



















**YAYIN HAKKI DEVRİ SÖZLEŞMESİ**  
**Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi**

Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisinde yayınlanmak üzere göndermiş olduğumuz "....." adlı makale/derleme ile ilgili olarak;

Aşağıdaki maddeleri onayladığımızı belirtiriz.

- 1- Bu makalenin/derlemenin bir kısmı ya da tamamı başka bir dergide yayınlanmamıştır.
- 2- Bu makale/derleme yayınlanmak üzere başka bir dergiye gönderilmemiştir.
- 3- Makale/derleme yayımlandıktan sonra tüm hakları Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisine devredilmiştir.
- 4- Tüm yazarlar makaleyi okumuş ve onaylamıştır. Yayınlanmak üzere dergiye gönderildiğinden haberdardır.

Yazarlar	İmza	Tarih
.....		
.....		
.....		
.....		



## Eskişehir yöresi Türk Arap atlarında lavanta renkli tay sendromunun araştırılması

Muhammet Kaya<sup>1</sup> , Tuğba Yıldız<sup>2</sup> , Elif Günvar<sup>3</sup> , Metin Taş<sup>4</sup> 

<sup>1,2,3,4</sup> Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Eskişehir

**Geliş Tarihi** / Received: 23.04.2019, **Kabul tarihi** / Accepted: 18.02.2020

**Özet:** Lavanta Renkli Tay Sendromu (Lavender Foal Syndrome-LFS) otozomal resesif kalıtım modeli gösteren bir genetik kusur olup, Arap atlarında nörolojik anormalliklere ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yürütölen araştırmada, Eskişehir yöresindeki dokuz özel işletmeden alınan toplam 115 baş Arap atı materyalinde LFS mutant allelin varlığı araştırılmıştır. Genomik DNA kandan elde edilmiş ve LFS'den sorumlu mutasyonu içeren MYO5A gen bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri *FauI* restriksiyon enzimi ile muamele edildikten sonra agaroz jel elektroforezde analiz edilmiştir. Heterozigot genotipte olanlar dizi analizi yöntemiyle teyit edilmiştir. Araştırmada, incelenen 115 baş Türk Arap atının LFS genetik kusuru bakımından mutant allele sahip olmadığı tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Genetik kusurlar, LFS, PCR-RFLP, Türk Arap Atı

### Investigation of lavender foal syndrome in Turkish Arabian horses in Eskisehir region

**Abstract:** Lavender Foal Syndrome (LFS) is autosomal recessive hereditary disorder causing serious economic losses in Arabian horse breeding throughout the world. In this study, the presence of LFS genotypes was investigated in 115 Turkish Arabian horse reared at nine different private farms in Eskisehir. Genomic DNA was obtained from blood and the MYO5A gene fragment which includes the mutation responsible for LFS were obtained by using Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis after treatment with *FauI* restriction enzyme. Heterozygous genotypes were confirmed by sequence analysis. In the study, it was detected that 115 head Turkish Arabian horses examined did not have mutant alleles with respect to LFS genetic defect.

**Key words:** Genetic disorder, LFS, PCR-RFLP, Turkish Arabian horse

### Giriş

Hayvan popölasyonların da görölen kalıtsal kusurlar araştırmacılar ve yetiştiriciler için önemli konulardan birisidir. Hayvan yetiştiriciliğinde suni tohumlamanın yaygınlaşması ile birlikte bazı kalıtsal kusurların popölasyonlardaki frekansları artmıştır. Sığırlarda BLAD (Bovine leukocyte adhesion deficiency) taşıyıcısı olduğu sonradan belirlenen Osbornedale Ivanhoe, Penstate Ivanhoe Star ve Carlin-M Ivanhoe Bell gibi damızlık boğaların suni tohumlamada kullanılmasıyla BLAD'ın Holstein sığır ırkı ve melezlerinde yayılmasında etkili olduğu bildirilmektedir [17]. Bu nedenle, hayvan yetiştiriciliğinde kalıtsal kusurların moleküler temellerinin belirlenmesi çok önemlidir. Atlarda 232 genetik bozukluk ile özellik tanımlanmış ve bunlardan 44'üne neden olan mutasyonlar tespit edilerek kalıtım modelleri belirlenmiştir [18]. Bu kalıtsal kusurlardan bazıları sadece belli ırk ve melezlerinde gözükmektedir. Kalıtsal kusurlara sebep olan mutasyonların moleküler tanı yöntemleri üzerinde çalışmalar yürütölmektedir.

Lavanta Renkli Tay Sendromu (LFS) Arap atları ve melezlerinde görölen kalıtsal bir hastalıktır [4]. LFS, Arap atlarında görölen açık deri rengi ile ilişkili nörolojik bir durumdur. Taylar açık deri rengi ile doğmaktadır ve deri rengi gümüş, kalay, lavanta ya da pembe görünebilir. Hastalıklı taylarda doğumdan sonra görölen nörolojik anomaliliklerde çeşitlilik, kesikli ya da sürekli opisthotonus da dahil olmak üzere, bacaklarda aralıklı kürek çekme hareketi, bacaklarda ekstansör kas sertliği, gözlerde şaşılık görölmektedir. Taylar yanal yatar pozisyondan kendilerini düzeltemezler. Klinik bulguların şiddeti ve kalıcılığı göz önüne alındığında bu durumun tedavisi olmadığından dolayı taylar doğumdan kısa bir süre sonra ötenazi edilmektedir [19, 10]. LFS, ilk olarak Mısır Arap atlarında teşhis edilmiştir [4]. LFS'li taylarda *Miyosin 5A* (MYO5A) geninin 30.-ekzonun 148. nükleotidi olan sitozin (C) bazı delesyonunun hastalığa sebep olduğu belirlenmiştir. LFS otozomal resesif kalıtım modeline sahiptir. MYO5A geni vesiköl trafiğinden sorumlu olan miyosin-5a protein üreti-

**Yazışma adresi / Correspondence:** Muhammet Kaya, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Eskişehir E-posta: muhammetkaya@ogu.edu.tr

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0001-6474-121X • <sup>2</sup>0000-0001-6845-5181 • <sup>3</sup>0000-0002-7227-2588 • <sup>4</sup>0000-0003-0862-9973

minden sorumludur [6]. Vesikül trafiği melanosit ve nöronlarda, dolayısıyla açık deri rengi ve nörolojik anormalliklerde önemlidir. *MYO5A* genindeki mutasyonların insanlarda Griscelli Sendromuna sebep olduğu rapor edilmiştir; bu hastalık hipopigmentasyon, nörolojik anormallikler ve immün eksikliği ile özdeşleşmiştir [6, 20].

Moleküler tanı teknikleri, kalıtsal hastalıktan sorumlu mutasyonun belirlenmesi esasına dayalı yöntemlerdir. LFS kalıtsal kusuruna sebep olan mutasyonun tespit edilmesinden sonra moleküler test geliştirilmiştir [6]. Yapılan genetik analizler sonucu mutant allelelere sahip atlar yetiştiricilik programından çıkartılarak bu genetik kusurların yeni nesillere taşınması engellenebilir. Mısır kökenli Arap atlarında bulunduğu tespit edilen LFS kalıtsal kusuruna Mısır [1], Güney Afrika [21], ABD [6] ve Hırvatistan'da [8] yetiştirilen Arap atlarında farklı frekanslarda heterozigot genotipli atlar belirlenmiş ancak Ortadoğu [12] ve Türkiye'de [5] yürütülen çalışmalarda mutant allele taşıyan atlara rastlanılmamıştır.

Türkiye'de yetiştirilen sığırlarda genetik hastalıkların belirlenmesine yönelik çalışmalar fazlaca bulunurken atlarda rastlanan kalıtsal hastalıkları araştırmanın sadece bir araştırma vardır ve bu çalışmada kamu işletmelerinde yetiştirilen Arap atlarında LFS mutant allelin varlığına rastlanılmamıştır [5]. Yapılan çalışmada, Eskişehir İli Mahmutiye ilçesinde bulunan çeşitli özel işletmelerde yetiştirilen Arap atlarında LFS geni mutant alleli varlığının PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Hayvan materyali

Hayvanlar üzerinde yapılan tüm işlemler ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.08.2015 tarih ve 466-1 sayılı kararı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Araştırmada, Eskişehir İli Mahmutiye ilçesinde bulunan dokuz farklı özel işletmelerde yetiştirilen toplam 115 Arap atına ait kan örnekleri materyal olarak kullanılmıştır.

### Yöntem

Çalışmada kullanılan kan örnekleri 10 ml'lik EDTA'lı tüplere, steril ve tek kullanımlık enjektörler ile Arap atlarının vena jugularislerinden alınmış ve laboratuvara soğuk zincir içinde taşınmıştır. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yürütülen bu çalışmada toplam

gDNA, Meydan [16] tarafından bildirilen DNA izolasyon protokolü kullanılarak izole edilmiştir.

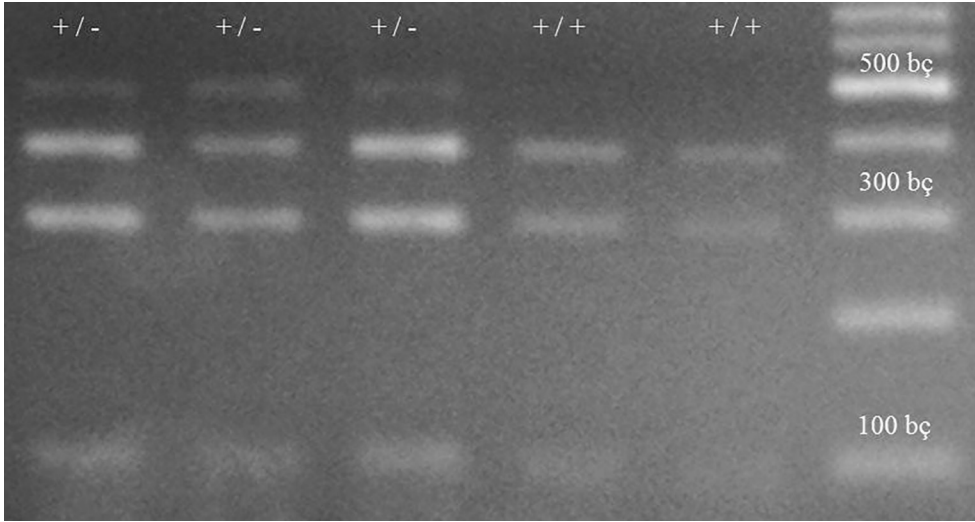
Araştırmada, LFS genetik kusuruna neden olan mutasyonun meydana geldiği gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla Brooks ve ark. [6]'un geliştirdiği PCR-RFLP yöntemi için dizayn ettiği primerler (F: 5' CAG GGC CTT TGA GAA CTT TG 3' ve R: 5' CAG CCA TGA AAG ATG GGT TT 3') kullanılmıştır. 25 ul PCR reaksiyonu 50-100 ng gDNA, 10 X Taq polimeraz tamponu, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM dNTP karışımı, 0.5 U Taq DNA polimeraz (Promega, Madison, Wisconsin, USA) ve 5 pmol her bir primeri içermektedir. PCR reaksiyonu 94°C'de 3 dak, 33 döngü (94°C-30 sn, 60°C-30 sn, 72°C-30 sn) ve son uzama olarak 72 °C- 5 dak yapılarak tamamlanmıştır. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde kontrolünden sonra *Fau I* (New England Biolabs, MA, ABD) kesim enzimi ile 55°C'de 1 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyon sonrası kesim ürünlerinin kontrolü yapılırken %2'lik agaroz jeli kullanılmıştır. PCR-RFLP analizi sonucu heterozigot olarak belirlenen tüm örnekler ile normal olan (n=5; rasgele seçilen) örnekler aynı primerler kullanarak DNA dizi analizi yapılmıştır. PCR ürünlerinin temizliği ve DNA dizileme uygulamaları hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Bu işlemler yürütülürken PCR ürünü temizleme PCR clean-up (Macherey-Nagel, Almanya) adlı kit ve DNA dizi analiz BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit adlı ticari kitle ABI 310 Genetik Analiz Cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) uygulanmıştır. DNA sekansları MEGA X programı [13] ile analiz edilmiştir.

## Bulgular

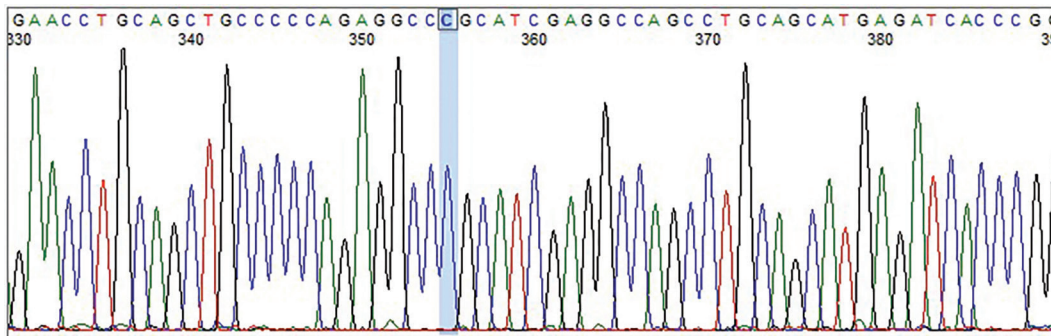
Eskişehir yöresi Arap atı popülasyonlarında LFS hastalığına sebep olan *MYO5A* genindeki mutant allelin varlığını araştırmak için PCR-RFLP ve dizi analizi yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla Eskişehir Mahmutiye yöresinde bulunan özel işletmelerinde yetiştirilen 115 kısra ve aygırdan alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Brooks ve ark. [6] tarafından geliştirilen yöntem uygun olarak elde edilen 765 bç büyüklüğündeki PCR ürünleri *Fau I* kesim enzimi ile muamele edilmiştir. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile muamele edildikten sonra meydana gelen genotiplerin %2'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir. PCR ürünlerinin *Fau I* kesim enzimi ile muamelesi sonucunda; LFS mutant alleli taşımayan normal genotipteki (+/+) atlar 386 bç, 289 bç ve 90 bç'lik bant modeline, LFS mutant alleli bakımından homozigot genotipe (-/-) sahip olan hasta atlar 476 bç ve 289 bç'lik bant modeline sahipken LFS mutant

aleli bakımından heterozigot genotipe (+/-) sahip olan taşıyıcı atlar ise 476 bç, 386 bç, 289 ve 90 bç'lik bant modeline sahiptirler [6]. Bant modellerinde tespit edilen bu farklılıklara dayanarak normal ve LFS taşıyıcı atların genotipleri belirlenmiştir. PCR-RFLP analizinde kullanılan *FauI* kesim enzimi star aktivite gösterme ihtimalinin yüksek olmasından dolayı [5] analiz sonuçlarının doğruluğu dizi analizi yöntemi ile

teyit edilmiştir (Şekil 2). Yürütülen PCR-RFLP analizi sonucunda 115 Arap atı arasında 38 Arap atının LFS kalıtsal kusuru bakımından heterozigot genotip olduğu görülmüştür. PCR-RFLP sonucunda belirlenen heterozigot genotipler ile rastgele seçilen normal genotipli örnekler dizi analizi yapılmış hiçbir örneğin mutant alleli taşımadığı belirlenmiştir.



**Şekil 1.** LFS PCR ürünlerinin *FauI* enzimi ile kesimi sonucunun % 2'lik agaroz jelindeki görünümü (M, 100 bç Fermentas® GeneRuler DNA marker).



**Şekil 2.** LFS kusuruna neden olan delesyonun (C işaretli) yer aldığı DNA dizi sekansı.

## Tartışma ve Sonuç

Eskişehir yöresi özel işletmelerinde yetiştirilen Arap atlarında LFS kalıtsal kusuruna neden olan *MYO5A* geni mutant alleli PCR-RFLP ve dizi analizi yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Türk Arap atı yetiştiriciliği için önemli bir yer olan Eskişehir ilinde bazı özel at işletmelerinde yetiştirilen Arap atlarının LFS kalıtsal kusuru bakımından ari popülasyonlar olduğu ortaya konmuştur. Türkiye'de 2019 yılı verilerine göre 136.209 at yetiştirildiği ancak bunların ne kadarının Arap atı ırkına ait olduğu bilinmemektedir [25]. Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre Bursa ilinde 1.967

[7], Malatya ilinde 1.279 [15] baş at bulunurken, Eskişehir ilinde 1.698 [9] baş Arap atı bulunmaktadır. Türkiye Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM)'e ait işletmelerde (Mahmudiye'de 281, Karacabey'de 389 ve Sultansuyu'nda 279 olmak üzere) toplam 949 baş damızlık Arap atı yetiştirilmektedir [23]. 2013 yılında yapılan at yarışları incelendiğinde TİGEM'lerde yetişmiş at oranı %29 iken, daha önceki yıllara göre karşılaştırıldığında bu oranın azaldığı bildirilmektedir. Bu durum özel işletmelerde yetiştirilen at sayısının artarak sürdürüldüğünü göstermektedir [23]. TİGEM'e bağlı çeşitli kamu işletmelerde yetiştirilen

239 Arap atı ile yapılan çalışmada PCR-RFLP analizinde heterozigot bulunan bireylerin dizi analizi sonucunda normal genotipte oldukları belirlenerek benzer sonuç alınmıştır [5]. Yürütülen araştırma ile Eskişehir yöresindeki özel işletmelerde, Bilgen ve arkadaşlarının [5] yaptığı çalışmada ise Türkiye kamu kurumlarında (Eskişehir, Bursa ve Malatya) yetiştirilen Arap atlarını incelenmiş ve araştırılan Türk Arap atlarında LFS mutant allelinin olmadığı tespit edilmiştir.

Türkiye’de yetiştirilen atların genetik hastalıklarının taranması ve kontrolü hakkındaki veriler yetersizdir. Türk Arap atların kalıtsal hastalıklarını araştıran bu çalışma dışında sadece bir araştırma [5] bulunmaktadır. Amerika, Avustralya, İngiltere vb. gelişmiş ülkelerde oldukça kısa sürede güvenilir sonuçlar veren rutin DNA testleri profesyonel at yetiştiriciliğinde kalıtsal hastalıkların tanımlanması için kullanılmaktadır [14, 2, 22]. Yapılan genetik analizler sonucu kalıtsal hastalıklara sahip atlar yetiştiricilik programından çıkarılmaktadır. Böylelikle, bu genetik kusurların yeni nesillere aktarılması engellenmektedir.

Türkiye’de yapılan iki araştırma sonucu diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında Türk Arap atlarında LFS kalıtsal kusuruna henüz rastlanılmamıştır. Diğer ülkelerde yapılan farklı çalışmalarda [6, 21, 8, 11, 3] heterozigot bireyler tespit edilmiştir. Brooks ve ark. [6] yaptıkları çalışmada altı LFS hastası taylarda *Miyosin 5A (MYO5A)* genin 30. ekzonu 148. nükleotidinde sitozin (C) bazının delesyonun taylarda LFS hastalığına sebep olduğunu belirlemiş ve bu delesyonu tespit edecek PCR-RFLP testini geliştirmiştir. 114 baş Arap atının incelendiği çalışmada 58 baş Mısır Arap atından altısının (%10.3) ve 56 baş Mısır kökenli olmayan Arap atı arasından da bir atın heterozigot genotipte olduğu (%1.8) tespit edilmiştir [6]. Avrupa’da yapılan ve birbiri ile akraba olmayan 215 Arap atının yanında 78 Thoroughbred ve 30 Standardbred ırkı atın da kullanıldığı başka bir çalışmada PCR-RFLP tekniği kullanılarak yedi Arap atının MYO5A delesyonu için heterozigot ve LFS taşıyıcısı olduğu (0.016) belirlenmiştir. Diğer ırklarda LFS mutant alleleline rastlanılmamıştır [11]. Güney Afrika’da yapılan bir çalışmada Arap atları için 2004 sezonunda LFS taşıyıcı atların prevalansı %13.3 iken 2009 yılı sezonunda %11.7 tespit edilmiştir [21]. Yapılan ticari test sonuçlarında Mısır Arap atı popülasyonunda %10 civarında heterozigot at olduğu bildirilmektedir [3]. Hırvatistan’da toplam 618 Arap atı bulunduğu bildirildiği ve 3 farklı Arap atı popülasyonunda 100 örnekle yapılan başka bir çalışmada sadece bir

popülasyonda 5 heterozigot at (%5) tespit edilmiştir [8].

LFS kalıtsal kusuru moleküler yapısının belirlenmesinden sonra yapılan çalışmalarda LFS mutant alleli Mısır [1], Güney Afrika [21], ABD [6, 24] ve Hırvatistan’da [8] yetiştirilen Arap atlarında görülmüş ancak Türkiye [5] ve Ortadoğu’da [12] yetiştirilen Arap atlarında tespit edilmemiştir. LFS gibi kalıtsal kusurların popülasyonlarda olmadığını gösteren çalışmalar Türk Arap atlarının değerini artıracaktır. Bu durumun korunması ve sürdürülmesi için Türkiye’ye ithal edilecek aygır spermalarının genetik hastalıklardan arı olması ilgili talimatlarda belirtilmektedir [24].

Sonuç olarak, LFS kalıtsal kusurunun Türkiye’de yetiştirilen Arap atlarında bulunmadığı, yetiştirilen tüm damızlık Arap atlarında ve ithal edilen spermaların genetik hastalıklar bakımından taranmasında yarar vardır. Kalıtsal kusurların belirlenmesinde DNA tabanlı moleküler tanı yöntemlerinden yararlanma oranı arttıkça genetik kusurlardan arı popülasyonların korunmasındaki başarı da o oranda artacaktır.

**Teşekkür:** Bu çalışmanın bir kısmı TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurtiçi Arş. Destekleme Programı (Proje No: 1919B011502601 - TY) tarafından desteklenmiştir.

## Kaynakça

- Alkalamawy NM, Amin DM, Alkalamawy IM, Abd Elaty IA (2018): Lavender foal syndrome in Egyptian Arabian horses: molecular and pathological studies. SVU-International Journal of Veterinary Sciences, 1 (1): 55-65.
- Animal Genetics (2019): Erişim: [http://www.animalgenetics.us/equine/genetic\\_disease/Index.asp](http://www.animalgenetics.us/equine/genetic_disease/Index.asp). (Erişim tarihi: 18.02.2019)
- Animal Genetics (2019): Erişim: [http://www.animalgenetics.us/equine/genetic\\_disease/LFS.asp](http://www.animalgenetics.us/equine/genetic_disease/LFS.asp). (Erişim tarihi: 18.02.2019)
- Bierman A, Guthrie AJ, Harper CK (2010): Lavender foal syndrome in Arabian horses is caused by a single-base deletion in the MYO5A gene. Animal Genetics, 41: 199-201.
- Bilgen N, Çınar Kul B, Ertuğrul O, Erzurum F (2017): Türkiye Arap Atı Popülasyonunda LFS ve PSSM-I Hastalıklarının Moleküler Taraması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 23 (2): 339-342.
- Brooks SA, Gabreski N, Miller D, Brisbin A, Brown HE (2010): Whole-genome SNP association in the horse: identification of a deletion in myosin Va responsible for Lavender Foal Syndrome. PLOS Genetics, 6 (4): e1000909.
- Bursa İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü Faaliyet Raporu (2013): Erişim: [https://www.tarimorman.gov.tr/SGB/Belgeler/Bakanlık\\_Faaliyet\\_Raporlari/2013%20YILI.pdf](https://www.tarimorman.gov.tr/SGB/Belgeler/Bakanlık_Faaliyet_Raporlari/2013%20YILI.pdf)
- Efendić M, Maćešić N, Samardžija M, Vojta A, Korabi N, Capak H, Sušnić MA, Žaja IŽ, Pećin M, Babić NP (2018): Determination of Sublethal Mutation Causing Lavender Foal Syndrome in Arabian Horses From Croatia. Journal of Equine Veterinary Science, 61: 72-75.

- 09 Eskişehir İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü Faaliyet Raporu (2015): Erişim: [https://eskisehir.tarimorman.gov.tr/Belgeler/2016\\_Faaliyet\\_Raporu/2016%20Yılı%20Faaliyet%20Raporu.pdf](https://eskisehir.tarimorman.gov.tr/Belgeler/2016_Faaliyet_Raporu/2016%20Yılı%20Faaliyet%20Raporu.pdf). (Erişim tarihi: 18.02.2019)
10. Fanelli HH (2005): Coat color dilution lethal (Lavender Foal Syndrome): A tetany syndrome of Arabian foals. Equine Veterinary Education, 17: 260-263.
11. Gabreski NA, Haase B, Armstrong CD, Distl O, Brooks SA (2012): Investigation of allele frequencies for Lavender foal syndrome in the horse. Animal Genetics, 43: 646-652.
12. Khanshour AM, Juras R, Stelly L, Cothran EG (2013): Molecular investigation and diagnosis of three genetic diseases in Arabian horses from Middle East and North American populations. Journal of Equine Veterinary Science, 33 (5): 364-365.
13. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35: 1547-1549.
14. Laboklin Laboratory (2019): Erişim: <http://www.laboklin.co.uk/laboklin/index.jsp>. (Erişim tarihi: 18.02.2019)
15. Malatya İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü Faaliyet Raporu (2019): Erişim: <https://malatya.tarimorman.gov.tr/Menu/14/Hayvan-Varligi>. (Erişim tarihi: 18.02.2019)
16. Meydan H (2007): Türkiye'de yetiştirilen siyah alaca sığır ırkında lökosit adhezyon yetersizliği (BLAD; Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency)'nin PCR-RFLP yöntemi kullanılarak belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
17. Nagahata H (2004): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD): A Review. The Journal of Veterinary Medical Science, 66 (12): 1475-1482.
18. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA) (2019): Erişim: <https://omia.org/home/>. (Erişim tarihi: 18.02.2019)
19. Page P, Parker R, Harper C, Guthrie A, Naser J (2006): Clinical, clinicopathologic, postmortem examination findings and familial history of 3 Arabians with lavender foal syndrome. Journal of Veterinary Internal Medicine, 20: 1491-1494.
20. Takagishi Y, Murata Y (2006): Myosin Va mutation in rats is an animal model for the human hereditary neurological disease, Griscelli syndrome type 1. Annals of the New York Academy of Sciences, 1086: 66-80.
21. Tarr CJ, Thompson PN, Guthrie AJ, Harper CK (2014): The carrier prevalence of severe combined immunodeficiency, lavender foal syndrome and cerebellar atrophy in Arabian horses in South Africa. Equine Veterinary Journal, 46: 512-514,
22. The UC Davis Veterinary Genetics Laboratory (2019): Erişim: <https://www.vgl.ucdavis.edu/services/horse.php>. (Erişim tarihi: 18.02.2019)
23. TIGEM Hayvancılık Sektor Raporu (2013): Erişim: <https://www.tigem.gov.tr/DosyaGaleriData/View/a374cc25-acc1-44e8-a546-63b4c8bce146>.
24. TOB Hayvancılık Genel Müdürlüğü (2019): Erişim: <https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Duyuru/124/%E2%80%8Bsafkan-Arap-Ati-Ve-Spor-Ati-Spermasi-Ithalat-Teknik-Kriterleri-Yayinlanmistir>. (Erişim tarihi: 18.02.2019)
25. Türkiye İstatistik Kurumu (2019): Hayvancılık İstatistikleri, Erişim: [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1002](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002). (Erişim tarihi: 18.02.2019)

## Etlik piliçlerde iki farklı barındırma sıklığının piliçlerin besi performansı, ölüm oranı ve ayak taban yangısı üzerine etkisi

Bülent Teke<sup>1</sup>, Mustafa Uğurlu<sup>2</sup>, Filiz Akdağ<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootehni Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 24.07.2019, Kabul tarihi / Accepted: 03.12.2019

**Özet:** Bu araştırma ticari koşullarda yetiştirilen etlik piliçlerde iki farklı barındırma sıklığının ortalama canlı ağırlığı, piliç başına ortalama yem tüketimi, yem dönüşüm oranı, ölüm oranı ve ayak taban yangısı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Ross 308 ırkı civcivler iki kümeşte 39 kg/m<sup>2</sup> ve 34 kg/m<sup>2</sup> barındırma sıklığında 3 yetiştirme dönemi boyunca incelenmiştir. Piliçlerin 41 günlük besi dönemi sonunda, 39 kg/m<sup>2</sup>deki piliç başına ortalama yem tüketimi (P<0.01), yem dönüşüm oranı (P<0.01) ve ölüm oranının (P<0.05) daha yüksek, ortalama canlı ağırlığın ise 34 kg/m<sup>2</sup>deki piliçlerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir (P<0.01). Ayak taban yangısı bakımından iki barındırma sıklığı grubu arasında önemli bir farklılık olmadığı (P>0.05) fakat barındırma sıklığı grupları içinde bu farkın önemli olduğu belirlenmiştir (P<0.001). Araştırma bulguları doğrultusunda, çevre denetiminin iyi olduğu ticari kümeslerde, 39 kg/m<sup>2</sup> barındırma sıklığında yetiştirilen piliçlerde 34 kg/m<sup>2</sup>'ye göre besi performansı ve ölüm oranının olumsuz etkilenmesine karşın kabul edilebilir düzeyde olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Ayak taban yangısı, barındırma sıklığı, besi performansı, etlik piliç, ölüm oranı

### The effect of two different stocking density in broiler chicken on fattening performance, mortality rate and foot pad dermatitis

**Abstract:** This study was carried out to determine the effect of two different stocking densities on average live weight, average feed consumption per chicken, feed conversion ratio, mortality rate and foot pad dermatitis of broiler chickens under commercial conditions. Ross 308 chickens were placed in two different densities as 39 kg/m<sup>2</sup> and 34 kg/m<sup>2</sup> into two poultry house and investigated throughout three fattening periods. Average feed consumption per chicken (P<0.01), feed conversion ratio (P<0.01) and mortality rate of 39 kg/m<sup>2</sup> density group (P<0.05) were higher than that 34 kg/m<sup>2</sup> density group at the end of the 41 days fattening period. Average live weight of 34 kg/m<sup>2</sup> density group was higher than that 39 kg/m<sup>2</sup> density group (P<0.01). There was no significant difference between the two stocking density groups (P>0.05), but there was a significant difference within the groups (P<0.001) in terms of foot pad dermatitis. According to the research findings, it was concluded that although the fattening performance and mortality rate were negatively affected in density group of 39 kg/m<sup>2</sup> compared to that of 34 kg/m<sup>2</sup>, but it was acceptable in commercial poultry houses with good environmental control.

