



T.C.  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences



**SIĞIRLARDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ  
GENİ POLİMORFİZMİ VE GEÇİŞ DÖNEMİ KOLİN VE  
METİYONİN İLAVESİNİN BAZI METABOLİK  
PARAMETRELER İLE SÜT VERİM ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**NAZLICAN DERE**

**Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı**  
Bilim Alan Kodu: 10102.02



**BALIKESİR**  
2025

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIRLARDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ  
GENİ POLİMORFİZMİ VE GEÇİŞ DÖNEMİ KOLİN VE  
METİYONİN İLAVESİNİN BAZI METABOLİK  
PARAMETRELER İLE SÜT VERİM ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**NAZLICAN DERE**

**TEZ DANIŞMANI**

**DOÇ. DR. MURAD GÜRSES**

**Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı**

**Bilim Alan Kodu: 10102.02**

**Proje No: 2024/059 - Balıkesir Üniversitesi BAP**

**BALIKESİR**

**2025**



T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ KABUL VE ONAY

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Doktora Programı  
Çerçevesinde **Nazlıcan DERE** tarafından yürütülmüş ve tamamlanmış olan

**“Sığırlarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni Polimorfizmi ve  
Geçiş Dönemi Kolin ve Metiyonin İlavasının Bazı Metabolik Parametreler ile  
Süt Verim Özellikleri Üzerine Etkisi”**

başlıklı tez çalışması,  
Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından  
**DOKTORA TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Tarihi:** 17 /06/ 2025

**TEZ SINAV JÜRİSİ**

Prof. Dr. Erdoğan UZLU  
Balıkesir Üniversitesi  
**(Başkan)**

Prof. Dr. Tanay BİLAL  
İstanbul Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Ergün DEMİR  
Balıkesir Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ  
Fırat Üniversitesi  
Üye

Doç. Dr. Murad GÜRSES  
Balıkesir Üniversitesi  
**(Danışman)**

Yukarıdaki Doktora,  
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 17 /07 /2025 tarihinde teslim  
edilmiştir.

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI  
Enstitü Müdürü

## BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıpları kabullendiğimi **beyan ederim.**

**17/07/2025**

**İmza**

**Nazlıcan DERE**

## İTHAF

Kalbindeki *Duru*'luğu Kaybetmeyenlere...

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgisi, tecrübesi ve yol göstericiliğiyle bana her zaman destek olan; sabrını, emeğini ve kıymetli vaktini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Murad GÜRSES'e,

Doktora eğitimimin ilk gününden itibaren bilgi birikimleri, rehberlikleri ve destekleriyle akademik gelişimime önemli katkılarda bulunan Anabilim Dalı hocalarım Sayın Prof. Dr. Ergün DEMİR, Sayın Prof. Dr. Rahim AYDIN ve merhum Sayın Doç. Dr. Hasan ATALAY'a,

Tez izleme komitemizde bulunan, kıymetli zamanını ayırarak görüşleriyle çalışmamıza önemli katkılar sağlayan Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Erdoğan UZLU'ya,

Tez çalışmam boyunca sorularıma içtenlikle cevap veren Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Zeynep KARAPINAR, Sayın Prof. Dr. Uğur AYDOĞDU ve Doç. Dr. Büşra YARANOĞLU'na,

Bu tez çalışmasının yürütülmesine maddi destek sağlayarak sürecin başarıyla tamamlanmasına katkıda bulunan Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne ve YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında aldığım bursa destek sağlayan YÖK'e ve katkıda bulunan tüm akademik paydaşlara,

İlgi alanımı keşfetmemde beni cesaretlendiren, koşulsuz destekleyen ve her zaman yanımda duran kıymetli annem Ayfer ÇOBAN, canımın içi babam Hüseyin ÇOBAN ve hem ilk rakibim hem yoldaşım olan biricik ikizim Bedirhan ÇOBAN'a,

Sevgi, sabır ve anlayışla bu yolculuğu daha da kolaylaştıran değerli kayınpederim Serkan DERE, kayıinvalidem Ülkü DERE ve kız kardeşim Senem DERE'ye ve sevgilerini her daim kalbimde hissettiğim canım akrabalarım,

Akademik yolculuğum boyunca beni her daim yüreklendiren ve her zaman yardımına koşan değerli meslektaşım Veteriner Hekim Aybüke ÖZTÜRK TOKLU olmak üzere bana benden çok güvenen arkadaşlarıma,

Bu çalışmanın yürütülmesi sürecinde anlayış ve destekleriyle süreci kolaylaştıran, iş birliğini esirgemeyen tüm işletmelere ve çalışanlarına,

Her anımda olduğu gibi doktora yolculuğumda da yanımda olarak beni cesaretlendiren, varlığıyla bana güç veren hem kola sponsorum, hem moral koçum, hem de sabır taşıyan hayat arkadaşım ve değerli meslektaşım Veteriner Hekim Ahmetcan DERE'ye,

Doktora tezimin son düzlüğüne girerken sahneye hızlı bir giriş yapan, hem hamilelikte hem de doğum sonrası dönemde sabrıyla, neşesiyle bana yoldaşlık eden hayatımın en değerlisi kızım Duru DERE'ye,

Bu çalışmayı mümkün kıldıkları için gönülden teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Süt Sığırlarında Geçiş Döneminde Gözlenen Değişimler .....	4
2.2. Geçiş Dönemi Metabolik Hastalıkları .....	7
2.2.1. Ketozis.....	7
2.2.2. Hipokalsemi.....	9
2.2.3. Asidoz.....	11
2.2.4. Karaciğer Yağlanması .....	12
2.3. Kolin .....	14
2.4.Metiyonin.....	16
2.5. Korunmuş Kolin ve Metiyoninin Geçiş Döneminde Kullanımı .....	21
2.6. Homosistein .....	24
2.7. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz .....	33
2.8. Folat ve Kobalamin Metabolizmasının Sığır Sağlığı ve Verimliliği Üzerindeki Kritik Rolü .....	36
2.8.1. B <sub>12</sub> Vitamini (Kobalamin) .....	38

2.8.2. Folik Asit .....	39
2.9. Esterleşmemiş Yağ Asitleri ve Beta Hidroksi Bütirik Asit .....	41
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>43</b>
3.1. Polimorfizmlerin Belirlenmesinde Kullanılan Malzemeler .....	43
3.2. Hayvan Materyali ve Örnek Toplama .....	44
3.3. Deneme Düzeni .....	45
3.4. DNA İzolasyonu.....	48
3.5. MTHFR Geni Analizi .....	49
3.6. PCR Analizi .....	50
3.7. Jel Elektroforezi .....	53
3.8. Genotiplerin Belirlenmesi.....	53
3.9. DNA Dizi Analizi.....	54
3.10. Biyokimyasal Analizler .....	54
3.11. Süt Verimi ve Üreme Performansı Kayıtlarının Temini.....	57
3.12. Veri Analizi.....	57
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>61</b>
4.1. Genotiplerin Belirlenmesi.....	61
4.2. DNA Dizi Analizi.....	63
4.3. Biyokimyasal Kan Parametreleri .....	63
4.4. Süt Verimi .....	75
4.5. Döl Verimi .....	76
4.6. Süt Sığırlarında Verim Kaybına Yol Açan Bazı Sağlık Problemleri .....	78
<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>80</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>89</b>

<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>92</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>107</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>108</b>
<b>EK 1. Etik Kurul İzin Belgesi 1.....</b>	<b>108</b>
<b>EK 2. Etik Kurul İzin Belgesi 2 .....</b>	<b>110</b>
<b>EK 3. BAP Proje Kabul Sözleşmesi.....</b>	<b>112</b>

## ÖZET

### SIĞIRLARDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GENİ POLİMORFİZMİ VE GEÇİŞ DÖNEMİ KOLİN VE METİYONİN İLAVESİNİN BAZI METABOLİK PARAMETRELER İLE SÜT VERİM ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Bu çalışma, Türkiye’de yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlarda metilentetrahidrofolat redüktaz geni rs110692574 polimorfizmi ile geçiş döneminde farklı oranlarda kolın ve metiyonin ilavesinin biyokimyasal parametreler, süt ve döl verim özellikleri ile bazı sağlık problemleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yürütülmüştür. Araştırmanın hayvan materyalini, Balıkesir ilinde özel işletmelerde yetiştirilen Holştayn ırkı inekler oluşturmuştur.

Bu çalışmanın ilk aşamasında, hayvanların metilentetrahidrofolat redüktaz geni rs110692574 polimorfizmi açısından genotipleri belirlenmiştir. Genotipleme işlemi, Tetra-primer ARMS-PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha düşük frekansa sahip T allelini taşıyan (CT genotipli) bireyler öncelikli olarak seçilerek toplam 80 baştan oluşan bir araştırma grubu oluşturulmuştur. Araştırma grubundaki hayvanlar, genotip (CC ve CT) ve yem katkı maddesi uygulamalarına (CH: kolın ve CH+MET: kolın + metiyonin) göre sınıflandırılarak dört gruba ayrılmıştır. Çalışmada, hayvanlardan buzağılamadan önceki 21. gün, buzağılama günü ve buzağılamadan sonraki 21. günde alınan kan örneklerinde homosistein, folik asit, vitamin B<sub>12</sub> ve NEFA düzeyleri analiz edilmiştir. Buzağılama sonrası BHBA düzeyleri ile doğum, laktasyon, süt verimi ve sağlık kayıtları dijital sürü yönetim sisteminden elde edilmiştir. Genotip ve yem katkı maddesi gruplarının biyokimyasal parametreler üzerindeki zamana bağlı etkileri tekrarlı ölçümler varyans analizi, farklı zaman noktalarındaki etkileri ise genel lineer model kullanılarak analiz edilmiştir.

Analizler sonucunda, Türkiye’deki Holştayn sığır popülasyonunda T alleli taşıyan hayvanların frekansı %12.64 olarak belirlenmiştir. Zaman × genotip etkileşiminin, geçiş döneminin farklı evrelerinde folik asit ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerindeki değişimler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu saptanmıştır (p<0.05). CC ve CT genotip grupları arasında, buzağılama öncesi dönemde (-21. gün) folik asit ve B<sub>12</sub>; buzağılama sonrası 7. günde ise BHBA düzeyleri açısından anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Benzer şekilde, CH ve CH+MET grupları arasında buzağılama günü (0. gün) ve buzağılama sonrası 21. günde folik asit düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmiştir. Ayrıca, yem katkısının 100, 200 ve 305 günlük süt verimi üzerinde anlamlı etkileri olduğu; rs110692574 polimorfizminin ise verim kaybına yol açabilecek bazı sağlık problemleriyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Bu bulgular, geçiş döneminde metabolik dengenin korunması ve verim özelliklerinin artırılması amacıyla, genotipe dayalı bireysel beslenme stratejilerinin geliştirilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

*Anahtar Kelimeler:* Beslenme genetiği, geçiş dönemi, Holştayn ırkı, Kolın, Metiyonin, MTHFR geni

## ABSTRACT

### METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE POLYMORPHISM AND THE EFFECT OF TRANSITION PERIOD CHOLINE AND METHIONINE SUPPLEMENTATION ON SOME METABOLIC PARAMETERS AND MILK YIELD CHARACTERISTICS IN COWS

This study investigated the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene (rs110692574) polymorphism, as well as the effects of different ratios of choline and methionine supplementation, on biochemical parameters, milk production, reproductive characteristics, and health problems in Holstein cattle raised in Türkiye during the transition period. The study's animal subjects were Holstein cows raised on private farms in the Balıkesir province.

In the initial phase of the present study, the genotypes of the subjects were ascertained with respect to the methylenetetrahydrofolate reductase gene rs110692574 polymorphism. The genotyping process was executed through the implementation of the Tetra-primer ARMS-PCR method. Individuals who carried the T allele at a lower frequency (CT genotype) were prioritized, and a research group consisting of 80 heads was formed. The animals in the research group were classified according to genotype (CC and CT) and feed additive treatments (CH: choline and CH+MET: choline + methionine) and divided into four groups. In the present study, a comprehensive analysis was conducted on the levels of homocysteine, folic acid, vitamin B12, and NEFA in blood samples extracted from animals on the 21st day prior to parturition, the day of parturition, and the 21st day thereafter. Post-calving BHBA levels and records pertaining to birth, lactation, milk yield, and health were obtained from the digital herd management system. The temporal effects of genotype and feed additive groups on biochemical parameters were analyzed using repeated measures analysis of variance, and the effects at different times were analyzed using the general linear model.

The frequency of animals carrying the T allele in the Holstein cattle population in Turkey was determined to be 12.64% as a result of the analysis. The interaction between time and genotype exhibited a statistically significant effect on the alterations in folic acid and vitamin B12 levels across the various stages of the transition period ( $p < 0.05$ ). A comparison of CC and CT genotype groups revealed substantial disparities in folic acid and vitamin B12 levels during the pre-calving period (day -21) and in BHBA levels on day 7 post-calving. In a similar vein, statistically significant disparities were identified between the CH and CH+MET groups with respect to folic acid levels on calving day (day 0) and post-calving day 21. Furthermore, it was elucidated that feed supplementation exerts a substantial influence on 100-, 200-, and 305-day milk yield. The rs110692574 polymorphism has been demonstrated to be associated with certain health concerns that could potentially result in yield reduction. These findings underscore the necessity of formulating customized nutritional strategies predicated on genotype, with the objective of preserving metabolic balance and enhancing yield characteristics during the transition period.

**Keywords:** Choline, Holstein breed, methionine, MTHFR gene, nutritional genetics, transition period.

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
µmol/L	: Mikromol/litre
ADF	: Acid Detergent Fiber (Asit Deterjan Lifi)
ADMA	: Asymmetric Dimethylarginine (Asimetrik Dimetil Arginin)
AMD	: Age-related Macular Degeneration (Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu)
BHBA	: Beta-Hidroksibütirik Asit
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BTA	: Bos Taurus Autosome (Bos Taurus Otozomu)
Ca	: Calcium (Kalsiyum)
CAP	: Caffeic Acid Phenethyl Ester (Kafeik Asit Fenetil Ester)
CAT	: Catalase (Katalaz)
CCl <sub>4</sub>	: Carbon Tetrachloride (Karbon Tetraklorür)
CH	: Choline Chloride (Kolin Klorit)
CH+MET	: Choline Chloride + Methionine (Kolin Klorit + Metiyonin)
DCAD	: Dietary Cation-Anion Difference (Diyet Katyon-Anyon Dengesi)
DDAH	: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (Dimetil Arginin Dimetilaminohidrolaz)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
eNOS	: Endothelial Nitric Oxide Synthase (Endotel Nitrik Oksit Sentaz)
FE	: Fosfatidil Etanolamin
GAA	: Guanidinoasetik Asit
GC-MS	: Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi)
GHR	: Growth Hormone Receptor (Büyüme Hormonu Reseptörü)

GSH	: Glutathione (Glutatyon)
GSH-Px	: Glutathione Peroxidase (Glutatyon Peroksidaz)
Hcy	: Homocysteine (Homosistein)
HDL	: High-Density Lipoprotein (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein)
HK	: Ham Kül
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
HT	: Hyperthyroidism (Hipertiroidizm)
HY	: Ham Yağ
IGF-1	: Insulin-like Growth Factor 1 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1)
IL	: Interleukin (İnterlökin)
KM	: Kuru Madde
LDL	: Low-Density Lipoprotein (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
LOK	: Lif Olmayan Karbonhidrat
MAS	: Marker-Assisted Selection (Markör Destekli Seleksiyon)
MDA	: Malondialdehit
mg/kg	: Miligram/kilogram
mM	: Milimolar
mmol/L	: Milimol/litre
MTHF	: 5-Metiltetrahidrofolat
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
MTR	: Metiyonin Sentaz
NAFLD	: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (Alkol Dışı Yağlı Karaciğer Hastalığı)
NDF	: Neutral Detergent Fiber (Nötr Deterjan Lifi)
NED	: Negatif Enerji Dengesi
NEFA	: Non-Esterified Fatty Acids (Esterleşmemiş Yağ Asitleri)
ng/mL	: Nanogram/mililitre

NO	: Nitrik Oksit
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit Anyonu
P	: Phosphorus (Fosfor)
PC	: Phosphatidylcholine (Fosfatidilkolin)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PCR-SSCP	: Polymerase Chain Reaction - Single-Strand Conformation Polymorphism (Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Tek Sarmallı Konformasyon Polimorfizmi)
PE	: Preeklampsi
PEMT	: Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase (Fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaz)
RPC	: Rumen-Protected Choline (Rumen Korumalı Kolin)
RPM	: Rumen-Protected Methionine (Rumen Korumalı Metiyonin)
SAH	: S-Adenozilhomosistein
SAM	: S-Adenosilmetiyonin
SH	: Sülfhidril
SIRS	: Systemic Inflammatory Response Syndrome (Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu)
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotit Polimorfizmi)
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SST	: Serum Separator Tube (Serum Ayırıcı (Sarı Kapaklı Jelli) Tüp)
TAG	: Triasilgliserol
Tetra-primer ARMS-PCR	: Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction (Dört Primerli Amplifikasyon Dirençli Mutasyon Sistemi – Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
THF	: Tetrahidrofolat
TNF $\alpha$	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
VKS	: Vücut Kondisyon Skoru
VLDL	: Very Low-Density Lipoprotein (Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Homosistein Metabolizması.....	25
Şekil 2.2. Vitamin B <sub>12</sub> 'nin Yapısı.....	39
Şekil 2.3. Folik Asidin Yapısı.....	40
Şekil 3.1. Standartların Seyreltilmesi.....	54
Şekil 3.2. ELISA Aşamaları.....	55
Şekil 4.1. PCR Ürünlerinin % 1.5 Agaroz Jel Elektroforezinde Görünümü.....	60
Şekil 4.2. DNA Dizi Analizi Sonucu Elektroferogram Görüntüleri .....	62
Şekil 4.3. Farklı Genotiplere Göre Zaman İçinde Homosistein Seviyelerinin Değişimi.....	64
Şekil 4.4. Farklı Genotiplere Göre Zaman İçinde Folik Asit Seviyelerinin Değişimi.....	65
Şekil 4.5. Farklı Genotiplere Göre Zaman İçinde Vitamin B <sub>12</sub> Seviyelerinin Değişimi.....	65
Şekil 4.6. Farklı Genotiplere Göre Zaman İçinde NEFA Seviyelerinin Değişimi.....	66
Şekil 4.7. Farklı Genotiplere Göre Zaman İçinde BHBA Seviyelerinin Değişimi.....	67
Şekil 4.8. Farklı Yem Katkı Maddelerine Göre Zaman İçinde Homosistein Seviyelerinin Değişimi.....	69
Şekil 4.9. Farklı Yem Katkı Maddelerine Göre Zaman İçinde Folik Asit Seviyelerinin Değişimi.....	69
Şekil 4.10. Farklı Yem Katkı Maddelerine Göre Zaman İçinde Vitamin B <sub>12</sub> Seviyelerinin Değişimi.....	70
Şekil 4.11. Farklı Yem Katkı Maddelerine Göre Zaman İçinde NEFA Seviyelerinin Değişimi.....	70
Şekil 4.12. Farklı Yem Katkı Maddelerine Göre Zaman İçinde BHBA Seviyelerinin Değişimi.....	71
Şekil 4.13. Verim Kaybına Yol Açan Bazı Sağlık Problemleri Genotip Gruplarına Göre Dağılımı.....	78

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

<b>Tablo 2.1.</b> Süt Sığırlarında Laktasyon Döneminde Metabolik ve Fizyolojik Süreçlerdeki Değişimler .....	6
<b>Tablo 2.2.</b> Hayvan Türlerine Göre Homosistein Düzeyleri.....	31
<b>Tablo 3.1.</b> CH ve CH+MET Gruplarında Kullanılan Rasyonların Besin Madde İçerikleri.....	46
<b>Tablo 3.2.</b> CH ve CH+MET Gruplarında Kullanılan Rasyonların Hammadde İçerikleri.....	47
<b>Tablo 3.3.</b> Tetra-ARMS Primerler ve Nükleotid Dizileri.....	50
<b>Tablo 3.4.</b> PCR Bileşenleri ve Termal Döngü Koşulları .....	50
<b>Tablo 3.5.</b> PCR Analizinde Kullanılan Primerlerin Nükleotid Dizileri.....	52
<b>Tablo 4.1.</b> MTHFR Geni rs110692574 Polimorfizmine Ait genotip ve Alel Frekansları ile Heterozigotluk Oranı .....	61
<b>Tablo 4.2.</b> Zaman × Genotip Etkileşiminin Geçiş Döneminde Biyokimyasal Kan Parametreleri Düzeylerindeki Değişim Üzerine Etkileri .....	63
<b>Tablo 4.3.</b> Zaman × Yem Katkı Maddesi Etkileşiminin Geçiş Döneminde Biyokimyasal Kan Parametreleri Düzeylerindeki Değişim Üzerine Etkileri .....	68
<b>Tablo 4.4.</b> Genotip ve Yem Katkı Maddesi Gruplarının Geçiş Dönemde Biyokimyasal Kan Parametreleri Üzerine Etkileri .....	72
<b>Tablo 4.5.</b> Genotip ve Yem Katkı Maddesi Gruplarının Geçiş Döneminde NEFA ve BHBA Düzeyleri Üzerine Etkileri .....	73
<b>Tablo 4.6.</b> Genotip ve Yem Katkı Maddesi Gruplarının 100, 200 ve 305 Günlük Süt Verimi Üzerine Etkileri .....	74
<b>Tablo 4.7.</b> Genotip ve Yem Katkı Maddesi Gruplarının Gebelik Başına Tohumlama Sayısı Üzerine Etkileri .....	75
<b>Tablo 4.8.</b> Genotip ve Yem Katkı Maddesi Gruplarının İlkine Buzağılama Yaşı ve Buzağılama Aralığı Üzerine Etkileri .....	76
<b>Tablo 4.9.</b> Verim Kaybına Yol Açan Bazı Sağlık Problemlerinin MTHFR Genotipleri ile İlişkisi .....	77

## 1.GİRİŞ

2024 yılı verilerine göre, Türkiye’de çiğ süt üretimi yaklaşık 22,5 milyon tona ulaşmış ve bir önceki yıla göre %4,7 oranında artış göstermiştir. Aynı dönemde, büyükbaş hayvan sayısı %2,4 artarak 16 milyon 986 bine ulaşmıştır. Bu gelişmeler, ülkemizde süt üretimi ve süt sığırcılığı varlığında istikrarlı bir artışın devam ettiğini göstermektedir (Türkiye İstatistik Kurumu, 2024). Son yıllarda Türkiye’de modern süt sığırcılığı işletmelerinin sayısındaki artış, genetik, beslenme, sağlık ve sürü yönetimi alanlarındaki bilimsel gelişmelerin işletmelere entegrasyonu ile hız kazanmıştır (Çetin, 2017). Bu gelişmeler, süt üretimindeki artışı desteklerken, inek başına laktasyon süt veriminin yükselmesi, peripartum hastalıklar ve infertilite gibi sağlık sorunlarının da artmasına yol açmaktadır (Hayırlı ve ark., 2012; LeBlanc ve ark., 2006; Olson, 1992).

Süt, insan beslenmesinde önemli bir yer tutarken, artan süt tüketimiyle birlikte süt üretimi ve ticareti de büyümektedir. Süt sığırcılığı işletmelerinin karlılığı, yüksek verim ve kaliteli süt üretimine dayanır (Tekeli, 2005). Yüksek verimli hayvanlardan istenilen verimi elde edebilmek için rasyonel besleme gereklidir. Kaliteli kaba ve kesif yemlerin kullanımı ve uygun barınma koşulları, karlı hayvancılığın temel unsurlarındandır (Kutlu ve ark., 2003). Ancak, yemleme maliyetleri işletme giderlerinin %60-70’ini oluşturmasına rağmen, doğru besleme uygulamaları her zaman yeterli olmayabilir (Koç, 2023).

Hayvansal ürünler, insanların temel besin maddelerinin önemli bir kısmını oluşturmakta olup, sağlıklı beslenme için günlük protein ihtiyacının büyük bir kısmının bu kaynaklardan karşılanması gerekmektedir (Arık, 2012). Artan nüfus ve talep, hayvansal ürünlerin kalitesini ve miktarını karşılamak amacıyla yeni üretim yaklaşımlarını zorunlu kılmaktadır. Hayvancılıktaki verimliliği artırmak için genetik seleksiyon çalışmalarında moleküler genetik teknolojileri kullanılmaktadır. Marker Destekli Seleksiyon (MAS) gibi yöntemler, genetik ilerlemeyi hızlandırmaktadır (Doğrul, 1985; Öner ve Elmacı, 2007). Genetik seleksiyonlarla hayvanların süt ve et

verimlerinin artması sağlanırken, bakım ve besleme koşullarının da bu gelişmelerle uyumlu olması gerekmektedir (Kovanlıkaya, 2023). Beslenme faktörlerinin gen ifadesi üzerindeki etkisi de hayvanların üreme, büyüme ve verim düzeylerini etkileyebilmektedir (Clarke ve Abraham, 1992). Nutrigenetik ve nutrigenomik alanları, diyetin gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini inceleyerek önemli moleküler mekanizmaları ortaya koymaktadır (Gillies, 2003; Hasan ve ark., 2019). Ayrıca, besin maddelerinin gen ifadesini değiştirebileceği ve kronik hastalıkların önlenmesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (German ve ark., 2003; Jansman ve Pas, 2015; Kore ve ark., 2008). Nutrigenomik bilimi, hayvancılıkta daha verimli dönüşümler sağlamak için genetik profil ve beslenme arasındaki boşluğu doldurabilir (Akanbi ve ark., 2019).

Süt verimindeki artış, aynı zamanda hayvanların metabolik hastalıklara karşı duyarlılığını artırmaktadır (Oltenucu ve Algers, 2005). Özellikle geçiş döneminde, hormonal ve metabolik değişikliklere uyum sağlayamayan süt sığırlarının büyük bir kısmı hastalanarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Drackley, 1999; Gressley, 2008; Van Saun, 2016).

Tüm bu gelişmeler, Türkiye'deki modern süt sığırcılığı işletmelerinde verimliliği artırmak ve hayvan sağlığını korumak için genetik, beslenme ve sağlık alanlarındaki güncel bilimsel bilgilerin takip edilip uygulanmasını daha da önemli kılmaktadır.

MTHFR enzimi, tek karbon metabolizmasında kritik bir rol oynar ve folat ile homosistein düzeylerini etkileyerek, yüksek verimli süt sığırlarında metabolik stresin göstergelerinin belirlenmesinde önemli bir biyobelirteç olarak değerlendirilir (Chmurzynska ve ark., 2020). Metil verici besin öğeleri olan kolin ve metiyonin, MTHFR enziminin aktivitesi ile etkileşime girerek, geçiş döneminde görülen negatif enerji dengesiyle ilişkili metabolik bozuklukların hafifletilmesinde potansiyel rol oynayabilir (Finkelstein, 1990; Overton ve Waldron, 2004). Bu nedenle, geçiş dönemindeki süt sığırlarında hem MTHFR genindeki polimorfizmin hem de bu dönemde önem taşıyan kolin ve metiyonin katkılarının söz konusu polimorfizm üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

Bu alışmada, MTHFR geni polimorfizminin moleküler yöntemlerle tespiti, Balıkesir ilinde yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlarında söz konusu polimorfizmin mevcut durumu hakkında bilgi edinilmesi, bu genetik varyasyonların bazı metabolik parametreler ile süt verim özelliklerine olan etkilerinin değerlendirilmesi ve elde edilen bulgular doğrultusunda geçiş dönemindeki süt sğırları için beslenme stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Süt Sığırlarında Geçiş Döneminde Gözlenen Değişimler

Süt sığırlarında buzağılamadan yaklaşık üç hafta öncesi ile buzağılamayı izleyen üç ila dört haftalık süreç, geçiş dönemi olarak ifade edilir. Bu sürecin buzağılama öncesine denk gelen kısmı prepartum dönem, buzağılamadan sonraki ilk üç haftalık bölüm ise postpartum dönem olarak tanımlanır. Ayrıca buzağılama öncesi ve sonrası birkaç günlük süreye peripartum dönemi de denir (Arslan ve Tufan, 2010). Geçiş dönemi, birçok metabolik değişikliğin yaşandığı kritik bir süreçtir. Aynı zamanda çevresel, fizyolojik ve psikolojik faktörlerden daha fazla etkilenen bir dönemde olup, metabolik ve enfeksiyöz hastalıkların gelişme riski de artmaktadır (Tablo 2.1). Bu nedenle, geçiş dönemi doğru bir şekilde yönetilmelidir.

Bu dönemde dikkat edilmesi gereken en önemli konulardan biri kuru madde tüketimidir. Süt sığırlarının yedikleri rasyonun nem içeriğinin yüksek olmaması, kaba yemin kaliteli olması, rasyonun partikül büyüklüğü, yemleme sıklığı, yaş, ırk, vücut kondisyonu, yağ, protein, nişasta ve nötr deterjan lifi (NDF) düzeyi, süt verimi ve içinde bulunduğu mevsim gibi birçok faktör kuru madde tüketim miktarı üzerinde etkilidir (Allen, 2000; Hayırlı ve ark.,2002; Kara, 2009).

Süt ineklerinde doğum yaklaştıkça, kandaki progesteron hormonu seviyesi azalırken östrojen hormonu seviyesi artar. Yüksek östrojen konsantrasyonu, hayvanın kuru madde tüketimini azaltır. Ayrıca, ineklerin karşılaştığı stres, hastalık ve beslenme hataları gibi faktörler, rumende bulunan gram negatif bakterilerin endotoksin salgılamasına neden olur. Bazı toksik bileşikler, organizmada inflamatuvar yanıtları uyatarak interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinlerin salınımını artırmakta, bu durum da kuru madde tüketiminin azalmasına yol açmaktadır (Ingvarsen, 2006; Lacetera ve ark., 2005). Ayrıca, plasentadan salgılanan interlökin-8 (IL-8) ve IL-1 $\beta$  gibi inflamatuvar mediatörlerin yanı

sıra rumen hacmindeki azalma da kuru madde alımını kısıtlayan diğer faktörlerdendir. Bu interlökinler, karaciğerde TNF- $\alpha$ , serum amiloid A1 ve haptoglobin üretimini tetikleyerek iştahı kontrol eden merkezi sinir sistemi mekanizmalarını olumsuz etkileyebilir (Goff ve Horst, 1997; Sevinç ve Başoğlu, 2011). Plasenta ve karaciğer kökenli bu sitokinlerin ayrıca lipolizi teşvik ederek kandaki NEFA (Esterleşmemiş Yağ Asitleri) ve BHBA (Beta-Hidroksibütirik asit) düzeylerini artırdığı bildirilmektedir (Goff ve Horst, 1997; Sevinç ve Başoğlu, 2011). Ruminantlarda, kuru madde tüketiminin azalması durumunda glikoz düzeyleri genellikle kortizol aracılığıyla dengelenmektedir (Forslund ve ark., 2010).

Geçiş döneminde, süt ineklerinde yağ mobilizasyonu artar ve kandaki NEFA ile BHBA seviyeleri yükselir. Ruminantlarda, insülin seviyesinin düşmesi, yağ dokularından NEFA salınımını tetikler. Bu süreç, karaciğerde keton cisimlerinin üretimine yol açar. Keton cisimleri, glikoza alternatif bir enerji kaynağı olarak kullanılarak süt sentezine yardımcı olur (Cheng, 2007; Herdt, 2000). Karaciğere ulaşan NEFA'lar burada ya enerji için oksitlenir ya da ketonlara dönüştürülür. Bu keton maddeler, süt yağ oranını artırır ve ketozis (asetonemi) teşhisi için bir gösterge olarak kullanılır (Herdt, 2000).

Süt ineklerinde geçiş dönemindeki metabolik uyum süreci, nörolojik ve hormonal sistem ve diğer karmaşık biyolojik mekanizmalar aracılığıyla düzenlenir (Drackley ve ark., 2005). Hormonal adaptasyonlar, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) seviyelerinin azalması ve glukagon ile büyüme hormonu seviyelerinin yükselmesiyle karakterizedir. Bu hormonal değişiklikler, yağ dokularından uzun zincirli yağ asitlerinin mobilizasyonunu hızlandırır ve lipolitik uyarılara karşı yağ dokularının hızlı tepki vermesini sağlar (Herdt, 2000). Ayrıca, insülin seviyelerindeki düşüş, yağ dokularından lipoliz yoluyla NEFA salınımını artırır.

Geçiş dönemi, süt ineklerinde bağışıklık sisteminin zayıfladığı kritik bir evredir. Bu dönemde stres, enfeksiyon ve travma gibi faktörler, mastitis (meme iltihabı) ve metritis (rahim iltihabı) gibi hastalıkların görülme sıklığını önemli ölçüde artırır. Vücut kondisyon skoru (VKS) yüksek seyreden ineklerde bağışıklık sisteminin baskılanması daha belirgin olabilir. Nötrofil ve lenfosit hücrelerinin

fonksiyonlarındaki azalma, hayvanların enfeksiyonlara karşı direncini düşürür (Bobe ve ark., 2004; Lacetera ve ark., 2005). Artan stres seviyesi, kandaki kortizol hormonunun yükselmesine neden olur. Kortizol, bağışıklık sistemini daha da baskılayarak hayvanların hastalıklara karşı daha savunmasız hale gelmesine yol açar.

**Tablo 2.1.** Süt sığırlarında laktasyon döneminde metabolik ve fizyolojik süreçlerdeki değişimler

Metabolik Süreç	Fizyolojik Değişim / Etki	İlgili Doku / Organ	Kaynaklar
Glikoz Metabolizması	Glikoneogenesis artışı, Glikoz kullanımını azalışı	Karaciğer, kas dokusu	Arslan ve Tufan, 2010; Aschenbach ve ark., 2010; Chen ve ark., 2024
Lipid Metabolizması	Lipolizis artışı, Lipogenesis azalışı, Yağ asitlerinin enerjiye dönüşümü	Adipoz doku, kas dokusu	Gouveia ve ark., 2024; Taylor ve ark., 2009; Stefanska ve ark., 2024
Protein Metabolizması	Protein mobilizasyonu, Kas protein yıkımı, Amino asit kullanımı	Kas, karaciğer, diğer vücut dokuları	Myers ve ark., 2024; Stefanska ve ark., 2024
Mineral Metabolizması	Emilim artışı, Mobilizasyon artışı, Kalsiyum-fosfor dengesinde değişim	Kemikler, kas dokusu	Wang ve ark., 2024; Taylor ve ark., 2009
Süt Sentezi	Sentez kapasitesi artışı, Kan akışı artışı, Besin alımı ve kullanımını artışı	Meme bezi	Arslan ve Tufan, 2010; Toscano ve ark., 2023
Hormonal Değişimler	Prolaktin ve oksitosin salgısında artış, İnsülin duyarlılığında değişim	Hipofiz bezi, pankreas	Arslan ve Tufan, 2010; Myers ve ark., 2024; Wang ve ark., 2024
Yem Tüketimi	İştah artışı, Metabolik hızda değişim	Merkezi sinir sistemi, sindirim sistemi	Kadzere ve ark., 2002; Myers ve ark., 2024
Sindirim Fonksiyonları	Sindirim kanalında hipertrofi, Besin emilim kapasitesinde artış	Karaciğer, bağırsaklar	Aschenbach ve ark., 2010; Chen ve ark., 2024
Vücut Sıcaklığı Düzenlemesi	Isı üretiminde artış, Termoregülasyon mekanizmalarında değişim	Hipotalamus, kas dokusu	Kadzere ve ark., 2002; Taylor ve ark., 2009
Kan Akışı Düzeni	Periferik kan akışında değişim	Dolaşım sistemi	Toscano ve ark., 2023; Gouveia ve ark., 2024

## 2.2. Geçiş Dönemi Metabolik Hastalıkları

### 2.2.1. Ketozis

Ketozis, özellikle yüksek verimli süt ineklerinde sıkça karşılaşılan önemli bir metabolik bozuluktur. Bu bozukluk, kandaki keton cisimciklerinin (aseton, asetoasetat ve beta-hidroksibütirik asit gibi) anormal derecede yüksek seviyelerde bulunmasıyla karakterize edilir (Çetin, 2017; Kovanlıkaya, 2023). Keton cisimciklerinin aşırı üretimi, enerji metabolizmasındaki dengesizliklerden kaynaklanır ve genellikle buzağılama sonrası dönemde negatif enerji dengesi (NED) ile ilişkilidir (Goff ve Horst, 1997).

Buzağılama sonrası dönemde, süt üretimi için gereken enerji ihtiyacı önemli ölçüde artar. Yüksek süt verimine sahip inekler, bu artan talebi karşılamak için yeterli miktarda yem tüketemeyebilirler. Bu durum, NED'e yol açar. NED durumunda, Yağ dokusunu parçalayarak vücudun enerji ihtiyacını karşılar. Bu süreçte, yağ asitleri karaciğere taşınır ve burada keton cisimciklerine (ketogenez) dönüştürülür. Keton cisimciklerinin üretimi, vücudun bunları enerji olarak kullanma kapasitesini aştığında, kanda birikmeye başlarlar ve ketozise neden olurlar (Çetin, 2017; Zhang ve Ametaj, 2020). Ketozis, süt sığırlarında önemli bir metabolik sorundur ve ciddi ekonomik kayıplara yol açabilir. Bu nedenle, özellikle yüksek süt verimine sahip ineklerde ketozisin önlenmesi ve etkili bir şekilde yönetilmesi büyük önem taşır. Doğru besleme stratejileri, yem katkı maddeleri ve stresin azaltılması gibi uygulamalarla ketozis riski azaltılabilir ve süt sığırlarının sağlığı ve verimliliği korunabilir.

Ketozis olguları, klinik ve subklinik olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır. Subklinik ketozis durumunda inek herhangi bir belirgin semptom göstermez, ancak kandaki BHBA seviyesi 1.2–1.4 mmol/L'nin üzerine çıkar (Duffield, 2000; Oetzel, 2007a; Suthar ve ark., 2013). Bu form, süt veriminde düşüş, üreme performansında azalma ve diğer hastalıkların riskinde artış gibi uzun vadeli olumsuz sonuçlara neden olabilir. Klinik ketozis ise belirgin semptomlarla seyreden

bir formdur ve kandaki BHBA seviyesi genellikle 3 mmol/L'nin üzerindedir. Bu durumda iştahsızlık, kilo kaybı, süt veriminde belirgin azalma, depresyon, sinirlilik ve anormal sinirsel belirtiler gibi semptomlar gözlenebilir (Duffield, 2000; Oetzel, 2007a).

Ketozis, oluşum zamanına ve nedenine göre iki farklı tipe ayrılır: Tip I ketozis, genellikle laktasyonun 3. ile 6. haftaları arasında görülür ve yetersiz karbonhidrat alımı ile ilişkilidir (Holtenius ve Holtenius, 1996). Tip II ketozis ise buzağılamadan hemen sonraki ilk günlerde ortaya çıkar ve genellikle aşırı yağlı ineklerde görülür; bu tip, insülin direnci ve karaciğer yağlanması ile bağlantılıdır (Oetzel, 2007a).

