T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DÖL TUTMAYAN (REPEAT BREEDER) İNEKLERDE OKSİDAN/ANTİOKSİDAN DURUM

Hazırlayan
Salih ULUTAŞ

Danışman
Prof. Dr. Meryem EREN

Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2024
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DÖL TUTMAYAN (REPEAT BREEDER) İNEKLERDE OKSİDAN/ANTİOKSİDAN DURUM

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Salih ULUTAŞ

Danışman
Prof. Dr. Meryem EREN

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TYL-2023-12785 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ocak 2024
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Salih ULUTAŞ

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"Döl Tutmayan (Repeat Breeder) İneklerde Oksidan/Antioksidan Durum" adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan	Danışman
Salih ULUTAŞ	**Prof. Dr. Meryem EREN**

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Meryem EREN

Prof. Dr. Meryem EREN danışmanlığında **Salih ULUTAŞ** tarafından hazırlanan **"**Döl Tutmayan (Repeat Breeder) İneklerde Oksidan/Antioksidan Durum**"** adlı bu çalışma jüri tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Biyokimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

09.01.2024

JÜRİ:

Danışman: Prof. Dr. Meryem EREN

Üye: Prof. Dr. Miyase ÇINAR

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Meryem ŞENTÜRK

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun …… tarih ve …….sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……./……./…….

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bilgi ve birikimlerini esirgemeyerek hem ders dönemimde hem de tez çalışmamın planlanma ve uygulama aşamasında bana her türlü katkıyı sağlayan, her zaman iletişim kurabilip, kıymetli tecrübelerinden faydalanabildiğim saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Meryem EREN ve sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Meryem ŞENTÜRK'e saygılarımı sunarım ve teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek lisans eğitimim boyunca öneri ve yardımlarından faydalandığım, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı doktora öğrencisi Uzm. Vet. Hek. Çağlar Kaan BOZBEK'e saygılarımı sunar, teşekkür ederim. Kurmel Tarım ve Hayvancılık Anonim Şirketi Genel Müdürü Veteriner Hekim Sabahattin KÖKNUR başta olmak olmak üzere tüm çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca eğitimim süresince birçok fedakârlık gösterip, yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

Salih ULUTAŞ

Kayseri, Ocak 2024

DÖL TUTMAYAN (REPEAT BREEDER) İNEKLERDE OKSİDAN/ANTİOKSİDAN DURUM

Salih ULUTAŞ

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Biyokimya Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2024

Danışman: Prof. Dr. Meryem EREN

ÖZET

Bu çalışmada, gebe ve repeat breeder (RB) ineklerde oksidan ve antioksidan durum değerlendirildi. Bu amaçla 10 yaşından küçük, düzenli östrus siklusu gösteren, klinik olarak reprodüktif hastalık bulunmayan ve gebelik durumları ultrason yöntemi ile tespit edilen 3 veya daha fazla tohumlanıp gebe kalamayan (34 adet) ve gebe kalan (ilk 3 aylık dönem, 34 adet) olmak üzere toplam 68 adet Holstein ırkı ineklerden kan alındı. Plazma malondialdehit (MDA) düzeyleri, süperoksid dismutaz (SOD) aktiviteleri, total oksidan kapasite (TOK), total antioksidan kapasite (TAK), total ve native tiyol (TT ve NT) düzeyleri ile oksidatif stres indeksi (OSİ) ve dinamik tiyol/disülfit dengeleri (DD) belirlendi. Repeat breeder ve gebe inekler arasında plazma MDA düzeyleri, SOD aktiviteleri ile OSİ ve DD yönünden bir fark belirlenmezken, TOK ve TAK ile TT ve NT düzeylerinin RB ineklerde gebelere göre daha yüksek olduğu saptandı. Sonuç olarak; oksidatif stresin güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi açısından fizyolojik ve patolojik reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonları ile birlikte oksidan ve antioksidanların statüsünün belirlenmesinin; döl tutmayan inekler oksidatif stres altında olduğundan, buna neden olabilecek faktörlerin araştırılıp elimine edilmesinin ve ayrıca bu hayvanların rasyonlarında yeterli miktarda antioksidan, mineral ve vitamin içeriğinin sağlanmasının yararlı olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnek; Oksidatif stres; Repeat breeder.

OXIDANT/ANTIOXIDANT STATE IN REPEAT BREEDER COWS

Salih ULUTAŞ

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Veterinary Biochemistry

Master of Science, January 2024

Supervisor: Prof. Dr. Meryem EREN

ABSTRACT

In this study, oxidant and antioxidant status in pregnant and repeat breeder (RB) cows were evaluated. For this purpose, blood was taken a total of 68 Holstein breed cows: repeat breeder (34) and pregnant (primer trimester, 34), less than 10 years old, inseminated 3 or more times; have a regular estrous cycle, do not have clinically reproductive disease, and whose pregnancy status is determined by ultrasound method. Malondialdehyde (MDA) levels, superoxide dismutase (SOD) activities, total oxidant capacity (TOC), total antioxidant capacity (TAC), total and native thiol levels (TT and NT) were determined in plasma obtained from blood. Oxidative stress index (OSI) and dynamic thiol/disulfide balance (DD) were calculated. While no difference was determined between RB and pregnant cows in terms of plasma MDA levels, SOD activities, OSI and DD; TOC and TAC and TT and NT levels were found to be higher in RB cows than in pregnant cows. In conclusion; determination of the status of oxidants and antioxidants along with the concentrations of physiological and pathological reactive oxygen species in order to reliably evaluate oxidative stress; since cows that do not fertilize are under oxidative stress, the factors that may cause this should be investigated, eliminated and it was also concluded that it would be beneficial to provide adequate amounts of antioxidants, minerals and vitamins in the rations of these animals.

Keywords: Cow; Oxidative stress; Repeat breeder.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK .....
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ii
KABUL VE ONAY SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
KISALTMALAR ve SİMGELER x
TABLOLAR LİSTESİ xii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Repeat Breeder (RB) 3
2.2. Oksidatif Stres (OS) 4
2.2.1. Serbest Radikallerin Kaynakları 5
2.2.1.1. Endojen Kaynaklar 6
2.2.1.1.1. Mitokondrideki Elektron Transport Zincir Reaksiyonları 6
2.2.1.1.2. Yangı 6
2.2.1.1.3. Peroksizomal Enzimler 6
2.2.1.1.4 Araşidonik Asit Metabolizması 6
2.2.1.1.5. Otooksidasyon eaksiyonları 6
2.2.1.1.6. İskemi, Reperfüzyon, Travma ve Zehirlenmeler7
2.2.1.2. Ekzojen Kaynaklar 7
2.2.2. Serbest Radikallerin Sınıflandırılması 7
2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri 8
2.2.3.1. İyon Kanallarının Açılması 8
2.2.3.2. Lipid Peroksidasyonu 8
2.2.3.3. Protein Oksidasyonu 9
2.2.3.4. DNA Oksidasyonu 10

2.2.4. Antioksidasyon 10
2.2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması 11
2.2.4.1.1. Endojen Antioksidanlar 12
2.2.4.1.1.1. Endojen Enzimatik Antioksidanlar 12
2.2.4.1.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) 12
2.2.4.1.1.1.2. Glutatyon peroksidaz (GSH-P_X) ve Glutatyon Redüktaz (GSR) 12
2.2.4.1.1.1.3. Katalaz (CAT) 12
2.2.4.1.1.1.4. Sitokrom Oksidaz 12
2.2.4.1.2. Nonenzimatik Endojen Antioksidanlar 13
2.2.4.1.2.1. Transferrin 13
2.2.4.1.2.2. Laktoferrin 13
2.2.4.1.2.3. Seruloplazmin 13
2.2.4.1.2.4. Glutatyon 13
2.2.4.1.2.5. Diğer Nonenzimatik Endojen Antioksidanlar 13
2.2.4.2. Ekzojen Antioksidanlar 14
2.2.4.2.1. Vitaminler 14
2.2.4.2.2. İlaçlar 15
2.2.5. Tiyol ve Disülfid Dengesi 16
2.3. Repeat Breeder ve Oksidatif Stres 18
3.GEREÇ VE YÖNTEM 27
3.1. GEREÇ 27
3.1.1. Demirbaş malzemeler 27
3.1.2. Sarf malzemeler 27
3.1.3. Hayvan Materyali 28
3.1.4. Örneklerin alınması 28
3.2.YÖNTEM 28
3.2.1. Biyokimyasal Analizlerin Yapılması 288
3.2.1.1. Plazma MDA Analizleri 28

3.2.1.2. Plazma SOD Analizleri....30
3.2.1.3. Plazma TOK Analizleri....31
3.2.1.4. Plazma TAK Analizleri....32
3.2.1.5.Plazma Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Düzeylerinin Belirlenmesi....32
3.2.1.6. Tiyol-Disülfit Dengesinin Belirlenmesi....33
3.2.1.6.1. Plazma TT Analizleri....33
3.2.1.6.2. Plazma NT Analizleri....34
3.2.2. İstatistiksel Analizler....35
4.BULGULAR....36
4.1. Plazma MDA Düzeyleri ile SOD aktiviteleri....36
4.2. Plazma TOK, TAK ve OSİ Düzeyleri....37
4.3. Plazma TT, NT ve DD Düzeyleri....38
5.TARTIŞMA VE SONUÇ....39
6. KAYNAKLAR....44
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

AOPP	:	Proteinlerin İleri Oksidasyon Ürünleri
ATP	:	Adenozin Trifosfat
Ca^{+2}	:	Kalsiyum İyonu
CAT	:	Katalaz
Cu	:	Bakır
DD	:	Dinamik Tiyol/Disülfit Dengesi
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
Fe	:	Demir
FSH	:	Folikül Uyarıcı Hormon
GR	:	Glutatyon Redüktaz
GSH-PX	:	Glutatyon Peroksidaz
H	:	Hidrojen
H_2O_2	:	Hidojen Peroksit
HNO_2	:	Nitröz Asit
HOCl	:	Hipokloröz Asit
IGF-1	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
LH	:	Luteinleştirici Hormon
LOO•	:	Lipid Peroksil
MDA	:	Malondialdehit
N_2O_3	:	Dinitrojen Trioksit
NO•	:	Nitrik Oksit
NO2•	:	Nitrojen dioksit
NT	:	Native Tiyol
$^1O_2$	:	Singlet Oksijen

O_2	:	Oksijen
$O2•^-$	:	Süperoksit
O_3	:	Ozon
OH•	:	Hidroksil radikali
ONOO-	:	Peroksinitrit
OS	:	Oksidatif Stres
P4	:	Progesteron
PGF2α	:	Prostaglandin F2-alfa
RB	:	Repeat Breeder
ROM	:	Reaktif Oksijen Molekülleri
ROO•	:	Peroksil
Se	:	Selenyum
SH	:	İndirgenmiş Tiyol
SOD	:	Süper oksit dismutaz
T4	:	Tiroksin
TAK	:	Total Antioksidan Kapasitesi
TOK	:	Total Oksidan Kapasitesi
TT	:	Total Tiyol
Zn	:	Çinko
Mn	:	Manganez

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması 10

Tablo 2.2. Antioksidanların Bulunduğu Yer ve Görevleri 16

Tablo 4.1. Gebe ve RB ineklerin plazma MDA düzeyleri ile SOD aktiviteleri 36

Tablo 4.2. Gebe ve RB ineklerin plazma TOK, TAK ve OSİ düzeyleri 37

Tablo 4.3. Gebe ve RB ineklerin plazma TT, NT ve DD düzeyleri 38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Oksidatif Denge.....4

Şekil 2.2. Protein Oksidasyonun Sonuçları.....9

Şekil 2.3. Korpus luteumda yumurtlama ve sterodogenez sırasında reaktif oksijen molekülleri üretimi.....19

Şekil 2.4. Yaşa bağlı yumurtalık ve oosit hasarının olası mekanizmalarını gösteren diyagram.....20

Şekil 3.1. Plazma MDA'nın optik dansite eğrisi.....29

Şekil 3.2. Plazma SOD'ın optik dansite eğrisi.....31

Şekil 3.3. OSİ değeri hesaplama.....33

Şekil 4.1. Gebe ve RB ineklerin plazma MDA düzeyleri ile SOD aktiviteleri.....36

Şekil 4.2. Gebe ve RB ineklerin plazma TOK, TAK ve OSİ düzeyleri.....37

Şekil 4.3. Gebe ve RB ineklerin plazma TT, NT ve DD düzeyleri.....38

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Süt sığırcılığında verim düşüklüğünün nedenlerinden biri de döl tutmayan (repeat breeder) inekler oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda (Ali ve ark., 2014; Soni ve ark., 2014; Güvenç ve ark., 2017; Siddique ve ark., 2021) RB ineklerin oksidatif stres düzeylerinin yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Oksidatif stres, hücrede serbest oksijen radikallerinin üretimi ile antioksidan savunma mekanizması arasında önemli bir dengesizlik olduğunda ortaya çıkan bir durumdur. Çeşitli literatürlerde (Behrman ve ark., 2001; Guerin ve ark., 2001; Celi, 2011; Celi ve Gabai, 2015; Hejel ve ark., 2021), OS'in süt ineklerinde hormonel fonksiyon bozuklukları, enfeksiyonlar, immünolojik faktörler, reprodüktif performansın düşmesi ile ilgili olabileceği, etkili tohumlamayı ve sağlıklı fetal gelişimi etkileyebileceği vurgulanmıştır.

Serbest radikallerin aşırı üretilmesi, hücrelerin normal işlevlerini ve metabolik faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Plazmada antioksidan olarak en yüksek konsantrasyonda tiyol grupları bulunur ve bu da plazmada bulunan tiyol gruplarının birincil kaynağı olan metiyonin ve sistein amino asitleri ile açıklanmaktadır (Çelik, 2020). Antioksidan olarak tiyoller, reaktif oksijen türlerinin yok edilmesine katılır ve disülfit bağları oluşturarak oksidatif moleküller içinde oksidatif reaksiyonda kullanılırlar (Biswas ve ark., 2006). Total tiyoller (TT) indirgenmiş ve oksitlenmiş tiyolleri içerirken, native tiyol (NT) sadece indirgenmiş tiyolleri (SH) içerir. Dinamik tiyol/disülfid dengesi (DD), enzimatik aktivitenin düzenlenmesi, hücre sinyalizasyonu, apoptoz, transkripsiyon ve antioksidan savunmada önemli bir etkiye sahiptir (Milletli-Sezgin ve ark., 2019). Tiyol ve disülfit oranının belirlenmesi biyolojik sistemlerdeki ekzojen ve endojen kaynaklı OS durumu hakkında bilgi verebilmektedir (Jones ve

Liang, 2009). Şu ana kadar RB ineklerde TT ve NT durumlarını değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Repeat breeder ineklerde oksidan ve antioksidan durum değerlendirmesinin amaçlandığı bu çalışmada Kayseri İli Develi İlçesi'ndeki Kurmel Tarım ve Hayvancılık Anonim Şirketi'ne ait çiftlikte yer alan 10 yaşından küçük, düzenli östrus siklusu gösteren, klinik olarak reprodüktif hastalık bulunmayan ve gebelik durumları ultrason yöntemi ile tespit edilen 3 veya daha fazla tohumlanıp gebe kalamayan (34 adet) ve gebe kalan (34 adet) olmak üzere 2 gruptan oluşan toplam 68 adet Holstein ırkı ineklerin V. jugularis'inden yaklaşık 10 ml kan, antikoagulantlı tüplere alınarak elde edilen plazmalarda malondialdehit (MDA) konsantrasyonları ve süperoksid dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri ile birlikte total oksidan kapasite (TOK), total antioksidan kapasite (TAK), total ve native tiyol (TT ve NT) düzeylerindeki olası değişiklikler belirlenmiştir. Bu çalışmada repeat breeder ineklerde diğer oksidatif stres parametrelerinin yanında, ilk defa biyolojik sistemlerdeki ekzojen ve endojen kaynaklı oksidatif stres durumu hakkında bilgi verebilen total ve native tiyollerin statüsü belirlenmiş olup, elde edilen veriler çiftlik sahipleri ve ilgili veteriner hekimler yanında, bu konu ile ilgili ileride çalışma yapacak olan araştırmacılara da katkı sağlayabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Repeat Breeder (RB)

Döl verimi çiftlik hayvanlarının en önemli verimi olup, et ve süt verimini de direkt etkilemektedir. Bu nedenle süt sığırı işletmelerinin en büyük sorunu döl tutmama problemi olarak düşünülmektedir (Çakıcı ve Aköz, 2017; Taşal ve ark., 2019).

Repeat breeder inekler; en az bir kez doğum yapmış, 10 yaşından daha küçük, düzenli olarak östrus siklusu gösteren, patolojik bir sorun tespit edilememiş, 3 veya daha fazla sayıda tohumlama yapılmasına karşın, gebe kalamayan inekleri ifade etmektedir. (Aköz ve Dinç, 2001; Alaçam, 2005; Çakıcı ve Aköz, 2017).