**Key words:** Foot pad dermatitis, stocking density, fattening performance, broiler chicken, mortality rate.

### Giriş

Etlik piliçlerin kümes içindeki yoğunluğunun, besi performansı, hayvan refahı ve işletme karlılığına önemli etkileri vardır [9, 23]. Canlı ağırlık artışı [14, 19], ayak tabanı yangısı [21], karkas kalitesi [20] ve ölüm oranı [9] gibi özellikler etlik piliçlerin kümes içindeki sıklığının artmasından olumsuz etkilenir. Çünkü barındırma sıklığının artmasıyla altlık kalitesi [23], barınak içi hava sıcaklık ve nem değerleri [7] ve hayvan davranışları [9] olumsuz etkilenmektedir. Kümes içinde hayvan başına ayrılan alan arttığında ise yem dönüşüm oranı, ölüm oranı ve karkasta istenmeyen çiziklerin azaldığı, beden ağırlığı ve göğüs et miktarının arttığı bildirilmiştir [1].

Kümes içinde tavsiye edilen piliç başına ayrılması gerekli minimum barındırma sıklığı ile ilgili değerler değişkendir. Kümes içinde etlik piliçlere ayrılması gerekli minimum alan piliçlerin besi sonu ağırlığına göre 33 kg/m<sup>2</sup> olarak belirlenmiş, fakat kümes içi çevresel koşulların karşılandığı ve idarenin iyi olduğu kümeslerde 39 kg/m<sup>2</sup> hatta 42 kg/m<sup>2</sup>'ye kadar izin verilebileceği bildirilmiştir [5, 8, 21]. Bunun yanı sıra SCAHAW [17] tarafından barındırma sıklığının 30 kg/m<sup>2</sup>'yi, FAWC [6] tarafından ise 34 kg/m<sup>2</sup>'yi aşılması tavsiye edilmiştir. Bu sınırlamalara karşın gerek Türkiye, gerekse de diğer ülkelerdeki etlik piliç işletmelerinde daha çok gelir elde etmek amacıyla kümes içi hayvan yoğunluğu sıkça aşılmakta ve sorunlar oluşmaktadır. Kümes içi barındırma sıklığı ile



ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde çalışmaların çoğunun deneysel kapsamda, az sayıda örnekler düzeyinde yapıldığı, ticari işletme koşullarında yapılan araştırma sayısının çok az olduğu belirlenmiştir.

Bu araştırma ticari koşullarda yetiştirilen etlik piliçlerin besi performansı, ölüm oranı ve ayak taban yangısı üzerine iki farklı barındırma sıklığının etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

## Materyal ve Metot

Bu araştırma Samsun'un Ondokuz Mayıs ilçesindeki özel bir firmaya ait olan, iki adet kümese yerleştirilen Ross 308 hattı etlik piliçler üzerinde üç tekrarla yürütülmüştür. Araştırmaya 2018 Eylül ayında başlanmış, her iki kümeste de besi süreleri arasında 10'ar gün ara verildikten sonra besiyeye devam edilmiştir. Aynı firmaya ait birbirinin aynısı olan 195 m x 10 m boyutlarındaki (1950 m<sup>2</sup>) iki adet kümesin birine ardışık besi sürelerinde 35378 ( $\pm 79.91$ ) adet (18.14 $\pm 0.04$  piliç/m<sup>2</sup>) diğerine ise 29993 ( $\pm 98.21$ ) adet (15.38 $\pm 0.052$  piliç/m<sup>2</sup>) civiv yerleştirilmiştir. Her iki kümeste de yemlik ve suluklar aynı dizaynda yerleştirilmiştir. Piliç başına düşen yemlik ve suluk uzunluğu her iki kümeste de sabit olup yuvarlak tip yemlikte en az 2.5 cm, 8-10 pilice bir adet nipel suluk olacak şekilde ayarlanmış, yem ve su ad libitum olarak sağlanmıştır. Ortalama besi dönemi barındırma sıklığı yüksek ve düşük kümesler için sırasıyla 41.91 ( $\pm 0.36$ ) gün ve 41.70 ( $\pm 0.20$ ) gün olarak belirlenmiştir. Etlik piliçlere besi boyunca ilk 11 gün başlangıç (HP: %23.5; ME: 2850 kcal/kg), 12-22 günler arasında büyütme (HP: %22; ME: 2950 kcal/kg) ve kesime gönderilinceye kadar bitiş (HP: %20; ME: 3010 kcal/kg) olmak üzere 3 farklı yem verilmiştir. Birbirinin aynısı her iki kümeste de sıcaklık, nem ve havalandırma otomatik olarak kontrol edilmiştir. Kümeslerin sıcaklıkları ilk hafta 32°C'ye ayarlanmış, 3. haftanın sonunda 24°C'ye düşürülmüş ve piliçlerin çıkışına kadar bu sıcaklıkta çalışmaya devam edilmiştir. Havalandırma oranı ve bağıl nem oranı her iki kümeste sırasıyla 2 m<sup>3</sup>/h/kg canlı ağırlık ve %65 olarak ayarlanmıştır. Çalışma boyunca her gün 24 saat aydınlatma sağlanmıştır. Beton olan her iki kümesin zeminine kümes boyunca 7'şer cm kaba talaş serilmiş her besi döneminden sonra altlık değiştirilmiştir. Araştırma boyunca etlik piliçlerin kümes içinde yoğunluğunu etkileyecek uygulama yapılmamıştır.

## Ölçüm ve Değerlendirmeler

Kümeslerin yemlikleri tamamen doldurulmuş ve haftalık olarak kümeslere göre tüketilen yem miktarı ve günlük olarak ölen piliç sayıları kaydedilmiştir. Kesim günü kesimhanede barındırma sıklığı gru-

buna göre nakil aracına yüklenen piliçlerin toplam ağırlığı piliç sayısına bölünerek besi sonu ortalama canlı ağırlığı olarak kaydedilmiştir. Kümeden çıkan piliçlerin toplam ağırlığı kümesin alanına bölünerek metrekaare başına düşen ortalama canlı ağırlık olarak hesaplanmış ve bu değerler 39.55 $\pm 0.14$  ve 34.22 $\pm 0.18$  kg/m<sup>2</sup> olarak belirlenmiştir. Toplam tüketilen yem miktarı toplam ağırlık artışına bölünerek yem dönüşüm oranı hesaplanmıştır. Piliç ayaklarının lezyonlarının skorlaması Martrenchar ve ark. [12]'nin yöntemine göre yapılmıştır. Buna göre kesimhanede uzman üç personel tarafından, her barındırma sıklığı grubu için rastgele seçilen 150 örnek olmak üzere üç tekrar için toplam 900 etlik piliçin ayak tabanı ve/veya parmaklarındaki lezyonun varlığı veya yokluğuna göre makroskobik olarak değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirmede lezyon yoksa Skor 0, lezyon ayak tabanının %25'ine kadar yayılmışsa Skor 1; lezyon ayak tabanının %25-50'si arasındaysa Skor 2; lezyon %50'den fazla ve/veya ayak parmaklarına da yayılmışsa Skor 3 olarak skorlama yapılmıştır.

## İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada iki farklı barındırma sıklığına ait besi performans özelliklerinin karşılaştırılmasında bağımsız iki örnek t testi, iki barındırma sıklığı grubu arasında ayak taban yangılarına ait skorların ve ölüm oranlarının karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi, barındırma sıklığı grupları içinde ayak taban yangılarına ait skorların karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi, kullanılmıştır. İstatistiksel analizde SPSS 21.0 [22] istatistik programından yararlanılmıştır.

## Bulgular

Etlik piliçlerin iki barındırma sıklığına ait bazı besi performansı ve ölüm oranı değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Ortalama canlı ağırlık değeri 39 kg/m<sup>2</sup> barındırma sıklığı grubunda, 34 kg/m<sup>2</sup> grubundan daha az bulunmuştur (P<0.01). Piliç başına ortalama yem tüketimi (P<0.01), yem dönüşüm oranı (P<0.01) ve ölüm oranı (P<0.05) 39 kg/m<sup>2</sup> barındırma sıklığı grubunda daha fazla bulunmuştur.

Barındırma sıklığı grupları arasında ve içinde ayak taban yangılarına ait skorların karşılaştırılması Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre barındırma sıklığı grupları arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir (P>0.05). Diğer taraftan, barındırma sıklığı grupları içinde ayak taban yangı skorları arasında önemli farklılık bulunduğu tespit edilmiştir (P<0.001). Her iki barındırma sıklığında da Skor 2'de en çok, Skor 0 ve Skor 3'de en az sayıda etlik piliçin olduğu saptanmıştır.

**Tablo 1.** Barındırma sıklığı gruplarına ait bazı besi performansı özellikleri değerleri ( $\bar{X} \pm S\bar{X}$ ), ölüm oranları ve önemlilik düzeyleri.

Özellikler	Barındırma sıklığı (39 kg/m <sup>2</sup> )	Barındırma sıklığı (34 kg/m <sup>2</sup> )	Önemlilik
Toplam hayvan sayısı (adet)	35378±79.91	29993±98.21	***
Ortalama canlı ağırlık (g)	2315±9.33	2348±7.09	**
Toplam yem tüketimi (kg)	135689±308.52	108460±530.76	***
Piliç başına ortalama yem tüketimi (g/adet)	4073±6.17	3816±32.72	**
Yem dönüşüm oranı	1.75±0.007	1.62±0.016	**
Ölüm oranı (%)	5.85	5.25	*

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001

**Tablo 2.** Barındırma sıklığı grupları arasında ve içinde ayak taban yangılarına ait skorların karşılaştırılması ve önemlilik düzeyleri.

Barındırma Sıklığı	Skor 0 (n) (%)		Skor 1 (n) (%)		Skor 2 (n) (%)		Skor 3 (n) (%)		Toplam	Önemlilik
39 kg/m <sup>2</sup>	23 <sup>c</sup>	5.11	140 <sup>b</sup>	31.11	219 <sup>a</sup>	48.67	68 <sup>c</sup>	15.11	450	***
34 kg/m <sup>2</sup>	26 <sup>c</sup>	5.78	113 <sup>b</sup>	25.11	270 <sup>a</sup>	60.00	41 <sup>c</sup>	9.11	450	***
Önemlilik	ö.d.		ö.d.		ö.d.		ö.d.			

a, b, c: Aynı satırda farklı harfle gösterilen skor değerleri önemli derecede farklıdır (P<0.05).

\*\*\*: P<0.001, ö.d.: Önemli değil.

## Tartışma ve Sonuç

Kümes içi barındırma sıklığı etlik piliçlerin besi performansını etkileyen en önemli çevre faktörlerinden birisidir. Bu araştırmada 39 kg/m<sup>2</sup> ve 34 kg/m<sup>2</sup> barındırma sıklığında kümese yerleştirilen etlik piliçlerin ortalama besi dönemi sonu canlı ağırlık değerleri arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir. Yapılan araştırmaların çoğunda da yüksek barındırma sıklığında bulunan etlik piliçlerin besi dönem sonu canlı ağırlığı, düşük barındırma sıklığında bulunanlardan daha az olduğu bildirilmiştir [14, 16, 19, 20, 23]. Mortari ve ark. [16], Mendes ve ark. [14] ve Skrbic ve ark. [19] tarafından yüksek barındırma sıklığının etlik piliçlerin besi sonu ortalama ağırlık değerine olumsuz etkide bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan bir araştırmada [20] etlik piliçlere kümes içinde 10, 13 ve 16 piliç/m<sup>2</sup> olmak üzere 3 farklı barındırma sıklığı uygulanmış ve araştırma sonucunda düşük sıklıkta barındırmanın ağırlık artışı ve besi sonu ortalama canlı ağırlığına katkısının olumlu olduğu bildirilmiştir. Petek ve ark. [23] tarafından 15 piliç/m<sup>2</sup> ve 19 piliç/m<sup>2</sup> barındırma sıklığındaki piliçlerden elde edilen besi sonu canlı ağırlık ortalamaları arasında farkın önemli olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan barındırma sıklığının canlı ağırlığa etkisi ile ilgili yapılan bir araştırmada [24] ise 15 piliç/m<sup>2</sup> ve 20 piliç/m<sup>2</sup> olmak üzere iki barındırma sıklığında yetiştirilen piliçlerin besi dönemi sonu ortalama canlı ağırlık değerleri arasında istatistiksel bakımdan fark olmadığı bildirilmiştir. Bizim araştırma sonucumuz Thomas ve ark. [24]'nin araştırma sonucundan farklıdır.

Petek ve ark. [23] tarafından barınak içinde 15 piliç/m<sup>2</sup> ve 18 piliç/m<sup>2</sup> barındırma sıklığında yetiştirilen piliçlerde yem dönüşüm oranlarının sırasıyla 1.59 ve 1.71 olduğu belirtilmiştir. Thomas ve ark. [24] tarafından 15 piliç/m<sup>2</sup> ve 18 piliç/m<sup>2</sup> yoğunlukta barındırılan piliçlerin yem dönüşüm oranları sırasıyla 1.718 ve 1.750 olarak bildirilmiştir. Bu araştırmacıların [23, 24] sonucuna benzer olarak bu araştırmada da barındırma sıklığı artınca yem dönüşüm oranı artmıştır. Bazı çalışmalarda ise yüksek barındırma sıklığında yem dönüşüm oranının, düşük barındırma sıklığında yetiştirilenlerden daha az olduğu bildirilmiştir [4, 11, 19]. Besi sonu canlı ağırlık ve yem dönüşüm oranları ile ilgili olarak, bizim araştırma sonuçlarımız ile bazı çalışmalar arasındaki bu farklılık, araştırmalarda kullanılan etlik piliç hatlarının değişken olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Bu araştırmada ölüm oranı, 39 kg/m<sup>2</sup> barındırma sıklığındaki etlik piliçlerde 34 kg/m<sup>2</sup> barındırma sıklığındakilerden daha fazla bulunmuştur. Hall [9] tarafından yüksek kapasiteli (120 000 adet piliç) kümeslerde iki farklı barındırma sıklığında (34 kg/m<sup>2</sup> ve 40 kg/m<sup>2</sup>) yetiştirilen etlik piliçlerin ölüm oranları karşılaştırılmış ve araştırma sonucunda 40 kg/m<sup>2</sup>'de ölüm oranının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bizim araştırmamızdaki ölüm oranı ile ilgili araştırma sonucu Hall [9]'in araştırma sonucuna benzerdir. Diğer taraftan Thomas ve ark. [24] tarafından 15 piliç/m<sup>2</sup> ve 20 piliç/m<sup>2</sup> barındırma sıklıklarında ölüm oranları sırasıyla %4.3 ve %3.8 olarak bildirilmiştir. Shanawayn [18], Cravener ve ark. [2] ve Martrenchar

ve ark. [13] tarafından düşük ve yüksek barındırma sıklıklarında yapılan araştırmalarda ölüm oranları arasında farklılığın önemsiz olduğu bildirilmiştir. Ölüm oranları ile ilgili bizim araştırma sonucumuz bu araştırmacıların sonuçlarından farklıdır [2, 13, 18, 24]. Bu farklılık örnek büyüklüğünün artması ile hayvan davranışlarındaki değişimle korku davranışının artması ve boğulma riskinin büyük sürülerde fazla olmasından kaynaklanmış olabilir.

Bu araştırmada iki farklı barındırma sıklığı grubu arasında yapılan karşılaştırmada piliçlerin ayak taban yangıları arasında önemli bir farkın bulunmadığı belirlenmiştir. Fransa'da 50 etlik piliç kümesinde yapılan araştırmada [12] altlık ve hava kalitesinin iyi olması koşuluyla barındırma sıklığı ile ayak taban yangısı arasında ilişkinin bulunmadığı bildirilmiştir. Diğer iki araştırmada da [3, 10] barındırma sıklığının artması ile ayak tabanı yangısında önemli bir farklılık olmadığı bildirilmiştir. Bizim araştırma sonucumuz bu araştırma sonuçlarına benzerdir [3, 10, 12]. Fakat bazı araştırmacıların sonuçları ile farklılık göstermektedir [9, 21, 23, 24]. Bu farklılığın kümes içinde altlık, hava kalitesi, sıcaklık ve nem değerleri gibi bakım ve idare koşullarının farklılığından ileri gelebileceği düşünülmektedir. Araştırmada barındırma sıklığı grupları içindeki ayak taban yangı skorları arasındaki farklılık ise önemli bulunmuştur. Her iki barındırma sıklığı grubunda da Skor 2'de en çok, Skor 0 ve Skor 3'de en az sayıda etlik piliçin olduğu gözlemlenmiştir. Spindler ve Hartung [21] tarafından yapılan araştırmada 33, 39 ve 42 kg/m<sup>2</sup> yoğunlukta barındırılan 30, 34 ve 40 güne kadar büyütülen piliçlerde ayak tabanındaki lezyonun yaygınlığının arttığı yani Skor 0'dan Skor 2'e doğru etkilenen piliç sayısının arttığı ve aradaki farkın önemli olduğu bildirilmiştir. Bizim araştırma sonucumuz Spindler ve Hartung [21] tarafından bildirilen sonuca benzerdir.

Sonuç olarak, bu araştırma iki farklı barındırma sıklığının (34 ve 39 kg/m<sup>2</sup>) piliçlerin besi sonu ortalama canlı ağırlığı, piliç başına ortalama yem tüketimi, yem dönüşüm oranı, ölüm oranı ve ayak taban yangısı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Araştırma sonucunda 39 kg/m<sup>2</sup> grubunda bulunan piliçlerin besi sonu ortalama canlı ağırlığı, piliç başına ortalama yem tüketimi, yem dönüşüm ve ölüm oranı özelliklerinin diğer gruba göre olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Buna karşın ayak taban yangısı bakımından iki barındırma sıklığı grubu arasında fark olmadığı tespit edilmiştir. Araştırma bulguları doğrultusunda çevre denetimi kontrol edilebilen ticari kümeslerde 39 kg/m<sup>2</sup> barındırma sıklığında yetiştirilen piliçlerde besi performansı ve ölüm oranı

kısmen olumsuz etkilense de kabul edilebilir olduğu söylenebilir.

## Kaynaklar

1. Bilgili SF, Hess JB (1995): Placement density influences broiler carcass grade and meat yields. *The Journal Applied Poultry Research*, 4: 384-389.
2. Cravener TL, Roush W, Band Mashaly MM (1992): Broiler production under varying population densities. *Poultry Science*, 71: 427-433.
3. Dawkins MS, Donnelly CA, Jones TA (2004): Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. *Nature*, 427: 342-344.
4. Edriss MA, Davoodvandi S, Pourreza J (2003): The effect of stock density on the prediction of performance and carcass traits in broiler chickens. ss: 695-700. *Proceedings XVI th European Symposium on the Quality of Poultry Meat*, September 2003, Saint-Brienc, France.
5. European Commission, 2007: Council Directive 2007/43/EC of 28 June 2007 laying down minimum rules for the protection of chickens kept for meat production. In: *Official Journal*, L 182, 12/07/2007, pp 19-28.
6. FAWC 1992 Report on the Welfare of Broiler Chickens. FAWC: Tolworth, UK.
7. Feddes JJR, Emmanuel EJ, Zuidhof MJ (2002): Broiler performance, body weight variance, feed and water intake, and carcass quality at different stocking densities. *Poultry Science*, 81: 774-779.
8. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (2018): Etçi tavukların korunması ile ilgili asgari standartlara ilişkin yönetmelik. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2018/01/20180120-19.htm>. (Erişim Tarihi: 21.11.2019).
9. Hall AL (2001): The effect of stocking density on the welfare and behaviour of broiler chickens reared commercially. *Animal Welfare*, 10: 23-40.
10. Haslam SM, Brown SN, Wilkins LJ, Kestin SC, Warriss PD, Icol CJ (2006): Preliminary study to examine the utility of using foot burn or hock burn to assess aspects of housing conditions for broiler chicken. *British Poultry Science*, 47: 13-18.
11. Lewis PD, Perry GC, Farmer LJ, Patterson RLS (1997): Responses of two genotypes of chicken to the diets and stocking densities typical of UK and "Label Rouge" production systems: 1. Performance, behaviour and carcass composition. *Meat Science*, 45: 501-516.
12. Martrenchar A, Boilletot E, Huonnic D, Pol F (2002): Risk factors for foot-pad dermatitis in chicken and turkey broiler in France. *Preventive Veterinary Medicine*, 52: 213-226.
13. Martrenchar A, Morisse JP, Huonnic D, Cotte, JP (1997): Influence of stocking density on some behavioural, physiological and productivity traits of broilers. *Veterinary Research*, 28: 473-480.
14. Mendes AA, Garcia RG, Imeida ICLA, Moreira J (2004): Effect of stocking densities and season on performance, environmental and thermoregulatory parameters and carcass yield of broiler chickens p 417. *Book of abstract, XXII World's Poultry Congress, Istanbul-Turkey*, 8-13 June 2004,
15. Moreira J, Mendes, AA, Roca Ro, Garcia EA, Naas IA, Garcia RG, Lima IC, Paz A (2004): Effect of stocking density on performance, carcass yield and meat quality in broilers of different commercial strains. *Revista Brasileira Zootecnia*, 33: 1506-1519.

16. Mortari AC, Rosa P, Zanella I, Neto CB, Visentin PR, Brites LBP (2002): Performance of broilers reared in different population density, in winter, in South Brazil. *Ciência Rural*, 32: 493-497.
17. SCAHAW (2000): The welfare of chickens kept for meat production (broilers). Report of the Scientific Committee in Animal Health and Animal Welfare. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General, Brussels, Belgium. Home page address: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scaw/out39\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scaw/out39_en.pdf)
18. Shanawany MM (1988): Broiler performance under high stocking densities. *British Poultry Science*, 29: 43-52.
19. Skrbic Z, Pavlovski Z, Lukic M (2007): Body mass and dynamics of growth of broiler chickens of different genotype in improved rearing conditions. 2nd International Congress on Animal Husbandry "New Perspectives and Challenges of Sustainable Livestock Farming", Belgrade, October 3-5. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23(5-6): 347-357.
20. Skrbic Z, Pavlovski Z, Lukic M, Peric L, Milosevic N (2009): The effect of stocking density on certain broiler welfare parameters. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25: 11-21.
21. Spindler B, Hartung J (2011): Prevalence of pododermatitis in broiler chickens kept according to directive 2007/43/EC stocking densities, Proceedings of the XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene, 3-7 July 2011, pp. 39-42, Australia, Vienna, ISBN 978-80-263-0008-3,
22. SPSS (2013): Statistical package for the social sciences, Release 22.0, SPSS Inc, Chicago, Il, USA.
23. Petek M, Üstüner H, Yeşilbağ D (2014): Effects of stocking density and litter type on litter quality and growth performance of broiler chicken. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20: 743-748.
24. Thomas DG, Ravindran V, Thomas DV, Camden BJ, Cottam YH, Morel PCH, Cook CJ (2004): Influence of stocking density on the performance, carcass characteristics and selected welfare indicators of broiler chickens. *New Zealand Veterinary Journal*, 52: 76-81.

## ***In vitro* embriyo kültür medyumlarına ilave edilen eritropoietinin oksidatif stres ve embriyo gelişimi üzerine etkisi**

Muharrem Satılmış<sup>1\*</sup> , Ali Bilgili<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Mdrlg, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, Türkiye

**Geliş Tarihi** / Received: 21.01.2020, **Kabul tarihi** / Accepted: 28.05.2020

**zet:** alışmada, *in vitro* embriyo kültür medyumuna ilave edilen eritropoietinin antioksidan etkinliği incelendi. Siğir ovaryumlarından elde edilen oositlerin *in vitro* maturasyonu ve fertilizasyonlarını izleyen süreçte eritropoietinin 3 farklı dozu (0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg /ml) ilave edilerek 3 deneme grubu ve eritropoietin ilave edilmemiş (antioksidansız) kontrol grubu oluşturularak kültür ortamına alınarak bölünen oosit oranları, blastosiste erişim oranları biyokimyasal parametreler değerlendirildi. Morula ve 48. saat bölünen oosit oranları bakımından gruplar arasındaki farklılık önemli iken, diğer özellikler için gruplar arası farklılıkların istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edildi ( $p>0,05$ ).

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan, embriyo, eritropoietin, *in vitro*, oksidatif stres

### **Effects of erythropoietin addition to *in vitro* embryo culture mediums, on oxidative stress and embryo development**

**Abstract:** In this study, effectiveness of erythropoietin addition to *in vitro* culture mediums on oxidative stress and embryo development was investigated. *in vitro* maturation and fertilization of oocytes from cow ovaries, cleaved oocyte ratios, reaching to blastocyst ratios, and biochemical parameters were evaluated using 3 trial groups with different doses of erythropoietin (0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg /ml) to culture mediums and 1 control group without erythropoietin (no antioxidant). Morula and 48th hour cleaved oocyte ratios were significantly different between groups whereas differences regarding the other parameters were insignificant ( $p>0,05$ ).