Ketozis, süt sığırlarında süt veriminin azalması, üreme bozuklukları ve metabolik hastalıkların riskinin artması gibi çeşitli olumsuz etkilere yol açarak önemli ekonomik kayıplara neden olabilir. Bu durum, süt üretiminde ciddi düşüüşlere (Koç, 2023), anöstrus, düşük gebelik oranı ve erken embriyonik ölüm gibi üreme problemlerine (Türkmen ve ark., 2015) ve süt humması ile abomazum deplasmanı gibi metabolik hastalıkların görülme sıklığında artışa neden olabilir (Koç, 2023). Ayrıca, hastalığın tedavi maliyetleri ve verim kayıpları da ekonomik açıdan işletmeleri olumsuz etkiler.

Ketozisi önlemek ve yönetmek için çeşitli stratejiler uygulanabilir. Buzağılama öncesi ve sonrası dönemde uygun besleme yönetimiyle negatif enerji dengesi (NED) en aza indirilmeli; ineklerin buzağılama öncesi aşırı yağlanması engellenmeli ve doğum sonrası yeterli miktarda ve kalitede yem tüketmeleri sağlanmalıdır (Garnsworthy ve ark., 2008a; 2008b). Kuru dönemde düşük enerji içeren rasyonların kullanımı da ketozis riskini azaltabilir (Koç, 2023). Özellikle buzağılama sonrası dönemde rasyonun enerji yoğunluğunun artırılması, ineklerin artan enerji ihtiyacını karşılamada faydalı olabilir. Ayrıca, propilen glikol, gliserol ve niasin gibi yem katkı maddeleri karaciğerde glikoz üretimini artırarak ketozis riskini azaltabilirken; korunmuş kolin ve metiyonin takviyesi, karaciğer fonksiyonlarını destekleyerek ve yağ mobilizasyonunu azaltarak koruyucu etki gösterebilir (Çetin, 2017). Bununla birlikte, doğum sırasında ve sonrasında stresin azaltılması da ketozis riskinin önlenmesinde önemli bir faktördür.

Ketozisin teşhisinde, kan BHBA seviyelerinin ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyobelirteçler arasında, NEFA, gliserol ve bazı inflamatuvar belirteçler yer almaktadır (Andersson, 1988).

### **2.2.2. Hipokalsemi**

Sığırlarda hipokalsemi, genellikle buzağılama sonrası dönemde ortaya çıkan ve hayvan sağlığı üzerinde ciddi etkilere sahip olan metabolik bir bozukluktur (Goff, 2008). Özellikle süt ineklerinde buzağılama sonrası kalsiyum seviyelerinde ani bir düşüş yaşanması, hipokalseminin temel nedenlerinden biridir. Bu durum, süt veriminin yüksek olması nedeniyle genellikle laktasyonun başlangıcında daha sık görülmektedir (DeGaris ve Lean, 2008).

Hipokalsemi, temel olarak plazma iyonize kalsiyum seviyelerinin 8 mg/dl'nin altına düşmesiyle tanımlanır (Reinhardt ve ark., 2011) ve genellikle çeşitli fizyolojik, beslenme ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu gelişir. Kalsiyum metabolizması ve regülasyonu kapsamında bağırsaklardan emilim, kemiklerden mobilizasyon ve böbreklerden atılım süreçleri hipokalsemi riskini doğrudan etkiler (Horst ve ark., 2005). Buzağılama sonrası dönemde artan kalsiyum ihtiyacının vücut tarafından yeterince karşılanamaması, hipokalseminin gelişmesinde önemli bir rol oynar (Goff, 2008). Ayrıca, özellikle buzağılama öncesinde uygulanan yüksek kalsiyum içeren dengesiz rasyonlar, paratiroid hormonunun etkinliğini azaltarak doğum sonrası kalsiyum mobilizasyonunu zorlaştırabilir (Lean ve ark., 2006). Doğum stresi de hipokalsemi riskini artıran bir diğer faktör olup, stres azaltıcı uygulamaların bu riski azaltabileceği bildirilmiştir (Mobini ve ark., 2018). Bunun yanında, hipokalseminin doğum sonrası bağışıklık sistemini zayıflatarak, özellikle nötrofil aktivitesini baskılayıp enfeksiyonlara karşı duyarlılığı artırabileceği gösterilmiştir (Kimura ve ark., 2006).

Hipokalsemi hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üç farklı seviyede görülebilir (Martinez ve ark., 2014). Belirtiler genellikle şu şekildedir:

Hafif hipokalsemi, genellikle 1,75–2,0 mmol/L düzeyinde kan kalsiyumu ile karakterizedir. Bu durumda iştah azalması, halsizlik, kulakların soğuması ve vücut sıcaklığında hafif düşüş gibi non-spesifik belirtiler gözlemlenir (Goff, 2008).

Orta düzeyde hipokalsemi, kan kalsiyumunun 1,25–1,75 mmol/L arasına düşmesiyle ortaya çıkar. Bu seviyede kaslarda güçsüzlük, titreme, koordinasyon bozukluğu ve ayakta durmada zorluk görülür (Reinhardt et al., 2011).

Şiddetli hipokalsemi ya da klinik süt hummasında, kan kalsiyumu genellikle <1,0 mmol/L seviyesindedir. Bu durumlarda hayvan yatar pozisyonda kalır, başını gövdesine yaslar, kas felci ve termal regülasyon bozuklukları görülür; tedavi edilmezse ölümlerle sonuçlanabilir (Horst et al., 2005).

Hipokalsemi tanısı genellikle klinik belirtilere dayanarak konulsa da, kesin teşhis için laboratuvar testleri gereklidir. Kan plazmasındaki kalsiyum seviyelerinin ölçülmesi, hipokalseminin derecesini belirlemek açısından önemlidir (DeGaris ve Lean, 2008). Ayrıca, magnezyum ve fosfor seviyelerinin de değerlendirilmesi, hipokalseminin diğer metabolik hastalıklarla ilişkisinin ortaya konulmasına yardımcı olabilir (Reinhardt ve ark., 2011).

Hipokalsemi tedavisinde en yaygın yöntem, intravenöz kalsiyum glukonat uygulanmasıdır; ancak hastalığın önlenmesi amacıyla da çeşitli stratejiler kullanılmaktadır (Goff, 2008). Buzağılama öncesinde düşük kalsiyum içeren diyetlerin uygulanması, paratiroid hormonunun doğum sonrası daha etkin çalışmasını sağlayarak hipokalsemi riskini azaltabilir (Lean ve ark., 2006). Ayrıca, diyet katyon-anyon dengesi (DCAD) stratejisi kapsamında anyonik tuzların kullanımı metabolik asidoz oluşturarak kalsiyum mobilizasyonunu artırabilir (Horst ve ark., 2005). Bunun yanı sıra, buzağılama sonrasında uygulanan oral kalsiyum takviyeleri de hipokalseminin önlenmesinde etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Martinez ve ark., 2014).

### 2.2.3. Asidoz

Rumen asidozu, ineklerde rumen pH'sının aşırı düşmesiyle karakterize edilen ve sindirim sisteminde ciddi bozukluklara yol açan kritik bir metabolik hastalıktır (Kılıç ve ark., 2010; Owens ve ark., 1998). Özellikle yüksek miktarda kolay fermente olabilen karbonhidrat içeren yemlerin ani ve aşırı tüketimi, rumen mikroflorasının hassas dengesini bozarak laktik asit üreten bakterilerin hızlı bir şekilde çoğalmasına neden olur (Krause ve Oetzel, 2006; Yıldız ve ark., 2015). Bu durum, rumendeki asit yükünü artırarak pH değerinin hızla düşmesine ve asidik bir ortamın oluşmasına yol açar (Russell ve Rychlik, 2001).

Asidozun klinik belirtileri, hafiften şiddetliye kadar değişebilir ve iştah kaybı, şiddetli ishal, karın ağrısı, dehidrasyon ve ileri vakalarda ölüm gibi ciddi sonuçlar doğurabilir (Akyol ve ark., 2018; Nagaraja ve Chengappa, 1998). Subklinik asidoz ise, belirgin klinik belirtiler göstermeden sinsi bir şekilde ilerleyerek süt veriminde düşüş, topallık, tırnak bozuklukları ve diğer metabolik hastalıklara zemin hazırlayabilir (Demirci ve ark., 2016; Enemark, 2008). Rumen duvarının asidik ortam nedeniyle zarar görmesi, zararlı bakterilerin kana karışmasına ve sistemik inflamasyona neden olarak bağışıklık sistemini zayıflatır ve hayvanın genel sağlığını olumsuz etkiler (Kleen ve ark., 2013; Plaizier ve ark., 2018).

Asidozun önlenmesinde temel strateji, rasyonun dengeli bir şekilde formüle edilmesi, nişasta ve şeker oranlarının kontrollü tutulması, yem değişikliklerinin kademeli olarak yapılması ve yeterli miktarda fiziksel etkili lif sağlanmasıdır (Stone, 2004; Şahin ve ark., 2020). Rasyonda NDF içeriğinin %32'nin üzerinde tutulması, rumen pH'sının korunmasında kritik bir rol oynar (Zebeli ve Metzler-Zebeli, 2012). Ayrıca, maya kültürleri ve probiyotiklerin kullanımı, rumen mikroflorasını destekleyerek asidoz riskini azaltmada etkili olabilir (Golder ve Lean, 2016; Kaya ve ark., 2019).

Asidozun tedavisinde amaç, rumen pH'sını yükselterek rumen mikroflorasını yeniden dengelemektir. Bu amaçla, sodyum bikarbonat gibi tamponlayıcı maddeler rasyona eklenir (Nordlund, 2011; Uçar ve ark., 2021). Rumen sağlığını desteklemek için magnezyum oksit ve kalsiyum karbonat gibi alkali maddeler de kullanılabilir

(Garrett ve Johnson, 2017; Öztürk ve ark., 2017). Dehidrasyonu önlemek için elektrolit takviyesi ve ileri vakalarda intravenöz sıvı tedavisi uygulanması gerekebilir (Dirksen ve ark., 2019; Çelik ve ark., 2022). Kronik asidoz vakalarında, uzun vadeli besleme stratejileri ve yönetim değişiklikleri büyük önem taşır.

#### **2.2.4. Karaciğer Yağlanması**

Metabolizma, enerji ihtiyacını karşılamak için çeşitli biyolojik süreçleri devreye sokar. Enerji açığının ortaya çıkması durumunda, vücut enerji kaynağı olarak adipoz dokuda depolanan yağ asitlerini kullanır (Ametaj ve ark., 2005). Özellikle erken laktasyon döneminde, yüksek verimli süt sığırlarının enerji ihtiyacının artması ve rasyonla yeterince karşılanamaması nedeniyle negatif enerji dengesi oluşur. Bu durumda, metabolizma, vücut yağlarını mobilize ederek enerji açığını dengelemeye çalışır. Bu süreçte kandaki NEFA seviyesinde belirgin bir artış görülür ve bu lipid yapılar çeşitli dokular tarafından farklı şekillerde metabolize edilir (Arslan ve Tufan, 2010).

Karaciğerdeki artan NEFA düzeyleri, hepatositlerde yağ yapımı ve keton cisimciklerinin oluşum süreçlerini tetikler. Ancak, NEFA'nın oksidasyonu kandaki konsantrasyonuna bağlı olup belirli bir sınırla gerçekleşir. Eğer karaciğere gelen yağ asitleri metabolize edilme kapasitesini aşarsa, trigliseritler birikerek yağlı karaciğer sendromuna yol açabilir. Yapılan araştırmalar, yüksek verimli süt sığırlarının geçiş döneminde yaklaşık %50'sinde yağlı karaciğer sendromunun görüldüğünü göstermiştir (Bobe ve ark., 2004).

Memelilerde lipoproteinler, trigliserid taşınmasından sorumlu olup iki ana tipe bulunur: şilomikronlar ve çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL). Ruminantlarda plazma VLDL seviyesinin düşük olması, karaciğer dışı dokular için başlıca lipid kaynağı olarak işlev görmesine neden olmaktadır. Sütte bulunan uzun zincirli yağ asitlerinin büyük bölümü, kandaki VLDL'ye bağlı trigliseritlerden türemektedir. Bu trigliseritler ya rasyonla alınan yağlardan ya da enerji açığı durumunda adipoz dokudan serbest bırakılan lipitlerden oluşmaktadır. Laktasyonun başlangıç evresinde, negatif enerji dengesi sonucu lipoliz süreci hızlanmakta ve buna bağlı olarak NEFA

düzeyinde artış gözlenmektedir. NEFA, karaciğer tarafından keton cisimciklerine veya esterifiye trigliseritlere dönüştürülerek metabolize edilir (Arslan ve Tufan, 2010).

Normal koşullarda, trigliseritler karaciğerde VLDL formunda depolanır veya uzaklaştırılır. Ancak, erken laktasyon döneminde karaciğere aşırı miktarda NEFA ulaşması, VLDL üretim kapasitesini aşabilir. VLDL üretiminin sınırlı olmasının sebepleri arasında kolesterol, fosfatidilkolin ve apolipoproteinler gibi esansiyel bileşenlerin yetersiz sentezi bulunmaktadır. Bu nedenle, süt sığırlarının geçiş döneminde karaciğer yağlanması başlıca sebeplerinden biri, metabolize edilebileceğinden fazla yağın karaciğere mobilize edilmesi ve bu süreçte kolin ve metiyonin gibi lipotropik maddelerin eksikliğidir (Pinotti ve ark., 2002).

Karaciğerde yağ birikiminin artması, karaciğer fonksiyonlarını olumsuz etkileyerek süt sığırlarının genel sağlığına zarar verir. Karaciğer, glikoz metabolizmasında kritik bir rol oynar ve süt sığırlarında gerekli olan glikozun %85'ini sentezler. Ayrıca, karaciğerin fertilité, yem tüketiminin düzenlenmesi ve bağışıklık sistemi üzerindeki merkezi rolü, bu organın sağlık durumu ile genel vücut kondisyonu arasındaki bağlantıyı açıkça göstermektedir. Karaciğer yağlanması, metabolik ve reproduktif bozukluklarla ilişkili olup, genel sağlık durumunu olumsuz yönde etkileyen önemli bir faktördür (Bobe ve ark., 2004).

Karaciğer yağlanması klinik ve subklinik formlarda görülebilir. Klinik formda iştahsızlık, süt veriminde düşüş, depresyon ve kilo kaybı gibi belirtiler yaygındır (Bobe ve ark., 2004). Subklinik form ise belirgin semptomlar göstermeden ilerleyebilir ve sadece biyokimyasal analizlerle tespit edilebilir (Herdt, 2000). Karaciğerin fonksiyon bozukluğu nedeniyle ketozis, bağışıklık sisteminin zayıflaması ve üreme performansında azalma gibi ikincil sorunlar da ortaya çıkabilir (Reynolds ve ark., 2003). Çetin (2017), metiyonin ve korunmuş kolin takviyesinin kan parametrelerini iyileştirerek bu tür metabolik rahatsızlıkların önlenmesine katkı sağlayabileceğini bildirmektedir.

Tanı koymada biyokimyasal analizler büyük önem taşır. Plazma NEFA, BHBA ve trigliserid seviyeleri karaciğer yağlanması belirlenmesinde yaygın olarak

kullanılır (Oetzel, 2004). Ultrasonografi ve karaciğer biyopsisi gibi yöntemler de tanıyı doğrulamak için kullanılabilir (Jorritsma ve ark., 2001).

Karaciğer yağlanmasını önlemek için doğru besleme yönetimi esastır. Geçiş dönemi beslenmesi, süt ineklerinde enerji dengesini optimize edecek şekilde düzenlenmelidir (Grummer, 2008). Yüksek kaliteli rasyonlar, yeterli düzeyde glukojenik besin maddeleri ve lipotropik ajanlar (örneğin metiyonin ve kolin) içermelidir (Zom ve ark., 2011). Meral ve Kara (2013), kolinin karaciğer fonksiyonlarını destekleyerek yağ metabolizmasını düzenlediğini ve hepatik lipidoz riskini azalttığını belirtmektedir. Ayrıca, Çetin (2017), korunmuş kolin ve metiyonin takviyesinin süt verimi ve bileşimi üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Tedavi genellikle intravenöz glikoz, insülin ve karnitin takviyesi gibi metabolik destekleyicileri içerir (Drackley, 1999).

### **2.3. Kolin**

Kolin ( $C_5H_{15}O_2N$ ; molekül ağırlığı 121 g/mol), vücut fonksiyonlarının sürdürülebilmesi açısından elzem olan renksiz ve bazik bir bileşiktir. Her ne kadar geçmişte B grubu vitaminleri arasında değerlendirilmiş olsa da, organizmada belirli miktarlarda sentezlenebilmesi ve klasik anlamda bir enzim kofaktörü olarak görev yapmaması nedeniyle bu sınıflandırmaya tam anlamıyla uymamaktadır (McDowell, 1989). Kolin, beyin fonksiyonları, sinir iletimi ve hücre yapısı için kritik öneme sahiptir. Metiyonin ve homosistein döngüsü, kolin metabolizmasıyla yakından ilişkilidir. Bu bağlantı, kolin oksidasyonu sonucu oluşan betainin, betain-homosistein metiltransferaz (BHMT) enzimi aracılığıyla homosisteini yeniden metiyonine dönüştürmesiyle sağlanır. Ayrıca, fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaz (PEMT) enzimi fosfatidilkolin sentezini katalizlerken, bu süreç S-adenosilmetiyoninin (SAM) S-adenozilhomosisteine (SAH) dönüşümü ile ilişkilidir. Bu enzimlerin aktiviteleri, kandaki homosistein düzeylerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Chmurzynska et al., 2020).

Kolin eksikliği hiperhomosisteinemiye ve alkol dışı yağlı karaciğer hastalığına (NAFLD) yol açabilir (Leclercq ve ark., 2000; Liu ve ark., 2014; Radziejewska ve

ark., 2020b) ve MTHFR rs1801133 C677T gen varyantı kolin durumu ile ilişkilendirilmiştir (Abratte ve ark., 2008). Bu nedenle, homosistein içeriği dolaylı olarak kolin içeriğini yansıtabilir. Ancak, kolin durumu günlük diyetle de ilişkilidir ve farklı besin gruplarının farklı kolin içeriği vardır. MTHFR varyasyonu ile NAFLD arasında güçlü bir ilişki olduğuna dair artan kanıtlar vardır (Adinolfi ve ark., 2005; Catalano ve ark., 2014; Franco Brochado ve ark., 2013; Sazci ve ark., 2008).

Kolin, vücutta önemli metabolik işlevlere sahip olan bir maddedir. Kolinin metilasyondaki görevi metil grubu vericisi olmaktır. Aynı zamanda ruminal sistemde lipit metabolizması için kritik olan fosfatidilkolinin yapısına katılır. Lipotropik etkisi sayesinde karaciğerde yağ birikimini önler (Piepenbrink ve Overton, 2003). Karaciğerden dokulara yağ taşınması için gerekli olan fosfolipitlerin sentezini artırarak karaciğer yağlanmasını engellemeye yardımcı olur. Negatif enerji dengesi yaşayan süt sığırlarında, aşırı yağ mobilizasyonu sonucu oluşan NEFA moleküllerinin karaciğere taşınmasında önemli bir rol oynar. VLDL sentezi için gerekli olan kolin, karaciğerdeki trigliserid birikimini azaltır (Overton ve Waldron, 2004).

Korunmuş kolin formu, ruminantlarda daha fazla kullanılabilirliği nedeniyle özellikle geçiş dönemi gibi stresli zamanlarda önem kazanır. Rumen mikroorganizmaları tarafından büyük ölçüde parçalanmış kolin, ince bağırsakta yeterli emilim gösteremez. Yapılan araştırmalarda, pamuk tohumu küspesi, arpa, balık unu ve soya fasulyesi küspesi gibi gıdalarda bulunan korunmamış kolinin rumende parçalanma oranları sırasıyla %79.4, %84.7, %82.9, %83.8, %98.0 ve %98.6 olarak bildirilmiştir (Elek ve ark., 2008). Bu nedenle, rasyona eklenen kolinin korunmuş formda olması, ince bağırsakta emilim oranını artırır.

Ruminal metan üretimi ile ilişkilendirilen kolin metabolizması, çevresel etkiler açısından da önemlidir. Ruminantların metan üretimi, hem çevresel kirliliğe yol açar hem de enerji kaybına neden olur. Rumen mikroorganizmaları tarafından kullanılan kolinin metil grupları, metan üretiminde substrat olarak kullanılabilir. Yeterli metil grubu sağlanmadığı durumlarda, metan üretimi engellenemez ve trimetilamin, metana dönüşüm için birikir (Broad ve Dawson, 1976; Piepenbrink ve Overton, 2003).

## 2.4.Metiyonin

Metiyonin döngüsü içinde metiyonin, DNA, RNA, protein, histonlar, nörotransmitterler ve fosfolipitler dahil olmak üzere çok sayıda metil alıcı için bir metil donörü olarak işlev gören SAM'a dönüştürülür (Finkelstein, 1990). Metiyonin sentaz, metil gruplarını noradrenalin, miyelin ve fosfatidil etanolamin (FE) dahil olmak üzere çok çeşitli moleküllere sağlayan bir döngünün parçasıdır. Metiyonin, metil grubu donörü olarak işlev gören SAM'e dönüştürülür. Tüm bu metiltrans feraz enzimlerinin ortak ürünü olan SAH normalde sadece hücrelerde düşük konsantrasyonlarda bulunur, çünkü daha sonra sisteine indirgenir veya metiyonine yeniden bağlanır. Bu reaksiyonlarda yer alan metiltransferaz enzimlerinin aktiviteleri, SAM'ın doku konsantrasyonlarının SAH'ye oranı ile yönetilir.

Ratlarda yapılan bir çalışmada Betain-homosistein metiltransferaz, protein ve metiyonin beslenmesiyle, N5-Metiltetrahydrofolat-homosistein metiltransferaz ise metiyonin sentezine ihtiyaç duyulan koşullar altında arttığı, N5-metiltetrahydrofolat-homosistein metiltransferaz aktivitesinin memelilerde metiyonin metabolizmasının düzenlenmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır (Finkelstein ve ark., 1971).

Apolipoprotein E eksik fareler, üç farklı gruba ayrılmıştır: (1) yüksek metiyonin içeren ve homosistein düzeyi normal olan diyetle beslenen grup, (2) yüksek metiyonin içeren, B vitamini eksikliği ve buna bağlı hiperhomosisteinemi gelişen grup, (3) normal metiyonin içeren, ancak B vitamini eksikliği nedeniyle hiperhomosisteinemi olan grup. Sonuçlara göre, metiyonin açısından zengin diyetle beslenen farelerde aortik arkta belirgin ateromatöz lezyonlar gözlenmiştir. Buna karşın, B vitamini eksikliği nedeniyle homosistein düzeyleri yüksek olsa da, bu gruplarda vasküler patolojide herhangi bir artış saptanmamıştır. Bu bulgular, metiyonin alımındaki ılımlı artışların aterojenik olduğunu, ancak yüksek plazma homosistein düzeylerinin tek başına ateroskleroz gelişimine yol açmadığını göstermektedir. Sonuç olarak, damar hastalıkları ile ilişkili olan asıl faktörün plazma homosistein düzeyinden ziyade, metiyonin metabolizmasındaki bozulmalar sonucu ortaya çıkan homosistein türevleri olabileceği düşünülmüştür (Hwang ve ark., 2001). Zou ve ark. (2003) araştırmasında da benzer bulgulara rastlanmış, B vitamin takviyesinin serum Hcy seviyelerini

düşüremese de, farelerde aortik arkta daha az ateroskleroz gözlemlenmiş ve B vitaminlerinin anti-aterojenik etkisi serum Hcy seviyelerinden bağımsız olduğu kanısına varılmıştır.

İnsanlarda yapılan çalışmada Metiyonin alımının 1.24 g'dan 1.87 g'a çıkmasında homosistein düzeyi de 10.3'den 9.1  $\mu\text{mol/L}$  düzeyine düşmüştür (Jacques ve ark., 2001). Avrupa'da yapılan geniş bir retrospektif çalışmada arterosklerozlu 750 ve sağlıklı 800 bireyin açlık plazma homosistein düzeyleri ölçülmüş ve gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülmüş, ardından metiyonin yüklemesi yapılmış ve kişilerin %27'sinin daha hiperhomosisteinemi grubuna geçmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Graham ve ark., 1997).

Metiyonin sentaz, metil gruplarını noradrenalin, miyelin ve fosfatidil etanolamin (FE) dahil olmak üzere çok çeşitli moleküllere sağlayan bir döngünün parçasıdır (Kennedy ve ark., 1992). Metil gruplarının ana diyet kaynakları kolin, betain ve metiyonindir. Koyunlar diyetleri yeterli miktarda betain ve kolin içermesine rağmen, bu bileşikler rumen mikroorganizmaları tarafından neredeyse tamamen parçalanmasından dolayı metil grubu eksikliği görünme açısından risk altındadır (Dawson ve ark., 1981, Mitchell ve ark., 1979). Bu nedenle koyunlar, enterohepatik döngü ile kolinin korunmasına ve dolaylı yol kullanılarak fosfatidil etanolaminden de novo biyo sentezine güvenmektedir (Neill ve ark. 1978).

Robert ve ark. (1994) yaptığı çalışmada süt ineklerinin diyetlerindeki rumen korumalı metiyoninin (RPM), erken emzirme döneminde hem süt hem de süt proteini verimini arttırdığını belirtmiştir. Yapılan diğer çalışmalar RPM ilaveli diyetin gelişmiş antioksidan kapasitesinde ve antienflamatuar duruma etkili olduğunu (Osorio ve ark., 2014), embriyo gelişimini ve gebelik kaybını azalttığını göstermiştir (Toledo ve ark., 2017).

Norsidah ve ark. (2013) metiyonin miktarı yüksek bir diyetle beslenen farelerde folat ve vitamin E'nin plazma homosistein ve kalp oksidatif stresi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta yüksek metiyonin verilen grupta glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin düşük olduğunu, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin metiyonin ve vitamin desteğinden etkilenmediğini bulmuşlardır.

Sonuçta yüksek metiyonin diyetinin sebep olduğu yüksek homosistein seviyesinin azaltılmasında E vitamininin folada göre daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Transkripsiyon, protein ekspresyonu ve metiyonin sentaz (MTR) aktivitesi, deri ve bağırsak epitellerinin çoğalan hücrelerinde, sıçan bağırsak kriptlerinde ve çoğalan CaCo2 hücrelerinde artarken, MTR aktivitesi sıçan bağırsak villusundaki DNA metilasyonu ile ilişkilidir (Gueant ve ark., 2013).

Mitokondriyal oksijen radikal oluşumu ve sızıntısına ve ayrıca mitokondriyal DNA ve proteinlere oksidatif hasara metiyonin kısıtlamasının etkisini incelemek için yapılan çalışmada fareler kontrol grubu ve kontrol grubuna verilen diyet ek olarak %0.17 l-metiyoninin ve %3.39 l-glutamik asit içeren metiyonin kısıtlamalı grup oluşturulmuş ve yapılan analizlerin sonucunda metiyonin kısıtlamasının mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu ve mitokondriyal DNA ve proteinlere oksidatif hasarı azalttığı bulunmuştur (Sanz ve ark., 2006).

Maymunlara 4 hafta boyunca oral olarak metiyonin takviyesinin yapıldığı çalışmanın sonucunda plazma Hcy seviyelerinde yaklaşık 3 kat bir artış gözlemlendiğini belirtmişlerdir (Böger ve ark., 2001). Böger ve ark. (2009) insanlarda yaptığı çalışmada oral olarak 100 mg/kg tek doz metiyonin takviyesinin plazma homosistein düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, farklı düzeylerde ve kaynaklarda metiyonin ile beslenen piliçlerin karaciğer ve göğüs kaslarında insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) ve büyüme hormonu reseptörü (GHR) gen ekspresyonları incelenmiştir. 22-42 günlük yaş aralığındaki civcivler, metiyonin takviyesi yapılmayan kontrol grubu, %0.08 DL-metiyonin içeren DL1 grubu, %0.24 DL-metiyonin içeren DL2 grubu, %0.11 metiyonin hidroksi analog-serbest asit (MHA-FA) içeren MHA-FA1 grubu ve %0.33 MHA-FA içeren MHA-FA2 grubu olmak üzere beş farklı gruba ayrılmıştır. Deneme sonunda karaciğer ve göğüs kası dokularından RNA izole edilmiş; cDNA sentezi ve amplifikasyonu, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, kas dokusundaki GHR ve IGF-I gen ekspresyonlarının metiyonin takviyesinden anlamlı şekilde etkilenmediğini göstermiştir. Buna karşın, karaciğer dokusunda IGF-I gen ekspresyonunun metiyoninle desteklenen gruplarda,

kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Özellikle DL2 grubundaki IGF-I mRNA seviyeleri, DL1, MHA-FA1 ve MHA-FA2 gruplarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca DL2 grubunda, karaciğerdeki GHR gen ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu bulgular, metiyonin takviyesinin IGF-I sentezini uyararak ve büyüme hormonu etkisini artırarak hayvan performansını olumlu yönde etkileyebileceğini ortaya koymuştur (Del Vesco ve ark., 2013). Broiler tavuklar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, iskelet kasındaki diyetle alınan metiyoninin göğüs eti birikimi ve protein ekspresyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, metiyonin oranı düşük (MD) ve metiyonin oranı normal (MN) olmak üzere iki deneme grubu oluşturulmuştur. Pektoralis majör (PM) kas dokusundan elde edilen örneklerde toplam 190 farklı protein tanımlanmıştır. MD grubundaki tavukların göğüs kasında yalnızca bu gruba özgü olarak piruvat kinaz, miyozin alkali hafif zincir-1 ve ribozomal protein L-29 enzimlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, özellikle piruvat kinaz enziminin metiyonin eksikliğinin biyolojik bir belirteci olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. (Corzo ve ark., 2006).

Büyüyen kuzulardaki metiyonin takviyesi, eser minerallerin biyoyararlanımını ve büyüme performansını arttırdı (Abdelrahman ve Hunaiti, 2008). RPM ile diyet takviyesinin koyun sütü yağı ve toplam katı içeriği, antioksidan kapasitesi ve emziren kuzuların büyüme oranını arttırdığı gösterilmiştir (Tsiplakou ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada diyet rumen korumalı metiyonin takviyesinin kuzuların yem verimliliğini, azot kullanımını ve et kalitesini iyileştirme potansiyeline sahip olabileceğini, ancak optimum RPM dozunun daha fazla tanımlanması gerektiğini göstermiştir (Li ve ark., 2019).

Metiyoninin takviyesinin embriyo gelişimine etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada fare embriyolarının gelişimi için süt ineklerinden alınan serum kullanılmış ve normal serum kullanıldığında toplam embriyo proteini, somite çiftleri veya anormal olan embriyoların yüzdesi (nöral tüp kapanması, anormal şekil, gelişim yok) olarak ölçüldüğünde embriyonik gelişim anormal bulunurken, serum aminoasit ve vitaminlerle takviye edildiğinde, yalnızca aminoasit takviyesi yapıldığında, sadece metiyonin takviyesi yapıldığında ve rumen korumalı metiyonin takviyesi yapıldığında anormal bir durumla karşılaşmadığı embriyo normal gelişimini tamamladığı

bulunmuş, sonuç olarak sığır serumunun çok düşük metiyonin seviyesinde olduğu ve fare embriyolarının normal gelişimini geciktirdiği sonucuna varılmıştır (Coelho ve ark., 1989). Ikeda ve ark. (2012), metiyoninin sığır embriyo gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada, embriyo kültür ortamlarına tek karbon metabolizmasında yer alan metiyonin yolunu engelleyen etionin ya da ilave metiyonin eklemiştir. Yapılan gözlemler sonucunda, etioninin embriyoların morula aşamasına kadar gelişimini engellemediği, ancak blastosist aşamasına ulaşmalarını belirgin şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, metiyoninin özellikle moruladan blastosist aşamasına geçişte, sığır embriyosunun normal gelişimi için kritik bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan bir başka çalışmada, maternal metiyonin takviyesinin sığır preimplantasyon embriyolarının transkriptomu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Holştayn inekleri, ham protein (%16.5 KM bazında), enerji, lif, nişasta, yağ, makro ve mikro mineraller ile vitamin açısından benzer rasyonlarla beslenmiş; ancak metiyonin içeriği açısından iki gruba ayrılmıştır. Metiyonince zengin grup, %6.8 lisin MP ve %2.4 metiyonin MP içeren, günlük 2.875 g metabolize edilebilir protein sağlayacak şekilde oluşturulurken; kontrol grubu %1.9 metiyonin MP içermiştir. Her iki gruptan yüksek kaliteli preimplantasyon embriyolar toplanmış ve RNA dizileme (RNA-seq) yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, embriyonik gelişimle ilişkili VIM, IFI6, BCL2A1 ve TBX15 ile bağışıklık yanıtıyla ilişkili NKG7, TYROBP, SLAMF7, LCP1 ve BLA-DQB gibi genler de dahil olmak üzere toplam 276 genin farklı düzeylerde ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu genlerin çoğunun ekspresyon düzeyinin, maternal metiyonin takviyesi ile azaldığı ve bunun, metiyoninin belirli gen bölgelerinde metilasyonu artırarak transkripsiyonu baskılamasıyla uyumlu olduğu ortaya konmuştur (Penagaricano ve ark., 2013). Laktasyondaki süt ineklerinde erken embriyo gelişimi üzerine metiyonin takviyesinin in vivo etkilerini incelemek için süperovule hayvanlar % 2.43 metiyonin MP içeren diyet uygulanan Metiyonin grubu, % 1.89 metiyonin MP içeren diyet uygulanan kontrol grubu olarak iki gruba ayrılmış, sonucunda hem süt proteinin üretilen kg hem de sütteki protein yüzdesinde bir artış olduğu, rumen korumalı metiyonini dolaşımdaki metiyonin konsantrasyonlarına beslemede büyük bir etki gösterdiği (Kontrol = 16.8 µM ve Met takviyeli = 22.9 µM) ancak değerlendirilen 570 embriyoda döllenme veya embriyo kalitesinde fark bulunamamıştır (Wiltbank ve ark., 2014).

## 2.5. Korunmuş Kolin ve Metiyoninin Geçiş Döneminde Kullanımı

Buzağılama sonrası negatif enerji dengesi nedeniyle süt sığırlarında aşırı yağ mobilizasyonu gözlemlenebilir. Bu durum, karaciğerde yağ birikimine yol açarak karaciğer yağlanması ve ketozis gibi metabolik hastalıklara neden olabilir. Kolin, bu tür hastalıkların riskini azaltmada veya engellemede kullanılabilir. Süt sığırlarının rumen mikroorganizmaları, korunmamış kolin formlarını büyük ölçüde parçalar. Bu durum, korunmamış kolin içeren rasyonlarla beslenen süt sığırlarında ince bağırsağa ulaşan kolin miktarında belirgin bir artışın gözlenmemesine neden olur (Broad ve Dawson, 1976; Neil ve ark., 1978). Kolin ince bağırsağa ulaştığında çoğunlukla fosfatidilkolin şeklinde bulunur. Fosfatidilkolin, başta protozoalar olmak üzere rumende bulunan mikroorganizmalar tarafından üretilir (Broad ve Dawson, 1976).

Geçiş dönemindeki yüksek verimli süt sığırlarına verilen rasyonlarda yoğun konsantre yem kullanımı, rumendeki protozoa varlığını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle, özellikle bu dönemde korunmuş kolin ihtiyacının artması beklenir (Meral ve Kara, 2013).

Korunmamış kolin formlarının, ruminal metan üretimi ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. Ruminantlar tarafından üretilen metan, çevresel kirliliğe yol açan bir sera gazıdır ve hayvanın sindirdiği brüt enerjinin %2-12'sinin kaybına neden olur (Johnson ve Johnson, 1995). Rasyondan alınan korunmamış kolinin metil grupları, rumen mikroorganizmaları tarafından metana dönüşmeden önce trimetilamine çevrilir. Ancak bu dönüşüm, yeterli substrat mevcut olduğunda gerçekleşir. Substrat yetersiz olduğunda ise metana dönüşmeyen trimetilamin rumende birikebilir. Ayrıca, kolinin metil gruplarının metana dönüşümünde trimetilaminin tek aracı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, metilamin de metan üretimi için substrat görevi görür. Ayrıca, metiyoninin metil grubu da metana dönüşebilir (Neil ve ark., 1978). Yüksek verimli süt sığırlarında, konsantre yemlerin fazla kullanılması rumen mikroflorasının dengesini bozarak kolin kaynaklarının yetersiz hale gelmesine yol açabilir (Broad ve Dawson, 1976). Bu nedenle, kolinin korunmuş formda (rumende parçalanmayan) kullanımı, hayvanların metabolik sağlığı için büyük önem taşır (Pinotti ve ark., 2000).

Süt ineklerinin geçiş dönemi, metabolik değişikliklerin yoğunlaştığı ve beslenme açısından kritik bir evredir. Bu dönemde, rumen korumalı metiyonin (Met) takviyesi, ineklerin genel üretimi ve sağlığı üzerinde önemli bir rol oynar. Metiyonin, süt sentezi için sınırlayıcı bir amino asit olmasının yanı sıra, fosfatidilkolin gibi önemli metillenmiş bileşiklerin sentezini de destekler (Zhou ve ark., 2017).

Geçiş döneminde süt inekleri, yüksek fosfatidilkolin gereksinimine sahiptir. Fosfatidilkolin, karaciğerde VLDL sentezi için gereklidir ve yağlı karaciğerin önlenmesinde önemli bir rol oynar. Buzağılamadan sonra, süt ineklerinin sütteki fosfatidilkolin seviyeleri artar ve bu durum, karaciğerin kolin ve metabolitlerini tknetmesine neden olur.

Metiyonin takviyesi, geçiş dönemindeki süt ineklerinde fosfatidilkolin sentezini artırarak karaciğerin VLDL ihracatını destekler. Bu sayede, karaciğerin normal yüksek süt sentezi oranlarına ulaşması sağlanır ve metabolik hastalıkların riski azaltılır.

Kolin ve metiyonin eksikliğinin, karaciğerde lipit birikimini artırdığı çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (Ardalan ve ark., 2011; Guretzky ve ark., 2006). Bu nedenle bu besin maddeleri, süt inekleri için özellikle geçiş döneminde temel moleküller olarak kabul edilmektedir. Rasyona eklenen rumen korumalı kolinin (RPC) karaciğerde biriken trigliserit oranını azalttığı (Cooke ve ark., 2007; Elek ve ark., 2013), plazma NEFA ve BHBA düzeylerini düşürdüğü, enerji dengesini iyileştirerek karaciğer sağlığına olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Cooke ve ark., 2007; Xu ve ark., 2006).

Geçiş dönemindeki ineklerde rumen korumalı metiyonin kullanılması lipid metabolizması ve enerji homeostazı üzerinde düzenleyici bir etki gösterse de, bu konuda yapılan araştırma sayısı nispeten azdır. Ayrıca, rumen korumalı kolin ve rumen korumalı metiyonin arasındaki potansiyel etkileşimler de sınırlı sayıda incelenmiştir (Shahsavari et al., 2016).