Döl tutmayan ineklerde üreme sistemi ile ilgili organlar genelde klinik yönden normal olup, patolojik bulgulara rastlanmamaktadır. Döl tutmamanın nedeni tek bir bağlı faktöre olduğu gibi birden fazla da olabilir. Bu durum sorunun ortaya konulmasını güçleştirebilir. Döl tutmamanın nedenleri olarak;

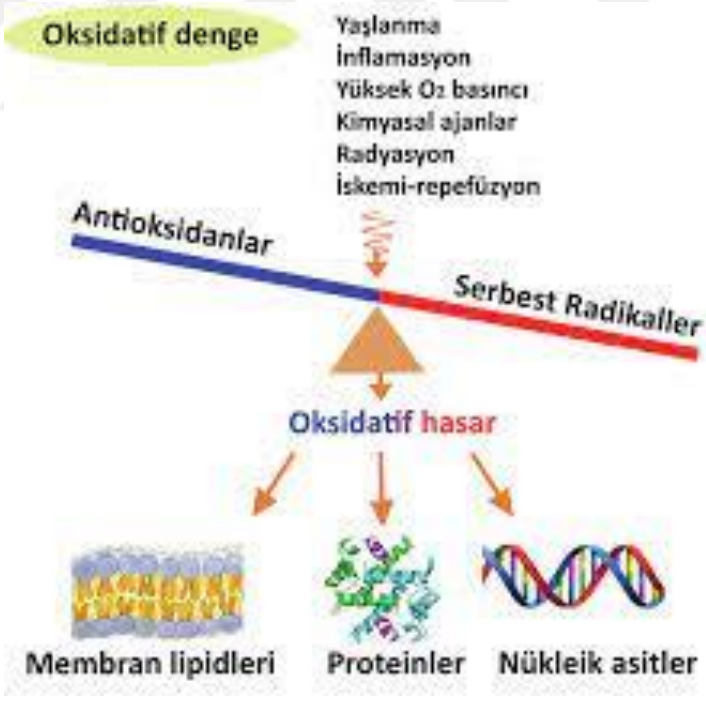
- Bakım, beslenme, yönetim ve çevre şartları,
- Endokrin sisteminde görülen bozukluklar,
- Erken embriyonik ölümler,
- Fertilizasyonun şekillenmemesi,
- Genetik, anatomik veya konjenital defektler,
- İmmunolojik faktörler,
- İneğin yaşı, vücut kondüsyonu,
- Östrus döneminin belirlenememesi ve hatalı tohumlama zamanı,
- Stres yaratan faktörler (sıcaklık stresi vb),
- Suni tohumlama prosedürlerindeki uygulama hataları,

- ❖ Üreme sisteminde yangıya neden olan enfeksiyonlar sayılabilir (Saraswat ve Purohit, 2016; Çakıcı ve Aköz, 2017; Pascottini ve ark., 2018; Sarıbay ve ark., 2018; Taşal ve ark., 2019; Ak ve Acar, 2022).

Bu faktörlerin bir kısmı hayvan yetiştiricilerinin alabileceği birtakım önlemlerle düzeltilebilecek sorunlardır (Taşal ve ark., 2019).

2.2. Oksidatif Stres (OS)

Son yörüngelerinde eşlenmemiş elektron bulunduran ve elektron alma eğilimde olan yüksek reaktif atom veya moleküller, serbest radikal olarak adlandırılır. Oksidatif stres, hücrede metabolik faaliyetler sonucu veya ekzojen etkilerle serbest radikallerin aşırı olarak artması ve antioksidanların yetersizliği sonucunda oksidatif dengenin bozulmasıdır (Şekil 2.1) (Agarwal ve ark. 2005; Bahorun ve ark., 2006; Valko ve ark., 2007).



Şekil 2.1. Oksidatif Denge (Özcan ve ark., 2015)

Reaktif oksijen molekülleri (ROM) hücrelerde metabolizma ürünleri olarak düşük yoğunlukta sürekli oluşmakta olup, fizyolojik süreçlerde;

- Akrozom reaksiyonu,
- Apoptozis,
- Blastosit formasyonu,
- Fertilizasyon,
- Gebelik süresince lüteal korunma,
- Hücrelerin olgunlaşması,
- Hücresel immunite,
- İmplantasyon,
- Lüteolizis,
- Ovulasyon,
- Proteinlerin fosforilasyonu,
- Steroidlerin sentezi ve
- Yumurtaların olgunlaşması gibi birçok fonksiyonda gereklidir.

Serbest radikallerin aşırı üretildiğinde hücresel lipidler, protein ve deoksiribonükleik asit (DNA) yapısında hasar şekillenir. Bunların sonucunda hücre, faaliyetlerini yitirebilir (Pietro, 2011; Soni ve ark., 2014; Siddique ve ark., 2021).

2.2.1. Serbest Radikallerin Kaynakları

Reaktif oksijen molekülleri, radikal olmayan türlere göre daha az stabil olmasına karşın, reaktiviteleri genel olarak daha güçlüdür (Bahorun ve ark., 2006). Serbest radikaller endojen veya ekzojen kaynaklardan üretilir. Endojen serbest radikaller; bağışıklık hücresi aktivasyonu, inflamasyon, stres, aşırı egzersiz, iskemi, enfeksiyon, kanser ve yaşlanmadan kaynaklanır. Ekzojen serbest radikaller; hava ve su kirliliği, sigara içimi, alkol, ağır metaller, bazı ilaçlar (siklosporin, takrolimus), endüstriyel solventler, pişirme ve radyasyondan kaynaklanır. Bu ekzojen bileşikler vücuda girdikten sonra serbest radikallere ayrışır (Valko ve ark., 2007; Sen ve Chakraborty, 2011; Kabel, 2014; Karabulut ve Gülay, 2016).

2.2.1.1. Endojen Kaynaklar

2.2.1.1.1. Mitokondrideki Elektron Transport Zincir Reaksiyonları

Hücrede oksijen tüketimi, büyük bir kısmı mitokondrilerde gerçekleştiğinden ROM'lerin ana kaynağını oluşturmaktadır. Mitokondri iç membranında meydana gelen reaksiyonlarda süperoksit ($O_2•^-$) radikali ve hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda oluşurlar (Valko ve ark., 2005).

2.2.1.1.2. Yangı

Yangı durumunda yabancı organizmanın etkisiz hale getirilmesi amacıyla nitrik oksit (NO) artışı olur, makrofaj ve lenfositlerden salınan sitokinlerce aktif hale getirilir. Bağışıklık sisteminin fagositik hücreleri (nötrofiller, eozinofiller, monosit ve makrofajlar), fagositoza bağlı enerji ihtiyacının artmasına bağlı olarak oksijen tüketimi artarak solunum patlamasına yol açarlar. Solunum patlaması sonucu oluşan oksidanlar bakterileri yok eder, ancak bu durum antioksidan sistemi aşması durumunda hücreye zarar verir. Özellikle H_2O_2 ve hipoklorik asit (HOCl) inflamasyonda artan güçlü oksidanlardır (Moilanen ve Vapaatalo, 1995; Konukoğlu, 2007).

2.2.1.1.3. Peroksizomal Enzimler

Peroksizomlar hücresel oksijeni kullanarak solunum reaksiyonu sonucunda ve peroksizomlarda bulunan oksidaz, H_2O_2 kaynağı durumundadır. Peroksizomlarda bulunan katalaz (CAT) enzimi sayesinde H_2O_2'i su ve oksijene ayırır (Cipolla ve ark., 2017).

2.2.1.1.4 Araşidonik Asit Metabolizması

Fagositoz olayı, hücrelerin stimülasyonu, membransel siklooksijenaz, fosfolipaz ve protein kinaz enzimlerinin aktif hale geçmesiyle hücre zarından araşidonik asidin salınımına sebep olur. Araşidonik asidin oksidasyonuyla serbest radikaller oluşur (Akkuş, 1995; Sezer ve Keskin, 2014).

2.2.1.1.5. Otooksidasyon Reaksiyonları

Hücrede endoplazmik retikulum ve hücre nükleer zarında sitokrom b5 ve sitokrom p450 sistemlerinde meydana gelen elektron kaçakları sonucu serbest radikal üretilmektedir (Gutteridge, 1995; Dündar ve Aslan, 2000).

2.2.1.1.6. İskemi, Reperfüzyon, Travma ve Zehirlenmeler

İskemi/reperfüzyon hasarında iskemide dokulardaki oksijen yetersizliğinde, ksantin oksidazın katalik döngüsü sonucunda moleküler oksijeni H_2O_2'e indirgenir. Ortamda oksijen az olduğundan, serbest radikal üretimi düşük seviyede kalır ve oksidatif hasar minimumdur. Reperfüzyon sonucu artan oksijen etkisiyle H_2O_2 ve hidroksil (OH^-) yüksek seviyelere çıkar ve oksidatif hasara neden olur (Dündar ve Aslan, 2000).

2.2.1.2. Ekzojen Kaynaklar

- ✓ Hava Kirleticileri: karbonmonoksit, asbest, benzen, formaldehit, ozon,
- ✓ Organik maddelerin yanması, orman yangınları, volkanik faaliyetler,
- ✓ Radyasyon: ultraviyole, X ve gamma ve mikrodalga ışınları,
- ✓ Su kirleticileri: trihalometanlar ve kloroform,
- ✓ Temizlik ürünleri, boya, tiner, parfümler ve pestisitler (Abdollahi ve ark., 2004).

2.2.2. Serbest Radikallerin Sınıflandırılması

Serbest radikaller arasında;

- Hidroksil (OH•),
- Süperoksit ($O_2•^-$),
- Nitrik oksit (NO•),
- Nitrojen dioksit(NO_2•),
- Peroksil (ROO•),
- Lipid peroksil (LOO•)
- Hidrojen peroksit (H_2O_2),
- Ozon (O_3),
- Singlet oksijen ($^1O_2$),
- Hipokloröz asit (HOCl),
- Nitröz asit (HNO_2),
- Peroksinitrit ($ONOO^-$),
- Dinitrojen trioksit (N_2O_3) yer alır.

Lipid peroksit (LOOH) serbest radikal değildir ve genellikle oksidan olarak adlandırılır, ancak canlı organizmalarda kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilir

(Valko ve ark., 2005; Genestra, 2007; Yin ve ark., 2011; Ayala ve ark., 2014; Özcan ve ark., 2015, Karabulut ve Gülay, 2016).

2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller normalde insan vücudunun, zararlı maddelere karşı savunma mekanizmalarından biri olarak ürettiği maddelerdir. Üretim oranları vücudun antioksidan kapasitesini aştığında OS ortaya çıkar. Oksidatif stres tüm vücut sistemlerine zararlı etkiler taşır ve hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet ve kanser gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynar. Reaktif oksijen türleri hücre zarı ve hücre içinde bulunan lipid, proteinler ve DNA'daki bazlarından hidrojen atomu almasıyla oksidasyon reaksiyonlarına sebep olurlar. Hücrenin yapısını oluşturan lipid, protein ve DNA moleküllerin zarar görmesi hücre hasarı, hücrede ölümü veya nekroz ile sonuçlanabilir (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000; Burton ve Jauniaux, 2011; Kabel, 2014; Altıner ve ark., 2018).

2.2.3.1. İyon Kanallarının Açılması

Reaktif oksijen moleküllerinin aşırı artması endoplazmik retikulumdan ve diğer depolardan kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının sitozole salınımına yol açar. Sitozolde biriken Ca^{+2} iyonları hücrede homeostaziyi bozar. Kalsiyum iyon konsantrasyonundaki artış, mitokondriyal geçirgenliği artırarak fonksiyonu olumsuz yönde etkiler. Sonuç olarak adenozin trifosfat (ATP) üretiminin durması ve iyon dengesinin bozulması hücrenin nekroze olmasına sebep olur (Burton ve Jauniaux, 2011).

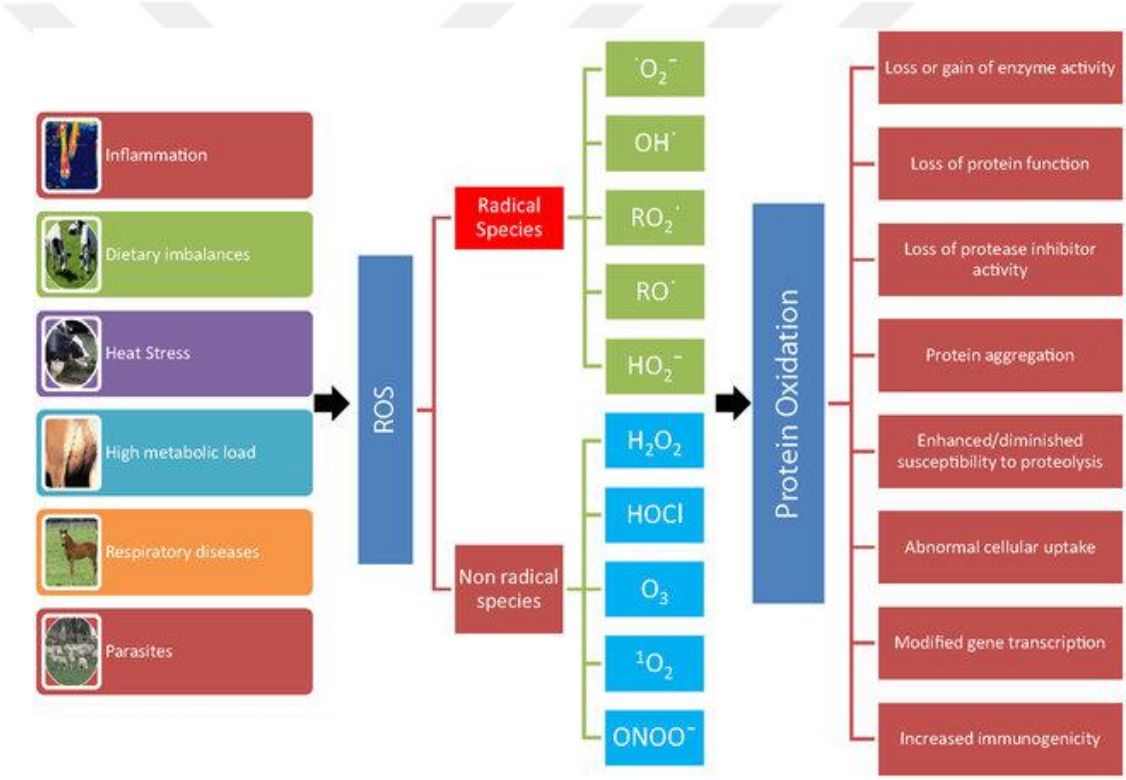
2.2.3.2. Lipid Peroksidasyonu

Lipidler hücrede oksidatif hasara en yatkındırlar. Hücre zarında bulunan doymamış yağ asitlerinin ROM'leri tarafından okside edilmesi lipid peroksidayonu olarak adlandırılır. Reaktif hidroksil molekülleri yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen koparmasıyla peroksidasyonu başlatır. Hücre zarında karbon baz alan lipid radikali, moleküler oksijenle reaksiyonu sonucu lipid peroksil meydana gelir. Lipid peroksil radikali yüksek reaktivite göstermemesine karşın, uzak bölgelerde etki gösterebilir. Lipid peroksil kendi aralarında reaksiyona girebilir, hücre zarına zarar verebilir veya çevresinde bulunan yağ asitlerinden hidrojen koparmasıyla lipid hidroperoksitlere dönüşür. Lipid peroksidasyonu hücre zarı viskozitesi ve iyonlar geçirgenliği artması

sonucu organellerin ve hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olur (Halliwell, 1991; Dündar ve Aslan, 2000; Burton ve Jauniaux, 2011; Altıner ve ark., 2018).

2.2.3.3. Protein Oksidasyonu

Amino asitler oksidatif hasar için hedeflerdir. Yan zincirlerin doğrudan oksidasyonu, karbonil gruplarının oluşumuna yol açabilir. Gelişmiş oksidasyon protein ürünleri (AOPP), serbest radikallere maruz kalan proteinlerin terminal ürünleridir ve plazma proteinleri ile bir nötrofil enzimi miyeloperoksidazın aracılık ettiği klorlu oksidanlar arasındaki reaksiyondan kaynaklanır (Şekil 2.2) (Celi ve Gabai, 2015).



Şekil 2.2. Protein Oksidasyonun Sonuçları (Celi ve Gabai, 2015)

Yangı, diyet dengesizlikleri, ısı stresi, yüksek metabolik yük, solunum yolu hastalıkları ve paraziter enfeksiyonlar reaktif oksijen metabolitlerinin artmasına sebep olabilmektedir. Proteinlerin oksidasyonu sonucu ROM'leri meydana gelmektedir. Protein oksidasyonu, enzim aktivitesinin kaybı veya kazanımı, protein fonksiyonunun ve proteaz inhibitör aktivitesinin kaybı, protein agregasyonu, proteolize karşı artan/azalan duyarlılık, anormal hücresel alım gibi durumlar modifiye gen

transkripsiyonu ve artan immünojenisite ile sonuçlanabilir (Burton ve Jauniaux, 2011; Celi ve Gabai, 2015).

2.2.3.4. DNA Oksidasyonu

Hidroksil radikalleri; ya DNA bazlarında bulunan çift bağlara H atomu ekleyerek ya da timin yapısındaki metil gruplarından H atomu alarak DNA molekülü ile reaksiyona girerek DNA yapısında harabiyete neden olur. Ayrıca DNA onarım mekanizmaları üzerine baskılayıcı etki göstererek DNA hasarını artırabilir. Oluşan hasarın, karsinogenezisin başlangıç evresine sebep olabileceği gibi hasar tümör gelişimi aşamalarında aktif rol oynayabilir. Mitokondriyal DNA, elektron transport zincirinde O_2 bulunması, histon ve onarım mekanizmalarının olmaması nedeniyle ROM'leri oksidatif hasardan daha çok etkilenmektedir (Hu ve ark., 1995; Cooke ve ark., 2003).