**Key words:** Antioxidant, embryo, erythropoietin, *in vitro*, oxidative stress

### **Giriş**

Eritropoietin (EPO), hematopoietin olarak da adlandırılan glikoprotein yapısında yerel bir hormondur. 30.4 kDa ağırlığında bir glikoprotein ve insanlarda genomik DNA da 7. kromozomda bulunan 5.4 kb'lik bölgeden 193 amino asit içeren polipeptit zinciri şeklinde ifade edilir [15,19]. Başlıca böbrekler tarafından salgılanan EPO'nun karaciğer, makrofajlar ve salgı bezleri ile diğer doku ve hücrelerde varlığı tespit edilmiştir. Ancak en önemli üretim kaynakları böbreklerde kortikal peritubular hücreler olup, eritrosit üretiminden sorumludur [14,16]. Eritropoietinin birincil olarak eritrosit üretiminden sorumlu olmakla birlikte çeşitli klinik raporlar oksidatif stresi azaltabileceğini bildirmektedir. Bu alışmalarda EPO'nun *in vitro* embriyo üretim aşamasında hüresel hasarın önemli nedenlerinden biri olan oksidatif stresi azaltarak hücreleri koruya bilirdiği ortaya koymaya çalışıldı [3,9,17,24].

Embriyonun hücre membran yapısı büyük oranda doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu durumda gerek *in vitro* kültür ortamlarında gerekse kültür öncesi manipulasyonları esnasında oosit ve embriyolar lipid peroksidasyonuna maruz kalmaktadırlar [6].

Bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda embriyoların *in vitro* kültür sürecinde oluşan serbest radikal oranlar ile embriyo gelişiminin olumsuz etkilenmesi arasındaki ilişkinin önemli olduğunu bildirmektedirler [18,23].

Oositlerin gerek maturasyonu gerekse fertilizasyonunun *in vitro* kültür ortamında gerçekleştirilmesi esnasında oluşan serbest radikaller (süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikali) hücrede oksidatif hasara neden olarak hücrenin normal fonksiyonlarını etkilemektedir. Bu oksijen radikalleri özellikle hücre zarlarını aşarak nükleik asit, protein, lipid gibi yapıları etkileyerek mitokondride bozukluklara

\* Bu makale birinci yazarın doktora tezinin bir kısmından üretilmiştir.

**Yazışma adresi / Correspondence:** Muharrem Satılmış, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Mdrlg, Ankara, Türkiye  
E-posta: satilmis96@gmail.com

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0002-4758-9508 • <sup>2</sup>0000-0001-6819-7952

neden olurlar. Oluşan bu bozukluklar ise embriyonun normal gelişimini engelleyerek fertilizasyondan sonra embriyonik gelişimde bloklanmaya ve apoptozise neden olmaktadır [11,13].

*In vivo* şartlarda, embriyonun kendi yapısında ve yaşadığı dişi kanalında tiol bileşikler (glutasyon, sistein, hipotaurine) ve enzimler (katalaz, superoksit dismutaz) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşturduğu hasara karşı koruyucu endojen kaynaklı antioksidan etkili maddeler bulunmaktadır. Bu antioksidan maddeler ortamda gelişen ROS'un zararlı etkilerini önleyerek embriyoyu korumaktadır. Fakat bu endojen kaynaklı antioksidanlar *in vitro* kültür esnasında yetersiz kalmakta ve endojen antioksidanlar dışında başka ekzojen antioksidan maddelerin ilave edilmesine gereksinim duyulmaktadır [4].

Bu çalışmada *in vitro* Charles Rosencrans 1 aminoasit (CR1aa) embriyo kültür medyumuna eritropoietinin farklı dozları ilave edilerek embriyo gelişiminde ROS'un etkilerini elimine ve detoksifiye etkisi ile kullanılacak etkili uygun dozlarının belirlenmesi araştırıldı.

## Materyal ve Metot

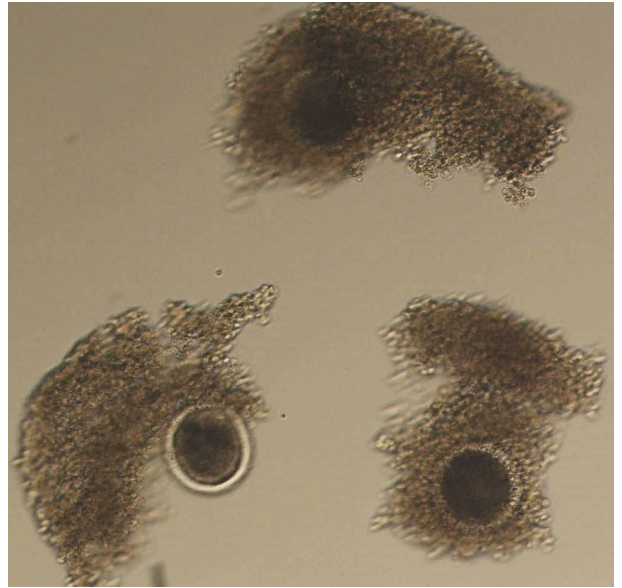
Ankara İli Çubuk İlçesi'nde ve Kırıkkale İl'inde bulunan çevre mezbahalarda kesilen dişi hayvanlardan toplanan ovaryumlar oosit kaynağını oluşturdu. Eritropoietin (Rat Recombinat Erythropoietin; SIGMA E 8905 USA) antioksidan olarak, Tissue Culture Medyum (TCM-199; M7528/Sigma-Aldrich Co.) maturasyon medyum, Charles Rosencrans (CR1aa) kültür medyum ve total oksidan ölçümleri için spektrofotometrik kit (Total Oxidant Status Assay Kit, Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti.) kullanıldı.

### Ovaryumdan Oosit Aspirasyonu

*In vitro* embriyo elde edilmesi amacıyla bölgedeki mezbahalarda kesilen kültür ırkı ve melezlerine ait ineklerin ovaryumları kullanıldı. Hayvanların kesimini takip eden 15-20 dakikalık süre içerisinde alınan ovaryumlar antibiyotik (gentamisin 100 mg/L) ilave edilmiş %0.9 fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisine nakledildi. FTS içerisinde ve 30°C'lik sabit ısı sağlayan termosta 3 saat içerisinde laboratuvara getirildi [8]. Çapı 2-8 mm'lik büyüklüğe sahip folliküller normal enjektör ile Resim 1'deki gibi oositler aspire edilerek 90 mm petrilere toplandı [20]. Ardından çalışma için kullanılacak olan oositler kalite yönünden değerlendirildi [1]. A ve B kaliteye sahip olan oositler Resim 2'deki gibi (A kalite: etrafında 2 ve daha fazla kumulus hücre katmanı bulunan, B kalite: etrafında 2 sıralı kumulus hücre katmanı bulunan oosit) *in vitro* embriyo üretim sürecine alındı.



Resim 1. Oosit aspirasyonu.



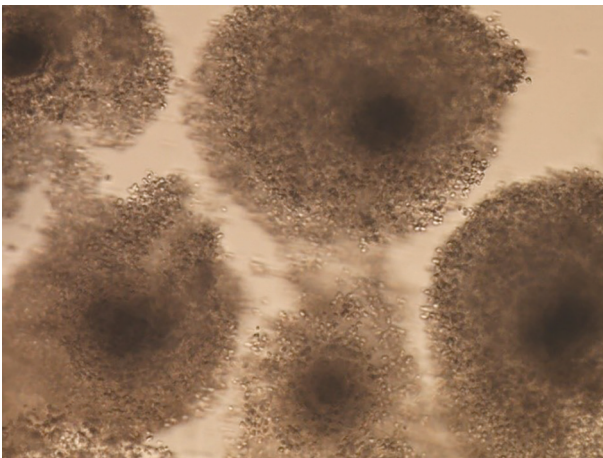
Resim 2. Aspire edilen oosit

### Oositlerin *in vitro* Maturasyonu ve Fertilizasyonu

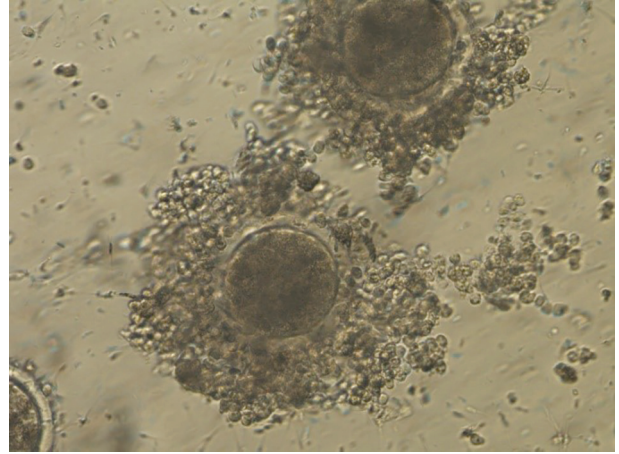
Aspire edilen A ve B kalite oositlerin maturasyonunu gerçekleştirmek amacıyla 2 µg/ml FSH, %10 fetal calf serum (FCS, SIGMA F9665), 0.1 mg/ml L-Glutamin (G8540/Sigma-Aldrich Co.), 100 IU/ml kristalize penisilin-G potasyum ve 100 µg/ml kristalize streptomisin sülfat ilave edilmiş TCM-199 doku kültürü medyum kullanıldı. Maturasyon sürecine alınan oositler 20-22 saat %95 bağıl nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 38,5°C'deki karbondioksit inkubatörde inkübasyona bırakıldı [22]. % 90 ve üzeri kumulus ekspansiyonu gösteren oositler mature olmuş olarak değerlendirilerek (Resim 3) fertilizasyon sürecine alındı.

Bu amaçla Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Suni Tohumlama

Laboratuvarı'nda üretilmiş olan, payet içerisinde  $175 \times 10^5$  spermatozooya sahip 0,25 ml'lik suni tohumlama payetlerinde dondurulan boğa spermaları kullanıldı. Kanagawa ve arkadaşlarının (12) yöntemine göre, Spermatozoonların kriyoprotektanlar, seminal plazmadan ayrılması, sulandırılması ve kapasitasyonu için modifiye Brackett Oliphant (BO) medyumları kullanıldı. BO stok medyumlarından Sperm Yıkama Solüsyonu (SYS), Sperm Sulandırma Solüsyonu (SSS) ve Oosit Yıkama Solüsyonu (OYS) hazırlanarak SYS ve OYS  $35^\circ\text{C}$ 'deki su banyosuna, SSS ise inkubatöre kaldırıldı. Kapasitasyon amacıyla 5 U/ml heparin (H3149/Sigma-Aldrich Co.) ve 2 mM kafein (C4144/Sigma-Aldrich Co.) kullanıldı.  $0.25$ 'lik 5 sperma payeti  $37^\circ\text{C}$ 'deki su banyosunda 25-30 saniyede çözdürüldü. Ardından santrifüj tüplerine alınarak üzerine 6 ml SYS ilave edildikten sonra 1800 rpm devirde 5 dk santrifüj edildi. Ardından supernatant kısmı sifon yaptırılarak uzaklaştırıldı. İşlem 2 tekrar şeklinde gerçekleştirildi. Spermatozoonların mikroskoptaki sayımlarının kolay yapılabilmesi için üzerine 1.2 ml daha SYS ilave edildi. Bundan 50  $\mu\text{l}$  alınarak 4950  $\mu\text{l}$  %5'lik NaCl içeren tuzlu suya aktarılarak thoma lamında sayım işlemi gerçekleştirildi. Sayımın ardından elde edilen sayıya göre final yoğunluk  $6.25 \times 10^6$  spermatozoa/ml olacak şekilde SSS ilave edilerek fertilizasyon medyumuna hazırlandı. 30.000 spermatozoa / oosit olacak şekilde son sulandırması yapılan spermatozoonlardan 35 mm kültür petrilerinde (Falcon 3001/Dickinson) 100  $\mu\text{l}$  olmak üzere 4 mikro damla ve üzerleri mineral yağ ile kaplanarak fertilizasyon dropları oluşturuldu. *In vitro* maturasyonu tamamlanan oositler fertilizasyon için OYS ile en az 2 kez yıkandıktan sonra her bir mikro damlaya 20 adet oosit ilave edilerek 5-6 saat süreyle fertilizasyon (Resim 4) işlemleri gerçekleştirildi [22].



**Resim 3.** Oositlerin maturasyonu



**Resim 4.** Oositlerin fertilizasyonu

### ***In vitro* Embriyoların Elde Edilmesi**

5-6 saat fertilizasyon sürecinden sonra kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla dar pastör pipeti kullanıldı. Kumulusları uzaklaştırılan oositler eritropoietinin 3 farklı dozu ilave edilerek (0,125  $\mu\text{g}$ , 0,25  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$  /ml) deneme [26] ve eritropoietin ilave edilmemiş (antioksidansız) kontrol olmak üzere 4 grup oluşturularak CR1aa kültür medyumuna alındı. Kültür ortamı olarak  $38,5^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ , % 95 nem içeren inkubatörden yararlanıldı. Her bir 100  $\mu\text{l}$  kültür drobundan en az 20 oosit kullanılarak çalışma gerçekleştirildi. Kültüre alınan oositlerin 2. günü (48 saat) sonunda mikroskopta bölünme oranları (Resim 5 ve Resim 6) kontrol edildi. Elde edilen bulgular kayıt edilerek bölünen oosit sayılarına göre bölünme oranları tespit edildi. İkinci gün bölünme kontrolü yapılan oositler tekrar inkübasyona alındı. Kültür sürecinin 7. gününde embriyo gelişimleri takip edilerek morula-blastosiste ulaşma oranları bakımından ve toplam embriyo sayıları stereo mikroskop (Olympus SZH10 Japonya) altında incelendi. Elde edilen embriyolar daha sonra total oksidan düzeyi ölçümleri yapılmak üzere  $-40^\circ\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

### **Embriyoların Total Oksidan Düzeyi Analizi**

Örneklerdeki mevcut oksidanlar, demir iyonları ile birleşerek demirli şelat bileşimler halinde bulunurlar. Bu demir iyonları asidik solüsyonlarda renkli yapılar oluştururlar. Bu renk oluşumları da spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Total oksidan düzeyi (TOS) analizi bu prensiple yapılmaktadır. Total oksidan düzeyi ölçümleri ticari spektrofotometrik kit (Total Oxidant Status Assay Kit, Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti. Gaziantep, Türkiye) kullanılarak spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer Lambda 25) belirlendi.  $-40^\circ\text{C}$ 'den çıkarılan embriyolar oda ısısında

çözündürüldü. Embriyoların parçalanması işlemi dar pastör pipeti ile pipetleme yöntemiyle gerçekleştirildi. 1.2 mL'ye kadar distile su ilave edildi. 10 milimol etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren 0,2 molar 1.2 ml Fosfat tamponu ile karıştırıldı. Analiz için hazırlanan bu embriyo solüsyonundan 75 µl 1 ml'lik spektrofotometre küvetine konuldu. Üzerine kit içerisinde bulunan Reagent 1 (Assay Buffer) solüsyonundan 500 µL eklendi. Aynı şekilde kit içerisinde bulunan Standart 2 solüsyonunda 75 µL alınarak küvete konuldu ve üzerine 500 µl reagent 1 solüsyonu ilave edildi. Örnekler ve standart 530 nm'de okundu. Örneklerin ve standardın üzerine kit içerisinde bulunan 25 µl reagent 2 (Prochromogen solution) solüsyonundan ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tekrar 530 nm'de okundu. Sonuçlar aşağıdaki formülle hesaplandı [7].  

$$\text{Sonuç} = (\Delta \text{Absorbans Örnek} / \Delta \text{Absorbans Standart}) \times 20 \text{ Equiv/L}$$

$\Delta$  Absorbans Örnek: Örneğin, 530 nm de 2. absorbans değeri - 530 nm'de 1. absorbans değeri

$\Delta$  Absorbans Standart: Standardın, 530 nm de 2. absorbans değeri - 530 nm'de 1. absorbans değeri.

## İstatistiksel Analiz

Embriyo gelişiminde expanse oosit, 48. saat bölünen oosit, morula, blastosist ve toplam embriyo oranları bakımından gruplar arası karşılaştırmalarda Khikare; expanded blastosiste erişme oranları bakımından gruplar arası karşılaştırmalarda ise bazı gruplarda gözlem sayısının (frekansların) 5'ten az olması nedeniyle G (Likelihood Ratio Chi-Square) istatistiği uygulanmıştır [5].

## Bulgular

Embriyo kültür sürecine alınan fertilize oositlerin bölünme oranları Çizelge 1'te verilmiştir. Fertilize oositlerin 48. saatteki bölünme oranları bakımından 0.25 µg (% 66.49) ve 0.125 µg (% 62.19) eritropoietin içeren kültür medyumlarında, kontrol grubuna (% 50.78) göre daha yüksek sonuçlar elde edildi ( $P < 0.001$ ). Morula aşamasına ulaşan embriyo oranları üzerinde ise, 0.5 µg (% 66.67) eritropoietin içeren kültür medyumuna, diğer gruplara göre daha yüksek sonuç verdi ( $P < 0.05$ ). Blastosist ve expanded blastosist oranları üzerinde, eritropoietinin önemli bir etkisi görülmedi ( $P > 0.001$ ). Oksidatif stres parametreleri üzerinde de eritropoietinin herhangi bir etkinlik göstermediği görüldü.

**Çizelge 1.** Kültür sürecine alınan fertilize oositlerin 48. saat ve 7-8. gün gelişim süreçlerine ait istatistiksel tablo.

Gruplar	Maturasyona alınan oosit sayısı	Expanse oosit oranı (%)	Kültüre alınan oosit sayısı (CR1aa)	48. saat bölünen oosit oranları (%)	7. Gün Kültür Sonu Morula/Blastosist Oranları			
					Morula %	Blastosist %	Exp. Blast. %	Toplam Embriyo %
Kontrol	200	86,50	193	50,78 (98/193) <sup>b</sup>	17,65 (3/17) <sup>b</sup>	64,71 (11/17)	17,65 (3/17)	17,35 (17/98)
Deneme I (0,125 µg erit.)	201	85,57	201	62,19 (125/201) <sup>a</sup>	38,24 (13/34) <sup>b</sup>	47,06 (16/34)	14,71 (5/34)	27,20 (34/125)
Deneme II (0,25 µg erit.)	200	88,50	194	66,49 (129/194) <sup>a</sup>	32,00 (8/25) <sup>b</sup>	60,00 (15/25)	8,00 (2/25)	19,38 (25/129)
Deneme III (0,5 µg erit.)	200	89,50	177	46,33 (82/177) <sup>b</sup>	66,67 (12/18) <sup>a</sup>	33,33 (6/18)	0 (0/18)	21,95 (18/82)
p	-	-	-	***	*	-	-	-

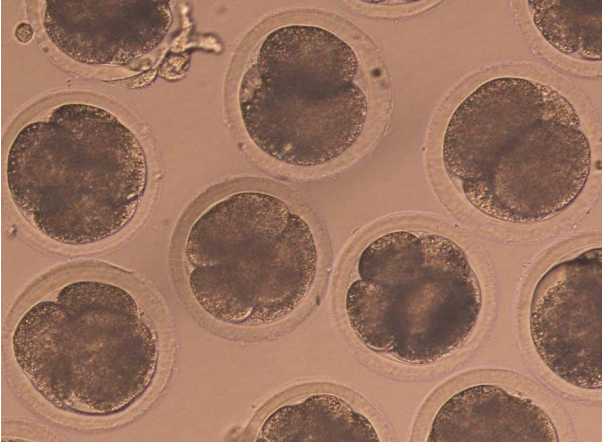
-:  $p > 0,05$  ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

a, b: Aynı sütündeki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

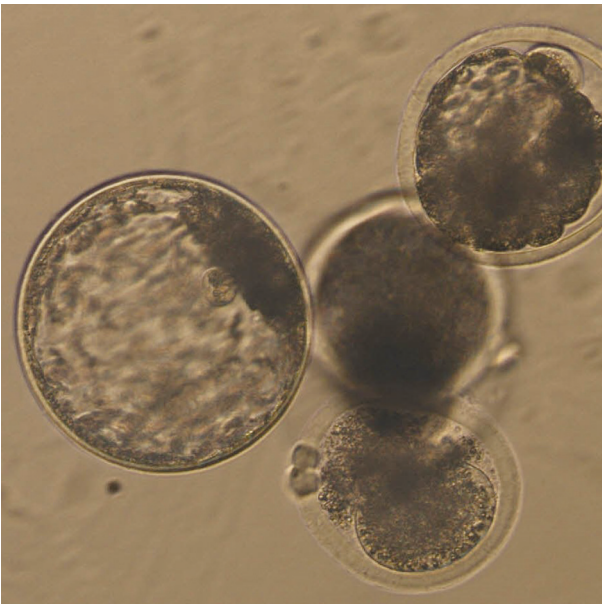
**Çizelge 2.** Kültür sürecine alınan fertilize oositlerin 7. gün total oksidan düzeyi analizi

Gruplar	Okuma 1	Okuma 2	DS	Sonuç Equiv/L
Kontrol	0,148	0,199	0,051	53,68
Deneme I (0,125 µg eritropoietin)	0,185	0,228	0,48	50,90
Deneme II (0,25 µg eritropoietin)	0,182	0,231	0,049	51,57
Deneme III (0,5 µg eritropoietin)	0,201	0,244	0,043	45,26
p	-	-	-	-





**Resim5.** Fertilizasyondan sonra 48. Saat



**Resim 6.** Fertilizasyondan sonra 7. Gün

## Tartışma ve Sonuç

Memeli hayvanlarda *in vitro* fertilizasyon sonrası gelişen oksidatif stres ve buna bağlı ortamda şekillenen serbest radikaller embriyonun gelişimini etkileyen önemli etkenlerden birisidir. Özellikle embriyonun yapısında meydana gelen hasara bağlı olarak blastosiste erişme oranında ve kaliteli embriyo elde edilmesinde oldukça önemlidir. Buradaki temel etken, embriyo hücre membranlarının yapısının doymamış yağ asitleri oranının yüksek olmasıdır. Serbest radikallerin oluşturduğu lipid peroksidasyon, hücre yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Fertilizasyondan sonra *in vitro* kültüre alınan oositlerin 48. saati embriyo gelişimi için oldukça önemli ve kritik bir dönemdir. Bu dönemde oksijen radikal-

lerin etkisi daha büyük olmakta ve embriyonal bloklanmalara sebep olmaktadır [6]. Netice olarak bu oksijen radikallerinin (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksi radikali) neden olduğu hücredeki hasar, hücre fonksiyonlarının devam ettirilmesini engelleyerek elde edilecek embriyo sayı ve kalite oranlarını düşürmektedir [11,13].

Memeli embriyoların *in vitro* elde edilmesinde çok farklı kültür ortamları kullanılmaktadır. Bunda temel amaç en uygun kültür ortamını sağlayarak embriyo kalitesini ve sayısını artırmaktır. Kaliteli blastosist elde edilmesi halinde embriyoların dondurulup çözünmesi sonrası nakillerinde gebelik oranları üzerinde oldukça önemli katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda kaliteli blastosist elde edilmesi ile embriyoda yapılacak işlemlerden (biyopsi, kriyoprotektanlardan daha az oranda etkilenme, blastomer seperasyonu vb.) etkilenmesi de daha az olacaktır. Bu amaçlarla oositlerin gerek maturasyon gerekse fertilizasyon sonrası kültür medyumlarına çok çeşitli antioksidan etkili maddelerin ilavesi yapılarak uygun bir kültür ortamının oluşturulmasına çalışılmaktadır [10,25].

Yapılan bu çalışmada, oositlerin fertilizasyonu sonrası kültürün 48. saatinde yapılan bölünme kontrollerinde; 0.25 µg ve 0.125 µg eritropoietin, kontrol grubuna göre daha yüksek (% 62 ve % 66) oran verdiği görüldü. Alınan bu sonuçlar Bucak ve ark. [2] Sisteamin ile yaptıkları çalışmaları sonuçlarından daha (% 49) yüksek bulunmuştur. Morula aşamasına ulaşan embriyo oranları üzerinde ise, 0.5 µg eritropoietin içeren kültür medyumunu, diğer gruplara göre daha üstün çıktığı tespit edildi ( $P < 0.05$ ). Sung ve ark. [21] ise morula aşamasındaki embriyo oranını %26, blastosist aşamasındaki embriyo oranını ise %19 bularak, bizim bulduğumuz sonuçlardan daha düşük bulmuşlardır.

Embriyo oksidatif stres parametreleri üzerinde de eritropoietin herhangi bir etkinlik vermediği tespit edildi. Bu sonuç, ortama katılan eritropoietinin antioksidan seviyelerini (glutasyon ve total antioksidan kapasite) artırmadığından hareketle, blastosist ve ekspanded blastosist oranlarına bir etkinliğin olmadığı varsayımını doğrulamaktadır. Bilimsel kaynaklarda ise embriyo üzerine eritropoietinin etkinliğini araştıran bir çalışmaya rastlanılmadı. Ancak yapılan diğer antioksidan çalışmalar ile karşılaştırıldığında daha düşük bir oran elde edilmediği de görüldü. [2].

*In vitro* kültür ortamında eritropoietinin serbest radikallerin zararlı etkilerinin azaltılmasına yönelik yapılan bu çalışmada oositlerin kültür ortamına aktarıldıktan sonra 48. saat bölünme oranları 0.25 ve

0.125 µL eritropoietin ilave edilmiş deneme gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç verdiği tespit edildi. Bununla birlikte toplam elde edilen embriyo sayıları bakımından 0.125 µL eritropoietin ilave edilen deneme grubunun diğer gruplara göre daha yüksek embriyo sayısı verdiği belirlendi. Mevcut çalışmada eritropoietinin *in vitro* embriyo kültür medyumlarında antioksidan etkinliğinin yapıldığı ilk çalışma olduğu için oksidatif stres parametrelerinin istatistiksel olarak anlamsız olmasının nedeninin ortaya konulabilmesi için farklı kültür medyumlarında da çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra embriyo kalite ve blastosiste erişme oranlarına etkili olan farklı etkenlerde bulunmaktadır. Özellikle oositlerin elde edildiği hayvanların kondisyonu, oosit kaliteleri ve farklı kültür ortamları da elde edilen sonuçları etkilemektedir. Bu nedenle çalışmaların başka kültür ortamlarında yapılacak farklı çalışmalar ile desteklenmesinin uygun olacağı kanaatine varıldı.

**Teşekkür:** Bu çalışma, TAGEM (TAGEM/HAYSUD/13/A-02/P-01/0) tarafından doktora projesi olarak desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Brackett BG, Zuelka KA (1993): Analysis of factor involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Therio*, 39: 43-64.
- Bucak MN, Satılmış M, Kızıl SH, Karaşahin T, Akyol N (2010): Sığır embriyolarının *in vitro* gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 16 (1): 69-74.
- Calo LA, Stanic L, Davis PA, Pagnin E, Munaretto G, Fusaro M, Landini S (2003): Effect of epoetin on HO-1 mRNA level and plasma antioxidants in hemodialysis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 41: 187-192.
- Del Corso A, Cappiello M, Mura U (1994): Thiol-dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int J Biochem*, 26: 745-750.
- Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F (1983): İstatistik Metotları I. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 861: 229.
- Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zircarelli L (2000): Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. *Therio*, 54: 1537-1542.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2000): Free radicals in biology and medicine. 3th ed. Oxford: Oxford Science Publications, 617-24.
- Hamano S, Koikeda A, Kuwayama M, Nagai T (1992): Full-term development of *in vitro* matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Therio*, 38: 1085-1090.
- İnal M, Kanbak G, Şen S, Akyüz F, Sunal E (1999): Antioxidant status and lipid peroxidation in hemodialysis patients undergoing erythropoietin and erythropoietin- vitamin E combined therapy. *Free Radic Res*, 31: 211-216.
- Izquierdo D, Villamediana P, Paramio MT (1999): Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Therio*, 52: 847-61.
- Johnson MH, Nasr-Esfahani MH (1994): Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*. *Bioessays*, 16: 31-38.
- Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N (1995): Manuel of bovine embryo transfer national livestock breeding center. MAFF, JICA, Japan.
- Kehrer JP, Lund LG (1994): Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radical Biol Med*, 17: 65-75.
- Kratz SB (1991): Erythropoietin. *Blood*, 77: 419-434
- Maiese K, Li F, Chong ZZ (2005): New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA*, 293: 90-95.
- Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, Ratcliffe PJ (1997): Sites of erythropoietin production. *Kidney Int*, 51: 393-401.
- Mimic-Oka J, SIMIC T, DJUKANOVIC L (2002): Epoetin treatment improves red blood cell and plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients. *Ren Fail*, 24: 77-87.
- Nasr-Esfahani MH, Johnson MH (1992): How does transferrin overcome the *in vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo? *J Reprod Fertil*, 96(1): 41-48
- Sasaki, R, Masuda S, Nagao M (2000): Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64: 1775-1793.
- Schellender K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H, Schleger W (1990): *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplement with estrous cows serum. *Therio*, 33 (2): 477-485.
- Sung LY, Du F, Xu J, Chang W, Nedambale TL, Zhang J, Jiang S, Tian XC, Yang X (2004): The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Reprod Nut Dev*, 44, 551-564.
- Takagi Y, Mori K, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J (1992): Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *J Anim Sci*, 70: 1923-1927.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T (1992): Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 31: 28-33.
- Usberti M, Gerardi, GM, Micheli AM, Tira P, Bufano G, Gaggia P, Movilli E, Galli F (2002): Effects of erythropoietin and vitamin E modified membrane on plasma oxidative stress markers and anemia of hemodialyzed patients. *Am J Kidney Dis*, 40: 590-599.
- Wan PC, Hao Z.D, Zhou P, Wu Y, Yang L, Cui MS, Liu SR, Zeng SM (2008): Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Animal Reproduction Science*, in pres.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004): Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 35: 1732-1737.