Yağ mobilizasyonu, karaciğerde aşırı lipit peroksidasyonuna ve serbest radikal oluşumuna yol açarak redoks dengesinin bozulmasına yol açabilir (Osorio ve ark., 2014; Turk ve ark., 2013). Bu durum, oksidatif stresi arttırarak bağışıklık

fonksiyonlarında azalma ile sonuçlanır (Sordillo ve ark., 2009; Trevisi ve ark., 2013). İnsan, kemirgen ve balıklarda yapılan çalışmalarda kolin ve metiyoninin oksidatif stresi azalttığı ve bunun sonucunda bağışıklığı artırdığı tespit edilmiştir (Miller ve ark., 2005; Wu ve ark., 2013). Ancak, geçiş döneminde RPM ve RPC kullanımının süt ineklerinin antioksidan durumu ve immünolojik fonksiyonlarını nasıl etkilediği tam olarak anlaşılamamıştır. RPM kullanımının, glutatyon gibi önemli bir antioksidan peptidin sentezini hızlandırarak, geçiş dönemindeki süt ineklerinin antioksidan kapasitesini artırabileceği gösterilmiştir (Osorio ve ark., 2014).

Çetin (2017), geçiş dönemindeki yüksek verimli süt sığırlarının rasyonlarına korumalı kolin ve metiyonin eklemenin kuru madde alımı, süt verimi ve bileşimi, vücut kondisyon skoru, kan metabolik profili, sağlık durumu ile bazı üreme parametreleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Araştırmada, rumen korumalı metiyonin (RPM) takviyesinin süt verimi, süt bileşenleri ve karaciğer sağlığı üzerinde olumlu etkiler sağladığı bildirilmiştir.

Çetin ve arkadaşları (2018) ise, geçiş dönemindeki süt sığırlarının rasyonlarına eklenen rumen korumalı kolin ve metiyoninin kuru madde tüketimi, süt verimi, süt kompozisyonu ve vücut kondisyon skoru üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, RPM takviyesinin süt verimi ve süt bileşenlerinde olumlu artışlara yol açtığını göstermiştir; özellikle süt protein ve yağ oranlarında belirgin yükselmeler saptanmıştır. Bu veriler, rumen korumalı metiyoninin geçiş dönemindeki süt sığırlarının beslenmesinde önemli bir katkı sağlayabileceğine işaret etmektedir.

Yapılan bir başka çalışmada süt sığırlarında metiyonin (Met) ve kolin takviyesinin karaciğerdeki BHMT, MTR ve CBS genlerinin transkripsiyonu ve aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır. Elde edilen bulgular, Met takviyesinin fosfatidilkolin ve antioksidanların sentezini artırarak ineklerde daha iyi bir performans ve immüno-metabolik durum sağladığını göstermektedir (Zhou ve ark., 2017). Zhou ve ark. (2018)'nin yaptığı çalışmada da süt ineği karaciğer hücrelerinde, Metiyoninin transmetilasyon ve transsülfürasyon süreçlerini daha fazla etkilediğini, sitidin 5'-difosfo kolin yolunun ise kolin beslemesine daha duyarlı olduğunu ancak bu verilerin canlı organizmalardaki etkileri için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir.

## 2.6. Homosistein

Homosistein, metiyoninden türetilen ve metiyonin içeren gıdalarla alınabilen, vücudun metilasyon sürecinin doğal bir parçası olarak oluşan kükürtlü bir amino asittir (McCully, 1969; Selhub, 1999). Lipotropik bir molekül olan homosistein, vücuttaki yağların metabolik olarak yakılmasını hızlandırma potansiyeline sahiptir (Ueland ve ark., 2000). Kan düzeyleri, alınan metiyonin miktarına ve B<sub>6</sub> vitamini, B<sub>12</sub> vitamini ile folik asit düzeylerine bağlıdır; bu vitaminler homosistein metabolizmasının düzgün işleyişi için gereklidir (Selhub ve ark., 1993).

Homosistein, metiyoninin glutatyon gibi önemli antioksidanlara dönüşmesi sürecinde bir ara metabolittir ve toksik özellikler taşıdığı bilinmektedir (Jakubowski, 2000). Metabolize olması için iki ana yol bulunmaktadır: remetilasyon ve transsülfürasyon (Radziejewska ve ark., 2020a).

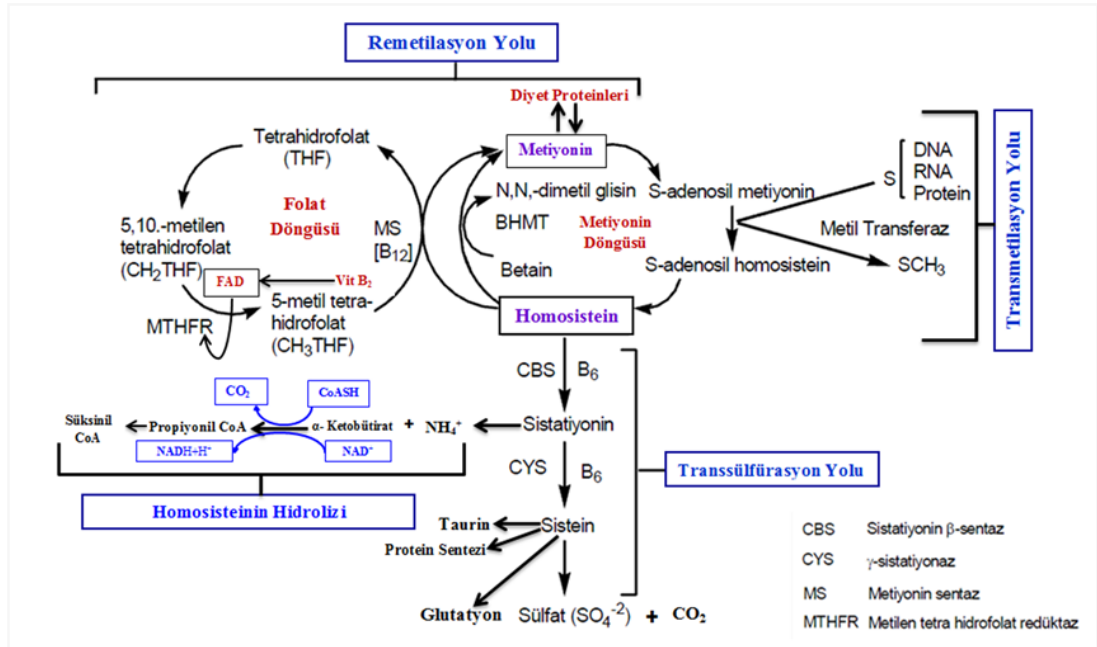
Homosistein remetilasyonu iki farklı yolla gerçekleşmektedir (Şekil 2.1):

Folat döngüsü yoluyla: Bu yolda gerekli metil grubu, 5-metil tetrahidrofolat formunda folat döngüsünden sağlanır. Bu dönüşüm, 5-metil tetrahidrofolat homosistein metiltransferaz enzimi aracılığıyla gerçekleşir ve bu enzimin kofaktörü B<sub>12</sub> vitaminidir (Finkelstein, 1990). Tetrahidrofolatın kaynağı diyetdeki folik asit iken, döngünün devamlılığını sağlayan enzim MTHFR olup bu enzimin de kofaktörü yine B<sub>12</sub> vitaminidir (Scott ve Weir, 1998).

Betain yoluyla: Alternatif remetilasyon yolunda metil kaynağı olarak betain kullanılır. Homosistein, betain-homosistein S-metiltransferaz enzimi yardımıyla tekrar metiyonine dönüştürülür. Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamda betain bulunmalıdır. Betain, diyetle alınabileceği gibi kolinden de sentezlenebilir (Craig, 2004). Bu yol özellikle folat düzeylerinin düşük olduğu durumlarda önem kazanır ve yalnızca karaciğer ve böbrek dokularında işlevseldir (Slow ve ark., 2004).

Transsülfürasyon, iki basamaktan oluşan bir süreçtir (Şekil 2.1): Homosistein, sistationin  $\beta$ -sentaz (CBS) enzimi tarafından sistationine dönüştürülür. Ardından sistationin, sisteine metabolize edilir.

Her iki reaksiyonun da kofaktörü B<sub>6</sub> vitaminidir (Finkelstein, 1998). Oluşan sistein, sonrasında taurin veya glutatyon gibi önemli bileşiklerin sentezinde kullanılabilir. Homosistein tüm dokularda sentezlenebilmekle birlikte, detoksifikasyonu yalnızca karaciğer ve böbrekte gerçekleşir (Miller, 2003). Kan damarları ve beyin gibi diğer dokularda homosistein birikimini önlemenin tek yolu remetilasyon olup, özellikle beyin dokusunda betain bulunmadığı için bu dönüşüm yalnızca folat döngüsü aracılığıyla gerçekleşir. Dolayısıyla, artmış homosistein düzeylerinin önlenmesinde aktif MTHFR enzimi, yeterli folik asit ve B<sub>12</sub> vitamini düzeyleri kritik rol oynamaktadır (Moll ve Varga, 2015).



Şekil 2.1. Homosistein metabolizması (Vychytil ve ark., 1998).

Homosistein miktarının tespitinde aminoasit kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ELISA, gaz kromatografisi kütle spektroskopisi (GC-MS), antikor floresans polarizasyon immünoassay gibi yöntemlerin yanı sıra radyoenzimatik ve elektrokimyasal teknikler de kullanılmaktadır (Perry, 1999).

Homosistein seviyeleri, folik asit, vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, ve magnezyum eksiklikleri, yaşlılık, vücutta ağır metal birikimi, obezite, tiroid hastalıkları, böbrek hastalıkları ve bazı ilaçların aşırı tüketimi gibi çeşitli faktörlerden dolayı yükselebilir. Ayrıca, MTHFR genindeki belirli bir tek nükleotit polimorfizmi (SNP), diyetle alınan vitaminlerin aktif formlarına dönüşümünü zorlaştırabilir. Veteriner hekimlikte, homosistein ile ilgili sonuçlar çelişkili ve nadir veriler nedeniyle tartışmalıdır (Cotul ve ark., 2020).

Süperoksit anyonu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ile endotel kaynaklı nitrik oksit (NO) arasındaki reaksiyon, NO'nun biyoyararlanımını azaltarak vasküler fonksiyonu bozabilir ve aterosklerozun erken gelişimine katkıda bulunabilir. Hiperhomosisteinemi, henüz tam olarak anlaşılammış bir mekanizma ile endotel tarafından O<sub>2</sub><sup>-</sup>'den türetilen serbest radikallerin aşırı üretimine yol açar. Tavşan endotel hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, 10 µmol/L Tiron, C vitamini veya E vitamininin homosistein ile indüklenen endotel hücrelerindeki O<sub>2</sub><sup>-</sup> seviyelerini kontrol edebildiği gösterilmiştir (Lang ve ark., 2000).

Homosisteinin nitrik oksit (NO) sentezi, biyoyararlanımı ve yıkımı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, insan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) ve dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) genlerinin ekspresyon düzeyleri ile NO miktarları analiz edilmiştir. Bu amaçla, hücreler sırasıyla 10, 50, 100, 500 ve 1000 µM homosistein konsantrasyonlarıyla 24 saat inkübe edilmiş, ardından cDNA sentezlenerek uygun primerlerle PCR uygulanmış, ürünler agaroz jel elektroforeziyle değerlendirilmiştir. Aynı zamanda kültür ortamındaki NO düzeyleri de ölçülmüştür. Elde edilen bulgular, homosisteinin eNOS ve DDAH gen ifadeleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını, ancak NO üretimini hafif düzeyde baskıladığını ortaya koymuştur (Akkiprik ve ark., 2007).

Oral metiyonin ve oral homosisteinin endotel fonksiyonu üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, 11'i plasebo, 11'i deneme olmak üzere 22 kişilik iki grup oluşturulmuştur. Asetilkolin (endotele bağımlı) ve sodyum nitroprussid (endotelden bağımsız) intra-arteriyel infüzyonuna yanıt olarak önkol kan akışı ölçülerek belirlenen endotel fonksiyonu sonuçlarına göre, metiyonin verilen grupta

plazma metiyonin ve homosistein konsantrasyonları plaseboya göre artarken, endotele bağımlı yanıtlar azalmıştır. Homosistein verilen grupta ise homosistein artarken metiyonin değişmemiş ve endotele bağımlı yanıtlar %34.6'dan %22.8'e düşmüştür. Bu sonuçlar, endotel fonksiyonlarındaki değişikliklerden metiyoninin değil, homosisteinin sorumlu olduğunu göstermektedir (Hanratty ve ark., 2001).

Hiperhomosisteineminin endotel hasarına ve miyometriyumda kasılmalara neden olarak prematüre doğumlara yol açabileceği düşüncesiyle yapılan bir araştırmada, prematüre doğum yapmış 60 kadın, 25-30. haftada doğum yapanlar prematüre 1 ve 31-36. haftada doğum yapanlar prematüre 2 olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Ayrıca, normal doğum yapmış sağlıklı 30 kadın ile kontrol grubu oluşturulmuştur. Tüm grupların serum total homosistein, folik asit, B<sub>12</sub> vitamini, trigliserit, kreatinin, total kolesterol, VLDL, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) ve HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) kolesterol düzeyleri ölçülmüştür. Sonuç olarak, gruplar arasında homosistein, B<sub>12</sub> vitamini, folik asit ve diğer lipid parametreleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmezken, Prematüre 1 ve Prematüre 2 gruplarında folik asit ile homosistein seviyeleri arasında negatif bir korelasyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte, kontrol grubunda HDL kolesterol ile homosistein arasında da negatif bir korelasyon görülmüş ve prematüre doğumlara diğer faktörlerin daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Dülger ve ark., 2008).

Ayrıca insanlarda yapılan çalışmalarda neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonunda (AMD) plazma homosistein seviyesinin yüksek olduğu bulgusuna ulaşılmıştır (Axer-Siegel ve ark., 2004), karaciğer ve koroner damar hasarı (Çiftçi ve Yüce, 2013), kardiyovasküler hastalıklar (Ganguly ve ark., 2015), geriatric bir sendrom olan kadınlardaki kırılabilirlik (İdil ve ark., 2022), kronik böbrek hastalıkları (Cemile ve ark.,2021; Perna ve ark., 2019), düşükler (Çıkım ve Tok, 2021; Gaiday ve ark., 2018), osteoporoz (Kim ve ark., 2013; Öntan ve Dokuzlar, 2021) , tip II diyabet (Abdulhameed ve ark., 2023), yeme bozuklukları (Levine ve ark., 2007; Paratthakonkun ve ark., 2019) gibi çeşitli hastalık ve bozuklukların yüksek homosistein seviyeleri gösterdiği bildirilmiştir.

## Hayvan Çalışmaları

Kedilerde yapılan çalışmalarda sağlıklı kedi homosistein düzeyi McMichael ve ark. (2000)'nın çalışmasında  $7,6 \pm 4,1$   $\mu\text{mol/L}$  bulunurken Üren ve ark. (2009)'nın çalışmasında  $13,03 \pm 2,81$   $\mu\text{mol/L}$  bulunmuştur (Tablo 2.2). Bununla birlikte Özkan ve ark. (2017) Van kedilerinde yaptığı çalışmada erkek ve dişi kediler ile farklı yaş gruplarındaki kedilerin homosistein düzeylerini karşılaştırmış ve bazı farklılıklara rastlansa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Kabakçı ve Bülbül (2021) 'ün Ankara kedilerinde yaptığı çalışma da bu durumu destekler niteliktedir. Yapılan diğer çalışmalarda kardiyomiyopati ile tromboembolizm (McMichael ve ark., 2000) ve kronik böbrek yetmezliği (Giraldi ve ark., 2019; Üren ve ark. 2009) görülen kedilerde sağlıklı olanlardan daha yüksek homosistein seviyeleri gözlemlenmiştir. Drut ve arkadaşları (2018), 77 sağlıklı kedide plazma homosistein için 6.1–52.8  $\mu\text{mol/L}$  arasında bir referans aralığı belirlemiştir. Ayrıca, bu değerlerin kedi cinsi, yaşı, cinsiyeti ve vücut kondisyon skoru ile etkilenmediğini göstermiştir. Homosisteinin her ne kadar bazı hastalıklar için biyobelirteç gibi kullanılabileceği düşünülse de kedilerdeki B<sub>12</sub> eksikliği için bu durum tam tersidir (Hanisch ve ark., 2018; Ruaux ve ark., 2005). Metiyoninin ticari kedi mamalarına yaygın olarak katılması serum B<sub>12</sub> seviyesini etkilediğinden dolayı serum B<sub>12</sub> konsantrasyonunun ölçümü için homosistein biyobelirteç olarak kullanılamamaktadır (Riaux ve ark., 2001). Tüm bunlara ek olarak Cotul ve ark. (2020) yaptığı çalışma homosistein metabolizmasının farklı beslenme ilkeleri ile düzenlenebileceğini ve uygun beslenme yöntemi ile kardiyovasküler gibi bazı hastalıkların önüne geçmeye destek olacağını göstermektedir.

Köpekler üzerinde yapılan çalışmalar, homosistein düzeylerinin ırka özgü olduğunu ortaya koymuştur. Shiba Inu, Labrador Retriever ve Shar-Pei gibi ırkların, diğer ırklara kıyasla daha yüksek homosistein seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir (Grützner ve ark., 2013; Kakimoto ve ark., 2014). Çayır ve Kozat (2016) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise plazma Hcy düzeyleri Golden Retriever ırkında  $11,43 \pm 6,10$   $\mu\text{mol/L}$ , Terrier ırkında  $8,88 \pm 2,34$   $\mu\text{mol/L}$ , Alman Çoban Köpeği ırkında  $10,60 \pm 4,55$   $\mu\text{mol/L}$  ve Labrador Retriever ırkında  $9,40 \pm 3,83$   $\mu\text{mol/L}$  olarak tespit edilmiştir (Tablo 2.2). İnsanlarda olduğu gibi, köpeklerde de plazma homosistein

seviyelerindeki değişimler hormonal koşullarla yakından ilişkilidir (Tallova ve ark., 1999). Trisolini ve ark. (2008) dişi köpekler üzerinde yaptığı çalışmada, tüm üreme aşamalarında östrojen ve progesteronun fizyolojik varlığının, kadınlarda olduğu gibi homosistein metabolizmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Köpeklerde kardiyak ve renal bozukluklarda (Rossi ve ark., 2008), hipotiroidizmde (Gołyński ve ark., 2017) ve kuyruk ısırma alışkanlığı olan köpeklerde (Yalçın ve ark., 2016) homosistein seviyesi yüksek seyrederken sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) görülenlerde homosistein seviyesi düşük seyretmektedir (Patterson ve ark., 2013). Johnson ve ark. (2023) yaptığı çalışmada tazılarda homosisteinin metiyonine dönüşümünde bir kusur olduğunu ve buna bağlı olarak folat üretiminin bozularak herhangi bir hastalık semptomu göstermeyenlerde bile yüksek homosistein değerlerine sebep olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada serum homosistein konsantrasyonu immünosupresana yanıt veren enteropatide daha yüksek olmasına rağmen, biyobelirteç olarak kullanılması için daha fazla çalışma yapılması kanaatine varılmıştır (Benvenuti ve ark., 2020).

Yapılan çalışmalar sonucunda koyunlardaki normal homosistein değeri ~9.4 µmol/L (Vellema ve ark., 1999),  $10.1 \pm 0.7$  µmol/L (Kennedy ve ark., 1992),  $37.8 \pm 3.7$  µmol/L (Kennedy ve ark., 1994) gibi değişken seviyelerde ve koçlarda koyunlara göre daha yüksek homosistein seviyeleri (Aksoy, 2019) bulunmuştur (Rizzo ve Sciorsci, 2019) (Tablo 2.2). Homosistein ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi incelemek için çeşitli çalışmalar yapılmış ve laktasyondaki koyunlarda oksidatif strese bağlı homosistein yüksekliği görüldüğü bildirilmiştir (Fetoui ve ark., 2009; Memişoğulları ve ark., 2008; Piccione ve ark., 2008). Betainin oksidatif stres ve homosistein üzerine etkisi incelendiğinde de rasyonlarına yüksek oranda betain verilen koyunların homosistein seviyelerinin yüksek olduğu ancak oksidatif stresin azaldığı görülmüştür (Cai ve ark., 2021; Sahraei ve ark., 2020; Yarahmadi ve ark., 2020). Bir başka çalışmada selenyum eksikliği olan kuzularda artan homosistein konsantrasyonunun, oksidatif ajanların kalp dokusu üzerindeki zararlı etkilerini şiddetlendirerek miyokardiyal hasar üzerine etkili olabileceği düşünülmektedir (Rezaei ve ark., 2009). Ayrıca subklinik beyaz kas hastalığı olan kuzularda yüksek homosistein seviyeleri gözlemlenmiştir (Kozat ve ark., 2011). Fasciola hepatica görülen koyunlarda yapılan bir araştırmada karaciğer hasarına bağlı olarak hayvanların yeterince B<sub>12</sub> ve folatı kullanamadığı ve bunun sonucunda homosistein artışıyla

birlikte nitrik oksidin oluşumunun engellendiği sonucuna varılmıştır (Denizhan ve Kozat, 2020). Bununla birlikte serum homosistein seviyesinin ölçülmesi koyunlardaki B<sub>12</sub> durumu hakkında kesin bilgi sağlamazken, metilmalonik asit seviyesinin ölçülmesi daha güvenilir sonuçlar vermektedir (Furlong ve ark., 2010).

Farklı sığır ırklarında yapılan çalışma sonucunda ırklar arasındaki homosistein düzeyleri arasında belirgin bir fark olmadığı belirtilip Montafon ırkında 16.35±1.24 µmol/L, Holştayn ırkında 17.04±1.13 µmol/L ve Simmental ırkında 17.44±1.22 µmol/L olarak tespit edilmiştir (Kılıçkap ve Kozat, 2017) (Tablo 2.2). Ayvazoğlu ve arkadaşlarının (2023) yaptığı çalışma sonucunda homosisteinin kardiyak hasarın şiddetinin belirlenmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Vücuttaki homosistein seviyesini belirleyen unsurlardan biri de B<sub>12</sub>'dir. Sığırlarda kobalt B<sub>12</sub> vitamininin sentezi için gerekli bir yapı olduğundan eksikliğinde homosisteinin birikiminin sebep olduğu tespit edilmiştir (Stangl ve ark., 2000a). Stangl ve ark. (2000b) tarafından yapılan çalışmada, sığırlarda normal folat metabolizması ve minimum homosistein düzeylerinin sağlanması için diyet kobalt seviyesinin 150-200 µg/kg KM olması gerektiği, maksimum vitamin B<sub>12</sub> seviyelerine ulaşmak için ise diyetdeki kobalt içeriğinin 250 µg/kg KM seviyesine çıkarılması gerektiği belirtilmiştir. Sığırlarda, metiyonin takviyesi ile veya metiyonin takviyesi olmaksızın rumen sonrası guanidinoasetik asit (GAA) takviyesine verilen metabolik yanıtların incelendiği bir çalışmada, GAA takviyesi sonrası metil grubu eksikliği nedeniyle homosistein düzeylerinde artış gözlemlenmiş; ancak metiyonin takviyesi ile bu durum düzeldiği bildirilmiştir (Ardalan ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar, geçiş dönemindeki ineklerde tetrahidrofolattan de novo metilneogenez ile birlikte rumen korumalı folik asit, vitamin B<sub>12</sub>, metiyonin, kolin ve betainin diyetle takviyesinin, tek karbon havuzlarını desteklemede, karaciğerdeki metil grubu gerektiren reaksiyonları düzenlemede ve metil donör dengesini iyileştirmede etkili bir yaklaşım olduğunu ortaya koymuştur (Lopreiato ve ark., 2023; McFadden ve ark., 2020). Bununla birlikte, hipokalsemili ineklerde homosistein düzeylerini inceleyen bir çalışmada, homosisteinin prognoz ve tanı açısından önemli olmadığı öne sürülmüştür (Başbuğan ve ark., 2015).

**Tablo 2.2.** Hayvan türlerine göre homosistein düzeyleri

Hayvan Türü	Homosistein Düzeyi	Kaynak
Kedi	6,7 ± 4,1 mmol / L 6,1–52,8 µmol/L 13,03 ± 2,81 µmol/L	McMichael ve ark., 2000 Drut et al., 2018 Üren et al., 2009
Köpek	6,29±0,23 µmol/L	Yalçın ve ark., 2016
• Terrier	8,88 µmol/L	
• Golden Retriever	11,43 µmol/L	
• German Shepherd Dog	10,60 µmol/L	Çayır ve Kozat., 2016
• Labrador Retriever	9,40 µmol/L	
Koyun	0-20 µmol/L 9.4 µmol/L	Kennedy et al., 1992 Vellema ve ark., 1999
Sığır	5,85 ± 0,82 µmol/L 15,45 ± 1,42 µmol / L	Fedota et al., 2018 Ayvazoğlu et al., 2023
- Simmental	7,39 ± 1,82 µmol / L 17,44 ± 1,22 µmol / L	Stangyl et al., 2000a Kılıçkap ve Kozat, 2017
- Holstein	4,57±1,09 µmol / L 17,04 ± 1,13 µmol / L 11,7 µmol / L	Cannizzo et al., 2012 Kılıçkap ve Kozat, 2017 Sun et al., 2025
- Montafon	16,35 ± 1,24 µmol / L	Kılıçkap ve Kozat, 2017
At	1,3–14,7 µmol/L 5-10 µmol/L 4.65 ± 1.5 µmol/L	Berhane et al., 2004 Lefebvre et al., 2003 Cervantes et al.,2018

Karabağ, (2010) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, hipertiroidizmin neden olduğu endotel hasarına karşı kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) koruyucu etkisi araştırılmıştır. Beş gruba ayrılan ratlara L-tiroksin ve/veya CAPE uygulanmış; dört hafta sonunda tiroid hormonları, lipid profili, homosistein, asimetrik dimetilarginin (ADMA) ve NO düzeyleri değerlendirilmiştir. Hipertiroidizimli grupta plazma homosistein düzeyleri anlamlı ölçüde düşerken, CAPE ile birlikte uygulandığında bu düzeylerde belirgin bir artış gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde, CAPE+HT grubunda ADMA düzeyleri kontrol gruplarına kıyasla yüksek, sadece hipertiroidizimli gruba göre ise daha düşüktür. Ayrıca bu grupta NO düzeyleri

anlamli olarak artmiftr. Bulgular, CAPE'nin hipertiroidiye bagli endotel hasarini azaltabilecegini gostermektedir. Homosistein, oksidatif stres mekanizmalarinda rol oynayan ve serbest radikal benzeri etkiler gosteren bir aminoasittir. Prooksidan ve antioksidan sistemler arasindaki dengenin bozulmasi durumunda hucresel hasar riski artmaktadır (Bolander, 2002; Sies, 1997).

Kirtas, (2015) tarafından yurutulen bir calismada, ratlarda olusturulan hiperhomosisteineminin kalp ve eritrosit dokularinda yol actigi oksidatif hasar üzerine C vitamininin etkisi arastirilmiftr. Uc gruba ayrilan ratlara alti hafta boyunca sirasıyla normal diyet, L-metiyonin takviyeli diyet ve L-metiyonin ile birlikte C vitamini iceren diyet uygulanmiftr. Deneme sonunda serum homosistein duzeylerinin metiyonin verilen gruplarda yukseldigi dogrulanmif, ancak C vitamini takviyesinin bu parametreyi anlamlı düzeyde degistirmedigi gozlenmiftr. Buna karfin, kalp dokusu ve plazmada olculen MDA seviyeleri, yalnızca metiyonin verilen grupta daha yuksek bulunmuf; C vitamini eklenen grupta bu degerlerin kontrol duzeylerine yaklastigi raporlanmiftr. Bu bulgular, C vitamininin oksidatif stres üzerindeki koruyucu etkisini ortaya koyarken, homosistein duzeyine dogrudan etkili olmadigini gostermektedir.

Kaga (2007) tarafından gerceklestirilen bir calismada, siyah uzum suyunun homosistein ile induklenen oksidatif stres üzerindeki koruyucu etkisi arastirilmiftr. Bu amacla ratlar dort gruba ayrilmiftr: Kontrol grubuna cesme suyu ve 1 mg/kg intraperitoneal serum fizyolojik; siyah uzum grubuna 10 ml/kg uzum suyu ve 1 mg/kg serum fizyolojik; homosistein grubuna 1 mg/kg intraperitoneal homosistein; siyah uzum + homosistein grubuna ise 1 mg/kg homosistein ile birlikte 10 ml/kg uzum suyu verilmiştir. Deney sonunda plazma MDA (oksidatif stres gostergesi), plazma karbonil, eritrosit glutatyon (GSH; antioksidan kapasite gostergesi), plazma sulfhidril (SH) gruplari ile eritrosit katalaz (CAT) ve superoksit dismutaz (SOD) duzeyleri degerlendirilmiftr. Elde edilen bulgulara gore, siyah uzum suyu verilen grupta plazma MDA duzeylerinde azalma, eritrosit GSH ve CAT aktivitelerinde ise artif gozlenmiftr. Bu sonuclar, siyah uzum suyunun homosistein kaynakli oksidatif stresi azalttigini ortaya koymuftr.

Ciftci ve Yuce (2013) tarafından yapilan bir arastirmada, karaciğer fibrozisi olusturulan ratlarda kuersetinin homosistein duzeyleri ve koroner damar hasari

üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında hayvanlar dört gruba ayrılmıştır: yalnızca zeytinyağı verilen kontrol grubu, 0.25 mg/kg dozunda karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) uygulanan grup, 150 mg/kg kuersetin verilen grup ve hem CCl<sub>4</sub> hem de kuersetin verilen grup. On haftalık deney süresinin sonunda, MDA ve homosistein düzeyleri ölçülmüş; karaciğer ile koroner damarlardaki histopatolojik değişiklikler analiz edilmiştir. Sonuçlar, CCl<sub>4</sub> uygulamasının MDA düzeylerini artırarak karaciğerde doku hasarına yol açtığını ve bunun da plazma homosistein seviyelerinde yükselmeye ve koroner damarlarda yapısal bozulmalara neden olduğunu ortaya koymuştur.

## 2.7. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, 5-metiltetrahidrofolatın (MTHF) tetrahidrofolata (THF) dönüşümünü sağlayan bir katalizördür. Bu biyokimyasal dönüşüm; DNA metilasyonu, homosistein düzeyinin düzenlenmesi, nükleotid sentezi ve folik asit metabolizması açısından hayati öneme sahiptir (İzmirli ve ark., 2014). MTHFR, homosisteinin metiyonine dönüşümünde 5-metiltetrahidrofolat sağlayarak metiyonin döngüsünde hayati bir rol oynamaktadır (Finkelstein, 1990).

MTHFR genindeki 677 C>T polimorfizmi, genin 4. ekzonuna yerleşmiştir ve 222. kodondaki alanin-valin dönüşümü, enzimin kofaktörü flavin adenin dinükleotid'in (FAD) bağlanmasını olumsuz yönde etkileyerek 5,10-MTHF üretimini engellemektedir. Bu durum, 5-MTHF'nin birikmesine ve dolayısıyla homosistein birikimine yol açmaktadır (Ueland, 1993).

MTHFR, tek karbon akımını S-adenosilmetiyonin üretimine ve genel metilasyon reaksiyonlarına yönlendiren geri dönüşü olmayan bir reaksiyonu katalize eder. Bu nedenle, MTHFR aktivitesindeki eksiklik, pürin veya pirimidin sentezinden daha çok bu yönün tehlikeye girmesine neden olabilir. Bu durum, MTHFR eksikliği olan bireylerin epigenomlarında bir metilasyon açığı olabileceğini düşündürmektedir (Salbaum ve Kappen, 2012).

Şiddetli MTHFR eksikliği görülen hastalarda, biyokimyasal anormallikler arasında ciddi hiperhomosisteinemi (normalden 10 kat daha fazla), hipomethioninemi, düşük folat seviyeleri ve SAM düzeylerinde azalma görülmektedir (Hyland ve ark., 1988; Kishi ve ark., 1994). Ayrıca, MTHF düzeylerinde azalma ve beyin omurilik sıvısında (BOS) nörotransmitterlerde düşüş tespit edilmektedir (Narisawa ve ark., 1979; Singer ve ark., 1980;).

MTHFR geninde, wild tip (C) ve mutant tip (T) olmak üzere iki protein formuna yol açan bir polimorfizm bulunmaktadır. Wild tip genin (CC) iki kopyasına ya da her birinin (CT) bir kopyasına sahip bireyler, normal folat metabolizmasına sahip gibi görünmektedir (Ganguly ve ark., 2015). MTHFR genindeki yaygın bir polimorfizm olan 677C>T, farklı MTHFR aktivitesi üretir ve özellikle düşük folat durumlarında yüksek homosistein seviyesi ile artmış koroner kalp hastalığı riski ile ilişkilidir (Frosst, 1995; Jacques, 1996; Masud ve Baqai , 2017; Mehlig ve ark., 2014). Toplam kan plazmasındaki homosistein konsantrasyonunun ölçülmesi, MTHFR'deki olası sorunların tespit edilmesine olanak tanımaktadır.

Yapılan çalışmalarda MTHFR polimorfizmi insanlarda özellikle koroner kalp hastalıkları ile olmak üzere esansiyel hipertansiyon (Ilhan ve ark., 2008), miyokard infarktüsü (Ezzat ve ark., 2014), iskemik kalp rahatsızlığı (Husemoen ve ark., 2014), diyastolik kan basıncı (Heifetz ve Birk, 2015), Parkinson (Bialecka ve ark., 2012; Gorgone ve ark., 2012), Down Sendromu (James ve ark., 1999; Hobbs ve ark., 2000), karaciğer hastalıkları (Adinolfi ve ark., 2005 ; Catalano ve ark., 2014; Franco Brochado ve ark., 2013; Sazci ve ark., 2008), erkeklerde infertilite (Wei ve ark., 2012; Wu ve ark., 2011), kadınlarda düşükler (Govindaiah ve ark., 2009; Nair ve ark., 2011) ve yarık damak/dudak (Pezzetti ve ark., 2004) ile de ilişkilendirilmiştir.

### **Hayvan Çalışmaları**

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda An ve ark., (2015) keçilerde g.1951C> T ve g.4800G> A lokuslarındaki mutasyonların süt proteini içeriği üzerinde önemli etkileri olduğunu ve daha yüksek süt proteini içeriği olan bireyleri tanımlamak için marker

destekli seçim için kullanılabilceğini ayrıca MTHFR genindeki genetik varyasyon spektrumunu genişleterek keçi genetik kaynaklarına ve ıslahına katkı sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada ise MTHFR'nin çekirdek promotör bölgesindeki g.680C>A varyantı arasında önemli bir ilişki bulunmuş ve CC genotipinin tavşanlarda yararlı bir üreme belirteci olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Yang ve ark., 2024).

Sığırlarda MTHFR geni polimorfizmleri üzerine yapılan sınırlı sayıdaki çalışma insanlarda homosistein seviyesini etkileyen 677C/T ve 1298C/T mutasyonları sırasıyla ekzon 4 ve ekzon 7 de oldukları için bu bölgelere odaklanılmıştır. Song ve ark. (2011) sığır MTHFR geni ekzon 4 ve ekzon 7 bölgelerini sekanslamışlar ekzon 4 bölgesinde herhangi bir mutasyon bulamazken, ekzon 7 bölgesinde tespit ettikleri 8137C/T (diğer adıyla rs110692574) mutasyonunun Holştayn ırkında homosistein seviyesini etkilediğini ve yavru atmalar (abort) ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Fedota ve ark. (2018) ekzon 7 bölgesi 8137C/T (rs110692574) mutasyonunun farklı ırklardan süt inekleri üzerinde etkilerini araştırdıkları çalışmada, 8137C/T (rs110692574) mutasyonunun kemik mineral yoğunluğu ve buzağılama aralığı üzerine etkilerinin önemli olduğunu tespit etmişlerdir. Preynat ve ark. (2010) Holştayn ırkı ineklerinde laktasyon döneminde kas içi folik asit ve B<sub>12</sub> enjeksiyonunun karaciğer dokusunda MTHFR mRNA'sını arttırma eğiliminde olduğunu bildirmiştir.

MTHFR eksikliği olan farelerin preeklampsi (PE) görülme durumunu araştırmak için yapılan çalışmada normal diyetle beslenen kontrol grubu ve yetersiz folat / yüksek metiyonin bulunan diyetle beslenen çalışma grubu olmak üzere iki gruba ayrılmış ve yapılan incelemeler sonucunda MTHFR eksikliği olan farelerde endotel disfonksiyonu olmasına rağmen, gebelik sırasında hipertansiyon veya proteinüri gelişmediği, yetersiz folat / yüksek metiyonin diyetiyle beslenen farelerde plasenta etkilenmemiş ancak proteinüri, büyüme kısıtlaması ve anne başına yavru sayısında bir azalma olduğu belirtilmiştir. Hiperhomosisteineminin farelerde PE'ye neden olmadığı ancak folat alımının gebelik sonuçlarına etkili olduğu kanısına varılmıştır (Falcao ve ark., 2009).

MTHFR eksikliği olan farelerde kolin tedavisinin davranışsal ve nörokimyasal otistik benzeri fenotip üzerindeki etkisi üzerine yapılan çalışmada MTHFR +/- annelerin yetişkin yavrularına 14 gün boyunca kolin takviyesi verilmesi, hem erkeklerde hem de dişilerde tekrarlayan davranış ve kaygı ile ilgili özellikleri ortadan kaldırdığı ve yalnızca erkek farelerde sosyal davranışı iyileştirdiği belirtilmiştir (Agam ve ark., 2020).

Domuzlarda yapılan bir çalışmada MTHFR geninin 1-2, 6-10 ve 12 lokustaki çift mutasyonunun, semen kalitesini düşürdüğü, spermde oksidatif stresi artırdığı ve bu durumun Landrace erkek domuzlarının semen kalitesini tahmin etmek için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Lai ve ark., 2020). Chen ve ark. (2001), farelerde MTHFR'nin spermatogenezde kritik bir rol oynadığını, Kelly ve ark. (2005) ise spermatogenezin durmasına neden olarak anormal testise ve kısırlığa yol açtığını belirtmişlerdir. Afedo ve ark. (2020) sağlıklı yetişkin sığırların testislerinde genç olanlara kıyasla MTHFR enzimlerinin aktivitelerinin yüksek olduğunu bildirmişler ve bunun spermatogenezin başlangıcı, sürdürülmesi ve spermatozoa üretimi ile bağlantılı olduğunu savunmuşlardır.

İnsanlarda yapılan çalışmalardan yola çıkarak damak-dudak yarığı fazla görülen Pug ve Chihuahuas ırkı köpeklerde folik asit takviyesinin bu duruma etkisini incelemek için yapılan çalışmada takviye sonrası damak-dudak yarığı olan yavru yüzdesi hem Pugs hem de Chihuahua yavrularında azaldığı (sırasıyla %10.86 ve %15.78'e karşı % 4.76 ve % 4.8) belirtilmiştir (Domosławska ve ark., 2013).

Meng ve ark. (2013)'nın yaptığı çalışmada folik asidin kaz karaciğerindeki MTHFR gen ekspresyonu üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

## **2.8. Folat ve Kobalamin Metabolizmasının Sığır Sağlığı ve Verimliliği Üzerindeki Kritik Rolü**

Folat (B<sub>9</sub> vitamini) ve kobalamin (B<sub>12</sub> vitamini) metabolizması, karbon birimlerinin transferinde birbirine sıkıca bağlıdır ve bu vitaminler, birçok temel biyokimyasal süreçte hayati roller üstlenir. Folatlar, pürin ve timidilat sentezi ile metil

gruplarının oluşumunda kritik öneme sahiptir. Bu süreç, kobalamin bağımlı metiyonin sentaz enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Metiyonin sentaz, homosisteini metiyonine dönüştürerek, DNA, kromatin ve histon metilasyonunda kullanılan S-adenozilmetiyoninin üretimine katkıda bulunur.