2.2.4. Antioksidasyon

Oksidasyon reaksiyonları, hücrelere zarar veren zincirleme reaksiyonları başlatan serbest radikaller üretebilir. Antioksidan, moleküllerin oksidasyonunu yavaşlatabilen veya önleyebilen bir moleküldür. Organizmada serbest radikallere karşı 'antioksidanlar' olarak bilinen ve çeşitli mekanizmalarla etkilerini gösteren savunma sistemleri yer almaktadır.

Bu mekanizmalar şunlardır:

- Tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların durdurulması,
- Oluşan radikallerin detoksifikasyonu ve uzaklaştırılması,
- Radikal oluşumunun sınırlandırılması ve inhibe edilmesi,
- Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi ve
- Hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılması (Duarte ve Lunec, 2005; Aydemir ve ve Karadağ Sarı, 2009; Kabel, 2014).

2.2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, endojen ve ekzojen olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar (Tablo 2.1) (Gutteridge, 1995; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009; Kabel, 2014).

Tablo 2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Başlıca Antioksidanlar		
Endojen antioksidanlar		
Enzimatik antioksidanlar	**Nonenzimatik antioksidanlar**	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Transferrin	Melatonin
Glutatyon peroksidaz (GSH-P_X)	Laktoferrin	Miyoglobin
Glutatyon redüktaz (GSR)	Seruloplazmin	Hemoglobin
Katalaz (CAT)	Albümin	Ferritin
Sitokrom oksidaz	Glutatyon	Bilirubin
	Sistein	Metiyonin
Ekzojen Antioksidanlar		
Vitaminler	**İlaçlar**	
E vitamini	Barbitüratlar	
A Vitamini (Beta karoten)	Demir şelatörleri	
C Vitamini (Askorbik asit)	Desferroksamin	
B9 Vitamini (Folik asit)	Ebselen ve asetilsistein	
	Ksantin oksidaz inhibitörleri	
	Mannitol ve Albümin	
	NADPH oksidaz inhibitörleri	
	Nötrofil adezyon inhibitörleri	
	Rekombinant süperoksit dismutaz	
	Sitokinler	
	Trolox-C (E vitamini analoğu)	

2.2.4.1.1. Endojen Antioksidanlar

2.2.4.1.1.1. Endojen Enzimatik Antioksidanlar

Bu antioksidanlar serbest radikalleri etkisizleştirerek hücreye ve hücresel yapılara zarar vermesini engellerler. Doğal antioksidanlar olarak da bilinen enzimatik antioksidanlar, H_2O_2, su ve alkole indirgeyen SOD, CAT, GSH-P_X, GSR ve sitokrom oksidazdan oluşur (Agarwal ve ark., 2005; Sen ve Chakraborty, 2011).

2.2.4.1.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Tüm aerobik hücrelerde ve hücre dışı sıvılarda bulunan ve Cu, Zn, Mn veya Fe gibi metal iyonları içeren SOD enzimi, süperoksit anyonunun oksijen (O_2) ve H_2O_2'e parçalanmasını katalize eder. Süperoksit dismutaz bir dismutasyon reaksiyonunu katalize ederek O_2'yi uzaklaştırır. Süperoksit dismutazın yokluğunda bu reaksiyon çok yavaş bir hızda nonenzimatik bir şekilde gerçekleşir. Antioksidan bir enzim olan SOD, süper oksit düzeylerini kontrol etmek suretiyle hücreleri oksidatif hasara karşı korur (Zelko ve ark., 2002; Jhonson ve Giulivi, 2005; Nozik-Grayck ve ark., 2005).

2.2.4.1.1.1.2. Glutatyon peroksidaz (GSH-P_X) ve Glutatyon Redüktaz (GSR)

Glutatyon redüktaz hücre içi en önemli antioksidan olup proteinlerin aktif şekilde kalmasını sağlar. Glutatyon peroksidaz, H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin parçalanmasını katalize eden bir enzimdir. Hücrelerin sitoplazmasında bulunur ve H_2O_2'in neden olduğu oksidatif hasara karşı korur (Sharma ve ark., 2004; Hayes ve ark., 2005; Sen ve Chakraborty, 2011).

2.2.4.1.1.1.3. Katalaz (CAT)

Katalaz enzimi, H_2O_2 molekülünü suya ve O_2'e dönüştürür. Katalazın katalitik aktivitesiyle H_2O_2'nin ayrışması birinci dereceden bir reaksiyon şeklini takip eder ve hızı H_2O_2 konsantrasyonuna bağlıdır (Valko ve ark., 2007).

2.2.4.1.1.1.4. Sitokrom Oksidaz

Sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimi olup süperoksidi nötralize eder. Ayrıca O_2'nin suya indirgenmesi sırasında radikal oluşumunu önler (Dündar ve Aslan, 2000).

2.2.4.1.2. Nonenzimatik Endojen Antioksidanlar

2.2.4.1.2.1. Transferrin

Transferrin, Fe taşıyan bir proteindir ve Fe'in 1/3'ini bağlayarak plazmada yer alan serbest Fe'in düzeylerini düşürür ve sonuçta serbest radikaller, bağlı Fe ile Cu iyonları tarafından katalizlenemediğinden reaksiyon sayısında azalma görülür (Gutteridge ve ark., 1981). Transferrinin antioksidan görevi; fenton reaksiyonu ile H_2O_2'in oldukça toksik hidroksil radikaline dönüşümünü katalize eden serbest Fe iyonunun konsantrasyonunu azaltması yönündedir (Chauhan ve ark., 2004).

2.2.4.1.2.2. Laktoferrin

Laktoferrin, hemoglobin, miyoglobin, hemopeksin ve albumin hemen hemen aynı fonksiyonlara sahiptir. Laktoferrinin nötrofillerde radikal oluşumunu önleyen bir faktör olduğu ifade edilmiştir (Gutteridge, 1995). Laktoferrrin bir süt proteini olup, etkisini Fe bağlayarak gösterir. Haptoglobulin ve hemopeksin hemoglobini bağlamak suretiyle serbest hemoglobin oluşumunu sınırlar (Özcan ve ark., 2015).

2.2.4.1.2.3. Seruloplazmin

Seruloplazmin Cu iyonlarını bağlamak suretiyle metal kataliz reaksiyonlarını kısıtlar ve glikoz, ürat ve bilirubin ortamdaki radikalleri temizleme uğraşındadır (Dündar ve Aslan, 2000; Özcan ve ark., 2015).

2.2.4.1.2.4. Glutatyon

Glutatyon sistemi glutatyon, GSR, GSH-P_X ve glutatyon S-transferazları içerir. Alt birimlerin aktif bölgesinde selenyum (Se) elementinin atomunu içerir Glutatyon S transferazlar, lipid peroksitlerle yüksek aktivite gösteren glutatyona bağımlı antioksidan enzimlerin başka bir sınıfıdır. Bu enzimler karaciğerde yüksek seviyelerde bulunur ve aynı zamanda detoksifikasyon metabolizmasına da yardımcı olur (Sharma ve ark., 2004; Hayes ve ark.,2005; Sen ve Chakraborty, 2011).

2.2.4.1.2.5. Diğer Nonenzimatik Endojen Antioksidanlar

Hücrelerarası ortamda üretilen serbest radikallerin, metalloidlerin Fe ve Cu gibi katalizör metal iyonları ile karşılaşmalarını engellemesi, ekstrasellüler antioksidan savunmanın başlıca yolunu oluşturmaktadır (Dündar ve Aslan, 2000).

Hemoglobin, miyoglobin, hemopeksin ve albümin, laktoferrinle hemen hemen aynı fonksiyonlara sahiptir (Gutteridge, 1995). Haptoglobulin ve hemopeksin hemoglobini bağlamak suretiyle serbest hemoglobin oluşumunu sınırlar (Özcan ve ark., 2015). Ekstrasellüler ortamlar ve organik ürünlerin korunmasında, mannitol, dimetil, sulfoksid gibi kimyasal antioksidanlardan da yararlanılmaktadır (Dündar ve Aslan, 2000).

2.2.4.2. Ekzojen Antioksidanlar

Besinlerle alınan veya ilaç formunda olan sentetik antioksidanlar C vitamini, E vitamini Se, Zn, taurin, hipotaurin, β-karoten ve diğer karotenlerdir (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000; Kabel, 2014; Altıner ve ark., 2018).

2.2.4.2.1. Vitaminler

Antioksidan vitaminler A, C ve E, serbest radikalleri başlatan temizleme, zincirleme reaksiyonların kırılması, ve reaktif metabolitlerin süpürülmesi gibi mekanizmalarda önemli rol oynayarak anahtar reaktif türlerini ortadan kaldırırlar. Antioksidan vitaminlerin bu özellikleri koruyucu hekimlik ve sağlık açısından önemlidir**.**

Lipidlerde çözünen en önemli antioksidan olan vitamin E (α-tokoferol), lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunda üretilen lipid radikalleri ile reaksiyona girer ve böylece serbest radikal ara ürünlerini uzaklaştırmak süretiyle oksidasyona karşı hücre zarlarını korur. Tokotrienollerin nöroproteksiyonda özel bir rolü olabilir. Enzimatik antioksidanlar tarafından artması engellenemeyen serbest radikallerce başlatılan fosfolipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını, E vitamini bir hidrojen atomunu serbest radikale transfer ederek başlamasını engeller. Vitamin A (β-karoten); radikal toplayıcı etkisi ile antioksidan etki göstermektedir. Hem hayvanlarda hem de bitkilerde bulunan ancak, insanlarda sentezlenemeyen askorbik asit (Vitamin C), diyetle alınması gereken bir monosakkarit antioksidandır. Hücrelerde glutatyon ile reaksiyona girerek indirgenmiş formunda bulunur. Askorbik asit, H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerini azaltabilen ve dolayısıyla nötralize edebilen bir indirgeyici maddedir (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000; Sen ve Roy, 2006; Kabel, 2014; Altıner ve ark., 2018).

Folik asit DNA sentezi, fertilite, hücre bölünmesi gibi birçok biyolojik sistemlerde yer alır ve güçlü bir antioksidan özelliğe sahiptir. Folik asit ya direk olarak ya da C, E vitamini ve diğer B vitaminleriyle birlikte homosisteinin neden olduğu oksidatif hasarı en aza indirmektedir (Title ve ark., 2000; Hussein ve ark., 2012; Ebaid ve ark., 2013).

2.2.4.2.2. İlaçlar

- Barbitüratlar,
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin),

- Demir şelatörleri,
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein),
- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten),
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenyline iodonium),
- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin),
- Nötrofil adezyon inhibitörleri,
- Rekombinant süperoksit dismutaz,
- Sitokinler (TNF ve IL-1),
- Trolox-C (vitamin E analoğu) (Gutteridge, 1995; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009).

Antioksidanların bulundukları yer ve görevleri Tablo 2'de yer almaktadır (Dündar ve Aslan, 2000).

Tablo 2. Antioksidanların Bulunduğu Yer ve Görevleri

Antioksidanlar	**Bulunduğu Yer**	**Görevi**
SOD	Mitokondri ve Serum	Süper anyon katalize eder.
GSH-Px	Sitoplazma ve Mitokondri	H_2O_2 katalize eder.
GSH-redüktaz	Sitoplazma ve Mitokondri	Disülfit indirgeyici.
Katalaz	Peroksizom	H_2O_2'i su ve oksijene parçalar.
Sitokrom oksidaz	Mitokondri	O^{2-} Nötralize eder.
Transferrin	Plazma	Serbest Fe iyonlarını bağlar.
Laktoferrin	Plazma	Serbest Fe iyonlarını bağlar.
Ferritin	Dokularda	Doku demir bağlayıcısı
Seruloplazmin	Dokularda	Cu iyonlarını bağlar.
Glutatyon	İntrasellüler, alveoller	Redoks substratı
E vitamini	Membranlarda ve Ekstrasellüler ortam	Peroksidasyon azaltıcı etki gösterir.
A Vitamini	Hücre zarlarında	Peroksil temizleyici
C vitamini	Hücre içi ve dışı sıvılarda	Reaksiyon durdurucu ve zincir kırıcı
Ürik Asit	Geniş dağılım	Hidroksil toplayıcı
Sistein	Geniş dağılım	Organik bileşikleri indirger.
Albumin	Plazma ve serum	Radikal Süpürücü
Bilirubin	Dokularda	Zincir Kırıcı

2.2.5. Tiyol ve Disülfid Dengesi

Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu antioksidan mekanizmalardan biri tiyol-disülfid homeostazisidir. Sülfhidril grupları içeren bu bileşiklerin, hücrelerde OS'in önlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Hücre içi üretilen ROM'lerinin birincil hedefi, proteinlerdeki kükürt içeren amino asitlerdeki tiyol gruplarıdır. Tiyol grupları, geri dönüşümlü disülfit bağları oluşturmak için ROM'leri ile etkileşime girer. Daha sonra bu disülfit bağları antioksidan mekanizmalarla tekrar tiyol gruplarına indirgenir. Böylece dinamik bir tiyol-disülfür dengesi elde edilir (Deveci ve Erdal, 2022). Dinamik tiyol-disülfür dengesinin antioksidan koruma, detoksifikasyon, apoptoz, enzimatik aktivite düzenlenmesi, transkripsiyon faktörleri ve hücresel sinyal

mekanizmalarında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Biswas ve ark., 2006; Circu ve Aw, 2010; Milletli-Sezgin ve ark., 2019).

Tiyoredoksin sistemi, tiyoredoksin proteini ve tiyoredoksin redüktaz içerir (Nordberg ve Arner, 2001). Tiyoredoksin ile ilgili proteinler tüm organizmalarda mevcuttur. Tiyoredoksinin aktif bölgesi, aktif bir ditiyol formu (indirgenmiş) ve oksitlenmiş bir disülfür formu arasında geçiş yapabilen iki komşu sisteinden oluşur. Aktif durumunda tiyoredoksin, ROM'lerini temizleyen etkili bir indirgeyici ajan olarak görev yapar (Mustachish ve Powis, 2000). Antioksidan özelliğindeki tiyol grupları ROM'lerinin yok edilmesi reaksiyonlarına katılır ve disülfit bağlarının oluşumuna katılarak oksidatif reaksiyonlarda yer alır (Biswas ve ark., 2006).

Tiyol gruplarının birincil kaynağı olan metiyonin ve sistein amino asitlerinden dolayı plazmada antioksidan olarak tiyol grupları en yüksek konsantrasyonda bulunur (Çelik, 2020). Tiyoller, hidrojen ile sülfür grubunun bir karbon atomuna bağlanmasıyla oluşurlar. Bu yapılar plazma albumin ve protein tiyolleri ile düşük molekül ağırlıklı GSH, sistein ve homosistein moleküllerinden ibaret olup, plazmada tiyol havuzu olarak görev alırlar (Turell ve ark., 2013).

Tiyoller plazmada nonenzimatik antioksidanlar olarak görev alırlar. Bu yapılar, protein gruplarının ortamdaki oksijen moleküllerince oksitlenmesi ile disülfür bağlarına dönüştürülür ve bu reaksiyon reverzibl olup, disülfit bağlarının da tiyol gruplarına redüksiyonu sözkonusudur. Bu şekilde tiyol-disülfit dengesi korunmuş olur. Biyolojik sistemlerde yer alan ekzojen ve endojen kökenli OS durumunun belirlenmesinde, tiyol ve disülfit oranının önemli bir gösterge olduğu ifade edilmektedir (Jones ve Liang, 2009; Ergin ve ark., 2015). Hücresel homeostazda, hücre içi tiyol-disülfit redoks dengesinin regülasyonu önemli bir yer tutmaktadır. Tiyol-disülfit redoks dengesi hücrelerin redoks ortamındaki değişikliklere cevap verme yeteneği başta olmak üzere hem oksidatif hem de indirgeyici yolların düzenlenmesi ile oksidan süpürücülerin üretimini içermektedir (Jensen ve ark., 2009).