# Tek hücre proteinlerinin hayvan besleme açısından önemi ve rasyonda kullanım olanakları

Betül Çelik<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Antalya

Geliş Tarihi / Received: 27.05.2019, Kabul tarihi / Accepted: 02.10.2019

**Özet:** Dünya nüfusunun hızlı artışına bağılı olarak geleneksel gıda ve yem katkı maddelerine alternatif besin kaynakları arama yolunda çalışmalar gündeme gelmektedir. Rasyonlarda kullanılan antibiyotiklerin, insan ve hayvan sağılığı üzerindeki olumsuz etkilerinin ortaya çıkmasıyla birlikte Avrupa Birliğı ülkeleri ve Türkiye’de yem katkı maddesi olarak kullanımı yasaklanmıştır. Protein bakımından zengin gıdalara olan talebin artması da alternatif protein kaynaklarının aranması gerektiğı sonucunu ortaya çıkarmıştır. Dünyadaki protein açığı için bazı mikroorganizmaların bol miktarda üretilip doğrudan doğruya besin maddesi olarak kullanılabilceğı düşünölmektedir. İnsan ve hayvan beslemede protein kaynağı olarak bakteri, maya, mantar ve su yosunlarından önemli oranda yararlanmaktadır. Ayrıca bir takım sanayi atıkları da besiyeri olarak kullanılmaktadır. Böylece tarımsal ve sanayi atıkları değerlendirilerek, ekonomiye kazandırılmakta, çevre kirliliğı önlenmekte ve yüksek kaliteli hayvansal ürünlere eşdeğer protein üretimi mümkün olmaktadır. Bu derlemenin amacı tek hücre proteininin hayvan besleme açısından önemi ve rasyonda kullanım olanaklarına yönelik yapılan çalışmalar hakkında bilgi vermektir.

**Anahtar kelimeler:** Hayvan besleme, protein kaynağı, tek hücre proteini.

## Importance of single cell proteins in terms of animal nutrition and possibilities of use in ration

**Abstract:** Due to the rapid increase in the world population, studies are underway to search for alternative food sources for traditional food and feed additives. Antibiotics used as growth factors, together with the emergence of adverse effects on human and animal health it is prohibited from use in the European Union and Turkey. Increased demand for protein-rich foods has also led to the conclusion that alternative sources of protein should be sought. It is thought that some microorganisms can be produced in abundance and can be used directly as nutrients in order to close the protein deficit in the world. Human and animal nutrition as a source of protein from bacteria, yeast, fungi and algae is to benefit significantly. In addition, a number of industrial wastes are also used as fattening. Thus, by evaluating agricultural and industrial wastes, it is gained to the economy, environmental pollution can be prevented and equivalent protein production to high quality animal products is possible. The aim of this review is to give information about the importance of single cell protein for animal feeding and the studies on the use of rationality in ration.

**Key words:** Animal nutrition, protein source, single cell protein.

## Giriş

Dünya nüfusunun sürekli artması, tarım ürünlerine olan talebi de aynı oranda artırmaktadır. Özellikle ekonomik gelir seviyesinin düşük olduğı ülkelerde insanların sağılıklı ve dengeli beslenmesi günümüzde giderek zorlaşmaktadır. Dünyadaki protein tüketimi açığı insanlığın önemli sorunlarından biri haline gelmiştir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından yapılan bir incelemede, protein kaynaklarının yetersiz olması ve nüfusun her geçen gün artması gibi nedenlerle, insanların fiyatı giderek artan geleneksel protein kaynakları (soya, balık unu vb.) yerine geçebilecek alternatif protein kaynaklarını aramaya başladığı vurgulanmıştır [1].

Geçmiş dönemlerde rasyon protein dengesinin sağlanmasında ekonomik ve kolay bulunabilir rendering ürünlerden (et-kemik unu, kan unu vb.) yararlanılırken günümüzde Avrupa Birliğı’nde ruminantların rasyonlarına uzun yıllardır dâhil edilmeyen hayvansal orijinli kaynaklar, ülkemizde de Haziran 2010 tarihli 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağılığı, Gıda ve Yem Kanunu sonrasında Aralık 2011’de yayınlanan “İnsan Tüketimi Amacıyla Kullanılmayan Hayvansal Yan Ürünler Yönetmeliğı” ile yasaklanmış ve 1 Ocak 2017 tarihi itibarıyla kanatlı beslemede kullanımı kısıtlanmaya başlamıştır [6]. Bu tarihten itibaren proteince zengin diğere kaynakların kullanımında artış söz konusu olmuştur. Bu kaynakların

başında yağlı tohum ve küspeleri gelmektedir [8]. Ancak Avrupa'da olduğu gibi Türkiye'de de üretimdeki eksiklikten dolayı genellikle ithal küspe kullanılıyor olması, karma yem sektörünü ithalata bağımlı hale getirmekte ve ekonomik dalgalanmalardan hızlı bir şekilde etkilenecek fiyatların artış göstermesine neden olmaktadır. Ayrıca sürekli aynı hammadde akışının sağlanamaması üretimde sıkıntılara yol açmaktadır [19, 20]. Bundan dolayı, küresel anlamda ve ülkemizde artan nüfusun hayvansal ürün ihtiyacını karşılamak için hayvan beslemede kullanılabilir ucuz ve güvenilir proteine zengin yem hammadde arayışı hız kazanmıştır.

Bir kaynağın yem hammadde olarak kullanılması için besin madde içeriğinin uygun olması, toksik etki barındırmaması, sindirilebilir olması ve hayvanlar tarafından sevilerek tüketilmesi gerekmektedir [21]. Bazı ülkelerde insanlar tarafından protein takviyesi olarak tüketilen mavi-yeşil alg, maya ve bakteri gibi tek hücre proteinlerinin (THP) hayvan beslemede de kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, THP'lerinin hayvan beslemede alternatif protein kaynağı olarak kullanılması, küresel gıda sorununun çözümüne katkı sağlayabilecek alternatif ve yenilikçi bir yol olabilir. Bu çalışmada THP'ler hakkında genel bilgiler derlenerek, hayvan beslemede kullanım olanakları tartışılmıştır.

### Tek hücre proteinleri

Tek hücre proteini değişik besiyerlerinde uygun koşullar altında çoğaltılan mikroorganizmaların oluşturduğu bir biyokütle ürünüdür. Tek hücre proteini alg, bakteri ya da fungal kaynaklı olabilir. Tek hücre proteini alglerin, mayaların, bakterilerin büyük çapta üretilmesi ve bunların kurutulmasıyla hazırlanır. Mikrobiyal protein uygun besi ortamı sağlandığında, bitkisel ve hayvansal proteinlere göre daha hızlı üretilmektedir. Ekonomik üretim için besi ortamı olarak ucuz, atık nitelikli yan ürünlerden olan selüloz ve hemiselüloz içeren karbonhidrat kaynakları kullanılmalıdır [14]. Tek hücre proteini, yüksek besin değeri nedeniyle özellikte tavukçulukta tercih edilen; soya ve balık unu yerine kullanılabilecek önemli bir alternatif kaynaktır. Tek hücre proteinleri ham protein bakımından oldukça iyi durumdadır. Başta B grubu olmak üzere vitamin içerikleri düşük olsa da, yüksek kaliteli yağ seviyeleri ve proteince zengin diğer kaynaklarda kısıtlı olarak bulunan lizin ve metiyonin bakımından üstün olmaları nedeniyle insan ve hayvanlar için alternatif besin kaynağı haline gelmiştir [4]. Bakteri, maya, mantar ve alglerin protein oranı sırasıyla %47-87, %45-50, %19- 57 ve %24-80 aralığında değişmektedir. Yüksek protein içeriği, yüksek

üreme hızı, tarımsal üretim alanlarına ihtiyaç duyulmaması, üretim koşullarının iklime bağlı olmaması, proteine dönüştürdükleri substratların çok çeşitli ve ucuz olması ile mikrobiyal proteinlerin dengeli bir aminoasit yapısına sahip olması tek hücre proteinin sürdürülebilir ve ucuz hammadde kaynağı olarak tercih edilme nedenleridir. Bununla birlikte, THP'lerin yanında toksik ürünlerinde sentezlenebilmesi, alışılmamış lezzet-koku vb. içermesi, nükleik asit ve protein oranlarından kaynaklanan sindirilme zorluğu nedeniyle oluşan hastalıklar, içerdiği yağ-selüloz gibi maddelerin oranları ve THP'lerin güvenilirliğini bu ürünlerin kullanımını sınırlayıcı faktörler olarak sayılabilir. Bu nedenle; *Methylophilus*, *Brevibacterium* gibi bakteri; *Spirulina*, *Chlorella* gibi alg; *Candida*, *Hanseluna*, *Pitchia*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* gibi maya; *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma* gibi fungus türlerinin THP üretimi için uygun olduğu; *A. fumigates*, *fusarium graminearum* gibi küflerin toksikolojik değerlendirme yapılmaksızın kullanılmasının uygun olmadığı bildirilmiştir. [7, 11, 18].

### Bakterilerden Elde Edilen Tek Hücre Proteini

Bakterileri THP üretimi için uygun kılan özellikler; hızlı üremesi ve kısa büyüme süresidir. 20 dakika ile 2 saat arasında hücre kütlelerini iki katına çıkarabilmektedirler. Ayrıca nişasta ve şekerler gibi karbonhidratlardan, metan ve petrol içeren gaz ve sıvı hidrokarbonlara kadar çeşitli hammaddeler üzerinde üretilebilir. Büyümeyi desteklemek ve olabilecek besin eksikliğini gidermek için bakteri kültür ortamına mineral besin takviyesi eklenmesi önerilmektedir [22]. Bazı bakteri türlerinden elde edilen protein miktarı bakterinin kuru maddesinin %70'ine kadar çıkabildiği ve biyolojik değeri zengin aminoasit bileşimlerine sahip oldukları ifade edilmiştir. Bazıları ise kükürtlü aminoasitlerle birlikte, diğer tüm esansiyel aminoasitleri içerir [5]. Bakteri kaynaklı THP'lerinin metiyonin içerikleri maya ve algere göre fazla, lizin miktarları ise biraz düşüktür. Protein kaynağı olarak kullanımlarında en önemli sakıncaları da mayalar gibi yüksek oranda nükleik asit içermeleridir. Yüksek kontaminasyon riski taşımaları nedeniyle insan beslenmesinde yaygın olarak kullanımı güç olmakla birlikte, hayvan yemlerinde kullanılması daha uygundur.

### Mayalardan Elde Edilen Tek Hücre Proteini

Mayalardan elde edilen proteinlerin daha büyük boyutlara sahip olması (hasat edilmesi daha kolay), düşük nükleik asit içeriği, yüksek lizin içeriği ve asidik pH'da büyüme kabiliyeti gibi avantajları vardır. Geleneksel olarak uzun süreden beri fermentasyon endüstrisinde kullanılması nedeniyle güvenilirliği

yüksektir. Dezavantajları ise düşük büyüme oranları, düşük protein içeriği (%45-65) ve bakterilerden daha düşük metiyonin içeriğine sahip olmalarıdır. Zor parçalanıran sert yapılı hücre duvarı; kırma, ezme, öğütme, yüksek basınç ve ultrasonik yöntemlerle parçalanabilir. Yüksek etkinlik sağlamak için önce mekanik parçalama daha sonra enzim ilavesi tercih edilmelidir. Mayaların üretiminde melas, patates nişastası, şeker, kuagüle olmuş sütün sıvı kısmı, meyve posaları, sülfite sarısı, bira ve kağıt endüstrisinin atık maddeleri, gazyağı, saf hidrokarbonlar, peynir altı suyu, odun şekeri mayası ve petrol ürünleri substrat olarak kullanılmıştır [22]. Buda endüstri atıklarının tekrar kullanıma kazandırılması veya gıdaya dönüştürülmesi açısından önem arz etmektedir. Alternatif protein kaynağı olarak "Tek Hücre Proteinlerinin" üretiminde nar kabuklarından yararlanılabilir ve bu şekilde elde edilen maya proteinleri, kanatlı hayvanların beslenmesinde soya küspesinin veya balık ununun yerine kullanılabilir. THP kaynağı olarak kullanılan mayalar: *S.cerevisiae*, *S. fragilis*, *S. pasteurianus*, *Torulopsis utilis*, *Brettanomyces* 'ler, *Candida tropicalis*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. maltosa* ve *C. intermedia*'dir. Ekonomik açıdan değerlendirildiğinde en iyi olan *Torula* mayası, *Torulopsis* veya *Candida utilis* olarak bilinen mayalardır.

### Alglerden Elde Edilen Tek Hücre Proteini

*Chlorella*, *Soenedesmus*, *Coelastrum* ve *Spirulina* gibi su yosunları biyokütle olarak kültüre alınıp kullanılmaktadır. En fazla üretilen iki alg türü; tek hücreli yeşil alg olan *Chlorella* ile son zamanlarda üretimi yaygınlaşan iplikli mavi - yeşil alg olan *Spirulina*'dır [23]. Antik çağlardan beri, *Spirulina*'nın Afrika'daki insanlar tarafından tarımı yapılmaktadır. Kurutulduktan sonra gıda maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Benzer şekilde, *Chlorella* ve *Soenedesmus*'dan elde edilen biyokütle de hasat edilerek gıda kaynağı olarak tüketilmektedir. Alglerin besin olarak kullanımının yaygın olması basit hasat yöntemleri, güneş enerjisinin etkin kullanımı, yüksek protein içeriği ve hızlı büyümesine dayanmaktadır [24].

Mikro-alglerin hayvan yemi olarak kullanımı daha yenidir. Çok sayıda besleme ve toksikolojik değerlendirme sonucu, alg biyokütlesinin değerli bir besin takviyesi olarak ya da geleneksel protein kaynakları (soya fasulyesi unu, balık unu, pirinç kepeği, vb.) yerine kullanılabilirliğini ortaya koymuştur [23]. Alglerin kümes hayvanlarının rasyonlarına dâhil edilmesi hayvan beslemede ticari kullanım için uygulanabilir niteliktedir. Su kültüründe mikro alglerin kullanılması gelişmekte olan bir alandır. Mevcut dünya alg üretiminin yaklaşık % 30'unun hayvan besleme

uygulamalarında kullanılmak üzere satıldığı tahmin edilmektedir [24].

Algler, insanlar tarafından sindirilmeyen selülozik hücre duvarlarına sahip olmanın dezavantajına sahiptir. Aynı zamanda ağır metal içerikleri göz ardı edilmemelidir. Yosunlar söz konusu olduğunda, teknik ve ekonomik nedenlerden dolayı, tek hücre proteini izole etmenin ve kullanmanın genel amacı olmadığı, ancak tüm alg biyokütlesini çoğaltmanın vurgulandığı belirtilmelidir.

### Mantarlardan Elde Edilen Tek Hücre Proteinleri

Birçok iplikçikli mantar türü glukoz ve nişastalı ortamlarda üretilerek, mikoprotein olarak adlandırılmıştır. Büyüme etkinliği ve güvenli gıda kaynağı olarak yaklaşık 3000 mantar türü araştırılmıştır [25]. *Aspergillus oryzae* ve *Rhizopus arrhizus* türleri toksik madde içermemeleri nedeniyle önem arz etmektedir. Saprotit özellikli mantarlar kompleks yapıdaki organik materyal üzerinde gelişerek onları basit yapıdaki ürünlere çevirebilirler. Böylece yüksek düzeyde fungus kaynaklı biyokütle üretilmektedir. Miselial verim organizmanın ve besi yerindeki materyalin özelliklerine göre değişmektedir. *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Fusarium graminearum* gibi bazı mantar suşları ürettikleri mikotoksinler nedeniyle insanlar için oldukça tehlikelidirler. Bu nedenle tek hücre proteini üretiminde kullanılacak mikroorganizmalar belirlenirken toksikolojik değerlendirmeler yapmak gerekmektedir. İplikçikli mantar hasat kolaylığı bakımından avantajlıdır, fakat daha düşük büyüme oranları, daha düşük protein içeriği bu ürünün kullanımını sınırlamaktadır. Lezzetsiz olması tüketimindeki bir diğer sakıncadır [17].

### THP'nin Hayvan Beslemede Kullanım Düzeyleri ve Etkileri

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, rasyonlara katılan maya preparatlarının rumen bakterilerinin sayısı ve aktivitelerini artırdığı, uçucu yağ asitlerinin düzeyini değiştirdiği, mikrobiyal protein sentezini ve yemlerin sindirimini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. McDonald ve ark. [12] THP'nin buzağılarda 80 kg/tona kadar, etlik piliçlerde ve yumurtacı tavuklarda ise sırasıyla 50 kg/ton ve 100 kg/tona kadar kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, *Aspergillus terreus*'tan elde edilen % 43,7 ham protein içeren THP'nin etlik piliçlerin besi performansları ve sağlıkları üzerinde olumsuz etkisi olmaksızın soya küspesinin %30'una kadar kullanılabilmesi tespit edilmiştir [16]. Seyidoğlu ve ark. [15] balık ve kanatlı yemleri üzerine yapılan çalışmalarda *S. platenis*'in bağışıklık sistemini güçlendirici özelliklerinin

bulduğunu, bununla beraber etki mekanizmasının tam olarak açıklanması ve açıklığa kavuşturulması için araştırmaların artması gerektiğini bildirmişlerdir. Najib ve ark. [13] rasyona farklı dozlarda (%5, 10 ve 15) % 51,88 ham protein içeren maya (*S. cerevisiae*) ilavesinin yumurtacı tavuklarda performans ile yumurta verimi ve kalitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar yumurta kalitesi bakımından gruplar arasında fark olmadığını belirtirken, rasyona %5 veya 10 oranında maya girebileceğini, ancak %15 maya ilavesinin yumurta üretimi, ağırlığı ve yemden yararlanmayı olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Chand ve ark. [3] etlik piliçlerin rasyonuna soya küspesi yerine farklı dozlarda (3,5-7,0-10,5 g/kg) maya (*S.cerevisiae*) ilavesinin performans üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, tüm muamele gruplarında canlı ağırlığın arttığını ve yemden yararlanmanın iyileştiğini bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda, THP'lerin yüksek nükleik asit içeriği nedeniyle yem katkı maddesi olarak kullanılmasının daha uygun olacağı bildirilmiştir. Bu gelişmeler ışığında THP'lerin içeriğindeki fazla nükleik asidin biyoteknolojik işlemlerle uzaklaştırılması sonucu, alternatif proteince zengin yem kaynağı olabileceği öngörülmekte, ayrıca toksik etki ya da sindirilebilirliği ile ilgili soruların cevap bulması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, THP, hayvansal ve bitkisel ürünlere göre çeşitli avantajlara sahiptir. Büyüme gereksiniminin mevsimsel ya da iklimsel bir bağımlılık göstermemesi nedeniyle proteinler yıl boyunca üretilebilirler. Gıda endüstrisi yan ürünleri ve diğer bazı atıklar kullanılarak yetiştiriciliği yapılabilir ve bu nedenle çevre dostudur. THP'lerin alternatif bir besin takviyesi olarak kullanılması, özellikle gelişmekte olan ülkelerde hızla büyüyen nüfusun gıda kıtlığı sorununu çözmeye yardımcı olabilir. Geleneksel protein kaynakları yetersiz ve maliyetleri de yüksektir. Alternatif olarak tek hücre proteinleri üzerine yoğun çalışmalar yapılmalı, toksik etkileri ve kullanılabilirlik miktarları belirlenmelidir.

## Kaynaklar

1. Anupama, Ravindra P (2000): Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances* 18:459-479.
2. Bhalla TC, Sharma NN, Sharma M (2007): Production of metabolites, industrial enzymes, amino acids, organic acids, antibiotics, vitamins and single cell proteins. *J. Environ* 6: 34-78.
3. Chand N, Khan I, Khan RU (2014): Replacement of soybean meal with yeast single cell protein in broiler ration: the effect on performance traits. *Pakistan J. Zool.* 46(6):1753-1758.
4. Çalışkaner Ş, Ceylan N, Konca Y, Demirel R, Çördük M, Milli Ü (1998): Etil alkol vasatında üretilen tek hücre proteini (Eprin)

- üzerinde biyolojik bir araştırma. *Türk Tarım ve Ormanlık Dergisi*, 22 (3): 299 - 304.
5. Çetin E (1983): Endüstriyel Mikrobiyoloji, İstanbul Tıp Fak. Vakfı- Bayda Yayını, 1. Baskı.
6. Çınar H, Aral S (2012): Avrupa Birliği uyum sürecinde Türkiye'de tavuk unu kullanımına getirilecek yasaklamanın broyler entegrasyonları üzerinde ekonomik etki analizi. *Vet. Hekim Der. Derg.* 83(1): 15-25.
7. Hamdy HS (2013): Production of mini-food by *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* using orange peels. *Romanian Biotechnological Letters.*18(1):7929-7946.
8. İlkdoğan U (2008): Dünya ve Avrupa Birliği'nde yağlı tohum ticaretinde gelişmeler Türkiye bağlamında değerlendirme. AB Uzmanlık Tezi. 182s.
9. Kamel BS (1979): Dates as a potential substrate for single cell protein production. *Enzyme and Microbial Technology*; 1(3): 180 - 182.
10. Khan M, Khan SS, Ahmed Z, Tanveer A (2009): Production of fungal single cell protein using *Rhizopus oligosporus* grown on fruit wastes. *Biolog. Forum*, 1: 26- 28.
11. Köksal O (1980): "THP'nin insan beslenmesinde kullanılması", *Gıda Dergisi*, Sayı:4,
12. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA (2010): "Animal nutrition", Seventh Ed. Edinburg. 692.
13. Najib H, Aleid SM, Al-Jasass FM, Hamad SH (2014): Feeding value of single cell protein, produced from dates, for laying hens. *Indian J. of Fundamental and Appl. Life Sci.* 4(1):30-36.
14. Reed G, Nagodawithana T (1995): *Biotechnology enzymes, biomass, food and feed.* Bibliographic Citation, 9: 168-215.
15. Seyidoğlu N, Galip N (2013): *Spirulina platensis*'in hayvanlarda büyüme performansı ve bağışıklık sistemi üzerine etkisi. *Anim. Health Prod. and Hyg.* 2(2) : 240 - 244.
16. Shahzad MA, Rajoka MI (2011): Single cell protein production from *aspergillus terreus* and its evaluation in broiler chick. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 1, No. 2, July.
17. Srividya AR, Vishnuvarthan VJ, Murugappan M, Prajakt Gopal Dahake (2013): Single cell protein - a review. *International Journal of Pharmaceutical Research Scholar.* 2 : 472 - 485.
18. Suman G, Nupur M, Anuradha S, Pradeep B (2015): Single cell protein production: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4(9): 251-262.
19. Şenköylü N (2014): Dünyada ve Türkiye'de karma yem ve kanatlı sektörlerine genel bakış. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-2. 1053-1068 s. 12-16 Ocak. Ankara.
20. Van der Poel AFB, Van Krimpenb M, Veldkamp T, Kwakkel RP (2013): Unconventional protein sources for poultry feeding: opportunities and threats. *Proceedings 19th Symposium on Poultry Nutrition, Potsdam, Germany.* August. 26(29):14-24
21. Vasey RB, Powell KA (1984): Single cell protein. *Biotechnology and Genetic Engineering.* 10(2): 285-311.
22. Kurbanoğlu EB (2001): Production of single cell protein from ramhorn hydrolysate. *Turk J. Biol.* 25: 371 - 377.
23. Becker EW (2007): Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25: 207 - 210.
24. Rasoul-Amini S, Ghasemi Y, Morowvat MH, Mohagheghzadeh A (2009): PCR amplification of 18S.
25. Demirel R, Demirel DŞ (2018): İğdir Üni. Fen Bilimleri Enst. Der./ İğdir Univ. J. Inst. Sci. & Tech. 8(3): 327-336, 2018.

# Sıcak stresi ve termotolerans: Sığırlarda moleküler alışmalar

Özge şebnem ıldır<sup>1</sup> , Özge Özmen<sup>2</sup> 

<sup>1,2</sup> Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi, Genetik Anabilim Dalı, Altındağ, Ankara

**Geliş Tarihi** / Received: 21.08.2019, **Kabul tarihi** / Accepted: 28.11.2019

**Özet:** Küresel iklim değişikliği riski insan nüfusu, evre kirliliği ve atmosferdeki sera gazları oranlarında görölen artış nedeniyle gün geçtikçe artmaktadır. Yüzey sıcaklığında 2100'lerin sonunda yaklaşık 1,8 ile 4,8°C aralığında artış beklenmektedir. İliman iklimlerde yaşamakta olan sığırlar gelecekte artan sıcaklıklarla ve dolayısıyla da sıcak stresi ile karşı karşıya kalacaklardır. Sıcak etkisi ile ortaya çıkan stres yanıtları aynı zamanda verim kaybıyla sonuçlanmaktadır. Yüksek sıcaklık ve nem seviyeleri verim özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Tüm bu gerekçeler sıcak stresi ve termotolerans ile ilişkili moleküler çalışmaların gerekliliğini gözler önüne sermektedir. Bilim insanları genom boyu ilişkilendirme alışması (GWAS), gen ifadesi, polimorfizm ve mikroRNA çalışmaları gibi birçok farklı yaklaşım ile sıcak stresini ve termotoleransın moleküler mekanizmalarını araştırmışlardır. Bu derlemede sıcak stresi ve zararlı etkileri tanımlanmış, sığırlar üzerinde yapılmış moleküler çalışmalar ise tek bir yayın altında toplanmaya çalışılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Sıcak stresi, GWAS, polimorfizm, gen ifadesi, miRNA

## Heat stress and thermotolerance: Molecular studies in cattle

**Abstract:** The risk of global climate change has been increasing from day to day due to, the increase in the human population, environmental pollution, and greenhouse gases in the atmosphere. It is estimated that the surface temperature will increase by approximately 1.8 to 4.8 °C at the end of the 2100s. Cattle breeds, which are living in temperate climates will face off increasing temperatures and heat stress in the future. The stress response resulting from the high-temperature effect also results in loss of yield in cattle. Additionally, high temperature and humidity levels cause negative effects on productivity. All these reasons, reveal the necessity of molecular studies related to heat stress and thermotolerance. Scientists have been investigating the molecular mechanisms of heat stress and thermotolerance with many different approaches such as genome-wide association study (GWAS), gene expression, polymorphism, and microRNA studies. In this review, heat stress and its harmful effects are described and molecular studies, which are applied to cattle have been explained.

