced by β -hydroxybutyrate in dairy cow abomasum smooth muscle cells and in mouse gastric smooth muscle. *PLoS ONE.*, **9**(5), 1–12.

Turk R, Juretić D, Gereš D, Svetina A, Turk N, Flegar-Meštrić Z (2008). Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci.*, **108**(1–2), 98–106.

Turk R, Juretic D, Geres D, Turk N, Rekic B, Simeon-Rudolf V, Svetina A (2004). Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. *Res Vet Sci.*, **76**(1), 57–61.

Turk R, Podpečan O, Mrkun J, Kosec M, Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Starič J, Robič M, Belič M, Zrimšek P (2013). Lipid mobilisation and oxidative stress as metabolic adaptation processes in dairy heifers during transition period. *Anim Reprod Sci.*, **141**(3–4), 109–115.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, **39**(1), 44–84.

Van Winden SCL, Jorritsma R, Müller KE, Noordhuizen JPTM. (2003). Feed intake, milk yield, and metabolic parameters prior to left displaced abomasum in dairy cows. *J Dairy Sci.*, **86**(4), 1465–1471.

Vargová M, Konvičná J, Zaleha P, Kadaňi M, Kováč G (2013). *Physiological and pathological changes in dairy cows during the transition period.* XIII Middle European Buiatric's Congress, June 5-8, Belgrade, Republic of Serbia, p:542-548.

Warnick GR, Nguyen T, & Albers AA (1985). Comparison of improved precipitation methods for quantification of high- density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem.*, **312**(2), 217–222.

Wilson DG (2008). Management of abomasal displacement. *Large Anim Vet Rounds.*, **8**(8), 1-6.

Winden SV, Kuiper R (2003). Left displacement of the abomasum in dairy cattle: recent developments in epidemiological and etiological aspects. *Vet Res.*, **34** (1), 47-56.

Yagi K (1984). Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol.*, **105**, 328-31.

Yıldız R, İder M, Ok M (2019). Beta hidroksi bütirik asit düzeyinin diğer metabolik test parametreleri üzerine etkisi. *Vet Hekim Der Derg.*, **90**(1), 15–21.

Zak B, Luz D, Fisher M (1957). Determination of serum cholesterol. *J Amer Med Technol.*, **23**, 283-287.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Nurcanan ASLAN
Doğum Yeri ve Yılı : Silvan-1977
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Telefon No : 0505 301 01 21
Elektronik Posta : canan.xms@gmail.com
İletişim Adresi : Bozkurt M. TOKİ Sit. C10 Blok
1/4, BURDUR



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Atatürk Üniversitesi/Ziraat Fakültesi/Toprak Bölümü- 2001

Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. Ceren Süt Ürünleri (Sorumlu Yönetici) 2006
2. Bio-Tek Toprak Analiz Laboratuvarı (Sorumlu Yönetici) 2009-2012

Yayınları (SCI ve diğer makaleler):

1. BÜYÜKOĞLU T, ASLAN N (2018). [Oksidatif Stres ve Geçiş Dönemi Süt Sığırlarında Oksidatif Stresin Etkileri](#), Türkiye Klinikleri J Vet Sci, (2):33-41.

Üyesi Olduğu Mesleki Kuruluşlar

1. Ziraat Mühendisleri Odası