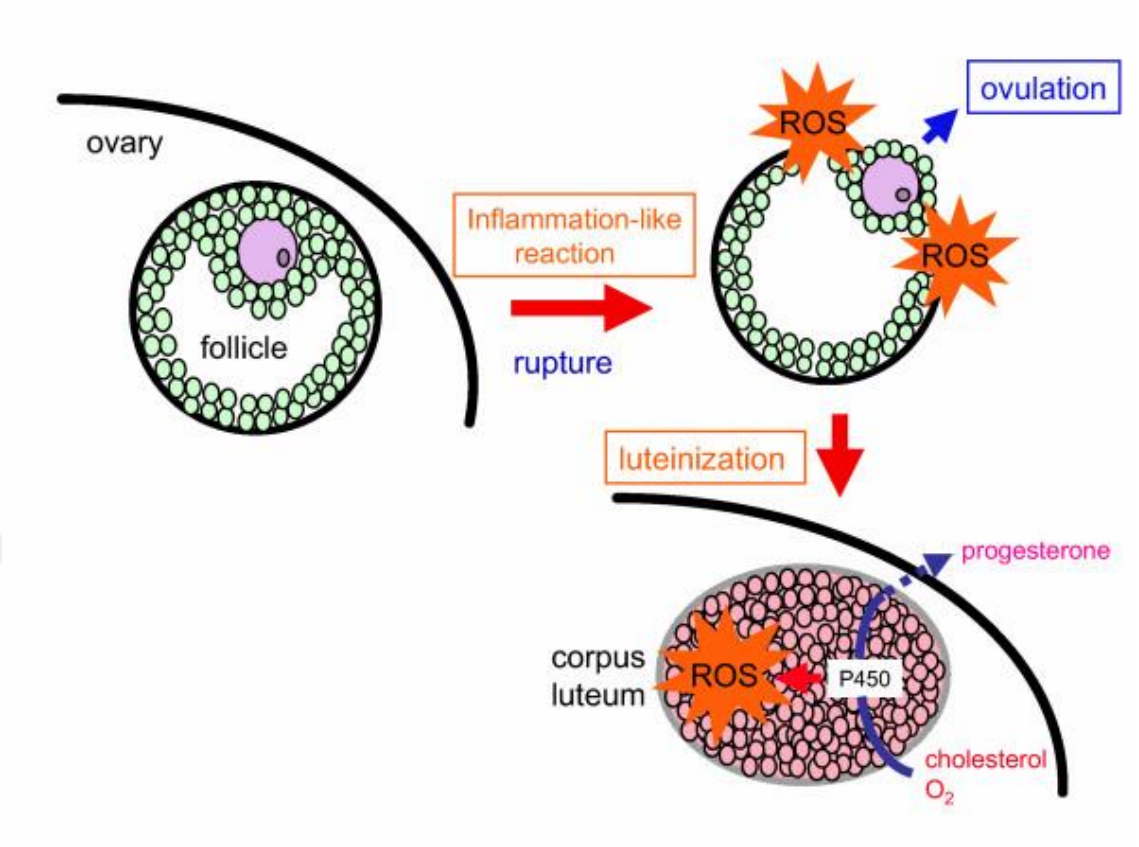
İndirgenmemiş ya da serbest halde bulunan glutatyondan köken alan TT'ler, hem hücre içinde ve hem de dışında bulunan tiyollerin meydana getirdiği bir üründür ve genellikle albüminin oluşturduğu kan proteinlerine bağlanırlar. Total tiyol, indirgenmiş ve

oksitlenmiş tiyollerden ibaretken, NT'ler sadece indirgenmiş tiyolleri (SH) kapsamaktadır. Anormal tiyol-disülfid dengesinin diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek hastalığı, ayak hastalıkları, endometritis, uyuz hastalıkları ve kanser gibi hastalıklarla ilişkisi rapor edilmiştir (Matteucci ve Giampietro, 2010; Go ve Jones, 2011; Prabhu ve ark., 2014, Çamkerten ve ark., 2019; Emre ve ark., 2021; Deveci ve Erdal, 2022). Bununla birlikte hayvanlarda özellikle tiyol-disülfid dengesinin değerlendirildiği çalışmalar oldukça sınırlıdır (Çamkerten ve ark., 2019; Emre ve ark., 2021; Deveci ve Erdal, 2022).

2.3. Repeat Breeder ve Oksidatif Stres

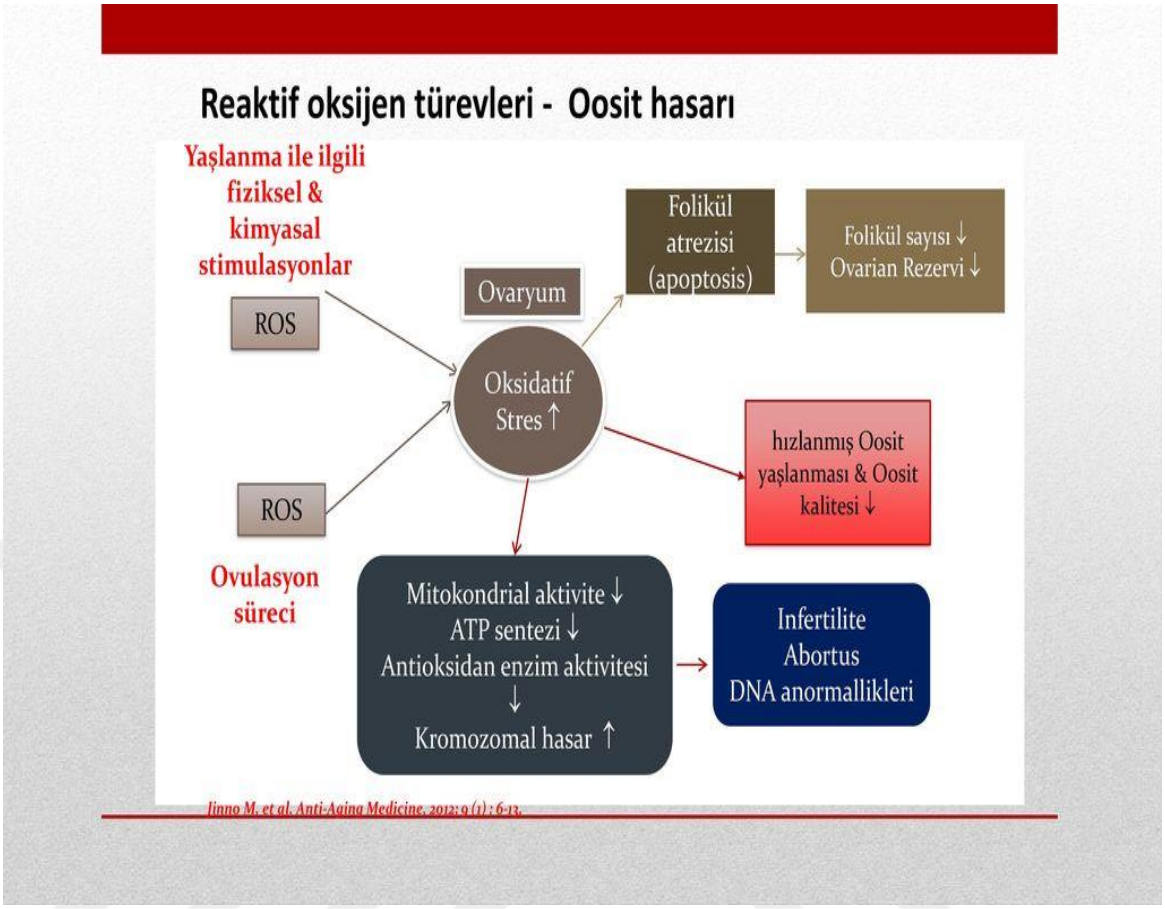
Üreme süreci, metabolizma ve enerji tüketiminde dinamik değişikliklere yol açar; bu da, oksijen tüketiminin fizyolojik süreci sırasında üretilen serbest radikallerin (oksidanlar) aşırı üretiminden sorumlu olabilir. Yumurtalık, metabolik olarak aktif bir organ olduğundan oksidanlar üretir. Büyüyen foliküller, Graffian foliküllerinin granüloz hücreleri ve yumurtlamış foliküllerin tümü, kendilerini oksidanların oksidatif hasarından korumak için hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar üretir. Oksidanlar ve antioksidanlar;

- Foliküler sıvı ortamının düzenlenmesi,
- Folikülogenez,
- Steroidogenez,
- Korpus luteum fonksiyonu ve
- Luteoliz gibi çeşitli üreme fonksiyonlarında rol oynarlar (Şekil 2.3) (Talukder ve ark., 2017).



Şekil 2.3. Korpus luteumda yumurtlama ve sterodogenez sırasında reaktif oksijen molekülleri üretimi. Yumurtlama, iltihaplanma benzeri bir süreç gibi görünmektedir. Reaktif oksijen molekülleri, foliküler yırtılma sırasında lokal olarak üretilir ve yumurtlama sürecine dahil olabilir. Reaktif oksijen molekülleri ayrıca steroid hormon sentezi sırasında bir yan ürün olarak monooksijenaz reaksiyonu yoluyla korpus luteum tarafından da üretilir (Fujii ve ark., 2005).

Oksidatif stres, mitokondri aktivitesini azaltarak yumurtalık fonksiyonuna zarar verebilen, dolayısıyla sitoplazmanın bozulmasına ve antioksidan potansiyelde azalmaya yol açabilen, yaşa bağlı önemli bir risk faktörüdür. Yumurtalıkta bu değişiklikler döllenmeyi ve oosit gelişimini olumsuz etkiler, ancak bu tür OS, E vitamini ve Koenzim Q10 gibi antioksidanların tüketimiyle önlenebilir (Şekil 2.4) (Jinno ve ark., 2012).



Şekil 2.4. Yaşa bağlı yumurtalık ve oosit hasarının olası mekanizmalarını gösteren diyagram (Jinno ve ark., 2012).

Yem alımındaki azalma, antioksidan alımını ve antioksidan proteinlerin ve peptidlerin endojen sentezini azaltır. Aşırı besleme, enerji substratlarının artan oksidasyonunun bir sonucu olarak ROM'lerin üretiminde bir artışa yol açar. Her iki beslenme şeklinde de oksidatif savunma sistemi zayıflar ve OS ortaya çıkabilir. Rasyonda antioksidan minerallerin (Se, Zn, Cu veya Fe) veya vitaminlerin (örneğin folik asit, B6 vitamini ve B12 vitamini) eksikliği, embriyoların ve fetüslerin hayatta kalma oranını azaltır ve büyüme hızını düşürebilir (Ashworth ve Antipatis, 2001; Fang ve ark., 2002; Wu ve ark., 2004).

Gebelik ve buzağılama hayvanlar için fizyolojik, ancak zorlayıcı koşullardır. Düvelerin ilk kez 24-25 aylıkken buzağılaması (Donovan ve ark., 1998) ve ineklerin buzağılamadan sonraki dönemde geç gebe kalması ekonomik süt sığırcılığı açısından hayati önem taşımaktadır. Fetüsün şekillenmesi ve gelişimi esas olarak ineğin

beslenmesi ve sağlığının yanı sıra çeşitli ek yönetim faktörlerinden etkilenir. Tohumlamanın başarısız olması oksidatif stresten kaynaklanabilmektedir (Celi ve ark., 2012). Uygun olmayan bakım ve beslenme, iklim faktörleri, hormonel fonksiyon bozuklukları ve immünolojik faktörler gibi çeşitli faktörlerin, etkili tohumlamayı ve sağlıklı fetal gelişimi etkileyebileceğine ve OS'in bunda önemli bir rol oynayabileceğine işaret edebilir (Hejel ve ark., 2021).

Fagositlerden salınan serbest radikaller DNA, lipid ve oksidasyonun doğal hedefleri olarak görev yapan proteinler gibi diğer farklı makromoleküllerle reaksiyona girer ve proteinlerin normal fonksiyonlarını değiştirir, enzimlerin ve farklı enzimlerde bulunan amino asitlerin fonksiyonlarının bozulması oksidatif hasara neden olur (Ali ve ark., 2014). Üreme bozuklukları da dahil olmak üzere sığır hastalıklarının etiyolojisinde OS'in kesinlikle rolü vardır. Patogenezi net olmamakla birlikte; hastalıkların iyileşmesine yol açan belirli antioksidanların eklenmesiyle bu rol açıkça görülmektedir (Hajhashemi ve ark., 2010). Normal seviyede bulunan ROM'leri, üreme sisteminde çeşitli fizyolojik fonksiyonların oluşması için gereklidir. Oksidatif stres, hayvan sağlığını ve performansını etkileyen bir dizi metabolik süreçle bağlantılıdır. Oksidatif stres ikili işlev sergiler, redoks dengesinin korunmasına yardımcı olur ve dişi üreme süreçlerinde rol oynar. Oksidatif stresin döllenme ve erken embriyo gelişimi gibi bir dizi üreme olayının nedeninde ve ilerlemesinde çok önemli bir rol oynadığı açıktır ve gerçekten de OS'in dişi üreme sisteminin düzenlenmesinde farklı seviyelerde yer aldığı görülmektedir. Örneğin, OS'in süt ineklerinde maternal ve plasental fonksiyonların bozulması sonucu embriyonik kayıplarla ilişkili olduğu, plasentanın atılamaması, meme ödemi, mastitis ve reprodüktif performansın düşmesine neden olduğu, foliküler kistlerin patogenezinde ve RB sendromunda rol oynadığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Behrman ve ark., 2001; Guerin ve ark., 2001; Celi, 2011; Celi ve Gabai, 2015).

Reaktif oksijen molekülleri, luteinize edici hormon (LH) reseptörlerini bozar veya kolesterolün mitokondriye translokasyonunu veya sitokrom P450 enzim aktivitesini engeller ve korpus luteumun progesteron (P4) üretimini kısıtlar. Progesteron salgısındaki azalma, embriyonik veya fetal ölüme yol açar. Oksidanlar, LH reseptörünü adenilat siklazdan ayırır ve trans-mitokondriyal kolesterol taşınmasını kesintiye

uğratarak steroidogenezi inhibe eder (Rautela ve ark., 2021). PGF2-α ile indüklenen ROM'lerin birikimi, P4 sentezindeki azalmadan önce meydana gelir. Ek olarak, ROM'lerin sitokrom P450'nin inhibisyonu, kolesterolün mitokondriye hücre içi taşınması ve LH reseptörlerinin bozulması yoluyla P4 sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir. Reaktif oksijen moleküllerin, korpus luteumda üretildiğini ve korpus luteumda SOD aktivitesinin rapor edildiğini göz önünde bulundurarak, ROM'lerin ve SOD'ın korpus luteumun düzenlenmesinde rol oynadığını düşünmek mantıklıdır. Oksidatif streste olduğu gibi, oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir dengesizlik meydana geldiğinde, korpus luteum aktivitesi bozularak erken luteolize neden olabilir. Reaktif oksijen molekülleri, genellikle korpus luteumun gerilemesinde görülen luteal hücre plazma zarının bütünlüğünü bozabilir. Korpus luteumun gerileme fazı sırasında ROM'lerindeki artış, PGF2 α uygulamasından sonra yalancı gebe sıçanların korpus luteumunda gözlenen SOD ekspresyonundaki azalmaya bağlanabilir. Ayrıca PGF2 α, lipid peroksidasyonunu indüklediği için ROM'lerin artışına katkıda bulunabilir ve süperoksit radikal üretimini stimüle ederler (Sawada ve Carlson, 1994; Takahashi ve ark., 2000; Sugino, 2006).

Makrofajların, kısmen luteoliz ile ilgili olduğu varsayılmıştır. Makrofajlar, ROM'leri üretir ve aktive edildiklerinde hücrelere zarar verir. Gerileyen korpus luteumda sayıları artar ve luteal hücreler tarafından P4 üretimini engelleyen sitokinler üretirler. Ayrıca korpus luteum gerilemesi sırasında overde kan akımında azalma meydana gelir ve bu iskemi-reperfüzyon hasarı mekanizması ile ROM'lerin oluşumu yoluyla doku hasarına neden olabilir (Stabel ve ark., 1989).

Reaktif oksijen molekülleri normal embriyo metabolizması sırasında üretilir, ancak OS sırasında oluşan ROM'lerin üretimindeki fazlalığın embriyo gelişimini bozduğu ve sıklıkla embriyo ölümüne yol açtığı bildirilmiştir. Embriyolar, kendilerini ROM atağına karşı korumak ve ROM fazlalığını atmak için SOD, GSH-Px ve transferrin, yumurta kanalında bulunan askorbik asit gibi antioksidanları içeren mekanizmalara sahiptir. Ancak embriyo gelişimi sırasında sürekli ve aşırı ROM'lerin üretimi nedeniyle OS oluşabilir. Reaktif oksijen molekülleri, lipid peroksidasyonunu ve DNA parçalanmasını artırarak, enzimleri veya mitokondriyal yapıları ve işlevleri değiştirerek

ve sıklıkla embriyonik ölüme yol açarak preimplantasyon embriyolarına zarar verebilir (Takahashi ve ark., 2000; Guerin ve ark., 2001; Agarwal ve ark., 2005).

Oksidatif stres, inflamasyonu embriyo mortalitesi ile ilişkilendiren mekanizmalardan biri olarak da düşünülebilir. Örneğin mastitis yaşayan ineklerden yapılan gözlemler, inflamatuar veya immün yanıtların aktivasyonunun embriyonik mortaliteye yol açabileceğini düşündürmektedir. Bu embriyonik kayıplar, hipotalamik-hipofiz ekseni, yumurtalık, oosit ve embriyo dahil olmak üzere birçok noktada üreme eksenini bozan çoklu yolların aktivasyonunu takip ediyor gibi görünmektedir. İnflamatuar ve immün yanıtların aktivasyonu, sitokin üretiminde bir artışa yol açar, bu da embriyonun hayatta kalması ve gelişmesi için zararlı olan PGF2 α veya NO gibi diğer moleküllerin salgılanmasını artırabilir. Bakteriyel enfeksiyonların fagositoz yoluyla eliminasyonu, bir kez aktive edildiğinde, yabancı patojenleri hedef alan solunum patlaması salan ROM'lerine maruz kalan nötrofillerin aktivasyonunu içerir, ancak bu reaksiyonlarda özgüllüğün olmaması, konakçıda doku hasarına neden olabilir (Hansen ve ark., 2004; Lykkesfeldt ve Svendsen, 2007).