Kobalamin eksikliği, folatların metillenmiş formda birikmesine neden olarak, özellikle pürin ve timidilat sentezi için gerekli olan diğer aktif folat formlarının azalmasına yol açar (Bässler, 1997; Scott ve Weir, 1981). Kobalamin ayrıca, metiyonin sentaz ve metilmalonil-CoA mutaz gibi iki önemli enzim için koenzim olarak işlev görür. Metilmalonil-CoA mutaz, bazı amino asitlerin ve tek zincirli yağ asitlerinin Krebs döngüsüne girmesini sağlayarak enerji metabolizmasında önemli bir rol oynar (Combs ve McClung, 2017). Düşük folat seviyeleri ise kobalaminin metilmalonil-CoA mutazdaki etkinliğini azaltır (Selhub ve ark., 2007).

Sığırların folat ve kobalamin ihtiyacı, özellikle gebelik, meme bezi gelişimi ve kolostrum üretimi gibi fizyolojik dönemlerde artış gösterir. Kolostrum üretimi sırasında yüksek miktarda folat ve kobalamin salgılanır, bu da laktasyon dönemi boyunca artan metil grubu ihtiyacını karşılamak için hayati öneme sahiptir (Duplessis ve ark., 2015; McFadden ve ark., 2020; Mykkänen ve Korpela, 1981). Bu vitaminlerin yeterli miktarda alınması, hücre üretimi, enerji ve amino asit metabolizması için kritik öneme sahiptir. Folat ve kobalamin eksiklikleri, geçiş dönemi ve erken laktasyon gibi yüksek enerji ve besin ihtiyacı olan dönemlerde süt verimi ve sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratabilir (Duplessis ve ark., 2022a; Graulet ve ark., 2007; Preynat ve ark., 2009a).

Folat ve kobalamin, lipid ve protein metabolizması, nükleotit sentezi, metilasyon reaksiyonları ve muhtemelen redoks durumunun korunmasında da önemli roller üstlenir (Combs ve McClung, 2017). Folik asit takviyelerinin üretim ve metabolik yanıtları, kobalamin seviyeleri tarafından modüle edilir (Selhub ve ark., 2007). Vitamin takviyeleri ile artan laktasyon performansı, süt ineklerinde subklinik folat ve kobalamin eksikliğinin, özellikle yüksek metabolik aktivite dönemlerinde, genellikle negatif enerji ve besin dengesiyle birlikte ortaya çıkabileceğini göstermektedir (Graulet ve ark., 2007; McFadden ve ark., 2020).

Bu eksiklikler mevcut olduğunda, enerji metabolizmasının verimliliği düşer ve enerji dengesine bağlı olarak glukoneogenez veya yağ asidi oksidasyonu gibi süreçlerin verimliliği etkilenebilir (Riedel ve ark., 1999). Ayrıca, subklinik eksiklikler, süt bileşenleri sentezini, özellikle süt kazeini üretimini azaltır ve oksidatif koşullara verilen yanıtları değiştirir (Duplessis ve ark., 2022b). Vitamin takviyelerine karşı üretim ve metabolik yanıtların genliği, her iki vitaminin ihtiyaç ve arz arasındaki fark ile besin ve enerjinin mevcudiyeti tarafından belirlenir (Combs ve McClung, 2017).

Folat ve kobalamin arzını diyet kompozisyonuna dayalı olarak tahmin etmek şu an için gelişim aşamasındadır. Ancak, bu vitaminlerin arzı ve gereksinimleri hakkında daha fazla bilgi edinildikçe, metabolik verimlilik ve besin kullanımını optimize etmek amacıyla süt yemleri için folat ve kobalaminle ilgili önerilerin modele dahil edilmesi mümkün olabilir (Preynat ve ark., 2009b).

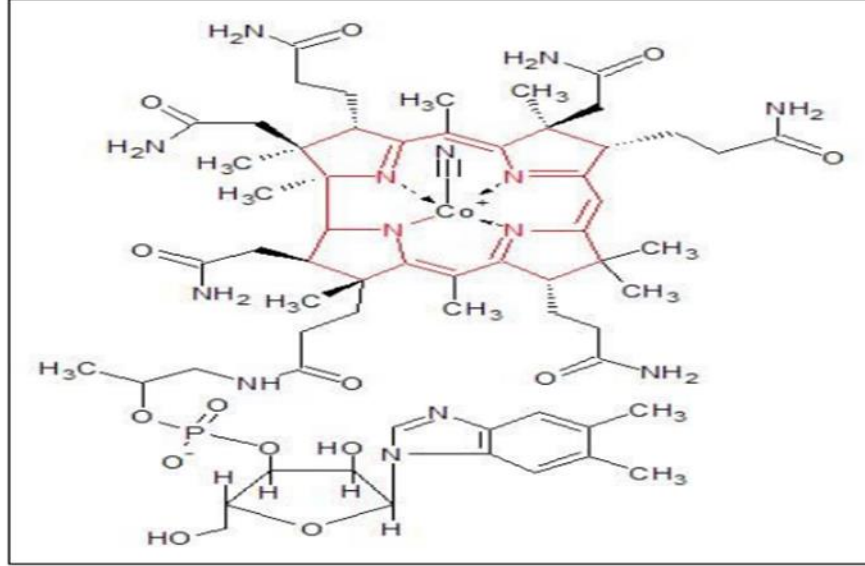
### **2.8.1. B<sub>12</sub> Vitamini (Kobalamin)**

B<sub>12</sub> vitamini, sığırların metabolik süreçlerinde kritik bir role sahip olan bir vitamindir. Özellikle ruminant fizyolojisi açısından, propiyonik asidin glikoza dönüşümü ve eritrositlerin oluşumu gibi temel süreçlerde yer alır (McDowell, 2000). Ruminantlar, B<sub>12</sub> vitaminini rumendeki mikroorganizmalar (Selemonas, Peptostreptococcus ve Butyrivibrio grubu) aracılığıyla sentezlerler (İssi ve ark. 2010). Ancak, bu sentez süreci için kobalt mineralinin yeterli düzeyde bulunması gerekmektedir (Greenfield ve Jones, 2004).

B<sub>12</sub> vitamini, metionin sentaz gibi önemli enzimlerin kofaktörü olarak görev yapar ve bu nedenle protein metabolizmasında da etkilidir (Allen, 2009). Yüksek süt verimi dönemlerinde veya metabolik stres altında, rumende sentezlenen B vitaminleri hayvanın ihtiyacını karşılamakta yetersiz kalabilir (Girard ve Matte, 2005a). Bu durum, süt veriminde düşüşe ve çeşitli metabolik bozukluklara yol açabilir.

B<sub>12</sub> vitamini eksikliği, sığırlarda klinik olarak nadiren görülse de, subklinik eksiklikler hayvanın performansını olumsuz etkileyebilir. Özellikle, kobalt eksikliği

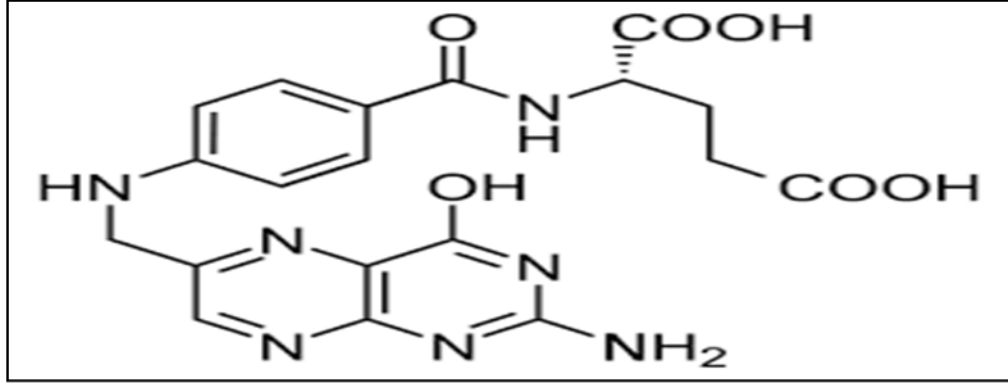
olan bölgelerde yetiştirilen sığırlarda B<sub>12</sub> vitamini takviyesi, büyüme ve süt verimini artırabilir (Grace ve ark., 2014).



**Şekil 2.2.** Vitamin B<sub>12</sub>'nin yapısı (Sönmezışık F., 2009).

### 2.8.2. Folik Asit

Folik asit doğal olarak bulunan folatın sentetik formu olarak isimlendirilir. Bir karbon ünitesinin alıcısı ve donörü olarak folik asit (FA) veya folatlar, metiyonin döngüsü, pürin ve pirimidinlerin sentezi ve böylece nükleik asit sentezi ve onarımı, ayrıca DNA ve histon metilasyonu dahil olmak üzere hücre bölünmesine ve homeostaza katılır (Bailey ve Gregory, 1999; Garcia ve ark., 2016).



Şekil 2.3. Folik asidin yapısı.

Loria-Kohen ve ark. (2013)'nin yaptığı çalışmada sonuçlar, folik asit takviyesinin yeme bozukluğu olan hastalara uygulanan kapsamlı ve multidisipliner tedavide başka bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

İlkinde buzağılayan ineklerin serum folat konsantrasyonlarının çok kez doğum yapan ineklere kıyasla daha düşük olduğunu bulmuşlardır (Girard ve ark., 1995). Ancak Girard ve Matte (1999), yaptıkları çalışmada herhangi bir doğuma yönelik etki tespit edememişlerdir. Bununla birlikte folatların hücre bölünmesinde bir rolü olduğu için (Combs ve McClung, 2017), daha genç hayvanlar bu vitamini kendi büyümeleri için kullanarak daha düşük plazma folat düzeyleri gösterebilirler.

Sun ve ark. (2025)'nin Holştayn ırkı sığırlarda rumen korumalı folik asit ile standart folik asit takviyesinin kullanımı arasındaki farklı araştırdıkları çalışmada rumen korumalı folik asidin ineklerde süt verimini arttırırken hepatik lipid oranında azalmalar sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca folik asit takviyelerinin süt verimini arttırdığı (Graulet ve ark., 2007) ve laktasyonda folik asit ihtiyacının daha fazla olduğunu (Girard ve ark., 2005) belirten çalışmalar da mevcuttur.

Duplessis ve ark. (2020)'nin ABD ve Kanada'daki Holştayn ineklerinde diyet bileşiminin plazma folat ve B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonları üzerindeki etkisini incelemek için yaptıkları çalışmada plazma folat konsantrasyonları diyet lifi konsantrasyonlarıyla (yani, nötral ve asit deterjan fiber ve lignin) azaldığını ve diyet lifi olmayan karbonhidrat konsantrasyonlarıyla arttığını belirtmişlerdir. Duplessis ve

ark. (2023) kan BHBA ve NEFA düzeylerinin geçiş döneminde ineklerdeki folat düzeyiyle negatif ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Duplessis ve ark. (2023) kan BHBA ve NEFA düzeylerinin geçiş döneminde ineklerdeki folat düzeyiyle negatif ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

## **2.9. Esterleşmemiş Yağ Asitleri ve Beta Hidroksi Bütirik Asit**

Süt sığırlarında, özellikle laktasyonun erken döneminde sıkça rastlanan negatif enerji dengesi, hayvanın tükettiği enerjinin, süt üretimi ve diğer fizyolojik ihtiyaçları için harcadığı enerjiden daha az olması durumudur (Smith ve ark., 2020). Bu durum, kandaki glikoz seviyesinin düşmesine ve vücudun yağ dokusundan esterleşmemiş yağ asitlerini mobilize ederek kan dolaşımına salmasına yol açar (Jones ve Brown, 2019). NEFA'lar, enerji kaynağı olarak kullanılır ve süt sentezine katkıda bulunur, ancak karaciğerin işleme kapasitesini aşarsa, triasilgliserol (TAG) formunda karaciğerde birikerek hepatik lipidozise (karaciğer yağlanması) neden olabilir (Anderson ve Miller, 2022; Williams ve ark., 2021).

Artan NEFA ve BHBA seviyeleri, bağışıklık sistemini zayıflatır ve iştahı azaltır (Henderson ve ark., 2020). Ayrıca, keton cisimlerinin aşırı üretimi, yüksek konsantrasyonlarda toksik etkilere yol açabilir (Clark ve ark., 2023). Bu nedenle, buzağılama öncesi ve sonrası dönemlerde serum NEFA ve BHBA seviyelerinin izlenmesi, NED, ketozis ve karaciğer yağlanması gibi metabolik bozuklukların erken teşhisi için kritik öneme sahiptir (Richards ve White, 2017; Stevens ve ark., 2020).

Geçiş dönemindeki sığırlarda NED ve ketozisin belirlenmesinde NEFA ve BHBA yaygın olarak kullanılır (Herdt, 2000). Buzağılamadan bir hafta sonra alınan kan örneklerinde BHBA düzeyleri, hayvan sağlığının değerlendirilmesinde önemli bir göstergedir. BHBA değerinin 0.8-1.0 mmol/L arası subklinik ketozisi, 1.2-1.4 mmol/L arası ise klinik ketozisi işaret eder (Ospina ve ark., 2010). BHBA değeri 19 mg/dL'nin üzerine çıktığında süt veriminde düşüş, 29 mg/dL'nin üzerinde ise klinik ketozis ve tedavi gerekliliği söz konusudur (Oetzel, 2007b). NEFA için eşik değer >0,26 mmol/L olarak belirlenmiş olup, kandaki BHBA'ya oranla %82,54 duyarlılık ve %91,89 özgüllük gösterir (Asl ve ark., 2011; Duffield, 2000).

Sıcaklık stresi, kan parametrelerini etkileyerek NEFA değerini artırabilir (Stefanska ve ark., 2024). Ayrıca, çok doğum yapmış süt ineklerinde buzağılama öncesi iskelet kası rezervleri ve dallı zincirli uçucu yağ asitleri takviyesi, glikoz seviyesini düşürürken BHBA seviyesi üzerinde belirgin bir etki göstermeyebilir (Gouveia ve ark., 2024). Bu bulgular, NED ve ketozis yönetiminde çeşitli faktörlerin dikkate alınmasının önemini vurgulamaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Polimorfizmlerin Belirlenmesinde Kullanılan Malzemeler

##### **Makine-Teçhizat**

UV Jel görüntüleme

Elektroforez

Hassas Terazı

Mikrosantrifüj

Mikrodalga Fırın

Thermal Cyclers

Vorteks

Otomomatik Mikropipetler

Buzdolabı

Derin Dondurucu

PCR Cihazı

##### **Kimyasal Malzemeler**

Etil alkol

DNA İzolasyon kiti

JelRed

Agaroz

Primerler

Master Mix

##### **Tampon Çözeltiler**

TBE (Tris Borik Asit EDTA)

##### **Plastik Malzemeler**

Mikrosantrifüj tüpleri

Pipet uçları

### 3.2. Hayvan Materyali ve Örnek Toplama

Bu çalışmanın hayvan materyalini, Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği'ne bağlı işletmelerde yetiştirilen Holştayn ırkı inekler oluşturmuştur. Araştırma, genetik tarama ve deneysel uygulama olmak üzere iki aşamalı olarak planlanmış ve yürütülmüştür.

İlk aşamada, Türkiye'de yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlarda MTHFR geni rs110692574 polimorfizmine ait T allelinin frekansı bilinmediğinden ve literatürde bildirilen oranlardan (Song ve ark., 2011; Fedota ve ark., 2018) daha düşük olabileceği göz önünde bulundurularak, iki farklı işletmeden toplam 356 süt ineği genetik taramaya tabi tutulmuştur. Bu amaçla kullanılan kan örnekleri, araştırma ekibi tarafından doğrudan alınmamış olup, işletmelerin rutin bulaşıcı hastalık taramaları sırasında, hayvanlara ek bir prosedür uygulanmaksızın elde edilen ilave tüpler yoluyla araştırma birimine ulaştırılmıştır.

Genetik tarama sonuçlarına göre, T allelini taşıyan (CT genotipli) hayvanlar öncelikli olarak seçilmiş ve bu doğrultuda 25 CT ile 55 CC genotipine sahip toplam 80 hayvandan oluşan bir araştırma grubu oluşturulmuştur. Bu hayvanlar, uygulanan yem katkı maddesine göre kolin (CH) ve kolin+metiyonin (CH+MET) olarak da sınıflandırılmıştır. Her bir hayvandan, buzağılamadan 21 gün önce (-21. gün), buzağılama günü (0. gün) ve buzağılamadan 21 gün sonra (+21. gün) olmak üzere üç farklı zamanda kan örnekleri alınmıştır.

Hayvanlara ait doğum tarihi, buzağılama tarihi, laktasyon sırası, süt verim kayıtları ve bazı sağlık problemlerine ilişkin veriler, işletmelerin sürü yönetim programı ve sağım sistemine bağlı dijital veri tabanından temin edilmiştir. Ayrıca, buzağılamayı takiben 7. ve 14. günlerde ölçülen BHBA değerleri işletme kayıtlarından alınmıştır.

Araştırmanın planlama aşamasında, toplam 500 hayvanda genetik tarama yapılması ve elde edilecek sonuçlara göre deneysel uygulamalara dahil edilecek 120 hayvanın belirlenmesi öngörülmüş; bu kapsamda 28.04.2022 tarihli ve 2022/3-3 sayılı Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınmıştır (Ek 1). Etik kurul başvuru formunda; araştırmanın özeti, hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek işlemler, 3R ilkesinin uygulanması ve hayvan seçimi gibi bölümlerde 500 hayvanda genetik tarama yapılacağı açıkça belirtilmiştir. Ancak etik kurul onay belgesinin yalnızca deneysel aşamada kullanılacak 120 hayvanı kapsayacak şekilde düzenlendiği, onay sürecinden sonra yapılan belge incelemesi sırasında fark edilmiştir. İlk değerlendirmede, genetik tarama örneklerinin işletmelerde yürütülen rutin bulaşıcı hastalık taramaları sırasında alınacak olması nedeniyle, bu aşamanın deneysel müdahale kapsamı dışında değerlendirildiği ve bu nedenle etik onaya dâhil edilmediği düşünülmüştür. Süreç içerisinde yapılan yeniden değerlendirmelerde, başvuru formundaki bazı ifadelerin farklı şekillerde yorumlanmış olabileceği ihtimali de dikkate alınarak, etik kurula resmi bildirim yapılmıştır. Söz konusu bildirimde, başvuru formunun çeşitli bölümlerinde 500 hayvanda genetik tarama yapılacağına açıkça belirtildiği vurgulanmış; genetik tarama sonuçlarının da çalışmada kullanılacağı ifade edilerek toplam hayvan sayısının 500 olarak düzeltilmesi talep edilmiştir. Bu doğrultuda, 27.02.2025 tarihli ve 2025/2-11 sayılı ek etik kurul kararıyla çalışmanın kapsamı 500 hayvanı içerecek şekilde güncellenmiştir (Ek 2). Bu karar yalnızca kapsam düzeltilmesini içermekte olup, çalışmanın yürütüldüğü tarih aralığı (25.09.2022–25.09.2025) ilk etik onayda belirtildiği şekilde korunmuştur. Süreç, etik kurallar çerçevesinde uygun biçimde tamamlanmıştır.

Araştırma süreci, hayvan hakları ve refahı ile bilimsel etik ilkeler dikkate alınarak yürütülmüştür. Bu doğrultuda, 3R ilkeleri çerçevesinde ve çok aşamalı bir etik değerlendirme süreci uygulanmıştır.

### **3.3. Deneme Düzeni**

Çalışmada yer alan hayvanlar, MTHFR genotiplerine göre ve rasyonlarına eklenen yem katkı maddeleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Buna göre hayvanlar, CC genotipi ve CT genotipi ile kolin (CH) ve kolin + metiyonin

(CH+MET) takviyesi uygulanan işletmeler bakımından değerlendirilerek toplam dört gruba ayrılmıştır.

Çalışma süresince hayvanlar, günde 15 gram rumen korumalı kolin klorür içeren yem katkısı ile beslenen CH grubu ile, günlük 40 gram rumen korumalı kolin klorür ve 25 gram rumen korumalı metiyonin içeren yem katkısı ile beslenen CH+MET grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

Çalışmanın yürütüldüğü CH grubunda, 100 gramında 7.5 gr kolin klorid içeren yem katkı maddesi (1 mg vitamin B<sub>12</sub>, 140 mg vitamin B<sub>1</sub>, 120 mg vitamin B<sub>2</sub>, 105 mg vitamin B<sub>6</sub>, 32 mg folik asit ve 3000 mg niasin içeren karışım), buzağılamadan önceki 3 hafta ile buzağılamadan sonraki 3 hafta boyunca 200 gram/inek/gün dozunda kullanılmıştır.

CH+MET grubunda ise 100 gramında 40 gr kolin klorid ve 25 gr metiyonin içeren yem katkı maddesi (35 kg kepek, 25 kg metiyonin ve 40 kg kolin kullanarak hazırlanan karışım), buzağılamadan önceki 3 hafta ile buzağılamadan sonraki 3 hafta boyunca 100 gram/inek/gün dozunda kullanılmıştır.

İki grupta da kullanılan rasyonların besin madde içerikleri Tablo 3.1'de ham madde içerikleri Tablo 3.2'de sunulmuştur. Bu iki gruptaki hayvanlar ayrıca genotiplerine göre CC ve CT olarak sınıflandırılmış ve süt verimi ile bazı biyokimyasal kan parametreleri üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 3.1.** CH ve CH+MET gruplarında kullanılan rasyonların besin madde içerikleri

Besin Madde İçerikleri	CH		CH+MET	
	Kuru Dönem (KM)	Laktasyon (KM)	Kuru dönem (KM)	Laktasyon (KM)
NDF %	41,00	34,00	49,90	31,40
ADF %	24,80	19,80	30,50	19,00
HP %	15,30	17,00	14,40	17,00
HY %	2,20	3,30	2,77	5,59
HK %	7,10	7,40	8,55	8,32
LOK %	34,4	38,3	24,2	37,76
Ca %	0,90	0,70	0,80	0,74
P %	0,30	0,50	0,40	0,39
Vitamin E, mg/kg	-	-	94,7	19,9
NEL	1,49	1,58	1,26	1,66

LOK: Lif Olmayan Karbonhidrat, 100- (%NDF + %HP + %HY + %HK), NEL: Net Enerji Laktasyon, KM: Kuru Madde.

**Tablo 3.2.** CH ve CH+MET gruplarında kullanılan rasyonların hammadde içerikleri

Yem Maddeleri	CH		CH+MET	
	Kuru Dönem	Laktasyon	Kuru Dönem	Laktasyon
Saman	13.64	-	31.13	1.88
Buğday Silajı	-	12.68	9.61	5.12
Mısır Silajı	45.45	46.50	9.34	23.22
Yonca Otu	-	2.11	-	13.34
Konsantre Yem Karması	40.91 <sup>1</sup>	32.43 <sup>2</sup>	49.92 <sup>3</sup>	54.35 <sup>4</sup>

1: Konsantre yem karması; kuru mısır, soya küspesi, toksin bağlayıcı, vitamin- mineral premiksi, mermer tozu ve amonyum klorür içerir.

2: Konsantre yem karması; nemli mısır, arpa ezme, soya küspesi, DDGS, kanola küspesi, mermer tozu, tuz, Vitamin- mineral premiksi içerir.

3: Konsantre yem karması; kuru yemi, mısır flake, soya kabuğu, vitamin- mineral premiksi ve amonyum klorür içerir.

4: Konsantre yem karması; süt yemi, mısır flake, melas, soya kabuğu, bypass yağ, soda ve vitamin- mineral premiksi içerir.

### 3.4. DNA İzolasyonu

Dönem içinde toplanan kan örneklerinin DNA izolasyonu spin kolon bazlı ticari DNA izolasyon kiti (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyon protokolü aşağıda sunulmuştur.

#### **Kan lizati:**

1. İzolasyona başlamadan önce 55 °C’de bir ısı bloğu ayarlanmıştır.
2. -20 °C’de saklanan kan numuneleri çözdürülüp, steril bir mikrosantrifüj tüpüne 200 µL eklenmiştir.
3. Örneğe 20 µL Proteinaz K eklenmiştir.
4. Numuneye 20 µL kitle birlikte verilen RNase A eklenmiş ve ardından kısa bir vorteks yapılmış, iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
5. 200 µL genomik lizis solüsyonu eklenmiş ve homojen bir çözelti elde etmek için vortekslenerek iyice karıştırılmıştır.
6. Protein sindirimini desteklemek için 55 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyondan alınan lizata 200 µL %96–100 etanol eklenmiş ve homojen bir çözelti elde etmek için 5 saniye vorteksleyerek iyice karıştırılmıştır.

#### **DNA bağlama:**

1. Toplama tüpündeki spin kolon paketten çıkarılmıştır.
2. Genomik lizis solüsyonu ve etanol ile hazırlanan lizat spin kolona eklenmiştir.
3. Spin kolon oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10.000 × g’de santrifüjlenmiştir.
4. Toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atılarak spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

#### **DNA yıkama:**

1. Spin kolona etanol ile hazırlanmış 500 µL wash buffer 1 eklenmiştir.

2. Spin kolon oda sıcaklığında 10.000 x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
3. Toplama tüpü tekrar atılarak spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
4. Spin kolona etanol ile hazırlanmış 500 µL wash buffer 2 eklenmiştir.
5. Spin kolon oda sıcaklığında 3 dakika maksimum hızda santrifüjlenmiş ve toplama tüpü atılmıştır.

#### **DNA elüsyonu:**

1. Spin kolon 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
2. Spin kolona 50 µL elüsyon tamponu eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir.
3. Spin kolona oda sıcaklığında 1 dakika maksimum hızda santrifüjlenmiştir (tüp saflaştırılmış genomik DNA içerir).
4. 2. adım tekrarlanmıştır.
5. Spin kolon, oda sıcaklığında 1.5 dakika maksimum hızda santrifüjlenmiştir.
6. Saf DNA mikrosantrifüj tüpüne toplanmış olduğu için Spin kolon çıkarılmış ve atılmıştır.

PCR aşamasında saflaştırılmış DNA'nın hemen kullanılabilmesi ve DNA'nın tekrar tekrar dondurulup ve çözülmesini önlemek amacıyla örnekler öncelikle 4 °C'de saklanmıştır. İşlemi tamamlanan örnekler ise uzun süreli saklama için -20 °C'ye alınmıştır.

### **3.5. MTHFR Geni Analizi**

Hayvanların MTHFR geni ekzon 7 bölgesi 8137C/T (rs110692574) polimorfizmi yönünden sahip oldukları genotipler tetra-primer ARMS-PCR (Dört primerli Amplifikasyon Dirençli Mutasyon Sistemi – Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile tespit edilmiştir. Moleküler analizler Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir

### 3.6. PCR Analizi

Bu proje kapsamında, 8137C/T (rs110692574) polimorfizminin tetra-primer ARMS-PCR yöntemi (Medrado ve De Oliveira, 2014) ile tespit edilmesi hedeflenmiştir. Primer tasarım sürecinde, Primer1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) ve BatchPrimer3 (<https://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>) web tabanlı araçlarından yararlanılmış olup, tasarlanan primerler Tablo 3.3'te sunulmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) optimizasyon çalışmaları sonucunda, Tablo 3.4'te detaylandırılan koşullar altında başarılı bir amplifikasyon profili elde edilmiştir.

**Tablo 3.3.** Tetra-ARMS primerler ve nükleotid dizileri.

Primer adı	5'-3' Nükleotid Dizisi
MTHFR-C-F <sup>1</sup>	ACCAGTGAGGAAAGCGTCGTC
MTHFR-C-R <sup>1</sup>	ACACGGTGACAAGACTCAGGGTAG
MTHFR-T-F <sup>1</sup>	TGGGGAGCTGAAGGACTACTACCT
MTHFR-T-R <sup>2</sup>	GAGGTAGTGGGCAAAGACTTGA

<sup>1</sup>: <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html> , <sup>2</sup>: <https://probes.pw.usda.gov/batchprimer3>

**Tablo 3.4.** PCR bileşenleri ve termal döngü koşulları.

PCR Bileşenleri	Miktar	Termal Döngü Koşulları
Genomik DNA	0.7 µl <sup>a</sup> - 0.9 µl <sup>b</sup>	94 °C'de 5 dk.
MTHFR-C-F primeri	0.14 µl	94 °C'de 30 sn.
MTHFR-C-R primeri	0.14 µl	62.7 <sup>c</sup> -62.5 <sup>d</sup> °C'de 30 sn.
MTHFR-T-F primeri	0.23 µl	72 °C'de 35 sn.
MTHFR-T-R primeri	0.23 µl	72 °C'de 7 dk.

<sup>a</sup>. C primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonunda kullanılan genomik DNA miktarı.

<sup>b</sup>. T primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonunda kullanılan genomik DNA miktarı.

<sup>c</sup>. C primerlerinin kullanıldığı PCR protokolündeki bağlanma sıcaklığı.

<sup>d</sup>. T primerlerinin kullanıldığı PCR protokolündeki bağlanma sıcaklığı.

PCR amplifikasyonu, MTHFR geni için C ve T allelerine yönelik iki ayrı şekilde gerçekleştirilmiştir. C alleli için PCR bileşenleri; 1.75 µL DNA, 0.35 µL primer (Reverse ve Forward, Oligomer Biotechnology, Ankara, Türkiye), 10 µL 2X Taq DNA polymerase master mix (Ampliqon Inc., Odense, Danimarka) ve 7.55 µL nuclease-free water (Ambion Inc., Austin, TX, USA) iken, T alleli için PCR bileşenleri; 2.25 µL DNA, 0.57 µL primer (Reverse ve Forward, Oligomer Biotechnology, Ankara, Türkiye), 10 µL 2X Taq DNA polymerase master mix (Ampliqon Inc., Odense, Danimarka) ve 6.6 µL nuclease-free water (Ambion Inc., Austin, TX, USA) kullanılmıştır.

Bu çalışmada, sığırlarda MTHFR genine ait eş anlamlı (sinonim) bir C→T nükleotid değişimini belirlemeye yönelik primer dizileri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanmıştır. Hedef bölge, Bos taurus 16. kromozom (BTA 16) üzerinde yer almakta olup, varyantın tespiti amacıyla iki ayrı primer çifti tasarlanmıştır (Tablo 3.5). Tasarımı yapılan primer çiftleri, genotiplendirme çalışmalarında hedef varyant bölgesinin özgül olarak çoğaltılmasını sağlamak üzere seçilmiş olup, PCR optimizasyonları primer özellikleri dikkate alınarak yürütülmüştür.

**Tablo 3.5.** PCR analizinde kullanılan primerlerin nükleotid dizileri.

Kromozom	Gen	Varyant Tipi	Primer (Sekans 5'-3')	Kromozomal Pozisyonları	Amplikon Büyüklüğü (Bp)	Tm (°C)
BTA 16	MTHFR	Eş anlamlı C→T nükleotid değişimi	CF: ACCAGTGAGGAAAGCGTCGTC	BTA16:41217697-41217717	155	62.61
			CR: ACACGGTGACAAGACTCAGGGTAG	BTA16:41217851-41217828		63.86
			TF: TGGGGAGCTGAAGGACTACTACCT	BTA16:41883754-41883777	127	63.99
			TR: GAGGTAGTGGGCAAAGACTTGA	BTA16:41883880-41883859		59.96

BTA: Bos Taurus Autosome

### **3.7. Jel Elektroforezi**

PCR ürünleri, % 1.5 agaroz içeren bir jel kullanılarak agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Elektroforez tamponu olarak kullanılan TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu, 10X stok çözeltisinden distile su ile 1/10 oranında seyreltilerek 1X çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

Agaroz jel hazırlanırken, gerekli miktarda toz agaroz hassas terazide tartılarak otoklav şişesine aktarılmıştır. Jel hazırlığında buharlaşma ile oluşabilecek hacim kaybı göz önünde bulundurularak üzerine uygun hacimde 1X TBE tamponu eklenmiştir. Agaroz çözeltisi, 550 W gücünde bir mikrodalga fırında tamamen çözülüp berrak bir çözelti elde edilene kadar, yaklaşık 4-5 dakika süreyle ısıtılmış ve ardından oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Yaklaşık 60 °C'ye kadar soğuyan çözeltiye, çeker ocak altında GelRed nükleik asit boyası eklenmiş ve homojen hale gelene kadar yavaş yavaş karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım, önceden taraklar yerleştirilmiş olan jel kalıbına (tray) dökülmüş ve PCR ürünlerinin elektroforezi sonucunda bant deformasyonlarını önlemek amacıyla hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilmiştir. Jel tamamen katılaştıktan sonra, kuyucukların zarar görmemesi için tarak dikkatlice çıkarılmıştır. Hazırlanan jel, önceden 1X TBE tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirilmiştir. PCR amplifikasyon ürünleri, jel üzerindeki kuyucuklara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, güç kaynağı 70 V'a ayarlanarak başlatılmış ve yaklaşık 1 saat süresince yürütülmüştür. İşlem tamamlandıktan sonra, DNA bantları jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiş ve analiz edilmiştir.

### **3.8. Genotiplerin Belirlenmesi**

Elektroforez işleminde, aynı örneğe ait C ve T allellere yönelik iki PCR ürünü, yan yana iki kuyucuğa yüklenmiş ve her iki kuyucukta oluşan bantların sayı ve büyüklüklerine göre örneklerin genotipleri belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Elektroforez analizi sonucunda, örneklerde C alleleline özgü 155 bp ve T alleleline özgü 127 bp büyüklüğündeki fragmentlerin varlığına göre genotip tayini yapılmıştır. Jel

görüntüsünde hem C hem de T alleleine özgü bantların birlikte gözlenmesi heterozigot CT genotipini, yalnızca C alleleine özgü bantın gözlenmesi homozigot doğal (wild tip) CC genotipini, yalnızca T alleleine özgü bantın gözlenmesi ise homozigot mutant TT genotipini göstermiştir. PCR sonuçlarının güvenilirliğini sağlamak amacıyla her amplifikasyon setine bilinen CC ve CT genotipli örnekler de eklenmiştir.

Genotip ve allel frekansları elle sayım yöntemi ile belirlenmiştir. Her grup için gözlenen heterozigotluk değerleri, Hardy-Weinberg modeline göre beklenen değerlerle karşılaştırılmış ve  $\chi^2$  testi uygulanmıştır (Tablo 4.1).

### **3.9. DNA Dizi Analizi**

Tetra-ARMS yöntemiyle gerçekleştirilen PCR'ın doğruluğunu değerlendirmek amacıyla, her üç genotipi temsil eden toplam 8 örnek DNA dizi analizine gönderilmiştir. Elde edilen elektroferogram dosyaları, DNA Baser v3.5.1 yazılımı (Heracle BioSoft SRL, Romanya) kullanılarak hizalanmış ve karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.2).

### **3.10. Biyokimyasal Analizler**

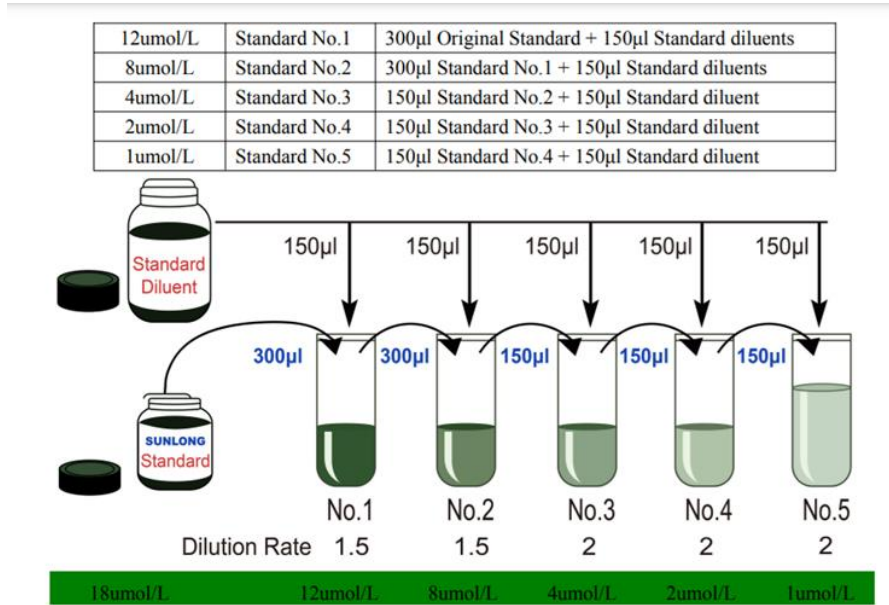
Homosistein, vitamin B<sub>12</sub>, folik asit ve NEFA değerleri için, buzağılamadan 21 gün önce (-21), buzağılama anında (0) ve buzağılamadan 21 gün sonra (+21) sarı kapaklı jel içeren tüplere (Serum Separator Tube – SST) kan örnekleri alınmıştır. Toplanan örnekler, 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edilmiştir. Serum örnekleri, analizler yapıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca, işletmelerin kayıtlarından buzağılamayı takiben 7. ve 14. günlerde ölçülen BHBA değerleri temin edilmiştir.

Homosistein düzeyleri (mmol/L), Bovine Homocysteine ELISA Kit (Sunlong, SL0319Bo) kullanılarak enzim immünoassay yöntemi ile analiz edilmiştir. Folat (ng/mL) ve vitamin B<sub>12</sub> (pg/mL) düzeylerinin tayini hizmet alımı yoluyla

gerçekleştirilmiştir. Analizler sırasıyla fotometrik ve kemilüminesans yöntemlerle, Abbott Architect i8200 marka cihaz (Abbott Diagnostics, ABD) kullanılarak yapılmıştır. NEFA (Non-Esterified Fatty Acids,  $\mu\text{mol/L}$ ) düzeyleri ise yine hizmet alımı kapsamında, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Ölçümler, Randox marka cihaz (Randox Laboratories Ltd., Birleşik Krallık) ile gerçekleştirilmiştir.

### Bovine Homosistein ELISA Uygulama Protokolü;

1. Standartların Seyreltilmesi; öncelikle standardı küçük tüplerle seyreltilip, ardından her tüpten 50ul hacmini mikro plaka kuyusuna pipetlemiş ve her tüp için iki kuyu olmak üzere toplamda on kuyu kullanılmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Standartların seyreltilmesi.