**Key words:** Heat stress, GWAS, polymorphism, gene expression, miRNA

## Giriş

İnsan popölasyonundaki artış, atıklar ve atmosferdeki CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O gibi sera gazlarının oranlarındaki yükseliş küresel iklim değişikliği için risk teşkil etmektedir [37, 64]. Yüzey sıcaklığının 2100'lerin sonunda 1,8-4,8°C aralığında artması beklenmektedir [58, 64]. 2018 yılında yayınlanan IPCC (Intergovernmental panel on climate change/Hükümetlerarası iklim değişikliği paneli) özel raporuna göre, ısı artışının devam etmesi halinde, 2030 ve 2052 yılları arasında küresel ısınmadaki artışın 1,5°C'ye ulaşacağı beklenmektedir [33].

Küresel ısınma nedeniyle birçok bölgede aşırı sıcaklık artışının frekansı ve yoğunluğunda; yağış sıklığı ve miktarında ya da kuraklık olaylarının görölme sıklığında artış beklenmektedir [17, 33, 37, 51, 52, 64]. Karada artan sıcakların GMST (Global Mean Surface Temperature/anlamli küresel yüzey sıcaklı-

ęı) değerlerinden daha yüksek düzeyde olacağı ve ılıman iklim kuşağındaki aşırı sıcak günlerde küresel ısınmadaki artışın 1,5°C olması durumunda, 3°C'lik artış görölmesi öngörölmektedir [33]. Geimleri tarım ve kıyı alanlarındaki kaynaklara bağlı olan popölasyonlar ve bazı bölgelerdeki yerli halklar küresel ısınmanın doğrudan etkilerinin yanı sıra, dolaylı etkilerine de yüksek oranda maruz kalacaklardır [32, 33]. Buzul ekosistemleri, kurak bölgeler, küçük adalardaki gelişmekte olan ölkeler ve az gelişmiş ölkeler en çok risk altında olan bölgelerdir [17, 32, 33]. Sahra altı Afrika, Güneydoğu Asya, Orta Amerika ve Güney Amerika'da mısır, pirinç, buğday ve diğer tahılların veriminde ve pirinç ve buğdayın CO<sub>2</sub>'e bağlı beslenme kalitesinde düşüş görölmesi beklenmektedir [33, 55]. Yem kalitesi ve miktarındaki düşüşler, hastalıkların yayılması ve kullanılabilir su kaynaklarında öngörölen kayıplar artan sıcaklığın hayvancılıktaki dolaylı etkileri olarak sayılabilmektedir [2, 33, 51, 63].

**Yazışma adresi / Correspondence:** Özge şebnem ıldır, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi, Genetik AD. Ankara  
E-posta: oscildir@ankara.edu.tr

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0001-7070-4212 • <sup>2</sup>0000-0002-8577-7323

Sıcak stresi, dünya genelinde hayvanlarda verim kaybına neden olan en önemli sorunlardan biridir. Her ne kadar hayvanlar zorlu iklim koşullarına adapte olabilseler de; hayatta kalmalarını sağlayan fizyolojik stres yanıtları verim kaybıyla sonuçlanmaktadır. Yüksek sıcaklık ve nem oranları büyüme oranı; süt verimi; süt yağ, protein ve laktoz oranları; yemden yararlanma oranı; canlı ağırlık artışı ve fertilitede düşüşe neden olmaktadır [11, 50].

Küresel ısınmanın Türkiye için olası etkileri düşünüldüğünde yağışlarda azalma, sıcaklıklarda artma, seller ve kuraklık olayları gibi alışılmışın dışında doğa olaylarında artış gözlenmesi beklenmektedir [37]. Küçük ve orta ölçekli işletmeler ile meraya dayalı hayvancılık ile geçimlerini sağlayan gelişmekte olan ülkeler için çevresel stres faktörlerine daha dirençli veya adaptasyon yeteneği güçlü genotiplerin geliştirilmesi oldukça önemlidir [37, 58].

Bu derlemede sıcak stresi ve zararlı etkileri tanımlanmış, sığırlar üzerinde yapılmış moleküler çalışmalar tek bir yayın altında toplanmaya çalışılmıştır.

### Sıcak Stresi, Hipertermi ve Fizyolojik Yanıtlar

M.C Appleby ve B.O. Hughes refahı "Hayvanların fizyolojik, çevresel, besinsel, davranışsal ve sosyal ihtiyaçlarının karşılandığı iyi olma hali" olarak tanımlamışlardır. Hayvanlar refah sınırları dışına çıktığında ise stres yanıtları görülmeye başlamaktadır [29]. Ilıman iklimlerde yaşayan sığırlar gelecekte artan sıcaklıklar nedeniyle sıcak stresi ile karşı karşıya kalacaklardır. Şekil 1 çiftlik hayvanlarının sıcak stresine adaptasyon mekanizmalarını göstermektedir [4].

Vücut sıcaklığındaki her 1 °C'lik artış metabolizma hızında %10 artışa neden olmaktadır. Bu nedenle öncelikle homeostazis bozulur, fizyolojiyi dengelemek amacıyla sıcak stresi semptomları görülmeye başlar, ardından hipertermi gerçekleşir. Sıcak stresinden hipertermiye doğru gidildikçe sırasıyla deride vazodilatasyon, dehidrasyon, hipovolemi, hipotansiyon ve serebral iskemi semptomları görülür. Hipertermide artan metabolizma ve dokularda oksijen kullanımındaki artış nedeniyle hücrelerde hipoksi meydana gelir ve bunun sonucunda organ yetmezlikleri görülmeye başlar. Hiperterminin son aşamasında ise enzimler denatüre olur ve hipertermi ölümle sonuçlanır [16, 59].

Yüksek sıcaklık ve nem oranları hücresel ve sistemik yanıtları da beraberinde getirmektedir. Akut stres anında sempatik sinir sistemi uyarımının bir

sonucu olarak kalp atımında ve kandaki epinefrin seviyesinde kısa süreli bir artış meydana gelir. Kısa vadede glukokortikoid seviyelerinde artış görülür; sıcak stresinin uzun süre devam etmesi halinde ise glukokortikoid seviyeleri tekrar düşmeye başlar [16, 29]. Kronik stres durumunda ise CRF (kortikotropin salgılatıcı faktör) ACTH (adrenokortikotropik hormon) sentezini uyarır; ACTH salınımını ise kortikosteroidlerin salınımına neden olur [29]. Hipertermi nedeniyle tiroid fonksiyonları baskılanır ve metabolik ısı üretimi azaltılmaya çalışılır [16].

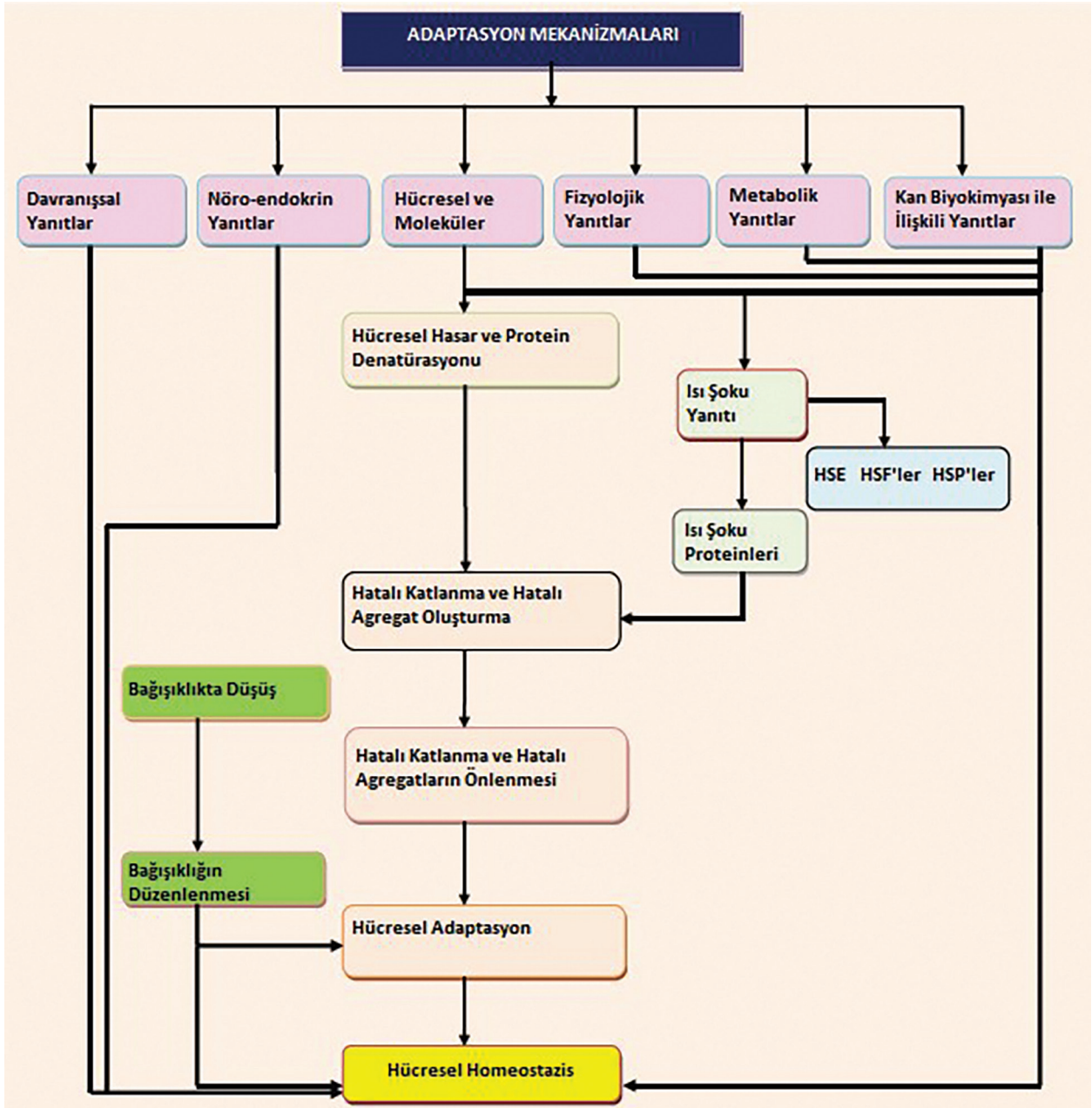
Sıcak stresi söz konusu olduğunda prolaktin seviyesi ve plazma insülin konsantrasyonlarında artış görülmektedir. Strese karşı ortaya çıkan fizyolojik yanıtlar nedeniyle solunum hızı, rektal sıcaklık, plazma kortizol, tiroksin ve triiodotreonin seviyeleri çevresel stresin tespitinde ideal belirteçler olarak önerilmektedir [64].

Termal çevrede homeostazis termoregülasyon ile sağlanmaktadır. Isı değişimi ısı üretimine, evaporatif ve evaporatif olmayan ısı kaybına bağlıdır. Evaporatif olmayan ısı kaybı epidermal damarlaşmadaki değişikliklerle; evaporatif ısı kaybı ise polipne ve terleme ile sağlanmaktadır [59]. Epidermis yüzeyi; ter bezlerinin yoğunluğu ve fonksiyonları; kıl yoğunluğu, inceliği, uzunluğu ve rengi; don rengi; epidermal damarlaşmanın regülasyonu gibi faktörler evaporatif ısı kaybını etkileyen en önemli faktörlerdir [16].

### Sıcak Stresinin Verim Özellikleri Üzerindeki Etkileri

Sıcak stresinin sığırlar üzerinde birçok olumsuz etkisi bulunmaktadır. Şekil 2 artan çevresel sıcaklığın sığırlar üstündeki yaygın potansiyel etkilerini göstermektedir [56]. Yüksek sıcaklıklar yem alımı ve ruminasyonu baskılamakta; hızlı soluk alıp verme nedeniyle solunum alkalozu meydana gelmektedir. Oksidatif hasarda artış görülmekte; bağışıklık sistemi olumsuz etkilenmektedir. Üreme performansı ve embriyo gelişiminin de artan çevresel sıcaklıklardan olumsuz etkilendiği bildirilmektedir [19]. Sıcak stresindeki ineklerde çiftleşme ve doğum oranları ile süt veriminde düşüş tespit edilmiştir [74]. Yem alımı, büyüme oranı, döl verimi azalmakta; kızgınlık dönemi sıcak stresine duyarlı ineklerde daha zor tespit edilmektedir. Oosit kalitesi, sperm kalitesi ve embriyo gelişimi artan sıcaklıklardan olumsuz etkilenmekte; bu da fertilitede düşüş ile sonuçlanmaktadır [14, 19, 34].





Şekil 1. Isı şoku proteinlerinin üretiminde ortaya çıkan hücresel ve moleküler mekanizmalar [3].

Sıcak stresi ineklerde süt verimi, laktasyon periyodu, meme sağlığı, somatik hücre skoru ve süt kompozisyonunu etkilemektedir. Hammami ve ark. [26] Holştayn sığır ırkında sıcak stresiyle ilişkili olarak, süt verimi; süt yağ ve protein oranları ile yağ asitlerinin çoğunda düşüş gözlemlenmiştir. Somatik hücre skoru, C18:0, C18:1 *cis*-9, doymamış yağ asitleri, tekli doymamış yağ asitleri, çoklu doymamış yağ asitleri ve uzun zincirli yağ asitlerinin seviyelerinde ise artış olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda süt kompozisyonundaki değişimlerin sıcak stresi

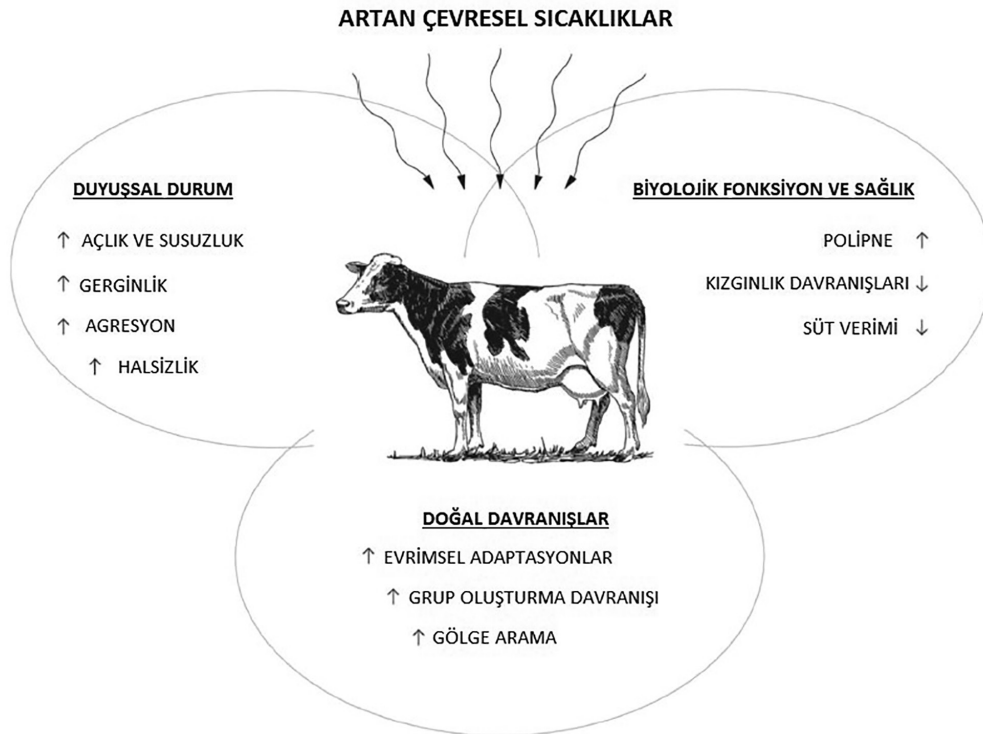
için belirteç olarak kullanılabilmesi önerilmiştir [26]. Das ve ark. [19]'nın yayınları süt sentezi, süt yağı, yağsız kuru madde miktarı ve protein oranlarındaki değişimler bakımından Hammami ve ark. [26]'nın yayınlarını destekler niteliktedir [19, 26]. Süt verimi arttıkça sıcak stresiyle duyarlılığın arttığı belirtilmiş, daha yüksek verim alınabilmesi için barınak, beslenme, elektrolit dengesi gibi çevresel koşulların uygun hale getirilmesi ve termotolerans ile ilişkilendirilmiş genler aracılığıyla belirteç yardımcı seleksiyona gidilmesi önerilmektedir [19]. Pragna ve ark. [57] aynı

verileri desteklemekle birlikte sütteki laktoz oranında düşüş ve mastitise yatkınlık görüldüğünü bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra dünya genelinde süt verimi kayıplarının nedenlerinin net bir şekilde tanımlanabilmesi amacıyla daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiğini vurgulamışlardır [57]. Thorat ve ark. [71] ise Deoni sığırlarında yaptıkları çalışmada sıcak stresi ile laktasyon periyodu arasında negatif korelasyon görüldüğünü ifade etmişlerdir. Sıcaklık-nem indeksi çalışma süresince stres yaratmayacak düzeylerde ölçülmüş olsa da, sıcaklık-nem indeksi düştükçe aylık laktasyon süt veriminin arttığı belirtilmiş ve süt veriminde düşüşün önüne geçilebilmesi için genomik seleksiyon ve çiftlik yönetiminin önemi üzerinde durulmuştur [71].

Uslucan [73] süt verimi ve fertilitiyi etkileyen çevresel faktörler üzerine çalışmıştır. Çalışma sonuçları sığırlarda sıcak ve soğuk mevsimlerde birçok davranış değişikliği olduğunu göstermiştir. Süt verimi; yem alımı; ayakta durma, dinlenme, hareket etme ve kızgınlık davranışları mevsimler arasında farklılık göstermiştir [73]. Polsky ve von Keyserlingk [56] ineklerde ayakta durma süresi ile topallık ve ağrı arasında ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Sıcak stresi dolaylı olarak ayak hastalıklarına predispozisyona da neden olabilmektedir [56].

Trifković ve ark. [72] farklı mevsimlerin Holştayn ırkında kolostrum ve buzağların doğum sonrası adaptasyon kapasitelerine etkileri üstüne çalışmışlardır. Çalışma sonuçları sıcak mevsimlerde kolostrumun hem kompozisyon hem de kalitesinin olumsuz etkilendiğini; sıcak mevsimlerde doğan buzağların ise fizyolojik, metabolik ve endokrin performanslarının muhtemelen sıcak stresi nedeniyle baskılandığını göstermiştir [72]. Buna karşın, Ahmed ve ark. [3] fetal hayatta sıcak stresine maruz kalan buzağların hayatlarının ilerleyen dönemlerinde daha yüksek termotoleransları olduğunu iddia etmektedir.

Sığırları ve verim özelliklerini sıcak stresinin etkilerinden korumak için çevresel faktörlerin hayvanlar için en uygun koşullara getirilmesi oldukça önemlidir. Barınakların fiziksel koşulları geliştirilmeli, çevresel koşullara en uygun ırklar yetiştirilmeli ve ırklar sert iklim koşullarına dayanıklı hale getirilmelidir. Hayvan açısından çevre şartlarına uygun genotiplerin geliştirilmesi en önemli faktörlerden birisidir. Sıcak stresiyle başa çıkabilmek için Renaudeau ve ark. [58] üç temel strateji önermektedir. Yem alımı artırılmalı veya metabolik ısı üretimi azaltılmalı; ısı kaybı kapasiteleri geliştirilmeli; termotoleransı yüksek genotipler elde edilebilmesi amacıyla genetik seleksiyona gidilmelidir [58].



**Şekil 2.** Çevresel sıcak stresin ani etkileri ve hayvan refahının üç temel bileşeni arasındaki ilişki: (1) hayvanın biyolojik fonksiyonları ve sağlığı, (2) hayvanın duyuşsal durum ve deneyimleri, (3) hayvanın mevcut ısı yönetim stratejileri altındaki doğal davranışları [47].

### Sıcak Stresi ve Termoregülasyon için Yapılmış Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları

Hastalık ve çeşitli karakterlere ilişkin varyasyonlar genom boyu ilişkilendirme (GWAS) çalışmaları ile tanımlanabilmektedir. Belirli bir karaktere sahip binlerce genom genellikle mikrodizin analizine tabi tutulur, elde edilen veriler ilgilenilen karaktere sahip olmayan bireylerin genomları ile kıyaslanarak karakterin oluşumuna etki eden aday genler ve varyantlar tanımlanmaya çalışılır [12]. Bu bölümde sunulan çalışmalarda mikrodizin analizi kullanılmıştır.

Sığırlarda ilk genom boyu ilişkilendirme çalışması Hayes ve ark. [27] tarafından Holştayn ve Jersey ırklarında yapılmıştır. *FGF4* geninin meme epitel hücrelerinin apoptozisinde regülatör görevi gördüğü, insan testisinde eşey hücrelerini artıran sıcaklıklardan koruduğu ifade edilmiş bu nedenle de sıcak stresi ile ilişkilendirilen SNP'lerden (tekli nükleotit polimorfizmi) birinin pozisyonu gereği *FGF4* geninde bulunduğu ve *FGF4* geninin termotoleransa ilişkin önemli bir aday gen olduğu ileri sürülmüştür. [27]. Howard ve ark. [30] Angus, Simental ve Piedmont ırkı sığırlar ve bunların melezleri ile yaptıkları çalışmada kış mevsimi için, *CCNH*, *TNRC6A*, *FGD3*, *G2E3*, *RASA1*, *CSTB*, *DAPK1*, *CACNG3*, *CLCN4*, *PRKCB*, *TRPC5*, *COX4I1* ve *COX7C* genlerinin; yaz mevsimi için ise; *STAC*, *WRNIP1*, *MLH1*, *RIPK1*, *SMC6*, *GEN1*, *SERPINB9*, *KCNS3*, *SLC22A23* ve *TRPC4* genlerinin bulunduğu bölgeleri termoregülasyon ve sıcak stresi ile ilişkili bulmuşlardır. Yapılan fonksiyonel anotasyonlar ve yolak analizleri sonucunda bu bölgelerdeki genlerin hücrel stres, sıcak stresi ve apoptozis yolları ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [30]. Dikmen ve ark. [22] Holştayn ırkında yaptıkları çalışmada *GOT1*, *KBTBD2*, *RFWD12*, *LSM5*, *SCARNA3*, *SNORA19* ve *U1* genlerinin bulunduğu bölgelerin sıcak stresi altındaki süt ineklerinde kantitatif özellik lokusları olduklarını ve bu bölgelerdeki SNP'lerin termotolerans açısından genetik seleksiyonda kullanılabileceğini ve sıcak stresine verilen yanıtın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında etkili olabileceğini ifade etmişlerdir [22]. Dikmen ve ark. [23]'ün Holştayn ırkındaki bir diğer çalışmalarında *ATP1A1*, *HSP70A*, *PGR*, *CAST*, *SERPINE2* ve *ARL6IP1* genlerinin termoregülasyonla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu genlerdeki mutasyonların sıcak stresinde verilen fizyolojik yanıtlara etkilerinin araştırılması için yeni çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir. Hayes ve ark. [27]'nin *FGF4* geni ile ilişkilendirdikleri SNP'in apokrin ter bezlerindeki miyoepitelial hücre hatları arasındaki bağlantıları sağlamakla görevli *SHANK2* geninde olduğu ifade edilmiştir [23].

Sıcak iklimlere toleransı yüksek olduğu bilinen Doğu Afrika Kısa Boynuzlu Zebularında (Afrika gerçek sığırı ve Asya zebu melezi) yapılan araştırma sonuçları diğer sığır ırkları ile yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında Afrika Kısa Boynuzlu Zebularının *HSPB9*, *DNAJC7*, *DNAJC8*, *DNAJC14*, *DNAJC18*, *PPP1R10*, *PPP1R8*, *KRT* ve *PMEL* genleri yönünden pozitif seleksiyona uğramış oldukları belirlenmiştir. Bu genlerin çoğunun sığağa karşı hücrelerin korunmasını sağlayan ısı şoku proteinleri (HSP) ailesinde yer aldıkları, bir kısmının ise yine sığağa karşı duyarlılık ve direnci doğrudan etkileyen faktörlerden don rengi ve kıl yapısıyla ilişkili oldukları bildirilmiştir [6].

Son olarak, Macciotta ve ark. (2017)'nin İtalyan Holştaynları ile yaptıkları çalışmada süt verimi; süt yağ ve protein oranlarındaki değişiklikler stres yanıtından etkilenen faktörler olarak kabul edilerek temel bileşenler analizi yapılmıştır. *BTRC*, *FGF8*, *MGEA5*, *KCNIP2* ve *HPS6* genlerinin bulunduğu bölge ile *CCSER1* geninin bulunduğu bölge süt verimi ile ilişkili bulunmuştur. *DGAT1*, *HSF1*, *ARHGAP39* ve *RPL8* genleri ile; *MAPK15* ve *ZNF34* genlerinin bulunduğu bölgeler süt yağı oranı ile ilişkilendirilmiştir. Son olarak süt protein oranı ile ilişkili bölgenin *MCAT*, *SAMM50* ve *TSPO* genlerinin bulunduğu bölge olduğu ifade edilmiştir. Artan sıcaklık-nem indeksi verileri ve analiz edilen özelliklerdeki değişimler göz önünde bulundurulduğunda, bu özelliklerin yetiştiricilikte termotolerans ölçütü olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [46].

### Polimorfizm Çalışmaları

Birçok karakterin ve gen ailesinin sıcak stresi ve termotolerans ile ilişkili olabileceğine ikinci bölümde değinilmişti. Dördüncü bölümde görülen GWAS çalışmalarının sonucunda ise aday genler ve termotolerans etkilediği düşünülen aday SNP'ler belirlenmişti. Sonraki aşamada yapılan çalışmaların büyük bir kısmını sıcak stresi ile ilişkili olduğu düşünülen karakterlere ilişkin aday genlerde yapılmış olan polimorfizm çalışmaları oluşturmaktadır. Bu karakterlerden bazıları ve yapılan polimorfizm çalışmaları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. "*SLICK hair*" fenotipi: Kısa ve ince kıl yapısıyla karakterize otozomal dominant kalıtım gösteren bir fenotiptir. Bu fenotipe sahip bireylerin yüksek sıcaklıklarda diğer bireylere göre daha dayanıklı oldukları belirtilmektedir [53]. *PRLR* geninde tespit edilen 20 baz çiftlik bir delesyon ve iki farklı anlamsız mutasyon bu fenotipe neden olmaktadır [54].

2. *ATPaz genleri*: Sıcak stresi oksidatif strese neden olarak plazma  $K^+$  ve  $Na^+$  seviyelerinde deği-

şimlere neden olmaktadır. ATPaz proteininin sentezinde görevli genler  $\text{Na}^+$  iyonlarının hücre zarından transportu ile ilişkilidir. Liu ve ark. [44] Holştaynlarda *ATP1A1* geninde 14'üncü ekzonda polimorfizm saptamış; bazı genotiplere sahip bireylerin sıcak stresine diğer bireylerden daha dirençli olduklarını belirtmişlerdir [44]. Aynı araştırmacılar 2011 yılında aynı gende yeni bir SNP bulmuş; tespit ettikleri genotiplerden birinin diğer genotiplere göre sıcak stresi karşısında daha dirençli olduklarını önermişlerdir [45]. Kashyap ve ark. [35] Tharparkar ve Vrindavani ırklarında *ATP1A1* geninde yaptıkları çalışmada 17'nci ekzonda bir varyant tespit etmişlerdir. Bu varyantın bulunduğu genotipteki bireylerin diğer genotipteki bireylere göre solunum hızı ve rektal sıcaklık açısından daha avantajlı durumda olduklarını belirtmişlerdir [35].