Gebeliğin kendisi, proinflamatuar bir durumla tutarlı olarak, aktive monosit ve makrofajların yanı sıra OS belirteçlerinde bir artışı içerir. Gebe kadınlarda AOPP ve C-reaktif protein arasında pozitif bir korelasyon bildirilmiştir ve bu, gebelikte inflamatuar mekanizmalar ile oksidatif stres arasındaki ilişkinin olası bir olay olduğunu göstermektedir. Gebelik sırasında maternal ve fetal metabolizma, maternal dokularda ve konseptusta artan mitokondriyal aktivite nedeniyle yaşam döngüsünün diğer herhangi bir aşamasından daha fazladır. Bu, özellikle geç gebelik döneminde süt ineklerinde ROM'lerin üretimindeki artış ile ilişkilidir (Ness, 2004; Aurousseau ve ark., 2006; Fialovà ve ark., 2006).

Oksidatif stres, NO gibi reaktif nitrojen türleri yoluyla üreme olaylarını da etkileyebilir. Fallop tüplerinde endojen bir NO sistemi mevcuttur. Nitrik oksit düz kaslar üzerinde rahatlatıcı bir etkiye sahiptir ve tübüler kontraktilite üzerinde benzer etkilere sahiptir. Nitrik oksit eksikliği tubal motilite disfonksiyonuna yol açarak ovumun tutulmasına, sperm transportunun gecikmesine ve infertiliteye neden olabilir. Ürogenital sistem enfeksiyonları ile ilişkili infertilite, azalmış sperm motilitesi ve canlılığı ile ilişkilidir. Fallop tüplerinde artan NO seviyeleri, istilacı mikroplar için sitotoksiktir ve

ayrıca spermatozoa için toksik olabilir. Ek olarak NO, uterus kontraksiyonunun düzenlenmesine katılabilir. Gerçekten de, antioksidanlardaki bir azalma, bozulmuş kas tonusuna ve dolayısıyla uterus kontraktilitesine katkıda bulunabilir. Bu, spermin yumurtaya ya da plasentaya taşınmasının azalmasına neden olabilir (Rosselli ve ark., 1995; 1996; 1998; Norman ve ark., 1999; Agarwall ve ark., 2003). Nitrik oksit gibi oksidanların anormal konsantrasyonu, düz kaslar üzerindeki rahatlatıcı etkisi nedeniyle yumurtanın tutulmasına ve sperm taşınmasının gecikmesine neden olabilir (Rautela ve ark., 2021). Düşük NO seviyeleri, spermin kapasitasyonunu ve zona pellusida bağlama kabiliyetini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir. Sığırlarda süperoksit ve H_2O_2, in vitro olarak sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu için gereklidir. Yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarının in vitro boğa sperm motilitesini azalttığı, fertilizasyonun ve embriyo gelişimini bozduğu bildirilmiştir (Sengoku ve ark., 1998; O'Flaherty ve ark., 1999).

Döl tutmayan ineklerde daha yüksek MDA düzeyi, ya belirli stres faktörleri, yani yüksek süt üretimi, doğum sonrası bozukluklar, negatif enerji dengesi, sosyal faktörler, taşıma ve ısı nedeniyle ya da eksik antioksidan mekanizmalardan kaynaklanabilir. Stres, özellikle ROM'leri olmak üzere serbest radikallerin aşırı üretimine yol açar. Lipidler, lipid peroksidasyonu yoluyla zarar gören serbest radikallere karşı tercih edilen substrat olduğundan, ROM'leri OS'in en iyi biyobelirteçleri olarak kabul edilir. Lipid peroksidasyonu son ürünlerinden biri, çoklu doymamış yağ asidinin serbest radikal kaynaklı ayrışması sırasında oluşan birkaç düşük moleküler ağırlıklı son üründen biri olan MDA'dır (Soni ve ark., 2014).

Çeşitli çalışmalarda RB ineklerde OS'in meydana geldiği ve antioksidan enzim düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir. Döl tutmayan ineklerde sağlıklı ineklere göre MDA düzeylerinin artış gösterdiği, GSH, GSH-Px ve CAT düzeylerinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Repeat breeder sığırlarda sağlıklı olanlara göre MDA düzeylerinin yüksek olması, artan OS ve antioksidan enzimlerden; GSH, GSH-Px ve CAT düzeylerinde saptanan düşüşlerin ise OS'e yanıt olarak bu enzimlerin kullanımlarının artmasından ileri gelebileceği düşünülmüştür. Bu durumda başta endometritis gibi doğum kanalında meydana gelen enfeksiyonlar ve oosit gelişimini olumsuz etkileyen faktörler, gerek MDA düzeylerindeki yükseliş ve gerekse de GSH, GSH-Px ve CAT düzeylerinde

görülen düşüşler, hücresel harabiyete yol açabilen OS'in göstergesi olarak kabul edilebilirler (Güvenç ve ark., 2017). Repeat breeder ineklerde serum MDA ve NO düzeylerinin östrus dönemindeki ineklere göre önemli düzeyde yüksek bulunduğu bir araştırmada bu artışların, antioksidan savunmanın azalması ve çeşitli enfeksiyonlar sırasında serbest radikal üretiminin artmasına atfedilmiştir (Ali ve ark., 2014). Ahmed ve ark. (2010) çalışmalarında RB mandalarda oksidan/antioksidan belirteçleri olarak MDA ve NO düzeylerinde artış, CAT, SOD, askorbik asit, glutatyon ve TAK konsantrasyonlarında azalma tespit etmişlerdir. Siddique ve ark. (2021); oksidan/antioksidan durumunun Surti mandasında fertilitede çok önemli bir faktör olduğunu, döl tutmayan hayvanlarda MDA ve NO düzeylerinin, normal siklik gösteren hayvanlara göre önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmaların sonuçları döl tutmayan ineklerde artan serum MDA ve NO düzeylerinin, farklı patojenler tarafından indüklenen inflamatuar sürece bağlı olabileceği ortaya koymaktadır (Ali ve ark., 2014; Siddique ve ark., 2021). Bununla birlikte RB Surti mandalarında glikoz, SOD, CAT, glutatyon ve TAK'inin önemli ölçüde azaldığı da ortaya konulmuştur. Bu nedenle, döl tutmayan Surti mandalarının OS altında olduğu ve rasyonlarında yeterli miktarda antioksidan ve mineral sağlanması gerektiği kanaatine varılmıştır (Siddique ve ark., 2021).

Repeat breeder ineklerde toplam eritrosit sayısı, hemoglobin, trombositler, kan glikozu, LH, P4 ve testosteron düzeylerinin normal siklik gösteren ineklere göre önemli ölçüde daha düşük olduğu belirtilmiş, genel olarak, hemoglobin eksikliği ve düşük kan glikoz konsantrasyonlarının muhtemelen yumurtalık fonksiyonunu değiştirdiği ve yumurtlama için daha düşük LH konsantrasyonuna neden olduğu vurgulanmıştır (Sultana ve ark., 2022). Perumal ve ark. (2021) Andaman ve Nicobar Adaları'nın tropik ada ekosisteminde yer alan melez ineklerde RB'in hematolojik, antioksidan, OS ve endokrinolojik profiller üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapmışlar, RB ineklerde anemik bir tablo gözlendiğini, sağlıklı siklus gösterenlere göre daha düşük antioksidan profile ve yüksek MDA düzeylerine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde, endokrinolojik profilin yani RB hayvanların önemli ölçüde daha yüksek düzeyde kortizol, prolaktin ve daha düşük düzeyde 17 β-östradiol (E2), P4, folikül uyarıcı hormon (FSH), LH, tiroksin (T4) ve insülin benzeri büyüme

faktörü-1 (IGF-1) nün etkilenmemiş melez ineklere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak bu araştırmacılar, Andaman ve Nicobar Adaları'ndaki melez ineklerde RB'in anemi, antioksidan eksikliği, serbest radikallerin aşırı üretimi ve endokrinolojik profil bozukluklarından kaynaklandığını söylemişlerdir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Demirbaş malzemeler

1. ELISA okuyucu (Biotek, µQuant)
2. Santrifüj (Nüve)
3. Soğutmalı santrifüj (Nüve NF 32R)
4. Hassas terazi (Ohaus)
5. Deiyonize su cihazı (Milipore)
6. Derin dondurucu
7. Buzdolabı
8. Otomatik pipetler (Thermo, Tek kanallı ve Çok kanallı)
9. Vortex (Nüve)
10. Buz makinası (ITV IQ 85C)

3.1.2. Sarf malzemeler

1. MDA ELISA Kiti (BTLab, Katalog No: E1371Hu, Çin)
2. SOD ELISA Kiti (BTLab, Katalog No: E4502Hu, Çin)
3. TOK Kiti (Rel Assay, Katalog No: RL0024, Türkiye)
4. TAK Kiti (Rel Assay, Katalog No: RL0017, Türkiye)

5. Total Tiyol Kiti (Rel Assay, Katalog No: RL0192, Türkiye)
6. Native Tiyol Kiti (Rel Assay, Katalog No: RL0185, Türkiye)
7. Distile su
8. Ependorf tüp
9. Enjektör

3.1.3. Hayvan Materyali

Çalışma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesi'nden (ERÜ HADYEK) onay alındı (04.01.2023 tarih ve karar no: 23/001). Kayseri İli Develi İlçesi'ndeki Kurmel Tarım ve Hayvancılık Anonim Şirketi'ne ait çiftlikte yer alan 10 yaşından küçük, düzenli östrus siklusu gösteren, klinik olarak reprodüktif hastalık bulunmayan ve gebelik durumları ultrason yöntemi ile tespit edilen 3 veya daha fazla tohumlanıp gebe kalamayan (34 adet) ve gebe kalan (34 adet) olmak üzere 2 gruptan oluşan toplam 68 adet Holstein ırkı inek, çalışma için kullanıldı.

3.1.4. Örneklerin alınması

Kayseri İli Develi İlçesi'ndeki Kurmel Tarım ve Hayvancılık Anonim Şirketi'ne ait çiftlikte yer alan 10 yaşından küçük, 3 veya daha fazla tohumlandıktan sonra gebe kalamayan inekler ile gebeliğin ilk 3 aylık döneminde olan ineklerin V.jugularisinden yaklaşık 10 ml kan, Li-heparinli tüplere alınarak, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen plazmalar, analizleri yapılıncaya kadar -80 ºC'de saklandı.

3.2.YÖNTEM

3.2.1. Biyokimyasal Analizlerin Yapılması

Kanlardan elde edilen plazmalarda MDA düzeyleri ile SOD enzim aktiviteleri, TOK, TAK, TT, NT düzeyleri ELISA cihazlarında ticari kitler kullanılarak belirlendi.

3.2.1.1. Plazma MDA Analizleri

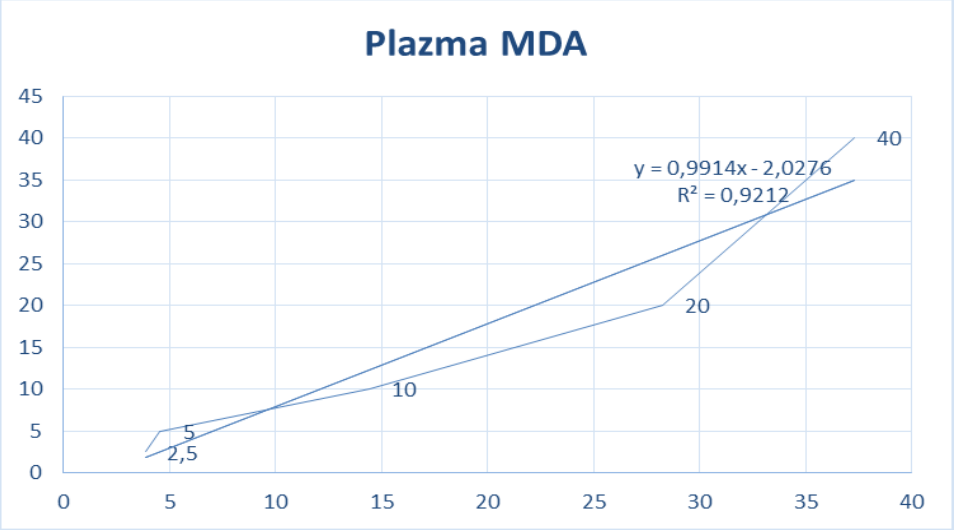
Plazma MDA düzeyleri ELISA cihazında (BioTek, uQuant) ticari ELISA kiti (BTLab, Katalog No: E1371Hu, Çin) kullanılarak belirlendi.

Prensip

Malondialdehit düzeyleri sandaviç-ELISA yöntemi ile ELISA cihazında ticari kit kullanılarak belirlendi. Öncelikle mikro ELISA plakaları MDA`ya özgü bir antikorla daha önceden kaplanmıştır. Örnekteki MDA absorbansları 450nm ± 10nm dalga boyunda belirlendi, daha sonra MDA konsantrasyonları örneklerin standart OD eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplandı.

İşlem

Analiz öncesi bütün reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi. Standart olarak belirlenen kuyucukların her birine 50 µl standart + 50 µl streptavidin HRP, örnek olarak belirlenen kuyucukların her birine 40 µl örnek + 10 µL anti-MDA antikor + 50 µl streptavidin HRP eklendi. Plakanın üzeri kapatılarak 37°C`de 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki çözelti aspire edildi ve her bir kuyucuğa 300 µl yıkama solüsyonu eklenip, 1-2 dakika bekletildikten sonra tekrar aspire edildi. Yıkama işlemi 5 kez tekrar edildikten sonra plaka temiz bir kurutma kağıdına hafifçe vurularak kurutuldu. Kurutulmuş plaka üzerindeki kuyucukların tamamına 50 µl substrat solusyon A + 50 µl substrat solusyon B eklenip, plakanın üzeri kapatılarak 37°C`de 10 dakika boyunca inkübatörde karanlık ortamda bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi. Daha sonra hızlı bir şekilde 450 nm`de okunarak sonuçlar hesaplandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Plazma MDA'nın optik dansite eğrisi

3.2.1.2. Plazma SOD Analizleri

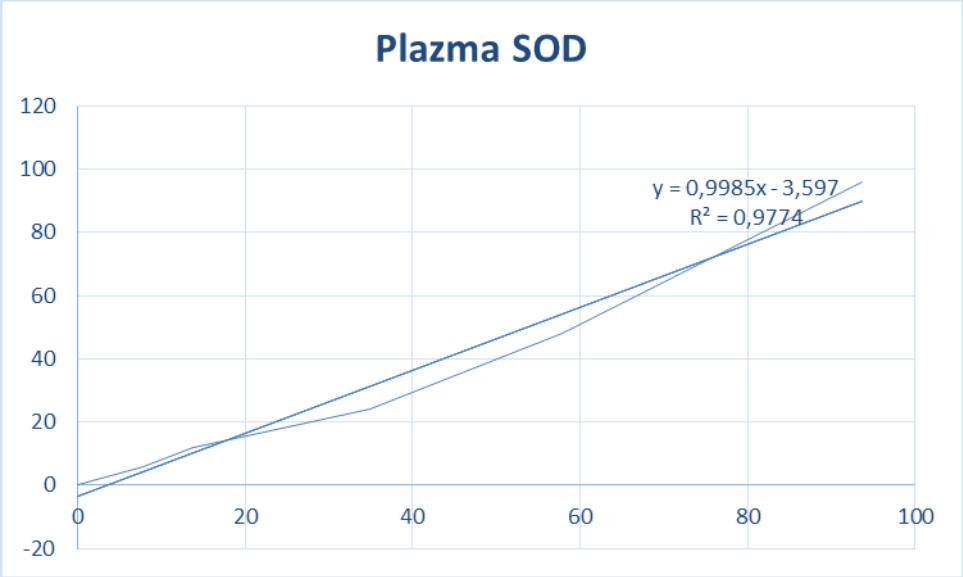
Plazma SOD aktiviteleri ELISA cihazında (BioTek, uQuant) ticari ELISA kiti (BTLab, Katalog No: E4502Hu, Çin) kullanılarak belirlendi.

Prensip

Süperoksit dismutaz aktivasyonları ticari kit kullaılarak ELISA kitinde sandaviç-ELISA yöntemi ile belirlendi. Bu kitle beraber sağlanan mikro ELISA plakaları SOD`a özgü bir antikorla daha önceden kaplanmıştır. Örnekteki SOD 450 nm ± 10 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü, daha sonra numunedeki SOD konsantrasyonu örneklerin standart OD eğrisi ile karşılaştırılarak belirlendi.

İşlem

Analiz öncesi bütün reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi. Standart olarak belirlenen kuyucukların her birine 50 µl standart + 50 µl streptavidin HRP, örnek olarak belirlenen kuyucukların her birine 40 µl örnek + 10 µl anti-SOD1 antikor + 50 µL streptavidin HRP eklendi. Plakanın üzeri kapatılarak 37°C`de 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki çözelti aspire edildi ve her bir kuyucuğa 300 µl yıkama solüsyonu eklenip 1-2 dakika bekletildikten sonra tekrar aspire edildi. Yıkama işlemi 5 kez tekrar edildikten sonra plaka temiz bir kurutma kağıdına hafifçe vurularak kurutuldu. Kurutulmuş plaka üzerindeki kuyucukların tamamına 50 µl substrat solusyon A + 50 µl substrat solusyon B eklenip, plakanın üzeri kapatılarak 37°C`de 10 dakika boyunca inkübatörde karanlık ortamda bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi. Daha sonra hızlı bir şekilde 450 nm`de okunarak sonuçlar hesaplandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Plazma SOD'ın optik dansite eğrisi

3.2.1.3. Plazma TOK Analizleri

Plazma TOK düzeyleri ELISA cihazında (BioTek, uQuant) ticari ELISA kiti kullanılarak (Rel Assay, Katalog No: RL0024, Türkiye) belirlendi.