2. Microelisa stripplate'te, boş kontrol olarak bir kuyuyu boş bırakılmış, örnek kuyularına, 40 $\mu\text{l}$  Örnek seyreltme tamponu ve 10 $\mu\text{l}$  örnek eklenmiştir. Ardından hafifçe çalkalayarak iyice karıştırılmıştır.
3. İnkübasyon: Kapatma plakası membranı (Closure plate membrane) ile kapatıldıktan sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

4. Seyreltme: Konsantre yıkama tamponu prosedürde belirtildiği gibi 30 kat distile suyla seyreltilmiştir. (96T için 30 kat, 48T için 20 kat).
5. Yıkama: Kapatma plakası membranını dikkatlice soyulmuş, aspire edilmiş ve yıkama solüsyonuyla doldurulmuştur. Yıkama solüsyonunu 30 saniye dinlendirdikten sonra atılmıştır ve bu yıkama prosedürü 5 kez tekrarlanmıştır.
6. Boş kontrol kuyusu hariç her kuyuya 50 µl HRP-Konjugat reaktifi eklenmiştir.
7. Adım 3'te açıklandığı gibi inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
8. Adım 5'te açıklandığı gibi yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
9. Boyama: Her kuyuya 50 µl Kromojen Çözeltisi A ve 50 µl Kromojen Çözeltisi B eklenmiş, hafifçe çalkalayarak karıştırılmış ve 37 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Boyama sırasında ışıktan kaçınılmaya özen gösterilmiştir.
10. Sonlandırma: Reaksiyonu sonlandırmak için her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir. Bunun sonucunda prosedürde belirtildiği gibi kuyudaki renk maviden sarıya dönmüştür (Şekil 3.2. A).



**Şekil 3.2.** ELISA aşamaları. A: durdurma solüsyonu eklenmesinin sonucu kuyudaki rengin maviden sarıya dönmesi, B: ELISA plaka okuyucu.

11. Bir Mikrotiter Plaka Okuyucusu (Şekil 3.2. B) kullanarak 450 nm'de absorbans OD'yi okutulmuş, boş kontrol kuyusunun OD değeri sıfır olarak ayarlanmıştır. Analiz, durdurma solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika içinde gerçekleştirilmiştir.
12. Orijinal HCY konsantrasyonunu hesaplamak için prosedürde belirtildiği gibi okuyucunun verdiği sonuçlar 5 ile çarpılarak değerlendirmeye alınmıştır.

### 3.11. Süt Verimi ve Üreme Performansı Kayıtlarının Temini

Hayvanlara ait 305 günlük süt verim kayıtları, sağım sisteminden dijital olarak elde edilmiştir. 100 ve 200 günlük süt verimleri ise sağım sisteminde kaydedilen günlük süt verimlerinin toplanmasıyla hesaplanmıştır. CH ve CH+MET grubundaki hayvanların doğum tarihleri, buzağılama tarihleri, buzağılama yaşı, tohumlama sayısı ve laktasyon sayısı gibi veriler de dijital ortamda işletme kayıt sisteminden alınmıştır. Ayrıca, CH grubunda genotipleri belirlenen hayvanlara ait, verim kaybına neden olan bazı sağlık sorunlarına ilişkin kayıtlar da temin edilmiştir.

### 3.12. Veri Analizi

MTHFR genotipleri ile kullanılan yem katkı maddesi gruplarının geçiş dönemi -21., 0. ve +21. günlerde ölçülen biyokimyasal kan parametreleri (homosistein, folik asit, vitamin B<sub>12</sub> ve NEFA) üzerine zaman faktörüne bağlı etkileri, tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi yöntemiyle değerlendirilmiştir. BHBA düzeyine ilişkin zaman faktörüne bağlı etkiler ise, buzağılamadan sonraki 7. ve 14. günlerde yapılan ölçümler doğrultusunda analiz edilmiştir. Bu analizler, hem genotip hem de yem katkı maddesi grupları yönünden ayrı ayrı yürütülmüştür. Kullanılan matematiksel modele, buzağılama yaşı ve laktasyon sayısı kovaryans olarak eklenmiştir.

MTHFR genotipleri ile kullanılan yem katkı maddesi gruplarının, bazı biyokimyasal kan parametreleri ile süt verim özellikleri üzerindeki etkileri genel lineer model (GLM) ile analiz edilmiştir. Kullanılan matematiksel modeller aşağıda sunulmuştur. Çoklu karşılaştırmalarda oluşabilecek Tip I hata riskini azaltmak amacıyla her iki analizde de Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır.

MTHFR genotiplerinin süt sığırlarında verim kaybına neden olan bazı sağlık sorunları üzerindeki etkisi incelenirken, öncelikle Pearson Ki-kare testi uygulanmıştır. Ancak, hücrelerden birinde beklenen frekansın 5'in altında durumunda Fisher'in Kesin Testi esas alınmıştır.

Genotip frekansları kullanılarak Hardy-Weinberg dengesi test edilmiştir. Allel ve genotip frekansları manuel olarak hesaplanmış ve  $\chi^2$  testi ile değerlendirilmiştir.

MTHFR genotiplerinin (CC ve CT), süt sığırlarında verim kaybına yol açan bazı sağlık problemleriyle ilişkili dağılımı, veri tabloları kullanılarak yapay zekâ destekli analiz yöntemleriyle görselleştirilmiştir (Şekil 4.13). Ayrıca, tekrarlayan ölçümlere ait varyans analizi sonuçlarının görselleştirilmesinde, SPSS 30 yazılımında oluşturulan grafikler kullanılmıştır (Şekil 4.3–Şekil 4.12).

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 30 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

*Biyokimyasal kan parametreler için kullanılan matematiksel model;*

$$Y_{ijklmn} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + f_m + e_{ijklmn} \text{ şeklinde olup,}$$

bu modelde yer alan terimlerden

$Y_{ijklmn}$  = herhangi bir ineğin -21., 0., +21.gün biyokimyasal kan parametresi

$\mu$  = popülasyonun beklenen ortalaması,

$a_i$  = i. genotip etki miktarını,

$b_j$  = j. hayvanın yaşı etki miktarını,

$c_k$  = k. laktasyon sırası etki miktarı (1, 2, 3),

$d_l$  = l. örnek alınma mevsimi etki miktarı,

$f_m$  = m. yem katkı maddesi etki miktarı,

$e_{ijklmn}$  = incelenen faktörler dışındaki faktörlerin etki miktarını (hata terimi) temsil etmektedir.

*Süt verimi için kullanılan matematiksel model;*

$$Y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + e_{ijklm} \text{ şeklinde olup,}$$

bu modelde yer alan terimlerden

$Y_{ijklm}$  = herhangi bir ineğin 100, 200 ve 305 günlük süt verimi (1., 2., 3.

Laktasyon)

$\mu$  = popülasyonun beklenen ortalaması,

$a_i$  = i. genotip etki miktarını,

$b_j$  = j. buzağılama yaşı etki miktarını,  
 $c_k$  = k. buzağılama mevsimi etki miktarını  
 $d_l$  = l. yem katkı maddesi etki miktarını,  
 $e_{ijklm}$  = incelenen faktörler dışındaki faktörlerin etki miktarını (hata terimi)  
temsil etmektedir.

*Tohumlama sayısı için kullanılan matematiksel model;*

$Y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + e_{ijklm}$  şeklinde olup,  
bu modelde yer alan terimlerden  
 $Y_{ijklm}$  = herhangi bir ineğin tohumlaması,  
 $\mu$  = popülasyonun beklenen ortalaması,  
 $a_i$  = i. genotip etki miktarını,  
 $b_j$  = j. yem katkı maddesi etki miktarını,  
 $c_k$  = k. buzağılama yaşı etki miktarını  
 $d_l$  = l. buzağılama mevsimi etki miktarını,  
 $e_{ijklm}$  = incelenen faktörler dışındaki faktörlerin etki miktarını (hata terimi)  
temsil etmektedir.

*İlkine buzağılama yaşı için kullanılan matematiksel model;*

$Y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + c_k + e_{ijkl}$  şeklinde olup,  
bu modelde yer alan terimlerden  
 $Y_{ijkl}$  = herhangi bir ineğin ilkinde buzağılama yaşı,  
 $\mu$  = popülasyonun beklenen ortalaması,  
 $a_i$  = i. genotip etki miktarını,  
 $b_j$  = j. yem katkı maddesi etki miktarını,  
 $c_k$  = k. buzağılama mevsimi etki miktarını,  
 $e_{ijkl}$  = incelenen faktörler dışındaki faktörlerin etki miktarını (hata terimi)  
temsil etmektedir.

*Buzağılama aralığı için kullanılan matematiksel model;*

$Y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + e_{ijklm}$  şeklinde olup,  
bu modelde yer alan terimlerden  
 $Y_{ijklm}$  = herhangi bir ineğin buzağılama aralığı

$\mu$  = popülasyonun beklenen ortalaması,  
 $a_i$  = i. genotip etki miktarını,  
 $b_j$  = j. yem katkı maddesi etki miktarını,  
 $c_k$  = k. buzağılama mevsimi etki miktarını,  
 $d_l$  = l. buzağılama yaşı etki miktarını,  
 $e_{ijklm}$  = incelenen faktörler dışındaki faktörlerin etki miktarını (hata terimi) temsil etmektedir.

Elde edilen veriler; genotip, kullanılan yem katkısı, ilk buzağılama yaşı (gün), ikinci buzağılama yaşı (gün), üçüncü buzağılama yaşı (gün), buzağılama mevsimi, hayvanın yaşı ve örnek alınma mevsimi olmak üzere aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır.

Genotip: 1. grup: CC genotipi, 2. grup: CT genotipi.

Hayvanın yaşı (örnek toplama tarihine göre): Sığırlar aşağıdaki yaş gruplarına ayrılmıştır: 1. grup: 666–1308 gün, 2. grup: 1309–1540 gün, 3. grup: 1541–1690 gün, 4. grup: 1691–2630 gün arası.

Laktasyon sırası: 1. grup: birinci ve ikinci laktasyon, 2. grup: üçüncü laktasyon, 3. grup: dördüncü ve beşinci laktasyon dönemi.

Yem katkı maddesi: 1. grup: kolin katkısı kullanan grup, 2. grup: kolin+metiyonin katkısı kullanan grup

Örnek alınma mevsimi: 1. grup: Aralık-Ocak-Şubat, 2. grup: Mart-Nisan-Mayıs, 3. grup: Haziran-Temmuz-Ağustos, 4. grup: Eylül-Ekim-Kasım

Buzağılama yaşı gün

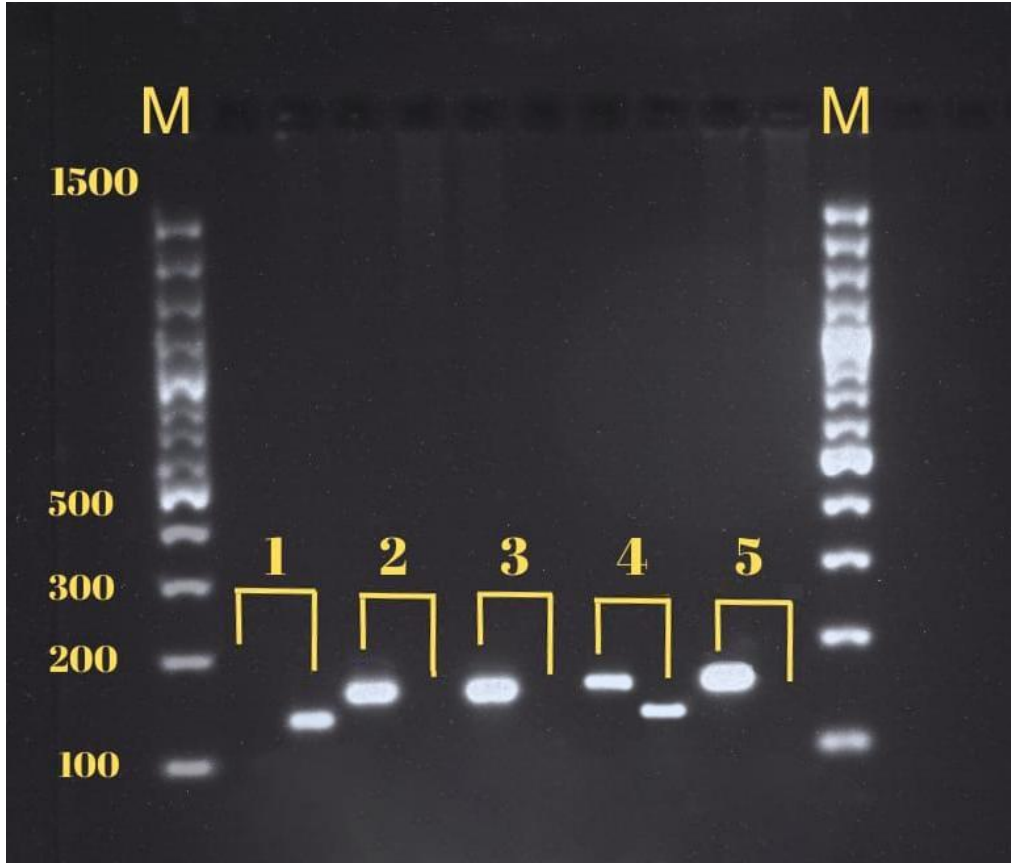
- 1. Laktasyon: 1. grup: 640-699 gün arası, 2. grup: 700-739 gün arası, 3. grup: 740-799 gün arası, 4. grup: 800-1414 gün arası.
- 2. Laktasyon: 1. grup: 890-1106 gün arası, 2. grup: 1110-1199 gün arası, 3. grup: 1200-1300 gün arası, 4. grup: 1301-1765 gün arası.
- 3. Laktasyon: 1256-1500 gün arası, 2. grup: 1501-1556 gün arası, 3. grup: 1560-1677 gün arası, 4. grup: 1701-2226 gün arası.

Buzağılama mevsimi: 1. grup: Aralık-Ocak-Şubat, 2. grup: Mart-Nisan-Mayıs, 3. grup: Haziran- Temmuz-Ağustos, 4. grup: Eylül-Ekim- Kasım

## 4. BULGULAR

### 4.1. Genotiplerin Belirlenmesi

Elektroforez sonucunda örneklerde C alleleine özgü 155 bp ve T alleleine özgü 127 bp büyüklüğündeki fragmentlerin varlığına göre genotipler belirlenmiştir. Jel görüntüsünde bir örnekte C ve T alleleine özgü bantların her ikisinin de görülmesiyle heterozigot CT, sadece C alleleine özgü bandın görülmesi durumunda homozigot doğal (wild) tip CC, sadece T alleleine özgü bandın görülmesi durumunda ise homozigot mutant TT görüntüsüne rastlanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. PCR ürünlerinin %1.5 agaroz jel elektroforezinde görünümü. M: 100 bp DNA marker; 1. örnek TT genotipi; 2., 3. ve 5. örnekler CC genotipi; 4. örnek CT genotipindedir.

MTHFR geni rs110692574 polimorfizmine ait genotip ve alel frekansları ile heterozigotluk oranları Tablo 4.1’de sunulmuştur.

**Tablo 4.1.** MTHFR geni rs110692574 polimorfizmine ait genotip ve alel frekansları ile heterozigotluk oranı

İşletme	n	Genotip Frekansı			Allel Frekansı		Heterozigotluk		$\chi^2$	p
		CC	CT	TT	C	T	H <sub>0</sub>	H <sub>e</sub>		
1	224	0.8482	0.1473	0.0045	0.9219	0.0781	0.1473	0.1438	0.135	0.7133 <sup>n.s.</sup>
2	132	0.9167	0.0833	-	0.9583	0.0417	0.0833	0.0796	0.224	0.6359 <sup>n.s.</sup>
Toplam	356	0.8732	0.1236	0.0028	0.9354	0.0646	0.1236	0.1208	0.191	0.6623 <sup>n.s.</sup>

<sup>n.s.</sup>: non-significant

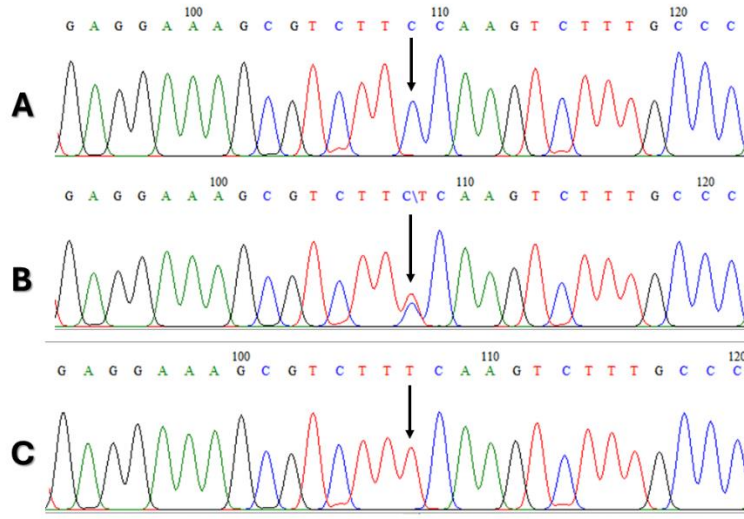
Tablo 4.1’de Türkiye’deki Holştayn sığır popülasyonuna ait iki farklı işletmede rs110692574 polimorfizmine yönelik genotip ve alel frekansları hesaplanmıştır. Her iki işletmede de C alleli yaygın olup, T alleli daha düşük frekansta (%4.17–7.81) bulunmuştur. Toplamda, C alleli frekansı %93.54, T alleli frekansı %6.46 olarak belirlenmiştir. TT genotipi yalnızca 1. işletmedeki bir hayvanda gözlenmiştir. 1. İşletmede genotip frekansları sırasıyla CC için %84.82, CT için %14.73 ve TT için %0.45 olarak bulunurken 2. işletmede TT genotipine rastlanmamış, CC için %91.67 ve CT için %8.33 oranları elde edilmiştir. Tüm popülasyonun genotip frekansı CC için %87.32, CT için %12.36 ve TT için %0.28 olarak hesaplanmıştır. T allelini taşıyan hayvanların frekansı ise %12.64 olarak hesaplanmıştır.

Her iki işletmede de gözlenen heterozigotluk değerleri (H<sub>0</sub>), beklenen heterozigotluk değerleri (H<sub>e</sub>) ile büyük oranda benzer bulunmuş olup, Hardy-Weinberg denge testi sonucunda elde edilen p-değerleri (p>0.05) istatistiksel olarak anlamlı olmaması, genotip dağılımının Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olduğunu göstermiştir.

TT genotipine sahip hayvan çalışma süresi boyunca doğum yapmadığı için çalışmaya dahil edilememiştir.

## 4.2. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi sonucunda elde edilen genotiplerin Tetra-ARMS yöntemiyle tespit edilen genotipler ile birebir uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.2). Bu durum Tetra-ARMS yönteminin MTHFR geni 8137C/T (rs110692574) mutasyonunun tespitinde doğruluğu ve uygulanabilirliğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.2. DNA dizi analizi sonucu elektroferogram görüntüleri. A: CC, B: CT, C: TT genotipleri.

## 4.3. Biyokimyasal Kan Parametreleri

Süt sığırlarında geçiş döneminde homosistein, folik asit, vitamin B<sub>12</sub>, NEFA ve BHBA düzeylerinin değişimi ve bu değişimin genotip ve yem katkı maddesi gruplarına göre farklılık gösterip göstermediği tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi yöntemiyle değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda, geçiş döneminde biyokimyasal kan parametrelerinin değişimi üzerinde zamanın tek başına anlamlı bir etkisi olmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ). Ancak zaman  $\times$  genotip etkileşiminin folik asit ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerini zaman içinde farklı şekilde etkilediği saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Bu durum, zamanın genel ortalama üzerinde anlamlı bir rol oynamamasına rağmen, genotip ile

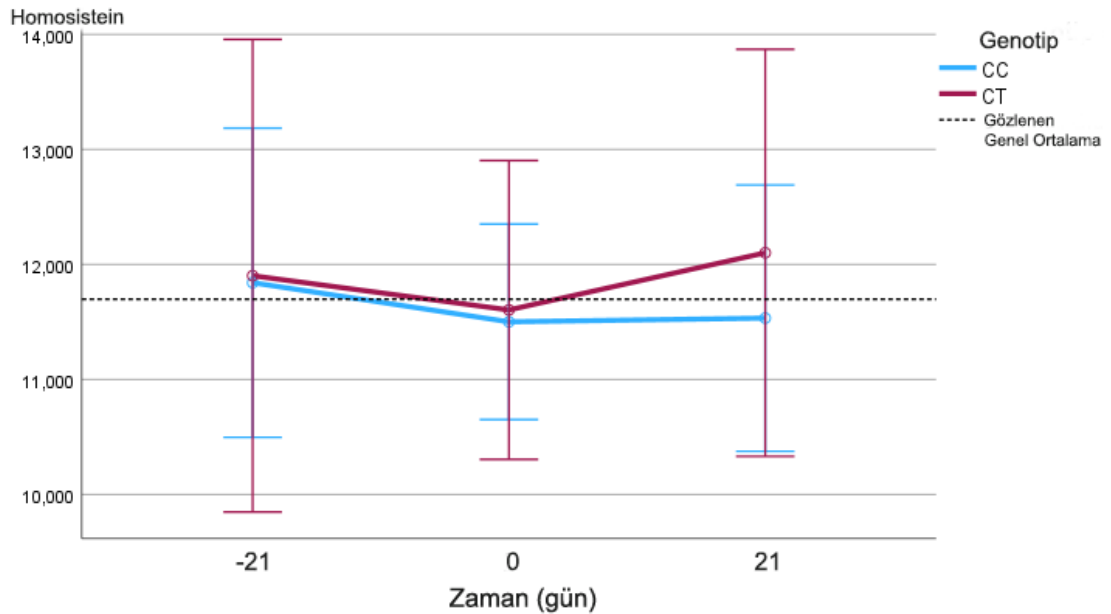
birlikte folik asit ve vitamin B<sub>12</sub> düzeyleri üzerindeki etkisinin belirginleştiğini göstermektedir.

**Tablo 4.2.** Zaman × genotip etkileşiminin geçiş döneminde biyokimyasal kan parametreleri düzeylerindeki değişim üzerine etkileri

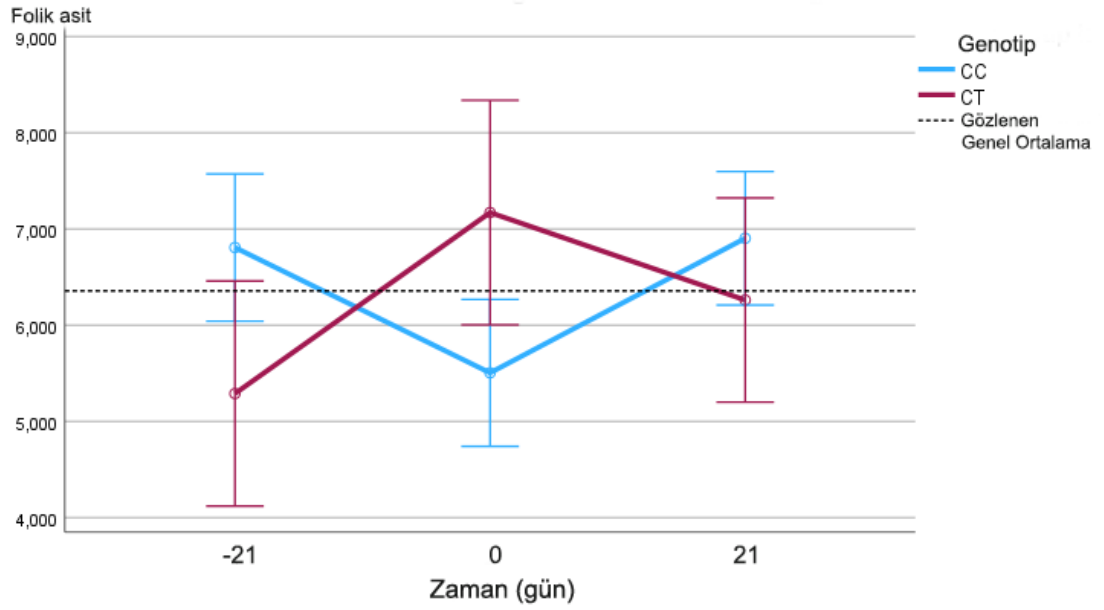
Parametre	Genotip	Zaman	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	p
Folik asit	CC	-21	6.80 ± 0.40	0.002
		0	5.50 ± 0.28	
		+21	6.93 ± 0.33	
	CT	-21	5.31 ± 0.54	
		0	7.18 ± 0.83	
		+21	6.21 ± 0.61	
Vit. B <sub>12</sub>	CC	-21	263.34 ± 8.66	0.011
		0	224.16 ± 9.12	
		+21	235.39 ± 8.15	
	CT	-21	216.04 ± 16.79	
		0	259.08 ± 21.21	
		+21	235.39 ± 17.55	
Homosistein	CC	-21	11.82 ± 0.71	0.776
		0	11.48 ± 0.46	
		+21	11.51 ± 0.59	
	CT	-21	11.95 ± 0.84	
		0	11.66 ± 0.57	
		+21	12.15 ± 0.85	
NEFA	CC	-21	0.22 ± 0.04	0.160
		0	0.35 ± 0.07	
		+21	0.31 ± 0.04	
	CT	-21	0.14 ± 0.04	
		0	0.26 ± 0.04	
		+21	0.37 ± 0.07	
BHBA	CC	+7	0.54 ± 0.05	0.388
		+14	0.43 ± 0.05	
	CT	+7	0.47 ± 0.06	
		+14	0.43 ± 0.03	

Tablo 4.2 incelendiğinde, geçiş döneminde zaman × genotip etkileşiminin folik asit ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinde anlamlı bir değişime yol açtığı (p<0.05); homosistein, NEFA ve BHBA düzeylerinde ise anlamlı bir etki göstermediği (p>0.05) görülmektedir. CC ve CT genotip gruplarının zaman içinde folik asit ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinde farklı değişimler sergilediği anlaşılmaktadır. Özellikle bu parametrelerin buzağılamadan önceki 21. gün (-21. gün), buzağılama günü (0. gün) ve buzağılamadan sonraki 21. gündeki (+21. gün) değişimleri genotipe bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Diğer taraftan, geçiş döneminde homosistein ve NEFA düzeyleri ile buzağılamadan sonraki 7. ve 14. günlerdeki BHBA düzeylerinde gözlenen değişimlerin genotip x zaman etkileşimi açısından istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (p>0.05).

Şekil 4.3'ten Şekil 4.7'ye kadar olan bölümde, süt sığırlarının geçiş döneminde genotip gruplarına (CC ve CT) göre homosistein, folik asit, vitamin B<sub>12</sub>, NEFA ve BHBA düzeylerindeki değişimler gösterilmiştir.

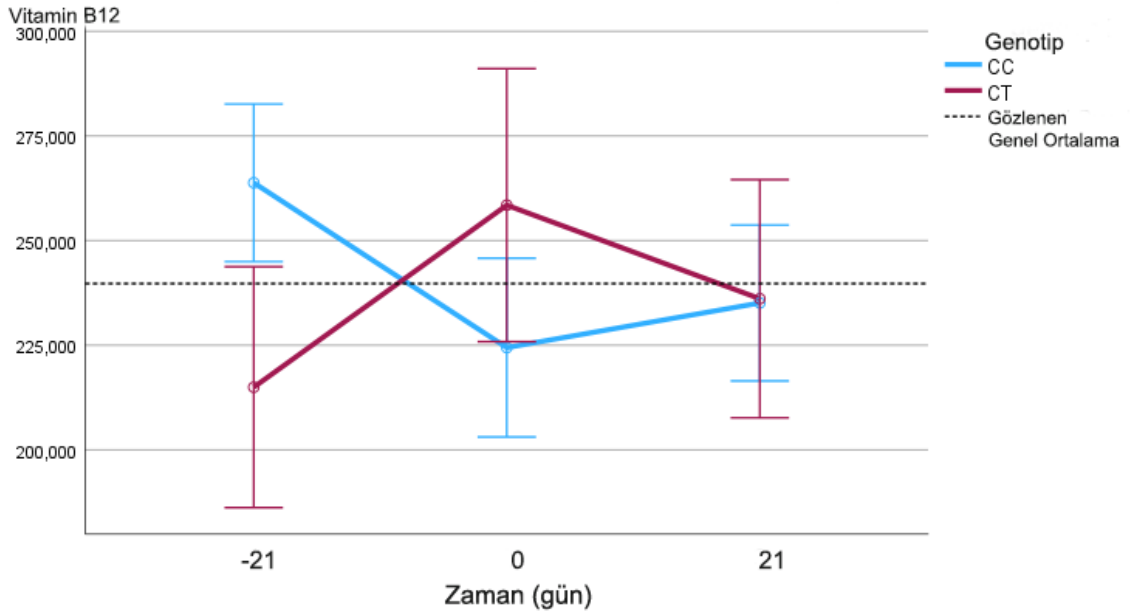


**Şekil 4.3.** Farklı genotiplere göre zaman içinde homosistein seviyelerinin değişimi.



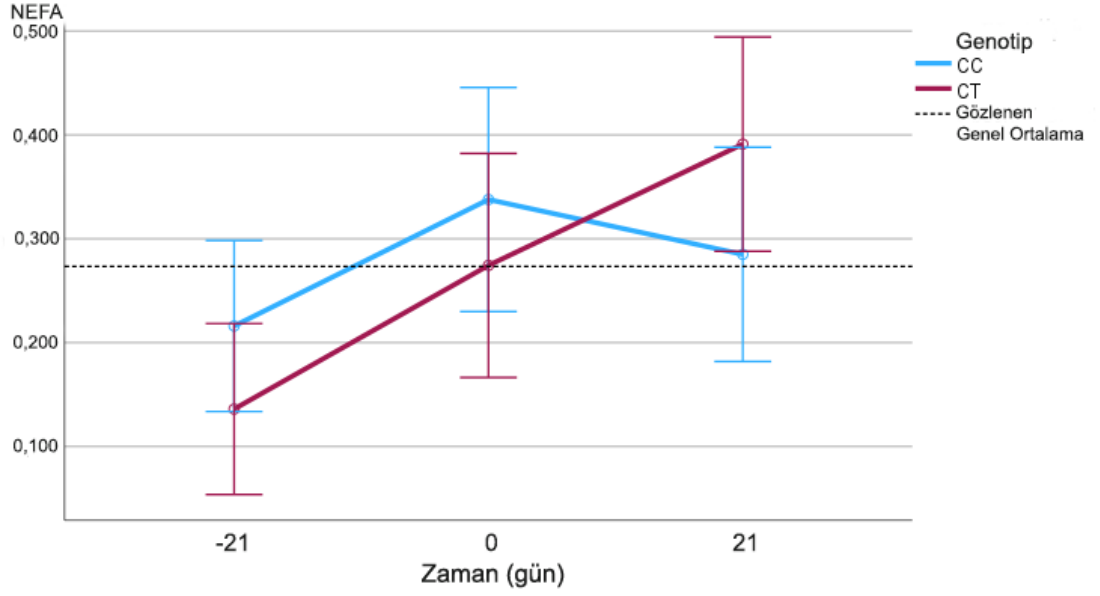
**Şekil 4.4.** Farklı genotiplere göre zaman içinde folik asit seviyelerinin değişimi.

Şekil 4.4'e göre, CT genotipine sahip hayvanlarda buzağılama günü (0. gün) folik asit düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenirken, CC grubunda bu dönemde azalma meydana gelmiştir. Bu durum, CT genotipinin buzağılama döneminde folik asit düzeylerini artırarak CC genotipinden ayrıştığını göstermektedir.



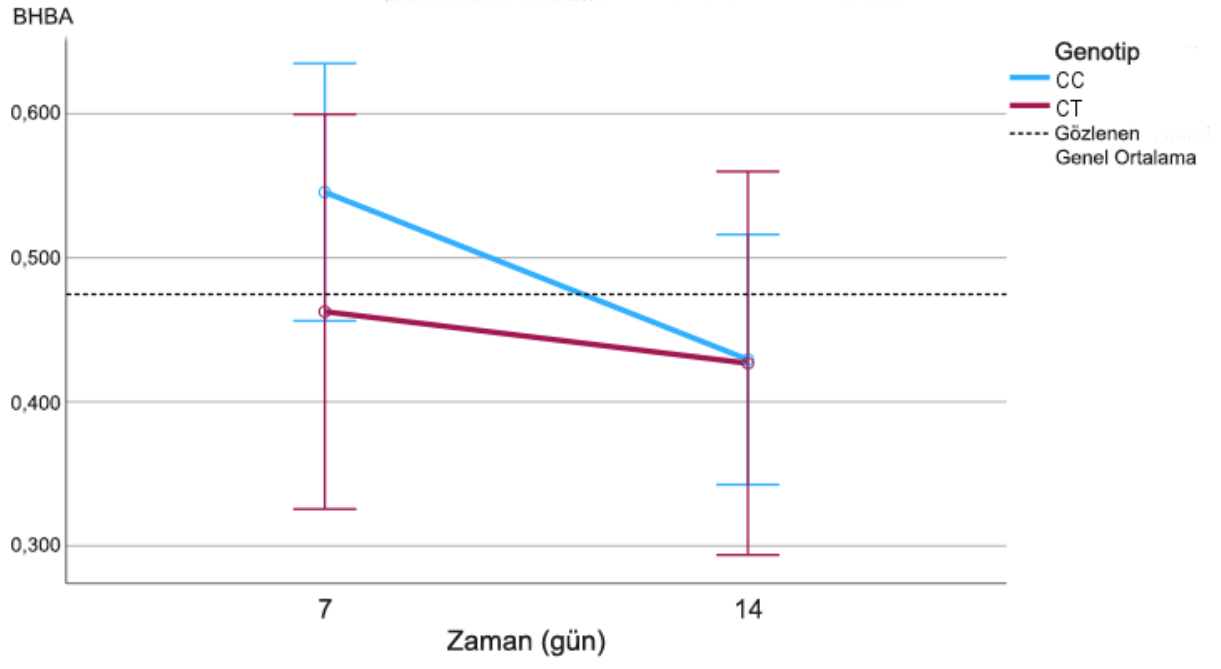
**Şekil 4.5.** Farklı genotiplere göre zaman içinde vitamin B12 seviyelerinin değişimi.

Şekil 4.5'te görüldüğü üzere, vitamin B<sub>12</sub> düzeyleri açısından buzağılamadan önceki 21. gün (-21. gün) ile buzağılama günü (0. gün) arasında CC grubunda düşüş, CT grubunda ise artış gözlenmiştir.



Şekil 4.6. Farklı genotiplere göre zaman içinde NEFA seviyelerinin değişimi.

Yapılan analizler sonucunda ölçülen NEFA seviyeleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark gözlenmemesine rağmen CT genotipine sahip hayvanların NEFA seviyelerinin analizin gerçekleştiği her üç dönemde de artış gösterdiği gözlenmiştir. Bu durum CT genotipli bireylerin geçiş döneminde negatif enerji dengesine daha yatkın olabileceğini gösterir niteliktedir (Şekil 4.6).



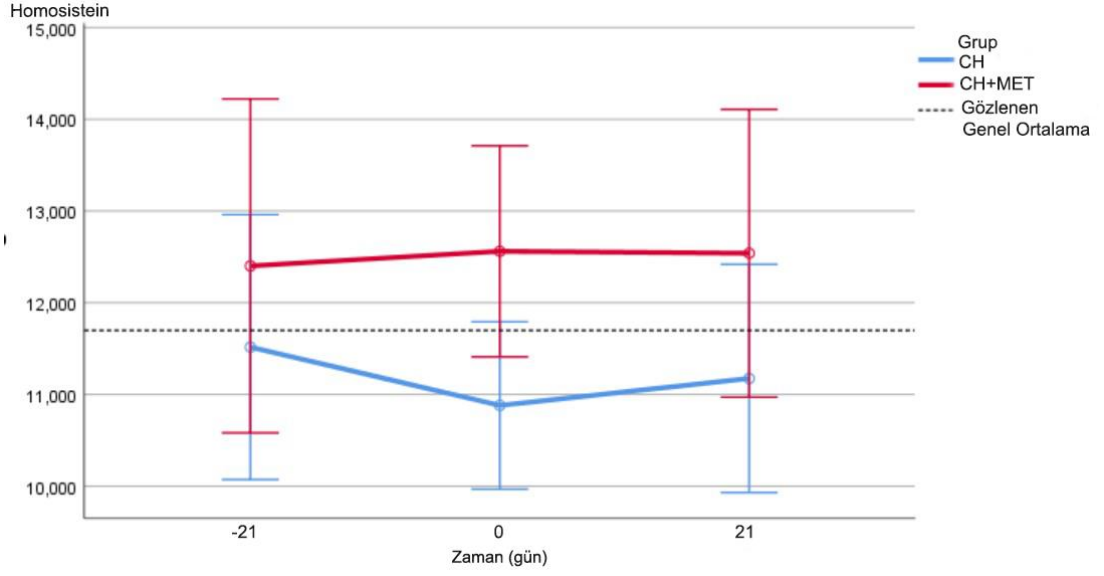
Şekil 4.7. Farklı genotiplere göre zaman içinde BHBA seviyelerinin değişimi.

**Tablo 4.3.** Zaman × yem katkı maddesi etkileşiminin geçiş döneminde biyokimyasal kan parametreleri düzeylerindeki değişim üzerine etkileri

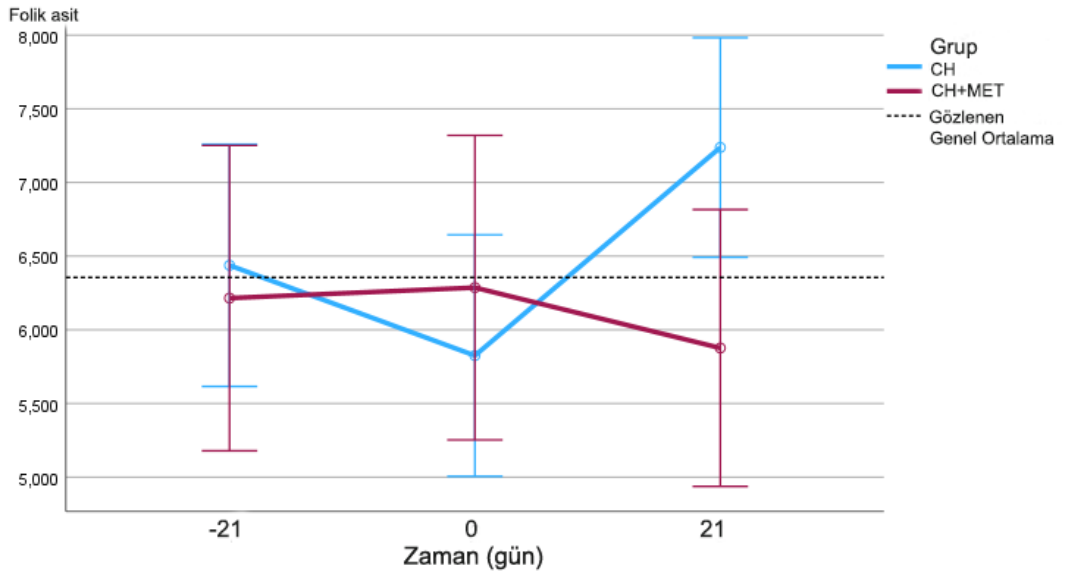
Parametre	Yem Katkı Maddesi	Zaman	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	p
Folik asit	CH	-21	6.47 ± 0.45	0.083
		0	5.79 ± 0.33	
		+21	7.27 ± 0.41	
	CH+MET	-21	6.17 ± 0.46	
		0	6.35 ± 0.66	
		+21	5.83 ± 0.37	
Vit. B <sub>12</sub>	CH	-21	243.82 ± 10.87	0.326
		0	223.27 ± 10.71	
		+21	237.78 ± 10.26	
	CH+MET	-21	257.58 ± 12.40	
		0	252.61 ± 16.02	
		+21	231.62 ± 11.66	
Homosistein	CH	-21	11.43 ± 0.82	0.781
		0	10.83 ± 0.40	
		+21	11.13 ± 0.52	
	CH+MET	-21	12.54 ± 0.63	
		0	12.63 ± 0.64	
		+21	12.61 ± 0.91	
NEFA	CH	-21	0.13 ± 0.02	0.135
		0	0.32 ± 0.06	
		+21	0.28 ± 0.04	
	CH+MET	-21	0.23 ± 0.06	
		0	0.29 ± 0.05	
		+21	0.42 ± 0.07	
BHBA	CH	+7	0.54 ± 0.05	0.947
		+14	0.45 ± 0.06	
	CH+ MET	+7	0.49 ± 0.06	
		+14	0.40 ± 0.02	

Tablo 4.3 incelendiğinde, geçiş döneminde zaman ile yem katkı maddesi etkileşimlerinin incelenen tüm parametreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (p>0.05).

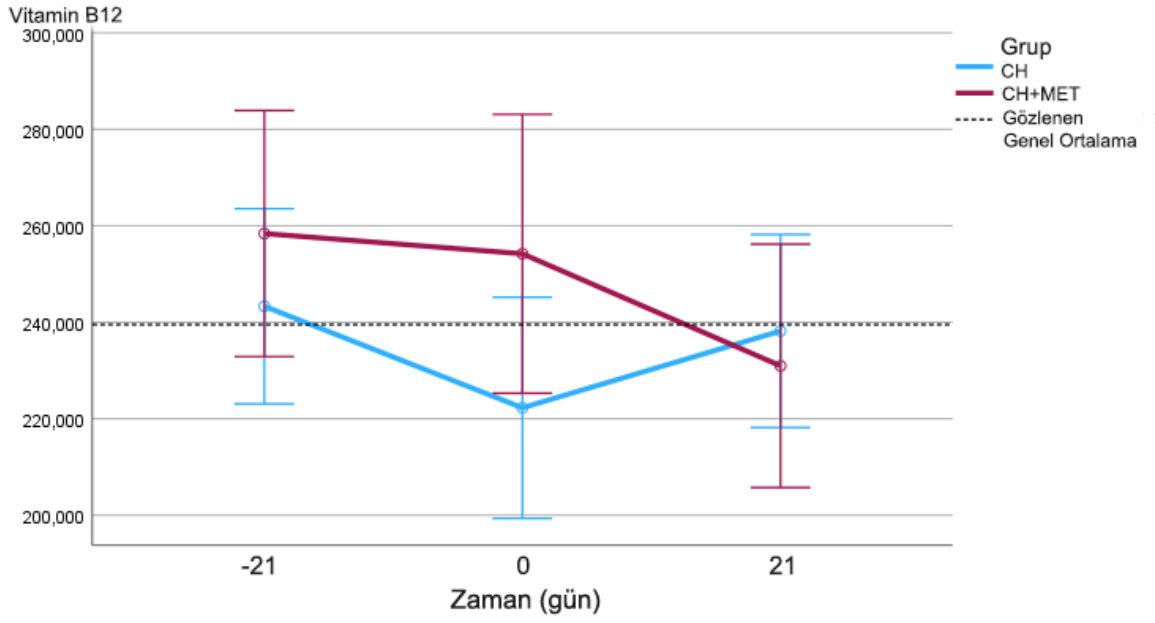
Şekil 4.8 ile Şekil 4.12 arasında ise geçiş dönemi boyunca biyokimyasal kan parametrelerinde yem katkı maddesi grupları (CH ve CH+MET) arasında gözlenen değişimler sunulmuştur.



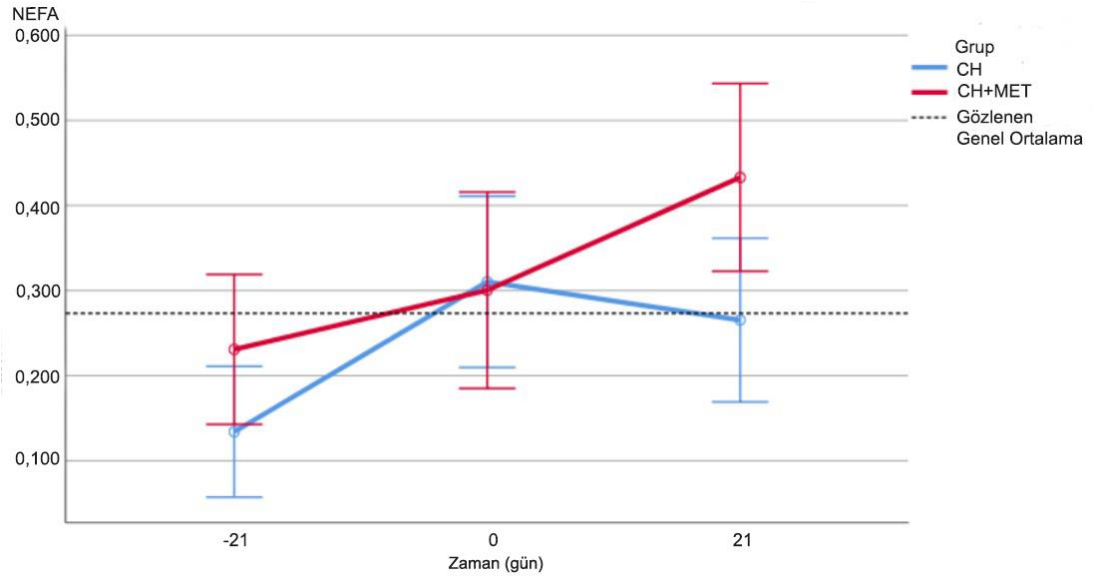
**Şekil 4.8.** Farklı yem katkı maddelerine göre zaman içinde homosistein seviyelerinin değişimi.



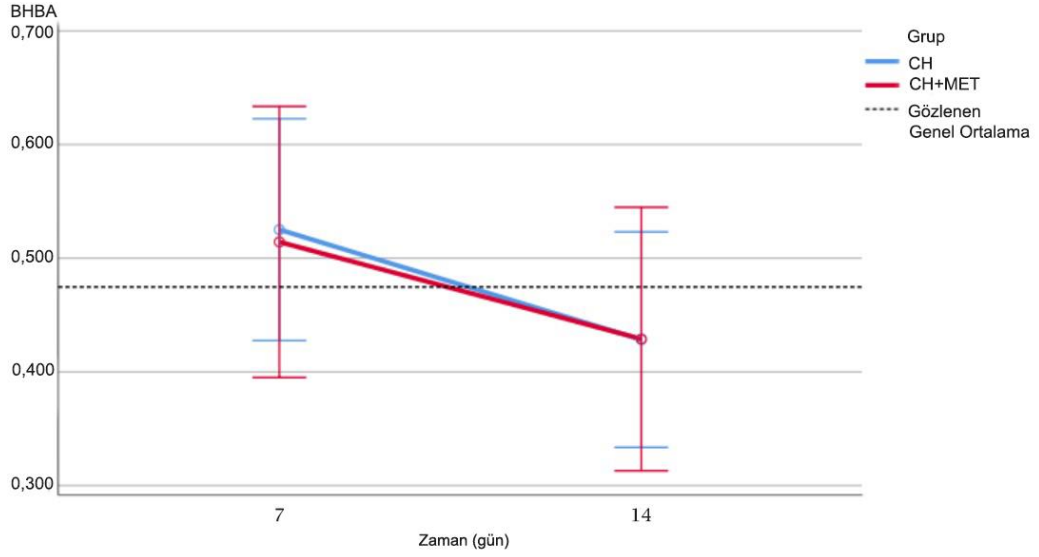
**Şekil 4.9.** Farklı yem katkı maddelerine göre zaman içinde folik asit seviyelerinin değişimi.



**Şekil 4.10.** Farklı yem katkı maddelerine göre zaman içinde vitamin B<sub>12</sub> seviyelerinin değişimi.



**Şekil 4.11.** Farklı yem katkı maddelerine göre zaman içinde NEFA seviyelerinin değişimi



**Şekil 4.12.** Farklı yem katkı maddelerine göre zaman içinde BHBA seviyelerinin değişimi.

Geçiş dönemi boyunca yem katkı maddesi grupları (CH ve CH+MET) ve ölçülen tüm biyokimyasal parametreler arasında herhangi bir önemli fark gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ).

Geçiş dönemine ait farklı zaman noktalarında ölçülen biyokimyasal kan parametreleri üzerine genotipin ve yem katkı maddelerinin etkisi, Genel Lineer Model kullanılarak analiz edilmiştir (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

**Tablo 4.4.** Genotip ve yem katkı maddesi gruplarının geçiş döneminde biyokimyasal kan parametreleri üzerinde etkileri ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ).

Zaman (gün)	Grup	n	Folik Asit (ng/mL)	Vitamin B <sub>12</sub> (pg/mL)	Homosistein (μmol/L)
<b>Buzağılama öncesi (-21. gün)</b>	CC	55	6.83 <sup>a</sup> ± 0.81	252.92 <sup>a</sup> ± 19.31	10.82 ± 1.04
	CT	25	4.88 <sup>b</sup> ± 0.72	203.03 <sup>b</sup> ± 17.26	12.02 ± 0.93
p değeri			0.050	0.037	0.340
	CH	49	6.10 ± 0.71	229.78 ± 17.08	11.57 ± 0.92
	CH+MET	31	5.61 ± 0.71	226.17 ± 17.04	11.27 ± 0.92
p değeri			0.542	0.852	0.770
<b>Buzağılama (0. gün)</b>	CC	55	6.53 ± 0.80	243.46 ± 23.30	11.76 ± 1.05
	CT	25	6.35 ± 0.71	241.37 ± 20.84	11.50 ± 0.94
p değeri			0.860	0.941	0.840
	CH	49	5.64 <sup>b</sup> ± 0.71	222.14 ± 20.61	11.43 ± 0.93
	CH+MET	31	7.24 <sup>a</sup> ± 0.70	262.68 ± 20.56	11.84 ± 0.93
p değeri			0.050	0.085	0.700
<b>Buzağılama sonrası (+21. gün)</b>	CC	55	6.15 ± 0.76	206.39 ± 20.11	11.09 ± 1.28
	CT	25	6.15 ± 0.68	224.97 ± 17.98	12.38 ± 1.15
p değeri			1.000	0.448	0.400
	CH	49	6.92 <sup>a</sup> ± 0.68	215.74 ± 17.79	11.43 ± 1.13
	CH+MET	31	5.38 <sup>b</sup> ± 0.67	215.62 ± 17.75	12.04 ± 1.13
p değeri			0.050	0.995	0.630

(<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) aynı sütünde farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0.05).

Tablo 4.4'e göre buzağılama öncesi 21. günde, CT genotipli hayvanlarda folik asit düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur (p=0.050). Aynı günde vitamin B12 düzeyi de CT genotipinde daha düşük tespit edilmiştir (p=0.037).

Buzağılama günü (0. gün) itibariyle yem katkısı gruplarının folik asit düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0.050). Bu dönemde, CH+MET katkı maddesi grubunun folik asit düzeyi, CH grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. (Tablo 4.4.). Vitamin B<sub>12</sub> düzeyi açısından CH+MET grubunda artış gözlenmekle birlikte, CH grubuna göre bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). Genotip grupları açısından değerlendirildiğinde ise, buzağılama günü (0. gün)

itibarıyla CC ve CT genotipleri arasında folik asit, vitamin B<sub>12</sub> ve homosistein düzeyleri yönünden anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0.05).

Buzağılama sonrası (+21. gün) itibarıyla yem katkısı gruplarının folik asit düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p<0.05). CH grubunda folik asit düzeyinin, CH+MET grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (p = 0.050). Bu dönemde vitamin B<sub>12</sub> ve homosistein düzeyleri yönünden yem katkısı grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05). Ayrıca, CC ve CT genotip grupları arasında incelenen parametreler yönünden anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (p>0.05).

Geçiş dönemine ait farklı zaman noktalarında ölçülen NEFA ve BHBA düzeyleri üzerine genotipin ve yem katkı maddelerinin etkisi, genel lineer model kullanılarak analiz edilmiştir (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Genotip ve yem katkı maddesi gruplarının geçiş döneminde NEFA ve BHBA düzeyleri üzerine etkileri ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ).

Grup	n	NEFA			n	BHBA		
		-21 gün	0 gün	+21 gün		+7 gün	n	+14 gün
CC	14	0.19 ± 0.09	0.42 ± 0.11	0.17 ± 0.11	54	0.68 <sup>a</sup> ± 0.10	53	0.52 ± 0.10
CT	16	0.19 ± 0.07	0.23 ± 0.09	0.35 ± 0.08	24	0.45 <sup>b</sup> ± 0.08	24	0.41 ± 0.08
p değeri		0.97	0.17	0.15		0.04		0.35
CH	17	0.18 ± 0.08	0.32 ± 0.11	0.20 ± 0.10	47	0.55 ± 0.09	46	0.47 ± 0.09
CH+MET	13	0.21 ± 0.07	0.34 ± 0.09	0.32 ± 0.08	31	0.59 ± 0.08	31	0.46 ± 0.09
p değeri		0.76	0.90	0.30		0.35		0.95

(<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) aynı sütun farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0.05).

Tablo 4.5 incelendiğinde, buzağılama sonrası 7. günde genotip grupları arasında BHBA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir (p<0.05). Bu dönemde, CC genotipine sahip hayvanların BHBA düzeyleri CT genotipine sahip hayvanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak, 14. gündeki BHBA düzeyleri yönünden CC ve CT genotip arasında anlamlı bir fark

belirlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Yem katkı maddesi grupları arasında ise hem 7. hem de 14. gün BHBA düzeyleri yönünden anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Geçiş dönemi boyunca (-21, 0, +21. günler), NEFA düzeyleri açısından genotip ve yem katkı grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ).

#### 4.4. Süt Verimi

Genotip ve yem katkı maddesinin laktasyonun farklı dönemlerindeki süt verimine etkisi, Genel Lineer Model kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6.** Genotip ve yem katkı maddesi gruplarının 100, 200 ve 305 günlük süt verimi üzerine etkileri ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ).

Süt verimi	Grup	n	1. Laktasyon	n	2. Laktasyon	n	3. Laktasyon
100 Gün	CT	55	3574.24 <sup>a</sup> ±89.09	50	4265.28±130.63	35	4372.58±143.72
	CC	25	3347.32 <sup>b</sup> ±59.38	25	4289.70±97.35	22	4463.83±138.42
	p		0.038		0.874		0.612
	CH	49	3100.90 <sup>B</sup> ±72.01	49	3667.73 <sup>B</sup> ±98.86	37	4191.07 <sup>B</sup> ±133.23
	CH+MET	31	3820.65 <sup>A</sup> ±81.71	26	4887.25 <sup>A</sup> ±129.14	20	4645.34 <sup>A</sup> ±135.74
	p		0.000		0.000		0.006
200 Gün	CT	55	7448.82±195.65	50	8448.01±262.88	33	8447.67±263.82
	CC	25	7162.39±130.40	25	8486.33±195.91	19	8722.95±245.89
	p		0.228		0.902		0.436
	CH	49	6553.17 <sup>B</sup> ±158.14	49	7633.65 <sup>B</sup> ±198.94	32	8167.28 <sup>B</sup> ±229.45
	CH+MET	31	8058.03 <sup>A</sup> ±179.45	26	9300.68 <sup>A</sup> ±259.88	20	9003.33 <sup>A</sup> ±227.13
	p		0.000		0.000		0.003
305 Gün	CT	47	10931.42±273.49	40	12139.23±462.03	28	12011.32±429.30
	CC	22	10592.49±187.65	19	12207.97±330.93	17	12346.86±397.51
	p		0.316		0.903		0.562
	CH	41	9395.78 <sup>B</sup> ±221.75	39	11227.64 <sup>B</sup> ±324.63	29	11487.13 <sup>B</sup> ±365.15
	CH+MET	28	12128.12 <sup>A</sup> ±256.86	20	13119.57 <sup>A</sup> ±451.21	16	12871.05 <sup>A</sup> ±389.54
	p		0.000		0.001		0.005

(<sup>A, B</sup>): aynı sütünde farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ( $P<0.01$ ).

(<sup>a, b</sup>): aynı sütünde farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ( $p<0.05$ ).

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, yalnızca birinci laktasyonun ilk 100 günlük döneminde CC ve CT genotip grupları arasında süt verimi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Buna karşın, ikinci ve üçüncü laktasyonların hiçbir döneminde genotipler arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Tablo 4.6). Birinci laktasyonun 100 günlük döneminde CT genotipine sahip hayvanların süt veriminin, CC genotipine sahip bireylere göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. İkinci ve üçüncü laktasyonda CC genotipine sahip hayvanların daha fazla süt verdiği görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ).

Kullanılan yem katkı maddelerinin etkisi incelendiğinde ise, birinci, ikinci ve üçüncü laktasyonların 100, 200 ve 305 günlük dönemlerinde CH ve CH+MET grupları arasında süt verimi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Her üç laktasyonun tüm dönemlerinde, CH+MET grubundaki bireylerin süt verimi, CH grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur.

#### 4.5. Döl Verimi

**Tablo 4.7.** Genotip ve yem katkı maddesi gruplarının gebelik başına tohumlama sayısı üzerine etkileri ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ).

Grup	n	1. Gebelik	n	2. Gebelik	n	3. Gebelik
CC	55	1.65 ± 0.09	50	2.69 ± 0.30	41	2.59 ± 0.31
CT	42	1.66 ± 0.11	40	3.27 ± 0.34	30	2.46 ± 0.31
p		0.945		0.164		0.763
CH			65	3.37 ± 0.24	49	2.81 ± 0.25
CH+MET	-	-	25	2.59 ± 0.40	22	2.25 ± 0.34
p				0.083		0.167

Tablo 4.7’de gebelik başına tohumlama sayılarının genotip (CC ve CT) ve yem katkı maddesi gruplarına (CH ve CH+MET) göre dağılımı verilmiştir. Birinci buzağılama öncesinde gebelik başına tohumlama sayısı, CC ve CT genotipleri arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ( $p>0,05$ ). Benzer şekilde, ikinci ve üçüncü

buzağılama öncesinde elde edilen gebeliklerde de gebelik başına ortalama tohumlama sayıları açısından genotip grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ). Bu bulgular doğrultusunda, genotipin (CC veya CT) gebelik başına tohumlama sayısı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

İkinci buzağılama döneminde CH ve CH+MET grupları arasında gebelik başına tohumlama sayısı açısından fark istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte anlamlılığa yakın bulunmuştur. Üçüncü buzağılama döneminde ise CH ve CH+MET grupları arasında gebelik başına tohumlama sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.8.** Genotip ve yem katkı maddesi gruplarının ilkinde buzağılama yaşı ve buzağılama aralığı üzerine etkileri ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ).

Grup	n	İlkinde Buzağılama Yaşı	n	1-2 Buzağılama Aralığı	n	2-3 Buzağılama Aralığı
CC	55	742.10 $\pm$ 14.11	50	445.42 $\pm$ 18.99	41	410.85 $\pm$ 17.35
CT	42	783.78 $\pm$ 17.19	41	454.12 $\pm$ 21.01	30	408.94 $\pm$ 19.42
P		0.055		0.748		0.938
CH	66	751.87 $\pm$ 14.88	65	450.31 $\pm$ 17.75	49	414.50 $\pm$ 14.84
CH+ MET	31	774.01 $\pm$ 19.22	26	449.23 $\pm$ 25.90	22	405.29 $\pm$ 22.56
p		0.389		0.974		0.728

Tablo 4.8’de ilkinde buzağılama yaşı ve buzağılama aralıklarının genotip (CC ve CT) ve yem katkı maddesi gruplarına (CH ve CH+MET) göre dağılımı verilmiştir. Genotip ve yem katkı maddesi grupları arasında, ilkinde buzağılama yaşı ve buzağılama aralığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ). Ancak, CC ve CT genotipleri karşılaştırıldığında, ilk buzağılama yaşı açısından farkın anlamlılık seviyesine yakın olduğu görülmüş; CT genotipine sahip bireylerin, CC genotipine sahip bireylere kıyasla ilk buzağılarını daha geç verme eğiliminde oldukları gözlemlenmiştir ( $p=0.055$ ). Diğer taraftan, yem katkı maddesi grupları (CH ve CH+MET) arasında, buzağılama aralığı yönünden herhangi bir istatistiksel farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.8

#### 4.6. Süt Sığırlarında Verim Kaybına Yol Açan Bazı Sağlık Problemleri

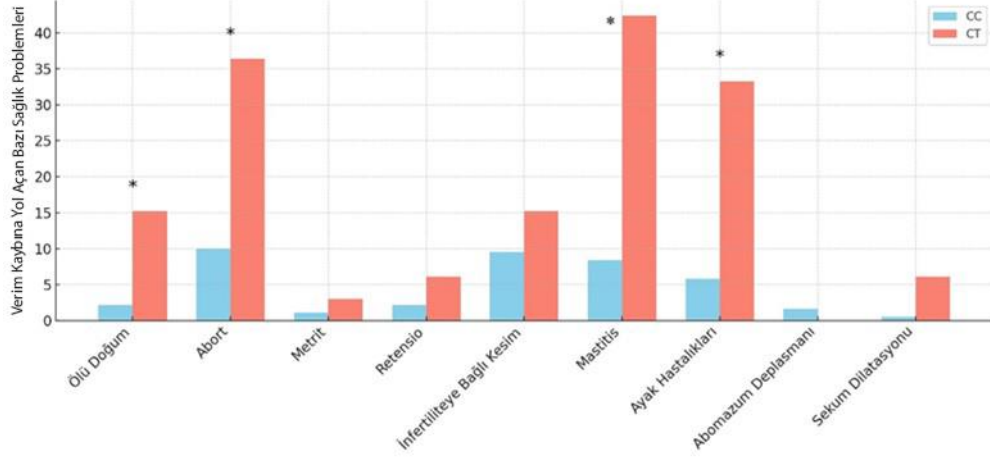
2021-2024 yılları arasında gözlenen ve verim kaybına yol açan bazı sağlık problemleri ile MTHFR genotipleri arasındaki ilişki Tablo 4.9’da sunulmuştur.

**Tablo 4.9.** Verim kaybına yol açan bazı sağlık problemlerinin MTHFR genotipleri ile ilişkisi.

Sağlık problemi	Genotip				p
	CC n:190		CT n:33		
	n	%	n	%	
Ölü doğum	4	2.1 <sup>B</sup>	5	15.2 <sup>A</sup>	0.004
Abort	19	10.0 <sup>B</sup>	12	36.4 <sup>A</sup>	0.000
Metrit	2	1.1	1	3.0	0.383
Retensio	4	2.1	2	6.1	0.217
İnfertiliteye bağlı kesim	18	9.5	5	15.2	0.351
Mastitis	16	8.4 <sup>B</sup>	14	42.4 <sup>A</sup>	0.000
Ayak hastalıkları	11	5.8 <sup>B</sup>	11	33.3 <sup>A</sup>	0.000
Abomazum deplasmanı	3	1.6	-	-	1.000
Sekum dilatasyonu	1	0.5	2	6.1	0.058

(<sup>A, B</sup>): aynı satırdaki farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ( $p < 0.01$ ).

İstatistiksel analizler, CT genotipine sahip ineklerin, CC genotipine sahip olanlara kıyasla mastitis ve ayak hastalıkları gibi verim kaybına yol açan sağlık problemlerine daha yatkın olduğunu ve abort ile ölü doğum vakalarının daha sık gözlemlendiğini ortaya koymuştur. (Şekil 4.13). Ayrıca, sekum dilatasyonu açısından genotip grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlılığa yakın bulunmuştur (Tablo 4.9).



(\* ile gösterilen grup ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ( $p < 0.01$ ).

**Şekil 4.13.** Verim kaybına yol açan bazı sağlık problemleri genotip gruplarına göre dağılımı.

## 5.TARTIŞMA

Bu çalışmada, süt sığırlarında geçiş döneminde biyokimyasal kan parametreleri, süt ve döl verimi ile bazı sağlık problemlerinin MTHFR genotipi ve yem katkı maddesi kullanımına bağlı olarak nasıl etkilendiği değerlendirilmiştir. MTHFR geni 8137C/T (rs110692574) polimorfizmi, önceki çalışmalarda (Song ve ark., 2011; Fedota ve ark., 2018) kullanılan PCR-SSCP ve DNA dizi analizinden farklı olarak, Tetra-primer ARMS-PCR yöntemi ile başarıyla tespit edilmiştir. Bu polimorfizmin söz konusu yöntemle belirlenmesi, DNA dizi analizine kıyasla daha hızlı ve ekonomik bir alternatif sunmaktadır. Çalışma kapsamında Tetra-primer ARMS-PCR yönteminin doğruluğu, yapılan dizi analizi ile doğrulanmış ve bu doğrultuda dizi analizine bir alternatif olarak kullanılabilceği gösterilmiştir. Literatürde, bu spesifik polimorfizmin Tetra-primer ARMS-PCR yöntemiyle analizine dair herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışma, yöntemin ilgili polimorfizm için uygulanabilirliğini ortaya koyması açısından literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır.

Bu çalışmada, MTHFR geni 8137C/T (rs110692574) polimorfizmi, Türk Holştayn popülasyonunda ilk kez araştırılmış olup, Holştayn ırkında daha önce bildirilmemiş olan TT genotipine sahip bir örneğe de rastlanmıştır. Türkiye’de yetiştirilen Holştayn sığırlarında MTHFR geni rs110692574 polimorfizmi yönünden T allelinin frekansı %6.46 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1.). Holştayn ırkında Çin’de %16.35 (Song ve ark., 2011) ve Ukrayna’da %5.70 (Fedota ve ark., 2018) oranında bildirilen T alleli sıklıklarıyla karşılaştırıldığında, Türkiye popülasyonunda T allelinin yaygınlığı Ukrayna’ya daha yakın görünmektedir. Ayrıca genotip frekansları, MTHFR 8137C/T polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde; CC genotipi %87.32, CT genotipi %12.36 ve TT genotipi %0.28 oranında tespit edilmiştir. Song ve ark. (2011) tarafından Çin Holstein ineklerinde yapılan geniş çaplı bir çalışmada (n = 569), CC genotip frekansı %67.3, CT frekansı %32.7 ve TT genotipi %0 olarak rapor edilirken Fedota ve ark. (2018) çalışmasında (n = 35) Ukrayna’daki süt sığırlarında genotip frekansları sırasıyla %88.6 (CC), %11.4 (CT) ve %0 (TT) olarak bildirilmiştir. Elde

edilen bu veriler sonucunda CT oranı %12,36 ile Fedota ve ark. çalışmasına benzerlik gösterirken, Song ve ark.'nın belirttiği yüksek CT oranından anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Türkiye, gerekse Dünyadaki yaygınlığının daha iyi ortaya konması için farklı bölgelerden daha yüksek sayıda hayvan popülasyonu ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyokimyasal parametreler incelendiğinde, zaman faktörünün tek başına folik asit, vitamin B<sub>12</sub>, homosistein, NEFA ve BHBA düzeyleri üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ancak, zaman × genotip etkileşiminin folik asit ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinde önemli değişimlere neden olduğu belirlenmiştir. Özellikle CC genotipinde folik asit ve B<sub>12</sub> düzeyleri buzağılama öncesi yüksekken buzağılama zamanında düşüp postpartum dönemde toparlanma eğilimi gösterirken, CT genotipinde her iki parametrenin buzağılama öncesi düşükken doğumda ani bir artış gösterip sonrasında tekrar düşmektedir. Bu bulgu, MTHFR geni rs110692574 polimorfizminin geçiş döneminde metabolik yanıtlar üzerindeki etkisine işaret etmektedir. Bu durum, CC genotipinin daha dengeli, CT genotipinin ise doğum stresine karşı daha tepkisel ve dalgalı bir vitamin metabolizmasına sahip olduğunu göstermektedir. MTHFR geni rs110692574 polimorfizmine bağlı eş anlamlı aminoasit değişiminin, transkripsiyon sürecini ve buna bağlı olarak gen ekspresyon düzeyini değiştirerek bu etkiyi oluşturmuş olabileceği düşünülmektedir. MTHFR geni polimorfizmlerinin metabolik etkileri olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Goyette ve ark., 1998). Buna karşın, homosistein, NEFA ve BHBA düzeylerinde genotip-zaman etkileşimi anlamlı bulunmamıştır. Bu parametrelerin rs110692574 polimorfizminden doğrudan etkilenmediğini veya diğer çevresel/genetik faktörlerin etkilerinin daha baskın olduğunu düşündürmektedir. Literatürde, laktasyon döneminde folik asit ihtiyacının daha fazla olduğu belirtilmektedir (Girard ve ark., 2005). Geçiş döneminde biyokimyasal kan parametreleri üzerine yapılan analizlerde, buzağılamadan önce (-21. gün) folik asit düzeyi genotip yönünden anlamlı bir sonuç verirken, buzağılama günü (0. gün) ve buzağılamadan sonra (+21. gün) alınan örneklerin analizinde CH ve CH+MET grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Bu sonuç, buzağılama öncesi dönemde CT genotipine sahip hayvanların, CC genotipli hayvanlara göre daha fazla folik aside ihtiyaç duyduğu yönünde değerlendirilebilir.

Yem katkı maddesi olarak uygulanan CH ve CH+MET gruplarının, geçiş d6neminin farklı zaman noktalarında homosistein, folik asit, vitamin B<sub>12</sub>, BHBA ve NEFA düzeylerinin seyri 6zerine etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). Çalışmada yem katkı maddesi grupları yalnızca her bir 6l6m zamanına g6re değerlendirildiğinde, buzağılama 6ncesi d6nemde (-21. g6n) gruplar arasında folik asit, vitamin B<sub>12</sub>, NEFA ve homosistein düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p > 0.05). Ancak, buzağılama g6n6 (0. g6n) itibariyle folik asit düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenmiş, CH+MET grubunda folik asit düzeyinin CH grubuna g6re daha y6ksek olduğu g6zlenmiştir (p = 0.050). Aynı d6nemde vitamin B<sub>12</sub>, NEFA ve homosistein düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Buzağılama sonrası 21. g6nde ise folik asit düzeyleri bakımından gruplar arasında yine anlamlı bir farklılık tespit edilmiş; bu kez CH grubundaki folik asit düzeyi, CH+MET grubuna kıyasla daha y6ksek bulunmuştur (p = 0.050). Diğer biyokimyasal parametreler olan vitamin B<sub>12</sub>, NEFA ve homosistein düzeylerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p > 0.05). Buzağılama zamanı CH ve CH-MET grupları arasında anlamlı bir fark olması, sığırılarda folik asit seviyesi 6zerine rasyona eklenen metiyoninin koline g6re daha fazla etki ettiğini d6ř6nd6rmektedir. Ayrıca, CH-MET grubunun 6zellikle buzağılamadan sonraki d6nemde folik asit değerlerinin d6şmesi, metiyonin fazlalığının folik asit t6ketimini arttırmayı teşvik etmesinden kaynaklı olabileceğini d6ř6n6lmektedir.

İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda vitamin B<sub>12</sub> düzeyleri arasında buzağılama 6ncesi genotipler arasında anlamlı bir fark bulunmuş ve CT genotipine sahip sığırılarda daha d6ř6k d6zeylerde seyrettiği tespit edilmiştir. Bu durum buzağılama 6ncesi d6nemde CT genotipine sahip hayvanların daha fazla vitamin B<sub>12</sub>'ye ihtiyacı olduğunu g6sterir niteliktedir. Bununla birlikte Baldaz ve Kaya, (2021)'nin yaptığı çalışmada 207.20 pg/ mL bulunurken Duplessis ve ark. (2023)'nin yaptığı çalışmada vitamin B<sub>12</sub> düzeyini buzağılama 6ncesi 238.6 ve 268.6 pg/mL, buzağılama sonrası 223.0, 197.9, 191.7 pg/mL bulmuşlardır. Yapılan diğer çalışmalarda Kılıçkap ve Kozat, (2017) 253.50 pg/mL, İssi ve ark. (2010) 155.13 pg/mL, Ertaş (2015) 193.00 pg/mL olarak bulmuşlardır. Çalışmalarda bildirilen vitamin B<sub>12</sub> d6zeylerindeki farklılıkların beslenme ve rasyon farklılıkları, 6l6m ve

numune zamanı, içinde bulunduğu fizyolojik dönem ve genetik sebeplere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Biyokimyasal parametreler incelendiğinde, homosistein düzeylerinin gerek geçiş döneminin farklı noktaları arasında, gerekse genotip ve yem katkı grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, buzağılama öncesi homosistein düzeyinin CT genotipli hayvanlarda CC genotipine göre daha yüksek olma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Song ve ark. (2011) tarafından Holştayn ırkında yapılan çalışmada da CT genotipli hayvanların homosistein seviyelerinin CC genotipine göre daha yüksek olduğu yönündeki raporlarıyla benzerlik göstermektedir. Ayrıca, CH-MET grubunda homosistein düzeylerinin CH grubuna göre daha yüksek olma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Bu durum, metiyonin metabolizmasıyla ilişkilendirilebilir. Özellikle metiyonin S-adenosilmetiyonine (SAM) ve ardından homosisteine dönüşüm süreci, ilgili vitamin kofaktörlerinin (özellikle folik asit ve B<sub>12</sub> vitamini) yeterli düzeyde olmaması durumunda plazma homosistein konsantrasyonlarının artmasına yol açabilmektedir (Selhub, 1999; Stanger et al., 2003). Bu nedenle, metiyonin takviyesi ile artan homosistein düzeyleri, B<sub>12</sub> ve folat metabolizmasının sınırda olduğu durumlarda daha belirgin hale gelebilir. Bu çalışmada belirlenen homosistein düzeyleri, Başbuğan ve ark. (2015) (15.89 µmol/L), Kılıçkap ve Kozat (2017) (17.04 µmol/L), Ardalın ve ark. (2020) ile Ayvazoğlu ve ark. (2023) (15.45 µmol/L) tarafından bildirilen düzeylerden daha düşük; buna karşın, Cannizzo ve ark. (2012) (4.57 µmol/L) ve Fedota ve ark. (2018) (5.85 µmol/L) tarafından bildirilen düzeylerden daha yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan, Song ve ark. (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, homosistein düzeyleri CC genotipine sahip hayvanlarda 11.4 µmol/L, CT genotipine sahip hayvanlarda ise 19,9 µmol/L olarak tespit edilmiştir. Veteriner hekimlikte süt sığırlarında homosistein düzeyleri ile ilgili veriler sınırlıdır (Cotul ve ark., 2020). Ruminantlarda folik asit ve B<sub>12</sub> vitamininin homosistein düzeyleri üzerindeki etkilerinin diğer türlerde olduğu kadar belirgin olmayabileceğini bildirmiştir (Girard ve Matte, 2005b). Bu nedenle süt sığırlarında homosistein mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve fizyolojik sınırlarının netleştirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Duplessis ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada folik asit düzeylerini 11.4–16.6 ng/mL aralığında bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Duplessis ve ark. (2023) tarafından yürütülen çalışmada, buzağılama öncesi 14. ve 7. günlerde folik asit düzeyleri sırasıyla 11.1 ve 11.6 ng/mL olarak belirlenmiştir. Buzağılama sonrası 7., 14. ve 21. günlerde ise bu değerler sırasıyla 12.3, 12.3 ve 13.7 ng/mL olarak saptanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen folik asit düzeyleri (4.88-7.27 ng/mL), yukarıda belirtilen Duplessis ve ark. (2020, 2023) çalışmalarına kıyasla daha düşük bulunmuştur. Buna karşın, Sun ve ark. (2025) tarafından raporlanan 6,048.18 ng/mL'lik folik asit düzeyi ise elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Karaciğer hastalığı olan insanlarda yapılan araştırmalar, serum folat düzeylerinin düşük, serum B<sub>12</sub> düzeylerinin ise yüksek olduğunu göstermiştir (Halifeoğlu ve ark., 2004; Muro ve ark., 2010). Süt ineklerinde ise Obitz ve Füll (2014), erken laktasyon döneminde yüksek serum B<sub>12</sub> düzeylerinin bir sağlık sorununun işareti olabileceği sonucuna varmıştır. Ayrıca Duplessis ve ark. (2018), süt ineklerinde buzağılama sonrası plazma B<sub>12</sub> vitamini ile NEFA konsantrasyonları arasında pozitif bir ilişki tespit etmiştir.

Çalışma süresince alınan örneklerde yapılan istatistiksel analizler sonucunda NEFA düzeyleri ile gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Ancak NEFA seviyeleri, enerji metabolizması ve negatif enerji dengesinin bir göstergesi olduğundan, değerler normal sınırlarda yer alsa da buzağılama sonrası 21. günde CT genotipine sahip bireylerde gözlenen artış, bu hayvanların enerji mobilizasyonunun farklı olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, CT ve TT genotipine sahip daha fazla sayıda hayvanla yapılacak analizlerin mevcut bulguları değiştirebileceğini ve genotiplerin enerji metabolizması üzerindeki etkilerinin daha net ortaya konabileceğini göstermektedir.

Süt sığırlarında kuru dönemde normal NEFA değeri <0.4 mmol/l (Duffield ve ark., 2003; Kara ve ark., 2016; Kennerman ve ark., 2006; LeBlanc, 2010; Ospina ve ark., 2010; Quiroz-Rocha ve ark., 2009; Şentürk 2013; Yılmaz ve ark., 2019) iken buzağılamadan sonraki dönemde normal NEFA düzeyi <0,7 mmol/l olmalıdır (Duffield ve ark., 2003; LeBlanc, 2010). Duplessis ve ark. (2023)'ün yaptığı çalışmada buzağılama öncesi 14 ve 7. günlerde NEFA düzeyleri sırasıyla 0.20, 0.27

mM, BHBA düzeyleri sırasıyla 0.68 ve 0.66, buzağılama sonrası 7., 14. ve 21.günlerde NEFA düzeyleri sırasıyla 0.44, 0.35, 0.31 mM ve BHBA düzeyleri sırasıyla 1.07, 1.36, 1.14 bulunmuştur. Sun ve ark. (2025) yaptıkları çalışmada NEFA düzeyini 0.42 mmol/L bulurken BHBA düzeyini 1.06 mmol/L bulmuştur. Stefanska ve ark. (2024) sıcaklık stresinin kan parametreleri üzerine etkisini inceledikleri çalışmada sıcaklık arttıkça NEFA değerinin de arttığını bildirmişlerdir. Çok doğum yapmış süt ineklerinde doğum öncesi iskelet kası rezervlerinin ve dallı zincirli uçucu yağ asitleri takviyesinin vücut kompozisyonu ölçümleri, sağlıkla ilgili metabolik belirteçler, protein ve enerji durumu ve sonraki süt verimi üzerindeki etkilerini belirlemek için yapılan çalışmada verilen takviyenin Glikoz seviyesini düşürürken BHBA seviyesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı belirtilmiştir (Gouveia ve ark., 2024). Alan ve Salman (2019)'nın yaptığı çalışmada rumen korumalı kolin takviyesinin BHBA ve NEFA düzeyi üzerine herhangi bir katkısı olmadığı belirtilmiştir. Rumen korumalı kolin takviyesinin NEFA düzeyine herhangi bir etkisi olmadığını gösteren farklı çalışmalar da mevcuttur (Guretzky ve ark., 2006; Hartwell ve ark, 2000; Piepenbrink ve Overton, 2003; Zom ve ark., 2011).