Wang ve ark. [77] Çin Holştaynlarda *ATP1B2* geninde polimorfizm çalışması yapmışlar; 2'nci ve 4'üncü intronlarda sırasıyla iki adet tekli nükleotit varyantı bulmuşlardır. Araştırmacılar 4'üncü intronda buldukları varyantı termotolerans ile ilişkilendirmişlerdir [77].

3. **PPAR $\alpha$  geni:** PPAR $\alpha$  adaptif termogeneze, metabolizma ve hücre farklılaşması gibi biyolojik yanıtlarda görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. Fang ve ark. [24] Çin Holştaynlarda *PPAR $\alpha$*  geninde polimorfizm taramışlardır. Çalışmada sekiz farklı haplotip tespit edilmiş; bu haplotiplerden birine sahip bireylerin sıcak stresine karşı diğer haplotiplere sahip bireylerden daha dirençli oldukları önerilmiştir [24].

4. **HSP'ler ve HSP ilişkili proteinler:** Isı şoku proteinleri hücreleri toksik etkilerden ve sıcak stresine bağlı meydana gelen termal hasarlardan korumaktadırlar. Bu proteinler moleküler ağırlıklarına göre adlandırılmışlardır. HSP27 ailesi mikrofilamentlerin stabilizasyonu ve apoptozisin önlenmesinde görev almaktadır. HSP60 ailesi proteinlerin yeniden katlanmasından sorumludur; denatüre edilmiş proteinlerin agregat oluşturmasını önler ve apoptozis öncesinde görev alır. HSP70 ailesi moleküler şaperonlarda ve apoptozisin önlenmesinde görevlidir. HSP90 ailesi steroid hormon reseptörlerinin regülasyonunda, protein katlanmasında, hücre sinyalinde ve tümör baskılanmasında görevlidir. HSP110/104 ailesi protein katlanmasında görev yapar. Sıcak stresine karşı en duyarlı HSP'lerin HSP70 protein ailesi olduğu bildirilmiştir [13, 68].

1990 yılında sıcak stresi altındaki sığır lökositlerinde HSP'lerde artış görüldüğü; 1997 yılında ise sıcak stresinde HSP'lerde artış görülürken diğer proteinlerin ifadesinde düşüş olduğu gösterilmiştir

[15]. Favatier ve ark. [25] HSP70 ailesindeki genlerin oksidatif hasar, iskemik, yangı, UV radyasyonu ve yaşlanmaya karşı koruyucu olduklarını belirtmiş; balık ve böceklerde termotolerans ile HSP70 ifadelerinin arasında pozitif korelasyon görüldüğünü bildirmiştir [25].

HSP70 proteinlerinden sorumlu *HSPA8*, *HSPA6*, *HSPA1A*, *HSPA1L*, *HSPA2* genleri [4] ile ilişkili olarak yapılmış çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Adamowicz ve ark. [1] *HSP70-1* geninin 3' UTR (Translasyonu yapılmayan bölge) bölgesinde yeni bir SNP tanımlamışlardır. Cai ve ark. [10] aynı yıl sıcak stresine maruz kalan süt ineklerinin lenfositlerinde *HSP70* polimorfizminin *HSF1*, *Bcl2* ve *Bax-a* gen ifadeleri ile arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Sonuçlar bu bölgedeki polimorfizmlerin *HSP70*, *HSF1*, *Bcl2* ve *Bax-a* mRNA'larının ifadelerinde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir [10]. Rosenkrans ve ark. (2010) *HSP70* geninin promotor bölgesinde polimorfizm çalışması yapmış ve tespit edilen polimorfizmlerin Brahman ırkında doğum ile ilişkisini araştırmışlardır. Tespit edilen 11 mutasyondan 3'ünün doğum ile ilişkili olduğu önerilmiştir [60]. Li ve ark. [43] *HSP70A1A* polimorfizmlerini ve Çin Holştaynlarda bu genin doku spesifik ifadelerini incelemişlerdir. Üç genotip termotolerans ile ilişkili bulunmuştur. Gen ifadelerine bakıldığında ise en yüksek ifade görülen dokudan en düşük ifade görülen dokuya doğru organlar kalp, karaciğer, böbrek, kas ve dalak olarak sıralanmıştır [43]. Maróti-Agóts ve ark. [48] sıcak stresine adapte olduğu bilinen yerli bir ırk olan Hungarian Grey ile soğuk iklime adapte olduğu bilinen Norwegian Red ve Finnish Ayrshire melezlerini karşılaştırmışlardır. Hungarian Grey ırkı bireylerin hiçbirinde *HSP70.2* geni promotor bölgesinde tanımlanmış AP2 mutanı homozigot olarak bulunmamasına rağmen, melez bireylerde mutant ve yabancı tip alleller eşit oranda bulunmuştur [48]. Basiricò ve ark. [7] Holştaynlarda *HSP70.1* geni polimorfizmi ve hücresel termotolerans arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Polimorfizmler tespit edildikten sonra seçilen genotiplerdeki bireylere ait örnekler ile hücre kültüründe çalışılmıştır. Sıcağa maruz bırakılan hücrelerin hayatta kalma kapasiteleri, gen ve protein ifadeleri incelenmiş; iki genotipin diğer genotiplere göre sıcak stresine daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir [7]. Deb ve ark. [20] Frieswal (Holştayn ve Sahival ırkı melez) ırkı sığırlarda *HSP70.1* geni AP2 kutusunda polimorfizm taramışlardır. Sonuçlar AP2 kutusuna ait genotipleri heterozigot olarak taşıyan bireylerin mutant ve yabancı tip genotip taşıyan bireylere göre daha yüksek süt verimi, laktasyon piki, protein ve yağ oranlarına sahip olduklarını göster-

miştir [20]. Xiong ve ark. [78] Çin Holştaynlarında *HSP70A1A* genindeki haplotiplerin termotolerans ile ilişkilerini incelemişlerdir. Sekiz yeni mutasyonun tespit edildiği çalışmada üç farklı haplotip tanımlanmıştır. Farklı haplotiplerde genin ifadesinde değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir [78]. Kerekoppa ve ark. [36] Holştayn melezleri ve Deoni ırklarında *HSPA1A* geninin karakterizasyonu için çalışmışlardır. Çalışma sonucunda 10 farklı polimorfizm tespit edilmiştir. g.312-C>G ve g. 1098-A>G polimorfizmleri her iki ırkta ortak olarak bulunmuş; g.456-G>A, g.972-A>G, g.1788-G>A, g.1766-C>T ve g.2033-G>C polimorfizmleri yalnızca Deoni ırkında tespit edilmiş; g.480-A>G, g.574\_575insC, ve g.624\_625insC polimorfizmleri ise yalnızca Holştayn melezlerinde tespit edilmiştir. Tespit edilen 10 nükleotid polimorfizminden üçü amino asit değişikliğine; insersiyonlar ise amino asit değişikliği ile birlikte çerçeve kayması mutasyonuna neden olmaktadır [36]. Bhat ve ark. [9] Tharparkar ırkı sığırlarda *HSP70* polimorfizminin termotolerans üstündeki etkilerini araştırmışlardır. Aspartattan tirozine amino asit dönüşümüne neden olan g.149-G>T mutasyonunu homozigot olarak barındıran bireylerin sıcak stresine toleransının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [9]. Bharati ve ark. [8] kronik sıcak stresi altındaki Tharparkar ırkı sığırlarda *HSP70* geni ifadesini incelemişlerdir. Sonuçlar *HSP70* mRNA ifadesinin sıcaklık-zaman durumuna göre farklılık gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Sıcağa maruziyetten on gün sonra ifadenin daha yüksek olduğu belirtilmiştir [8]. Maibam ve ark. [47] Tharparkar ve Karan Fries (Tharparkar ve Holştayn melezi) ırklarında *HSP70* geni ifadesine bakmışlardır. Deri biyopsileri ile yapılan çalışmada yaz ve kış mevsimlerinde gen ifadesinin diğer mevsimlere göre daha yüksek olduğu; Tharparkar ırkının Karan Fries ırkına göre sıcak stresine daha dayanıklı olduğu görülmüştür [47]. Suqueli Garcia ve ark. [70] *HSP70* genleri ile ilişkili yapılmış çalışmalarda çeşitli tutarsızlıklar olduğunu farketmişlerdir. Çalışmanın sonuçları sığır referans genomu UMD 3.1.1.'de muhtemel bir delesyonun varlığını göstermiştir. Daha önce çalışılan diziler üstünde yapılan *in silico* analizler referans genomda 11,1 kilobazlık bir delesyon olduğunu göstermiştir. *HSP70.1* ve *HSP70.2* genlerinde yalnızca bir amino asidin farklı olduğuna vurgu yapılan çalışmada, iki genin promotor bölgelerinin ise türler arasında korunmuş farklılıklar içerdiğine dikkat çekilmiştir. Daha önce çalışılan diziler farklı bir referans dizi ile hizalanmış (genbank erişim numarası: FQ482128.2) bazı çalışmalarda yanlış *HSP70* geni ile çalışıldığı; bazı çalışmalarda ise hangi gen ile çalışıldığının belirsiz olduğu ortaya çıkmıştır [70].

Verma ve ark. [75] *HSPB8* geninde iki adet SNP tespit etmiş; her iki SNP'in termotoleransla anlamlı derecede ilişkili olduklarını bildirmişlerdir.

Kumar ve ark. [39] Karan Fries ırkında *HSPB6* geninde dizi analizi ile beş yeni varyant tespit etmiştir. Bu varyantların intergenik bölge, 3' UTR bölgesi ve intronik bölgede oldukları ifade edilmiştir. Protein dizisini değiştiren herhangi bir amino asit değişikliği olmamasına karşın bu bölgelerde gözlenen nükleotid değişimlerinin gen ifadesini değiştirebileceği ifade edilmiştir. Sıcak stresi yanıtı ve deney tasarımı arasında herhangi bir ilişki tespit edilemediği bildirilmiştir [39].

*HSP90* proteinlerinin sentezinden sorumlu genler ile yapılan çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenmeye çalışılmıştır:

Shergojry [68] Deoni sığır ırkında *HSP90AA1* geninin moleküler karakterizasyonu üstünde çalışmıştır. Genetik varyantlar ve reproduktif performans arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada, genetik varyantlardan birinin ilk buzağılama yaşı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [68]. Kumar ve ark. [38] *HSP90AA1* geninin 3'üncü ekzonunda bulunan bir SNP'in Karan Fries ırkında termotolerans ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Badri ve ark. [5] Çin Holştaynlarında *HSP90AA1* geninde beş adet polimorfizm saptamış; bu polimorfizmlerden birinin (g.-87-G>C) promotor bölgede; üçünün (g.605-A>G; g.1662-T>G; g.2819-G>A) protein kodlayan bölgede; sonuncusunun ise (g.4172-A>G) 3'UTR bölgesinde olduğunu belirlemişlerdir. g.2819-G>A yabani tip allelinin stres döneminde sütte daha çok somatik hücre sayısına neden olduğu bildirilmiştir. g.-87-G>C mutant allelinin ifadesinin sıcak ve nemin toplamalı etkisine maruz kalındığında yabani tipe göre daha fazla olduğu fakat tek zincir konformasyonu ve süt üretimi açısından normal sıcaklık ve stres dönemi arasında herhangi bir farklılık gözlenmediği belirtilmiştir. g.4172-A>G mutant allelinin ifadesinde dme-miR-2279'a bağlı olarak düşüş olabileceği belirtilmiştir [5].

Charoensook ve ark. [13]'nün Holştayn ve yerli Thai sığır ırkları ile yaptıkları çalışmada *HSP90AB1* geninde 9 adet SNP tespit edilmiş fakat bu SNP'lerin sıcak stresi nedeniyle meydana gelen fizyolojik yanıtlarda anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı ifade edilmiştir. Sailo ve ark. [62]'nün Jersey melezlerinde yaptıkları çalışmada *HSP90AB1* genindeki genetik varyantlardan yalnızca birinin düşük rektal sıcaklık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Sajjanar ve ark. [61]'nün Hindistan'da süt verimi için yetiştirilen sığırlar ile yaptıkları çalışmada *HSP90AB1* geninde tespit ettikleri genotiplerden birine sahip bireylerin sıcak

stresine karşı fizyolojik yanıtlarının ve süt veriminin diğer bireylere göre daha iyi olduğu bildirilmiştir.

HSP ilişkili diğer proteinlerle yapılmış çalışmalar aşağıdaki gibidir:

Li ve ark. [42] Çin Holştaynlarında yaptıkları çalışmada *HSF1* geninde iki yeni SNP tanımlamışlar ve her iki SNP'in de termotolerans ile anlamlı derecede ilişkili olduklarını ifade etmişlerdir.

Çin Holştaynlarında *HSBP1* geninde yedi haplotip tespit edilmiş ve bu haplotiplerden birine sahip bireylerin, diğer bireylere göre sıcak stresine daha dayanıklı oldukları ifade edilmiştir [76].

Sıcak stresine verilen fizyolojik yanıtlar ve termotolerans birçok genin aktivitesinden etkilenmektedir. Farklı bireylerin yalnızca tek bir gende tespit edilen polimorfizmlere göre, gerek HSP genleri gerekse protein onarımı ile ilişkili yollarda görevli diğer genlere bakılmaksızın sıcak stresine duyarlı veya dirençli olarak nitelendirilmesi çalışmaların ne derece güvenilir olduğu konusunda şüphe uyandırmaktadır. Çalışmalarda kullanılan yöntemlerden SSCP (Tek iplikçik konformasyon polimorfizmi/ Single Strand Conformational Polymorphism) gibi eski ve düşük çözünürlüklü bir metodun yerini DNA dizi analizine bırakması; elde edilen polimorfizmlerin genin yapısı, fonksiyonu ve ifadesini ne şekilde etkileyebileceğine dair verilerin biyoinformatik analizlerle ortaya konulması; doğrulama amacıyla klonal hücre hatlarında ilgili mutasyonların indüklenerek sıcak stresine maruz bırakılması sonucu stres yanıtının ve hücrenin yaşamsal fonksiyonlarının ne şekilde etkilediğinin tespit edilebileceği daha sistemli deney tasarımları çalışmaların güvenilirliğini artıracaktır. Polimorfizm çalışmalarında "*Slick hair*" fenotipinden tek bir gen sorumlu olduğu için [54], *PRLR* genindeki mutasyonların bu fenotipi etkilediği bilgisi diğer çalışmalarla kıyaslandığında oldukça güvenilir bir bilgidir. İkinci bölümde de değinildiği üzere kıl yoğunluğu, inceliği ve uzunluğu gibi karakterler evaporatif ısı kaybını etkilediğinden *PRLR* geni mutasyonları termoregülasyonda önemli faktörlerden biridir [14, 53, 54].

### Gen İfadesi Çalışmaları

Sıcak stresi ile ilişkili yapılmış birçok gen ifadesi çalışması bulunmaktadır. Horowitz [28], HSP70 benzeri protein ifadeleri yüksek olan türlerin yüksek sıcaklıklara daha dayanıklı olduklarını belirtmiştir.

Collier ve ark. [15] sığır meme epiteli kollajen jel kültürü sisteminde çalışmışlardır. Çalışmada aklimasyon, adaptasyon ve termotolerans ile ilişkili genleri araştırmak amaçlanmıştır. *PIN*, *COLL* ve *UTRO* genleri

artan sıcak stresıyla negatif korelasyon gösterirken; *RAS*, *Lig*, *PFK-P*, *p38*, *CLK1*, *BAG3*, *HSP40*, *PLTP*, *TRAF*, *SIPP*, *HSP70A*, *HSP70B* genlerinin ifadeleri sıcak stresi ile birlikte artış göstermiştir. İfadelerinde artış görülen genlerin stres yanıtı ve protein onarımında görevli oldukları; ifadelerinde düşüş görülen genlerin ise biyosentez, metabolizma ve morfogenez ile ilişkili oldukları vurgulanmıştır. Gen ifadelerindeki değişimlerden anlaşıldığı üzere sıcak stresinin zararlı etkilerine maruz kalan hücrelerde stres yanıtı ve protein onarımı ile ilişkili mekanizmalar devreye girmekte; diğer faaliyetler ise baskılanmaktadır [15].

Collier ve ark. [16] sistemik sıcak stresi yanıtı ve moleküler mekanizmalarını derledikleri yayınlarında sıcak stresi yanıtında gen ifadesi değişimlerinin aşamalarını açıklamışlardır. Sıcak stresine maruziyette ilk önce *HSF1* (ısı şoku faktörü 1) aktive olmaktadır. Bunu HSP ifadelerinin artışı ve diğer protein ifadelerinin düşüşü izlemektedir. Glukoz ve amino asit oksidasyonunda artış; yağ asidi metabolizmasında düşüş gözlenir ve endokrin sistem stres yanıtı için aktive edilir. HSP'lerin hücre dışı kompartmana çıkışı ile bağışıklık sistemi uyarılır [16].

Artan HSP ifadeleri hücreleri ısı şoku, hipertermi, dolaşım şoku ve serebral iskemiye karşı korumaktadır. Sıcak stresine maruz kalınan süre uzadığında endokrin sistem de hücrel stres yanıtını etkilemektedir. Melatonin, prolaktin, prostaglandin- $\alpha$  ve glukokortikoidler HSP ifadesini artırırken, leptinin HSP ifadesini baskıladığı bildirilmiştir [16].

Mehla ve ark. [49] Sahiwal ırkı (Zebu) sığırlarda yaptıkları mikrodizin çalışmasında sıcağa maruziyet sonrası 140 transkriptin ifadesinde artış; 77 transkriptin ise ifadesinde düşüş saptamışlardır. *HSF1* ifadesi ve HSP'lerin sentezlenmesinde artış görülürken, diğer proteinlerin ifadelerinde düşüş görülmüş; HSP'lerin hücre dışına salınımının ardından bağışıklık sisteminin aktive edildiği belirtilmiştir [49].

Li ve ark. [40] sığır meme epiteli hücre kültüründe sıcağa maruziyetin etkilerini inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Mikrodizin analizinde ısıya maruz kalan grupta kontrol grubuna göre 123 genin ifadesinde artış, 419 genin ifadesinde ise düşüş gözlemlenmiştir. Hücre iskeleti ve TGF- $\beta$  sinyal yolağı ile ilişkili *FGF7*, *CHRM3*, *ROCK2*, *PIK3CA*, *PPP1R12A* ve *BMPR1A* genlerinde ifade düşüşü; HSP ailesindeki *HSPB8*, *HSPA1A*, *HSPA5* ve *HSP90AB1* genlerinde ise ifade artışı tespit edilmiştir [40]. HSP gen ailesindeki genlerde görülen ifade artışı ve diğer yollarda görevli genlerde görülen ifade düşüşleri Collier ve ark. [13, 16]'nın yayınlarını destekler nitelikte görülmektedir.

Deb ve ark. [21] *ATP1B1*, *ATP1B2* ve *ATP1B3* izoformları ile sıcak stresine ilişkisini araştırdıkları çalışma sonucunda *ATP1B1*, *ATP1B2* transkriptlerinin sıcak stresinde anlamlı derecede artış gösterdiği belirlenmiş; her üç izoformun *HSP70* geni ile arasında pozitif korelasyon görüldüğü bildirilmiştir.

Li ve ark. [41] granüloza hücrelerinde sıcak stresinin progesteron,  $17\beta$ -östradiol ve apoptozise etkilerini araştırmak için bir çalışma tasarlamışlardır. Isıya maruz bırakılan hücreler ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ısıya maruz bırakılan grupta 175 genin ifadesinde artış; 1036 genin ifadesinde ise düşüş gözlenmiştir. *HSP90B1*, *CASP3*, *BAX*, *BCL-2* genlerinde anlamlı derecede ifade artışı; *SF1*, *STAR*, *CYP11A1* ve *CYP19A1* genlerinde ise anlamlı derecede ifade düşüşü gözlenmiştir. Isıya maruz bırakılan grupta *CASP3*'ün artan ifadesi ve *BAX/BCL-2* mRNA oranının artışı ve buna bağlı olarak apoptoziste anlamlı derecede artış tespit edilmiştir. Yine bu grupta sığağa maruziyette koruyucu rolleri olduğu bilinen HSP ilişkili *HSP32*, *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* ve *HSP105* genlerinin ifadelerinde anlamlı artış göze çarpmaktadır [41].

Srikanth ve ark. [69] RNA dizileme analizi ile sıcak stresine maruz kalan Holştayn buzağılarında anlamlı derecede farklı ifade edilen genleri tanımlamaya çalışmışlardır. Analiz sonuçları 376 genin farklı ifade edildiğini göstermiştir. Sığağa maruziyetin birinci, ikinci ve üçüncü günlerinde sırasıyla 343, 261 ve 256 genin ifadesinde artış; 159, 133 ve 120 genin ifadesinde düşüş görülmüştür. İfade artışı ve düşüşü görülen genler moleküler fonksiyonları açısından sınıflandırıldığında genlerin ısı şoku faktörleri ve şapetonlar; bağışıklık sisteminde görevli genler ve MAPK yolağında görev yapan genler olarak gruplandıkları görülmüştür. HSP ilişkili genlerden *HSPA1A*, *HSPA8*, *HSPH1*, *HSP90AB1*, *HSP90AA1*, *DNAJA1*, *DNAJB1*, *HSPB1*, *STIP1* genlerinin ifadelerinde artış; *ATPA7A* ifadesinde ise düşüş görüldüğü bildirilmiştir. İfade artışının en fazla gözlemlendiği genler *TSK*, *IRF4*, *PGA5*, *HSPA1A*, *BOLA-DQA5*, *STT3A*, *PSIP1*, *PPP1R1B*, *HSPH1*, *TNFRSF13C* genleri; ifade düşüşünün ise en fazla görüldüğü genler *PSTK*, *SDCCAG8*, *C11orf54*, *ACTR5*, *FBXW8*, *FAM46A*, *VCAN*, *MCTP1*, *EHD4* ve *NRP2* olarak bildirilmiştir [69].

### MikroRNA Çalışmaları

MikroRNA'lar (miRNA) 18-25 nükleotit uzunluğunda, tek zincirli, küçük RNA molekülleridir. DNA'dan transkribe olan fakat proteine translasyonu gerçekleştirmeyen bu moleküller gen ifadelerinin transkripsiyon sonrası regülasyonunda kritik rol oynamaktadır. Protein kodlayan genlerin mRNA'larının ge-

nellikle 3' UTR bölgesine komplementerite esasına göre bağlanan miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'ların degradasyonuna neden olabilmekte veya proteine translasyonlarını baskılayabilmekte; bu sayede hedefledikleri genlerin ifadelerini değiştirebilmektedirler. Bir miRNA birden fazla protein kodlayan geni hedefleyebilmekte, bir gen ise birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilmektedir [67].

Sengar ve ark. [65] sıcak stresine maruz kalan Frieswal ırkı sığırlarda yaz mevsiminde 65 miRNA'nın farklı şekilde ifade edildiği belirlemişlerdir. Sıcak stresi sırasında bta-miR-103-2, bta-miR-2898, bta-miR-2478 ve bta-miR-181b-2'in ifadelerinde anlamlı derecede artış; bta-miR-2311 ve bta-miR-6536-2'nin ifadelerinde ise anlamlı derecede düşüş görüldüğü belirtilmiştir. Bu miRNA'ların birçoğunun HSP ilişkili proteinleri hedefledikleri tespit edilmiştir [65]. Aynı araştırmacılar 2018 yılında Sahiwal ırkında yaz mevsiminde kış mevsimine kıyasla bta-miR-1248, bta-miR-2332, bta-miR-2478 ve bta-miR-1839'un ifadelerinde anlamlı artış; bta-miR-16a, bta-let-7b, bta-miR-142 ve bta-miR-425 ifadelerinde ise anlamlı düşüş tespit etmişlerdir [66]. Hu ve ark. [31] normal koşullarda ve sıcak stresindeki besi sığırlarında ifade edilen miRNA profillerini incelemişlerdir. miR-1246'nın sıcak stresi altındaki sığırlarda anlamlı derecede ifade artışı gösterdiği tespit edilmiştir. Bu miRNA'nın akciğer hücrelerinde sıcaklıkla indüklenen apoptozisi baskılayan *PCBP2* ve *CREBL2* mRNA'larının 3'-UTR bölgesine bağlandığı deneysel olarak gösterilmiştir [31]. miR-1246 ifadesinin artışı *PCBP2* ve *CREBL2* ifadelerini baskılayarak akciğer hücrelerinde sıcaklık ile indüklenen apoptozise neden olmaktadır.

### Tartışma ve Sonuç

Sığırlarda sıcak stresi ve termotoleransın moleküler mekanizmalarının aydınlatılması için birçok çalışma yapılmıştır. Sıcak stresine verilen fizyolojik yanıt ve termotolerans birçok gen, transkripsiyon faktörü ve miRNA'lar gibi epigenetik faktörlerden etkilenmesine karşın; çalışmaların birçoğunda tek bir gene odaklanılmıştır. Bu nedenle araştırmalarda deney tasarımı doğru sonuçlara ulaşmak için oldukça önemlidir.

Sıcak stresi ve termoregülasyon konusunda tanımlanmış birçok belirteç olduğu görülmektedir. Yapılmış çalışmalarda sıcak stresine duyarlılık ve direnç konularında farklı belirteçlerin kullanılması söz konusudur. Bu nedenle, araştırmalarda elde edilen sonuçların diğer çalışmalarla karşılaştırılması zorlaşmaktadır. Örneğin; araştırmacılar bir çalışmada rek-

tal sıcaklık ve solunum sayısını stres belirteci olarak kullanırken; bir diğer çalışmada ise eritrositlerdeki potasyum konsantrasyonu stres belirteci olarak ele alınmıştır. Bu durum iki çalışmadan elde edilen bulguların karşılaştırılmasını, seçilen stres belirteçlerinin farklı olması nedeniyle zorlaştırmaktadır.

Stres yanıtını etkileyen birçok faktör göz önüne alındığında tekli nükleotit varyasyonları üstüne yapılmış çalışmalarda canlı organizmalar yerine, hücre kültürü çalışmalarının kullanımının daha etkili ve kesin sonuçlar vermesi olasıdır. CRISPR/Cas9 gibi yeni genom düzenleme teknolojileri ile istenen mutasyonlar indüklenebilmektedir [18]. Aday genlerdeki polimorfizmlerin termotoleransa etkisi araştırılırken, hücre kültüründe istenen mutasyonlar indüklenerek sıcak stresine duyarlılık veya direnç yönünden incelenebilmesi bu sayede artık mümkündür. Hücre kültürü çalışmalarında elde edilen ön sonuçlar ise daha sonra canlı organizmalarda test edilerek *in vivo* etkileri gözlemlenebilir.

*HSF1* gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin sıcak stresi yanıtını etkileyebildikleri bilinmektedir [16; 42]. Örneğin; *HSF1* transkripsiyon faktörü *HSP70* geninin promotor bölgesine bağlanarak stres yanıtının başlamasını sağlamaktadır. Eğer HSE'de (ısı şoku elementi; *HSP70* geninin promotor bölgesinde bulunur ve *HSF1* transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesidir) olası bir metilasyon söz konusu olursa; *HSF1* ve *HSP70*'in bağlanmaları sekteye uğrayabilir ve bu nedenle *HSP70* mRNA'sı sentezlenemez [42]. Tek bir gen ile yapılan çalışmalara bakıldığında, hiçbir çalışmada çalışılan genlerin promotor bölgelerinde DNA metilasyonunun araştırılmadığı görülmektedir. Yalnızca promotor bölge metilasyonu değil, aynı zamanda gen üstündeki diğer regülatör elementlerin bulunduğu bölgelerdeki CpG adacıklarında yapılacak metilasyon analizleri de gen ifadelerindeki değişimlerin nedenlerinin aydınlatılmasını sağlayacaktır.

miRNA'ların da UTR bölgelerine bağlanarak gen ifadesini transkripsiyon sonrası aşamada düzenleyebildikleri bilinmektedir. miRNA bağlanma bölgelerindeki olası nükleotit değişimleri transkripsiyon sonrası aşamada gen ifadelerini etkileyebilecektir. Sıcak stresi ve termotolerans konularında miRNA'lar ile yapılmış çalışmaların sayısı oldukça azdır [31, 65, 66]. miRNA çalışmaları ile hedef genlerdeki tekli nükleotit polimorfizmi çalışmalarının birleştirildiği bir deney tasarımı bu konuda yapılacak çalışmaların doğruluğu ve güvenilirliğini artıracaktır.

*HSP70* genleri ile ilişkili yapılmış çalışmalarda sığır referans genomundaki (UMD 3.1.1.) delesyon

nedeniyle karışıklık olduğu Suqueli Garcia ve ark. [70] tarafından gösterilmiştir. Gelecekte bu genler ile ilişkili yapılacak çalışmaların Suqueli Garcia ve ark. [70]'nın yayınlarına göre doğrulanarak gerçekleştirilmesi daha doğru sonuçlar alınmasını sağlayacaktır.

Dünya genelinde verim kaybına neden olan en önemli sorunlardan biri sıcak stresidir. Küresel iklim değişikliği nedeniyle yüzey sıcaklığında öngörülen sıcaklık artışları ılıman iklim kuşağındaki ülkelerde de sıcak stresi riskinde artışa neden olacaktır. Bu nedenle sıcak stresine verilen yanıtlar ve termotoleransın moleküler mekanizmasının aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmalar gittikçe önem kazanmaktadır. Sıcak stresine verilen yanıtla ilişkin mekanizmalar aydınlatıldığında; akla gelecek ilk soru küresel iklim değişikliği karşısında hangi stratejinin izlenmesi gerektiği olacaktır. Çevreye adaptasyon mekanizmaları geçmişten günümüze uzanan ve devam eden bir süreçtir. Yerli ırklar ve nesillerdir belirli bir bölgede yetiştirilen ticari ırkların çevresel etkilere adaptasyonu diğer ırklara göre daha fazladır. Irkların nesillerdir yetiştikleri çevresel koşullara adaptasyonlarının genetik seleksiyonla geliştirilmesi, tüm ırkların sert çevre koşullarına dayanıklılıklarının benzer şekilde artırılmasına kıyasla daha etkili bir yöntem olacaktır.

### Kısaltmalar

3' UTR	: 3' ucundaki translasyonu yapılmayan bölge (3' Untranslated region)
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon (Adrenocorticotrophic hormone)
CpG adacıkları	: Gen üstünde gen ifadesinin regülasyonu ile ilişkili ardişık CG (sitozin-guanin) nükleotitlerinin bulunduğu bölgeler
CRF	: Kortikotropin salgılatıcı faktör (Corticotropin releasing factor)
GMST	: Anlamlı küresel yüzey sıcaklığı (Global Mean Surface Temperature)
GWAS	: Genom boyu ilişkilendirme çalışması (Genome-wide association study)
HSE	: Isı şoku elementi, <i>HSP70</i> geninin promotor bölgesinde <i>HSF1</i> transkripsiyon faktörünün bağlandığı DNA dizisi (Heat shock element)
HSP	: Isı şoku proteinleri (Heat shock proteins)
IPCC	: Hükümetlerarası iklim değişikliği paneli (Intergovernmental panel on climate change)
miRNA	: MikroRNA
SNP	: Tekli nükleotit polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
SSCP	: Tek iplikçik konformasyon polimorfizmi (Single strand conformational polymorphism)



## Kaynaklar

- Adamowicz T, Pers E, Lechniak D (2005): A New SNP in the 3'-UTR of the hsp 70-1 Gene in *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Biochemical Genetics* 43 (11-12): 623-627.
- Aggarwal P, Vyas S, Thornton P, Campbell BM (2019): How much does climate change add to the challenge of feeding the planet this century? *Environ Res Lett* 14: 043001.
- Ahmed BMS, Younas U, Asar TO, Dikmen S, Hansen PJ, Dahl GE (2017): Cows exposed to heat stress during fetal life exhibit improved thermal tolerance. *Journal of Animal Science* 95: 3497-3503.
- Archana PR, Aleena J, Pragna P, Vidya MK, Abdul Niyas PA, Bagath M, Krishnan G, Manimaran A, Beena V, Kurien EK, Sejian V, Bhatta R (2017): Role of Heat Shock Proteins in Livestock Adaptation to Heat Stress. *J Dairy Vet Anim Res* 5(1): 00127. DOI: 10.15406/jdvar.2017.05.00127
- Badri TM, Chen KL, Alsiddik MA, Li L, Cai Y, Wang GL (2018): Genetic polymorphism in Hsp90AA1 gene is associated with the thermotolerance in Chinese Holstein cows. *Cell Stress and Chaperones* 23: 639-651.
- Bahbahani H, Clifford H, Wragg D, Mbole-Kariuki MN, Van Tassel C, Sonstegard T, Woolhouse M, Hanotte O (2015): Signatures of positive selection in East African Shorthorn Zebu: A genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Scientific Reports* 5: 11729.
- Basiricò L, Morera P, Primi V, Lacetera N, Nardone A, Bernabucci U (2011): Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. *Cell Stress and Chaperones* 16: 441- 448.
- Bharati J, Dangi SS, Chouhan VS, Mishra SR, Bharti MK, Verma V, Shankar O, Yadav VP, Das K, Paul A, Bag S, Maurya VP, Singh G, Kumar P, Sarkar M (2017): Expression dynamics of HSP70 during chronic heat stress in Tharparkar cattle. *International Journal of Biometeorology* 61 (6): 1017-1027.
- Bhat S, Kumar P, Kashyap N, Deshmukh B, Dige MS, Bhushan B, Chauhan A, Kumar A, Singh G (2016): Effect of heat shock protein 70 polymorphism on thermotolerance in Tharparkar cattle. *Veterinary World* 9 (2): 113-117.
- Cai Y, Liu Q, Xing G, Zhou L, Yang Y, Zhang L, Li J, Wang G (2005): Polymorphism of the Promoter Region of Hsp70 Gene and Its Relationship with the Expression of HSP70mRNA, HSF1mRNA, Bcl-2mRNA and Bax-AMRNA in Lymphocytes in Peripheral Blood of Heat Shocked Dairy Cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18 (5): 734-740.
- Casasús I, Rogošić J, Rosati A, Štoković I, Gabiña D (2012): Animal farming and environmental interactions in the Mediterranean region, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 77; 232.
- Chang M, He L, Cai L (2018): An Overview of Genome-Wide Association Studies. In: Huang T (eds) *Computational Systems Biology. Methods in Molecular Biology*, vol 1754. Humana Press, New York, USA.
- Charoensook R, Gatphayak K, Sharifi AR, Chaisongkram C, Brenig B, Knorr C (2012): Polymorphisms in the bovine HSP90AB1 gene are associated with heat tolerance in Thai indigenous cattle. *Tropical Animal Health and Production* 44: 921-928.
- Cheng Y, Liu S, Zhang Y, Su D, Wang G, Lv C, Zhang Y, Yu H, Hao L, Zhang J (2016): The effect of heat stress on bull sperm quality and related HSPs expression. *Animal Biology* 66: 321-333.
- Collier RJ, Stiening CM, Pollard BC, VanBaale MJ, Baumgard LH, Gentry PC, Coussens PM (2006): Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stress tolerance at the cellular level in cattle. *Journal of Animal Science* 84 (E Suppl.): E1-E13.
- Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH (2008): Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. *Journal of Dairy Science* 91: 445-454.
- Conway D, Nicholls RJ, Brown S, Tebboth MGL, Adger WN, Ahmad B, Biemans H, Crick F, Lutz AF, De Campos RS, Said M, Singh C, Zaroug MAH, Ludi E, New M, Wester P (2019): The need for bottom-up assessments of climate risks and adaptation in climate-sensitive regions. *Nat. Clim. Chang.* 9: 503-511. doi:10.1038/s41558-019-0502-0.
- Çıldır ÖŞ, Özmen Ö (2018): Çiftlik Hayvanlarında CRISPR/Cas9 Uygulamaları. *Selcuk J Agr Food Sci* 32 (3): 559-566. doi: 10.15316/SJAFS.2018.137.
- Das R, Sailo L, Verma N, Bharti P, Saikia J, Intiwati, Kumar R (2016): Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World*, 9 (3): 260-268.
- Deb R, Sajjanar B, Singh U, Kumar S, Brahmane MP, Singh R, Sengar G, Sharma A (2013): Promoter variants at AP2 box region of Hsp70.1 affect thermal stress response and milk production traits in Frieswal cross bred cattle. *Gene* 532: 230-235.
- Deb R, Sajjanar B, Singh U, Alex R, Raja TV, Alyethodi RR, Kumar S, Sengar G, Sharma S, Singh R, Prakash B (2015): Understanding the mechanisms of ATPase beta family genes for cellular thermotolerance in crossbred bulls. *International Journal of Biometeorology* 59 (12): 1783-1789.
- Dikmen S, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ (2013): Genome-wide association mapping for identification of quantitative trait loci for rectal temperature during heat stress in Holstein cattle. *PLoS ONE* 8 (7): e69202.
- Dikmen S, Wang X-z, Ortega MS, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ (2015): Single nucleotide polymorphisms associated with thermoregulation in lactating dairy cows exposed to heat stress. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 132: 409-419.
- Fang W, He J, Huang J, Ju Z, Wang C, Qi C, Li J, Li R, Zhong J, Li Q (2014): Study on genetic variations of PPAR $\alpha$  gene and its effects on thermal tolerance in Chinese Holstein. *Molecular Biology Reports* 41: 1273-1278.
- Favatier F, Bornman L, Hightower LE, Günther E, Polla BS (1997): Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell Stress & Chaperones* 2 (3): 141-155.
- Hammami H, Vandenplas J, Vanrobays ML, Rekik B, Bastin C, Gengler N (2015): Genetic analysis of heat stress effects on yield traits, udder health, and fatty acids of Walloon Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 98: 4956-4968.
- Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Savin K, van Tassel CP, Sonstegard TS, Goddard ME (2009): A validated genome wide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climate change. *PLoS ONE* 4 (8): e6676.
- Horowitz M (2001): Heat acclimation: phenotypic plasticity and cues to the underlying molecular mechanisms. *Journal of Thermal Biology* 26: 357-363.
- Haupt KA (2008): Dukes Veteriner Fizyoloji. p: 925-935. In: Davranış Fizyolojisi, Edit.: Reece WO, Yıldız S, Onikinci Baskı, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti, ISBN: 978-975-6676-36-3, Malatya, Türkiye.
- Howard JT, Kachman SD, Snelling WM, Pollak EJ, Ciobanu DC, Kuehn LA, Spangler ML (2013): Beef cattle body temperature during climatic stress: a genome-wide association study. *International Journal of Biometeorology* 58 (7): 1665-1672.

31. Hu Y, Cai MC, Wang L, Zhang TH, Luo ZG, Zhang GW, Zuo FY (2018): MiR-1246 is upregulated and regulates lung cell apoptosis during heat stress in feedlot cattle. *Cell Stress and Chaperones* 23: 1219. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0927-9>.
32. Islam MM, Barman A, Kundu GK, Kabir MA, Paul B (2019): Vulnerability of inland and coastal aquaculture to climate change: Evidence from a developing country. *Aquaculture and Fisheries* 4: 183-189.
33. IPCC (2018): Summary for Policymakers. In: Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty [V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P. R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, T. Waterfield (eds.)]. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 32 pp.
34. Kadokawa H, Sakatani M, Hansen PJ (2012): Perspectives on improvement of reproduction in cattle during heat stress in a future Japan. *Animal Science Journal* 83 (6): 439-45.
35. Kashyap N, Kumar P, Deshmukh B, Bhat S, Kumar A, Chauhan A, Bhushan B, Singh G, Sharma D (2015): Association of ATP1A1 gene polymorphism with thermo tolerance in Tharparkar and Vrindavani cattle. *Veterinary World* 8 (7): 892-897.
36. Kerekoppa RP, Rao A, Basavaraju M, Geetha GR, Krishnamurthy L, Rao TVLN, Das DN, Mukund K (2015): Molecular characterization of the HSPA1A gene by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis in Holstein-Friesian crossbred and Deoni cattle raised in India. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 39: 128-133.
37. Koyuncu M (2017): Küresel iklim değişikliği ve hayvancılık. *Selçuk Journal of Agriculture and Food Sciences* 31 (2): 98-106.
38. Kumar R, Gupta ID, Verma A, Singh SV, Verma N, Vineeth MR, Magotra A, Das R (2016): Novel SNP identification in exon 3 of HSP90AA1 gene and their association with heat tolerance traits in Karan Fries (Bos taurus × Bos indicus) cows under tropical climatic condition. *Tropical Animal Health and Production* 48 (4): 735-740.
39. Kumar R, Gupta ID, Verma A, Kumari R, Verma N (2017): Molecular characterisation and SNP identification in HSPB6 gene in Karan Fries (Bos Taurus x Bos indicus) cattle. *Tropical Animal Health and Production* 49: 1059-1063.
40. Li L, Sun Y, Wu J, Li X, Luo M, Wang G (2015): The global effect of heat on gene expression in cultured bovine mammary epithelial cells. *Cell Stress and Chaperones* 20: 381-389.
41. Li L, Wu J, Luo M, Sun Y, Wang G (2016): The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. *Cell Stress and Chaperones* 21: 467-475.
42. Li Q, Ju Z, Huang J, Li J, Hou M, Wang C, Zhong J (2011a): Two Novel SNPs in HSF1 Gene Are Associated with Thermal Tolerance Traits in Chinese Holstein Cattle. *DNA and Cell Biology* 30 (4): 247-254.
43. Li Q, Han J, Du F, Ju Z, Huang J, Wang J, Li R, Wang C, Zhong J (2011b): Novel SNPs in HSP70A1A gene and the association of polymorphisms with thermo tolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle. *Molecular Biology Reports* 38: 2657-2663.
44. Liu YX, Zhou X, Li DQ, Cui QW, Wang GL (2010): Association of ATP1A1 gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. *Genetics and Molecular Research* 9 (2): 891-896.
45. Liu YX, Li D, Li H, Zhou X, Wang G (2011): A novel SNP of the ATP1A1 gene is associated with heat tolerance traits in dairy cows. *Molecular Biology Reports* 38: 83-88.
46. Macciotta NPP, Biffani S, Bernabucci U, Lacetera N, Vitali A, Ajmone-Marsan P, Nardone A (2017): Derivation and genome-wide association study of a principal component-based measure of heat tolerance in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 100: 1-15.
47. Maibam U, Hooda OK, Sharma PS, Mohanty AK, Singh SV, Upadhyay RC (2017): Expression of HSP70 genes in skin of zebu (Tharparkar) and crossbred (Karan Fries) cattle during different seasons under tropical climatic conditions. *Journal of Thermal Biology* 63: 58-64.
48. Maróti-Agóts Á, Bodó I, Jávorka L, Gyurmán A, Solymosi N, Zenke P, Skogseth M, Zöldág L (2011): Possible genetic sign of heat stress adaptation in Hungarian Grey Bos taurus bred. *Acta Biologica Hungarica* 62 (1): 65-72.
49. Mehla K, Magotra A, Choudhary J, Singh AK, Mohanty AK, Upadhyay RC, Srinivasan S, Gupta P, Choudhary N, Antony B, Khan F (2014): Genome-wide analysis of the heat stress response in Zebu (Sahival) cattle. *Gene* 533: 500-507.
50. Misztal I (2017): Breeding and Genetics Symposium: Resilience and lessons from studies in genetics of heat stress. *Journal of Animal Science* 95 (4): 1780-1787.
51. Mora C, Spirandelli D, Franklin EC, Lynham J, Kantar MB, Miles W, Smith CZ, Freil K, Moy J, Louis LV, Barba EW, Bettinger K, Frazier AG, Colburn IX JF, Hanasaki N, Hawkins E, Hirabayashi Y, Knorr, Little CM, Emanuel K, Sheffield J, Patz JA, Hunter CL (2018): Broad threat to humanity from cumulative climate hazards intensified by greenhouse gas emissions. *Nature Clim Change* 8: 1062-1071. doi:10.1038/s41558-018-0315-6.
52. Naumann G, Alfieri L, Wyser K, Mentaschi L, Betts RA, Carrao H, Spinoni J, Vogt J, Feyen L (2018): Global changes in drought conditions under different levels of warming. *Geophysical Research Letters*, 45. <https://doi.org/10.1002/2017GL076521>.
53. Olson TA, Lucena C, Chase CC Jr, Hammond AC (2003): Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in Bos taurus cattle. *Journal of Animal Science* 81 (1): 80-90.
54. OMIA-Online Mendelian Inheritance In Animals (2019): OMIA 001372-9913 : Slick hair in Bos taurus. [Erişim: <https://omia.org/OMIA001372/9913/>], [Erişim tarihi: 20.08.2019].
55. Parry ML, Rosenzweig C, Iglesias A, Livermore M, Fischer G (2004): Effects of climate change on global food production under SRES emissions and socio-economic scenarios. *Global Environmental Change* 14 (1): 53-67.
56. Polsky L, von Keyserlingk MAG (2017): Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science* 100: 8645-8657.
57. Pragna P, Archana PR, Aleena J, Sejian V, Krishnan G, Bagath M, Manimaran A, Beena V, Kurien EK, Varma G, Bhatta R (2016): Heat stress and dairy cow: Impact on both milk yield and composition. *International Journal of Dairy Science* 12 (1): 1-11.
58. Renaudeau D, Collin A, Yahav S, de Baulieu V, Gourdière JL, Collier RJ (2012): Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock. *Animal* 6 (5): 707-728.
59. Robertshaw D (2008): Dukes Veteriner Fizyoloji. p: 935-945. In: Termoregülasyon ve Termal Çevre, Edit.: Reece WO, Yıldız S, Onikinci Baskı, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti, ISBN: 978-975-6676-36-3, Malatya, Türkiye.
60. Rosenkrans JrC, Banks A, Reiter S, Looper M (2010): Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with Heat Shock Protein 70 genetic polymorphisms. *Animal Reproduction Science* 119: 178-182.

61. Sajjanar B, Deb R, Singh U, Kumar S, Brahmane M, Nirmale A, Bal SK, Minhas PS (2015): Identification of SNP in HSP90AB1 and its Association with the Relative Thermotolerance and Milk Production Traits in Indian Dairy Cattle. *Animal Biotechnology* 26 (1): 45-50.
62. Sailo L, Gupta ID, Verma A, Singh A, Chaudhari MV, Das R, Upadhyay RC, Goswami J(2015): Single Nucleotide Polymorphisms in HSP90AB1 Gene and its association with thermotolerance in Jersey crossbred cows. *Animal Science Reporter* 9 (2): 43-49.
63. Sejian V, Naqvi SMK, Ezeji T, Lakritz J, Lal R (2012): *Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN: 978-3-642-29205-7, p: 413-468.
64. Sejian V, Bhatta R, Gaughan J, Malik PK, Naqvi, SMK, Lal R (2017): *Sheep Production Adapting to Climate Change*. Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, p: 3; 118.
65. Sengar GS, Deb R, Singh U, Raja TV, Kant R, Sajjanar B, Alex R, Alyethodi RR, Kumar A, Kumar S, Singh R, Jakhesara SJ, Joshi CG (2018a): Differential expression of microRNAs associated with thermal stress in Frieswal (Bos taurus x Bos indicus) crossbred dairy cattle. *Cell Stress Chaperones* 23 (1): 155-170.
66. Sengar GS, Deb R, Singh U, Junghare V, Hazra S, Raja TV, Alex R, Kumar A, Alyethodi RR, Kant R, Jakshara S, Joshi CG (2018b): Identification of differentially expressed microRNAs in Sahiwal (Bos indicus) breed of cattle during thermal stress. *Cell Stress and Chaperones* <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0911-4>. doi: 10.1007/s12192-018-0911-4.
67. Shao-Yao Y, Donald CC, Shi-Lung L (2018): *MicroRNA Protocols*. p:1-26. In: *The MicroRNA*, Edit.: Shao-Yao Y, Third Edition, Humana Press, ISBN: 978-1-4939-7601-0, New York, USA.
68. Shergojry SA (2011): *Molecular Genetic Characterization of HSP90 gene in Deoni (Bos indicus) cattle*. Master Thesis, National Dairy Research Institute, Karnal (Deemed University), Bangalore, India.
69. Srikanth K, Lee E, Kwan A, Lim Y, Lee J, Jang G, Chung H (2017): Transcriptome analysis and identification of significantly differentially expressed genes in Holstein calves subjected to severe thermal stress. *International Journal of Biometeorology* 61 (11): 1993-2008.
70. Suqueli Garcia MF, Castellote MA, Feingold SE, Corva PM (2017): Characterization of a deletion in the Hsp70 cluster in the bovine reference genome. *Animal Genetics* 48 (4): 377-385.
71. Thorat BN, Thombre BM, Narwade SG (2016): Studies on effect of climatic parameters on monthly lactation milk yields in Deoni cattle of Maharashtra, India. *Indian Journal of Animal Research* 50 (1): 31-34.
72. Trifković J, Jovanović L, Đurić M, Stevanović-Đorđević S, Milanović S, Lazarević M, Sladojević Z, Kirovski D (2018): Influence of different seasons during late gestation on Holstein cows' colostrum and postnatal adaptive capability of their calves. *International Journal of Biometeorology* 62 (6): 1097-1108.
73. Uslucan B (2017): Siyah alaca sığırlarda süt ve döl verim özellikleri ile bazı davranış parametreleri üzerine etkili çevre faktörlerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
74. Üçeş H (2005): Sıcaklık stresinin döl verim kriterleri üzerine etkisi ve süt verimi ile ilişkileri açısından sürü kayıtlarının değerlendirilmesi üzerine bir çalışma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
75. Verma N, Gupta I D, Verma A, Kumar R, Das R, Vineeth MR (2016): Novel SNPs in HSPB8 gene and their association with heat tolerance traits in Sahiwal indigenous cattle. *Tropical Animal Health and Production* 48 (1): 175-180.
76. Wang Y, Huang J, Xia P, He J, Wang C, Ju Z, Li J, Li R, Zhong J, Li Q (2013): Genetic variations of HSBP1 gene and its effect on thermal performance traits in Chinese Holstein cattle. *Molecular Biology Reports* 40: 3877-3882.
77. Wang Z, Wang G, Huang J, Li Q, Wang C, Zhong J (2011): Novel SNPs in the ATP1B2 gene and their associations with milk yield, milk composition and heat-resistance traits in Chinese Holstein cows. *Molecular Biology Reports* 38: 1749-1755.
78. Xiong Q, Chai J, Xiong H, Li W, Huang T, Liu Y, Suo X, Zhang N, Li X, Jiang S, Chen M (2013): Association analysis of HSP70A1A haplotypes with heat tolerance in Chinese Holstein cattle. *Cell Stress and Chaperones* 18 (6): 711-718.

# Spermatozoon liyofilizasyonu: Hayvan genetik kaynaklarının korunması için yeni bir saklama modeli olabilir mi?

İlktan Baştan<sup>1</sup> , Ergun Akçay<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi M¼d¼rl¼đ¼ Lalahan Mamak/Ankara

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fak¼ltesi, D¼lerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara

**Geliş Tarihi** / Received: 11.09.2019, **Kabul tarihi** / Accepted: 19.03.2020

**zet:** Her ülkenin, kendine zg¼ hayvan genetik kaynaklarını, nesli t¼kenme tehlikesine karşın veya gelecekte gen aktarım çalışmaları için koruması, önemli bir stratejik planlamadır. Gen bankalarında sıvı azot bağımlı olarak saklanan spermatozoon genetik materyallerinin, sıvı azot ile kontaminasyon riskinin bulunması ve sıvı azot ikmali aksaklıklarına bağlı olarak, spermatozoonların zarar görerek fertilizasyon yeteneğini kaybetmesi muhtemeldir. Son yıllarda sıvı azot ile spermatozoon saklama modeline alternatif olarak gösterilen spermatozoon liyofilizasyonu (dondurup-kurutarak saklama) işlemi sonucunda, spermatozoon motilite kaybı ve h¼cre membran hasarı gr¼lmesine rağmen DNA b¼t¼nl¼đ¼ korunmaktadır. Liyofilize spermatozoon genetik materyalinin, intra-sitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu (ICSI) ile laboratuvar hayvanları başta olmak üzere yaban hayvanları ve çiftlik hayvanlarında in vitro fertilizasyon uygulaması ile yavru alınması m¼mk¼nd¼r. Bu derlemede liyofilize spermatozoon protokolleri, saklama koşulları ve in vitro fertilizasyon çalışmaları hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Gen bankası, kriyokonservasyon, dondurarak- kurutma, yardımcı reme teknikleri.

## Lyophilization of sperm: Can it be a new storage model for conservation of animal genetic resources?

**Abstract:** The conservation of the unique animal genetic resources for endangered or future gene transfer studies is an important strategic planning for each country. Sperm stored in gene banks are at the risk of contamination with liquid nitrogen and also sperm can be damaged and lose fertilization ability due to liquid nitrogen replenishment failure. Sperm lyophilization (freeze-drying) process, which is indicated as an alternative to sperm storage model with liquid nitrogen, preserves sperm DNA integrity despite the loss of motility and cell membrane damage of the sperm. By using of intracytoplasmic sperm injection method, it is possible to produce offsprings from lyophilized sperm samples in wild animals and farm animals as well as in laboratory animals. In this review, it was aimed to give information about lyophilized sperm protocols, storage conditions and in vitro fertilization studies.

**Key words:** Gen bank, cryoconservation, freeze-drying, assisted reproduction techniques.

## Giriş

Her ülkenin, bulunduğu çevreye uyum sağlamış, tarımsal ekosistemin halkası olan kendine zg¼ hayvan genetik kaynakları bulunmaktadır. Bu hayvan genetik kaynaklarından bazılarının nesli, bilinçsiz melezleme, avlanma ve doğal afetler gibi çeşitli unsurlarla t¼kenmiř veya t¼kenme tehlikesi altındadır. Mevcut hayvan genetik kaynaklarının, nesli t¼kenme tehlikesine karşın veya gelecekte gen aktarım çalışmaları için korunması, her ülkenin benimsediği önemli bir stratejik planlamadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım rg¼t¼ (FAO) tarafından hayvan genetik kaynaklarının korunması ve s¼rd¼r¼lebilir kullanımı için üç yöntem önerilmektedir; i) doğal yaşam alanında yetiştirici şartlarında (in situ in vivo) koruma, ii)

doğal yaşam alanı dışında özel koruma s¼r¼lerinde canlı (ex situ in vivo) koruma ve iii) spermatozoon, embriyo, oosit, somatik h¼cre ve DNA gibi genetik materyallerin dondurularak, uzun s¼reler saklanmasını sağlayan gen bankalarında (ex situ in vitro) koruma [10].

Binlerce hayvana ait genetik materyalin pratik olarak korunmasına imkan sağlayan gen bankaları, ülkemizin de dahil olduğu 64 ülkede kurulmuş, 41 ülkede de kurulmaları planlanmıştır. Hayvan genetik materyalleri arasında sperma kriyoprezervasyonu (dondurup-saklama), diğer genetik materyallere göre, kolay elde edilebilir olması ve daha pratik yavru alabilme imkânı sağlamasıyla, gen bankalarının temelini oluşturmaktadır [3]. Ancak sıvı azota

**Yazışma adresi / Correspondence:** İlktan Baştan, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi M¼d¼rl¼đ¼ Mamak/Ankara E-posta: [ilktan@outlook.com](mailto:ilktan@outlook.com)

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0001-8155-1960 • <sup>2</sup>0000-0002-7491-5671

bağımlı olarak kullanılan bu tekniğin, sıvı azot ile kontaminasyon riskinin bulunması ve sıvı azot ikmalı aksaklıklarına bağlı olarak, spermatozoonların zarar görebilmesinin yeteneğini kaybetmesi muhtemel sonuçtur. Bu durum araştırmacıları, sıvı azot ile saklama metoduna alternatif yöntem arayışlarına yönlendirmiştir. Son dönemde yapılan araştırmalar sonucunda, bu alternatif yöntemlerin başında spermatozoon liyofilizasyonu gelmektedir [6, 16, 36, 53].

Bu derlemede, farklı memeli türlerinden, liyofilize spermatozoon protokolleri, saklama koşulları ve in vitro fertilizasyon çalışmaları hakkında güncel bilgiler sunulmaktadır, gelecekte yapılacak olan çalışmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır.

### Liyofilizasyon Nedir?

Prokaryot ve ökaryot hücreler yaklaşık %70-90 oranında su içermektedir. Su hücreler içerisinde biyokimyasal aktiviteleri destekleyen, onların metabolik aktivitelerinin devam etmesini sağlayan bir çözücü olduğu gibi olumsuz koşullarda ise hücre yapısının bozulması ve otoliz süreci için gereken ortamı sağlayan bir moleküldür [9, 17]. Liyofilizasyon veya dondurarak kurutma (freeze-drying) işlemi, biyolojik materyallerin dondurulup, düşük basınç altında buzun süblimasyonu (buzun sıvı hale geçmeden uzaklaşması) ile su miktarının herhangi bir metabolik reaksiyonu desteklemeyecek seviyeye kadar azaltılması işlemidir. Böylece liyofilize edilen ürünlerin oda sıcaklığında veya +4°C'de daha az maliyetle muhafaza edilmesi ve taşınması mümkün olmaktadır [31, 54].

### Liyofilizasyon Metodunun Tarihsel Gelişimi

Liyofilizasyon işleminin tarihsel gelişimi, Eskimoların avladıkları balıkları soğuk, kuru Arktik rüzgârlara maruz bırakarak suyun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Benzer uygulamalara Viking ve İnka toplumlarında da rastlanıldığı bildirilmektedir. Bu toplumlarda, basıncın ve sıcaklığın düşük olduğu yüksek tepeleri doğal yiyecek koruyucu depolar olarak kullandıkları belirtilmektedir [2, 17]. On dokuzuncu yüzyıl başlarında farklı bilim insanları tarafından bakteri, virüs, ilaç, kan ve doku liyofilizasyon çalışmaları yapılmıştır. Penisilini keşfeden bakteriyolog A. Fleming klinik çalışmalarında liyofilize mikroorganizmaları sıkça kullandığını belirterek ilk olarak "liyofilizasyon" terimini kullanmıştır [7, 14, 15, 45]. Günümüzde liyofilizasyon metodu, özellikle gıda ve ilaç endüstrisindeki ürünleri, işlevsel saklama imkânı sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadır.

### Spermatozoon Liyofilizasyonu

Tesadüfen gliserolü keşfederek başarılı spermatozoon kriyoprezervasyon çalışmaları yapan Polge ve ark. [44], aynı dönemde ilk kez horoz spermatozoonları ile liyofilizasyon çalışmaları yapmış ancak başarılı sonuç bildirilmemiştir [8, 48]. Spermatozoon liyofilizasyon çalışmaları, Wakayama ve Yanagimachi [50], tarafından yapılan çalışma ile ivme kazanmıştır. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada, liyofilize fare spermatozoonlarının hareketsiz, ölü olduklarını fakat DNA'larının bozulmadığını fark etmişler ve genetik materyali, intra-sitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu (ICSI) yoluyla oositlerin fertilizasyonunda kullanarak, yavru alınabileceğini göstermişlerdir. Liyofilizasyon sürecinde oluşan mekanik ve ozmotik stres spermatozoon membranında hasara yol açmakta ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Ancak memeli spermatozoon nükleusu son derece stabil ve yüksek yoğunlukta, somatik hücrelere kıyasla 6 kat daha fazla kompakt ve 40 kat daha az DNA hacmi ile özgün bir DNA organizasyonuna sahiptir. Bu özgün DNA yapısı, fertilizasyon öncesi ekzojen ajanlara karşı hücreyi koruma ve hasarları asgariye indirme bakımından hayati önem taşımaktadır [52].

### Spermatozoonun Liyofilizasyon Aşamaları

*Spermatozoonun liyofilizasyona hazırlanması:* Liyofilizasyon için taze veya dondurulmuş sperma kullanılabilir gibi epididimal spermatozoon da kullanılabilir. Liyofilizasyon öncesi spermatozoonun seminal plazma veya sperma sulandırıcılarından seperasyonu için çeşitli ayrıştırma yöntemleri (percoll gradient, swim up) uygulanmaktadır [17, 48]. Ancak, koç sperması gibi ekzojen etkenlere karşı hassas olan türler için spermatozoon ayrıştırılmadan da liyofilize edilebilmektedir [5, 40]. Liyofilizasyon için spermatozoon sulandırıcısı olarak, fetal sığır serumu, monosakkarit veya disakkaritler (trehaloz), L-glutamin, sodyum pürivat, etilen diamin tetra asetat (EDTA), esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler ve antibiyotik gibi çeşitli tampon, besin ve koruyucu madde bileşiklerinin eklendiği ticari kültür sulandırıcıları (TCM-199, DMEM, TRIS) kullanılabilir. Güncel liyofilize spermatozoon çalışmalarında ise Tris-HCl, EGTA bazlı [10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl ve 50 mmol/L etilen glikol bis ( $\beta$ -amino-etil-eter) tetra asetik asit (EGTA), pH 8.2] sperma sulandırıcısı ile başarılı sonuç alınan çalışmalar bulunmaktadır [17]. Sulandırılan sperma numunesi oda sıcaklığında 30 dakika ekilibrasyon sürecine bırakılmaktadır. Ekilibrasyon süreci sonrasında istenilen dozlarda ( $5 \times 10^4$  spermatozoa/ml gibi) dozlanarak cam veya

plastik kriyojenik tüplere aktarılır. Kriyojenik tüpler içerisindeki numuneler, sıvı azot içerisine daldırılarak (-196°C, 20-30s) veya azot gazı buharında (-140°C, 5dk) hızlı dondurma işlemi gerçekleştirilir [47, 49]. Konvansiyonel kriyoprezervasyon yönteminin aksine, dondurma işleminin hızlı yapılması, hücreler arasındaki buz kristallerinin hacminin büyük olması dolayısıyla daha başarılı liyofilizasyon işleminin gerçekleşmesi amacıyla yapılmaktadır [39].

**Spermatozoon liyofilizasyonu:** Genel olarak spermatozoon liyofilizasyonu üç aşamada gerçekleştirilmektedir; dondurma, esas kurutma ve son kurutma.

Spermatozoon dondurma işlemi liyofilizasyon cihazında yapılabildiği gibi, cihazı ve zamanı verimli kullanmak amacıyla, sıvı azot içerisinde veya azot gazı buharında yapılması tercih edilmektedir [13]. Dondurulmuş sperma numuneleri önceden soğutulmuş (-30°C - -80°C) liyofilizatör içerisine yerleştirilerek esas kurutma işlemine geçilir. Bu süreçte kademeli olarak sıcaklık artışı (+37°C ye kadar) ve basıncın düşürülmesi (1,98-0,03 mbar) ile numunelerdeki suyun yaklaşık %90'ı sıvı hale geçmeden doğrudan, katı buz halden gaz haline geçerek yani süblimasyona uğrayarak uzaklaştırılmaktadır (serbest suyun tamamı ve bağıl suyun bir kısmı). Geriye kalan, ürünün yapısal bütünlüğünü sağlayan bağlanmış su, esas kurutmada kullanılan daha düşük atmosferik basınç ile birlikte yüksek sıcaklık uygulanarak uzaklaştırılmaktadır [17, 48]. Genel olarak bu üç aşamada yapılan spermatozoon liyofilizasyon işlemi, son kurutma işlemi uygulanmadan, esas kurutma süresinin uzatılmasıyla (12-30 saat) iki aşamada gerçekleştirilebilmektedir [11, 29]. Liyofilize spermatozoon numuneleri, nemli ortamlardan uzak vakumlu tüpler içerisinde muhafaza edilmeli, ışıktan korunmalıdır. Öngörülen kullanım süresine göre oda sıcaklığında veya +4°C'de saklanabileceği gibi daha uzun süre muhafaza için -20°C'de veya -80°C'de saklanması önerilmektedir [6, 28].

### Spermatozoon Liyofilizasyonunu Etkileyen Faktörler

**Basınç ve liyofilizasyon süresi:** Bu iki faktör liyofilizasyon esnasında spermatozoon fonksiyonunu önemli derecede etkileyen unsurlardır. Birbirleri arasındaki etkileşim liyofilizasyon kinetiğini ve dehidrasyon oranını belirler (Tablo 1) [20]. Esas kurutma esnasında farklı basınçlar uygulayarak liyofilize edilen fare spermatozoonları 0,37 mbar basınç altında, 1,03 ve 0,04 mbar basınca göre DNA bütünlüğü ve ICSI başarısı açısından daha iyi sonuçlar vermektedir [28]. Domuzlarda, spermatozoonun liyofilizasyon süresi-

nin 4 saatten 24 saate uzatılması, ICSI uygulamasıyla yapılan in vitro fertilizasyon başarısını, olumsuz etkilemektedir [33].

**Tablo 1.** Liyofilize spermatozoon ile yavru veya blastosist aşaması elde edilen çalışmalarda, kullanılan solüsyon ve liyofilizatör basınç, süre kalibrasyonu.

Tür	Basınç (mbar)	Süre (saat)	Solüsyon	Kaynak
Fare	0,001	12	CZB, DMEM ve fetal siğir serumu	[50]
Fare	0,032 <sup>a</sup> ve 0,040 <sup>b</sup>	4	Tris-HCl, EGTA	[32]
Fare	0,030 <sup>a</sup> ve 0,045 <sup>b</sup>	4	Tris-HCl, EDTA	[24]
Tavşan	0,023 <sup>a</sup> ve 0,040 <sup>b</sup>	4	Tris-HCl, EGTA	[34]
Boğa	0,19	12-18	TCM-199, fetal siğir serumu	[29]
Ayır	0,133	30	DMEM, fetal siğir serumu	[11]

<sup>a</sup>Esas kurutma ve <sup>b</sup>son kurutma basınç değerleri. CZB; Chatot - Ziomek - Bavister, DMEM; Dulbecco'un Modifiye Eagle Medyumuna, EGTA; Etilen glikol tetra asetik asit, EDTA; Etilendiamin tetra asetik asit, TCM-199; Doku kültür medyumuna - 199.

**Liyofilizasyon solüsyonları ve pH değeri:** Liyofilizasyon işleminde kullanılacak solüsyonların spermatozoon DNA bütünlüğünün korunmasını sağlaması, liyofilizasyon sıcaklığı ve basıncında kolayca dehidre olması ve işlem sonrasında uygun şekilde rehidrasyonu önemlidir. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda araştırmacılar bu uygunluğu farklı maddelerin kombinasyonları ile sağlamaktadır. Liyofilizasyon solüsyonuna farklı maddeler ekleyerek koruyucu özelliğini artırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir [17]. Liyofilize spermatozoon kullanılarak, ICSI tekniği ile farelerde ilk başarılı yavru elde edildiği çalışmada, iki yaygın kültür medyumuna (CZB ve DMEM) eklenmiş %10 fetal siğir serumu kullanılmıştır [50]. Günümüzde yaygın olarak kullanılan liyofilizasyon solüsyonu Tris-HCl ve NaCl kombinasyonudur. Liyofilizasyon solüsyonlarına EGTA, EDTA, DMSO, Vit E, sorbitol ve laktoz ilavesi DNA bütünlüğünü korumada olumlu etki yaratmaktadır. Farklı hayvan türlerinde (fare, boğa, ayır, tavşan ve bazı yaban hayvan türleri) yapılan liyofilize spermatozoon çalışmaları sonucunda, DNA bütünlüğü için en uygun solüsyon pH değerinin 8 olduğu öngörülmektedir [1, 18, 20, 22, 23, 26, 28, 29, 32].

**Liyofilize spermatozoon depolama süresi ve sıcaklığı:** İn vitro veya in vivo embriyonik gelişme sağlanan çalışmalarda liyofilize fare, siçan, tavşan spermatozoonları oda sıcaklığında 1 ay muhafaza edilebilmiştir. Domuz spermatozoonlarının +4 °C'de 3 aydan daha fazla bulundurulmasının DNA bütünlüğünü olumsuz etkilediği belirtilmektedir [20, 37].

Kaneko ve Serikawa [25], taze, kısa süreli ve +4 °C'de 3 yıl süre ile muhafaza edilen liyofilize fare spermatozoonlarının, fare oositleri ile in vitro embriyonik gelişim oranları arasında, önemli bir fark olmadığını belirtmiştir. Liyofilize spermatozoonunun, +4°C'de veya oda sıcaklığında saklama süresi türlere göre farklılık göstermesine rağmen, uzun yıllar saklanma için -20°C'de veya -80°C'de saklanması önerilmektedir [6, 28].

### Etkin Liyofilize Spermatozoon Çalışmaları

Spermatozoon liyofilizasyonu araştırmalarındaki temel hedef, in vitro fertilizasyon (IVF) veya suni tohumlama uygulamalarında kullanılmak üzere gerekli olan spermatozoon motilitesinin ve fertilizasyon kapasitesinin korunmasını sağlamaktır. Dondurma ve kurutma sürecinde oluşan mekanik ve ozmotik stres, spermatozoon membranında hasara yol açmakta, bunun sonucunda motilite kaybı ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ancak spermatozoonun oosit içerisine mikroenjeksiyonu, rutin olarak birçok embriyo laboratuvarında kullanıldığı için motilite kaybı artık fertilizasyon için bir engel teşkil etmemektedir [30, 36]. Ayrıca liyofilize fare spermatozoonlarından üretilen blastosit aşamasındaki embriyolarda kromozomal anomaliler, doğan yavruların büyüme hızı ve patolojik değişiklikleri açısından taze spermatozoon ile kıyaslanabilir durumdadır. Bu durum spermatozoon genetik materyalinin liyofilizasyon ve rehidrasyon süreçlerinden etkilenmediğini göstermektedir. Aynı zamanda bu durum belli oranda DNA hasarına sahip spermatozoonun, oosit genetik materyalinde bulunan DNA onarım genlerinin aktivasyonu, spermatozoon DNA hasarının, giderilmesiyle açıklanmaktadır [12, 19, 21, 30, 37, 51].

Liyofilizasyon sonrası boğa spermatozoonlarında, kalsiyum salınımı uyarım yeteneği, hafif ölçüde azalmakta ve bu durum oosit aktivasyonunu olumsuz etkilemekte, fertilizasyon başarısını önemli ölçüde düşürmektedir [20]. Keskintepe ve ark. [29], liyofilize boğa spermatozoonunun, oosit aktivasyonunu uyaran şelatlar (iyonomisin, 6-dimetil amino pürine) ile muamele ederek in vitro fertilizasyon çalışmalarında kabul edilebilir blastosit oranları elde etmişlerdir. Kriyoprezervasyon için en hassas DNA'ya sahip tür olan koç spermatozoonu ile liyofilizasyon çalışmaları sınırlı sayıdadır [35]. Liyofilizasyon solüsyonuna antioksidan (rosmarinik asit) ilavesi DNA bütünlüğünü artırmakta, ancak fertilizasyon oranı ve embriyonik evre gelişimi açısından önemli bir katkı sağlamamaktadır [43]. Yapılan başka bir araştırmada ise liyofilize koç spermatozoonunun, oosit içerisine mikroenjeksiyon uygulaması ile %32,8 blastosit oranı elde

edilmiştir [40]. Choi ve ark. [11], liyofilize aygır spermatozoonlarının, spermatozoon sitozol ekstratı çıkarılarak muamele edilmesinin, oosit aktivasyonuna katkı sağlayarak, kaliteli embriyo üretiminde ve yavru alınmasında destek sağlayabileceğini, çalışmalarından aldıkları iki tay ile kanıtlamışlardır. Bu çalışma laboratuvar hayvanları dışında, çiftlik hayvanlarında yavru alınan tek çalışmadır. Evcil veya vahşi hayvan türlerinden, birçok hayvanın liyofilize spermatozoonları elde edilmesine rağmen laboratuvar hayvanları dışında yavru alınan çalışmalar sınırlıdır. Bunun sebebi olarak laboratuvar hayvanlarından oosit elde edilmesinin daha pratik olmasının yanı sıra in vitro fertilizasyon sürecinde oosit aktivasyonun da daha pratik olması belirtilmektedir. Farklı hayvan türlerinden elde edilen liyofilize spermatozoon numunelerinin, fertilizasyon özelliğini belirlemek amacıyla fare oositleri ile in vitro fertilizasyon çalışmalarının yaygınlığı, bu durumu ispatlar niteliktedir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Farklı türlere ait liyofilize spermatozoon çalışmaları ve başarı kriterleri.

Tür	Başarı Kriteri	Kaynak
İnsan	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[32]
Koç	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[40, 43]
Manda	DNA Bütünlüğü	[47]
Kedi	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[45]
Köpek	DNA Bütünlüğü, ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[41]
Zürafa	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[26]
Jaguar	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[26]
Şempanze	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[26]
Sansar	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[26]
Domuz	ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[33]
Laboratuvar Hayvanları (Rat, Hamster, Tavşan)	DNA Bütünlüğü, ICSI ile İn Vitro Fertilizasyon	[25, 34, 38]

ICSI; intra-sitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu.

### Sonuç

Gen bankalarında sıvı azot ile dondurulmuş spermaların saklanması pratik bir uygulama olarak görülebilir, ancak sıvı azotun sürekli buharlaşarak fire vermesi, sürekli sıvı azot ikmali gerektirmektedir [4]. Zamanında sıvı azot ikmali yapılamaması durumunda, mevcut genetik materyallerin kullanılamaz hale gelmesi, kaçınılmaz bir tehlikedir. Ayrıca sıvı azot temini, gen bankasının bulunduğu bölgeye göre değişkenlik gösteren süresiz bir ekonomik yüküdür. Bu yüzden, gen bankalarında bulunan genetik materyallerin en az iki gen bankasında, farklı yöntemler ile her olasılığa karşı yedeklenmesi FAO'nun önerileri

içerisinde dir [10]. Bu amaçla, son yıllarda liyofilizasyon tekniği yeni bir metot olarak memeli spermatozoonlarında kullanılmaktadır. Sıvı azota bağımsız ve farklı sıcaklıklarda (+25°C, +4°C, -20°C, -80°C) daha ekonomik saklama imkânı sağlayan bu metodu, gelecekte ıslah çalışmalarında ve genetik çeşitliliği korumak amacıyla gen bankalarında kullanılması birçok araştırmacı tarafından öngörülmektedir [27]. 1949 yılında Polge'nin sperma sulandırıcısına tesa-düfen ilave ettiği gliserol ile başlayan spermatozoon kriyoprezervasyonu, günümüzde herkes tarafından kullanılabilen, saha şartlarına uygun bir protokole uyarlanmıştır [44]. Liyofilizasyon çalışmalarındaki basınç ve liyofilizasyon sürelerinin farklılığı, kriyoprezervasyon metodu gibi bilim insanları tarafından kabul gören ortak bir liyofilizasyon protokolünün olmadığına göstergesidir. Bu durum hayvan türlerine özgü, farklı yöntemler ve liyoprotektanlar adını verebileceğimiz, liyofilizasyonun spermatozoon üzerindeki olumsuz etkilerini, elemine edebilecek maddeler ile liyofilizasyon protokollerinin optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir. Hızla gelişen teknoloji ve bilimsel çalışmaların ışığında, liyofilize spermatozoon metodunun, gelecek yıllarda hayvancılık endüstrisinde ve gen bankalarında, rutin yardımcı üreme tekniklerinden birisi olarak kullanılması, mümkün kılınabileceği düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Abdalla H, Hirabayashi M, Hochi S (2009): The ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and resumption of meiosis. *Theriogenology*, 71(3): 543-52.
- Adams GDJ, Cook I, Ward KR (2015): The principles of freeze-drying. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Ed.: Wolkers WF, Oldenof H, s:121-143.
- Akın AO (2017): Çiftlik Hayvanları genetik kaynaklarının korunması ve sürdürülebilir kullanımı küresel stratejilerinin ve Türkiye örneğinin değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ak K, Cirit Ü, Sandal Aİ, Arıcı R, Özmen MF (2017): Dondurulmuş Spermanın Depolanması ve Kullanımında Saha Koşullarında Yapılan Hatalı Uygulamalar ve Çözüm Önerileri. *Türkiye Klinikleri Reproduction and Artificial Insemination-Special Topics*, 3(1): 44-59.
- Anzalone DA, Palazzese L, Iuso D, Martino G, Loi P (2018): Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species. *Animal Reproduction Science*, 190: 85-93.
- Arav A, Saragusty J (2016): Directional freezing of sperm and associated derived technologies. *Animal Reproduction Science*, 169: 6-13.
- Benedict M (1905): The determination of water in foods and physiological preparations. *Ann J Physiol*, 13: 309-329.
- Bialy G, Smith VR (1957): Freeze-drying of bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 40: 739-745.
- Billy D, Potts M (2001): Life and death of dry prokaryotes. *Res Microbiol*, 153: 7-12.
- Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) (2012): Cryoconservation of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12*. Rome.
- Choi YH, Varner D, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K (2011): Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction*, 142: 529-538.
- Derjick AA, Heijden GW, Giele M, Philippens ME, Van Bayel CC, Boer P (2006): Gamma H2AX signaling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *DNA Repair* 5: 959-971.
- Ergün Z (2015). Biyolojik maddelerin kurutulmuş saklanması: liyofilizasyon. *Etilik Vet Mikrobiyoloji Dergisi*, 26(1): 35-40.
- Flosdorf EW, Mudd S (1935): Procedure and apparatus for preservation in "lyophile" form of serum and other biological substances. *The J. of Immunology*, 29(5): 389-425.
- Flosdorf EW, Kimball AC (1939): Studies with H. Pertussis: Maintenance of Cultures in Phase I. *J Bacteriol* 35: 696-704.
- Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello B, Pescatori ES, Ferraretti AP (2012): DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertility and sterility*, 97(5): 1067-1073.
- Gil L, Olaciregui M, Luño V, Malo C, González N, Martínez F (2014). Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 49: 72-81.
- Hara H, Tagiri M, Hwang IS, Takahashi M, Hirabayashi M, Hochi S (2014): Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. *Cryobiology*, 68(3): 354-360.
- Harrouk W, Codrington A, Vinson R, Robaire B, Hales BF (2000): Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutation Research*, 461: 229-241.
- Hochi S, Abdalla H, Hara H, Hirabayashi M (2011): Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 57(5): 557-563.
- Jaroudi S, Kakourou G, Cawood S, Doshi A, Ranieri DM, Serhal P (2009): Expression profiling of DNA repair genes in human oocytes and blastocysts using microarrays. *Human Reproduction*, 24: 2649-2655.
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R (2003a): Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*, 68(1): 136-139.
- Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW, Yanagimachi R (2003b): Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulphidylolizeide status. *Biology of reproduction*, 69(6): 1859-1862.
- Kaneko T, Nakagata N (2006): Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology*, 53(2): 279-282.
- Kaneko T, Serikawa T (2012): Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. *Cryobiology*, 64(3): 211-214.
- Kaneko T, Ito H, Sakamoto H, Onuma M, Inoue-Murayama M (2014): Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLoS one*, 9(11): e113381.
- Kaneko T (2016): Sperm freeze-drying and micro-insemination for biobanking and maintenance of genetic diversity in mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(8): 1079-1087.



28. Kawase Y, Araya H, Kamada N, Jishage K, Suzuki H (2005): Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*, 72(3): 568-573.
29. Keskindepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, Norris K, Curuk MA, Khan I, Brackett BG (2002): Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67(2): 409-415.
30. Keskindepe L, Eroğlu A (2015): Freeze-drying of Mammalian Sperm. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Ed.: Wolkers WF, Oldenof H, p:489-497.
31. Krokida MK, Karathanos VT, Maroulis ZB (1998): Effect of freeze-drying conditions on shrinkage and porosity of dehydrated agricultural products. *Journal of Food Engineering*, 35(4): 369-380.
32. Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y (2007): Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Human Reproduction*, 23(2): 233-239.
33. Kwon IK, Park KE, Niwa, K (2004): Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71(5): 1430-1436.
34. Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Yang X (2004): Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biology of Reproduction*, 70(6): 1776-1781.
35. Lopez-fernandez C, Fernandez JL, Gosalbez A, Arroyo F, Vazquez JM, Holt WV, Gosalvez J (2008): Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: Ram. *Theriogenology*, 70(6): 898-908.
36. Malik A, Laily M, Zakir MI (2015): Effects of long term storage of semen in liquid nitrogen on the viability, motility and abnormality of frozen thawed Frisian Holstein bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1): 22-25.
37. Men NT, Kikuchi K, Furusawa T, Dang-Nguyen TQ, Nakai M, Fukuda A, Tajima A (2016): Expression of DNA repair genes in porcine oocytes before and after fertilization by ICSI using freeze-dried sperm. *Animal Science Journal*, 87(11): 1325-1333.
38. Morishita N, Ochi M, Horiuchi T (2019): Development of golden hamster embryos effectively produced by injection of sperm heads sonicated in Tris-HCl buffer with EGTA. *Reproductive Medicine and Biology*, 18(1): 83-90.
39. Nireeaha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Babu MN, Lavakumar V (2013): Lyophilization/freezing—an review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(4): 87-98.
40. Nur Z, Birlir S, Üstüner B, Zık B, Özdaş ÖB, Akkoç CÖ (2009-2012). Koç spermının liyofilizasyonu ve intra-stoplazmik sperm enjeksiyonu yöntemi ile embriyo üretimi. (Yayınlanmamış veriler) TÜBİTAK Projesi, TEBAĞ 108R018.
41. Olaciregui M, Luño V, Gonzalez N, De Blas I, Gil L (2015): Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. *Cryobiology*, 71(2): 286-290.
42. Olaciregui M, Luño V, Martí JI, Aramayona J, Gil L (2016): Freeze-dried stallion spermatozoa: evaluation of two chelating agents and comparative analysis of three sperm DNA damage assays. *Andrologia*, 48(9): 988-994.
43. Olaciregui M, Luño V, Domingo P, González N, Gil L (2017): In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Scientific Reports*, 7(1): 1096.
44. Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172): 666.
45. Ringleb J, Waurich R, Wibbelt G, Streich WJ, Jewgenow K (2011): Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(6): 818.
46. Shackell LF (1909): An improved method of desiccation, with some applications to biological problems. *Ann J Physiol* 20: 325-340.
47. Shahba MI, El-Sheshtawy RI, El-Azab AS, Abdel-Ghaffar AE, Ziada MS, Zaky AA (2016): The effect of freeze-drying media and storage temperature on ultrastructure and DNA of freeze-dried buffalo bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(6): 524-535.
48. Sherman JK (1954): Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. *Fertility and sterility*, 5(4): 357-371.
49. Şen U (2013): Liyofilize spermanın in vitro embriyo üretiminde kullanımı. 8. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 5-7 Eylül, Bildiri Kitabı, s:183-188.
50. Wakayama T, Yanagimachi R (1998): Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature Biotechnology*, 16(7): 639-641.
41. Wossidlo M, Arand J, Sebastiano V, Lepikhov K, Boiani M, Reinhardt R, Walter J (2010): Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *The EMBO journal*, 29(11): 1877-1888.
52. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*, Knobil E, Neill JD, Eds.: Raven Press, p:189-317.
53. Yavaş İ, Cantekin Z, Korkmaz Yavaş T (2013): Sıvı azot ile yapılan kryopreservasyon tekniklerinde mikrobiyal kontaminasyon riskleri ve çözüm önerileri. *Lalahan Hay. Arşt. Enst. Derg.* 53(1): 39-45
54. Yöney T (2005): Gıdaları dondurarak kurutup saklamak nasıl çalışır? *Bilim teknik dergisi*, 12:101.