Prensip

Analiz öncesi bütün reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi. Serum TOK düzeyleri ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Plazma TOK düzeylerinin ölçümünde numunede bulunan oksidanlar, demirli iyon şelatör kompleksini demir iyonuna oksitlemektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan güçlendirici moleküller tarafından uzatılır. Ferrik iyon, asidik bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan oksidan moleküllerin toplam miktarı ile ilgilidir. Test hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri (µmol H_2O_2 Eşdeğeri / L) olarak ifade edilir (https://www.relassay.com/e-catalog. Erişim tarihi: 22.07.2021).

İşlem

Plaka üzerinde standart ve örneklerin yerleri belirlendi. Plaka kuyucuklarının her bir gözüne 200 µl R1 ve 30 µl standart / örnek eklendi. İlk absorbans 530 nm'de okundu.

Daha sonra kuyucuklara 10 µl R2 solüsyonu eklenerek oda ısısında 5 dakika inkübasyonun ardından ikinci kez 530 nm'de absorbanslar belirlendi. Absorbanslar arasındaki fark alınarak hesaplamalar yapıldı.

3.2.1.4. Plazma TAK Analizleri

Plazma TAK düzeyleri ELISA cihazında (BioTek, uQuant) ticari kit (Rel Assay, Katalog No: RL0017, Türkiye) kullanılarak belirlendi.

Prensip

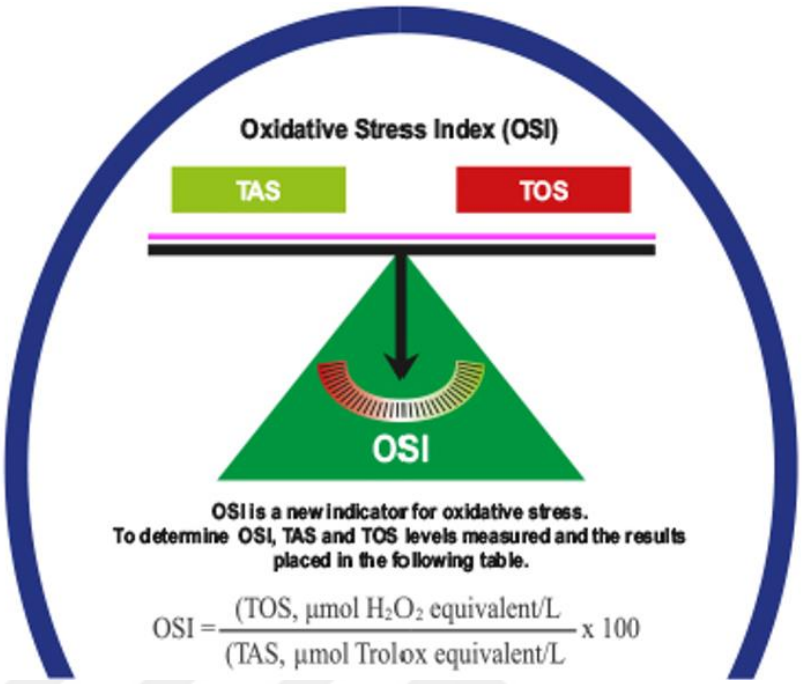
Analiz öncesi bütün reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi. Total antioksidan düzeyleri ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Plazma TAK düzeyleri, hidroksil radikalinin başlattığı serbest radikal reaksiyonlarına karşı numunenin antioksidan etkisi ile ölçülmektedir. Örnekteki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirgemektedir. Örneğin TAK düzeyleri, 660 nm'de belirlenen absorbans değişiminde belirlenir. Ölçüm, geleneksel olarak E vitamini analoğu olan Trolox Eşdeğeri olarak adlandırılan stabil bir antioksidan standart çözelti ile kalibre edilmekte ve sonuçlar µmol TroloxEq / L olarak ifade edilmektedir (https://www.relassay.com/ecatalog. Erişim tarihi: 22.07.2021).

İşlem

Plaka üzerinde standart ve örneklerin yerleri belirlendi. Plaka kuyucuklarının her bir gözüne 200 µl R1 ve 12 µl standart / örnek eklendi. İlk absorbans 660 nm'de okundu. Daha sonra kuyucuklara 30 µl R2 solüsyonu eklenerek oda ısısında 5 dakika inkübasyonun ardından ikinci kez 660 nm'de absorbanslar belirlendi. Absorbanslar arasındaki fark alınarak hesaplamalar yapıldı.

3.2.1.5.Plazma Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Düzeylerinin Belirlenmesi

Total oksidan düzeylerinin TAK'a oranı oksidatif stres indeksi (OSİ) olarak kabul edilmektedir. Hesaplama için elde edilen TAK birimi µmol/L'ye dönüştürülmüş ve OSİ değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (https://www.relassay.com/e-catalog. Erişim tarihi: 22.07.2021; Şekil 3.3).



Şekil 3.3. OSİ değeri hesaplama (https://www.relassay.com/e-catalog. Erişim tarihi: 22.07.2021)

3.2.1.6. Tiyol-Disülfit Dengesinin Belirlenmesi

Plazmada tiyol-disülfit dengesinin belirlenmesinde Erel ve Neşelioğlu (2014) tarafından geliştirilen metod kullanıldı ve sonuçlar kolorimetrik olarak ölçüldü. Prensibi; disülfit bağları sodyum borohidrit ($NaBH_4$) ile redükte olarak serbest fonksiyonel tiyol grupları üretimini sağlar. Kullanılmayan indirgen $NaBH_4$, DTNB 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) ile indirgenmesini önlemek için formaldehit tarafından tüketilir ve elimine edilir. İndirgen ve NT dahil tüm tiyol grupları DTNB ile reaksiyona girerek ölçülür. Total tiyol ve NT düzeylerin arasındaki farkın ikiye bölünmesi DD düzeyini belirler. Ölçümler ticari test kitlerinde yer alan prosedüre uygun olarak yapıldı, birimi µmol/L olarak verildi.

3.2.1.6.1. Plazma TT Analizleri

Plazma total tiyol düzeyleri ELISA cihazında (BioTek, uQuant) ticari kit kullanılarak (Rel Assay, Katalog No: RL0192, Türkiye) belirlendi.

Prensip

İndirgenebilir disülfür bağları, serbest fonksiyonel tiyol grupları oluşturacak şekilde indirgenmiştir. Kullanılmayan indirgeyici sodyum borohidrit tüketilip formaldehit ile uzaklaştırılmış ve 5,5-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyon sonrasında indirgenmiş ve doğal tiyol grupları dahil tüm tiyol grupları belirlenmiştir.

İşlem

Plaka üzerinde standart ve örneklerin yerleri belirlendi. Plaka kuyucuklarının her bir gözüne 10 µl R1 ve 10 µl standart/örnek eklendikten 1 dakika sonra plaka kuyucuklarının her bir gözüne 110 µl R2 eklendi. Dört dakika sonraki 415 nm`de yapılan ilk okumada A1 elde edildi. Daha sonra plaka kuyucuklarının her bir gözüne 10 µl R3 eklendi. İnkübasyonun 5. dakikasının sonunda 415 nm`de okuma yapılarak A2 belirlendi. Absorbanslar arasındaki fark alınarak hesaplamalar yapıldı.

3.2.1.6.2. Plazma NT Analizleri

Plazma native tiyol düzeyleri ELISA cihazında (BioTek, uQuant) ticari ELISA kiti kullanılarak (Rel Assay, Katalog No: RL0185, Türkiye) belirlendi.

Prensip

İndirgenebilir disülfür bağları, serbest fonksiyonel tiyol grupları oluşturacak şekilde indirgenmiştir. Kullanılmayan indirgeyici sodyum borohidrit tüketilip formaldehit ile uzaklaştırılmış ve DTNB ile reaksiyon sonrasında indirgenmiş ve doğal tiyol grupları dahil tüm tiyol grupları belirlenmiştir. Total tiyoller ile native tiyoller arasındaki fark ikiye bölünerek bulunan dinamik disülfit miktarı kaydedildi.

İşlem

Plaka üzerinde standart ve örneklerin yerleri belirlendi. Plaka kuyucuklarının her bir gözüne 10 µl su ve 10 µl standart / örnek eklendikten sonra plaka kuyucuklarının her bir gözüne 100 µl R1 eklendi. Beş dakika sonraki 415 nm`de yapılan ilk okumada A1 elde edildi. Daha sonra plaka kuyucuklarının her bir gözüne 10 µl R2 eklendi. İnkübasyonun 5. dakikasının sonunda 415 nm`de okuma yapılarak A2 belirlendi. Absorbanslar arasındaki fark alınarak hesaplamalar yapıldı.

3.2.2. İstatistiksel Analizler

Örneklerin analiz sonuçları aritmetik ortalama±standart hata şeklinde verildi. Gebe ve RB hayvanlara ait verilerde istatistiksel farkın belirlenmesinde Student Independent T Testi (Windows için SPSS 20 programında) uygulandı.

4.BULGULAR

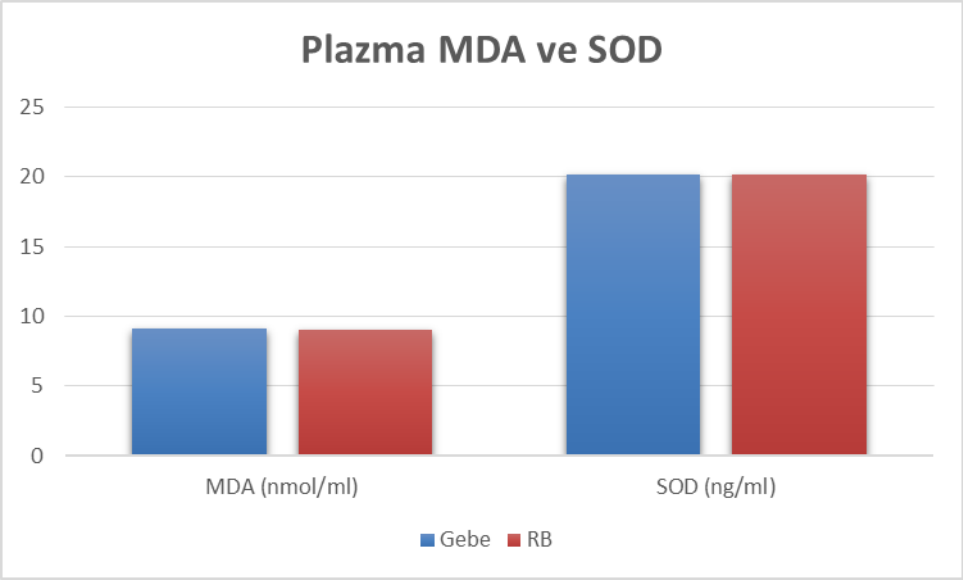
4.1. Plazma MDA Düzeyleri ile SOD aktiviteleri

Repeat breeder ineklerin plazma MDA düzeyleri ile SOD aktivitelerinin, gebe ineklerin MDA düzeyleri ile SOD aktivitelerinden istatistiksel anlamda farklı olmadığı belirlendi (P>0.05; Tablo 4.1; Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Gebe ve RB ineklerin plazma MDA düzeyleri ile SOD aktiviteleri

	N	**Gebe**	**RB**	**P**
MDA (nmol/ml)	34	9.13±0.64	8.99±0.91	-
SOD (ng/ml)	34	20.14±0.95	20.18±1.17	-

-: Önemsiz (P>0.05)



Şekil 4.1. Gebe ve RB ineklerin plazma MDA düzeyleri ile SOD aktiviteleri

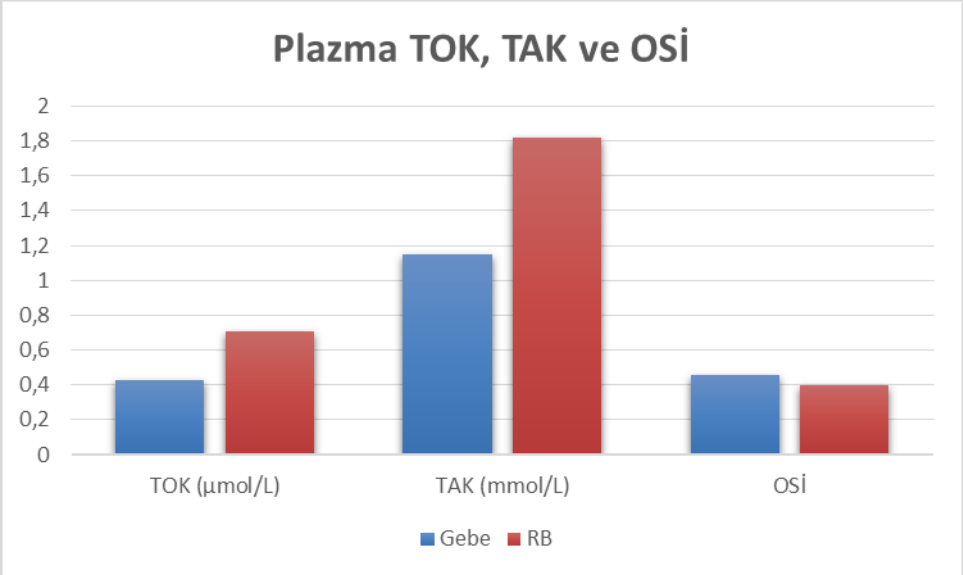
4.2. Plazma TOK, TAK ve OSİ Düzeyleri

Repeat breeder ineklerin plazma TOK ve TAK düzeylerinin gebe ineklerin TOK ve TAK düzeylerinden istatistiksel anlamda yüksek olduğu saptandı (P<0.001). Ancak, OSİ değerleri yönünden gruplar arasında istatistiki önemde bir fark belirlenmedi (P>0.05; Tablo 4.2; Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Gebe ve RB ineklerin plazma TOK, TAK ve OSİ düzeyleri

	N	**Gebe**	**RB**	**P**
TOK (µmol/L)	34	0.43±0.05	0.71±0.04	***
TAK (mmol/L)	34	1.15±0.07	1.82±0.06	***
OSİ (arbitrary unit)		0.46±0.10	0.40±0.03	-

-: Önemsiz (P>0.05), ***: P<0.001



Şekil 4.2. Gebe ve RB ineklerin plazma TOK, TAK ve OSİ düzeyleri

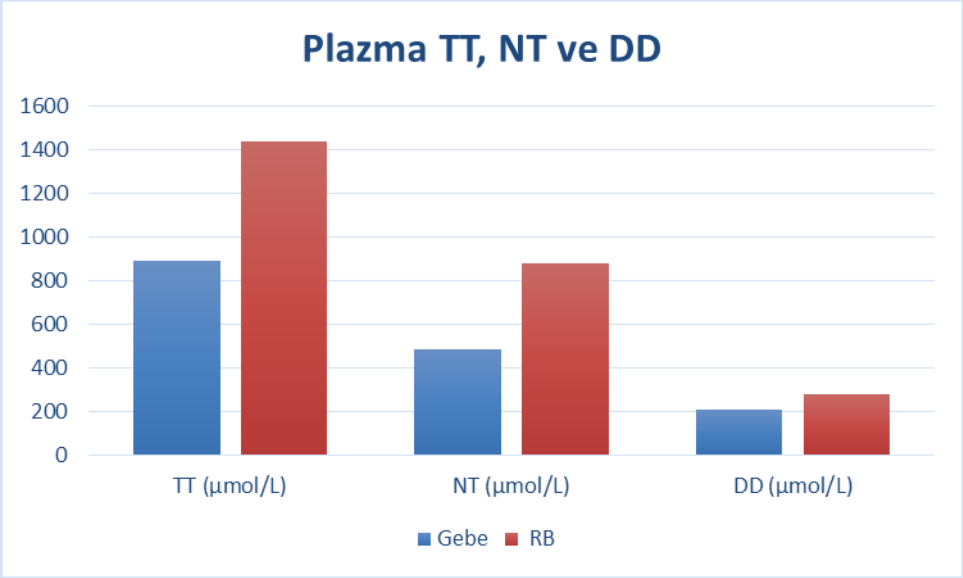
4.3. Plazma TT, NT ve DD Düzeyleri

Repeat breeder ineklerin plazma TT ve NT düzeylerinin gebe ineklerin TT ve NT düzeylerinden istatistiksel anlamda yüksek olduğu belirlenmesine karşın (P<0.001), DD değerleri yönünden gruplar arasında istatistiki önemde herhangi bir fark saptanmadı (P>0.05; Tablo 4.3; Şekil 4.3).

Tablo 4.3. Gebe ve RB **i**neklerin plazma TT, NT ve DD düzeyleri

	N	**Gebe**	**RB**	**P**
TT (µmol/L)	34	889.93±85.88	1436.61±111.14	***
NT (µmol/L)	34	481.56±32.83	879.46±99.88	***
DD (µmol/L)		204.19±44.52	278.57±46.37	-

-: Önemsiz (P>0.05), ***: P<0.001



Şekil 4.3. Gebe ve RB ineklerin plazma TT, NT ve DD düzeyleri

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Döl tutmama (Repeat breeder; RB), çeşitli faktörlerden kaynaklanan düşük süt üretimine ve hayvan başına buzağı sayısının azalmasına neden olarak çiftçi ve endüstri düzeyinde ekonomik kayıplara neden olan çok önemli bir kısırlık sorunudur. Repeat breederin nedenleri arasında OS, östrus tespit hataları, endokrin fonksiyon bozukluğu, yumurtlama kusurları, zayıf döllenme oranları ve/veya erken embriyonik kayıp gibi faktörler yer alır (Soni ve ark., 2014; Siddique ve ark., 2021).