Zhou ve ark. (2016), metiyonin ve kolin takviyesinin erken laktasyon dönemindeki süt ineklerinde metabolik profiller üzerine etkisini değerlendirdiği çalışmada benzer şekilde homosistein, BHBA gibi parametrelerde anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirmiştir. Osorio ve ark. (2013), buzağılama öncesi dönemde rumen korumalı kolin uygulamasının metabolik stres göstergeleri üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmada da kolin takviyesinin biyokimyasal kan parametreleri üzerinde sınırlı etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Arshad ve ark. (2020) ise metiyonin ve kolin takviyelerinin enerji metabolizmasıyla ilişkili kan parametreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve bireysel varyasyonların katkı maddelerine verilen yanıtta daha baskın olduğunu ifade etmiştir.

Süt sığırlarında kuru madde tüketimi yaş, ırk, mevsim, vücut kondisyonu, içinde buldukları dönem gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Çetin, 2017). Bu durum süt verimini de etkilemektedir. Bu çalışma boyunca ineklerin ilk 3 laktasyondaki süt verimleri incelenmiş ve rumen korumalı metiyonin içeren yem katkısı kullanan grubun daha yüksek süt verimine sahip olduğu görülmüştür. Zhou ve ark. (2016) ve Çetin (2017)'nin yaptığı çalışmalar da bu durumu destekler niteliktedir.

Benzer şekilde Abdelrahman (2009) ve Bilgeçli ve Yılmaz (2018) da rumen korumalı metiyoninin süt verimini arttırdığını belirtmişlerdir. Dolayısıyla metiyonin takviyesinin folik asit metabolizması üzerindeki olası baskılayıcı etkileri dikkate alınırken, elde edilen süt verimi artışının çok bileşenli bir rasyon yapısının sonucu olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bununla birlikte metabolik yanıtların genotip, zaman ve katkı özelliklerine bağlı olarak değişebileceği ve beslenme stratejilerinin bu ve benzer durumlara göre yapılandırılmasının bir gereklilik olduğu görülmüştür.

Kolin takviyesi yapılan ineklerin geçiş döneminde metiyonin kadar olumlu yanıt vermemesi, kolinden yeterli düzeyde endojen metiyonin sentezlenememesi (Zhou ve ark., 2017) veya genetik polimorfizmler nedeniyle kolin ve metiyonin metabolizmasında bireyler arası farklılıklar olabileceği ihtimalini gündeme getirmiştir. Bununla birlikte Sancanari ve ark. (2001), rumen korumalı metiyonin ile korunmamış metiyoninin süt ineklerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında korunmuş metiyonin katkısının süt verimini artırmadığını, fakat erken laktasyondaki ineklerde süt yağ içeriğini iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Huang ve ark. (2023)'nin yaptığı çalışmada ise hem rumen korumalı metiyonin hem de rumen korumalı kolin takviyesinin süt verimine olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada rumen korumalı kolin takviyesinin süt üretimini iyileştirdiği, hiperketonemiye azalttığı ve hepatik lipidozu en aza indirdiği bildirilmiştir (Lima ve ark., 2024). Elek ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışmada rumen korumalı kolin takviyesi alan ineklerin 60 günlük deney süresi boyunca günlük 4.4 kg daha fazla süt ürettiği bildirilirken Sales ve ark. (2010)'nin yaptığı meta analizde ise rumen korumalı kolin takviyesi alan ineklerde kolin takviyesinin yüksek dozlarda verildiğinde etkinliğinin sınırlanabileceği bildirilmiştir. Swartz ve ark. (2022)'nin rumen korumalı kolin takviyesinin kolostrum üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada kolin takviyesinin, ikinci doğum yapan ineklerden alınan kolostrumdaki fosfokolin konsantrasyonlarını arttırdığını, trimetilamin N-oksit konsantrasyonlarını yükselttiğini ve kolostrum verimini artırdığını ancak kolostrum kalitesini etkilemediğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, çalışmamızda CC ve CT genotipli inekler arasında süt verimi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamış olmakla birlikte, literatürde genetik varyasyonların bireylerin metabolik yanıtlarını etkileyebileceğine dair bulgular mevcuttur. Özellikle kolin ve metiyonin metabolizmasında görev alan bazı genlerdeki polimorfizmler, bu besin öğelerine olan

fizyolojik yanıtların bireysel farklılık göstermesine neden olabilmektedir. Örneğin, PEMT geninde rapor edilen varyasyonların kolin gereksinimini artırabileceği (Caudill ve ark., 2007; Zeisel ve ark., 2009), MTHFR genindeki polimorfizmlerin metiyonin döngüsünü ve homosistein metabolizmasını etkileyebileceği (Fedota ve ark., 2018; Olthof ve ark., 2005; Song ve ark., 2011) ve BHMT genindeki varyasyonların da metil grubu transfer mekanizmaları üzerinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (Fischer ve ark., 2005). Bu bilgiler ışığında, süt verimi gibi fizyolojik özelliklerin değerlendirilmesinde, genetik farklılıkların da dikkate alındığı daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca Omar (2022) yaptığı çalışmada Holştayn ırkı sığırların 305 günlük verimini 9690.02 kg tespit etmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da Bohlouli ve ark. (2015) ve Penev ve ark. (2017) 6589 kg, Sarar ve Tapkı (2017) 6.588,38 kg, Yıldırım ve ark. (2018) 7.923,28 kg tespit edilmiş olup bu değerler çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz süt verimlerine göre daha düşüktür. Süt verimleri arasındaki bu farklılıkların hayvanların yetiştirme koşulları, beslenme düzeni, genetik özellikleri ve çevresel faktörlerdeki değişimlerden olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir diğer çalışmada 100 günlük süt verimine genetik faktörler etki ederken 200 günlük süt verimine çevresel faktörlerin etki ettiği vurgulanmıştır (Lee ve ark., 2018). Holştayn ırkı sığırların 100 ve 200 günlük süt verimlerinden 305 günlük süt veriminin tahmini olarak hesaplanabileceğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Bruckmaier ve ark., 2014; Yılmaz ve Acar, 2016).

Gebelik başına tohumlama sayılarının genotip (CC ve CT) ve yem katkı maddesi gruplarına (CH ve CH+MET) göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Literatürde kolin ve metiyonin takviyelerinin süt ineklerinde üreme performansına olan etkileri üzerine çeşitli çalışmalar bulunsa da (Osorio ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2016), bu katkı maddelerinin ve genotipin doğrudan gebelik başına tohumlama sayısı üzerindeki etkisi net olarak ortaya konmamıştır.

Fedota ve ark. (2018), ekzon 7 bölgesindeki 8137C/T (rs110692574) mutasyonunun farklı ırklardan süt inekleri üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada, söz konusu mutasyonun kemik mineral yoğunluğu ve buzağılama aralığı üzerinde anlamlı etkileri olduğunu bildirmiştir. Ancak, bu çalışmada Holştayn ırkı sığırlarda 8137C/T mutasyonu ile buzağılama aralığı arasında herhangi bir ilişki tespit

edilememiştir. Bu farkın, Fedota ve ark. (2018)'nin farklı sığır ırklarıyla çalışmasından kaynaklandığı düşünülmektedir; zira aynı mutasyonun farklı ırklarda farklı fenotipik etkiler göstermesi mümkündür. Konuyla ilgili doğrudan literatür bilgisine ulaşamamış olsa da, metiyonin ve kolin takviyelerinin uterus involusyonunu hızlandırıcı etkileri (Baldea ve ark., 2018) ile bağışıklık sistemi fonksiyonları ve oksidatif stres üzerindeki olumlu etkileri (Zhou ve ark., 2017) dikkate alındığında, bu katkıların dolaylı olarak buzağılama aralığı üzerinde pozitif bir etki oluşturabileceği değerlendirilmektedir. Ancak CH ve CH-MET gruplarında buzağılama aralığı açısından herhangi bir anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, CC ve CT genotipine sahip ineklerin ilkine buzağılama yaşı arasında fark anlamlıya yakın bulunmuştur.

Verim kaybına yol açan sağlık problemlerinin dağılımı üzerine yapılan analizlerde, CT genotipine sahip hayvanların daha yüksek oranda abort vakası gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgu Song ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmayla benzerlik göstermektedir. Bunlara ek olarak ölü doğum, mastit ve ayak hastalıklarına CT genotipine sahip ineklerin daha yatkın olduğu (Şekil 4.13) aynı zamanda sekum dilatasyonu bakımından da anlamlıya yakın bir fark gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.8). Bu bulgular, MTHFR genindeki polimorfizmin yalnızca kan parametreleri değil, aynı zamanda çeşitli sağlık problemleri üzerine de etkili olabileceği yorumlanabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, MTHFR geninin rs110692574 polimorfizmi, Tetra-primer ARMS-PCR yöntemiyle başarıyla tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, bu yöntemin söz konusu polimorfizmin belirlenmesinde uygulanabilir olduğunu ve daha hızlı, ekonomik bir analiz alternatifi sunduğunu ortaya koymuştur. Türkiye’de yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlarda T allelini taşıyan hayvanların oranı %12,64 olarak belirlenmiştir. Polimorfizmin Türkiye ve dünya genelindeki yaygınlığının daha iyi anlaşılabilmesi için, farklı bölgelerden ve daha geniş hayvan popülasyonlarından elde edilecek verilere dayalı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

MTHFR geni rs110692574 polimorfizmi yönünden Zaman x Genotip etkileşimi, geçiş döneminin farklı evrelerinde folik asit ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinin seyirini önemli ölçüde etkilemiştir. Özellikle CC ve CT genotiplerine sahip hayvanların folik asit ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinin farklı bir seyir izlemesi, buzağılama öncesi ve sonrası metabolik süreçlere verdikleri yanıtların genotipe bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Bu durum, genetik ve beslenme faktörlerinin birleşimiyle bireysel beslenme stratejilerine duyulan ihtiyacın önemini ortaya koymaktadır.

Buzağılama öncesi dönemde, CT genotipine sahip sığırlarda folik asit ve vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinin anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, CT genotipinin folik asit ve B<sub>12</sub> metabolizması açısından daha duyarlı olduğunu ve bu genotipe sahip hayvanların geçiş döneminde ilave takviyelere daha fazla ihtiyaç duyabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu durumun MTHFR geni rs110692574 polimorfizmine bağlı eşanlamlı bir aminoasit değişiminin, transkripsiyon sürecini ve dolayısıyla gen ekspresyon düzeyini etkileyerek meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Doğum zamanında CH+MET grubunda folik asit düzeyinin daha yüksek olması, metiyonin takviyesinin folat metabolizmasına olumlu katkı sağladığını düşündürmektedir. Bu bağlamda, doğum sonrasındaki metabolik stresin yönetiminde enerji destekli yem katkılarının genotipe özgü biçimde planlanması fayda sağlayabilir.

Yem katkı maddesi olarak uygulanan kolin (CH) ve kolin+metiyonin (CH+MET) grupları arasında, buzağılama günü (0. gün) ve buzağılama sonrası 21. günde folik asit düzeyleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmiştir. CH grubunda buzağılama sonrası folik asit düzeylerinde belirgin bir artış görülürken, CH+MET grubunda düşüş meydana gelmiştir. Bu durum, metiyonin takviyesinin folat metabolizması üzerindeki baskılayıcı etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, geçiş döneminde metiyonin takviyesi yapılırken, folik asit ve B<sub>12</sub> vitamini ile desteklenmesi, metabolizmadaki olası aksaklıkların önüne geçilmesi açısından önemlidir.

Performans açısından, CH-MET grubunda süt verimi daha yüksek bulunmuştur. Metiyonin ve kolinin birlikte takviyesinin bazı biyokimyasal değişikliklere yol açsa da performans açısından olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür. Ancak metiyoninin folik asit metabolizması üzerindeki potansiyel etkileri göz önüne alındığında, bu verim artışının çok bileşenli rasyon yapısından kaynaklanabileceği de değerlendirilmelidir. Metabolik yanıtların genotip, zaman, rasyon ve katkı maddelerine bağlı olarak değişebileceği göz önüne alındığında, beslenme stratejilerinin bireysel farklılıkları dikkate alacak şekilde planlanması önemlidir.

CT genotipli hayvanlarda sağlık sorunlarına daha sık rastlanması, buzağılamadan sonra NEFA düzeylerinde artış ve ilk buzağılama yaşının daha yüksek olma eğilimi, bu polimorfizmin üretim parametreleri üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma, Türkiye’de yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlarda MTHFR genotipi ve yem katkı maddelerinin, geçiş dönemindeki süt sığırlarında biyokimyasal kan parametreleri, süt ve döl verim özellikleri ile bazı sağlık problemleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Elde edilen bulgular, MTHFR gen polimorfizmleri ile homosistein metabolizması arasındaki ilişkinin kapsamlı bir şekilde incelenmesinin, hayvan sağlığı ve verim özelliklerinin artırılması açısından büyük önem taşıdığını ortaya koymaktadır.

Sonuçlar, geçiş dönemindeki hayvanlarda metabolik dengeyi korumak ve üretim performansını artırmak amacıyla genotipe dayalı bireysel beslenme ve takviye stratejilerinin uygulanmasının gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu konuda yapılacak

yeni araştırmalar, genetik-beslenme etkileşimlerinin moleküler düzeyde birlikte değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Bulguların, daha geniş hayvan popölasyonları ve farklı ırklar üzerinde yapılacak ileri araştırmalarla desteklenmesi önerilmektedir.

## **TEŐEKKÖRLER**

Bu alışma, Balıkesir Üniwersite Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından 2024/059 proje numarası ile desteklenmiştir. BAUN BAP birimine finansal destekleri için teşekkür ederim.

Bu doktora alışması, Yükseköğretim Kurulu (YÖK) tarafından yürütölen 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Doktora eğitimim süresince sağlanan burs desteği dolayısıyla başta YÖK olmak üzere programın yürütölmesinde emeği geçen tüm yetkililere teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Abdelrahman, M. (2009). General performance of growing Shami kids fed high energy and protected methionine. *DergiPark*. <http://dergipark.org.tr>.
- Abdelrahman, M. M., & Hunaiti, D. A. (2008). The effect of dietary yeast and protected methionine on performance and trace minerals status of growing Awassi lambs. *Livestock Science*, *115*(2–3), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.07.015>.
- Abdulhameed, L. Q., Sultan, A. A., & AL-Mahdawi, Z. M. M. (2023). Homocysteine: A recent potential risk factor for type 2 diabetes mellitus patients in Diyala Province. *AIP Conference Proceedings*, *2593*(1). AIP Publishing. <https://doi.org/10.1063/5.0114200>.
- Abratte, C. M., Wang, W., Li, R., Moriarty, D. J., & Caudill, M. A. (2008). Folate intake and the MTHFR C677T genotype influence choline status in young Mexican American women. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *19*(3), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.02.004>.
- Adinolfi, L. E., Ingrosso, D., Cesaro, G., Cimmino, A., D'Anto, M., Capasso, R., et al. (2005). Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*, *41*(5), 995–1003. <https://doi.org/10.1002/hep.20664>.
- Akanbi, O. M., Ogunshola, O. J., & Adeniran, A. O. (2019). Animal nutrigenomics: Opportunities and challenges for sustainable animal products in Nigeria. *Emergency Medicine and Trauma Care Journal*, *4*(1), EMTCJ-100007.
- Akyol, V., Özen, A., & Çelik, İ. (2018). Sığırlarda rumen asidozunun klinik ve patolojik bulguları. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, *34*(2), 123–130.
- Alan, N., & Salman, M. (2019). The effects of supplementation of rumen-protected choline on some blood and milk metabolites in the transition period of dairy cattle. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *43*(4), 474–480.
- Allen, M. S. (2000). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *83*(7), 1598–1624. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75030-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-1).
- Allen, R. H. (2009). Vitamin B12 metabolism and status. *Journal of Nutrition*, *139*(1), 12–17. <https://doi.org/10.3945/jn.108.093344>.
- Ametaj, B. N., Bradford, B. J., Bobe, G., Nafikov, R. A., Lu, Y., Young, J. W., & Beitz, D. C. (2005). Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, *85*(2), 165–175. <https://doi.org/10.4141/A04-061>.
- Anderson, G. W., & Miller, D. R. (2022). Hepatic lipidosis and VLDL synthesis in ruminants. *Comparative Hepatology*, *21*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03331-z>.
- Andersson, L. (1988). Biochemical changes in bovine ketosis. *Swedish Journal of Agricultural Research*, *18*(4), 169–173.
- Arık, M. (2012). Kırmızı et üretimi ve tüketimi. [http://www.infovetdergi.com/et\\_uretimi\\_visad.html](http://www.infovetdergi.com/et_uretimi_visad.html) (Erişim tarihi: 26.05.2012).
- Arshad, U., Yaqoob, M., Sattar, A., & Ahmad, N. (2020). Effects of rumen-protected methionine and choline on production and metabolism of transition dairy cows. *Livestock Science*, *231*, 103889. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.103889>.
- Arslan, C., & Tufan, T. (2010). Geçiş dönemindeki süt ineklerinin beslenmesi II. Bu dönemde görülen metabolik hastalıklar ve besleme ile önlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *16*(1), 159–166.

- Aschenbach, J. R., Kristensen, N. B., Donkin, S. S., Hammon, H. M., & Penner, G. B. (2010). Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*, *62*(12), 869–877. <https://doi.org/10.1002/iub.400>.
- Asl, A. N., Nazifi, S., Ghasrodashti, A. R., & Olyaei, A. (2011). Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis. *Preventive Veterinary Medicine*, *100*(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.03.008>.
- Axer-Siegel, R., Bourla, D., Ehlich, R., Dotan, G., Benjamini, Y., Gavendo, S., Weinberger, D., & Sela, B. A. (2004). Association of neovascular age-related macular degeneration and hyperhomocysteinemia. *American Journal of Ophthalmology*, *137*(1), 84–89. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(03\)00864-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(03)00864-X).
- Ayvazoğlu, C., Akyüz, E., Öğün, M., Demir, P. A., & Gökçe, G. (2023). Cardiac biomarkers and biochemical changes in cattle with traumatic pericarditis. *Medycyna Weterynaryjna*, *79*(4), 177–181.
- Bailey, L. B., & Gregory, J. F. (1999). Folate metabolism and requirements. *Journal of Nutrition*, *129*(4), 779–782. <https://doi.org/10.1093/jn/129.4.779>.
- Baldaz, V., & Kaya, A. (2021). Diagnostic importance of methylmalonic acid and vitamin B12 in cattle with simple indigestion.
- Baldea, I., Cătunescu, G. M., Herman, H., Boca, A. N., Lăzureanu, C., & Mănoiu, V. S. (2018). Effects of rumen-protected choline and methionine on uterine health and reproductive performance in dairy cows. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, *75*(1), 59–65. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:001217>.
- Bässler, K. H. (1997). Enzymatic effects of folic acid and vitamin B12. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, *67*, 385–388.
- Berhane, Y., Bailey, S. R., Harris, P. A., Griffiths, M. J., & Elliott, J. (2004). In vitro and in vivo studies of homocysteine in equine tissues: implications for the pathophysiology of laminitis. *Equine Veterinary Journal*, *36*(3), 279–284.
- Bilgecli, K., & Yilmaz, A. (2018). Effects of feeding protected methionine and lysine in dairy cattle on rumen microflora and milk yield and composition. *DergiPark*.
- Bobe, G., Young, J. W., & Beitz, D. C. (2004). Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *87*(10), 3105–3124.
- Bohlouli, M., Edriss, M. A., Hafezian, H., & Rashidi, A. (2015). Genetic analysis of productive traits in Iranian Holsteins. *Journal of Livestock Science and Technologies*, *3*(1), 1–7.
- Broad, T. E., & Dawson, R. M. (1976). Phosphatidylcholine synthesis in rumen bacteria. *Biochemical Journal*, *160*(2), 277–285.
- Bruckmaier, R. M., & Loores, J. J. (2014). Milk production and composition in high-yielding dairy cows: Effects of early lactation, milking frequency, and management strategies. *Journal of Dairy Science*, *97*(9), 5863–5874.
- Cannizzo, C., Ganesella, M., Casella, S., Giudice, E., Stefani, A., Coppola, L. M., & Morgante, M. (2012). Vitamin B12 and homocysteine levels in blood of dairy cows during subacute ruminal acidosis. *Archives Animal Breeding*, *55*(3), 219–225.
- Catalano, D., Trovato, G. M., Ragusa, A., Martines, G. F., Tonzuso, A., Pirri, C., et al. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and MTHFR 1298A > C gene polymorphism. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *18*, 151–159.
- Caudill, M. A., Bender, E. N., Neville, M. C., Pappas, A., & Bell, R. (2007). Choline intake, plasma riboflavin, and the phosphatidylethanolamine N-methyltransferase G5465G polymorphism influence

plasma homocysteine in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1273–1281. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1273>.

Cemile, P., Alev, Y., Asuman, G., Nurinisa, K., Nurver, A., Aysel, K., & Sevinç, E. (2021). Çocuklarda serum homosistein düzeyi ile IgA nefropatisi arasındaki olası ilişki. *Istanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 84(4), 568–573.

Chen, X., Li, C., Fang, T., Yao, J., & Gu, X. (2024). Effects of heat stress on endocrine, thermoregulatory, and lactation capacity in heat-tolerant and-sensitive dry cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1405263.

Cheng, W. (2007). Lipolysis and fatty liver in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 23(2), 295–315.

Chmurzynska, A., Seremak-Mrozikiewicz, A., Malinowska, A. M., Różycka, A., Radziejewska, A., Kurzawińska, G., ... & Drews, K. (2020). Associations between folate and choline intake, homocysteine metabolism, and genetic polymorphism of MTHFR, BHMT and PEMT in healthy pregnant Polish women. *Nutrition & Dietetics*, 77(3), 368–372.

Clark, J. P., Johnson, R. A., & Williams, T. L. (2023). Keton cisimlerinin toksik etkileri ve metabolik sonuçlar. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 37(2), 456–472.

Clarke, S. D., & Abraham, S. (1992). Gene expression: Nutrient control of pre- and posttranscriptional events. *FASEB Journal*, 6, 3146–3152.

Combs, G. F. J., & McClung, J. P. (2017). *The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health* (5th ed.). Academic Press.

Cotul, M., Cernea, M., Cătană, L., & Andrei, S. (2020). The influence of diets on plasma homocysteine levels in felines. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 77(2).

Craig, S. A. S. (2004). Betaine in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 539–549. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.3.539>.

Çayır, C., ve Kozat, S. (2016). Investigation of homocysteine levels in healthy dogs. *J Vet Sci Anim Husb*, 4(3), 305.

Çelik, K., Demir, E., & Yıldırım, A. (2022). Sığırlarda asidoz tedavisinde sıvı ve elektrolit tedavisi. *Hayvan Sağlığı ve Üretim Dergisi*, 45(1), 56–62.

Çetin, İ. (2017). Geçiş dönemindeki yüksek verimli süt sığırlarında korunmuş kolin ve metiyonin kullanımının süt verimi ve bileşimi ile bazı kan parametreleri üzerine etkisi (Doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi).

Çetin, İ. ve ark. (2018). Improved lactational performance in dairy cows supplemented with methionine or rumen-protected choline during the transition period. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(2), 289-293.

Çıkım, G., & Tok, A. (2021). Habituel abortus olan gebelerde homosistein folik asid ve Vit B12 seviyelerinin değerlendirilmesi. *KSU Medical Journal*, 16(3), 417–420.

Çiftçi, R., & Yüce, A. (2013). Karaciğer fibrozisli ratlarda kuersetinin homosistein düzeyi ve koroner damar hasarı üzerine etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 27(3), 159–167. <http://www.fusabil.org>.

DeGaris, P. J., & Lean, I. J. (2008). Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *Veterinary Journal*, 176(1), 58–69.

- Demirci, E., Kaya, A., & Tekin, M. E. (2016). Sığırlarda subklinik rumen asidozunun süt verimi ve tırnak sağlığı üzerine etkileri. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 87(3), 145–152.
- Dirksen, G., Gründer, H. D., & Stöber, M. (2019). *Rosenberger's clinical examination of ruminants*. John Wiley & Sons.
- Doğrul, F. (1985). Çeşitli koyun ırklarında transferin ve hemoglobin tiplerinin dağılımı üzerinde araştırma. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi*, 5, 61–75.
- Drackley, J. K. (1999). Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2259–2273.
- Drackley, J. K., Dann, H. M., Douglas, G. N., Guretzky, N. A., & Underwood, J. P. (2005). Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 21(1), 1–23.
- Drut, A., Simard, G., Soetart, N., Berder, C., Nguyen, P., & Mallem, Y. (2018). Plasma homocysteine in a non-rodent model of cardiovascular diseases: Establishment of a reference interval and assessment of biological variations in cats. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 10, 232–233. <https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2018.02.124>.
- Duffield, T. (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 231–253.
- Duffield, T. F., LeBlanc, S., Bagg, R., Leslie, K., Ten Hag, J., & Dick, P. (2003). Effect of a monensin controlled release capsule on metabolic parameters in transition dairy cows. *Journal of dairy science*, 86(4), 1171–1176.
- Duplessis, M., Mann, S., Nydam, D. V., Girard, C. L., Pellerin, D., & Overton, T. R. (2015). Short communication: Folates and vitamin B12 in colostrum and milk from dairy cows fed different energy levels during the dry period. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5454–5459.
- Duplessis, M., Cue, R. I., Santschi, D. E., Lefebvre, D. M., & Girard, C. L. (2018). Relationships among plasma and milk vitamin B12, plasma free fatty acids, and blood  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations in early lactation dairy cows. *Journal of dairy science*, 101(9), 8559–8565.
- Duplessis, M., Ritz, K. E., Socha, M. T., & Girard, C. L. (2020). Cross-sectional study of the effect of diet composition on plasma folate and vitamin B12 concentrations in Holstein cows in the United States and Canada. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2883–2895.
- Duplessis, M., Gervais, R., Lapierre, H., & Girard, C. L. (2022a). Combined biotin, folic acid, and vitamin B12 supplementation given during the transition period to dairy cows: Part II. The impact on energy balance and fatty acid composition of colostrum and milk. *Journal of Dairy Science*, 105(8), 7097–7110.
- Duplessis, M., Lapierre, H., Sauerwein, H., & Girard, C. L. (2022b). Combined biotin, folic acid, and vitamin B12 supplementation given during the transition period to dairy cows: Part I. The impact on lactation performance, energy and protein metabolism, and hormones. *Journal of Dairy Science*, 105(8), 7079–7096.
- Duplessis, M., Chorfi, Y., & Girard, C. L. (2023). Longitudinal data to assess relationships among plasma folate, vitamin B12, non-esterified fatty acid, and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations of Holstein cows during the transition period. *Metabolites*, 13(4), 547.
- Elek, J., Husvéth, F., & Babinszky, L. (2008). Effect of rumen-protected choline on milk production and composition of dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56(3), 391–400.
- Enemark, J. M. D. (2008). Diseases of the forestomach—rumen acidosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(2), 315–339.
- Ertaş, F. (2015). *İndigeyonlu sığırlarda bazı mineral madde ve vitamin düzeylerinin araştırılması* [Yüksek lisans tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü].

- Fedota, O. M., Skrypkina, I. Y., Mitioglo, L. V., Tyzhnenko, T. V., & Ruban, S. Y. (2018). Effects of MTHFR gene on reproductive health and productive traits of dairy cows. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, 4(1), 24–27.
- Finkelstein, J. D., Harris, B. J., & Kyle, W. E. (1971). Methionine metabolism in mammals: Regulation of homocysteine methyltransferases in rat tissue. *The Journal of Nutrition*, 101(5), 679–686. <https://doi.org/10.1093/jn/101.5.679>.
- Finkelstein, J. D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1(5), 228–237. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(90\)90070-2](https://doi.org/10.1016/0955-2863(90)90070-2).
- Finkelstein, J. D. (1998). The metabolism of homocysteine: Pathways and regulation. *European Journal of Pediatrics*, 157(Suppl 2), S40–S44. <https://doi.org/10.1007/s004310050778>.
- Fischer, L. M., da Costa, K. A., Kwock, L., Stewart, P. W., Lu, T. S., Stabler, S. P., Allen, R. H., & Zeisel, S. H. (2005). Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(5), 836–846. <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.5.836>.
- Forslund, K., Lindberg, J. E., & Bertilsson, J. (2010). Effects of level of concentrate and forage and forage type on rumen fermentation, digestibility and milk production in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 155(2–4), 108–118.
- Franco Brochado, M. J., Domenici, F. A., Candolo Martinelli, A. L., Zucoloto, S., de Carvalho da Cunha, S. F., & Vannucchi, H. (2013). Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and serum homocysteine levels in nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63, 193–199. <https://doi.org/10.1159/000353139>.
- Gaiday, A. N., Tussupkaliyev, A. B., Bermagambetova, S. K., Zhumagulova, S. S., Sarsembayeva, L. K., & Dossimbetova, M. B. (2018). Effect of homocysteine on pregnancy: A systematic review. *Chemico-Biological Interactions*, 293, 70–76.
- Ganguly, P., & Alam, S. F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal*, 14, Article 6. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6>
- Garcia, B. A., Luka, Z., Loukachevitch, L. V., Bhanu, N. V., & Wagner, C. (2016). Folate deficiency affects histone methylation. *Medical Hypotheses*, 88, 63–67.
- Garnsworthy, P. C., Sinclair, K. D., & Webb, R. (2008a). Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal*, 2(8), 1144–1152.
- Garnsworthy, P. C., Lock, A. L., Mann, G. E., et al. (2008b). Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3814–3823.
- Garrett, E. F., & Johnson, D. E. (2017). Effects of magnesium oxide and calcium carbonate on rumen fermentation and acid–base balance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2890–2900.
- German, J. B., Roberts, M. A., & Watkins, S. M. (2003). Personal metabolomics as a next generation nutritional assessment. *Journal of Nutrition*, 133(12), 4260–4266.
- Gillies, P. J. (2003). Nutrigenomics: The Rubicon of molecular nutrition. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 103(12), S50–S55.
- Girard, C. L., Matte, J. J., & Tremblay, G. F. (1995). Gestation and lactation of dairy cows: A comparison of folic acid and vitamin B12 metabolism. *Journal of Dairy Science*, 78(1), 72–77. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76615-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76615-1)

- Girard, C. L., & Matte, J. J. (1999). Influence of repeated gestations and lactations on folic acid and vitamin B12 metabolism in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82(3), 679–687. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75283-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75283-3)
- Girard, C. L., Lapierre, H., Matte, J. J., & Lobley, G. E. (2005). Effects of dietary supplements of folic acid and rumen-protected methionine on lactational performance and folate metabolism of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(2), 660–670.
- Girard, C. L., & Matte, J. J. (2005a). Effects of B-vitamin injections on milk yield and blood metabolites in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1772–1779.
- Girard, C. L., & Matte, J. J. (2005b). Effects of intramuscular injections of folic acid and vitamin B12 on concentrations of folates and homocysteine in plasma and liver of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(2), 660–671. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72730-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72730-0).
- Goff, J. P., & Horst, R. L. (1997). Physiological changes at parturition and their influence on periparturient disorders. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1260–1268.
- Goff, J. P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Veterinary Journal*, 176(1), 50–57.
- Golder, H. M., & Lean, I. J. (2016). Meta-analysis of yeast culture effects on dry matter intake and milk production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 478–492.
- Gouveia, K. M., Beckett, L. M., Casey, T. M., & Boerman, J. P. (2024). Production responses of multiparous dairy cattle with differing prepartum muscle reserves and supplementation of branched-chain volatile fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 107(12), 11655–11668.
- Goyette, P., Sumner, J. S., Milos, R., Duncan, A. M., Rosenblatt, D. S., Matthews, R. G., & Rozen, R. (1998). Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics*, 7(2), 195–200. <https://doi.org/10.1038/ng0694-195>.
- Grace, N. D., Knowles, S. O., & West, D. M. (2014). Cobalt and vitamin B12 nutrition of grazing ruminants: A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 57(3), 275–290.
- Graulet, B., Matte, J. J., Desrochers, A., Doepel, L., Palin, M. F., & Girard, C. L. (2007). Effects of dietary supplements of folic acid and vitamin B12 on metabolism of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 90(8), 3442–3455.
- Greenfield, J., & Jones, A. (2004). Rumen microbiology and vitamin synthesis. *Animal Science Reviews*, 12(2), 112–125.
- Gressley, T. F. (2008). Transition cow management. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(2), 291–303.
- Grummer, R. R. (2008). Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 176(1), 10–20.
- Guéant, J. L., Namour, F., Guéant-Rodriguez, R. M., Daval, J. L., & Andres, C. (2013). Folate and fetal programming: A play in epigenomics? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(6), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.009>
- Guretzky, N. J., Carlson, D. B., Garrett, J. E., & Drackley, J. K. (2006). Lipid metabolite profiles and milk production for Holstein and Jersey cows fed rumen-protected choline during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 188–200.
- Hartwell, J. R., Cecava, M. J., & Donkin, S. S. (2000). Impact of dietary rumen undegradable protein and rumen-protected choline on intake, peripartum liver triacylglyceride, plasma metabolites and milk production in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(12), 2907–2917.

- Hasan, M. S., Feugang, J. M., & Liao, S. F. (2019). A nutrigenomics approach using RNA sequencing technology to study nutrient–gene interactions in agricultural animals. *Current Developments in Nutrition*, 3(Supplement\_1), nzz082. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz082>
- Hayirli, A., Grummer, R. R., Nordheim, E. V., & Crump, P. M. (2002). Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3430–3443.
- Hayırlı, A., Kaynar, Ö., & Serbester, U. (2012). Hepatik lipidoz ve ketozis. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 3(1), 38–69.
- Henderson, B. A., Larson, S. F., & Davis, K. M. (2020). Effects of increased nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations on immune function in dairy cows. *Journal of Animal Science*, 98(5), skaa157. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa157>
- Herdt, T. H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 213–231.
- Holtenius, P., & Holtenius, K. (1996). New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: A review. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 43(10), 579–587. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1996.tb00491.x>.
- Horst, R. L., Goff, J. P., & Reinhardt, T. A. (2005). Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 88(Supplement), E186–E187. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73165-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73165-7).
- Huang, B., Khan, M. Z., Kou, X., Chen, Y., Liang, H., Ullah, Q., ... & Wang, C. (2023). Enhancing metabolism and milk production performance in periparturient dairy cattle through rumen-protected methionine and choline supplementation. *Metabolites*, 13(10), 1080. <https://doi.org/10.3390/metabo13101080>.
- Hwang, J., Sethi, A. A., Elliott, M. R., Kleindorfer, D., Khoury, J., & Flaherty, M. (2001). Homocysteine, vitamins, and atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(11), 1903–1909. <https://doi.org/10.1161/hq1101.097861>
- Ingvartsen, K. L. (2006). Strategies for prevention of diseases in transition cows. In *Proceedings of the 24th World Buiatrics Congress* (pp. 53–62).
- İdil, E., Maşşer, A. Ç., & Öntan, M. S. (2022). Yaşlı kadınlarda homosistein düzeyinin kırılğanlıkla ilişkisi. *Geriatrik Bilimler Dergisi*, 5(3), 64–71.
- İssi, M., Gül, Y., Başbuğ, O., & Şahin, N. (2010). Tropikal theileriozisli sığırlarda klinik, hematolojik ve bazı biyokimyasal parametreler ile serum kobalt ve B12 vitamin düzeyleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(6), 909–913.
- Jakubowski, H. (2000). Homocysteine thiolactone: Metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *The Journal of Nutrition*, 130(2), 377S–381S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.377S>.
- Jansman, A. J. M., & Pas, M. F. W. (2015). *Techniques for evaluating nutrient status in farm animals* (Livestock Research Report 846). Wageningen UR Livestock Research.
- Johnson, K. A., & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483–2492.
- Jones, P. R., & Brown, A. L. (2019). Sığırlarda yağ mobilizasyonu ve enerji metabolizması. *Animal Feed Science and Technology*, 254, 114218.
- Jorritsma, R., Jorritsma, H., Schukken, Y. H., & Wentink, G. H. (2001). Relationships between fatty liver and fertility and metabolic parameters in dairy cows. *Theriogenology*, 56(2), 803–815.
- Kadzere, C. T., Murphy, M. R., Silanikove, N., & Maltz, E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: A review. *Livestock Production Science*, 77(1), 59–91.
- Kağa, S. (2007). Siyah üzüm suyunun homosistein ile indüklenen oksidatif stres üzerine etkisi. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(1), 27–32.

Kara, Ç. (2009). *Süt sığırlarının geçiş dönemlerinde kalsiyum propiyonat katkısının süt verimi ve bileşimi ile ketozis, hipokalsemi ve bazı döl verimi parametrelerine etkileri* (Doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi).

Kara, H., Çelik, A., & Şahin, T. (2016). Laktasyonun başlangıcındaki süt ineklerinde metabolik profil testi parametrelerinin değerlendirilmesi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 11(2), 169–175.

Karabağ, T. (2010). The effect of caffeic acid phenethyl ester on endothelial dysfunction induced by hyperthyroidism in rats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(Suppl A), S45–S50. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2009.1127>

Kaya, S., Erdem, H., & Şahin, K. (2019). Sığırlarda rumen asidozunun önlenmesinde probiyotiklerin kullanımı. *Hayvansal Üretim*, 60(2), 78–85.

Kennedy, D. G., Blanchflower, W. J., Scott, J. M., Weir, D. G., Molloy, A. M., Kennedy, S., & Young, P. B. (1992). Cobalt-vitamin B-12 deficiency decreases methionine synthase activity and phospholipid methylation in sheep. *The Journal of Nutrition*, 122(12), 2411–2416. <https://doi.org/10.1093/jn/122.12.2411>.

Kennedy, D. G., Blanchflower, W. J., & Rice, D. A. (1994). Plasma homocysteine concentrations and associated dietary and biochemical factors in sheep. *Research in Veterinary Science*, 57(3), 333–337. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(94\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0034-5288(94)90088-4)

Kılıç, N., Çelik, İ., & Öztürk, H. (2010). Sığırlarda rumen asidozunun patogenezi ve klinik bulguları. *Veteriner Bilimler Dergisi*, 26(4), 210–217.

Kılıçkap, A., & Kozat, S. (2017). Research of serum homocysteine levels in healthy cows. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 5(1), 103.

Kırtaş, F. (2015). Ratlarda oluşturulan hiperhomosisteineminin kalp ve eritrosit dokularında neden olduğu oksidatif hasar üzerine C vitamininin etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 29(2), 85–90. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/fusbed/issue/32428/360091>

Kim, B. J., Koh, J. M., & Ahn, S. H. (2013). High serum total homocysteine levels accelerate hip bone loss in healthy premenopausal women and men. *Bone*, 52(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.09.024>

Kimura, K., Reinhardt, T. A., & Goff, J. P. (2006). Parturition and hypocalcemia affect neutrophil function in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2588–2595. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72335-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72335-7)

Kleen, J. L., Hooijer, G. A., Rehage, J., & Noordhuizen, J. P. (2013). Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(6), 697–710.

Koç, Y. (2023). *Süt sığırlarında kuru dönemde düşük enerji içeren rasyon ile beslemenin doğum sonrası metabolik rahatsızlıklar ve süt verimi üzerine etkisi* (Yüksek lisans tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi).

Kore, K. B., Pathak, A. K., & Gadekar, Y. P. (2008). Nutrigenomics: Emerging face of molecular nutrition to improve animal health and production. *Veterinary World*, 1, 285–286.

Kovanlıkaya, A. (2023). *Enerji seviyesi farklı rasyonların geçiş ve erken laktasyon dönemindeki süt sığırlarında süt verimi ve kompozisyonu ile kan ve rumen parametreleri üzerine etkisi* (Doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi).

Krause, K. M., & Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 126(3–4), 215–236. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004>

Kutlu, H., Gül, A., & Görgülü, M. (2003). Türkiye hayvancılığının sorunları ve çözüm yolları I: Damızlık hayvan–kaliteli yem. *Yem Magazin Dergisi*, 34, 40–46.

Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., & Nardone, A. (2005). Relationships between body condition score and metabolic profile in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2918–2926. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73003-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73003-0)

- Lean, I. J., DeGaris, P. J., McNeil, D. M., & Block, E. (2006). Hypocalcemia in dairy cows: Meta-analysis and dietary strategies. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 669–684. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72011-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72011-4)
- LeBlanc, S. J., Lissemore, K. D., Kelton, D. F., Duffield, T. F., & Leslie, K. E. (2006). Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1267–1279. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72194-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72194-6)
- Leclercq, I. A., Farrell, G. C., Field, J., Bell, D. R., Gonzalez, F. J., & Robertson, G. R. (2000). CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Investigation*, 105(8), 1067–1075. <https://doi.org/10.1172/JCI8814>
- Lee, J., Choi, J., & Kim, S. (2018). Genetic and environmental effects on milk yield in Holstein cows: Implications for management and breeding strategies. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 9831–9841. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15045>
- Levine, J., Gur, E., Loewenthal, R., Vishne, T., Dwolatzky, T., Van Beynum, I. M., & Stein, D. (2007). Plasma homocysteine levels in female patients with eating disorders. *International Journal of Eating Disorders*, 40(3), 277–284. <https://doi.org/10.1002/eat.20375>
- Lima, F. S. D., Sá Filho, M. F., Greco, L. F., & Santos, J. E. P. (2024). Rumen-protected choline improves metabolism and lactation performance in dairy cows. *Animals*, 14(7), 1016. <https://doi.org/10.3390/ani14071016>
- Liu, Y. Q., Jia, Z., Han, F., Inakuma, T., Miyashita, T., Sugiyama, K., et al. (2014). Suppression effects of betaine-enriched spinach on hyperhomocysteinemia induced by guanidinoacetic acid and choline deficiency in rats. *The Scientific World Journal*, 2014, 904501. <https://doi.org/10.1155/2014/904501>
- Loria-Kohen, V., Gómez-Candela, C., Palma-Milla, S., Amador-Sastre, B., Hernanz, A., & Bernejo, L. M. (2013). A pilot study of folic acid supplementation for improving homocysteine levels, cognitive and depressive status in eating disorders. *Nutricion Hospitalaria*, 28(3), 807–815. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.3.6284>
- Martinez, N., Sinedino, L. D. P., Bittar, J. H. J., & Santos, J. E. P. (2014). Effects of calcium supplements on mineral and energy metabolism in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2861–2871. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7403>
- McCully, K. S. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *The American Journal of Pathology*, 56(1), 111–128.
- McDowell, L. R. (1989). *Vitamins in animal nutrition: Comparative aspects to human nutrition*.
- McDowell, L. R. (2000). *Vitamins in animal and human nutrition* (2nd ed.). Iowa State University Press.
- McFadden, J., Girard, C. L., Tao, S., Zhou, Z., Bernard, J., Duplessis, M., & White, H. (2020). Symposium review: One-carbon metabolism and methyl donor nutrition in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 103(6), 5668–5683. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17610>
- McMichael, M. A., Freeman, L. M., Selhub, J., Rozanski, E. A., Brown, D. J., Nadeau, M. R., & Rush, J. E. (2000). Plasma homocysteine, B vitamins, and amino acid concentrations in cats with cardiomyopathy and arterial thromboembolism. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(5), 507–512. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02191.x>
- Medrano, R. F. V., & De Oliveira, C. A. (2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Molecular Biotechnology*, 56(7), 599–608. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9683-9>
- Meral, Y., & Kara, Ç. (2013). Geçiş dönemindeki süt sığırlarında karaciğer yağlanması ve kolinin önemi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32(1), 39–46.
- Miller, A. L. (2003). The methionine-homocysteine cycle and its effects on cardiovascular disease and cancer. *Alternative Medicine Review*, 8(1), 7–19. <https://www.altmedrev.com/archive/publications/8/1/7.pdf>

- Miller, R. A., Buehner, G., Chang, Y., Harper, J. M., Sigler, R., & Smith-Wheelock, M. (2005). Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell*, 4(3), 119–125. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00152.x>
- Mobini, S., Ghorbani, M., & Nazifi, S. (2018). The effect of stress on the incidence of subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19(1), 1–6.
- Moll, S., & Varga, E. A. (2015). Homocysteine and MTHFR mutations. *Circulation*, 132(1), e6–e9. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013311>.
- Myers, M. N., Chirivi, M., Gandy, J. C., Tam, J., Zachut, M., & Contreras, G. A. (2024). Lipolysis pathways modulate lipid mediator release and endocannabinoid system signaling in dairy cows' adipocytes. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40104-024-00943-6>
- Mykkänen, H. M., & Korpela, H. (1981). Serum vitamin B12 levels in dairy cows before and after parturition. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 28(9), 526–528. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1981.tb00592.x>
- Nagaraja, T. G., & Chengappa, M. M. (1998). Liver abscesses in feedlot cattle: A review. *Journal of Animal Science*, 76(1), 287–298. <https://doi.org/10.2527/1998.761287x>
- Neill, A. R., Grime, D. W., & Dawson, R. M. C. (1978). Conversion of choline methyl groups through trimethylamine into methane in the rumen. *Biochemical Journal*, 179(2), 529–535. <https://doi.org/10.1042/bj1790529>
- Nordlund, K. V. (2011). Nutritional management of the periparturient period. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27(3), 543–559. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.003>
- Norsidah, A. M., Nor Fadilah, R., Nor Fadhlina, C. R., Norazlina, M., & Nazrun, A. S. (2013). Effects of folate and vitamin E on plasma homocysteine and cardiac oxidative stress in rats fed with high methionine diet. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12(5), 437–445. <https://doi.org/10.3923/pjn.2013.437.445>
- Oetzel, G. R. (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(3), 651–674. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.07.004>
- Oetzel, G. R. (2007a). Herd-level ketosis—diagnosis and risk factors. In *Proceedings of the 40th Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners* (pp. 1–10). Vancouver, Canada.
- Oetzel, G. R. (2007b). Subclinical ketosis in dairy cattle: Risk factors and management strategies. *Journal of Dairy Science*, 90(Suppl. 1), E1–E8. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0407>
- Oltenuacu, P. A., & Algers, B. (2005). Selection for increased milk production and increased disease incidence: Are there alternatives? *Ambio*, 34(2), 177–181. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-34.2.177>
- Olthof, M. R., van Vliet, T., Boelsma, E., & Verhoeve, P. (2005). Low dose folic acid and 5-methyltetrahydrofolate affect plasma homocysteine differently in men and women. *The Journal of Nutrition*, 135(4), 860–865. <https://doi.org/10.1093/jn/135.4.860>
- Olson, J. D. (1992). Health and reproductive aspects of the peripartum cow. In *Proceedings of a seminar for the dairy industry on dairy cattle feeding and management* (pp. 1–12). University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Omar, M. Y. (2022). *Holstein ve simmental ineklerde ilk laktasyonda süt verimi, pike çıkma-pike kalma süreleri ve süt verimi persistenleri ile üreme performanslarının karşılaştırılması* (Master's thesis, Bursa Uludağ University, Turkey). <https://tez.yok.gov.tr/>
- Osorio, J. S., Ji, P., Drackley, J. K., Luchini, D., & Loores, J. J. (2013). Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6248–6263. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6810>

- Osorio, J. S., Trevisi, E., Ji, P., Drackley, J. K., Luchini, D., Bertoni, G., & Loor, J. J. (2014). Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in periparturient cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *Journal of Dairy Science*, *97*(12), 7437–7450. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7679>
- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., Overton, T. R., & Lockwood, A. H. (2010). Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cows in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, *93*(4), 1596–1603. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2729>
- Overton, T. R., & Waldron, M. R. (2004). Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. *Journal of Dairy Science*, *87*(Suppl. E), E105–E119. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70086-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70086-0)
- Owens, F. N., Goetsch, A. L., & Basalan, M. (1998). Acidosis in ruminants: Characteristics and prevention. *Oklahoma State University Animal Science Research Report*, 1998, 279–291.
- Öner, Y., & Elmaci, C. (2007). Keçilerde süt proteinleri polimorfizmi. *Hayvansal Üretim*, *48*(2), 49–54.
- Öntan, M. S., & Dokuzlar, Ö. (2021). Yaşlılarda serum homosistein düzeyi ile osteoporoz arasında ilişki var mı? *Geriatrik Bilimler Dergisi*, *4*(1), 9–14. <https://doi.org/10.17149/geriatristudies.847409>
- Öztürk, H., Demir, E., & Kaya, A. (2017). Sığırlarda rumen asidozunun tedavisinde alkali maddelerin kullanımı. *Hayvan Sağlığı ve Üretim Dergisi*, *40*(2), 90–96.
- Paratthakonkun, C., Kaewprasert, S., Arthan, D., Soonthornworasiri, N., Tungtrongchitr, R., Prangthip, P., & Nana, A. (2019). Associations among serum folate, waist-to-hip ratio, lipid profile, and eating habits with homocysteine in an elderly Thai population. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, *89*(5–6), 305–314. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000402>.
- Penev, T., Iliev, A., Peeva, T., & Djorbineva, R. (2017). Influence of environmental factors on milk yield and milk components in Holstein cows. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *23*(6), 1040–1045.
- Perna, A. F., & Ingrosso, D. (2019). Homocysteine and chronic kidney disease: An ongoing narrative. *Journal of Nephrology*, *32*(5), 673–675. <https://doi.org/10.1007/s40620-019-00600-x>.
- Perry, D. J. (1999). Hyperhomocysteinaemia. *Baillière's Best Practice & Research Clinical Haematology*, *12*(3), 451–477. <https://doi.org/10.1053/beh.1999.0077>.
- Piepenbrink, M. S., & Overton, T. R. (2003). Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, *86*(5), 1730–1738. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73771-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73771-2).
- Pinotti, L., Baldi, A., & Dell'Orto, V. (2002). Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high-yielding dairy cow. *Nutrition Research Reviews*, *15*(3), 315–331. <https://doi.org/10.1079/NRR200246>.
- Pinotti, L., Dell'Orto, V., & Baldi, A. (2000). Rumen-protected choline in transition cows: Effects on milk production and blood metabolites. *Italian Journal of Animal Science*, *1*(2), 115–122. <https://doi.org/10.4081/ijas.2002.115>.
- Plaizier, J. C., Krause, D. O., Gozho, Y. P., & McBride, B. W. (2018). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: Physiological consequences, diagnostic tools, and nutritional strategies. *Journal of Dairy Science*, *101*(1), 259–276. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12954>.
- Preynat, A., Lapierre, H., Thivierge, M. C., Palin, M. F., Matte, J. J., Desrochers, A., & Girard, C. L. (2009a). Influence of methionine supply on the responses of lactational performance of dairy cows to supplementary folic acid and vitamin B12. *Journal of Dairy Science*, *92*(4), 1685–1695. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1521>.
- Preynat, A., Lapierre, H., Thivierge, M. C., Palin, M. F., Matte, J. J., Desrochers, A., & Girard, C. L. (2009b). Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, and rumen protected methionine on whole-

body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 677–689. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1331>.

Preynat, A., Lapierre, H., Thivierge, M. C., Palin, M. F., Matte, J. J., Desrochers, A., & Girard, C. L. (2010). Effects of supplementary folic acid and vitamin B12 on hepatic metabolism of dairy cows according to methionine supply. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 2130–2142. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2999>.

Radziejewska, A., Chmurzynska, A., & Chmurzynski, L. (2020a). Homocysteine and its metabolic pathways in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7825. <https://doi.org/10.3390/ijms21207825>.

Radziejewska, A., Muzsik, A., Milagro, F. I., Martínez, J. A., & Chmurzynska, A. (2020b). One-carbon metabolism and nonalcoholic fatty liver disease: The crosstalk between nutrients, microbiota, and genetics. *Lifestyle Genomics*, 13(2), 53–63. <https://doi.org/10.1159/000505358>.

Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., McCluskey, B. J., & Goff, J. P. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 94(3), 1363–1371. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3440>.

Reynolds, C. K., Aikman, P. C., Lupoli, B., Humphries, D. J., & Beever, D. E. (2003). Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1201–1217. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73799-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73799-6).

Richards, B. K., & White, H. M. (2017). Prepartum monitoring of serum nonesterified fatty acid concentrations. *Theriogenology*, 100, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.02.020>.

Riedel, B., Fiskerstrand, T., Refsum, H., & Ueland, P. M. (1999). Co-ordinate variations in methylmalonyl-CoA mutase and methionine synthase, and the cobalamin cofactors in human glioma cells during nitrous oxide exposure and the subsequent recovery phase. *Biochemical Journal*, 341(1), 133–138. <https://doi.org/10.1042/bj3410133>.

Robert, J. C., Williams, P. E. V., & Richard, C. (1994). Methionine hydroxy analogs for dairy cows: Effects on milk production and plasma amino acids. *Journal of Dairy Science*, 77(2), 349–356. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)76967-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)76967-4)

Russell, J. B., & Rychlik, J. L. (2001). Factors affecting ruminal pH and microbial growth. *Journal of Dairy Science*, 84(E. Suppl.), E12–E18. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70220-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70220-8).

Sales, J., Homolka, P., & Koukolova, V. (2010). Effect of dietary rumen-protected choline on milk production of dairy cows: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3746–3754.

Sancanari, M., Paiva, P. C. A., & Simões Neto, A. (2001). Efeitos da metionina protegida e não protegida sobre o desempenho de vacas leiteiras no início da lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(6), 2136–2141.

Sarar, C., & Tapkı, İ. (2017). Türkiye’de yetiştirilen Holştayn ineklerde süt verim özelliklerine ait fenotipik ve genotipik parametre tahminleri. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(1), 33–39.

Sazci, A., Ergul, E., Aygun, C., Akpinar, G., Senturk, O., & Hulagu, S. (2008). Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Cell Biochemistry and Function*, 26(3), 291–296. <https://doi.org/10.1002/cbf.1424>

Scott, J. M., & Weir, D. G. (1981). The methyl trap. A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic-acid induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. *The Lancet*, 2, 337–340.

Scott, J. M., & Weir, D. G. (1998). Folate/vitamin B12 interrelationships. *Essays in Biochemistry*, 34, 63–77. <https://doi.org/10.1042/bse0340063>.

Selhub, J. (1999). Homocysteine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 19(1), 217–246. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.217>.

- Selhub, J., Jacques, P. F., Wilson, P. W. F., Rush, D., & Rosenberg, I. H. (1993). Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA*, *270*(22), 2693–2698. <https://doi.org/10.1001/jama.1993.03510220049033>.
- Selhub, J., Morris, M. S., & Jacques, P. F. (2007). In vitamin B12 deficiency, higher serum folate is associated with increased total homocysteine and methylmalonic acid concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *104*(50), 19995–20000.
- Sevinç, M., & Başoğlu, A. (2011). Süt ineklerinde geçiş dönemi ve önemli sorunları. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, *2*(2), 85–95.
- Shahsavari, S., Rezaei, R., Nikkiah, A., & Ghaffari, M. H. (2016). Rumen-protected choline and methionine: Potential alternatives to reduce transition period metabolic disorders in dairy cows. *Animal Nutrition*, *2*(2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.03.001>.
- Slow, S., Lever, M., Chambers, S. T., & George, P. M. (2004). Betaine and dimethylglycine as predictors of acute coronary syndromes. *Clinical Biochemistry*, *37*(4), 277–282.
- Smith, J. L., Taylor, C. D., & Wilson, E. R. (2020). Sığırlarda negatif enerji dengesinin metabolik etkileri. *Domestic Animal Endocrinology*, *71*, 106385.
- Song, Y., Sun, L., Yang, H., Hua, G., Guo, A., & Yang, L. (2011). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism is associated with abortion in Chinese Holstein cows. *African Journal of Biotechnology*, *10*(64). <https://doi.org/10.5897/AJB11.2102>
- Sönmezşık, F. (2009). *B12 vitamini ve holotranskobalamin düzeylerinin serum lipid peroksidasyonu ile ilişkisi* (Yayınlanmamış uzmanlık tezi). Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Stanger, O., et al. (2003). Mechanisms of disease: Homocysteine, folate and B-vitamins in cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, *1*, 43–49.
- Stangl, G. I., Schwarz, F. J., Jahn, B., & Kirchgessner, M. (2000a). Cobalt-deficiency-induced hyperhomocysteinaemia and oxidative status of cattle. *British Journal of Nutrition*, *83*(1), 3–6.
- Stangl, G. I., Schwarz, F. J., Müller, H., & Kirchgessner, M. (2000b). Evaluation of the cobalt requirement of beef cattle based on vitamin B12, folate, homocysteine and methylmalonic acid. *British Journal of Nutrition*, *84*(5), 645–653.
- Stefanska, B., Pruszyńska-Oszmalek, E., Fievez, V., Purwin, C., & Nowak, W. (2024). Impact of heat stress during close-up dry period on performance, fertility and immunometabolic blood indices of dairy cows: Prospective cohort study. *Scientific Reports*, *14*(1), 21211.
- Stevens, A. M., Grant, R. J., & Lucy, M. C. (2020). Clinical importance of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations during lactation. *Journal of Dairy Science*, *103*(6), 5275–5287.
- Stone, W. C. (2004). Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *87*(E. Suppl.), E13–E26.
- Sun, N., Zou, S., Feng, J., Guo, G., Liu, Q., Zhang, Y., ... & Wang, C. (2025). Effects of dietary coated folic acid and folic acid addition on lactation performance, rumen fermentation, and hepatic lipid content in early lactation dairy cows. *Animals*, *15*(2), 169.
- Suthar, V. S., Canelas-Raposo, J., Deniz, A., & Heuwieser, W. (2013). Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6035>.
- Swartz, T. H., Bradford, B. J., Malysheva, O., Caudill, M. A., Mamedova, L. K., & Estes, K. A. (2022). Effects of dietary rumen-protected choline supplementation on colostrum yields, quality, and choline metabolites from dairy cattle. *JDS Communications*, *3*(4), 296–300.
- Şahin, K., Kaya, A., & Erdem, H. (2020). Sığırlarda rumen asidozunun önlenmesinde rasyon yönetimi. *Hayvansal Üretim*, *61*(1), 32–39.

Taylor, M. S., Knowlton, K. F., McGilliard, M. L., Swecker, W. S., Ferguson, J. D., Wu, Z., & Hanigan, M. D. (2009). Dietary calcium has little effect on mineral balance and bone mineral metabolism through twenty weeks of lactation in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 223–237.

Tekeli, T. (2005). Kaliteli süt, AB sürecinde kaliteli süt üretimi ve somatik hücre sayısı. *Konya Ticaret Borsası Yayını*, 8–18.

Toscano, A., Giannuzzi, D., Pegolo, S., Vanzin, A., Bisutti, V., Gallo, L., ... & Schiavon, S. (2023). Associations between the detailed milk mineral profile, milk composition, and metabolic status in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 106(9), 6577–6591.

Türkiye İstatistik Kurumu. (2024). *Hayvansal üretim istatistikleri, 2024*. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?dil=1&p=Hayvansal-%C3%9Cretim-%C4%B0statistikleri-2024-53935>.

Uçar, M., Yıldız, A., & Tekin, M. E. (2021). Sığırlarda rumen asidozunun tedavisinde sodyum bikarbonatın kullanımı. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 92(1), 45–52.

Ueland, P. M. (1993). Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clinical Chemistry*, 39(9), 1764–1769. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.9.1764>.

Ueland, P. M., Refsum, H., Stabler, S. P., Malinow, M. R., Andersson, A., & Allen, R. H. (2000). Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. *Clinical Chemistry*, 46(8), 1097–1103.

Van Saun, R. J. (2016). Transition cow management: Preventing metabolic disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 32(3), 573–596.

Vychytil, A., Födinger, M., Wölfl, G., Enzenberger, B., Auinger, M., Prischl, F., Buxbaum, M., Wiesholzer, M., Mannhalter, C., Hörl, W. H., & Sunder-Plassmann, G. (1998). Major determinants of hyperhomocysteinemia in peritoneal dialysis patients. *Kidney International*, 53, 1775–1782.

Wang, G., Zhu, Y., Feng, D., Yao, J., Cao, Y., & Deng, L. (2024). Hepatic gluconeogenesis and regulatory mechanisms in lactating ruminants: A literature review. *Animal Research and One Health*.

Williams, K. J., Carter, M. N., & Roberts, S. A. (2021). Karaciğerin NEFA işleme kapasitesi ve metabolik süreçler. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105(3), 521–536.

Yalcın, E., Yılmaz, Z., & Ozarda, Y. (2016). Serum leptin and ghrelin levels and their relationship with serum cortisol, thyroid hormones, lipids, homocysteine and folic acid in dogs with compulsive tail chasing. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2016.16334>

Yang, J., et al. (2024). MTHFR as a novel candidate marker for litter size in rabbits. *Animals*, 14(13), 1930.

Yıldırım, F., Özdemir, S., & Yıldız, A. (2018). Koçuş Tarım İşletmesinde yetiştirilen Siyah Alaca (Holştayn) sığırlarda bazı süt verimi özellikleri ve ilişkili genlerin ekspresyonu. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 21(1), 1–7.

Yıldız, A., Uçar, M., & Demirci, E. (2015). Sığırlarda rumen asidozuna neden olan risk faktörleri. *Hayvansal Üretim*, 56(3), 112–119.

Yılmaz, O., & Acar, Z. (2016). Holştayn sığırlarında kısmi süt verimlerinin 305 günlük süt verimi tahminindeki rolü. *Animal Production Research*, 45(1), 45–52.

Yılmaz, O., Aydın, F., & Gürler, Z. (2019). Doğum sonrası erken dönemde süt ineklerinde metabolik profil testi ile bazı kan parametrelerinin değerlendirilmesi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 12(3), 228–234.

- Zebeli, Q., & Metzler-Zebeli, B. U. (2012). Assessment of rumen liquid and reticuloruminal solid digesta pH in dairy cows using indwelling pH measurement systems. *Journal of Dairy Science*, *95*(11), 6608–6623.
- Zeisel, S. H., & da Costa, K.-A. (2009). Choline: An essential nutrient for public health. *Nutrition Reviews*, *67*(11), 615–623. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x>.
- Zhang, G., & Ametaj, B. N. (2020). Ketosis an old story under a new approach. *Dairy*, *1*(1), 5.
- Zhou, Z., Garrow, T. A., Dong, X., Luchini, D. N., & Loor, J. J. (2017). Hepatic activity and transcription of betaine-homocysteine methyltransferase, methionine synthase, and cystathionine synthase in periparturient dairy cows are altered to different extents by supply of methionine and choline. *The Journal of Nutrition*, *147*(1), 11–19.
- Zhou, Z., Vailati-Riboni, M., Trevisi, E., Drackley, J. K., Luchini, D., & Loor, J. J. (2016). Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*, *99*(11), 8716–8732. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11211>.
- Zhou, Z., Vailati-Riboni, M., Trevisi, E., Drackley, J. K., & Loor, J. J. (2017). Targeted lipid and amino acid metabolomics in liver uncovers altered hepatic metabolism in peripartal dairy cows supplemented with rumen-protected choline. *Journal of Dairy Science*, *100*(11), 9068–9082. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12838>.
- Zhou, Y. F., Zhou, Z., Batistel, F., Martinez-Cortés, I., Pate, R. T., Luchini, D. L., & Loor, J. J. (2018). Methionine and choline supply alter transmethylation, transsulfuration, and cytidine 5'-diphosphocholine pathways to different extents in isolated primary liver cells from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *101*(12), 11384–11395.
- Zom, R. L. G., Van Baal, J., Goselink, R. M. A., Bakker, J. A., De Veth, M. J., & Van Vuuren, A. M. (2011). Effect of rumen-protected choline on liver and adipose gene expression during the transition period in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *94*(8), 4023–4032.
- Zou, C. G., Banerjee, R., & Zheng, Y. (2003). Homocysteine promotes atherosclerosis via inhibiting anti-inflammatory gene expression in macrophages. *FASEB Journal*, *17*(3), 278–280. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0367fje>.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nazlıcan DERE
Eğitim	
Lise	Yalova-Çiftlikköy Atatürk Anadolu Lisesi (2008-2012)
Lisans	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2012-2018)
Doktora	Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı (2019-2025)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	Yök-Dil: 65
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Kuruluş Adı	Balıkesir Veteriner Hekimler Odası

## EKLER

### EK 1. Etik Kurul İzin Belgesi 1

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

**Toplantı Yeri:** Deney Hayvanları Üretim Bakım Uygulama ve Araştırma Merkezi Toplantı Salonu  
**Toplantı Tarihi:** 28 Nisan 2022  
**Toplantı Saati:** 13:00  
**Toplantı Sayısı:** 2022/3

Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 24 Şubat 2022 tarihinde Başkan Doç. Dr. Elif AKSÖZ Başkanlığında toplandı.

#### **KARAR :3**

Dr. Öğr. Üyesi Murad GÜRSES'in "*Sığırlarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni Polimorfizmleri ve Geçiş Dönemi Kolin ve Metiyonin İlavesinin Bazı Metabolik Parametreler ile Süt Verim Özellikleri Üzerine Etkisi*" isimli projesinin görüşülmesine geçildi.

Görüşme Sonunda; proje dosyasının etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ÜYELERİ  
(İMZA)

**ASLI GİBİDİR**

**Doç. Dr. Elif AKSÖZ**  
**BAŞKAN**



**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**  
**Çağış Yerleşkesi, (Bigadiç yolu üzeri 17. km) 10145, BALIKESİR-TÜRKİYE**  
**ARAŞTIRMA BAŞVURUSU DEĞERLENDİRME FORMU**

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN ADI	"Sığırlarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni Polimorfizmleri ve Geçiş Dönemi Kolin ve Metiyonin İlavasının Bazı Metabolik Parametreler ile Süt Verim Özellikleri Üzerine Etkisi"	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Dr. Öğr. Üyesi Murad GÜRSES BAÜN Veteriner Fakültesi Veteriner Anatomi AD.	
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Nazlıcan DERE (Doktora Öğrencisi) BAUN Sağlık Bilimleri Enstitüsü	
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Doktora	
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	25/09/2022 – 25/09/2025	
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	SİĞİR – 120 ADET	
<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	<b>Belge Adı</b>	<b>Tarihi</b>	
	HADYEK BAŞVURU FORMU	12/04/2022	
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Karar No : 2022/3-3</b>	<b>Tarih :28/04/2022</b>	
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar değişik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 4) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.		

**ETİK KURUL BİLGİLERİ**

**ÜYELER**

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza
Doç. Dr. Elif AKSÖZ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ali BAYRAKDAR Başkan Vekili	Veteriner Histoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ziya İLHAN Üye	Veteriner Mikrobiyoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Gülten ERKEN Üye	Tıbbi Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Hatice YILDIRIM Üye	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Muhamrem EROL Üye	Veteriner Cerrahi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Dr. Öğr. Üyesi Fatih UĞUN Üye	Tıp - Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Dr. Öğr. Üyesi Özgür BULMUŞ Üye	Tıbbi Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Hacer ERDEN Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ev Hanımı	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Serap URAS Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ev Hanımı	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Vel. Hek. Mustafa H. YARANOĞLU Üye	Veteriner Hekim	BAUNDEHAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	

(\*) Başvurulan Projelerde Proje Sahibi veya Yardımcı Araştırmacıların İktisadi Yeterlik Kurul Üyesi veya 1. Derece Akademiik olması halinde ilgili üye proje kurul görüşmesine katılamaz.

EK 2. Etik Kurul İzin Belgesi 2



T.C.  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**  
Çağış Yerleşkesi, (Bigadiç yolu üzeri 17. km) 10145, BALIKESİR-TÜRKİYE  
**ARAŞTIRMA BAŞVURUSU DEĞERLENDİRME FORMU**

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN ADI	<i>"Sığırlarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni Polimorfizmleri ve Geçiş Dönemi Kolin ve Metiyonin İlavesinin Bazı Metabolik Parametreler ile Süt Verim Özellikleri Üzerine Etkisi"</i>	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Doç. Dr. Murad GÜRSES BAÜN Veteriner Fakültesi Genetik AD.	
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Doktora Öğrencisi Nazlıcan DERE	BAUN Sağlık Bilm.Enst.
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Doktora	
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	25.09.2022 – 25.09.2025	
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	SIĞIR – 500 Adet	
<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	<b>Belge Adı</b>	<b>Tarhi</b>	
	HADYEK BAŞVURU FORMU	24/02/2025	
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Karar No: 2025/2-11</b>	<b>Tarih: 27/02/2025</b>	
	<p>Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi.</p> <p>Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği ile karar verildi.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması,</li> <li>2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar da değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması,</li> <li>3) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması,</li> <li>4) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.</li> </ol>		

**ETİK KURUL BİLGİLERİ**

**ÜYELER**

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza
Prof. Dr. Mehmet Faruk AYDIN Başkan	Histoloji ve Embriyoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Recai KULAKSIZ Başkan Vekili	Dölerme ve Suni Tohumlama	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Cengiz CEYLAN Üye	Veterinerlik Cerrahisi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	

Prof. Dr. Ziya İLHAN Üye	Veterinerlik Mikrobiyolojisi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Prof. Dr. Dilek TÜRKER Üye	Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Prof. Dr. Hatice YILDIRIM Üye	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Doç. Dr. Pelin PALAS KARACA Üye	Ebelik	Sağlık Bilimleri Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Doç. Dr. Muharrem EROL Üye	Veterinerlik Cerrahisi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Doç. Dr. İhsan KISADERE Üye	Veterinerlik Fizyolojisi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Doç. Dr. Nevzat SAAT Üye	Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Doç. Dr. Yasin BAYKALIR Üye	Biyoistatistik	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Dr. Öğr. Üyesi Fatih UGÜN Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Dr. Öğr. Üyesi Oguzhan KORKUT Üye	Tıbbi Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Dr. Mustafa H. YARANOĞLU Üye	Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi	BAUNDEHAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Vet. Hek. Hüdayi TANRIKULU Üye	Veteriner Hekim	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H
Zir. Müh. Mustafa YILDIRIM Üye	Ziraat Mühendisi	Sivil Üye	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H

(\* Başvurulan Projelerde Proje Sahibi veya Yardımcı Araştırmacılardan birinin Yerel Etik Kurul Üyesi veya 1. Derece Akrabası olması halinde ilgili üye proje kurul görüşmesine katılamaz.

## EK 3. BAP Proje Kabul Sözleşmesi



**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ BİRİMİ**  
**SÖZLEŞMESİ**

**PROJE NO: 2024/059**

**MADDE 1:** Balıkesir Üniversitesi tarafından desteklenmesine karar verilen **2024/059** no' lu, "Sığırlarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni Polimorfizmi ve Geçiş Dönemi Kolin ve Metiyonin İlavesinin Bazı Metabolik Parametreler ile Süt Verim Özellikleri Üzerine Etkisi" isimli projenin, Bilimsel Araştırma Projeler Yönergesiyle belirlenen esaslar dahilinde yürütülmesi ve sonuçlandırılması amacıyla Balıkesir Üniversitesi Rektör Yardımcısı **Prof. Dr. Cevdet AVCIKURT** ile proje yürütücüsü **Doç. Dr. Murad GÜRSES** arasında aşağıda belirlenen koşullarla işbu sözleşme imzalanmıştır.

**MADDE 2:** Proje yürütücüsü, projenin Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi ve bu sözleşme hükümlerinde öngörülen amaç, kapsam, süre ve diğer hususlara uygun olarak yürütülmesi ve sonuçlandırılmasından sorumludur.

**MADDE 3:** Desteklenmesi kabul edilen projenin amaç, kapsam, süre, program, yardımcı araştırmacılar ve bütçesinde yapılacak değişiklikler, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun kararıyla mümkündür.

**MADDE 4:** Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında alınan demirbaşlar bölüm ayniyat mutemetlerine zimmetlenir. Adı geçen demirbaş ürününün proje bitim tarihinden itibaren 1 (bir) ay içerisinde iade edilmesinden proje yürütücüsü sorumlu olup, iade işleminin belirlenen süre içerisinde yapılmamasının sonucunda proje yürütücüsü ürün bedelini karşılayacağını kabul eder.

**MADDE 5:** Proje yürütücüsü, aşağıdaki tarihlerde ara ve sonuç raporlarını istenilmeden teslim etmek zorundadır :

- 1.Ara Rapor** - 06-05-2024 - 05-11-2024
- 2.Ara Rapor** - 06-11-2024 - 05-05-2025
- 3.Ara Rapor** - 06-05-2025 - 05-11-2025
- 4.Ara Rapor** - 06-11-2025 - 05-05-2026
- 5.Ara Rapor** - 06-05-2026 - 05-11-2026
- Sonuç Raporu** - 06-11-2026 - 05-05-2027

Ayrıca istenildiğinde proje ile ilgili ayrıntılı bilgileri ve kayıtları Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna vermekle yükümlüdür. Ara Raporlarının, kabul edilebilir mazeret bildirmeksizin bu sözleşme ile belirlenen tarihlerde teslim edilmemesi halinde proje yürütücüsüne ödeme yapılmaz bu durumda Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu projeyi iptal edebileceği gibi proje yürütücüsünün değiştirilmesine de karar verebilir.

Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen projeler Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun ve / veya bu komisyonun belirleyeceği proje izleyicileri tarafından yerinde incelenebilir; proje yürütücüsü izleyicilere istenilen her türlü belgeyi vermekle yükümlüdür.

**MADDE 6:** Proje yürütücüsü, sonuçlanan projenin tüm yönlerini ve sonuçlarını kapsayan Kesin raporunu sözleşme tarihinin sona ermesinden itibaren dört ay içinde Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce hazırlanmış olan "**Kesin Raporu**" formatına uygun olarak Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine vermekle yükümlüdür.**Kesin Raporun kabul edilen sürede sunulmaması veya kabul edilebilir bir mazeret bildirilmemesi halinde proje iptal edilir.**

Bilimsel Araştırmalar Biriminde sunulmuş olarak sunulan "**Kesin Raporu**" Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından incelendikten sonra kabul edilebilir veya gerekli düzeltmelerin yapılması istenebilir. Yapılan değişikliklerden sonra **Kesin Raporu** yeniden değerlendirilir. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından Kesin Raporda yapılması istenilen değişiklikler için tanınan süre azami proje süresinin kullanılmış olması halinde 2 ayı geçemez.

**MADDE 7:** Proje yürütücüsünün gerçekçi gerekçeler sunması koşuluyla, projeye en fazla toplam bütçesinin %50'si kadar ek ödenek ve / veya 1 yıla kadar ek süre verilmesi konusu Komisyon tarafından değerlendirilebilir.

**MADDE 8:** Proje yürütücüsü, tamamlanan proje ile ilgili veri, kayıt ve dokümanları en az 10 yıl saklamak zorundadır.

**MADDE 9:** Proje yürütücüsü, proje ile ilgili verileri ve bulguları, yayınladığı her türlü yazı, makale ve sunduğu bildirielerde "Balıkesir Üniversitesi tarafından desteklenmiştir." ibaresini belirtmek zorundadır.

**MADDE 10:** Proje ile ilgili çalışmaların sürdürülmesinde, işyeri ve proje personeli yönünden çalışmanın gerektirdiği her türlü güvenlik önlemlerinin alınmasından proje yürütücüsü sorumludur.

**MADDE 11:** Bilimsel Araştırma Birimi Komisyonunca desteklenmek suretiyle ele alınan bu projenin sonucunda 17.7.1963 tarih ve 278 sayılı Kanunun 2/a maddesine göre bir ihtira meydana gelirse bu ihtira aynı kanunun 21. maddesi uyarınca Bilimsel Araştırma Birimi Komisyonuna ait olacaktır. Ancak Bilimsel Araştırma Birimi Komisyonunun

bu ihtiradan dolayı usulüne uygun olarak istihsal edeceği patenti satma yahut kiralama yolu ile elde edeceği bedel veya kiranın %30'u ihtirayı yapan veya yapanlara verilecektir.

**MADDE 12:** Projeden elde edilen bilimsel sonuçların telif hakkı Balıkesir Üniversitesine aittir.

**MADDE 13: Proje kapsamında alınan araç-gereç vb. Üniversitemiz Öğretim Elemanlarının kullanımına açıktır.**

**MADDE 14:** Bu sözleşme ile öngörülen toplam maddi destek miktarı ve ödeme planı bilimsel araştırma projeleri ödeneklerinin nakit akışında meydana gelebilecek kısıntıların neden olacağı aksamalar mücbir sebep olarak kabul edilir ve bu nedenle taraflar sorumlu tutulamazlar.

**MADDE 15:** Lisansüstü Öğrenim Araştırma projelerinden tez basımı dışında, bir (1) yıl içinde yayın yapılmadığı takdirde, tez yürütücüsü tezi yapanında adının geçmesi koşuluyla tezden yayın hazırlamak hakkına da sahiptir.

**MADDE 16-** Projeler kapsamında alınan makine ve teçhizat için ayrıca oda, derslik, laboratuvar vb. gibi yerler talep edilmeyecektir.

**MADDE 17-** Projeyi desteklemek amacıyla Balıkesir Üniversitesi tarafından 2024 yılı için; **TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI** : 48.360,00 TL, **HİZMET ALIMLARI** : 30.720,00 TL, **MENKUL MAL,GAYRİMADDİ HAK ALIM,BAKIM VE ONARIM GİDERLERİ** : 70.890,00 TL, olmak üzere toplamda **149.970,00 TL** ödenek sağlanacaktır.

**MADDE 18-** 23-07-2025 tarihinde taraflarca imzalanan bu sözleşmenin yürürlük süresi 36 aydır. Proje yürütücüsüne ek süre verilmesi halinde bu sözleşme ek sürede de geçerli olup, ayrı bir sözleşme imzalanmaz.

**MADDE 19-** Proje kapsamındaki, yazışmalar, ara rapor, sonuç raporu, harcama işlemleri ve takibinde tüm sorumluluk proje yürütücüsüne ait olup, bu işlemlerden doğabilecek hata ve zararlar proje yürütücüsü tarafından karşılanır.

**MADDE 20-** Sözleşme giderleri Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından ödenir.

**MADDE 21-** Anlaşmazlık halinde yetkili merci Balıkesir Mahkeme ve İcra Daireleridir.

**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
adına

**Prof. Dr. Cevdet AVCIKURT**  
Rektör Yardımcısı

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ**

**Doç. Dr. Murad GÜRSES**  
Öğretim Üyesi



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...



Balıkesir Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanlık Binası  
Çağış Yerleşkesi/BALIKESİR



(0 266) 612 14 62  
sagbilen@balikesir.edu.tr  
<http://www.balikesir.edu.tr>