Repeat breeder çok faktörlü bir durumdur; bu nedenle OS'in çok yönlü rolü öngörülebilir. Oosit metabolizması ve steroid üretimi ROM üretiminde artışa neden olur (Ciani ve ark., 2015). Ortaya çıkan oksijen yoksunluğu, anjiyogenezin ve foliküler büyüme ve gelişimin uyarılması için gereklidir. Denge antioksidan sistem tarafından sağlanır, ancak kontrolsüz ROM salınımı strese neden olur. Ortaya çıkan OS nükleik asit, protein ve lipidlere zarar verir ve dolayısıyla oosit kalitesini bozar (Forman ve Torres, 2002; Rautela ve ark., 2021). Oositteki oksidatif hasarın, kalıcı olarak zayıf oosit kalitesinin bir nedeni olduğu düşünülmektedir. Stres, çoklu doymamış yağ asitlerine saldıran serbest radikallerin aşırı üretimine neden olabilir, böylece lipoproteinlerde değişikliğe neden olarak P4 üretiminde değişikliklere neden olabilir (Rizzo ve ark., 2007; Rautela ve ark., 2021).

Oksidatif stres, antioksidan savunma düzeyine bağlı olarak ROM'lerin aşırı üretiminden kaynaklanır ve vücudun pro-oksidanlar ve antioksidan mekanizmaları arasındaki dengesizliği gösterir. Artan stres seviyesi dişi üremesinin fizyolojik fonksiyonlarını etkiler. Oksidatif stresle ilgili çalışmalar, günümüzde hayvan türlerinde, özellikle de genel olarak veteriner hekimlikte ve özel olarak üremede aktif bir araştırma alanı haline

gelmiştir. Bunun nedeni, hayvancılıkta kısırlık sorunlarının görülme sıklığının artmasıdır ve belki de önümüzdeki yıllarda da ortaya çıkan bir araştırma alanı olarak devam edecektir. Dişilerde kısırlığın patofizyolojisinde OS'in rol oynadığı düşünülmektedir ve klinik açıdan bakıldığında sığır infertilitesinde OS'in etkisi konusunda bilgi sahibi olmak büyük önem taşımaktadır (Rautela ve ark., 2021). Serbest radikaller aynı zamanda kısırlığa bağlı birçok hastalıkta da rol oynar. Serbest radikal, bağımsız olarak var olabilen bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküler türler olarak tanımlanır. Bunlar oksijen metabolizmasının doğal yan ürünleri olarak oluşur, bakterileri öldürme ve organizmadaki zararlı maddeleri atma amacına hizmet eder, ancak kontrolden çıktığında OS adı verilen bir süreçle toksik hale gelir ve vücut dokularına zarar vermeye başlarlar. Serbest radikallerin potansiyel zararlı etkilerini nötralize eden maddelere antioksidanlar veya serbest radikal süpürücüleri denir. Bu oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik doku hasarından sorumludur (Siddigue ve ark., 2021).

Aktif metabolizma ve steroidogenez nedeniyle üreme dokusunda ROM üretimi yüksek olduğundan doku sürekli OS altındadır. Oksidatif stes altında iken oluşan ROM'lerinden dolayı yumurtalarda bu tür bir hasarın taşınması, kalıtsal hastalık riskini artırır ve dolayısıyla canlı organizmalar, türleri korumak için bu tür gametleri ortadan kaldırmak zorundadır. Öte yandan üreme sistemi, üreme için gerekli olan bazı işlemlerde ROM'leri kullanır. Reaktif oksijen moleküllerinin neden olduğu riski en aza indirmek için SOD ve GSH-Px gibi antioksidan sistemler geliştirilmiştir. Reaktif oksijen moleküllerinin seviyeleri sistemin süpürme kapasitesini aştığında, bu gibi durumlarda bir redoks sistemi, orijinal elektron kaynağı olarak NADPH'yi kullanarak oksitlenmiş ve hasar görmüş molekülleri onarabilir. Bu nedenle yüksek redoks potansiyelinin korunması, üreme sistemlerinin sağlıklı bir durumda tutulması için ön koşuldur. Sperm çekirdeğinde ve yumurtlama sırasında disülfit bağı oluşumu gibi kontrollü oksidasyon, memeli üremesinde temel bir rol oynar. Ancak aşırı oksidasyon, OS'e neden olur ve bu da üreme sürecinin işlev bozukluğuna neden olur. Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini azaltan antioksidan reaksiyonlar, üreme sistemlerinde gamet kalitesinin korunmasında ve üremenin desteklenmesinde birincil öneme sahiptir. Süperoksit dismutaz ve peroksidaz gibi anti-oksidatif enzimler OS'in ortadan

kaldırılmasında merkezi bir rol oynarken, esas olarak glutatyon ve tiyoredoksinden oluşan indirgeme-oksidasyon (redoks) sistemleri, oksitlenmiş moleküllerin seviyelerini düşürme işlevi görür. Aldo-keto redüktaz, NADPH'yi elektron donörü olarak kullanarak, lipidlerin ve proteinlerin oksidasyonundan kaynaklanan karbonil bileşiklerini detoksifiye eder. Böylece birçok antioksidatif ve redoks enzim geni eksprese edilir ve üreme sistemlerinde gametleri ve embriyoları agresif bir şekilde korur (Fujii ve ark., 2005).

Lipid peroksidasyonunun bir indeksi olan MDA, hücre ve dokularda oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır. Sağlıklı hayvanın iyi dengelenmiş ROM ve antioksidanlara sahip olduğu ve denge bozulduğunda ROM'lerinin aşırı üretimine bağlı olarak OS'in ortaya çıkmasına yol açtığı iyi bilinmektedir. Reaktif oksijen molekülleri dişi gonadlarda, yardımcı bezlerde ve üreme sisteminde, oosit olgunlaşmasından döllenmeye, embriyo gelişimine ve gebeliğe kadar birçok fizyolojik süreci etkileyen, buzağılama sonrası daha uzun gebelik aralığına, zayıf gebelik oranına ve doğurganlığın başarısızlığına yol açan patolojik süreçleri tetikleme yeteneğine sahiptir (Kumar ve ark., 2012). Oksidan ve antioksidan arasında gözlenen dengesizlik, östrus döngüsünün kontrolünden sorumlu olan fizyolojik olayları olumsuz etkilediğinden, yumurtlamanın gerçekleşmesini sağlayan fizyolojik olayları bozmuş ve kistik yumurtalık hastalığına yol açmış olabileceği vurgulanmıştır (Talukder ve ark., 2014). Sunulan çalışmada döl tutmayan ve gebe kalan ineklerde OS durumu değerlendirilmiştir.

Siddique ve ark. (2021) normal mandalarla karşılaştırıldığında RB mandalarda kan MDA ve NO düzeylerinin daha yüksek olduğunu, SOD, CAT, glutatyon ve TAK düzeylerinin ise önemli ölçüde azaldığını saptamışlar ve sonuç olarak RB'li mandalarının oksidatif stres altında olduğunu ve rasyonlarında yeterli miktarda antioksidan ve mineral sağlanması gerektiğini ifade etmişlerdir. Aynı şekilde Ahmed ve ark. (2010) RB manda ineklerindeki oksidan/antioksidan belirteçleri olarak MDA ve NO düzeylerinde artış, CAT, SOD, askorbik asit, glutatyon ve TAK düzeylerinde azalma tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada (Güvenç ve ark., 2017) da yaşları 3-8 arasında değişen, 20 adet RB ve 20 adet kontrol grubu olarak döl verimi problemi olmayan toplam 40 adet Holstein ırkı ineklerde plazma MDA, CAT, GSH, GSH-Px düzeyleri belirlenmiş; MDA düzeylerinin RB grupta kontrol grubuna göre istatistiksel

olarak daha yüksek, GSH, GSH-Px ve CAT düzeylerinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, RB ineklerde saptanan plazma MDA düzeylerindeki artışlar ile plazma GSH, GSH-Px ve CAT düzeylerinde görülen azalmalar döl tutmama tablosunda OS'in geliştiğinin önemli göstergeleri olduğu kanaatine varılmıştır. Bununla birlikte sunulan çalışmada ise yukarıdaki araştırmacıların aksine, RB ve gebe inekler arasında plazma MDA düzeyleri ile SOD aktiviteleri yönünden istatistiki önemde herhangi bir fark saptanmadı.

Serum TAK konsantrasyonu, ROM'lerini devre dışı bırakacak ve zararlı etkilerini önleyecek olan vücuttaki hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanların durumu hakkında kümülatif bir görünüm sağlar (Cheeseman ve Slater, 1993; Gupta ve ark., 2011). Soni ve ark., (2014) RB ineklerde normal sağlıklı ineklere göre serum MDA ve NO düzeylerinin daha yüksek olduğunu, ancak TAK ve P4 konsantrasyonlarının daha düşük olduğunu saptamışlar ve bu verilerin RB ineklerde gebelik başarısızlığına yol açan luteal yetmezlikteki OS'in rolünü ortaya koyduğunu vurgulamışlardır. Benzer olarak bir başka çalışmada (Perumal ve ark., 2021) RB ineklerde sağlıklı siklus gösterenlere göre daha düşük antioksidan durum ve yüksek MDA düzeylerinin belirlendiği ortaya konulmuştur. El-Amrawi ve ark. (2021) da, inaktif ovaryuma sahip ineklerin serum TAK düzeylerinin düzenli östrus siklusuna sahip ineklerinkine göre daha düşük olduğunu belirlemişler, bu hayvanların serbest radikallerin veya ROM'lerinin aşırı üretimine ve oksidan/antioksidan dengesizliği durumuyla sonuçlanan antioksidan savunma sistemlerinin tükenmesine neden olabilecek bir durum altında olduğunu vurgulamışlardır.

Hayvanlarda özellikle ROM'lerinin zararlı etkilerine karşı çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmalarından biri olan tiyol-disülfid dengesinin değerlendirildiği çalışmalar oldukça sınırlıdır (Çamkerten ve ark., 2019; Emre ve ark., 2021; Deveci ve Erdal, 2022). Çamkerten ve ark. (2019) sarkoptik uyuzlu koyunlarda TT, NT ve disülfit düzeylerinin sağlıklı koyunlara göre daha düşük olduğunu, disülfit/natif tiyol, disülfit/total tiyol ve natif tiyol/total tiyol oranları açısından ise gruplar arasında bir farkın görülmediğini belirlemişler, sarkoptik uyuzun enfekte koyunlarda disülfit dengesini etkilediğini, bu dengeyi sağlayacak antioksidan moleküllerin terapotik seçeneklere eklenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Deveci ve

Erdal (2022) çalışmalarında, ayak hastalığı olan süt sığırlarında TT, NT ve disülfit düzeylerinin sağlıklı olanlara göre daha yüksek olduğunu, tiyol-disülfit dengesinin bozulduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte gebe kalamayan ineklerde TT ve NT düzeylerinin değerlendirildiği sadece bir çalışmaya ulaşılmıştır (Emre ve ark., 2021). Subklinik endometritisli infertil süt ineklerinde OS'in yeni bir göstergesi olarak tiyol/disülfit homeostazisinin değerlendirildiği bildirilen bu çalışmada, akut ve kronik endometritisli infertil ineklerin serum total ve native tiyol düzeylerinin sağlıklı ineklere göre daha düşük olduğu ve disülfit düzeyleri, disülfit/toplam tiyol, native tiyol/toplam tiyol ile disülfit/doğal tiyol oranlarının ise tüm gruplarda benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile, tiyol/disülfit homeostazisinin inek subklinik endometritisinde OS'in güvenilir ve hassas bir göstergesi olduğunu ve anormal tiyol/disülfit homeostazisinin subklinik endometritisin patojenik mekanizmalarında rol oynayabileceği kanaatine varılmıştır. Sunulan çalışmada da artan OS'ten dolayı RB ineklerde gebelere göre plazma TOK düzeylerinin artış gösterdiği ve bu artışı kompanze etmek amacıyla TAK düzeylerinin de yükseldiği görülmüştür. Bununla birlikte RB hayvanlarda, özellikle biyolojik sistemlerdeki ekzojen ve endojen kaynaklı OS durumu hakkında bilgi verebilen plazma TT ve NT düzeylerinin de, artmış olan TOK ve TAK düzeylerini destekler şekilde, istatistiksel anlamda daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada repeat breeder ve gebe inekler arasında plazma malondialdehit düzeyleri ve süperoksidaz dismutaz aktiviteleri yönünden herhangi bir fark saptanmazken, total oksidan ve antioksidan kapasitesi ile total ve native tiyol düzeylerinin repeat breeder ineklerde gebelere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Hayvan sağlığı ve doğurganlığının iyileştirilmesine ilişkin öneri olarak;

- Oksidatif stresin güvenilir bir şekilde değerlendirilebilmesi açısından fizyolojik ve patolojik reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonları ile birlikte oksidan ve antioksidanların statüsünün belirlenmesi,
- Döl tutmayan inekler oksidatif stres altında olduğundan, buna neden olabilecek faktörlerin araştırılıp, elimine edilmesi ve
- Ayrıca bu hayvanların rasyonlarında yeterli miktarda antioksidan, mineral ve vitamin içeriğinin sağlanması yararlı olabilir.

6. KAYNAKLAR

Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress. A review. Med Sci Monit, 2004; 10(6):141-147.

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reproduc Biol & Endocrin, 2005; 3(1): 1-21.

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril, 2003; 79(4): 829-843.

Ahmed WM, El-Khadrawy HH, Emtenan MH, Amal HA, Shalaby SA. Clinical perspective of repeat breeding syndrome in buffaloes. J Am Sci, 2010; 6(11): 661-666.

Ak MH., Acar DB. The comparison of two different ıntrauterine treatment efficiency in repeat breeder cows. Kocatepe Vet J, 2022; 15(4): 476-481.

Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1. Basım. 1995; 1-157.

Aköz M, Dinç DA. Döl Tutmayan (Repeat Breeder) İneklerde PGF2α ve intrauterin köpük sprey (rifaximina) uygulamalarının gebe kalma oranı üzerine etkisinin araştırılması. Hayvancılık Araştırma Dergisi, 2001; 11(2): 51-55.

Alaçam E. İnekte İnfertilite Sorunu. In: Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Beşinci Baskı. Eds: Alaçam E, 5. Ankara: Medisan Yayınları, 2005; 267-90.

Ali F, Lodhi LA, Hussain R, Sufyan M. Oxidative status and some serum macrominerals during estrus, anestrous and repeat breeding in Cholistani cattle. Pak Vet J, 2014; 34(4): 532-534.

Altıner A, Atalay H, Bilal T. Serbest Radikaller ve Stres ile İlişkisi. Balıkesir Sağ Bil Derg, 2018; 7(1):51-55.

Ashworth C, Antipatis C. Micronutrient programming of development throughout gestation. Reproduction, 2001; 122(4): 527-535.

Aurousseau B, Gruffat D, Durand D. Gestation linked radical oxygen species fluxes and vitamins and trace mineral deficiencies in the ruminant. Reproduc Nutr & Develop, 2006; 46(6): 601-620.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehydeand 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev, 2014; 2014: 360438.

Aydemir B, Karadağ Sarı E. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. Kocatepe Vet J, 2009; 2(2): 56-60.

Bahorun T, Soobrarree MA, Luximon-Ramma V, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. Internet J Med Update, 2006; 1(2): 1-17.

Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. J Soc Gynecol Investig, 2001; 8(1): S40-S42.

Biswas S, Chida AS, Rahman I. Redox modifications of protein-thiols: Emerging roles in cell signaling. Biochem Pharmacol, 2006; 71(5): 551-564.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative Stress. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011; 25(3): 287-299.

Celi P, Gabai G. Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation. Front Vet Sci, 2015; 2(48): 1-13.

Celi P, Merlo M, Barbato O, Gabai G. Relationship between oxidative stress and the success of artificial insemination in dairy cows in a pasture-based system. Vet J, 2012; 193(2): 498-502.

Celi P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine, Immunopharmacol Immunotoxicol, 2011; 33(2): 233-240.

Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen, I. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin-the antioxidant proteins. Life Sci, 2004; 75(21): 2539-2549.

Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull, 1993: 49(3): 481-493.

Ciani F, Cocchia N, d'Angelo D, Tafuri S. Influence of ROS on Ovarian Functions. In: Wu B (Ed). New Discoveries in Embryology**,** Intech Open Science (ISBN 978-1-78985-306-3), 2015; 3:41-73.

Circu ML., AW TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. Free Radic Biol Med. 2010; 48(6): 749-762.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. Faseb J, 2003; 17(10): 1195-1214.

Çakıcı Y, Aköz M. An important problem in dairy cows: repeat breeder. Int J Scien Tech Res, 2017; 3(3): 1-7.

Çamkerten İ, Çamkerten G, Erdogan H, Ayan A, Erdogan S, Ural K. Serum thiol disulphide levels among sheep with sarcoptic mange. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 2019; 25(6): 865-868.

Çelik N. Thiol /disulfide homeostasis in patients with chronic hepatitis B. Ortadoğu Tıp Derg, 2020; 12(2): 279-287.

Deveci MZY, Erdal H. Determination of dynamic thiol-disulfide levels in dairy cattle with foot disease. Vet Arhiv, 2022; 92(6): 657-666.

Donovan GA, Dohoo IR, Montgomery DM, Bennett FL. Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida, USA. Prev Vet Med, 1998; 33(1-4): 1-10.

Duarte TL, Lunec J. When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. Free Radic Res, 2005; 39(7): 671-686.

Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Afyon. 2000; 1-107.

Ebaid H, Bashandy SAE, Alhazza IM, Rady A, El-Shehry S. Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachlorideinduced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. Nutr Metab (Lond), 2013; 10(1): 1-10.

El-Amrawi G, El-Karim DG, El-Sayed Y. Antioxidant/oxidant status, metabolic profile status and concentration of some inflammatory cytokines in egyptian buffalo-cows suffered from ovarian inactivity. Buffalo Bulletin, 2021; 40(4): 39-45.

Emre B, Korkmaz Ö, Koyuncu İ, Çomaklı S, Akçay A, Zonturlu AK, Erer Ö. Determination of thiol/disulphide homeostasis as a new indicator of oxidative stress in dairy cows with subclinical endometritis. Vet Arhiv, 2021; 91(2): 137-148.

Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. Clin Biochem, 2014; 47(18): 326-332.

Ergin M, Cendek BD, Neselioglu S, Avsar AF, Erel O. Dynamic thiol-disulfide homeostasis in hyperemesis gravidarum. J Perinatol, 2015; 35(10): 788-792.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutr, 2002; 18(10): 872-879.

Fialovà L, Malbohan I, Kalousova M, Soukupova J, Krofta L, Štipek S, Zima T. Oxidative stress and inflammation in pregnancy. Scand J Clin Lab Invest, 2006; 66(2): 121-128.

Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. Am J Respir Crit Care Med, 2002; 166(12 Pt 2): 4-8.

Fujii J., Iuchi Y., Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system, Rep Biol Endocrin, 2005, 3:43.

Genestra M Oxyl radicals, redox-sensetive signaling cascades and antioxidants. Cell Signal, 2007; 19(9): 1807-1819.

Go Y-M, Jones DP. Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. Free Radic Biol Med, 2011; 50(4): 495-509.

Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod

Update, 2001; 7(2): 175-189.

Gupta S, Choi A, Hope YY, Czerniak SM, Holick EA, Paolella LJ, Agarwal A, Combelles CM. Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. Reprod Fert Develop, 2011; 23(5): 673-680.

Gutteridge JM, Paterson SK, Segal AW, Halliwell B. Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. Biochem J, 1981; 199 (1): 259-261.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem, 1995; 41(12 Pt 2):1819-1828.

Güvenç M, Cellat M, Ürer Koldaş E, Gökçek İ. Repeat breeder ineklerde oksidatif stres ve çeşitli biyokimyasal parametreler. FÜ Sağ Bil Vet Derg, 2017; 31(3): 243-247.

Hajhashemi V, Vaseghi G, Pourfarzam M, Abdollahi A. Are antioxidants helpful for disease prevention? Res Pharm Sci, 2010; 5(1): 1-8.

Halliwell B. Reactive oxygen species in living sistems: source, biochemistry and role in human disease. Am J Med, 1991; 91(3C): 14S-22S.

Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. Am J Reprod Immunol, 2004; 51(4): 294-301.

Hayes J, Flanagan J, Jowsey I. Glutathione transferases. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005; 45: 51-88.

Hejel P, Sáfár J, Bognár B, Kiss L, Jurkovich V, Brydl E, Könyves L. The impact of the oxidative status on the reproduction of cows and the calves' health. Acta Vet Brno, 2021; 90(1): 3-13.

Hu JJ, Dubin N, Kurland D, Ma BL, Roush GC. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. Mutat Res, 1995; 336(2): 193-201.

Hussein HK, Elnaggar MH, Al-Zahrani NK. Antioxidant role of folic acid against reproductive toxicity of cyhalothrin in male mice. Glo Adv Res J Environ Sci Toxicol, 2012; 1(4): 66-71.

Jensen KS, Hansen RE, Winther JR. Kinetic and thermodynamic aspects of cellular thiol–disulfide redox regulation. Antioxid Redox Signal, 2009; 11(5): 1047-1058.

Jinno M, Tamura H, Yonei Y. Anti-Aging Medicine and Reproductive Health. Anti-Aging Medicine, 2012; 9(1): 6-13.

Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol Aspects Med, 2005; 26(4-5): 340-352.

Jones DP, Liang, Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. Free Radic Biol Med, 2009; 47(10): 1329-1338.

Kabel AM. Free radicals and antioxidants: Role of enzymes and nutrition. J Nutr Health, 2014; 2(3): 35-38.

Karabulut H, Gülay MŞ. "Serbest radikaller." MAKÜ Sag Bil Enst Derg, 2016; 4(1): 50-59.

Kayseri Yerel Strateji Belgesi ve Eylem Planı. TC. Kayseri Valiliği Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 21.06.2017; 15: 1-190.

Konukoğlu D. Serbest radikaller ve önemleri. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi, 2007; 1(4): 197-200.

Kumar AK, Dangi SS, Mahla AS, Rajoriya JS, Purohit GN. Role of nitric oxide in animal reproduction. Theriogenology Insight, 2012; 2: 137-44.

Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. Vet J, 2007; 173(3): 502-511.

Matteucci E, Giampietro O. Thiol signalling network with an eye to diabetes. Molecules, 2010; 15(12): 8890-8903.

Milletli-Sezgin F, Nar R, Hızmalı L. Evaluation of thiol-disulphide homeostasis in patients with chronic hepatitis B. Ortadoğu Tıp Dergisi, 2019; 11(4): 396-403.

Moilanen E, Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. Ann Med, 1995; 27(3): 359-367.

Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. Biochem J, 2000; 346(Pt 1): 1-8.

Ness RB. The consequences for human reproduction of a robust inflammatory response. Q Rev Biol, 2004: 79(4): 383-393.

Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med, 2001; 31(11): 1287-1312.

Norman JE, Thompson AJ, Telfer JF, Young A, Greer IA, Cameron IT. Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy. Mo Hum Reprod, 1999; 5(2): 175-181.

Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi C Extracellular superoxide dismutase. Int J Biochem Cell Biol, 2005; 37(12): 2466-7241.

O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. Theriogenology, 1999; 52(2): 289-301.

Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. J Clin Exp Invest, 2015; 6(3): 331-336.

Pascottini, OB., Hostens M., Opsomer G. Cytological endometritis diagnosed at artificial insemination in repeat breeder dairy cows. Reprod Dom Anim, 2018; 53:559-561.

Perumal P, Chaurasia D, De AK, Bhattacharya D, Bhowmick S, Kundu A, Mishra PC. Heamatological parameters, endocrinological profiles, antioxidant and oxidative stress profiles of repeat breeding crossbred cows in Andaman and Nicobar Islands. Indian J Anim Sci, 2021: 91(8): 670-674.

Prabhu A, Sarcar B, Kahali S, Yuan Z, Johnson JJ, Adam KP, Kensicki E, Chinnaiyan P. Cysteine catabolism: a novel metabolic pathway contributing to glioblastoma growth. Cancer Res, 2014; 74(3): 787-796.

Rautela R., Katiyar R., Deori S., Singh M. Does Oxidative Stress Impact Bovine Reproductive Disorders? The Indian Journal of Animal Reproduction, 2021; 42(2): 1-7.

Rizzo A, Minoia G, Trisolini C, Manca R, Sciorsci RL. Concentrations of free radicals and beta-endorphins in repeat breeder cows. Anim Reprod Sci, 2007; 100(3-4): 257-263.

Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. Hum Reprod, 1995; 10(7): 1786-1790.

Rosselli M, Dubey RK, Rosselli MA, Macas E, Fink D, Lauper U, Keller PJ. Imthurn B. Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. Mol Hum Reprod, 1996; 2(8): 607-612.

Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. Hum Reprod Update, 1998; 4(1): 3-24.

Saraswat CS., Purohit, GN. Repeat breeding: Incidence, risk factors and diagnosis in buffaloes. APJR, 2016; 5(2): 87-95.

Sarıbay MK, Köse AM, Yılmaz MA. Repeat Breeder İneklerin Tedavisinde GnRH ve Gonadotropinlerin (LH, hCG, PMSG) kullanımı. Lalahan Hay Araşt Enst Derg, 2018; 58(1): 34-41.

Sawada M, Carlson JC. Studies on the mechanism controlling generation of superoxide radical in luteinized rat ovaries during regression. Endocrinology, 1994; 135(4): 1645-1650.

Sen CK, Khanna S, Roy S, Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. Life Sci, 2006; 78(18): 2088-2098.

Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. In: Andreescu S., Hepel M.(Eds): Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy.. American Chemical Society, Washington, DC, 2011; Chapter 1: 1-37.

Sengoku K, Tamate K, Yoshida T, Takaoka Y, Miyamot T, Ishikawa M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. Fertil Steril, 1998; 69(3): 522-527.

Sezer K, Keskin M. Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. FÜ Sağ Bil Vet Derg, 2014; 28(1): 49-56.

Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. Antioxid Redox Signal, 2004; 6(2): 289-300.

Siddique RA, Chaudhary S, Kelawala NH, Bharti MK, Khan MA, Garg A. Oxidative

Soni YK, Mehrotra S, Singh G, Das GK, Kumar A, Awase M, Gahlot M. Oxidative stress and progesterone profile in repeat breeding cows. Vet Pract, 2014; 15(2): 213-214.

Stabel JR, Spears JW, Brown Jr TT, Brake J. Selenium effects on glutathione peroxidase and the immune response of stressed calves challenged with Pasteurella hemolytica. J Anim Sci, 1989; 67(2): 557-564.

stress profiling in repeat breeder surti buffalo. The Pharma Innovation Journal, 2021; 10(4): 309-313.

Sugino N. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. Anim Sci J, 2006; 77(6): 556-565.

Sultana J, Khan SA, Pasha MDR, Imtiaz MA, Saif A, Nova FK, Shaikat AH. Alteration of Physiologıcal Parameters in Repeat Breeder Cows. AJOAIR, 2022; 15(2): 1-5.

Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schulte RM, Okano A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. Theriogenology, 2000; 54(1): 137-145.

Talukder S, Ingeenhoff L, Kerrisk KL, Celi P. Plasma oxidative stress biomarkers and progesterone profiles in a dairy cow diagnosed with an ovarian follicular cyst. Vet Q, 2014; 34(2): 113-117.

Talukder S, Kerrisk KL, Gabai G, Celi P. Role of oxidant–antioxidant balance in reproduction of domestic animals. Anim Produc Sci,, 2017; 57: 1588-1597.

Taşal İ, Kocamüftüoğlu M, Çortu A. Döl Tutmama Sorunu ve Çözümleri. In: Ağaoğlu AR (Ed.), "Büyükbaş Hayvanlarda Döl Verimi". MAKÜ Yetiştiricinin El Kitabı. MAKÜ Kurumsal İletişim Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2019; 42-47.

Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest Jr JJ, Nassar BA. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. J Am Coll Cardiol, 2000; 36(3): 758-765.

Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. Free Radic Bio Med, 2013; 65: 244-253.

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

Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem, 2005; 12(10): 1161-1208.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr, 2004; 134(3): 489-492.

Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chem Rev, 2011; 111(10): 5944-5972.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med, 2002; 33(3): 337-349.

EKLER

ETİK KURUL SAYFASININ PDF HALİ

Tarih: 04.01.2023 **Toplantı Sayısı: 01** **Karar No:23/001**

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 04.01.2023 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Nurcan DURSUN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültes
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Selma BÜYÜKKILIÇ BEYZİ	Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU AKIN	Doç. Dr.	Sağlık Bilimleri Fakülte
Ali İlteriş AYKUN	Arş. Gör.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERİ
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Filiz ASAN	Avukat	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Bölümü'nden **Prof.Dr.Meryem EREN** tarafından sunulan **"Döl Tutmayan (Repeat Breeder) İneklerde Oksidan-Antioksidan Durum"** başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : **04.01.2023**

Etik Kurul Başkanı : **Prof. Dr. Gültekin ATALAN**

İmza :

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

(Bu form çalışmada kullanılacak olan hayvanın sahibine işlem öncesinde imzalatılarak hayvanlarla ilgili çalışma sürecinin bitimini takiben, Çalışma Süreç Bildirim Formu ile birlikte ERÜ-HADYEK sekreterliğine teslim edilecektir)

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞINA

ERÜ-HADYEK ONAYI	Onay No:	Tarihi:
Araştırmanın Adı: Döl Tutmayan (Repeat Breeder) İneklerde Oksidan-Antioksidan Durum		
Araştırmanın Yürütücüsü (Unvanı, Adı Soyadı ve Çalıştığı Kurum) Prof. Dr. Meryem EREN Erciyes Üniv. Veteriner Fak. Biyokimya AD. Melikgazi- Kayseri		
Telefon: 2076666/29850	GSM: 5346622468	E-Posta: meren@erciyes.edu.tr

Araştırmada Kullanılacak Hayvanın				
Türü: Sığır	Irkı: Holstein	Cinsiyeti: Dişi	Yaşı:3-9	Sayısı: 68

Araştırmanın amacı: Süt sığırcılığında verim düşüklüğünün nedenlerinden biri de döl tutmayan (repeat breeder) inekler oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda repeat breeder ineklerin oksidatif stres düzeylerinin yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Serbest radikallerin aşırı üretilmesi hücrelerin normal işlevlerini ve metabolik faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu çalışmada repeat breeder ineklerde oksidan ve antioksidan durum değerlendirmesi yapılması amaçlanmıştır.

Araştırmanın önemi: Serbest radikallerin aşırı üretilmesi hücrelerin normal işlevlerini ve metabolik faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu çalışmada repeat breeder ineklerde oksidan ve antioksidan durum değerlendirecek, bu amaçla 10 yaşından küçük, 3 veya daha fazla tohumlanıp gebe kalamayan ve kalan olmak üzere toplam 68 adet Holstein ırkı inekten kan alınacak, elde edilen plazmalarda total oksidan kapasite (TOK), total antioksidan kapasite (TAK), total ve native tiyol (TT ve NT) düzeyleri ile birlikte malondialdehit (MDA) konsantrasyonları ve süperoksid dismutaz (SOD) enzim aktivitelerindeki olası değişiklikler belirlenecektir. Tiyol grupları antioksidan olarak, reaktif oksijen türlerinin yok edilmesine katılır ve disülfit bağları oluşturarak oksidatif moleküller içinde oksidatif reaksiyonda kullanılır. Tiyol ve disülfit oranının belirlenmesi biyolojik sistemlerdeki ekzojen ve endojen kaynaklı oksidatif stres durumu hakkında bilgi verebilmektedir. Repeat breeder ineklerde total ve native tiyol durumlarını değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu çalışmada elde edilecek veriler kapsamında, repeat breeder ineklerde sözkonusu oksidatif stres parametrelerinin belirlenmesi ve değerlendirmesi ile elde edilen sonuçlar çiftlik sahipleri ve ilgili veteriner hekimler yanında, bu konu ile ilgili ileride çalışma yapacak olan araştırmacılara da katkı sağlayabilecektir.

Hayvan üzerinde yapılacak olan işlem: Herhangi bir anestezik madde kullanılmadan jugular venden; serum için antikoagulantsız, plazma için antikoagulantlı (Li-Heparin) tüplere toplamda 10 ml kan alınacaktır.

Yapılacak işlemin taşıdığı risk(ler): Risk yoktur.

Yukarıda kısaca anlatılan klinik araştırmada kullanılmak üzere, hayvan(lar)ım ile ilgili yapılacak işlemleri ve sonuçlarını kendi rızamla kabul ettiğimi beyan ederim. (Tarih: .../..../.....)

Hayvan Sahibinin,

Adresi:

Telefonu:

(Ad - Sovad. İmza)

KURMEL
TARIM VE HAYVANCILIK A.Ş.
DEVELİ/KAYSERİ
V.D.: BEYKOZ - V.NO: 5930964463

TURNİTİN RAPORU

Döl Tutmayan İneklerde Oksidan/Antioksidan Durum

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%10	%2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
2	9lib.net İnternet Kaynağı	%2
3	acikerisim.aksaray.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
5	iksadyayinevi.com İnternet Kaynağı	<%1
6	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	GAZİOĞLU, Abdullah and GÜVENÇ, Mehmet. "Leptospirozisli danalarda oksidatif stres ve bazı biyokimyasal parametreler", Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri, 2015. Yayın	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Salih ULUTAŞ

Uyruğu : Türkiye (TC)

EĞİTİM

DERECE	KURUM	MEZUNİYET
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokima Anabilimdalı	Devam ediyor
Lisans	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2012
Önlisans	Kafkas Üniversitesi Kars M.Y.O Hayvan Yetiştiriciliği ve Sağlığı	2005
Lise	Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesi	2000

İŞ DENEYİMLERİ

YIL	KURUM	GÖREV
2004-2008	Iğdır İl Tarım ve Orman Müd.	Veteriner Sağlık Teknisyeni
2008-2013	Şarkışla İlçe Tarım ve Orman Müd.	Veteriner Sağlık Teknisyeni
2013-2016	Şarkışla İlçe Tarım ve Orman Müd.	Veteriner Hekim
2016-	Develi İlçe Tarım ve Orman Müd.	Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngiliz