

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ABOMAZUM DEPLASMANLI SÜTÇÜ SIĞIRLARDA NMR
BAZLI SERUM İDRAR VE KARACİĞER METABOLOM
PROFİLİ**

Erdem GÜLERSOY

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Abdullah BAŞOĞLU

KONYA-2020

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ABOMAZUM DEPLASMANLI SÜTÇÜ SIĞIRLARDA NMR
BAZLI SERUM İDRAR VE KARACİĞER METABOLOM
PROFİLİ**

Erdem GÜLERSOY

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Abdullah BAŞOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (Proje No: 17102035) ve ayrıca Avrupa Araştırma Altyapıları Strateji Forumu (ESFRI) CERM/CIRMMP merkezi Avrupa Komisyonu iNEXT tarafından (Proje No: 653706) desteklenmiştir.

KONYA-2020

ÖNSÖZ

Yüksek verimli sütçü sığırların %35-50'lik kısmı doğumdan sonra metabolik ve enfeksiyöz hastalıklardan etkilenirler. Abomazum deplasmanı (AD) genellikle laktasyon başlangıcındaki sütçü sığırlarda ekonomik kayıplara sebep olan multifaktöriyel bir hastalıktır. Amerika'da abomazum deplasmanı insidansı %3.5 olarak rapor edilmiştir. Avrupa ülkelerinde de bu seviyeler civarındadır. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniğine son 5 yılda getirilen 2610 adet büyükbaş çiftlik hayvanında tespit edilen abomazum deplasmanı oranı %4,75'tir. Abomazum deplasmanı vakalarının %76,6'sı sola, %23,4'ü sağa abomazum deplasmanıdır. Her abomazum deplasmanı vakasının teşhis, medikal tedavi ve post operatif bakım maliyeti ortalama 700 Amerikan Dolarıdır. Önemli ekonomik kayıpla seyreden bu bozukluğun daha iyi anlaşılabilmesi için ulusal ve uluslararası düzeyde birçok çalışma yapılmakla birlikte patogenezi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu sebeple periparturient dönemde sık karşılaşılan ketozis, yağlı karaciğer sendromu, hipokalsemi ve abomazum deplasmanı gibi üretim hastalıklarının metabolik arka planlarını aydınlatmak için omik bilimleri önemli hale gelmiştir. Bu hastalıkların kompleks patogenezi inceleyen çok değişkenli ve geniş skalalı omik (genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik) yaklaşımlar, organizmanın anlık biyokimyasal durumunu gösterebildiği gibi uzun sürede de belirli moleküler yolların hastalık durumunda zamanla nasıl değiştiği hakkında bilgi verir. Omiklerden biri olan metabolomik ölçümler, çeşitli vücut sıvı ve dokularından elde edilen metabolom profilleri ile abomazum deplasmanlı sığırların metabolik görünümünün daha iyi değerlendirilmesine katkı sağlayabilmektedir.

Bu çalışmada, abomazum deplasmanlı sütçü sığırların metabolizmalarını serum, idrar ve karaciğer ekstraktları üzerinden Nükleer Manyetik Rezonans bazlı metabolomik yaklaşımla daha kapsamlı değerlendirip, hastalığın patogenezi aydınlatmaya katkı sağlamak hedeflenmiştir.

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (Proje no: 17102035) ve ayrıca Avrupa Araştırma Altyapıları Strateji Forumu (ESFRI) CERM/CIRMMP merkezi Avrupa Komisyonu iNEXT tarafından (Proje no: 653706) desteklenmiştir.

Araştırmanın planlanmasından yazım aşamasına ve yayınlanmasına kadar geçen her evresinde fikir ve görüşleriyle yardımını, desteğini ve meslek hayatım boyunca kullanacağım değerli bilgileri bana kazandıran başta değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdullah BAŞOĞLU olmak üzere, doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle mesleki olarak gelişmemde büyük emekleri olan değerli hocalarım Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Kürşad TURGUT, Prof. Dr. Mahmut OK, Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ, Prof. Dr. Mehmet MADEN, Prof. Dr. İsmail ŞEN, Prof. Dr. Hasan GÜZELBEKTEŞ ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR vi

1. GİRİŞ 1

1.1. Geçiş Dönemi	2
1.2. Geçiş Dönemi Hastalıkları	2
1.2.1. Abomazum Deplasmanı.....	3
1.2.1. Genomikler	10
1.2.2. Transkriptomikler	12
1.2.3. Proteomikler.....	12
1.2.4. Metabolomikler ve Metabolom	13
1.3.1. İmmunite.....	15
1.3.2. Rumen Asidozu.....	15
1.3.3. Hipokalsemi	17
1.3.4. Retensiyo Sekundinarum	18
1.3.5. Mastitis.....	19
1.3.6. Laminitis	19
1.3.7. Metritis ve Endometritis	20
1.3.8. Yağlı Karaciğer Sendromu	21
1.3.9. Ketozis	22
1.3.10. Abomazum Deplasmanı.....	23

2. GEREÇ VE YÖNTEM..... 24

2.1. Hayvan Materyali	24
2.2. Gereç	24
2.3. Klinik Muayeneler ve Tanı.....	24
2.4. Kan, İdrar ve Karaciğer Örneklendirmesi	25
2.5. Hematolojik ve Kan Gazı Analizi	25
2.6. Biyokimyasal Analiz	25
2.7. Serum, İdrar ve Karaciğer Ekstraksiyonu	26
2.8. Metabolomik Değerlendirme.....	26
2.8.2 NMR Analizi.....	27
2.8.3 Spektral Proses.....	28
2.9. İstatistiksel Analiz	28

3. BULGULAR..... 30

3.1. Hematolojik ve Kan Gazı Bulguları	30
3.2. Biyokimyasal Bulgular	31

3.3. Metabolomik Profiller	32
4. TARTIŞMA.....	72
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
6. KAYNAKLAR	79
7. EKLER	89
EK A: Etik Kurul Onayı.....	89
EK B: Tezden üretilmiş yayın	90
8. ÖZGEÇMİŞ	106



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
≤	Küçük Eşittir
≥	Büyük Eşittir
°C	Santigrat Derece
1D-PAGE	1 Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi
2-DE	2 Boyutlu Jel Elektroforezi
2D-PAGE	2 Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi
²H₂O	Dihidrojen Oksit
A_{2m}	Makroglobulin Alfa 2
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABV	Hayvan Damızlık Değeri
AD	Abomazum Deplasmanı
AGP	Alfa Asit Glikoprotein
AQUA	Mutlak Protein Kantifikasyonu
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adenozin Trifosfat
BCS	Vücut Kondüsyon Skoru
BE	Baz Açığı
BHBA	β-hidroksibütirik Asit
¹³C	Karbon İyonu
Ca	Kalsiyum
CDCl₃	Dötaryumlu Kloroform
CE-MS	Kapillar Elektroforez-Kütle Spektrometrisi
CK	Kreatin Kinaz
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill Pulse Sekansı
CPK	Kreatin Fosfokinaz
CRP	C-Reaktif Protein
DCAD	Diyet Katyon-Anyon Farkı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNAaz-I	Deoksiribonükleaz

ESI	Elektrosprey İyonizasyonu
FDR	Hatalı Keşif Oranı
GABA	Gama Amino Bütirik Asit
GC	Gaz kromatografi
GD	Glutamat Dehidrogenaz
GE-MS	Kapılı Elektrostatik Kütle Spektrometrisi
GGT	Gama Glutamil Transferaz
GPC	Gliserofosfokolin
GWAS	Genom Çaplı İlişkili Çalışma
¹H	Hidrojen İyonu
HCO₃	Bikarbonat
µL	Mikrolitre
H-NMR	Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans
HPLC	Yüksek Performanslı Likit Kromatografi
HSP	Isı Şok Proteini
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IgG-CH	İmmunglobulin Ağır Zincir Bölgesi
K	Potasyum
KCTD11	Kanal Tetramerizasyon Domain İçerik-11
K-EDTA	Potasyum Etilendiamintetraasetik Asit
KEGG	Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
LC-MS	Likit Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
LDA	Abomazumun Sola Deplasmanı
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LIR	Laktasyon İnsidans Oranı
m/z	Kütle/Yük Oranı
MALDI	Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon
MCH	Ortalama Eritrosit Hemoglobini
MCHC	Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
Mcal	Megakalori
MDA	Malondialdehit
Mg	Magnezyum
MH₂	Metal Dihidrit
MHC-Ih	MHC Klas-I Ağır Zincir

MHz	Megahertz
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
miRNome	Belirli Bir Zamandaki Tüm RNA
MS	Kütle Spektrometre
Na	Sodyum
NAFLD	Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
NEB	Negatif Enerji Dengesi
NEFA	Non-esterified Fatty Acid, Doymamış Yağ Asidi
NEL	Net Laktasyon Enerjisi
NGS	İleri Nesil Sekanslama
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NO	Nitrik Oksit
NOESY	Nükleer Overhaus Etki Spektroskopi
OPLS	Ortogonal Kısmi En Küçük Kareler
P	Fosfor
PC	Gliserofosfokolin Oranı
PCA	Temel Bileşenler Analizi
pCO₂	Venöz Parsiyel Karbondioksit Basıncı
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCV	Hematokrit
pH	Hidrojen Konsantrasyonu
PLS	Kısmi En Küçük Kareler
pO₂	Venöz Parsiyel Oksijen Basıncı
PLINK	Açık Kaynak Kodlu Genom Analiz Seti
PQN	Probabilistik Katsayı Normalizasyonu
ppm	Milyonda Bir Birim
PSAQ	Protein Standart Absolut Kantifikasyon
QConCat	Birleştirilmiş Peptitlerden Oluşan Yapay Protein
QTL	Kantitatif Özellik Lokusu
RDA	Abomazumun Sağa Deplasmanı
RNA	Ribonükleik Asit
SARA	Subakut Rumen Asidozu
SDH	Sorbitol Dehidrogenaz
SELDI	Yüzey Geliştirilmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon

SNPs	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TAC	Serum Total Antioksidan Kapasitesi
TAG	Triasilgliserol
TCA	Trikarboksilik Asit
TMSP	Trimetilsilypropanoik Asit
TOF	Uçuş Süresi
UPLS-MS	Ultra Performanslı Likit Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
VGf	Sinir Büyüme Faktör
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein



ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Abomazum Deplasmanlı Sütçü Sığırlarda NMR Bazlı Serum İdrar Ve Karaciğer Metabolom Profili

Erdem GÜLSOY

Veterinerlik İç Hastalıkları Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2020

Abomazum deplasmanı (AD) sütçü sığırlarda önemli ekonomik kayıplara sebep olan bir hastalıktır. Bu projede AD'li sütçü sığırların metabolizması serum, idrar ve karaciğer ekstraktları üzerinden NMR bazlı metabolomik yaklaşımla geniş kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın materyalini multiparous AD'li 50 Holstein sütçü sığır (42 LDA, 8 RDA) ve klinik olarak sağlıklı multiparous 20 Holstein sığır oluşturdu. Tüm grupların genel klinik muayeneleri yapıldı. AD teşhisi anamnez, oskultasyonda karakteristik ping sesi varlığı, ultrason muayenesi ve Liptak testi ile konuldu. Hasta grubu oluşturan sığırların bazılarında ketozis bulunmaktaydı. Tüm gruplardan hematolojik analizler için coccygeal venadan heparinli ve K₃-EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden biyokimyasal ve NMR bazlı metabolomik profillendirmeler için serum örnekleri elde edildi. Tüm hayvanlardan idrar örnekleri steril, metal kateter ile; karaciğer biyopsileri sağ 11-12. interkostal aralıktan Tru-cut biyopsi torakarı ile alındı. Tüm sığırların hematolojik ve biyokimyasal analizleri ile birlikte NMR bazlı metabolomik profillendirmeleri yapıldı. Glikoneojenik substratlar ve ketojenik amino asitlerle birlikte birçok yağ asidi fraksiyonu ve kolesterol metabolitleri, her serum, idrar ve karaciğer ekstraktında her iki veri seti (lipofilik ve hidrofilik fraksiyonlar) kullanılarak identifiye ve kantifiye (opsiyonel birim) edildi.

Yapılan laboratuvar analizlerinde hasta gruplarda (hem LDA hem RDA) sağlıklı gruba göre serum laktat, GGT, NEFA ve BHBA seviyelerinde artış gözlemlendi. Hasta gruplar arasında LDA'lı gruba göre RDA'lı grupta laktat, BE ve CRP seviyelerinde önemli artış ve K ve Cl seviyesinde önemli düşüş gözlemlendi. Diğer parametrelerde farklılıklar gözlemlense de bunlar normal referans değerleri içerisindeydi. Serum örneklerinde yapılan metabolomik profillendirme sonucu hasta gruplarda (hem LDA hem RDA) sağlıklı gruba göre karnitin seviyesi yüksek; hippürat, löysin, izolöysin, tirozin, trimetil amin N-oksit, valin, fenilalanin, treonin, alanin, glisin, glutamin ve prolin seviyeleri düşüktü. RDA'lı grupta 3-hidroksibütirat, isopropanol ve asetat seviyesi LDA'lı gruba göre daha yüksekti.

İdrar örneklerinde yapılan metabolomik profillendirmede hasta gruplarda (hem LDA hem RDA) sağlıklı gruba göre dimetilamin, kolin, kreatin ve laktat seviyeleri yüksek; hippürat ve trimetilamin N-oksit seviyeleri ise düşüktü. Sağlıklı gruba göre LDA'lı grupta 3-hidroksi butirat ve 2-hidroksi 3-metilvalerat seviyeleri, RDA'lı grupta ise dimetilamin seviyesi yüksekti. Karaciğer biyopsi örneklerinden yapılan metabolomik profillendirmede hasta gruplarda (hem LDA hem RDA) sağlıklı gruba göre 2-hidroksi bütirat ve myoinostol seviyeleri yüksek; glikoz seviyesi ise düşüktü. Bu parametrelerdeki değişimler LDA'lı grupta çok daha anlamlıydı.

AD'li sığırlarda serum örneklerinde su ve yağ bazlı metabolitler düşerken, karaciğer örneklerinde yağ asidi fraksiyonları ve kolesterol metabolitleri artmıştır. Yapılan metabolomik ve biyokimyasal profillendirmeler ile AD'li (özellikle LDA'lı) sığırların ketozis ve yağlı karaciğer riski altında olduğu belirlendi. NMR bazlı metabolomik profillendirilmesi sonucu AD'li sığırlardaki farklı vücut sıvıları ve karaciğer dokusunda metabolit değişimleri açıkça ortaya kondu, biyokimyasal bir ağ ve yolak haritalaması ile AD durumunda en olası değişmiş metabolik yolak olarak valin, löysin ve izolöysin biyosentezi ile fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi belirlendi. Böylece hastalık patogenezinin aydınlatılmasına katkı sağlandı. ¹H-NMR analizi için optimal biyolojik matrisin serum olduğu desteklendi.

Anahtar kelimeler: Abomazum deplasmanı, Metabolom, Metabolomikler, NMR, Sütçü sığır

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

NMR based Serum Urine and Liver Metabolome profile in Dairy Cows with Displaced Abomasum

Erdem GÜLERSOY

Department of Internal Medicine

PhD THESIS / KONYA-2020

Abomasal displacement (AD) is a disease that causes significant economic losses in dairy cattle. In this project, the metabolism of dairy cattle with AD was extensively evaluated by NMR-based metabolomic approach over serum, urine and liver extracts.

The material of this study consisted of multiparous 50 Holstein dairy cattle (42 LDA, 8 RDA) with AD and multiparous 20 clinically healthy Holstein cattle. General clinical examinations of all groups were performed. The diagnosis of AD was made by anamnesis, presence of characteristic ping sound in auscultation, ultrasound examination and Liptak test. Some of the cattle in the patient group had ketosis. Blood samples were taken from the coccygeal vein to heparinized and K₃-EDTA tubes for hematological analysis. Serum samples were obtained from blood samples for NMR based metabolomic and biochemical profilings. Urine samples from all animals were collected with a sterile metal catheter; liver biopsies were collected from the right flank 11-12. intercostal space with Tru-cut biopsy trocar. Hematological and biochemical analyzes with NMR based metabolomic profiling of all cattle were performed. Many fatty acid fractions and cholesterol metabolites, together with gluconeogenic substrates and ketogenic amino acids, were identified and quantified (optional units) using both data sets (lipophilic and hydrophilic fractions) in each serum, urine and liver extract.

Increased serum lactate, GGT, NEFA and BHBA levels in the patient groups (both LDA and RDA) compared to the healthy group were observed by laboratory analyses. Between the patient groups, significant increases in lactate, BE and CRP levels and a significant decrease in K and Cl levels were observed in the RDA group compared to the LDA group. Differences were observed in other parameters, but these were within normal reference values. As a result of metabolomic profiling in serum samples, carnitine levels were high; hippurate, leucine, isoleucine, tyrosine, trimethyl amine N-oxide, valine, phenylalanine, threonine, alanine, glycine, glutamine and proline levels were low in the patient group (both LDA and RDA) compared to healthy group. In RDA group, 3-

hydroxybutyrate, isopropanol and acetate levels were higher than LDA group. Metabolomic profiling of urine samples showed high levels of dimethylamine, choline, creatine and lactate, and lower levels of hippurate and trimethylamine N-oxide in the patient groups (both LDA and RDA) compared to the healthy group. Compared to the healthy group, 3-hydroxy butyrate and 2-hydroxy 3-methylvalerate levels were higher in the LDA group and dimethylamine was higher in the RDA group. Metabolomic profiling of liver biopsy samples showed high levels of 2-hydroxybutyrate and myoinostole and lower glucose levels in the patient groups (both LDA and RDA) compared to the healthy group. The change in these parameters was much more significant in LDA group.

In cattle with AD, serum and water-based metabolites decreased in serum samples, while fatty acid fractions and cholesterol metabolites increased in liver samples. The metabolomic and biochemical profiles determined that cattle with AD (especially LDA) were at risk of ketosis and fatty liver. As a result of NMR-based metabolome profiling, metabolite changes in different body fluids and liver tissue in cattle with AD were clearly demonstrated and contributed to the elucidation of disease pathogenesis. With biochemical network and pathway mapping, valine, leucine and isoleucine biosynthesis with phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis were determined as the most likely altered metabolic pathway in AD status. Thus, contribution was made to elucidate the pathogenesis of the disease. It was supported that the optimal biological matrix was serum for ¹H-NMR analysis.

Key words: Dairy cow, Displaced abomasum, Metabolome, Metabolomics, NMR

1. GİRİŞ

Yüksek verimli sütçü sığırların %35-50'si doğumu takiben metabolik ve enfeksiyöz hastalıklardan etkilenmektedir. AD, sütçü sığırların genellikle erken laktasyon döneminde görülen multifaktöriyel bir bozukluktur ve özellikle Holstein ırkı sütçü sığırların predispoze olduğu bir hastalıktır. Çoğu AD vakası hipokalsemi, ketozis ve yağlı karaciğer sendromu gibi metabolik ve üretim hastalıkları ile birlikte seyreder (Doll 2015, Zerbin ve ark 2015). Ülkeden ülkeye farklılık gösteren AD insidansı Amerika'da sütçü sığır sürülerinde yaklaşık %3,5 olarak belirlenmiştir (NAHMS-USDA 2017). Avrupa ülkelerinde de bu seviyeler civarındadır. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniğine son 5 yılda getirilen 2610 adet büyükbaş çiftlik hayvanında abomazum deplasmanı vakaları oranı %4,75'tir. Bu vakaların %76,6'sı sola, %23,4'ü sağa abomazum deplasmandır. Her AD vakası için yapılan teşhis, tedavi ve korunma masraflarının ortalama 700 dolarlık ekonomik kayba sebep olduğu rapor edilmiştir (McArt ve ark 2015).

Hastalığın patogenezi anlamak için çok sayıda çalışma yapılmakla birlikte halen patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (Sickinger 2017). Her AD vakası için yapılan tanı, medikal tedavi, cerrahi metot ve tedavi sonrası sonuçlar, sürü bazında, çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Sevinc ve ark 2002, Civelek ve ark 2006, Sen ve ark 2006, Hamana ve ark 2010, Constable ve ark 2013, Doll 2015, Zerbin ve ark 2015, Caixeta ve ark 2018). Sütçü sığırlarda omik bilimlari yeni nutrisyonel, genetik ve bakım stratejileri geliştirmeyi hedefleyen teknik araçlar olarak tercih edilmektedir. Bunların uygulanmasında onların avantajları ve sınırlılıkları hala maliyet, tekrarlanabilirlik ve verimliliklerine bağlıdır. Bu yüzden bazı teknik veya ekonomik zorluklar olsa da omiklerin entegrasyonu peripartum hastalıklarının daha iyi anlaşılmasında önemlidir. Çünkü bunlar, metabolik yolları ve süt veriminde nutrisyonel bakım mekanizmalarının regülasyonunda yer alan anahtar genlerin, proteinlerin ve metabolitlerin keşifini kolaylaştırır (Li ve ark 2017). Proteomikler ve metabolomikler süt, kan ve idrar gibi biyolojik sıvılarda ve dokularda protein ve metabolit varlığını karakterize etmek için kullanılan değerli tekniklerdir (Takis ve ark 2018). Bu tez çalışmasında abomazum deplasmanı vakaları serum, idrar ve karaciğer örneklerinde 700 MHz'lik NMR spektroskopisi kullanılarak daha geniş kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

1.1. Geçiş Dönemi

Sütçü sığırlarda doğum öncesi üç hafta ile doğum sonrası üç hafta periparturient dönem ya da geçiş dönemi olarak adlandırılır (Sevinc ve Basoglu 2011). Bu dönemde rasyon değişimi, tekrar gruplandırma gibi çevresel faktörlerle birlikte doğum ve laktasyon başlangıcı ile ilişkili pekçok fizyolojik adaptasyon geçirilir (Mills ve ark 2019). Barınma, besleme ve yönetimdeki diğer değişimler yüksek verimli sütçü sığırlarda fizyolojik değişimlere ek olan stres faktörleridir. Gebeliğin son üç aylık döneminde hem fetüs hem de meme dokusu maksimum oranda büyür. Geçiş dönemindeki sütçü sığırlarda, özellikle erken laktasyondaki yüksek verimli sütçü sığırlarda, artan enerji ihtiyacı ve düşük kuru madde alımından dolayı NEB gelişir (Piras ve ark 2019). Şiddetli NEB, metabolik bozukluklara karşı sığırları daha hassas hale getirir. Bu durumda enerji ihtiyacını karşılamak için adipoz doku mobilize olur. Ruminantlarda, bitkisel karbonhidratlardan gelen glikoz ön midelerdeki fermantasyon sebebi ile ince barsaklara zor ulaştığından enerji metabolizmaları glikoneogenezise bağlıdır. Ana glikoneogenetik bileşen propiyonattır. Özellikle meme bezi laktoz üretmek için büyük miktarda glikoza ihtiyaç duyar. Diğer organların aksine meme bezinin glikoz alımı insulinden bağımsızdır. Kaslarda ve adipoz dokuda insulin sensitivitesinin azalması glikozun doğrudan meme bezi tarafından kullanılmasına sebep olur. Lipoliz artışı, yağ asitlerinin enerji substratı ve süt yağı üretimi için kullanımını sağlar. Lipoliz oranı karaciğer kapasitesini aşarsa yağlı karaciğer sendromu ve ketozis gelişebilir. Ketozis, özellikle subklinik ketozis, sütçü sığırlarda retensiyon sekondinarum ve metritis ile birlikte oldukça yaygındır. Aşırı yağ asitleri karaciğerde tekrar esterleşebilir ve trigliserit olarak depo edilebilirse de ruminantlarda bunların dolaşıma aktarılması VLDL kapasitesine bağlıdır (Wang 2016).

1.2. Geçiş Dönemi Hastalıkları

Sütçü sığırlarda geçiş dönemi hastalıklarının risk faktörleri, hayvanın enerji durumu hakkında bilgi veren bazı biyobelirteç testleri, sağlık kayıtları, gıda alımı, BCS ve süt veriminin değerlendirilmesi ile belirlenir (Wisnieski ve ark 2019). Hipokalsemi, ketozis, yağlı karaciğer sendromu ve AD, doğumdan sonraki ilk haftalarda gelişir ve sütçü sığırlarda enerji metabolizması ile ilişkili metabolik

bozukluklar olarak tanımlanırlar. Yüksek süt verimi, birden fazla doğum, doğum sırasında yüksek BCS ve diğer hastalıklar (ketozis, yağlı karaciğer sendromu gibi) AD ile ilişkilidir. Kuru dönemde aşırı konsantre yem ile besleme ve yüksek BCS, AD ve ketozis riskini arttırır. Mevsimsel faktörler de bu hastalıklarla ilişkilidir. Örneğin kış aylarında hastalık gelişim riski, yaz aylarına göre daha yüksektir. Ayrıca iklim şartlarının değişimi de AD gelişim riski ile ilişkilidir. Tablo 1.1’de çeşitli araştırmacılar tarafından normal ve yüksek süt verimli sütçü sığır sürülerinde üretim hastalıklarının insidans ortalamaları ve sapmaları verilmiştir (Jordan ve Fourdraine 1993, Kelton ve ark 1998, Ingvarstsen ve ark 2003).

Tablo 1.1. Normal (Kelton ve ark 1998, Ingvarstsen ve ark 2003) ve yüksek (Jordan ve Fourdraine 1993) verimli sütçü sığır sürülerinde (İnek başına yıllık ortalama 11.000 kg süt) üretim hastalıklarının insidans ortalamaları ve sapmaları.

Hastalık	Ingvarstsen ve ark (2003)	Kelton ve ark (1998)	Jordan ve Fourdraine (1993)
Hipokalsemi	%4.6 (%0.2-8.9) n=17	%6.5 (%0.03-22.3) n=33	%7.2 (%0-44.1) n=61
Ketozis	%4.1 (%1.6-10) n=17	%4.8 (%1.3-18.3) n=36	%3.7 (%0-20) n=61
Abomazum deplasmanı	%2.1(%0.6-6.3) n=10	%1.7 (%0.3-6.3) n=22	%3.3 (%0-14) n=61
Ayak/bacak hastalıkları	%14.7(%1.8-60) n=7	%7 (%1.8-30) n=39	
Retensiyo sekondinarum	%7.8(%3.1-13) n=13	%8.6 (%1.3-39.2) n=50	%9 (%0-22.6) n=61
Ovaryum kistleri	%8.9 (%3.1-12.4) n=14	%8 (%1-16.1) n=44	%13.5 (%0-58.8) n=61
Uterus enfeksiyonu	%10.8 (%2.2-43.8) n=16	%10.1 (%2.2-37.3) n=43	%12.8 (%0-66) n=61
Mastitis	%17.6 (%2.8-39) n=25	%14.2 (%1.7-54.6) n=62	

1.2.1. Abomazum Deplasmanı

Abomazum deplasmanı, normalde abdominal boşlukta rumenin ventralinde bulunan abomazumun gaz birikimi sonucu sağa veya sola deplase olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır. Abomazum deplasmanı tüm sığır tiplerinde rastlansa da en çok 4-7 yaş arası ve özellikle erken laktasyondaki yüksek verimli sütçü sığırlarda görülür (Constable ve ark 1992). Hastalık doğumu takiben gelişebilir, fakat vakaların %80 – 90’ı doğum sonrası ilk 4 haftada görülür (Erb ve ark 1984, Constable ve ark 1992, Pehrson ve Shaver 1992).

AD durumunda barsaklara içerik geçişi, kısmi veya tam bloke olur. AD, sütçü sığırlarda anoreksi, kolik ve hatta ölüme sebep olabilir, ayrıca yüksek verimli sütçü sığırlarda düşük fertiliteye, süt veriminde düşüşe ve ineklerin yüksek oranda sürüden çıkarılmasına neden olur (Guo ve ark 2019).

1.2.1.1. İnsidans ve Risk Faktörleri

Danimarka'da sütçü sığırlarda yapılmış bir çalışmada LDA'nın insidans riski %0,2-1,6 sapma ile %0,6 olarak belirlenmiştir (Hesselholt ve Grymer 1979). Daha sonraki raporlarda Danimarka Sığır Veritabanı verilerine göre insidans %1,3 olarak rapor edilmiştir (Blom 1993). Kuzey Amerika'da yapılan çalışmalarda, entansif besleme sistemlerinde AD insidans riskinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Kanada'da AD insidans riski %2 olarak bildirilirken (Geishauser ve ark 1997), Amerika'da yüksek verimli sütçü sığır sürülerinde insidans riskinin %3,3 (Jordan ve Fourdraine 1993) ve %5 (Pehrson ve Shaver 1992) olduğu ortaya konmuştur. Sürüler arasındaki varyasyon farklıdır. AD'nin önemli bir sürü problemi olduğunu bildiren Amerikan çalışmalarında insidans varyasyonu %0–14 (Jordan ve Fourdraine 1993) ve % 0–21,7 (Pehrson ve Shaver 1992) olarak rapor edilmiştir. Etçi sığırlara göre AD sıklıkla sütçü sığırlarda gözlenir (Constable ve ark 1992). AD gelişimi ırklar arasında farklılık gösterir ve en çok risk altında bulunan ırklar sırasıyla Brown Swiss, Holstein ve Guernsey'dir (Constable ve ark 1992, Geishauser 1995). AD prevalansındaki bu değişiklikler bu ırkların abomazal duvarında bulunan vazoaktif intestinal polipeptid, P substantı ve nörofilament 200'deki yapısal farklılıklar ile açıklanmıştır (Sickinger ve ark 2008, Sen ve ark 2015). Süt veriminin AD riski üzerine etkisi, çalışmalar arasında farklılık gösterdiğinden tam olarak belirlenmemiştir (Geishauser 1995).

Deplasman vakalarında LDA'nın yaklaşık insidansı %85'tir (Geishauser 1995). Norveç'te sütçü sığır sürülerinde yapılan çalışmalarda olguların %88'i LDA, %12'si RDA olarak rapor edilmiştir (Radostits ve ark 2000). Benzer şekilde Amerika'da AD vakalarının %86'sının LDA, %14'ünün ise RDA olduğu bildirilmiştir (Constable ve ark 1992).

Risk faktörleri arasında en önemlileri beslenme ve bakım şartlarıdır (Geishauser 1995, Shaver 1997). Doğuma yakın gıda alımındaki düşüş (Ingvartsen ve Andersen 2000) normal olarak kabul edilse de bu durum AD gelişimi bakımından önemli bir risk faktörüdür (Constable ve ark 1992). Prepartum yüksek NEB ve yüksek plazma NEFA konsantrasyonu, LDA gelişim riskini artırır (Cameron ve ark 1998). Ayrıca sütçü sığırlarda yapılan bir çalışmada, AD gelişimi için önemli risk faktörlerinin; yüksek BCS, kötü besleme şartları, kuru dönem sığırları için yüksek enerjili rasyon (>1,65 Mcal NEL/kg kuru madde) verilmesi ve süt verimi için yüksek

genetik potansiyel olduğu bildirilmiştir (Cameron ve ark 1998). Gebelik sonu ve laktasyon başlangıcında konsantre:kaba yem oranındaki artış AD gelişim riskini arttırır. Yapılan bir çalışmada doğuma 4 hafta kala sığırlar enerji yönünden zengin rasyona geçirilmiş ve bu ani rasyon geçişinin AD yönünden risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Coppock ve ark 1972).

Doğumdan önceki 2-3. haftalarda sığırların laktasyon dönemine adaptasyon için ihtiyaç duyacakları besin gereksinimlerini karşılamak amacıyla rasyonda besin kaynağı artışı yapılması önerilmektedir. Yapılan çalışmalarda kuru dönemin son 3 haftasında tahmin edilen enerji alımının yüksek oluşu, metabolik ve üretim hastalıkları ile birlikte güç doğum ve LDA riskini azaltırken (Curtis ve ark 1985), konsantre yem oranı artışının ise AD oluşum riskini arttırdığı (Correa ve ark 1990) bildirilmiştir. AD gelişim riskindeki farklılıklar, değişik besleme stratejileri ve değişik besin kaynakları ile açıklanabilir. Periparturient dönemde gıda alımı düşük olduğundan uygun rasyonla beslenmeyen sürülerde rasyonda konsantre:kaba yem oranı nispeten yüksek olabilir (Ingvarsen ve Andersen 2000). Erken laktasyon döneminde rasyonda konsantre yemin ani artışı kaba yem tüketimini düşürür (Ingvarsen ve ark 2001). Rasyondaki bazı yemler AD gelişim riskini arttırabilir. Samanla besleme ile karşılaştırıldığına silaj ile besleme, AD gelişim riskinin 2-3 kat arttırır (Zamet ve ark 1979, Nocek ve ark 1983). AD gelişim riski bakımından silaj ile saman arasındaki fark muhtemelen silajın daha ince kıyılmış olmasıdır. AD gelişim riski üzerine silaj uzunluğunun önemi daha önceden araştırılmamış olsa da yonca samanının öğütülmüş oluşu AD gelişim riskini arttırır (Dawson ve ark 1992). Danimarka çalışmaları lifli gıda kaynağı olarak sadece ince kıyılmış mısır silajı kullanımının, erken laktasyondaki sığırlarda AD gelişim riskini arttırdığı ve bu riskin sığır başına 1 kilogram saman ile elimine edilebileceği rapor edilmiştir. Yetersiz alan ve besleme durumunda sığırlar arası rekabet, kaba yem alımını düşürür ve AD gelişimi için önemli risk faktörleridir (Constable ve ark 1992).

Diğer üretim hastalıkları da AD gelişimi için risk faktörleri olarak rapor edilmiştir (Geishauser 1995, Guard 1996, Radostits ve ark 2000). AD, yağlı karaciğer sendromu ile eş zamanlı olarak gelişse de bu iki hastalık arasındaki ilişki net olarak aydınlatılamamıştır (Herdt ve ark 1982, Holtenius ve Niskanen 1985, Taguchi ve ark 1992). AD gelişimi için bir risk faktörü olarak bildirilmiş olan

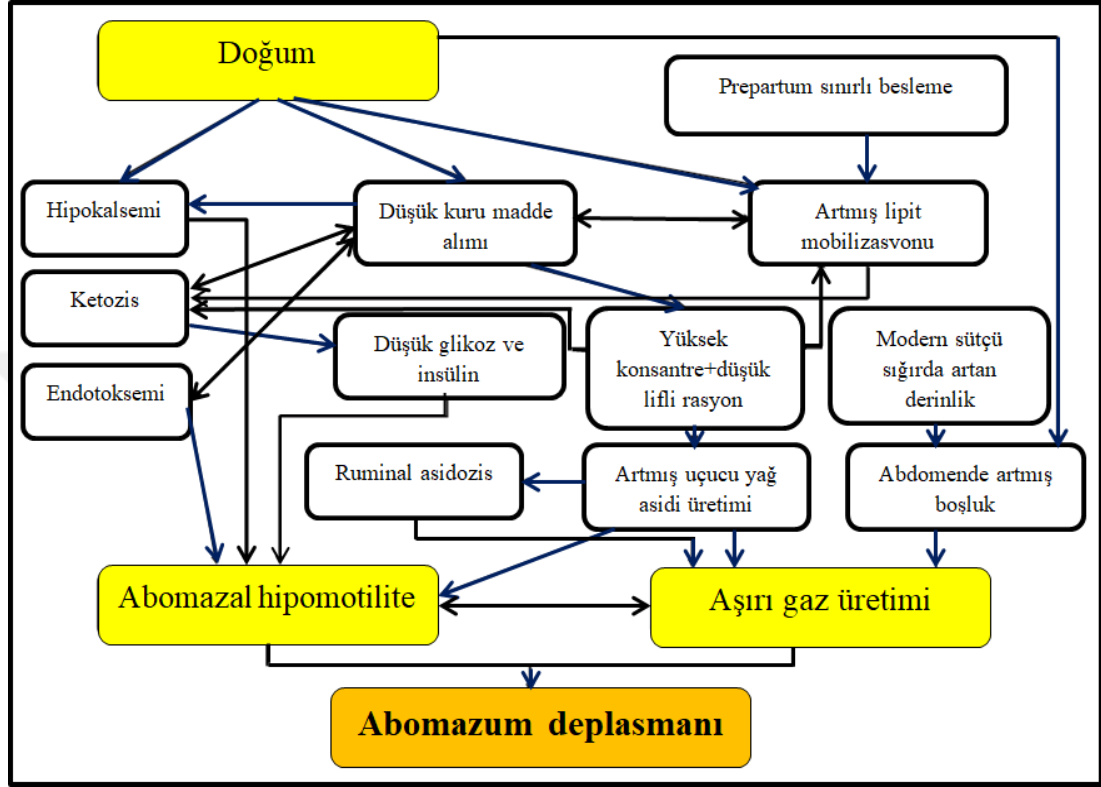
ketozisin (Curtis ve ark 1985, Markusfeld 1987, Erb ve Grohn 1988, Grohn ve ark 1995) AD ile birlikte seyrettiği belirtilmektedir (Pehrson ve Shaver 1992, Constable ve ark 1992). Benzer şekilde, hipokalsemi de AD ile birlikte seyredebilir (Willeberg ve ark 1982, Markusfeld 1986; Pehrson and Shaver 1992, Massey ve ark 1993). Bunu destekleyecek şekilde, kalsiyum klorür ile yapılan hipokalsemiden koruyucu tedavinin AD gelişim riskini de azalttığı rapor edilmiştir (Oetzel 1996).

1.2.1.2. Etiyoloji ve Fizyopatoloji

Etiyoloji ve fizyopatoloji üzerine yapılmış önceki çalışmalarda AD gelişiminin sebebi tam olarak aydınlatılamamıştır (Svendsen 1969, Geishauer 1995). AD gelişimi için çeşitli ön faktörlerin gerektiği bilinmektedir. Bu ön faktörlerden biri, gaz ile dilate olmuş abomazum ve abomazal atonidir (Constable ve ark 1992). Gazın bir kısmı ruminal bikarbonatın hidroklorik asit ile etkileşimi sonucu abomazumda, bir kısmı da rumende üretilir (Sarashina ve ark 1990). Bir diğer faktör de mezenteriyumun abomazumun yer değiştirmesine imkan sağlayacak kadar gerilebilmesidir. Diğer bir faktör ise fazla abdominal boşluk oluşumudur. Doğumla birlikte gıda alımında azalmaya bağlı olarak abdominal boşluk değişir (Ingvarsen ve Andersen 2000). Eğer rumen normal pozisyonu olan abdomenin ventralinde bulunmazsa abomazum rumenin altından kayar ve AD gelişir. Gerilmiş mezenteriyum, gaz birikimi, abomazal dilatasyon ve genişlemiş abdominal boşluk, AD gelişimi için gereken ön şartlardır. Abomazumda atoniye ve azalmış motiliteye sebep olan durumlar halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Olası faktörlerden biri doğuma yakın gelişen hipokalsemidir. Abomazal kontraktilitede düşüşe sebep olan hipokalsemi, abomazal dilatasyon ve atoni gelişimine yol açar (Daniel 1983, Massey ve ark 1993). Benzer şekilde abomazumdaki uçucu yağ asitlerinin de abomazal motiliteyi düşürdüğü rapor edilmiştir (Breukink 2003).

Laktasyona geçişi kolaylaştıran etkili yönetim stratejileri, AD profilaksisini doğrudan etkiler. Sütçü sığırlarda AD insidansını düşüren besleme yönetimi bir önceki laktasyonun son dönemlerinde ve kuru dönemde başlamalıdır. Uzun saplı ve kabaca doğranmış silajla besleme doğum öncesi enerji alımını kısıtlar ve dengeli BCS oluşumu sağlar (Caixeta ve ark 2018). Sütçü sığırlarda yapılan çalışmalarda rapor edilen AD gelişim mekanizması rumende kaba yem yetersizliği ve kontanstre

yem partiküllerinin rumenin ventralinde veya retikulumda birikip fermente olması şeklinde tanımlanmıştır (Shaver 1997). Rumenin ventral kısmında üretilen uçucu yağ asitleri, rumen tarafından absorbe edilmeden abomazuma geçerse abomazal motilite düşer. Şekil 1.1’de AD gelişiminin çoklu etiyolojik faktörleri şematize edilmiştir.



Şekil 1.1. Abomazum deplasmanı için çoklu etiyolojik faktörlerin şematik ifadesi (Caixeta ve ark 2018).

1.2.1.3. Klinik ve Laboratuvar Bulguları

AD’li sığırların klinik muayenesinde durgunluk, iştah kaybı, süt veriminde ani düşüş, ketotik solunum havası, dışkıda azalma ve bazen diyare görülür. Vücut sıcaklığı normaldir, nabız ve solunum sayısında artış görülebilir. Olgularda mastitis, metritis, retensiyo sekundinarum gibi hastalıklarda gelişmişse nötrofiliiyi takip eden lökositozis belirlenir. Ayrıca AD’li sığırların oskultasyon ve perkusyonunda karakteristik ping sesi ve abdominal balotmanda çalkantı sesi alınır (LeBlanc 2010). RDA’lı sığırlarda deplase olmuş abomazum ultrasonografik muayenede sağ 8 ile 12. interkostal aralıktan, diffüz ekojenik kesikli çizgiler şeklinde hipoekojenik yapıda, reverberasyon artefaktı ile karakterize şekilde görülür. Reverberasyon artefaktları

abdomen duvarına paralel ekojenik çizgiler şeklindedir (Ok ve ark 2002, Braun ve Feller 2008). LDA'lı sığırların rektal palpasyonunda rumen normale göre daha medialde hissedilir (Ismael ve ark 2018). LDA'lı sığırların ultrasonografik muayenesi sol 9 ile 12. interkostal aralıktan yapılır ve görüntü reverberasyon artefaktı ile karakterizedir. Abomazal içerik hiperekoik noktalar ile birlikte homojen hipoekoik sıvı şeklinde, genellikle 9 ile 12. interkostal aralığın ventral bölgesinden görüntülenir (Ok ve ark 2002, Li ve ark 2018).

AD'li sığırlardan elde edilen kan serumunun biyokimyasal analizinde serum kalsiyum, inorganik fosfor, sodyum, potasyum, klor, glikoz, total protein, albumin, globülin, kolesterol ve trigliserit seviyeleri sağlıklı sığırlara göre önemli ölçüde düşüktür. LDA'lı sütçü sığırlarda yapılan bir çalışmada anormal lipid biyokimyası (düşük serum trigliserit, kolesterol ve lipoprotein konsantrasyonu) bulunanların serum ApoB100 konsantrasyonlarının düşük olduğu rapor edilmiştir (Civelek ve ark 2006). Serum fosfor konsantrasyonundaki önemli düşüş, intraselüler fosfor girişini engelleyen metabolik alkalozaya bağlı olabilir. Genel olarak, LDA vakalarındaki sodyum, potasyum ve klorun önemli ölçüde düşüşü; asit-baz bozukluğuna, anoreksiye ve geçiş bozukluğu ile birlikte genel durum bozukluğuna bağlıdır. Hipokloremi, abomazuma sekresyonu devam eden klor iyonlarının, pilorik stenoz veya obstrüksiyona bağlı olarak rumene dönüşü ve buradan omazal kanal boyunca reflüksünün gerçekleşmesi sonucu oluşur. Ayrıca AD'li sığırlarda gözlenen şiddetli hiponatremi, duodeno-abomazal reflüks ve endotoksemiye bağlı metabolik asit-baz bozukluğuna bağlıdır (Geishauser ve Seeh 1996, Ohtsuka ve ark 1997, Ismael ve ark 2018).

AD'li sütçü sığırların postpartum serum ve periton sıvılarında akut-faz proteinleri ve oksidatif stres indikatörlerini değerlendiren bir çalışmada, sağlıklı sığırlara göre RDA'lı sığırların serum haptoglobin, serum amiloid A, malondialdehit, adenozin deaminaz, myeloperoksidaz, aspartat aminotransferaz, kreatin kinaz ve gama glutamil transferaz seviyeleri yüksek tespit edilmiştir. LDA'lı sığırlarda ise benzer şekilde serum haptoglobin, malondialdehit, adenozin deaminaz, myeloperoksidaz ve aspartat aminotransferaz seviyeleri yüksek olarak tespit edilmiştir. Periton sıvı analizinde ise sağlıklı sığırlarla karşılaştırıldığında sadece LDA'lı sığırlarda haptoglobin, malondialdehit, adenozin deaminaz,

myeloperoksidaz, alkalen fosfataz, gama glutamil transferaz ve laktat dehidrogenaz seviyeleri yüksek tespit edilmiştir (Maden ve ark 2012). Guzelbektes ve arkadaşları (2010), AD'li sığırlarda serum amiloid A ve haptoglobin artışlarının hepatik lipidozisin varlığına işaret edebildiğini bildirmişlerdir.

Doğumdan sonraki birinci ve ikinci haftalarda NEFA, BHBA ve kalsiyum konsantrasyonlarının ölçümü, sürü sağlığı hakkında faydalı bilgiler sağlar. Yüksek NEFA ($>0,4$ mmol/L) ve BHBA konsantrasyonları ($>1,2$ mmol/L) ketozis ve abomazum deplasmanı gelişimi için risk faktörleri olarak bilinmektedir. NEFA ölçümü daha iyi bir ön tanı parametresi olmasına rağmen BHBA ölçümü kolay ve ucuz olması sebebi ile tercih edilebilir. Ayrıca NEFA konsantrasyonundaki değişim BCS kaybını da yansıtır (LeBlanc 2010). Kısaca, AD'li sütçü sığırlarda, endotoksemi, NEB ve yağlı karaciğer sendromunun patolojik etkilerinin glikoz ve lipid metabolizmasında oluşturduğu uzun süreli bozukluk yüksek BHBA konsantrasyonu ile sonuçlanır (Itoh ve ark 1998, Ismael ve ark 2018).

AD'li sığırlarda hematolojik ölçümlerde PCV, MCH, MCHC ve hemoglobin konsantrasyonlarında artış gözlenir. Bu değişimler, abomazumdan duodenuma sıvı transferinin blokajına bağlıdır. AD'li sığırlarda serum BHBA, AST, ALT, BUN ve kreatininin konsantrasyonları yüksektir. Sevinc ve arkadaşları (2002), AD'li sığırlarda serum AST ve GGT seviyelerinin yüksek, HDL-kolesterol seviyesinin düşük olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca AD gelişmiş sütçü sığırlarda yapılan bir çalışmada sığırlarda oksidatif strese bağlı serum TAC düşük, NO ve MDA seviyelerinin ise yüksek olduğu rapor edilmiştir (Ismael ve ark 2018).

1.2. Omik Bilimleri

Omik kelimesi biyolojik bilimlerde genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi -omiklerle biten bir çalışma alanını ifade eder. -om eki, sırasıyla genom, proteom, transkriptom veya metabolom gibi bu alanların çalışma konularını ifade etmek için kullanılır. Daha spesifik olarak genomik, genomların yapısını, fonksiyonunu, değişimini ve haritalamasını inceleyen ve enzimlerin ve haberci moleküllerin yardımıyla proteinlerin üretimini yönlendiren genlerin karakterizasyonu ve kantifikasyonunu amaçlayan bilimdir. Transkriptom, bir hücre, doku veya organizmadaki tüm mRNA moleküllerinin dizisidir. Moleküler tanımlama

bakımından her bir RNA molekülünün miktar veya konsantrasyonunu içerir. Proteom terimi ise bir hücre, doku veya organizmadaki tüm proteinleri kapsar. Proteomik, bu proteinlerin biyokimyasal özellikleri, fonksiyonel rolleri, miktarları, modifikasyonları ve yapılarının büyüme sırasında veya iç ve dış uyaranlara yanıt olarak nasıl değiştiğini inceleyen bilimdir. Metabolom bir hücre, doku veya organizmadaki hücresel prosesin son ürünleri olan metabolitleri ifade eder. Metabolomikler, metabolitlerin dahil olduğu tüm kimyasal prosesleri inceler. Daha spesifik olarak; metabolomikler aktiviteleri sırasında oluşan spesifik hücresel proseslerin kimyasal parmak izlerini ve küçük moleküllü metabolit profillerini inceler. Genel olarak, omik bilimlerinin amacı yapıya dahil olan tüm biyolojik moleküllerin, hücrenin, dokunun veya organizmanın işlevi ve dinamiklerini tanımlamak, karakterize etmek ve ölçmektir (Ametaj 2017, Vailati-Riboni ve ark 2017).

1.2.1. Genomikler

Genomikler, genomlar olarak adlandırılan bir organizmadaki genler dahil tüm DNA setlerini inceleyen bilim dalıdır. NGS teknolojisindeki gelişmeler ile genom skalalı verilerin elde edilmesi daha da kolaylaşmıştır. Böylece genotip ile fenotip arasında var olan boşluk tam genom analizleri sayesinde kapatılmıştır. Genetik bilimi ile genomikler birbirlerine benzeseler de belirgin farklılıkları vardır. Genetik, kalıtım çalışmasıdır ve DNA ile bir nesilden diğerine özelliklerin nasıl aktarıldığını gösterir. Çalışma alanı belirli veya sınırlı sayıdaki genler veya fonksiyonu bilinen genler üzerindedir. Günümüzde, yüksek verimli teknoloji ve hesaplamalı biyolojideki gelişmeler, organizmalarda genom yapısı açısından çalışmaların başlamasını sağlamıştır. Böylece biyolojik sorular genom çapında değerlendirilmeye başlanmıştır. Bunun sonucunda da genetik bilimi, genomiklerle aşamalı olarak birleşmeye başlamıştır (Ametaj 2017). Genomiklerin ortaya çıkışı, hem insanlarda hem de diğer türlerde QTL ile ilişkili aday bölgeleri tanımlamak için kullanılan GWAS, yöntem olarak altın standarta dönüştürmüştür (Gondro ve ark 2013). Genom boyunca yayılmış çok sayıda SNP belirteçleri ile ve çeşitli ticari şirketler tarafından geliştirilen prob tabanlı çipler, genler ve ilgi alanları arasındaki ilişkilerin açıklanmasına yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Günümüzde 10.000 ile 800.000 arası SNP'yi kapsayan türe özgü diziler mevcuttur. Bu kapsam, herhangi bir QTL'nin

en az bir belirteç ile yakından bağlantılı olmasını temin eder. Bu nedenle GWAS, hastalıkla ilgili kantitatif özelliklerin haritasını çıkarmak için kullanılan güçlü bir metot haline gelmiştir. Eşzamanlı olarak çalışılan çok sayıda gen ile yapılan genomik çalışmalar, geleneksel genetik birliktelik yaklaşımlarının sınırlarını aşarak periparturient hastalıkların anlaşılmasına katkı sağlamaktadır (Loo 2010).

GWAS sonuçlarının yorumlanması halen önemli bir zorluk olarak görülmektedir. Örneğin, bir fenotip ve bir gen listesi arasında güçlü bir ilişki ortaya çıkarsa, yeni aday genlerin bulunma olasılığı konusunda duyulan güven artar. GWAS'ın keşif gücüne rağmen, ilgi alanı ile ilişkili genlerin rolünü doğrulayacak çalışmalar, fonksiyonel ilişkileri doğrulamak bakımından yapılmalıdır. Bu sorunu çözmek için, gen tabanlı yazılımlar GWAS sonrası analizde etkili bir çözümdür (Capomaccio ve ark 2015). Son yıllarda çeşitli SNP dizi veri yönetimi araçları geliştirilmiştir ve bunlar arasında bir açık kaynak kodlu tüm genom ilişkilendirme analiz araç seti olan PLINK (Purcell ve ark 2007), hız ve doğruluk oranı nedeniyle veri yönetimi için standart olarak kabul edilmiştir. Günümüzde, tüm GWAS ağı, çoğu durumda R ortamında sıklıkla geliştirilen açık kaynaklı çok platformlu yazılım paketleri olan geçici bilgisayar programları tarafından kolayca yürütülebilmektedir (Nicolazzi ve ark 2015). Belirli bir özellik veya özellikler için hayvan yetiştirme bağlamında, genomik seleksiyon özel bir konu olarak ortaya çıkmaktadır (Meuwissen ve ark 2001). Bu yaklaşım, tüm genomu kapsayan çok sayıda genetik belirtecin ABV'yi, yani genotiplerine göre genç hayvanların genetik değerini tahmin etmek için kullanıldığı bir belirteç destekli seçim şeklidir. Bu şekildeki seçim, geleneksel olarak nesil testine dayanan farklı hayvan popülasyonlarında üretim aralığını düşürebilir ve genetik iyileşme oranının artmasına katkı sağlayabilir (Goddard ve Hayes 2007). Yakın gelecekte DNA sekanslama verimliliğindeki devam eden ilerleme, tek tek hayvanların tam genom sekanslanmasını mümkün kılacak ve böylece uygun QTL'lerin allellerine sahip hayvanların seçilmesine izin verecektir. Bu gelişmeler bireysel genom dizilemesinin sadece evcilleştirme ve ırkların seçiminin incelenmesine değil, aynı zamanda çevresel faktörlerle ilişkili nicel farklılıkların hayvan hastalıklarının kontrolü bazında anlaşılmasına izin vereceğini göstermektedir (Bai ve ark 2012).

1.2.2. Transkriptomikler

Transkriptom, bir hücre veya doku tarafından eksprese edilen, böylece hücrel metabolizmanın bir anlık görüntüsünü temsil eden, mRNA, kodlanmamış RNA, rRNA ve tRNA'nın dahil olduğu toplam RNA'dır. Transkriptom dönemi, ink-jet DNA sentezleyiciyi kullanarak mikrodizi teknolojisinin geliştirilip (Schena ve ark 1995), önceden belirlenmiş bir dizi hücrel mRNA'nın büyük ölçekte analiz edilmesi ile başlamıştır. Bununla birlikte, yüksek verimli ileri nesil DNA sekanslama teknolojisinin son zamanlarda piyasaya sürülmesi, RNAseq ile cDNA sekanslaması yoluyla RNA analizine izin vererek transkriptomide devrim yaratmıştır (Voelkerding ve ark 2009). Bu teknoloji, mikrodizinin yarattığı sınırlı dinamik tespit aralığı gibi çeşitli zorlukları ortadan kaldırdığı gibi transkriptomun niteliksel ve yalnızca niceliksel yönleri, transkripsiyon başlatma sahaları, duyusal ve duyusal olmayan transkriptleri, alternatif birleştirme olayları ve gen füzyonu hakkında da daha fazla bilgi sağlar. Aynı zamanda, toplam RNA'nın kodlanmayan RNA kısmı hakkında ayrıntılı bilgi sağladığı için RNAseq, epigenetikler gibi karmaşık düzenleyici mekanizmaların anlaşılmasını sağlamıştır. Yirmi birinci yüzyılın başlarından beri, çeşitli epigenetik mekanizmalar arasında öne çıkan en önemli mekanizma, küçük kodlanmamış bir RNA sınıfı (18-25 nükleotit) olan miRNA'dır. miRNA, mRNA'nın translasyonunu önleyerek transkripsiyon sonrası regülasyonunun kontrol edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Romao ve ark 2011). Ayrıca, miRNA sadece epigenetik mekanizmanın bir parçası değildir ve aynı zamanda regülasyonunda yer alarak epigenetik araçların rollerini aydınlatır (Poddar ve ark 2017). Ek olarak, RNAseq veya miRNA tasarımı mikrodiziler yoluyla miRNome da analiz edilebilir (Ametaj 2017).

1.2.3. Proteomikler

Proteom terimi, belirli bir zamanda bir hücre, organ veya organizmadaki tüm protein gruplarının identifikasyonu ve kantifikasyonu olarak tanımlanır (Wasinger ve ark 1995). Dolayısıyla, bir proteomik analiz yeni biyobelirteçlerin keşfini, post-translasyonel modifikasyonların tanımlanmasını ve lokalizasyonu ile protein-protein etkileşimlerinin çalışmasını kolaylaştırır, belirli bir zaman noktasında bir hücre veya dokunun protein bileşimini gösterir (Chandramouli ve Qian 2009). Karmaşık biyolojik örneklerin protein yapılarını tanımlamak ve farklı şekilde ölçmek için güçlü

teknikler oluşturulmuştur. Bu sebeple hayvancılık araştırmacıları tarafından proteomik çalışmalar benimsenmiştir (Lippolis ve Reinhardt 2008, Sauerwein ve ark 2014). Modern proteomiklerin temeli, bir örnekteki tüm kimyasal bileşiklerin iyonize olduğu ve ortaya çıkan yüklü moleküllerin yani iyonların m/z oranlarına göre analiz edildiği bir teknik olan MS'dir (Aebersold ve Mann 2003). MS analizinden önce kompleks protein karışımlarının basit bir ön ayrılması için genellikle 1D-PAGE veya 2D-PAGE kullanılır. Ancak işlemdeki otomasyonu daha da geliştirmek ve akışlı bir ağ analizi oluşturmak için, jel bazlı ayırma tekniklerini tamamlamak veya ikame etmek için HPLC gibi farklı tiplerde sıvı kromatografisi kullanılmalıdır (Ametaj 2017). Ortam ve davranışlar arasındaki proteinlerin tanımlanması, bilgisayar simülasyonlu protein veritabanıyla karşılaştırılarak gerçekleştirilir. Ham veriler, protein veritabanlarından teorik olarak üretilen verilerle doğrudan karşılaştırılır. Tanımlanan proteinin güvenilir bir şekilde kantifiye edilmesi kimyasal, metabolik, enzimatik etiketleme ve etiketsiz dahil olmak üzere çeşitli MS bazlı niceleme yöntemleriyle de mümkündür (May ve ark 2011). Proteomik ilerlemeler, AQUA, QConCat ve PSAQ yaklaşımları için protein standartı aracılığıyla proteinlerin mutlak kantifikasyonu mümkün kılınmıştır (Brun ve ark 2007, Rivers ve ark 2007).

1.2.4. Metabolomikler ve Metabolom

Metabolom, biyolojik bir numunedeki metabolitlerin genel profillendirilmesinden oluşur. Bir metabolomik analiz, çeşitli biyolojik sıvılar ve doku tipleri üzerinde gerçekleştirilebilir ve bir dizi farklı teknoloji platformunu kullanabilir. Metabolomikler, metabolomun entegre bir resmini elde etmek için tipik olarak PCA ve PLS gibi istatistiksel araçlarla birlikte yüksek çözünürlüklü analizleri kullanır (Zhang ve ark 2012). Metabolomik verileri toplamak için kullanılan iki ana teknoloji, veri toplama kapasiteleri çok yüksek olan MS ve NMR'dır (Ametaj 2017). En yaygın spektroskopik analitik tekniklerden biri olarak NMR, mikro molar aralıktaki çok çeşitli organik bileşikleri tek biçimde tanımlayabilir ve eşzamanlı olarak ölçülebilir. Bu ölçüm sonucunda metabolit profilleri hakkında yalın bilgi sağlar. Bu yaklaşımla saptanabilen geniş molekül spektrumu arasında peptitler, amino asitler, nükleik asitler, karbohidratlar, organik asitler, vitaminler, polifenoller, alkaloidler ve inorganik türler bulunur. MS uygulaması, genellikle GE-MS, LC-MS, UPLS-MS veya CE-MS gibi diğer tekniklerle birlikte yüksek verimli

metabolomiklerle ilgili yüksek bir kazanım sağlar. Yüksek sensitivitesi ve çok çeşitli örtülü metabolitleri nedeniyle MS, birçok metabolom çalışmasında tercih edilen teknik haline gelmiştir (Zhang ve ark 2012). MS ve NMR spektrometrelerinin kendilerine özgü avantajları ve dezavantajları vardır. MS'nin ana avantajı yüksek sensitivitesidir. Femtomolar (10^{-15}) ve attomolar (10^{-18}) düzeyinde analitlerin saptamasına olanak sağlar. LC ve GC ile kombine edildiğinde MS, tek bir örnek ile yüzlerce metabolitin ölçümüne imkan sağlar. Pekçok MS ile kombine edilmiş kütle doğruluğu ve gerçek zamanlı tandem MS tekniği, metabolit identifikasyonunu daha da kolaylaştırır. MS'nin metabolomik analizlerinde temel eksikliklerinden biri düşük kantifikasyon özelliğidir. Herhangi bir bileşiğin MS sinyal yoğunluğu örnek hazırlanış tekniğinden ve moleküler çevreden etkilenir. Miktarı bilinen internal izotop-etiketli standart eklenmesi kantifikasyon doğruluğunu arttırsa da bu uygulama keşfe bağlı metabolomik araştırmaları için pratik değildir. MS çalışmalarının çoğu pik alanlarının karşılaştırılması esasına dayanır. MS'in temel eksikliği olan kantifikasyon, NMR spektrometresinin temel avantajıdır. NMR spektrumundaki bir bileşiğin pik alanı, doğrudan belirli bir nükleusun (^1H , ^{12}C gibi) konsantrasyonuyla ilişkilidir. NMR spektroskopinin üstünde çok durulmayan bir diğer özelliği serum, idrar gibi biyosıvılardaki metabolitlerin çok yönlü analizlerinin bozulmamış dokularda veya in vivo yapılabilmesidir. NMR spektroskopinin temel eksikliği ise MS'nin temel özelliği olan sensitivitedir. Kriyojen soğutulmuş prob teknolojisi, minimize edilmiş radyofrekans bobinleri, yüksek alan güçlü süper iletken mıknatıslar ile arttırılmış sensitiviteye rağmen NMR spektroskopinin sensitivitesi MS'ten halen düşüktür (Veenstra 2012).

1.3. Geçiş Dönemi Hastalıklarına Omik Yaklaşımlar

Sütçü sığırlarda gebelikten laktasyona geçişin uygun oluşu, doğum sonrası dönemde yüksek üretkenlik ve üreme performansı açısından önemlidir. Geçiş dönemi şartlarının kötü oluşu ise verimin ve üremenin düşüşü nedeniyle sütçü işletmelerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Geçiş dönemindeki sütçü sığırlardan alınan idrar, kan gibi sistemik vücut sıvıları ve doku biyopsileri hayvanların hastalık durumunu ve bu hastalık durumuna verdiği cevabı yansıtabilir (Ametaj 2017). Çeşitli biyokimyasal sistemleri değerlendiren omik profillendirmeleri genomikler, epigenomikler, transkriptomikler, proteomikler ve metabolomiklerdir (Itenov ve ark 2018). Bu sebeple omik profillendirmesi metabolik durumun

gösterilmesinde ve hastalık taramalarında DNA, RNA, lipidler, küçük molekül ağırlıklı metabolitlerle birlikte biyokimyasal örneklerin ölçümünde kullanılabilir (Vignoli ve ark 2019). Omik teknolojileri, vücudun herhangi bir yerinden birkaç yüz (bazı metabolomik ve proteomik yaklaşımları) ile birkaç milyon (genomik yaklaşımları) analitin ölçümüne olanak sağlar. Bu, tek molekül ilişkisine kıyasla hastalık patogenezinin tüm yolağının kritik olarak değerlendirilmesini sağlar. Bu yolakların identifiye edilmesi hastalığın alt tipleri veya spesifik hastalık sonuçlarının patogenezi hakkında tedaviye tahmin edilen cevap veya risk altındaki birey ve grupların tanımlanması hakkında kritik bilgi sağlar (Li ve ark 2017).

1.3.1. İmmünite

Geleneksel olarak, geçiş dönemindeki sığırların immünite araştırması, periparturient immün baskılamaya neden olan tek bir faktörü saptamaya çalışan indirgemeci bir yaklaşıma odaklanmıştır. Hem önceki hem de güncel araştırmalar bu fenomenin multifaktöriyel bir etiyolojiye sahip olduğunu ve geçiş dönemindeki yüksek hastalık insidansının doğru yönetimi için anlayışın yetersiz olduğunu göstermektedir. Omik bilimlerinin yardımı ile sistemler biyolojisi yaklaşımı önceki teknolojilerin başarısız olduğu durumlardaki nedensel ajanlar ve immünosupresyonun altında yatan mekanizmalar hakkında temel bir anlayış geliştirilebilir. Dahası bu yeni teknolojiler geçiş döneminde bozulan immünitenin tekrar oluşmasını sağlamaya ve immünosupresyonu takip eden yüksek hastalık insidansını düşürmeye yardımcı yönetim tekniklerinin geliştirilmesini sağlayabilir. Günümüzde, omik yaklaşımlarının geçiş dönemindeki sığırların immünitesine uygulanmasının başlangıç seviyesinde olduğu ve omik bilimlerinin sığır sağlığı ve immünitesi alanındaki önemini kavramak için daha fazla araştırma yapılması gerektiği unutulmamalıdır (Eckel ve Ametaj 2017).

1.3.2. Rumen Asidozu

Sütçü sığır işletmelerinde, erken laktasyon döneminde süt üretimini artırmak için hızlı fermente olan karbonhidrattan zengin rasyona geçiş sıklıkla uygulanmaktadır. Bu uygulama sonucu rasyondaki ani değişim veya tahıl içerik oranının aşırı artışına bağlı ruminal fermantasyon, ruminal emilim ve tamponlama

kapasitesini aşar. Bu durum ruminal asidoza zemin hazırlar. Aşırı miktarda tahıl içeren rasyonla beslenmeye bağlı oluşan rumen asidozu yangısal yanıt başlangıcına sebep olur. Bu yangısal yanıtın etiyolojisi karaciğer, barsaklar ve diğer iç organların dahil olduğu çoklu organ yangısal yanıtı olarak tanımlanır. Hızlı fermente olan karbonhidrattan zengin rasyon, rumen mikrobiyotasında kısa zincirli yağ asitlerinin birikimini arttır ve ruminal pH düşer (Khafipour ve ark 2009). Ruminal pH 5.6 veya daha düşük olduğunda, rumendeki mikrobiyal popülasyonlar, rumen pH'sını daha da düşüren laktat üretmeye başlar (Nagaraja ve Titgemeyer 2007).

Rumen asidozunun bir tipi olan SARA, günde en az 3 saat boyunca ruminal pH'nın 5,6'nın altında oluşu şeklinde tanımlanır (Gozho ve ark 2005). SARA en çok sütçü sığırlarda tespit edilmiştir. Sütçü sığırlarda yapılan çalışmalarda erken laktasyon dönemindeki hayvanların yaklaşık % 20'sinin SARA'dan muzdarip olduğu rapor edilmiştir (Plaizier ve ark 2008). SARA, kaba yem alımında (Gozho ve ark 2005, Plaizier ve ark 2008), ruminal lif sindiriminde (Plaizier ve ark. 2001) ve süt yağ oranında (Khafipour ve ark 2009) düşüş ile ilişkilidir. Ayrıca SARA, diyare, gastrointestinal hasar, karaciğer apsesi ve yangısal reaksiyon oluşturması sebebi ile genel durumu bozar.

SARA gelişmiş Holstein sığırlarda rumen mikrobiyotasının fonksiyonel gen ekspresyonu ve aktif metabolik yollarını inceleyen bir metatranskriptomik analizde selülitik rumen bakterileri olan *Fibrobacter succinogenes* ve iki *Ruminococcus* türünün asidoz durumunda azaldığı, mısır silajı ile oluşturulmuş asidozis durumunda rumende vitamin, kofaktör, amino asit, karbonhidrat ve enerji metabolizması gen harita yollarında üç yeni biyofilm formasyon yolağının zenginleştiği rapor edilmiştir (Ogunade ve ark 2019).

Ruminal asidozis gelişmiş sütçü sığırlarda NMR ve GC-MS teknikleri kullanılarak yapılan bir metabolom çalışmasında, rasyonda %30-45 oranında hızlı fermente olan karbonhidrat oranı artışının rumende metilamin, N-nitroso-dimetilamin, dimetilamin, glikoz, alanin, maltoz, urasil, propiyonat, fumarat, bütirat, valerat, ksantin, etanol, fenilasetat, valin, löysin, lizin, nikotin, gliserol ve fenil asetil glisin konsantrasyonlarında artış, fosfatidilkolin ve 3-fenil propiyonat konsantrasyonlarında düşüş tespit edilmiştir (Ametaj ve ark 2010).

Yüksek verimli sekanslama metotlarıyla yapılan çalışmalar sonucu çoklu genlerin ekspresyon seviyelerinin rumen epitel proliferasyonu ve metabolizması, gastrointestinal bariyer fonksiyonu ve hepatik enzim aktivitesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Ametaj 2017).

1.3.3. Hipokalsemi

Gebeliğin sonuna ve laktasyonun başlangıcına doğru vücudun Ca ihtiyacı önemli oranda artar. Sütün Ca içeriği yaklaşık 1,2 gr/L'dir ve modern sütçü sığırlar laktasyonun pik yaptığı zaman günlük 60 litreye kadar süt üretebilir. Bu da günlük 70 gram Ca kaybı demektir (Cairolı ve ark 2006). Metabolik adaptasyonlar aktive edilmediği takdirde kan Ca konsantrasyonu kritik limitin (< 2 mmol/L) altına düşer ve klinik veya subklinik hipokalsemi gelişir. Hipokalsemi hayvanın genel durumunu, ileri zamandaki süt üretimini ve fertilitiyi etkiler. Ayrıca hipokalsemi immüsupresyon ile ilişkilidir. Doğumdan sonraki ilk günde kan Ca konsantrasyonu düşük sığırlarda retensiyon sekondinarum, metritis ve mastitis gelişim riski, kan Ca konsantrasyonları normal seviyede olan sığırlara göre daha yüksektir. Bunlara ek olarak hipokalsemi AD, ketozis ve yağlı karaciğer sendromu gibi metabolik hastalıklarla da ilişkilidir (Kim 2010). Ayrıca AD'li sığırlarda görülen hipokalsemi, paratiroid hormon reseptörlerinin sensitivitesinin azalması ile ilişkili olan ve bu durum için bir risk faktörü olan metabolik alkaloz sebebiyle de görülebilir. Doğumu takiben gelişen iştahsızlık da hipokalsemi oluşumuna katkı sağlar. Puerparal hipokalsemi, abomazal motiliteyi azalttığından dolayı abomazum deplasmanı için önemli bir predispozisyon sebebidir (Ismael ve ark 2018). Kuru dönemde DCAD oluşturmak için anyonik tuz kullanımı, erken laktasyonda klinik hipokalsemi oluşumunu minimize eder. Ek olarak erken laktasyonda oral olarak kalsiyum takviyesi kullanımı hipokalseminin giderilmesinde alternatif bir stratejidir (Caixeta ve ark 2018).

Deneyisel hipokalsemi oluşturulan ve postparturient hipokalsemi gelişen laktasyon döneminde olmayan sığırlarda mikro array bazlı bir genomik çalışmada postparturient hipokalsemili sığırlarda sağlıklılara göre 98 genin ekspresyonunun değiştiği, bunlardan PKIB, DDIT4, PER1, NUAK1, ve EST'nin hipokalsemi ve

pospartürent hipokalsemi ile ilişkili olduğu, NESP55 geninin sadece pospartürent hipokalsemi için spesifik olduğu rapor edilmiştir (Sasaki ve ark 2014).

Postparturient hipokalsemi gelişmiş sütçü sığırlarda yapılmış ¹H-NMR bazlı bir metabolom çalışmasında sağlıklı sütçü sığırlara göre hipokalsemik sığırlarda glikoz, gliserol, alanin, GABA ve fosfokreatin seviyelerinde düşüş; pirüvat, keton ve lizin seviyelerinde ise artış görülmüştür. Bu sonuç hipokalseminin glikoz, yağ ve protein metabolizması yollarının değiştiği bir enerji metabolizması bozukluğu olduğunu gösterebilir (Sun ve ark 2014).

1.3.4. Retensiyon Sekundinarum

Retensiyon sekundinarum süt üretiminde düşüş, diğer periparturient hastalıklara predispozisyon ve ekonomik kayıplara sebep olan, sütçü sığırlarda doğumu takiben 24 saat içerisinde fetal membranların atılmaması ile karakterize oldukça yaygın bir durumdur. Retensiyon sekundinarumun sütçü sığırlarda bildirilmiş ortalama insidansı %4-16'dır (Eiler 1997). İkiz doğum, güç doğum, hipokalsemi, yüksek çevre sıcaklığı, yaş, prematüre doğum, stres, bakteriyel endotoksinler ve nötrofil inaktivasyonu gibi çeşitli çoklu faktörler retensiyon sekundinarum insidansını etkiler (McNaughton ve Murray 2009).

Retensiyon sekundinarum gelişmiş sütçü sığırlarda yapılan bir proteomik çalışmasında serum albumin, alfa enolaz, apolipoprotein, anneksin A8 benzeri-1, serin proteinaz inhibitörü, glutation transferaz ve transketolaz ekspresyonlarının sağlıklı sığırlara göre değiştiği tespit edilmiştir. Bu değişimin retensiyon sekundinarum olgularında gelişen fibrinoliz, yangısal yanıt, oksidatif stres ve pirüvat metabolizması ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Fu ve ark 2016). Yapılan bir metabolom çalışmasında ise serum visfatin seviyesinin retensiyon sekundinarum için diagnostik bir biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir (Fadden ve Bobe 2016). Gebe sütçü sığırlarda yapılan MS bazlı bir metabolom çalışmasında doğumdan 8 hafta önce asilkarnitin, fosfatidilkolin, lizofosfatidilkolin, amino asit ve biyojenik aminlerin değişime uğradığı ve serum lizin, ornitin, asetilornitin, aspartat ve löysin seviyelerinin sütçü sığırlarda retensiyon sekundinarum için potansiyel prediktif biyobelirteçler olabileceği bildirilmiştir (Dervishi ve ark 2018).

1.3.5. Mastitis

Geçiş dönemindeki sığırlarda gözlenen metabolik ve endokrin değişimler ve stres faktörlerinin immünite üzerine olumsuz etkileri vardır. Sığır, bu değişimler ile özellikle doğumdan sonraki ilk haftalarda enfeksiyöz hastalıkların gelişimine karşı savunmasız hale gelir. Mikroorganizmalar, travma veya toksin gibi fiziksel ve kimyasal nedenlere bağlı meme bezinin yangısı olarak tanımlanan mastitis, geçiş dönemi ve erken laktasyondaki sütçü sığırlarda oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Periparturient dönemde oluşan mastitis, klinik ve subklinik olarak sınıflandırılır. Sığırlarda 200'den fazla farklı patojenin mastitise sebep olabileceği bildirilmiştir (Zadoks ve ark 2011).

Son yıllarda omik teknolojilerindeki gelişmeler ile sığırların mastitis etiopatolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlanmıştır. Laktasyondaki sütçü sığırlarda yapılan bir GWAS çalışmasında, mastitis oluşumuna dirençli sığırlarda 117 SNP ve 27 QTL genleri tespit edilmiştir. Tespit edilen genlerden 10 QTL yeni olup bu QTL'lerden RAS guanil-releasing protein 1 geni mastit direnci için aday belirteç olarak bildirilmiştir (Kurz ve ark 2019).

Streptococcus uberis'e bağlı mastitis gelişmiş sütçü sığırlarda yapılan bir metabolom çalışmasında enfekte meme bölgesinde serum amiloid A3, haptoglobin, lipopolisakkarit bağlayıcı protein, süperoksit dismutaz-2 ve toll-like reseptör-2 sinyalizasyon ekspresyonunun, enfekte olmamış meme bölgesi ile karşılaştırıldığında arttığı rapor edilmiştir (Swanson ve ark 2009). Koliform mastitisli sığırlarda yapılan bir diğer metabolom çalışmasında ise hem süt hem plazma lipoksigenaz ve sitokorm P450 türevi oksilipid fraksiyon konsantrasyonlarının arttığı bildirilmiştir (Zadoks ve Fitzpatrick 2009).

1.3.6. Laminitis

Sığırların laminitisi, hem vasküler hem de hücresel değişimlerin dahil olduğu toynağın dermal katmanının diffüz yangısı olarak tanımlanmıştır. Sütçü sığırlarda laminitis fizyopatolojisi ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Laminitisli sığırlarda plazma protein değişimlerini inceleyen MS bazlı bir proteomik çalışmasında enerji metabolizması (izositrat dehidrogenaz-1) ve lipid metabolizması (apolipoprotein A-1

ve A-4, hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktaz) ile ilişkili proteinlerin konsantrasyonlarında artış rapor edilmiştir (Dong ve ark 2015). Ayrıca serum amiloid A, haptoglobin gibi akut faz proteinlerinin, interlökin 6 ve tümör nekroz faktör gibi proenflamatuvar sitokinlerin, NEFA ve BHBA gibi lipid metabolitlerinin serum konsantrasyonlarında laminitise bağlı klinik topallık oluşumundan haftalar önce artış görüldüğü bildirilmiştir (Zhang ve ark 2015).

Geçiş dönemindeki sütçü sığırlarda yapılan MS bazlı bir proteomik çalışmada laminitis ile ilişkili olarak komponent C9, haptoglobin ve konglutinin yanı sıra apolipoprotein A-IV ve ayrıca lipid metabolizmasında da yer alan apolipoprotein AI, 3-hidroksi-3-metilglutaryil-CoA redüktaz, çinko parmak 300 benzeri protein, transmembran proteini TMP10, izositrat dehidrojenaz ve albumin konsantrasyonları yüksek bulunmuştur (Ceciliani ve ark 2018). Omik teknolojilerinin kullanımı ile hastalık gelişiminde diğer uzak doku ve organların durumu ve hastalığın fizyopatolojisi anlaşılır hale gelmiştir.

1.3.7. Metritis ve Endometritis

Uterusun mukozal çevresi, patojenlerden fiziksel anatomik bariyerler ve moleküler mekanizmalar ile korunmakla birlikte sütçü sığırlarda, özellikle geçiş döneminde, bu mekanizmalar baskılandığında metritis veya endometritis gelişebilir. Doğum için serviksin açılması, doğuma bağlı doku lezyonları ve plasental membranların ve buzağının atılması anatomik bariyerleri bozar. Bu durum da metritis ve endometritise sebep olan bakteriyel enfeksiyonları kolaylaştırır. Bu hastalıkların postpartum insidansı yüksektir ve sıklıkla fertilitede düşüğe sebep olur (Cairolı ve ark 2006).

Metritis veya endometritis gelişmiş sütçü sığırlarda yapılmış MS bazlı bir proteomik çalışmada, doğuma yakın sağlıklı sığırlarda da yangısal reaksiyon geliştiği alfa asit glikoprotein, haptoglobin gibi pozitif akut faz proteinlerinin artışı ve fetuin-A gibi negatif akut faz proteinlerinin düşüşü ile gösterilmiştir. Bu durum yaklaşan doğumun da akut faz reaksiyonuna sebep olduğunu göstermektedir (Cairolı ve ark 2006). Benzer şekilde periparturient dönemdeki sütçü sığırlarda yapılan MS bazlı bir proteomik çalışmada MALDI-TOF ile birlikte yapılan 2-DE analizinde endometrial örneklerde endometiritis ile ilişkili proteinler identifiye edilmiştir.

Desmin, alfa aktin-2, ısı şok protein-27, peroksiredoksin-6, luteinize edici hormon reseptör isoform 1, kollektin-43 prekürsörü, deoksiribonükleaz-I ve MHC klas I ağır zincir ekspresyonu artarken transferrin, interlökin-2 prekürsörü, hemoglobin beta alt birimi ve potasyum kanal tetramerizasyon domain içerik-11'in ekspresyonunun normal endometriyuma sahip sağlıklı sütçü sığırlara göre azaldığı rapor edilmiştir (Choe ve ark 2010).

1.3.8. Yağlı Karaciğer Sendromu

Sütçü sığırlarda görülen yağlı karaciğer sendromu insanlardaki NAFLD ile benzerlik göstermektedir. Bildirilen bulgular arasında yağ asidi indirgenmesinin azaldığını ve karaciğer hastalığına yatkınlığın arttığını gösteren asetil-CoA dehidrogenaz, asil-CoA asetiltransferaz-2 ve yağ asidi bağlayıcı protein-1 regülasyonlarında düşüş rapor edilmiştir. Bu düşüşün aksine membranlar arasında kolesterol ve fosfolipidlerin transferini yapan sterol taşıyıcı protein-2, gıda alımı kısıtlanmış sığırlarda yüksek bulunmuştur. Bu durum artmış lipid transferini göstermektedir. Ana görevi oksidatif hasara karşı koruma olan peroksiredoksin-6 seviyesinin düşüşü, gıda alımının kısıtlandığı durumlarda ruminantların karaciğerinde oksidatif stresin arttığını gösterir. Karbonhidrat metabolizmasında ise 6-fosfofruktokinaz, enolaz 1, triosefosfat izomeraz, fruktoz bifosfat aldolaz B, sorbitol dehidrogenaz ve aldehil dehidrogenaz 2 enzim konsantrasyonlarının ad libitum beslenen sığırlara göre gıda alımı kısıtlanmış sığırlarda daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Kuhla ve ark 2009).

Yağlı karaciğer sendromlu 171 Holstein sığırdaki yapılan NMR bazlı bir metabolom çalışmasında BHBA, izobütirat ve aseton, amino asitlerden glisin, valin, trimetilamin-N-oksit ve sitrülün konsantrasyonları yüksek; alanin, asparagin, glikoz, GABA, gliserol ve kreatinin seviyeleri düşük bulunmuştur. TCA siklusuna girdiklerinden enerji açığı durumunda alanin ve asparagin seviyelerinin düşüşü glikoneogenezde rollerinin bulunmasından dolayı beklenen bir durumdur. Trimetilamin-N-oksit ve sitrülün seviyelerinin artışı, oksidatif stres ve karaciğer hasarı ile ilişkili olarak rapor edilmiştir (Xu ve ark 2016).

1.3.9. Ketozis

Ketozis, özellikle sütçü sığırlarda, NEB ile ilişkili, eş zamanlı olarak kan keton seviyesinin artışı ve glikoz seviyesinin düşüşü ile karakterize temel üretim hastalığıdır (El-Deeb 2015). Ketoziste pekçok metabolik yolakta değişim gerçekleşir. Ketozisli sığırların karaciğerinde miyozis, MGC128326 gibi yapı proteinlerinin regülasyonunun arttığı rapor edilmiştir. Alfa enolaz, gibi glikoneogenezle ilişkili proteinler ketoziste artış gösterir. Ketotik karaciğerde azalan asetil-CoA asetiltransferaz-2 ve 3-hidroksi asil-CoA dehidrogenaz gibi proteinler ayrıca yağ asidi oksidasyonunda da görevlidirler. Bu durumun, ketozis ile lipidozisin ilişkili olduğunu, lipidlerin kullanım kapasitesinin azalması sonucu hepatositlerde yağ asidi birikiminin arttığı ve hepatic lipidoz gelişimine katkı sağladığı rapor edilmiştir (Klein ve ark 2012).

Klinik ve subklinik ketozisli sığırlarda yapılan bir çalışmada düşük laktat ve L-alanin seviyesinin ketozis ve karbonhidrat metabolizması ile ilişkili olduğu ve gelişen hipogliseminin glikoneogenezis prekürsör eksikliğine bağlı olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca ketozis teşhisinde BHBA seviyesinin altın biyobelirteç olduğu, yağ mobilizasyonunun bir indikatörü olan cis-9-hekzadekanoik asitin ise potansiyel diagnostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır. Klinik ketoziste kandaki amino asitlerden konsantrasyonu artanlar; glisin, löysin, izolöysin, valin ve düşenler arjinin, triptofan ve lizindir (Zhang ve ark 2013).

Ketozisli sütçü sığırlarda yapılmış mikroarray bazlı transkriptom ve GC-MS, LC-MS bazlı bir metabolom çalışmasında ekspresyonu değişmiş 3065 gen ve 313 metabolit tespit edilmiştir. Bunlardan glikokenodeoksikolik asit konsantrasyonu en yüksek ve insanlardaki NAFLD ile benzer olarak rapor edilmiştir. KEGG yolak veritabanı kullanılarak elde edilen biyoinformatik bilgiye göre kofaktör ve vitamin metabolizması ile lipid, karbonhidrat ve glikan biyosentez metabolizmasının regülasyonunun düştüğü, benzer şekilde fruktoz-1,6-bifosfataz 2 ve pirüvat dehidrogenaz kinaz 4 konsantrasyonlarının prepartum sütçü sığır karaciğerlerinde bozulmuş glikoneogenez ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shahzad ve ark 2019).

1.3.10. Abomazum Deplasmanı

Sütçü sığırlarda genellikle erken laktasyon döneminde görülen AD, ekonomik kayıplara sebep olan önemli bir geçiş dönemi hastalığıdır. Oluşumundaki ana faktör hipomotilite ve yetersiz gaz geçişi olarak kabul edilmektedir (Van Widen ve Kuiper 2003, Doll ve ark 2009, Lehner ve ark 2018). LDA gelişmiş sütçü sığırlarda GWAS ile yapılan bir genomik çalışmada Bovine High Density BeadChip kullanılarak sığır kromozomlarında LDA ile ilişkili 6 genomik bölge (2, 8, 13, 20, 24 ve X) identifiye edilmiştir. Ayrıca allel spesifik PCR genotip teknolojisi kullanılarak LDA ile ilişkili olan BTA2, 8, 13 ve 27 lokusları identifiye edilmiş, bu lokusların sütçü sığırlarda LDA gelişimine duyarlılığın belirlenmesine katkı sağlayabileceği rapor edilmiştir (Lehner ve ark 2018).

Abomazum deplasmanlı sığırlarda 400 MHz'lik NMR bazlı ilk yapılan bir ön çalışmada (Başoğlu ve ark 2014) sadece plazma örneklerinde BHBA seviyeleri ile glikojenik amino asit (valin, glutamin ve glutamat) seviyeleri arasındaki pozitif korelasyonun, ketozise karşı glikoz üretimine katkı sağladığı belirtilmiştir. Bu araştırmacılar, NMR bazlı metabolomik değerlendirmenin AD'li sığırların metabolik durumlarının değerlendirilmesine katkı sağlayabileceği kanısına varmışlardır.

Postpartum LDA'lı sütçü sığırların plazma örneklerinde yapılmış LC-Q/TOF-MS bazlı bir metabolom çalışmada LDA ile ilişkili metabolik ağlar, metabolomik yolak analizi ile oluşturulmuş ve LDA'lı sığırların metabolik profilinin değiştiğini yansıtan 68 plazma metaboliti ile birlikte 13 metabolik yolak (histidin metabolizması, tirozin metabolizması, valin, löysin ve izolöysin biyosentezi, fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi, arjinin ve prolin metabolizması, triptofan metabolizması, keton cisimlerinin sentez ve yıkılması, linoleik asit metabolizması, araşidonik asit metabolizması, sitrat siklusu, butanoat metabolizması, vitamin B6 metabolizması ve pirimidin metabolizması) identifiye edilmiştir (Guo ve ark 2019).

Omik bilimleri kullanılarak yapılan önceki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda abomazum deplasmanlı sütçü sığırlarda serum, idrar ve karaciğer örneklerinin birlikte değerlendirildiği ve NMR bazlı metabolom profilendirilmesinin yapıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu projenin amacı, postpartum multiparous sütçü sığırlarda abomazum deplasman vakalarının metabolizmasını serum, idrar ve karaciğer biyopsi örnekleri üzerinden 700 MHz'lik NMR spektroskopisi tekniği ile daha kapsamlı değerlendirerek yeni potansiyel biyobelirteçler elde etmek ve bu hastalığın diğer üretim hastalıkları ile ilişkili olan kompleks patogenezi aydınlatmaya katkıda bulunmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Araştırmanın hayvan materyalini Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı kliniğine getirilen 1 ay içerisinde doğum yapmış 50 abomazum deplasmanlı (42 LDA ve 8 RDA) multiparous Holstein sığır oluşturdu. Sağlıklı grup olarak Aksaray çevresindeki özel çiftliklerde bulunan, aynı bakım ve besleme şartlarındaki 20 sağlıklı multiparous Holstein sığır hayvan materyali olarak kullanıldı. Sağlıklı sığırlar laktasyonun birinci ayındaydı.

2.2. Gereç

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yürütüldü. Çalışma için Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (SÜVDAMEK)'den Etik Kurulu onayı (2017/68 sayılı karar) alındı.

2.3. Klinik Muayeneler ve Tanı

Çalışmaya dahil edilen tüm sığırların rutin klinik ve hematolojik muayeneleri yapıldı. Sağ ve sol taraflı ping sesine yol açan diğer sebepler ortadan kaldırıldıktan sonra anamnez, oskultasyonda karakteristik ping sesinin varlığı ve Liptak testi ile AD tanısı konuldu. LDA ve RDA tanısını doğrulamak için ultrasonografik muayene yapıldı (Ok ve ark 2002). LDA'lı sığırların 19'unda, RDA'lı sığırların ise 2'sinde ketozis bulunmaktaydı. Ketozis, idrar test stripleri kullanılarak (Bayer Clintek 50, Germany) idrar analizatöründe ve kan keton test stripleri (Abbott Optium Xceed Pro,

UK) ile kan keton analizatörü ile belirlendi. Tüm tanımlar cerrahi operasyon sırasında doğrulandı.

2.4. Kan, İdrar ve Karaciğer Örneklendirmesi

Çalışmaya dahil edilen tüm sığırların kan örnekleri coccygeal venadan heparinli (kan gazları için) ve K₃-EDTA'lı (hemogram için) tüplere alındı. Kan örneklerinin hematolojik ölçümleri 10-15 dakika içinde yapıldı. Serum örnekleri 15 dakika 3000 rpm'de santrifüj sonrasında elde edildi ve analiz gününe kadar -80°C'de saklandı. İdrar örnekleri steril, metal kateter (yaklaşık 0,5 cm çapında 40 cm uzunluğunda) ile alındı. Karaciğer biyopsi örnek alımı için sağ taraftan, yaklaşık 11-12. interkostal aralıkta bir bölge traş edildi, asepsi ve antisepsisi sağlandı. İnfiltrasyon anestezisi için derialtına ve interkostal kasa 5 ml %2 lidokain solüsyonu enjekte edildi. Bistüri ile yapılan küçük ensizyonu takiben Tru-cut (Merit Medical) biyopsi trokarı kullanılarak karaciğer örnekleri alındı (Davies ve Jebbett 1981).

2.5. Hematolojik ve Kan Gazı Analizi

Tam kan sayımı (kan hücre sayımı, MCV, MCHC, PCV ve Hb) dahil hematolojik analizler otomatik hücre sayacı (MS4e, Melet Schloesing Laboratories, Fransa) kullanılarak ve kan gaz analizleri (pH, pCO₂, pO₂, HCO₃ ve BE) kan gaz analizatörü (Gem Premier 3000, Instrumentation Laboratory, ABD) kullanılarak yapıldı.

2.6. Biyokimyasal Analiz

Serum örnekleri glikoz, laktat, kolesterol, trigliserit, total protein, albumin, bilirubin, BUN, kreatinin, bazı mineraller (Mg, P, Na, Cl, K, Ca ve iyonize Ca) ve bazı enzim aktiviteleri (AST, GGT, LDH ve CPK), NEFA ve CRP yönünden spektrometre (Autoanalyzer/BT3000 plus, Italy) ile analiz edildi. Kan BHBA seviyeleri tam kan kullanılarak Freestyle Optium H B-ketone, Abbott® test strip'leri ile ölçüldü.

2.7. Serum, İdrar ve Karaciğer Ekstraksiyonu

Serum ve karaciğer örnekleri, buz üzerinde çözdürüldü ve ikili metanol-kloroform ekstraksiyonları (hidrofilik ve lipofilik fraksiyonların protein presipitasyonu ve seperasyonu için) elde edildi. Bu ekstraksiyon metodu ile, proteinler gibi makromolekülleri elimine edildi ve suda ve yağda çözülebilen metabolitleri için birleşik bir metabolik profil oluşturuldu. 0,5 ml'lik donmuş serum, idrar ve karaciğer örnekleri, 1 ml kloroform:metanol (1:1 oranında) ile karıştırıldı ve santrifüj edildi. Süpernatant (organik faz) toplandı ve pelet 0,5 ml kloroform:metanol ile tekrar suspanse edilip santrifüj edildi. Süpernatantlar birleştirildi ve kalan suda çözülebilir metabolitleri organik fazdan temizlemek için 0,5 ml soğuk su eklendi. 15 dakika -20°C derecede tutulduktan sonra, üstte kalan kısım alındı ve çözülebilir metabolitleri peletten yıkamak için kalan kısma 1 ml su eklendi. Elde edilen örnek santrifüj edilip 42°C 'de evaporizasyon ile liyofilize edildi (Serkova ve ark 2005).

2.8. Metabolomik Değerlendirme

2.8.1. H-NMR Spektroskopisi için Örneklerin Hazırlanması

Su Bazlı Örnekler

Liyofilize su bazlı örnekler 700 μL dihidrojen oksitte ($^2\text{H}_2\text{O}$) çözdürüldü ve 1 dakika boyunca vortex'lenerek homojenize edildi. Daha sonra santrifüj edildi (3000 rpm, 4°C 'de 15 dakika boyunca) ve her bir süpernatanttan 630 μL , 70 μL potasyum fosfat buffer'a (1,5 M K_2HPO_4 , 100% (v/v) $^2\text{H}_2\text{O}$, 2mM NaN_3 , 5,8 mM dötaryumlanmış trimetilsilylpropanoik asit (TMSP); pH 7,4) eklendi. Örneklerin karıştırılmasından sonra her bir karışımdan toplamda 600 μL örnek, analiz için 5mm'lik NMR tüplerine (Bruker Biospin S.r.l.) aktarıldı.

Lipid Bazlı Örnekler

Liyofilize lipid ekstraktları 700 μL dötaryumlu kloroformda (CDCl_3) çözdürüldü ve 1 dakika boyunca çevirilerek homojenize edildi. Her bir karışımdan 600 μL örnek analiz için 5 mm'lik NMR tüplerine (Bruker BioSpin S.r.l.) aktarıldı.

2.8.2 NMR Analizi

Tek boyutlu ^1H -NMR spektra, 600,13 MHz proton Larmor frekansında ve 5 mm PATXI ^1H - ^{13}C - ^{15}N and ^2H -decoupling probun dahil olduğu a-z aksis gradiyent bobin, otomatik tuning makinası (ATM), otomatik ve dondurulmuş örnek değiştiricisi (SampleJet, Bruker BioSpin srl; Rheinstetten, Almanya) ile alışan Bruker 700 MHz'lik spektrometre (Bruker BioSpin S.r.l.; Rheinstetten, Almanya) ile elde edildi (şekil 2.1). BTO 2000 termocouple, örneklerin yaklaşık 0,1K seviyesinde sıcaklık stabilizasyonu için kullanıldı. lumden önce, diğer tüm ekstraktların 310K'da ve idrar su bazlı örneklerin 300K'da sıcaklık dengelenmesi için örnekler en az 5 dakika NMR prob başı içinde tutuldu.



şekil 2.1. Bruker 700 MHz'lik spektrometre (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Almanya).

Her bir su bazlı ve lipid bazlı örnek için tek boyutlu proton NMR spektrumu, standart Nukleer Overhauser Efekt spektroskopi puls sekansı kullanılarak (NOESY 1 D presat; noesygppr1d.com; Bruker BioSpin), 98,304 veri noktası, 18,028 Hz spektral genişlik ve 2,7 s veri elde etme süresi, 4 s relaksasyon gecikmesi, 0,01 s karıştırma süresi ve farklı sayılarda ekstraktın tipine göre taramalar (128 tarama hem

serum su/lipid bazlı ve karaciğer lipid bazlı örnekler için; 256 tarama karaciğer su bazlı ekstraktlar; 64 tarama idrar su ve lipid bazlı örnekler için) ile elde edildi.

Ek olarak, serum su bazlı ekstraktlar için standart spin eko CPMG¹ (cpmgpr1d.comp; Bruker BioSpin) ile birlikte 128 tarama, 73,728 veri noktası , 12,019 Hz'lik spektral genişlik ve 3,1 s elde etme süresi kullanılarak başka bir ¹H-NMR spektrumu elde edildi.

2.8.3 Spektral Proses

Fourier değişimi uygulanmadan önce serbest indüksiyon ayrılmaları 0,3 Hz sınır genişletici faktöre denk üstel fonksiyon ile çarpıldı. Değişime uğramış spektra otomatik olarak faz ve temel distorsiyonlar için düzeltildi ve TopSpin 3,2 (Bruker BioSpin) kullanılarak kalibre (anomerik glikoz doublet serum su bazlı ekstraktlar için 5,24 ppm, TMSP singlet karaciğer ve idrarın hidrofilik ekstraktları için 0,00 ppm ve kloroform singlet lipid bazlı örnekler için 7,20 ppm) edildi.

0,2 ile 10,0 ppm arasındaki her bir 1D spektrum, 0,02 ppm'lik kimyasal değişim kutularında segmentlendi ve AMIX yazılımı kullanılarak (3.8.4 versiyon, Bruker BioSpin) uyumlu spektral alanlara entegre edildi. Kutulama tekniği ile total değişkenlerin sayısı azaltıldı ve sinyallerdeki küçük kaymalar telafi edildi. Böylece analiz daha güçlü ve tekrarlanabilir hale getirildi (Holmes ve ark 1994).

Su bazlı ekstraktlar için, 4,60 ile 4,85 ppm arasındaki H₂O sinyal rezidüsü içeren bölgeler uzaklaştırıldı, yerine 6,90 ile 7,55 ppm arasında kloroform sinyali içeren bölgeler lipid bazlı ekstraktların spektrumundan uzaklaştırıldı. Dokuların tanımlanması için kalan kutulara PQN uygulandı (Dieterle ve ark 2006).

2.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel anlam, tüm hematolojik ve biyokimyasal değişkenler için One way ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Tüm metabolomik analizleri ve verilerin istatistiksel analizi için bir açık kaynak yazılımı olan R kullanıldı (Caixeta ve ark 2014). İşlenmiş veriye multivaryant analizi uygulandı ve ilk araştırma yaklaşımı olarak PCA kullanıldı. Denetimli teknik olarak latent yapılara OPLS uygulandı.

Uygulanan bu teknik ile, normalde spektroskopik veri modellemesi için kullanılan multivaryant projeksiyon metodu gösterildi. PLS metodunun (Ceciliani ve ark 2018) bir modifikasyonu olan bu algoritma ile veride doğrusal ilişkili yanıt (response linearly related) ile ilişkisiz ortogonal yanıt (response unrelated orthogonal) değerleri birbirinden ayrıldı ve veri yorumlaması daha basit hale getirildi (Trygg ve Wold 2002).

Farklı sınıflandırmalar için doğruluk ve yanılma matrisleri Monte Carlo kross-validasyonu düzeninin (MCCV, R scrip in-house developed) 100 siklusunun ortalaması ile değerlendirildi. Bu metot için verinin %90'ı çalışma seti olarak her bir tekrarlama, rastgele veriler model oluşturmak için seçildi. Kalan %10'luk veri test edildi ve sınıflandırma için sensitivite, spesifite ve doğruluk oluşturuldu. Bu prosedür her bir grubun ortalama ayırt edici doğruluğunu türetmek için 100 kez tekrarlandı.

Tüm NMR spektrumuna PQN metodu ile normalize edilmiş univaryant istatistiksel analiz uygulandı. AMIX 3.8.4 yazılımı (Bruker BioSpin) ile farklı metabolitler ile ilişkili spektral bölgeler belirlendi. Aynı bölgeler isteğe bağlı birimlerde metabolitlerin konsantrasyonlarını elde etmek için entegre edildi. Çalışmadaki sığır grupları arasında ayırt edici metabolitleri belirlemek için konsantrasyonların analizleri yapıldı. Wilcoxon signed-rank testi (Neuhauser 2011) metabolit konsantrasyonlarının normal olarak dağılmadığı biyolojik varsayım grupları arasında farklı metabolitlerin sonuçlarını çıkarmak için uygulandı. FDR Benjamini-Hochberg metodu (Benjamini ve Hochberg 1995) uygulanarak düzeltildi ve ayarlanmış p değeri < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İşlenmiş 1D spektrumu, öncelikle sağlıklı sığırlar ile hastalar arasındaki başlıca farklılıklara genel bir bakış oluşturmak için PCA ile analiz edildi.

1D NOESY'deki PCA skor alanları ve su bazlı serum örneklerinin 1D CPMG'deki alanları Şekil 4 (a) – (g)'de şematize edildi. Sonuç skor alanları, sağlıklı sığırların hastalardan ayırt edilmesinde yeterli bulunmadı. Hasta sığırların sağlıklılarından ayırt edilmesinde rapor edilmiş belirgin farklılıklar yoktu. Sağlıklılar ile hasta sığırlar arasındaki farklılıkları araştırmak için OPLS yetkilendirilmiş metot kullanıldı. OPLS modelleri 1D NOESY spektrada ve su bazlı serum örnekleri 1D

CPMG’de yapıldı ve farklı sayıdaki içerikler örnek tipine bağlı olarak model içinde tutuldu. Yapılmış tüm modeller, kross-validasyon analizinin tahmini doğruluğu tarafından her bir grubun sığırları, yüksek doğruluk ile birbirinden ayırt edildi. Çalışma grupları arasındaki ayırım Şekil 5 (a) – (g)’de sunuldu. Yapılan bu modelleme ile çalışmamızdaki sağlıklı sığırlar hastalardan >%80 doğruluk oranı ile serum, idrar ve karaciğer biyopsi örnek tiplerinde birbirinden ayırt edildi. Ayrıca serum metabolitlerine biyokimyasal bağlantı haritası ve bununla ilişkili yolak analizi uygulandı.

3. BULGULAR

3.1. Hematolojik ve Kan Gazı Bulguları

Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında RDA’lı grubun laktat ($p<0,02$), pH ($p<0,05$), BE ($p<0,000$), HCO_3 ($p<0,000$) ve pCO_2 ($p<0,006$) seviyeleri önemli ölçüde yüksek bulundu. Hematolojik parametrelerdeki diğer önemli değişimlere rağmen bunlar normal referans sınırları içerisindeydi. Çalışmaya dahil edilen sığır gruplarının hematolojik bulguları Tablo 3.1’de sunuldu.

Tablo 3.1. Sağlıklı, LDA’lı ve RDA’lı sığırların hematolojik ve kan gazı parametreleri.

Parametre	Sağlıklı	LDA	RDA	p değeri
WBC (x 10 ⁹ /L)	13,71±4,81	16,70±11,05	11,52±3,21	0,231
RBC (x 10 ¹² /L)	7,35±1,40b	8,36±1,22ab	8,79±1,29a	0,007
MCV	47,41±5,73	48,15±4,74	46,48±6,04	0,669
MCHC (x 10 g/L)	34,62±2,77a	31,64±2,47b	30,73±1,96b	0,000
PCV (%)	34,15±4,51b	40,11±6,61a	41,05±8,51a	0,002
Hb (x 10 g/L)	11,77±1,28	12,75±1,95	12,53±2,22	0,150
pH	7,44±0,03ab	7,42±0,07b	7,49±0,06a	0,019
Laktat (mmol/L)	1,49±1,01b	2,80±2,39ab	3,97±3,99a	0,028
pO ₂ (mmHg)	35,72±6,89	31,80±5,05	31,87±2,98	0,032
pCO ₂ (mmHg)	36,70±5,80b	38,67±5,68b	44,43±3,92a	0,006
HCO ₃ (µmol/L)	25,30±2,14b	24,88±5,21b	33,47±7,16a	0,000
BE (µmol/L)	1,17±2,41b	1,10±6,13b	10,18±7,00a	0,000

3.2. Biyokimyasal Bulgular

Sağlıklı grupla karşılaştırıldığında hasta gruplarının serum örneklerinde NEFA ($p<0,000$), GGT ($p<0,001$), BUN ($p<0,000$), kreatinin ($p<0,01$) ve CRP ($p<0,05$) seviyeleri yüksek; K ($p<0,000$), Na ($p<0,000$), Ca ($p<0,000$), total protein ($p<0,001$) ve Cl ($p<0,000$) seviyeleri ise düşük bulundu. Hasta gruplarında trigliserit seviyeleri LDA'lı grupta yüksek iken RDA'lı grupta düşüktü ($p<0,01$). Biyokimyasal parametrelerdeki diğer önemli değişimlere rağmen bunlar normal referans sınırları içerisindeydi. Çalışmaya dahil edilen sığır gruplarının biyokimyasal bulguları Tablo 3.2'te sunuldu.

Tablo 3.2. Sağlıklı, LDA'lı ve RDA'lı sığırların biyokimyasal parametreleri.

Parametre	Sağlıklı	LDA	RDA	p değeri
AST (U/L)	134,40±45,56	191,38±120,86	175,62±137,23	0,155
ALP (U/L)	58,30±12,97	63,47±29,59	79,62±41,76	0,189
GGT (U/L)	15,90±5,87b	41,52±34,26ab	70,75±63,33b	0,001
LDH (U/L)	2070,60±247,84	2005,59±571,85	2109,75±381,83	0,797
CK (U/L)	326,10±212,07	487,64±498,11	395,37±279,31	0,353
Trigliserit (mg/dL)	31,05±30,02ab	55,54±45,15a	20,50±14,17b	0,016
Total bilirubin (mg/dL)	2,18±1,06a	0,76±0,40b	0,76±0,41b	0,000
Kolesterol (mg/dL)	130,90±60,18	115,47±40,03	110,25±46,85	0,417
Total protein (g/dL)	7,89±0,69a	6,96±1,04b	6,70±1,21b	0,001
Albumin (g/dL)	3,56±0,32a	3,24±0,46ab	3,11±0,41b	0,012
Glikoz (mg/dL)	52,75±9,77b	82,66±51,13b	127,25±56,18a	0,001
NEFA (mmol/L)	0,28±0,36b	1,26±0,60a	1,09±0,56a	0,000
BHBA (mmol/L)	0,82±0,50b	1,94±1,35a	0,97±0,77ab	0,001
Kalsiyum (mg/dL)	13,05±1,10a	10,95±1,32b	10,52±1,58b	0,000
Magnezyum (mg/dL)	2,16±0,43a	1,55±0,43b	2,17±0,96a	0,000
Fosfor (mg/dL)	7,20±1,31a	4,93±1,69b	5,90±2,82ab	0,000
Sodyum (mmol/L)	146,90±5,41a	139,76±5,30b	139,75±5,20b	0,000
Potasyum (mmol/L)	4,24±0,38a	3,43±0,64b	2,92±0,73b	0,000
Klor (mmol/L)	104,60±3,25a	98,30±7,67a	85,25±13,93b	0,000
BUN (mg/dL)	8,30±1,68b	10,19±6,12b	21,87±16,38a	0,000
Kreatinin (mg/dL)	1,09±0,15b	1,15±0,38b	1,62±0,90a	0,011
CRP (nmol/L)	5,52 ± 4,57a	10 ± 5,81ab	12,67 ± 6,38b	0,020

3.3. Metabolomik Profiller

Çalışmadaki tüm gruplardan alınan serum, karaciğer ve idrar örneklerinin NMR spektrumları elde edildi. Bazı örnekler (su bazlı serum ekstraktları için 2 adet, serum lipid ekstraktları için 5 adet, lipid bazlı karaciğer örnekleri için 6 adet ve lipid bazlı idrar örnekleri için 5 adet örnek) kötü spektrum kalitesinden dolayı istatistiksel analizden çıkarıldı.

¹H-NMR spektrumu, ayrıca hasta (hem LDA, hem RDA) ve sağlıklı sığırlarda değişen metabolitlerin identifikasyon analizi için de kullanıldı. İdentifiye ve kantifiye edilen her bir örnek tipindeki (lipofilik ve hidrofilik fraksiyonlar) metabolitlerin tam listesi Tablo 3.3'de sunuldu ve lipofilik ve hidrofilik fraksiyonlar her bir örnek tipinde (serum, karaciğer, idrar) Şekil 3.1–3.18'de şematize edildi. p değerleri sadece belirgin anlamlı ($p < 0,05$) metabolitler için rapor edildi. Özellikle her bir örnek tipi için, sağlıklı sığırlar hem LDA'lı hem de RDA'lı sığırlarla karşılaştırıldı. Buna ek olarak iki deplasman tipi arasında önemli ölçüde farklı olan metabolitleri vurgulamak için LDA'lı ve RDA'lı sığırlar arasında da karşılaştırma yapıldı.

Hasta grupların serum örneklerinde su bazlı metabolitlerden hippürat ($p < 0,00000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,00001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), glisin ($p < 0,05$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (LDA ve RDA karşılaştırması)), sitrat ($p < 0,00000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,0001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), trimetilamin n-oksit ($p < 0,000000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,0001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), tirozin ($p < 0,0000000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,0001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), propiyonat ($p < 0,00001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), treonin ($p < 0,05$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), 2-aminobütirik asit ($p < 0,05$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) $p < 0,001$ (LDA ve RDA karşılaştırması)), asetat ($p < 0,00001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), izolöysin ($p < 0,00001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) ve alanin ($p < 0,001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,0001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) seviyeleri sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında daha

düşük bulundu. Bu parametrelerden glisin ve treonin hariç diğerlerindeki düşüş LDA'lı grupta çok daha anlamlı olmuştur ($p < 0,000000001$). Ayrıca, bu metabolitlerden glisin ($p < 0,05$ (LDA ve RDA karşılaştırması)), 2-aminobütirat, ($p < 0,001$ (LDA ve RDA karşılaştırması)) ve lizin ($p < 0,05$ (LDA ve RDA karşılaştırması)) hasta grupları arasında da farklılık gösterdi.

Hasta grupların serum örneklerinde lipid bazlı metabolitlerden kolesterol C(18)H₃ ($p < 0,00001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), kolesterol-C(20,22,23)H₂ ($p < 0,00001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), kolesteril ester-C(3)H ($p < 0,00001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), yağ asidi-(CH₂)_n- ($p < 0,0001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), yağ asidi-CH₃ ($p < 0,00001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), yağ asidi-CH₂-CO ($p < 0,0000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), yağ asidi=CH-CH₂-CH₂ ($p < 0,0000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), gliserol backbone-(CH₂)- ($p < 0,000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,0001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), fosfogliseritler-CH- ($p < 0,000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,0001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), fosfolipidler N(CH₃)₃ ($p < 0,000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,0001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)(18:2, bis allilik protonlar) ($p < 0,0000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) ve doymamış yağ asidi-CH=CH- ($p < 0,00001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) seviyeleri sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında daha düşük bulundu. Bu parametrelerdeki düşüş LDA'lı grupta çok daha anlamlı olmuştur. Bunun yanında hasta grupların 2-hidroksibütirat ($p < 0,0000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), inosin ($p < 0,001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) ve laktat ($p < 0,05$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) seviyeleri ise sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında daha yüksekti.

Hasta sığırların karaciğer örneklerinde su bazlı metabolitlerden 2-hidroksibütirat ($p < 0,05$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), (sağlıklı ve RDA

karşılaştırması)), gliserol ($p < 0,000000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), myoinositol ($p < 0,00001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) seviyeleri her iki hasta grubunda yüksek iken glikoz ($p < 0,0001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında düşük bulundu. Kreatin seviyesi RDA'lı grupta diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha yüksekti ($p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması), $p < 0,05$ (LDA ve RDA karşılaştırması)).

Hasta sığırların karaciğer örneklerinde lipid bazlı metabolitlerden çoklu kolesterol protonları ($p < 0,05$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), yağ asitleri- $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ ($p < 0,0000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), yağ asitleri- $\text{(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ ($p < 0,000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), yağ asitleri- $\text{CH}_2\text{-CO}$ ($p < 0,0000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) seviyeleri sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında yüksek bulundu. Bu parametrelerdeki artış LDA'lı grupta çok daha anlamlı olmuştur ($p < 0,000000001$).

Hasta sığırların idrar örneklerinde su bazlı metabolitlerden allantoin ($p < 0,000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), kolin ($p < 0,000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), kreatinin ($p < 0,0001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), dimetilamin ($p < 0,00000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) ve laktat ($p < 0,05$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması), (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) seviyeleri sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında daha yüksekti. Bunun yanında hasta grupların dimetil sülfon ($p < 0,0000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)), hippürat $p < 0,000000000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,0001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) ve trimetilamin-n-oksit ($p < 0,0000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) seviyeleri sağlıklı gruba göre daha düşüktü. Bu parametrelerdeki düşüş LDA'lı grupta çok daha anlamlı olmuştur ($p < 0,000000001$).

Hasta grupların idrar örneklerinde, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında su bazlı metabolitlerden format ($p < 0,05$ LDA ve RDA karşılaştırması) LDA'lı grupta, laktoz ise ($p < 0,05$ (LDA ve RDA karşılaştırması)) RDA'lı grupta daha düşüktü.

Hasta sığırların idrar örneklerinde lipid bazlı metabolitlerden gliserol backbone-(CH₂)- ($p < 0,0000001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,001$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) seviyesi sağlıklı gruba göre daha yüksek; yağ asitleri-CH₂-CH₂-CO ($p < 0,0001$ (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) $p < 0,05$ (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)) seviyesi ise daha düşüktü. Bu parametrelerdeki değişimler LDA'lı grupta çok daha anlamlıydı. Hasta grupların idrar örneklerinde, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında lipid bazlı metabolitlerden yağ asitleri -CH₃-(CH₂)_n- $p < 0,0001$ (RDA ve LDA karşılaştırması)) ve yağ asitleri-(CH₂)_n ($p < 0,001$ (RDA ve LDA karşılaştırması)) seviyeleri LDA'lı grupta daha düşüktü.

Üç farklı matrisin (serum, karaciğer ve idrar örnekleri) analizlerinden elde edilen en önemli bulgular özetlenirse hippürat, sitrat, dimetilsülfon, trimetilamin oksit, tirozin, propiyonat ve 2-aminobütirik asit seviyeleri istatistiksel olarak ($p < 0,01$) anlamlıydı ve LDA ve RDA'lı sığırlarda serum seviyeleri sağlıklı gruba göre daha düşüktü. Karaciğer örneklerinin analizinde glikoz, istatistiksel olarak en anlamlı ($p < 0,001$) metabolit olarak tespit edildi ve LDA ve RDA'lı sığırlarda serum konsantrasyonu oldukça düşüktü. İdrar analizinde sadece trimetilamin oksit ($p < 0,05$) LDA ve RDA'lı sığırlarda düşüktü. Fosfogliseritler, fosfolipidler, doymamış ve çoklu doymamış yağ asitleri ve sfingomyelinler istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlıydı ve hasta sığır grubunda serum konsantrasyonları düşüktü. Benzer düşüş karaciğer ve idrar örneklerinde belirlenmedi. Serum metabolitlerinde yapılan biyokimyasal bağlantı ve yolak haritalaması ile AD durumunda en olası değişmiş metabolik yolağın valin, löysin ve izolöysin biyosentezi ve fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi olduğu vurgulandı. Serum metabolitlerinin biyokimyasal ağ ve yolak haritaları Şekil 6 ((a1 – a4) – (b))' te sunuldu.

Tablo 3.3. Serum, karaciğer ve idrar örneklerinden (hem hidrofilik hem de lipofilik fraksiyonlar) isteğe bağlı seçilen birimlerin konsantrasyonları (ortalama \pm ortalama kesim sapma). Karşılaştırmalarda istatistiksel olarak önemli p değerleri de rapor edilmiştir.

Metabolitler	SAĞLIKLI (isteğe bağlı seçilen birimleri)	LDA (isteğe bağlı seçilen birimleri)	RDA (isteğe bağlı seçilen birimleri)	p değeri
2-aminobütirat	145,0 \pm 63,4	67,9 \pm 28,5	20,6 \pm 10,1	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) <0,001 (LDA ve RDA karşılaştırması) <0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
2-hidroksibütirat	3,2 \pm 3,2	201,2 \pm 155,3	311,4 \pm 165,4	karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
3-hidroksibütirat	4896,0 \pm 984,3	8454,3 \pm 5252,8	3221,2 \pm 810,1	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
3-hidroksiizobütirat	212,3 \pm 58,0	228,9 \pm 68,2	265,9 \pm 101,9	
Asetat	15866,6 \pm 2143,8	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	<0,00001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
Alanin	1603,0 \pm 305,1	1082,9 \pm 337,3	800,8 \pm 230,0	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,0001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
Benzoat	27,2 \pm 14,8	18,5 \pm 18,5	150,2 \pm 130,7	
Karnitin	681,9 \pm 97,0	1000,0 \pm 451,8	752,3 \pm 354,5	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Sitrat	2814,4 \pm 242,9	698,6 \pm 333,4	907,5 \pm 188,2	<0,00000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,0001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
Kolin	456,2 \pm 86,6	531,9 \pm 146,7	393,5 \pm 110,8	
Kreatin	2285,0 \pm 357,1	1788,7 \pm 385,9	1518,3 \pm 703,9	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Kreatinin	943,9 \pm 139,0	819,1 \pm 172,9	1087,8 \pm 449,4	
Dimetil sülfon	661,9 \pm 189,9	179,7 \pm 82,8	136,3 \pm 41,3	<0,000000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,00001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
Format	650,8 \pm 77,0	509,9 \pm 155,6	564,1 \pm 97,1	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Fruktoz	675,5 \pm 110,5	745,0 \pm 244,7	1466,1 \pm 378,3	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)

Tablo 3.3. (Devamı). Serum, karaciğer ve idrar örneklerinin karşılaştırması.

Serum su solubl (SWS)					
	Glisin	2180,8 ± 213,5	1270,3 ± 460,7	184,8 ± 184,8	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) <0,05 (LDA ve RDA karşılaştırması)
	Glikoz	1233,0 ± 106,3	1105,7 ± 256,1	1434,0 ± 342,2	
	Glutamin	19,3 ± 7,8	40,1 ± 13,7	15,7 ± 13,2	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Hippürat	437,2 ± 115,7	58,2 ± 33,2	54,0 ± 15,8	<0,00000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,00001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	İnosin	6,13 ± 6,13	25,1 ± 18,8	38,3 ± 10,1	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Izolöysin	675,8 ± 106,4	352,1 ± 118,2	150,2 ± 50,3	<0,00001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Laktat	2240,6 ± 426,1	3023,0 ± 1328,1	3024,6 ± 900,6	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Löysin	1169,5 ± 195,8	816,5 ± 318,1	481,4 ± 136,5	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Lizin	559,9 ± 44,9	545,9 ± 58,3	468,9 ± 38,1	<0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) <0,05 (LDA ve RDA karşılaştırması)
	Mannoz	205,0 ± 40,9	265,0 ± 72,5	457,2 ± 68,2	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Myoinositol	83,7 ± 17,4	83,7 ± 24,0	93,9 ± 43,6	
	Fenilalanin	486,9 ± 60,0	342,7 ± 79,3	297,2 ± 98,2	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Prolin	176,9 ± 27,8	146,0 ± 35,4	139,4 ± 61,5	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Propriyonat	60,3 ± 16,0	27,6 ± 13,0	24,7 ± 8,6	<0,00001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Süksinat	791,9 ± 142,8	570,7 ± 170,8	558,5 ± 194,9	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Treonin	57,1 ± 10,1	47,0 ± 13,0	31,5 ± 10,4	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Trimetilamin N-oksit	4120,1 ± 1074,2	1263,6 ± 340,4	1535,7 ± 281,8	<0,000000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,0001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)

Tablo 3.3. (Devamı). Serum, karaciğer ve idrar örneklerinin karşılaştırması.

	Tirozin	210,2 ± 39,3	79,7 ± 26,5	65,7 ± 12,4	<0,000000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,0001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Tanınmamış	806,8 ± 101,5	724,0 ± 210,9	755,7 ± 373,1	
	Valin	1037,2 ± 222,9	798,0 ± 267,0	360,8 ± 116,9	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Kolesterol C(18)H ₃	92228,9 ± 23815,5	47223,8 ± 13086,6	51198,9 ± 8451,9	<0,00001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Kolesterol - C(20,22,23)H ₂ -	96059,4 ± 23169,5	48743,5 ± 13234,9	53844,7 ± 7671,8	<0,00001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Kolesterol ester - C(3)H	18006,6 ± 4574,6	7914,7 ± 2524,0	9110,7 ± 1023,9	<0,000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Serbest kolesterol C(3)-H Yağ asidi - CH=CH-CH ₂ - CH=CH-	8083,6 ± 1364,7	5712,1 ± 2134,8	6336,3 ± 896,8	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Yağ asidi - (CH ₂)n-	17792,4 ± 3499,8	16022,5 ± 6185,2	14097,5 ± 7392,1	
	Yağ asidi -CH ₃	1615749,3 ± 254434,4	1233196,9 ± 171325,7	1173938,0 ± 83905,6	<0,0001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) <0,00001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Yağ asidi -CH ₂ - CO	142111,4 ± 43363,0	80141,0 ± 18795,6	88449,1 ± 11524,3	<0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) <0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Serum lipid solubl (SLS)	Yağ asidi =CH-CH ₂ -CH ₂	56704,1 ± 13705,7	28166,0 ± 5875,4	29411,3 ± 2962,7	<0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) <0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Gliserol backbone -(CH ₂)-	81686,8 ± 24564,3	34361,4 ± 11049,9	30264,7 ± 6366,5	<0,000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Fosfolipidler - CH-	2870,3 ± 665,6	1761,0 ± 404,6	1337,1 ± 235,6	<0,000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,0001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Fosfolipidler N(CH ₃) ₃	13212,6 ± 2528,7	8006,1 ± 1844,0	5869,4 ± 1368,8	<0,000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,0001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) (18:2, bis allilik protonlar)	169112,5 ± 33440,1	107897,8 ± 23962,2	93096,8 ± 14665,1	<0,000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,0001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Sfingomyelin - CH=CH-	57311,7 ± 18174,2	25810,8 ± 7702,0	21921,8 ± 4081,7	<0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Doymamış yağ asidi -CH=CH-	2997,6 ± 513,0	2024,2 ± 522,9	2359,6 ± 358,0	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
		185955,1 ± 52747,7	117222,1 ± 28036,2	109687,6 ± 20646,2	<0,00001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)

Tablo 3.3. (Devamı). Serum, karaciğer ve idrar örneklerinin karşılaştırması.

	Tanınmamış lipid	719,2 ± 85,1	872,8 ± 171,5	709,8 ± 73,7	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	2-aminobütirat	84,6 ± 35,1	105,7 ± 55,1	84,3 ± 37,0	
	2-hidroksibütirat	39,1 ± 13,4	57,1 ± 23,1	58,5 ± 10,7	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	3-hidroksibütirat	649,8 ± 210,0	638,5 ± 431,6	321,4 ± 235,7	
	2-hidroksivalerat	192,8 ± 75,2	113,2 ± 76,0	206,4 ± 100,1	
	Asetat	156,7 ± 54,5	99,7 ± 38,6	202,5 ± 52,1	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (LDA ve RDA karşılaştırması)
	Alanin	1684,8 ± 317,7	1251,5 ± 335,9	901,6 ± 486,6	
	Aspartat	223,3 ± 45,0	137,5 ± 40,5	117,9 ± 66,5	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Kolin	5494,4 ± 1219,7	6712,6 ± 1175,0	6621,9 ± 2257,1	
	Kreatin	613,5 ± 223,1	663,8 ± 331,4	1152,4 ± 298,8	<0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) <0,05 (LDA ve RDA karşılaştırması)
	Kreatinin	429,1 ± 107,8	463,8 ± 182,7	401,9 ± 153,6	
	Format	42,7 ± 17,4	51,0 ± 19,8	85,2 ± 64,0	
	Fumarat	51,7 ± 21,6	67,5 ± 18,4	47,6 ± 46,0	
	Gliserol	335,5 ± 78,1	678,9 ± 93,9	638,2 ± 201,4	<0,00000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (LDA ve RDA karşılaştırması)
Karaciğer su solubl (LWS)	sn-Glisero-3-fosfokolin	6496,9 ± 1722,2	5391,4 ± 1085,4	3154,2 ± 1317,5	
	Glisin	1180,1 ± 275,8	2091,9 ± 306,7	1759,6 ± 543,4	<0,0001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Glikoz	316,3 ± 144,4	25,7 ± 25,7	3,1 ± 3,1	<0,0001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Glutamat	91,8 ± 26,9	116,5 ± 35,7	73,8 ± 59,5	
	Izolöysin	43,3 ± 19,9	31,6 ± 11,8	35,0 ± 7,5	
	İzopropanol	16,5 ± 6,4	19,2 ± 8,7	37,3 ± 10,6	<0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması) <0,05 (LDA ve RDA karşılaştırması)
	Laktat	977,6 ± 247,6	657,6 ± 120,0	837,5 ± 438,1	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Löysin	27,9 ± 27,9	44,0 ± 20,6	34,2 ± 15,3	
	Myoinositol	39,5 ± 16,9	91,2 ± 28,0	117,0 ± 35,0	<0,00001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)

Tablo 3.3. (Devamı). Serum, karaciğer ve idrar örneklerinin karşılaştırması.

Karaciğer lipid solubl (LLS)	O-fosfokolin	1956,1 ± 474,6	2171,6 ± 548,4	3725,5 ± 1229,3	
	Suksinat	236,6 ± 42,7	223,0 ± 31,8	193,7 ± 62,6	
	Urasil	52,7 ± 46,5	56,5 ± 37,3	71,1 ± 46,3	
	Uridin	69,3 ± 30,1	125,3 ± 22,6	113,3 ± 39,7	<0,00001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Tanınmamış	278,6 ± 78,2	122,3 ± 37,7	82,6 ± 65,2	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Valin	111,4 ± 36,9	78,1 ± 23,3	82,3 ± 29,4	
	Serbest kolesterol -C(3)H-	873,5 ± 393,6	1112,8 ± 395,5	1205,4 ± 349,2	
	Total kolesterol -C(18)H ₃	3367,7 ± 818,9	4317,6 ± 1699,1	4667,2 ± 686,1	<0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Çoklu kolesterol protonları	4930,3 ± 373,3	6027,2 ± 1271,3	6327,8 ± 567,6	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Yağ asitleri -CH ₃ -(CH ₂) _n -	78874,6 ± 7424,3	130014,7 ± 32490,4	97446,8 ± 9668,3	<0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Yağ asitleri - (CH ₂) _n -	672145,9 ± 75460,2	1034204,0 ± 270216,9	853648,9 ± 106179,1	<0,000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Yağ asitleri -CH ₂ -CH ₂ -CO	455655,5 ± 113667,9	549820,1 ± 115872,8	601105,4 ± 43428,1	
	Yağ asitleri -CH ₂ -CH=	34891,7 ± 10498,9	57371,2 ± 39746,7	52710,2 ± 16408,1	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Yağ asitleri -CH ₂ -CO	47047,6 ± 10198,8	79889,6 ± 33886,7	64893,3 ± 13046,1	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Yağ asitleri =CH-CH ₂ -CH=	26475,0 ± 10383,5	30851,1 ± 15070,1	24588,6 ± 4016,0	
	Yağ asitleri -CH=CH-	47835,0 ± 17628,7	78192,9 ± 42839,6	56367,3 ± 8661,7	
	Gliserol backbone -(CH ₂)-	199,2 ± 199,2	9267,3 ± 9212,6	1655,4 ± 1438,7	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Fosfoliseritler -CH-	13916,0 ± 4406,2	13895,6 ± 5307,9	16490,1 ± 3156,4	
	Fosfatidilkolin	12167,2 ± 4147,0	9516,6 ± 3512,6	12207,6 ± 3018,5	
	Sfingomyelin-kolin	40154,9 ± 13163,9	29159,9 ± 11177,4	38578,1 ± 9073,0	
	Tanınmamış 1	949,2 ± 156,8	581,2 ± 68,1	654,5 ± 82,1	<0,000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Tanınmamış 2	3851,5 ± 629,2	3129,0 ± 318,4	3089,0 ± 365,6	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)

Tablo 3.3. (Devamı). Serum, karaciğer ve idrar örneklerinin karşılaştırması.

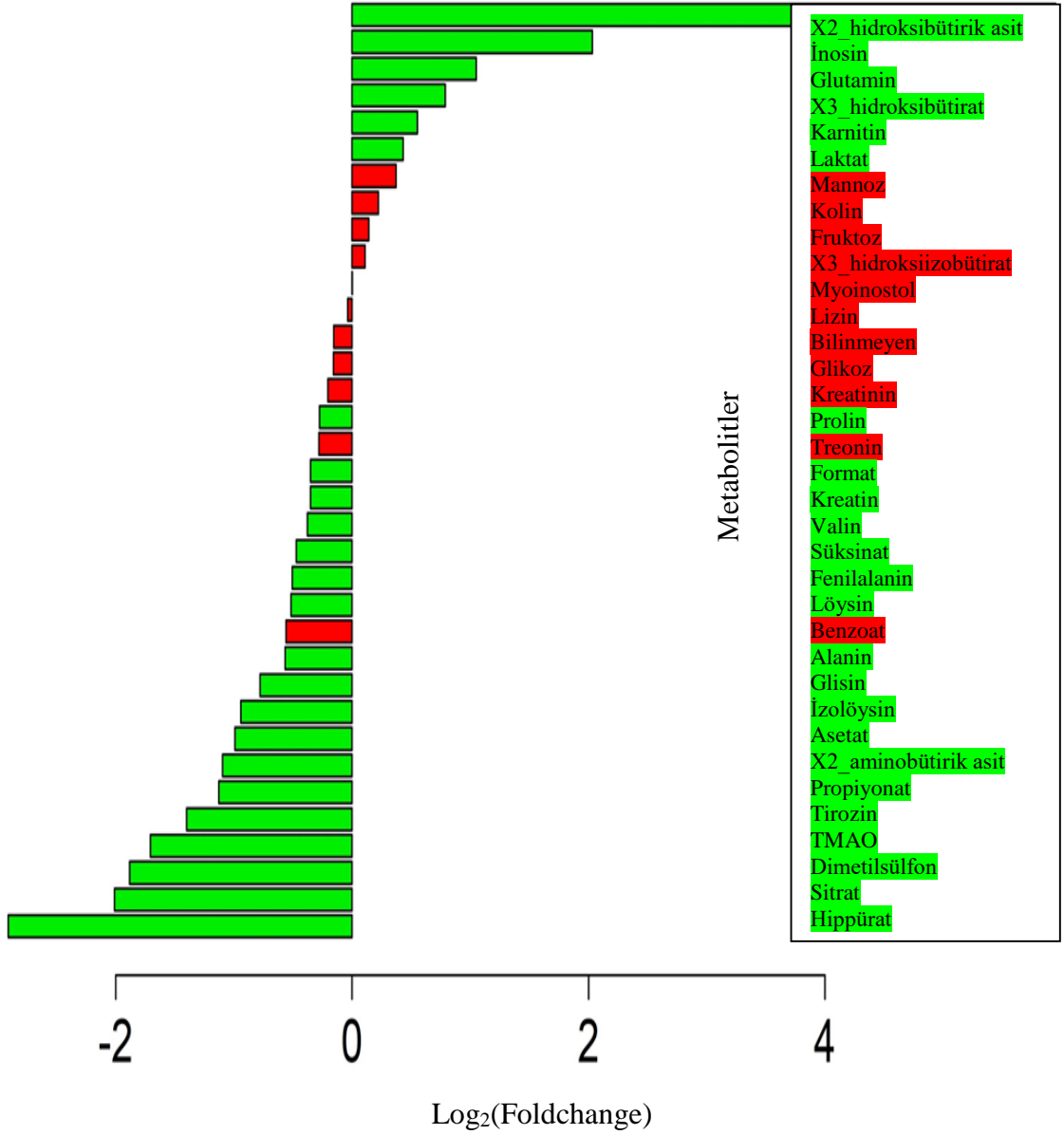
	3-hidroksibütirat	2057,4 ± 675,8	3756,0 ± 3329,4	1168,0 ± 895,7	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (LDA ve RDA karşılaştırması)
	2-hidroksi-3-metil-valerat	1526,9 ± 419,4	2988,3 ± 1348,7	1687,1 ± 409,5	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	4-hidroksifenilasetat	572,2 ± 60,0	388,4 ± 138,6	444,2 ± 183,7	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Asetat	6830,7 ± 2345,6	1482,6 ± 1266,6	4481,2 ± 4150,3	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Alanin	336,6 ± 108,1	417,8 ± 379,1	243,7 ± 52,1	
	Allantoin	349,2 ± 61,7	5061,5 ± 3542,5	5761,6 ± 5104,0	<0,000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Benzoat	22,8 ± 22,8	212,6 ± 212,6	0,8 ± 0,8	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Sitrat	4678,6 ± 3277,1	1507,7 ± 1286,6	1985,2 ± 1733,5	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Kolin	51,9 ± 51,9	365,0 ± 200,3	389,0 ± 89,4	<0,000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Kreatin	8791,9 ± 2611,7	21502,2 ± 8430,5	12218,0 ± 9821,0	<0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Kreatinin	10687,5 ± 2748,9	16234,4 ± 6726,3	23289,9 ± 10904,7	<0,0001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
İdrar su solubl (UWS)	Dimetilamin	27,9 ± 18,2	2248,5 ± 1265,4	2272,1 ± 1613,8	<0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Dimetil sülfon	1348,3 ± 300,8	275,6 ± 196,8	484,4 ± 220,2	<0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Format	1068,1 ± 143,3	231,5 ± 182,6	1282,3 ± 748,7	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (LDA ve RDA karşılaştırması)
	Fumarat	29,1 ± 26,9	33,2 ± 22,1	26,2 ± 12,5	
	Glioksilat	49,8 ± 28,7	21,0 ± 20,7	49,3 ± 48,6	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,000000000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Hippürat	95714,3 ± 5107,3	24948,8 ± 14254,0	26049,2 ± 7194,1	<0,00001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Izobütirat	347,6 ± 207,2	637,1 ± 346,9	333,2 ± 258,0	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
	Laktat	1473,5 ± 1473,5	5027,5 ± 4525,9	360,1 ± 151,7	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
	Laktoz	360,1 ± 151,7	1704,5 ± 1254,4	225,4 ± 225,4	<0,001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması) <0,05 (RDA ve LDA karşılaştırması)
		N-fenilasetilglisin	18749,8 ± 4876,8	16422,8 ± 4249,5	15927,5 ± 2047,1

Tablo 3.3. (Devamı). Serum, karaciğer ve idrar örneklerinin karşılaştırması.

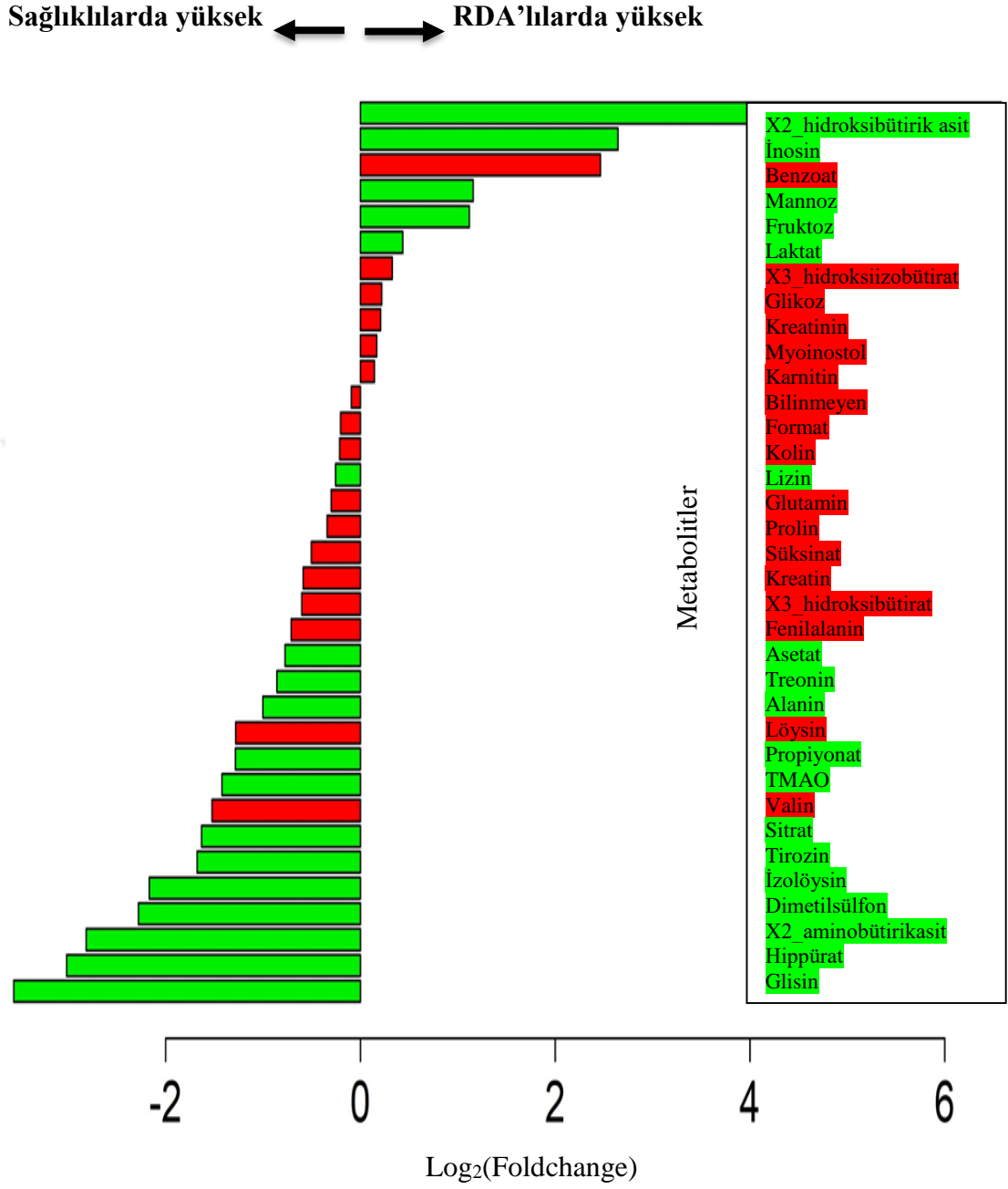
3-hidroksibütirat	2352,4 ± 1941,6	1657,9 ± 1253,0	1903,9 ± 1513,0	
Trimetilamin N-oksit	40396,6 ± 3423,7	11389,4 ± 6067,4	9964,5 ± 3920,7	<0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Tirozin	567,0 ± 125,3	145,2 ± 145,2	497,0 ± 474,1	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Tanınmamış 1	7163,5 ± 1254,9	9895,8 ± 3864,0	10944,8 ± 3811,2	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Tanınmamış 2	388,2 ± 123,1	1715,2 ± 758,2	539,8 ± 167,9	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Tanınmamış 3	643,9 ± 217,9	1255,1 ± 575,8	670,1 ± 163,3	<0,05 (LDA ve RDA karşılaştırması)
Total kolesterol C(18)H ₃	171,8 ± 89,8	53,6 ± 53,6	0,01 ± 0,01	
Gliserol backbone -(CH ₂)-	18,4 ± 18,4	197,6 ± 42,3	165,3 ± 37,2	<0,0000001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Yağ asitleri -CH ₃ -(CH ₂) _n -	122298,2 ± 1434,7	9413,9 ± 806,0	14060,8 ± 351,8	<0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
Yağ asitleri -(CH ₂) _n	85753,5 ± 12290,1	56153,8 ± 6561,3	94974,8 ± 7035,4	<0,05 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
Yağ asitleri -CH ₂ -CH ₂ -CO	274637,5 ± 36310,8	214963,2 ± 26967,3	217487,8 ± 24605,4	<0,0001 (RDA ve LDA karşılaştırması)
İdrar lipid solubl (ULS)				<0,0001 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Yağ asitleri =CH-CH ₂ -CH=	140,6 ± 73,5	51,6 ± 51,6	96,8 ± 17,8	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
Yağ asitleri -CH=CH-	643,0 ± 260,8	384,6 ± 189,4	325,7 ± 290,0	
Tanınmamış	1249,2 ± 93,4	1142,7 ± 126,7	983,2 ± 127,8	<0,05 (sağlıklı ve LDA karşılaştırması)
				<0,001 (sağlıklı ve RDA karşılaştırması)
				<0,05 (LDA ve RDA karşılaştırması)

Sağlıklılarda yüksek

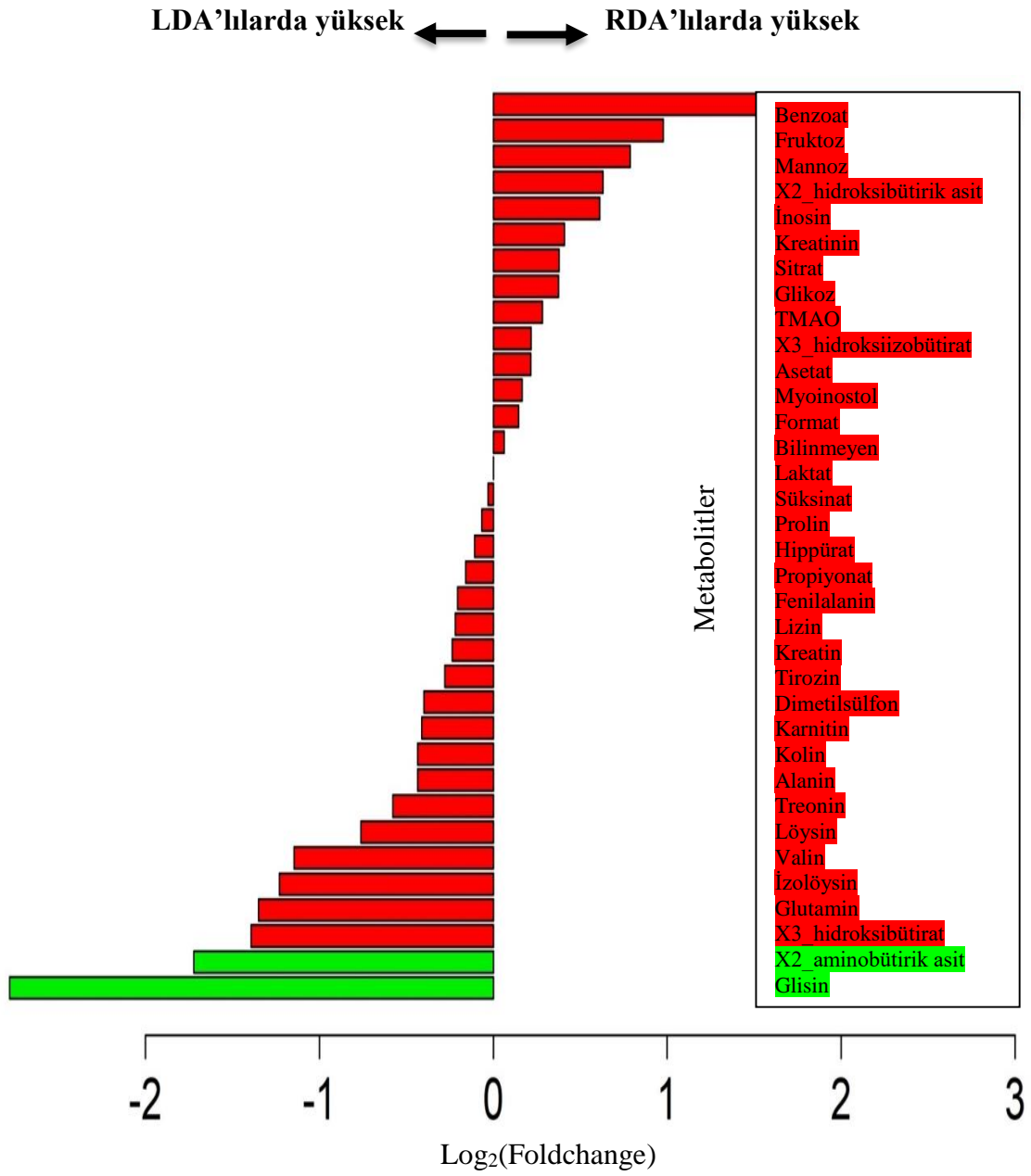
LDA'lılarda yüksek



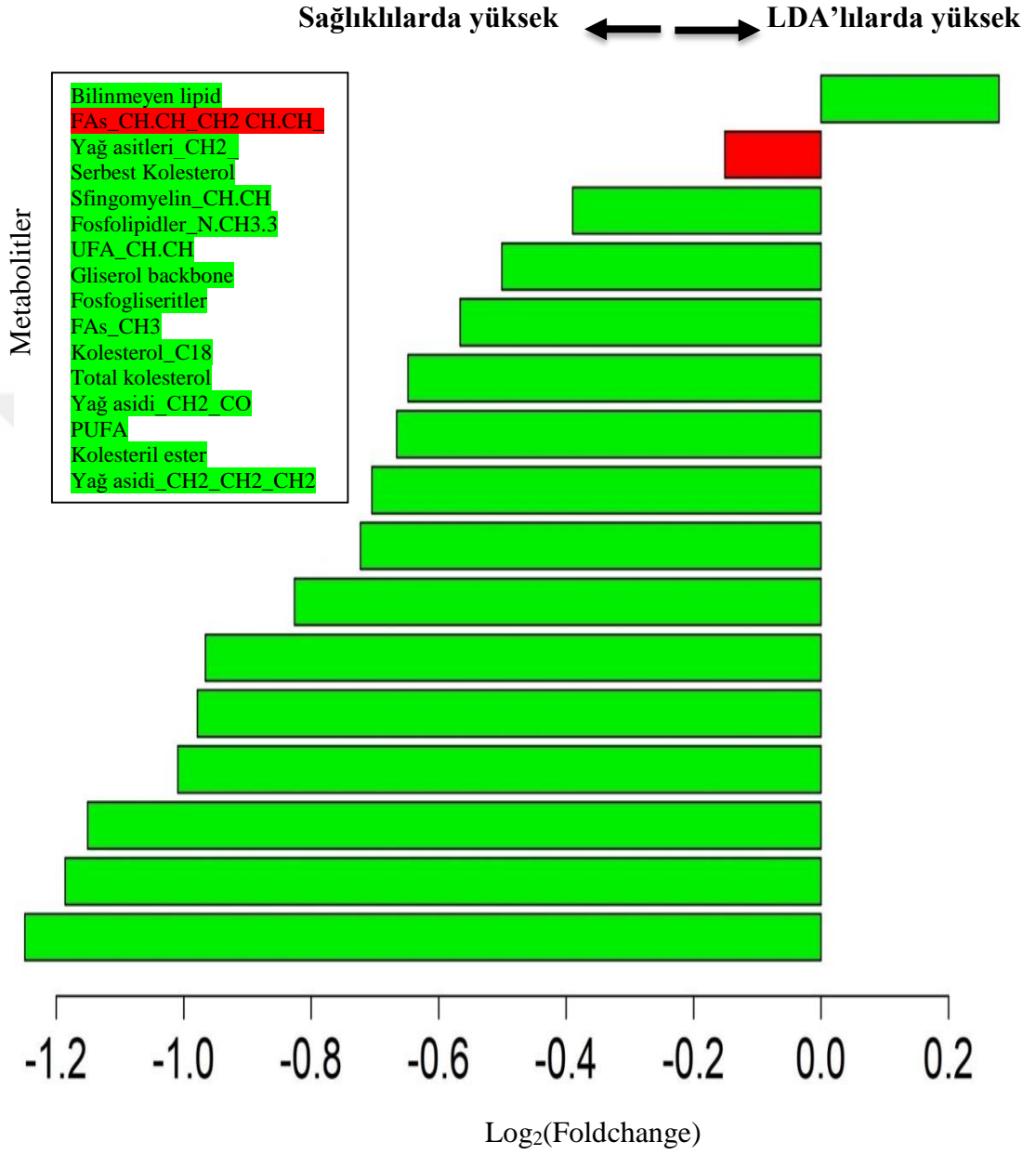
Şekil 3.1. Su bazlı serum örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve LDA grubu karşılaştırması.



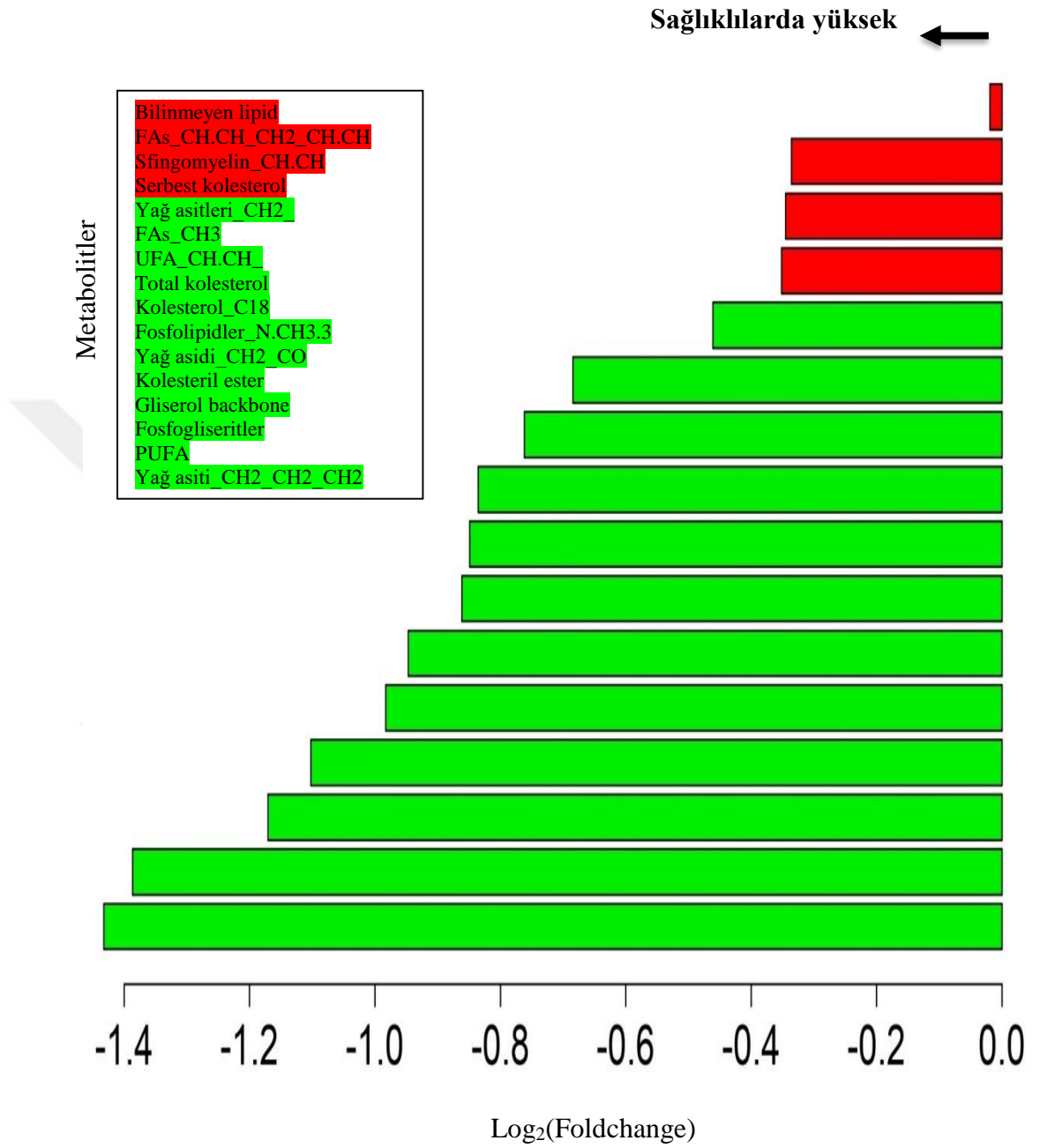
Şekil 3.2. Su bazlı serum örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve RDA grubu karşılaştırması.



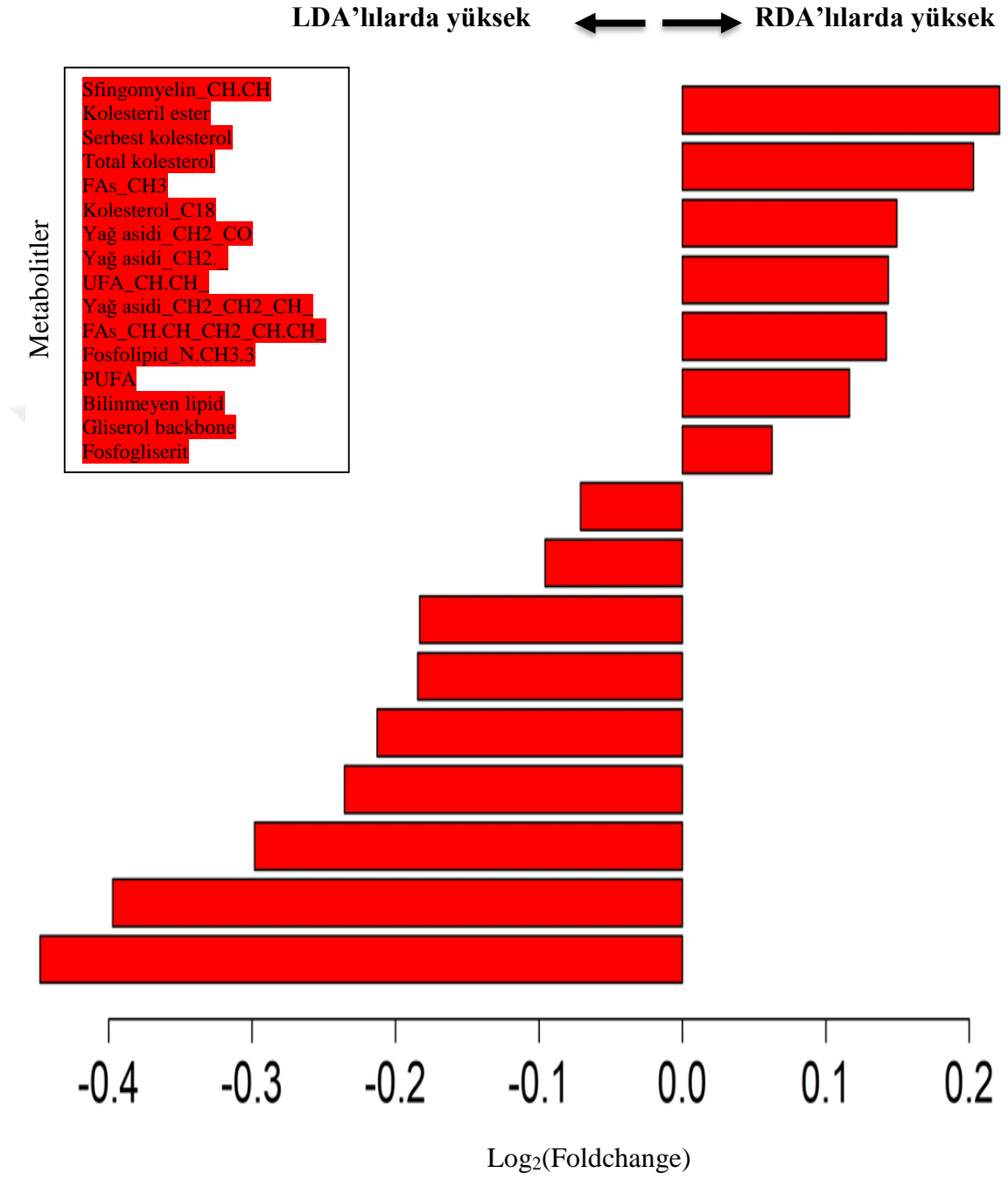
Şekil 3.3. Su bazlı serum örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, LDA ve RDA grubu karşılaştırması.



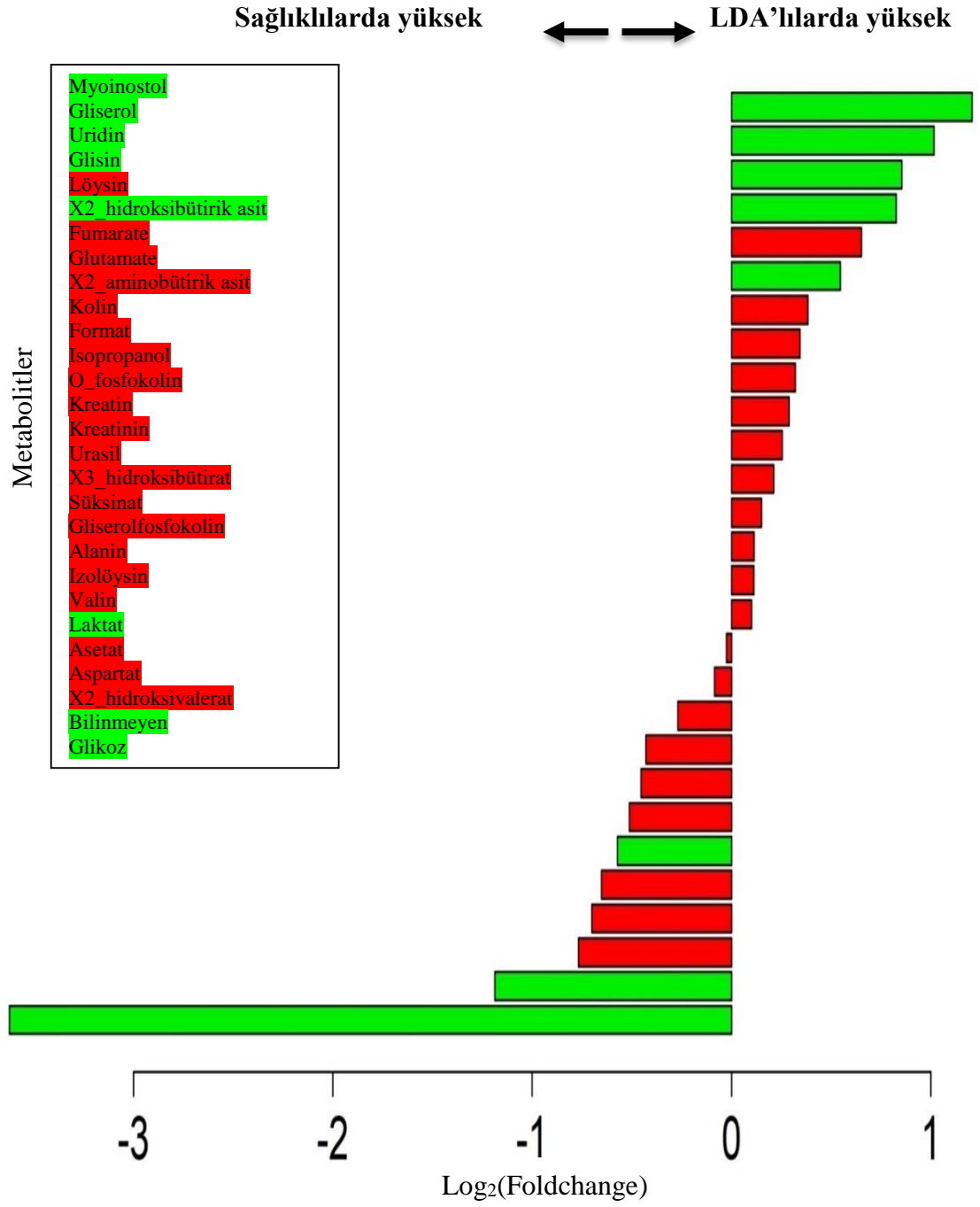
Şekil 3.4. Lipid bazlı serum örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve LDA grubu karşılaştırması.



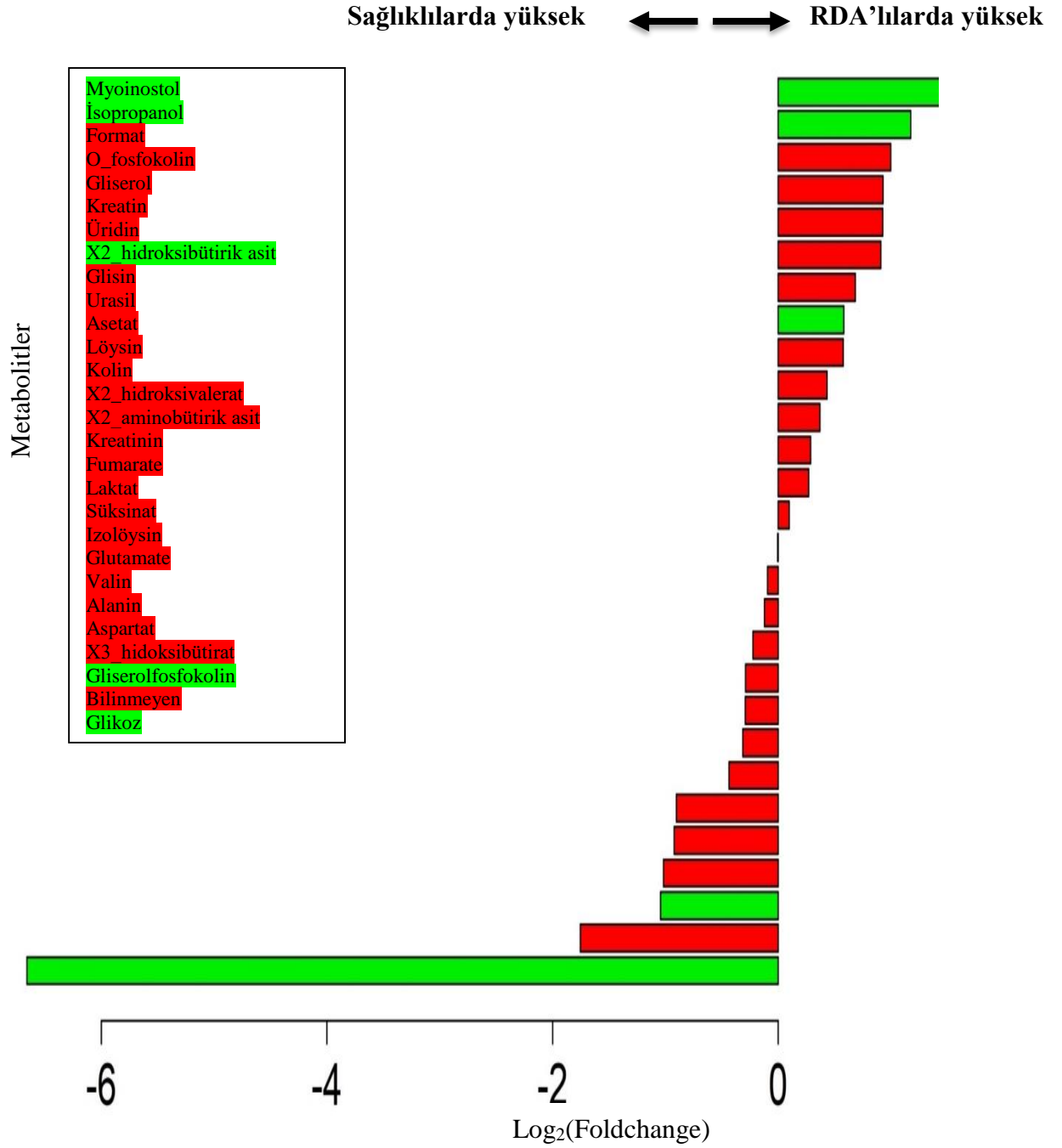
Şekil 3.5. Lipid bazlı serum örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve RDA grubu karşılaştırması.



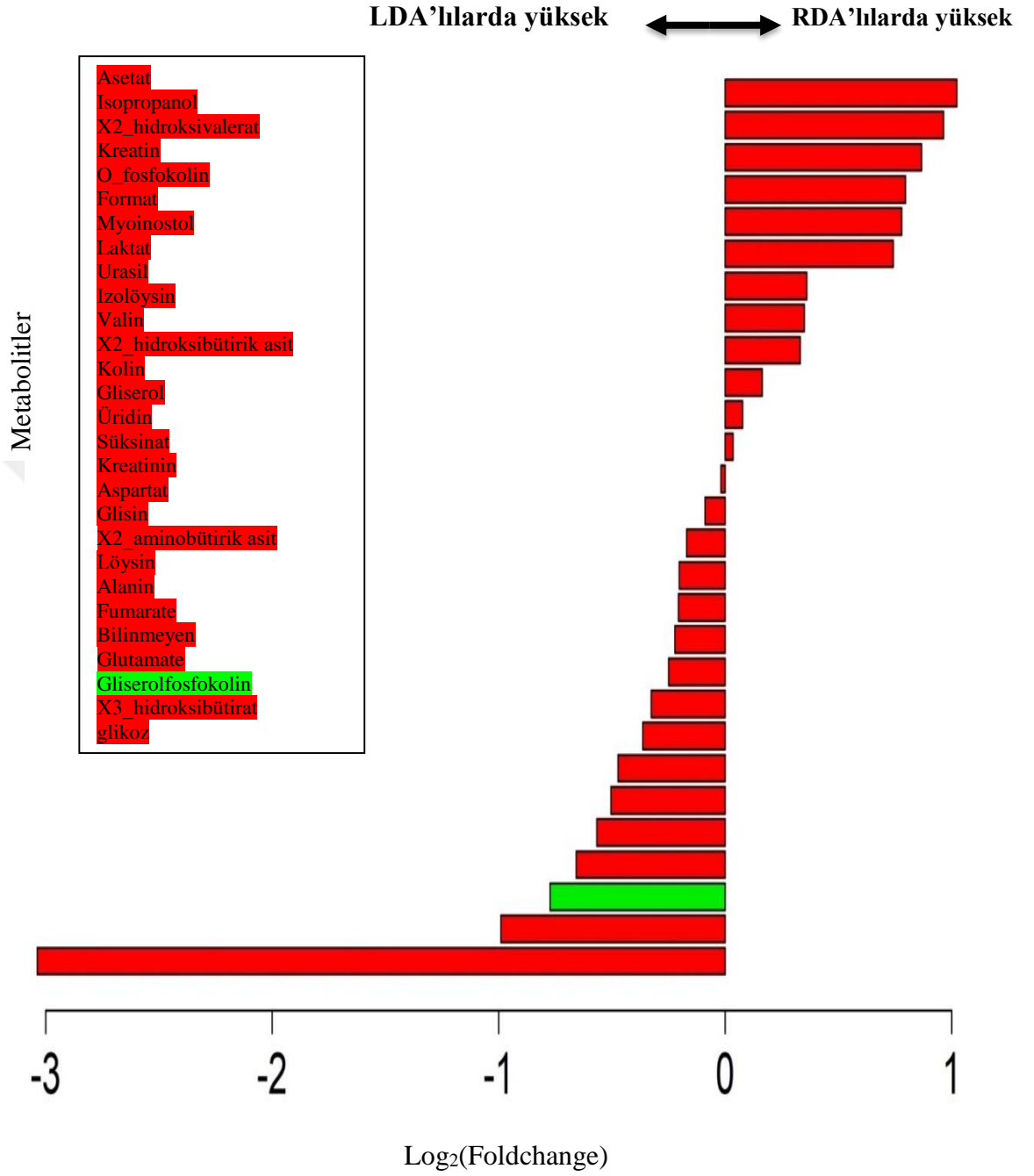
Şekil 3.6. Lipid bazlı serum örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, LDA ve RDA grubu karşılaştırması.



Şekil 3.7. Su bazlı karaciğer örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve LDA grubu karşılaştırması.

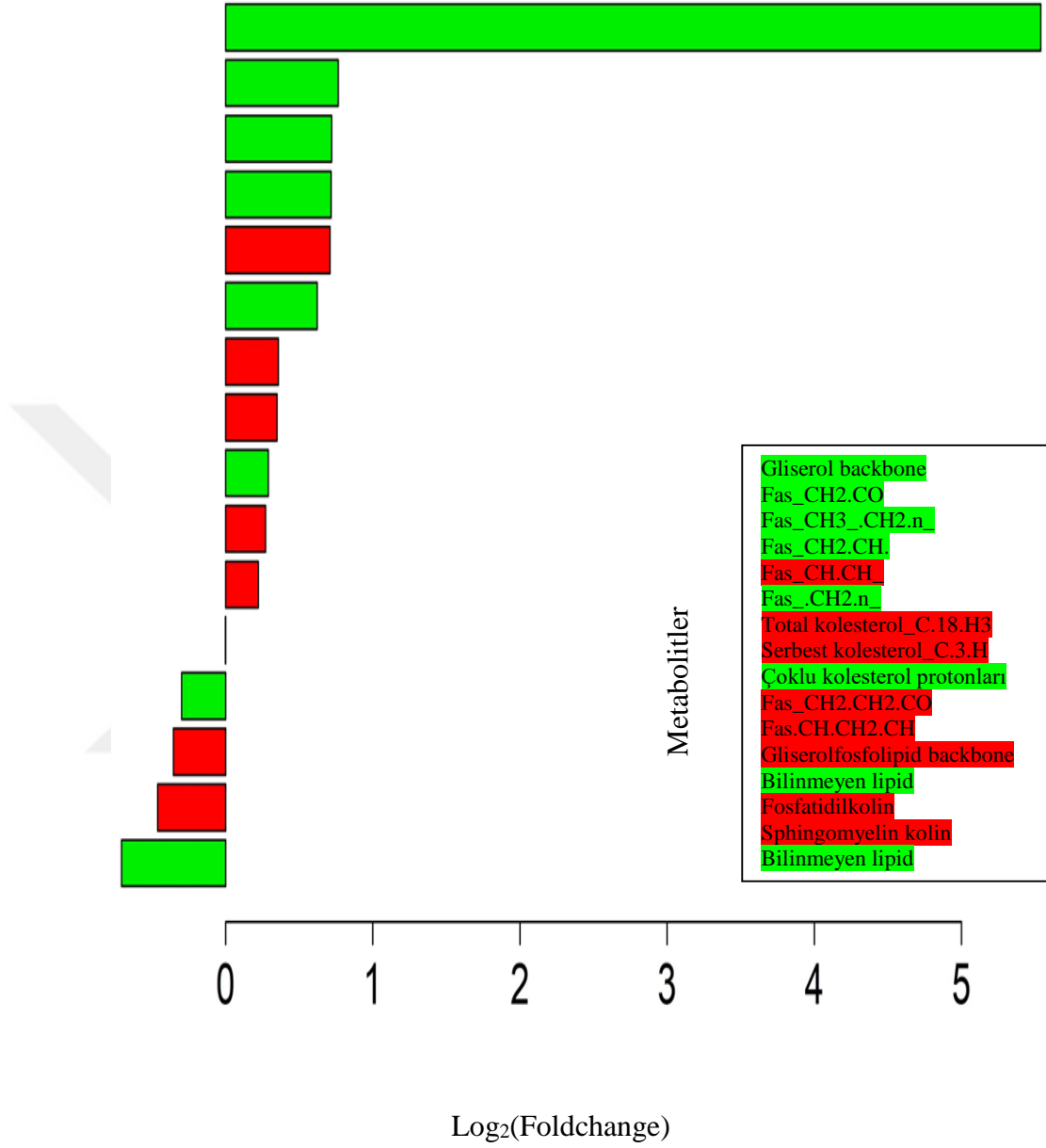


Şekil 3.8. Su bazlı karaciğer örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve RDA grubu karşılaştırması.

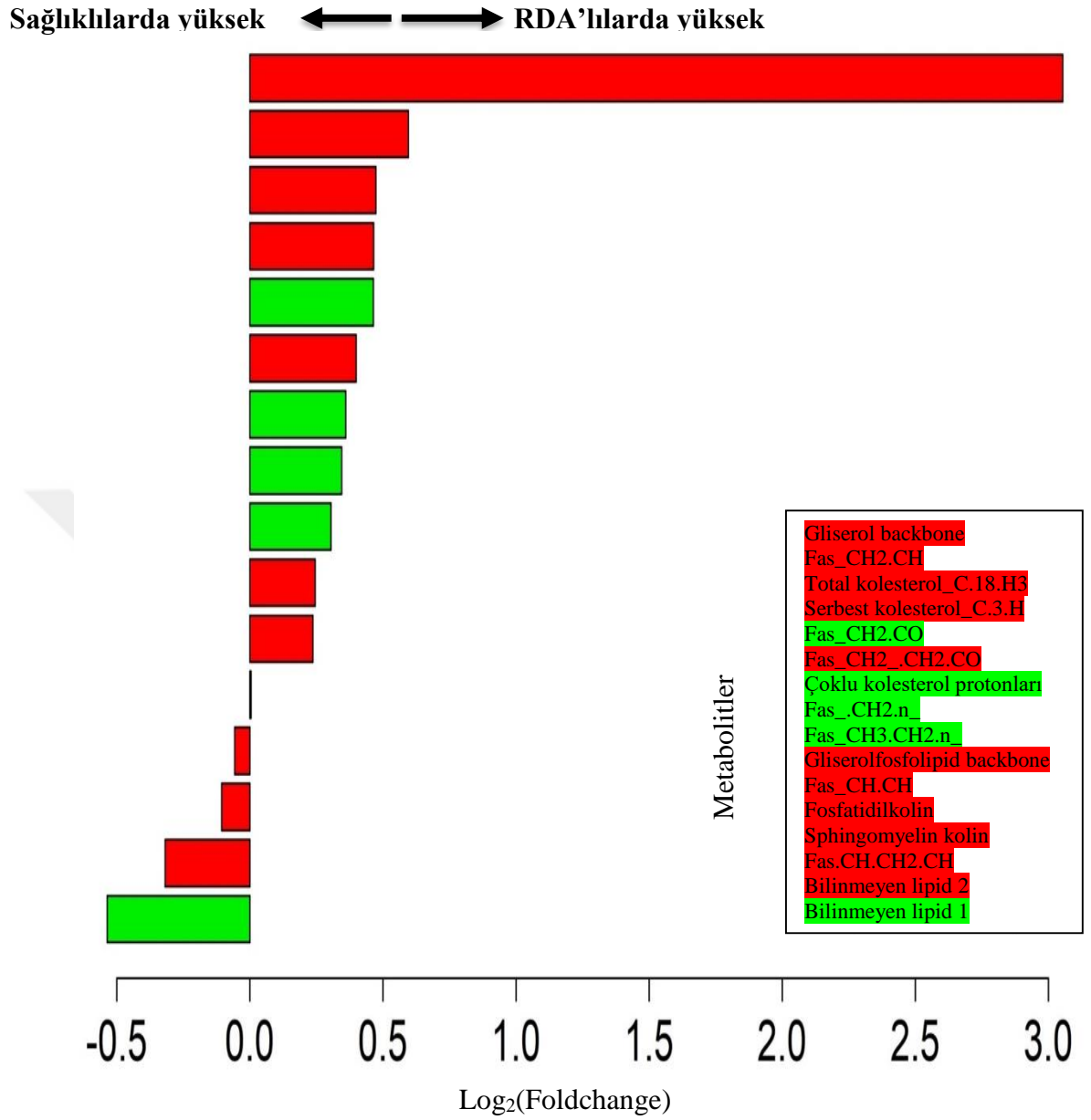


Şekil 3.9. Su bazlı karaciğer örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, LDA ve RDA grubu karşılaştırması.

Sağlıklılarda yüksek ↔ LDA'lılarda yüksek



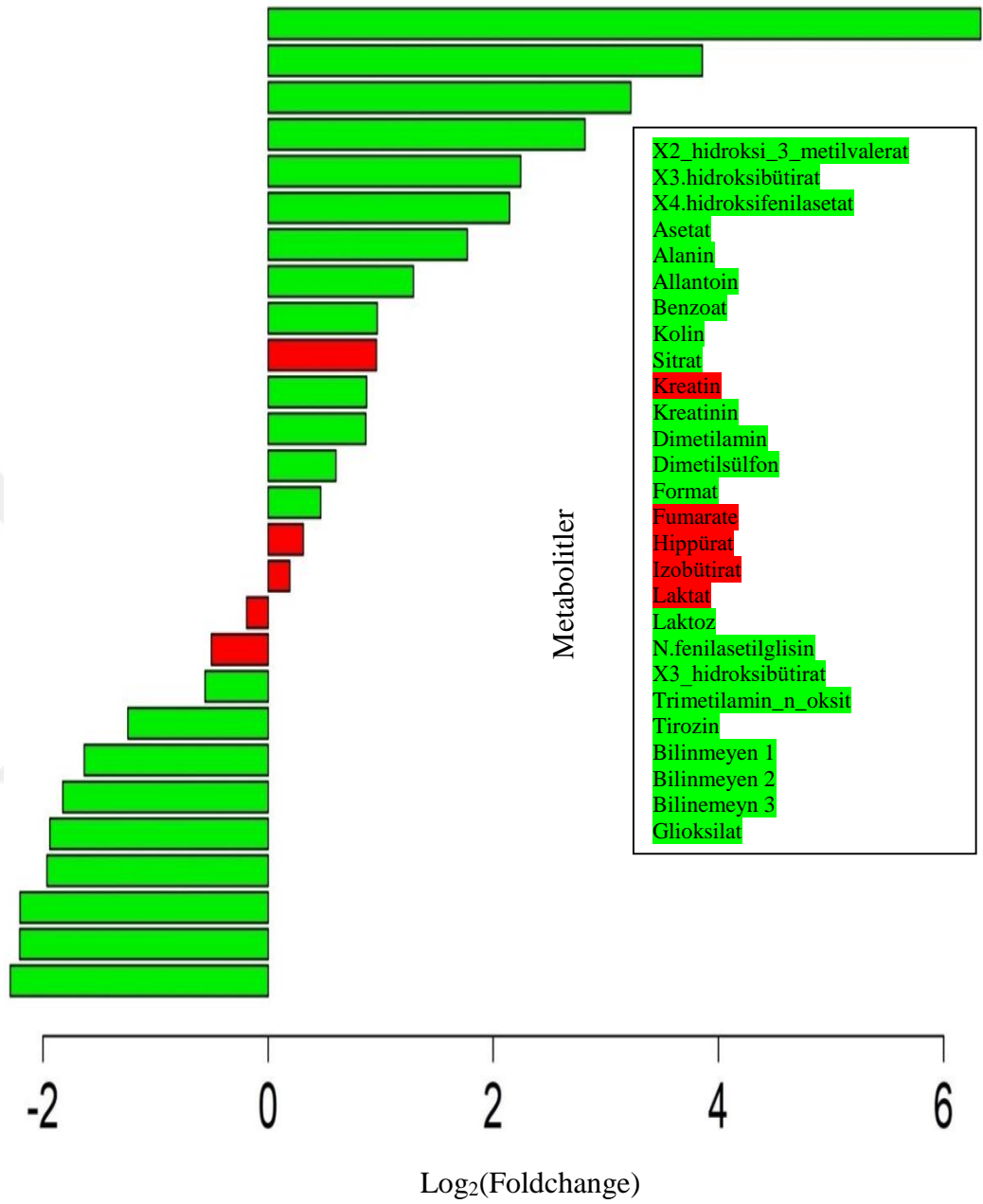
Şekil 3.10. Lipid bazlı karaciğer örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve LDA grubu karşılaştırması.



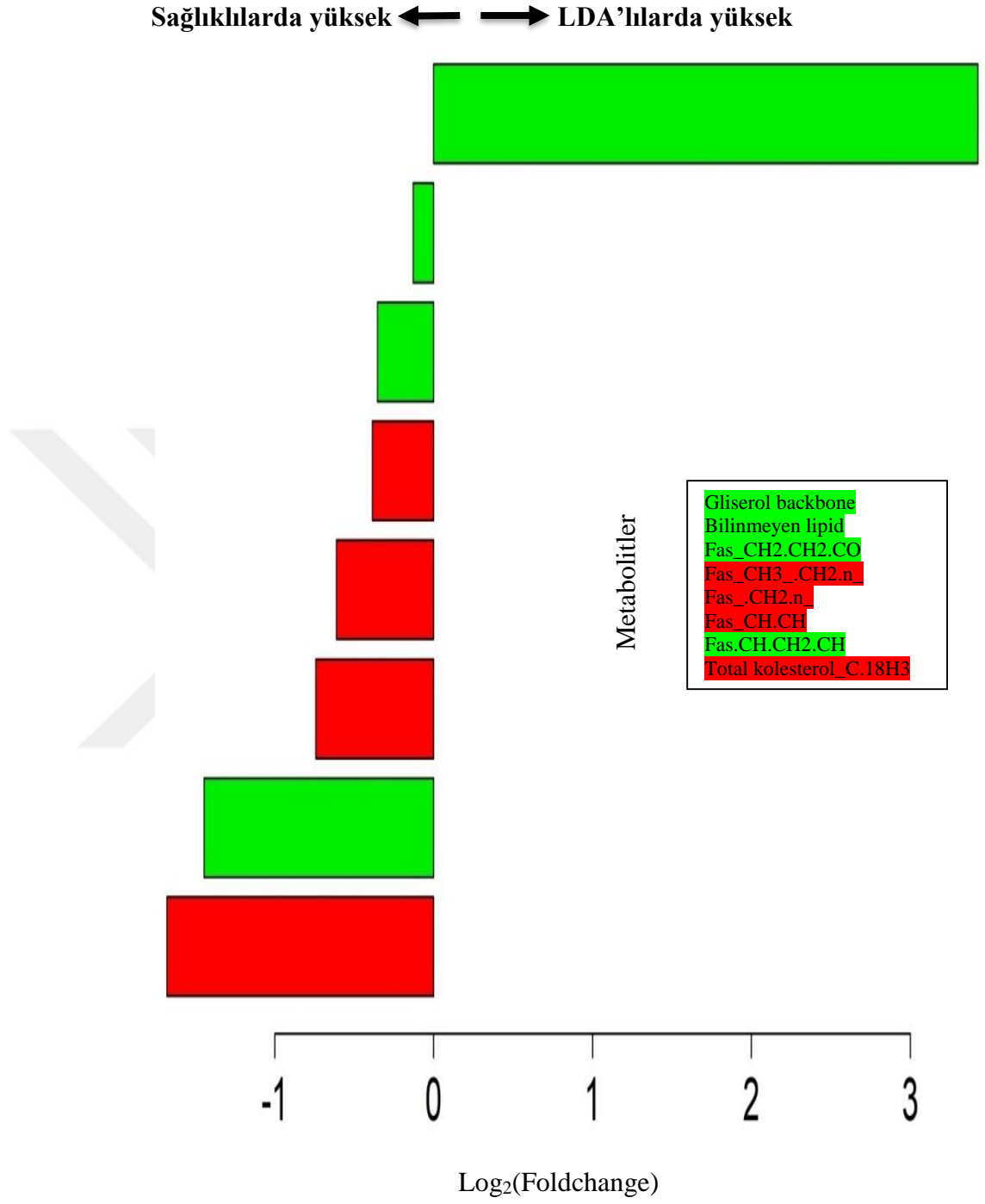
Şekil 3.11. Lipid bazlı karaciğer örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve RDA grubu karşılaştırması.

Sağlıklılarda yüksek

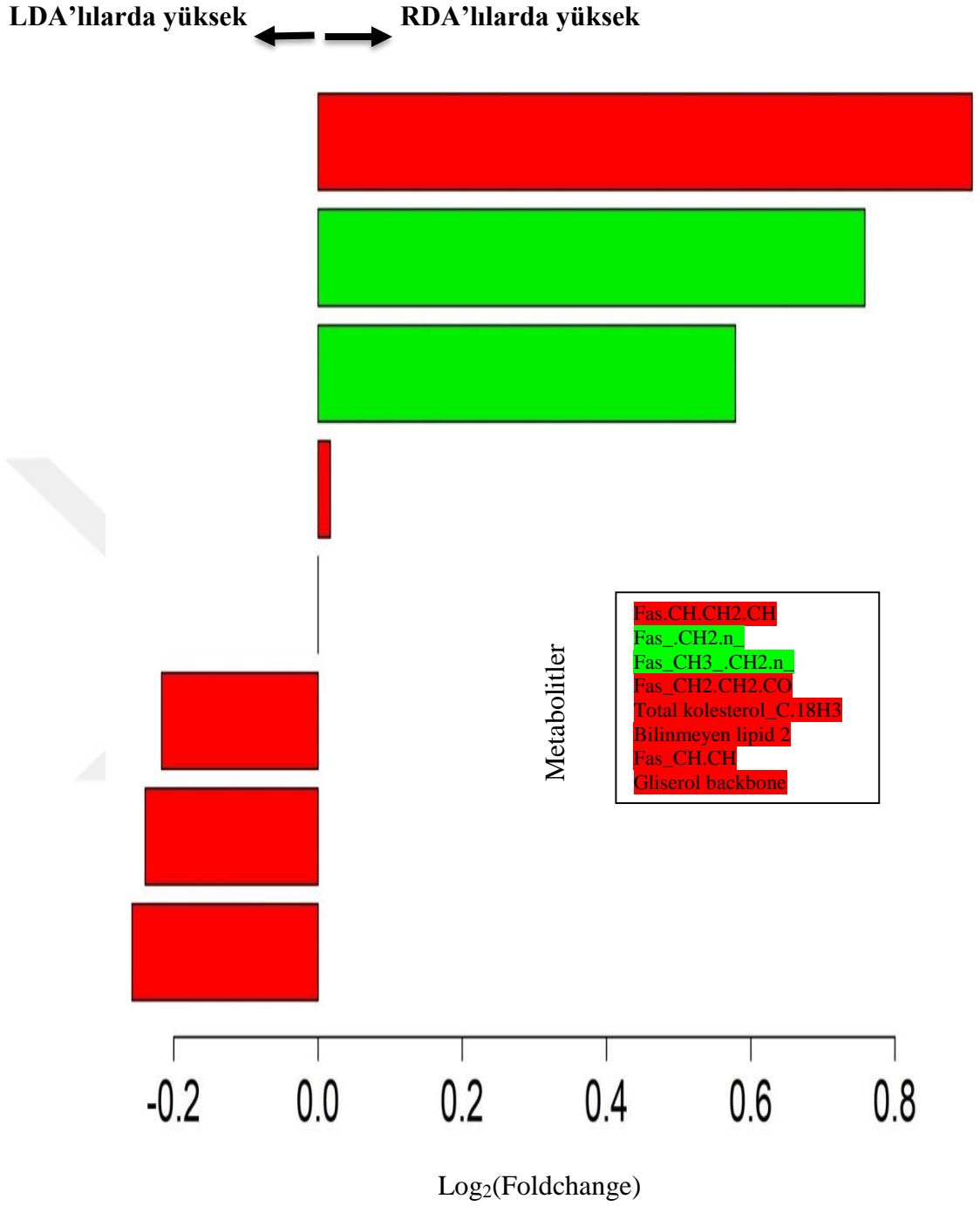
LDA'larda yüksek



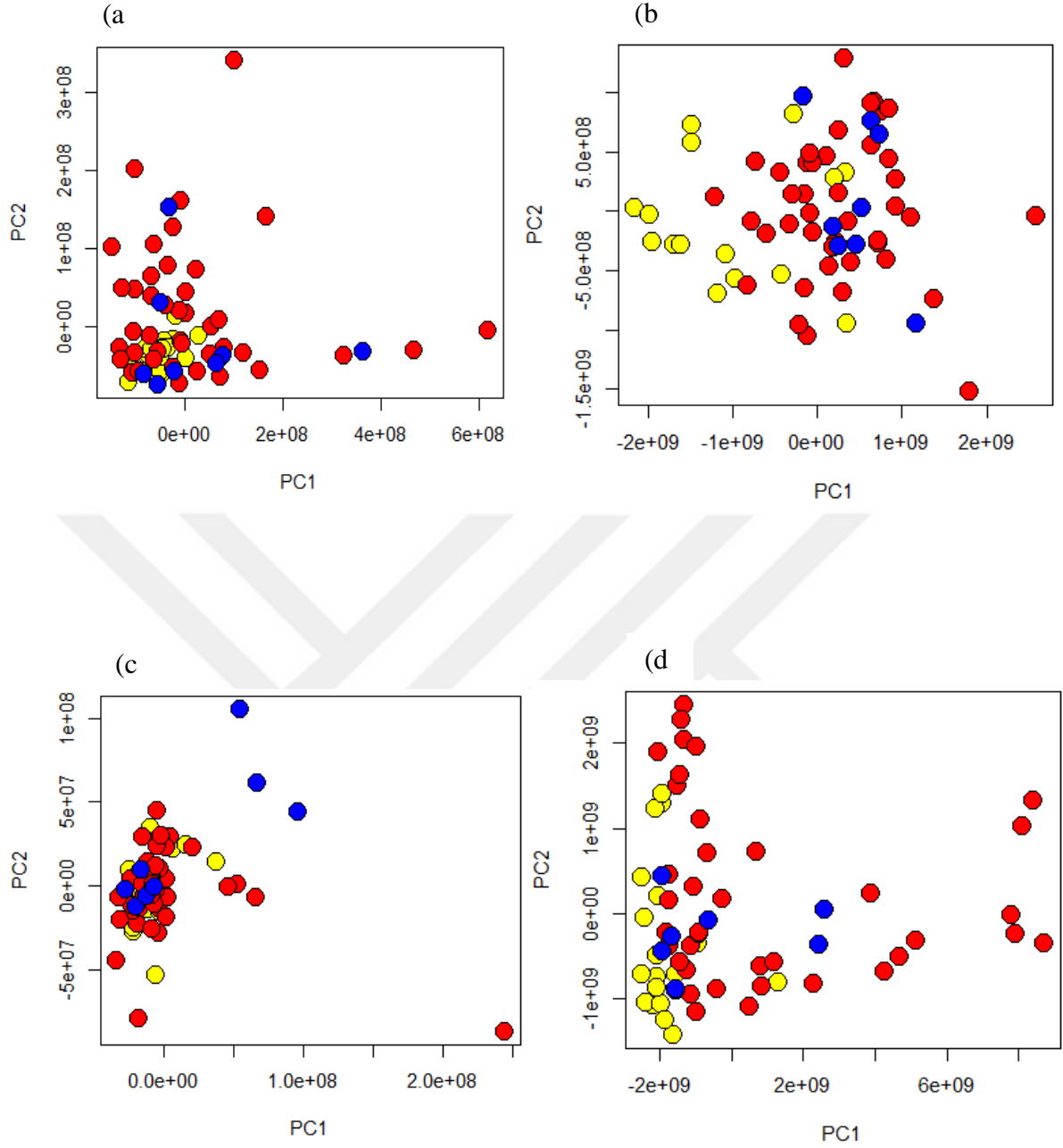
Şekil 3.13. Su bazlı idrar örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve LDA grubu karşılaştırması.



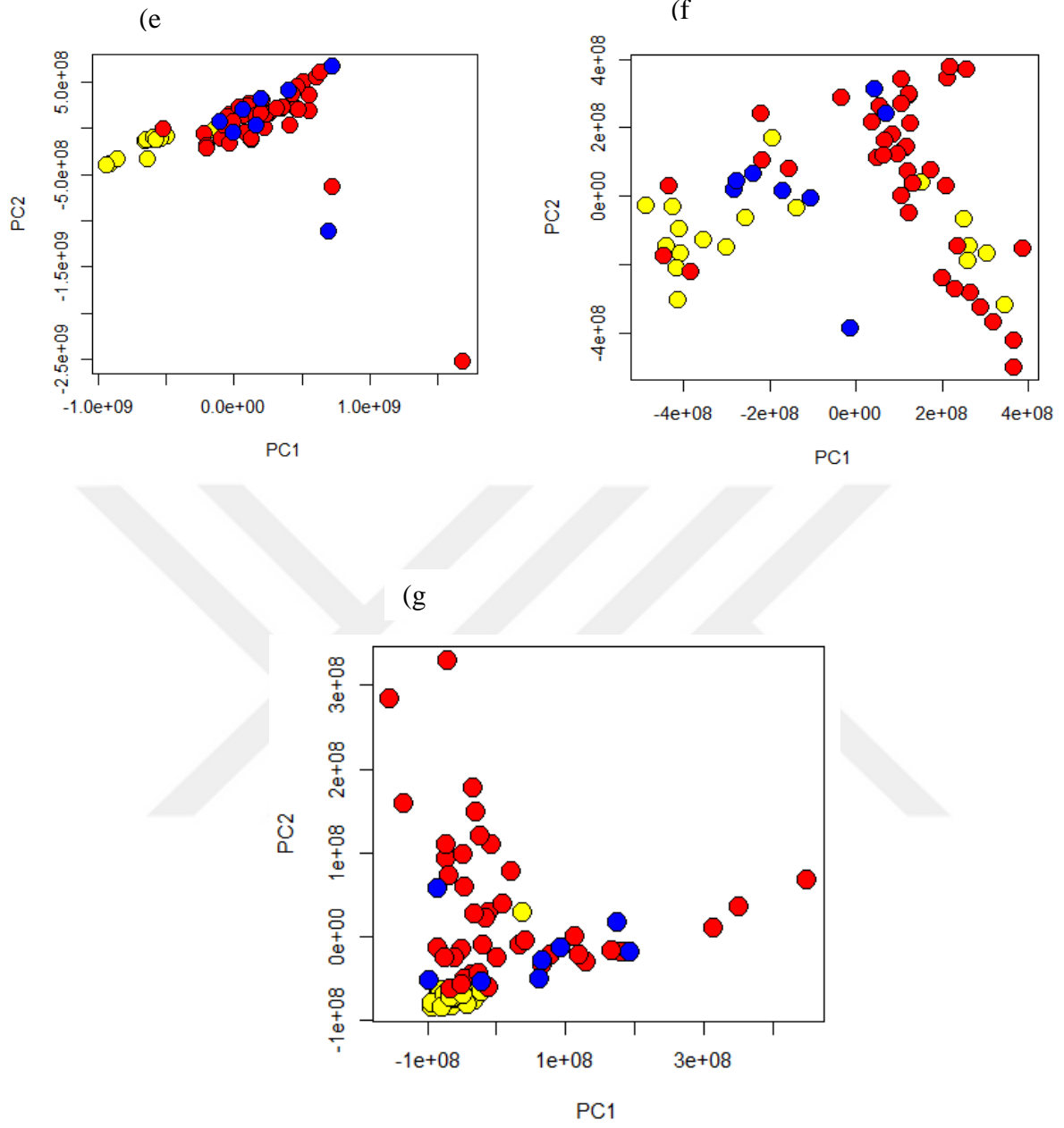
Şekil 3.16. Lipid bazlı idrar örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, sağlıklı ve LDA grubu karşılaştırması.



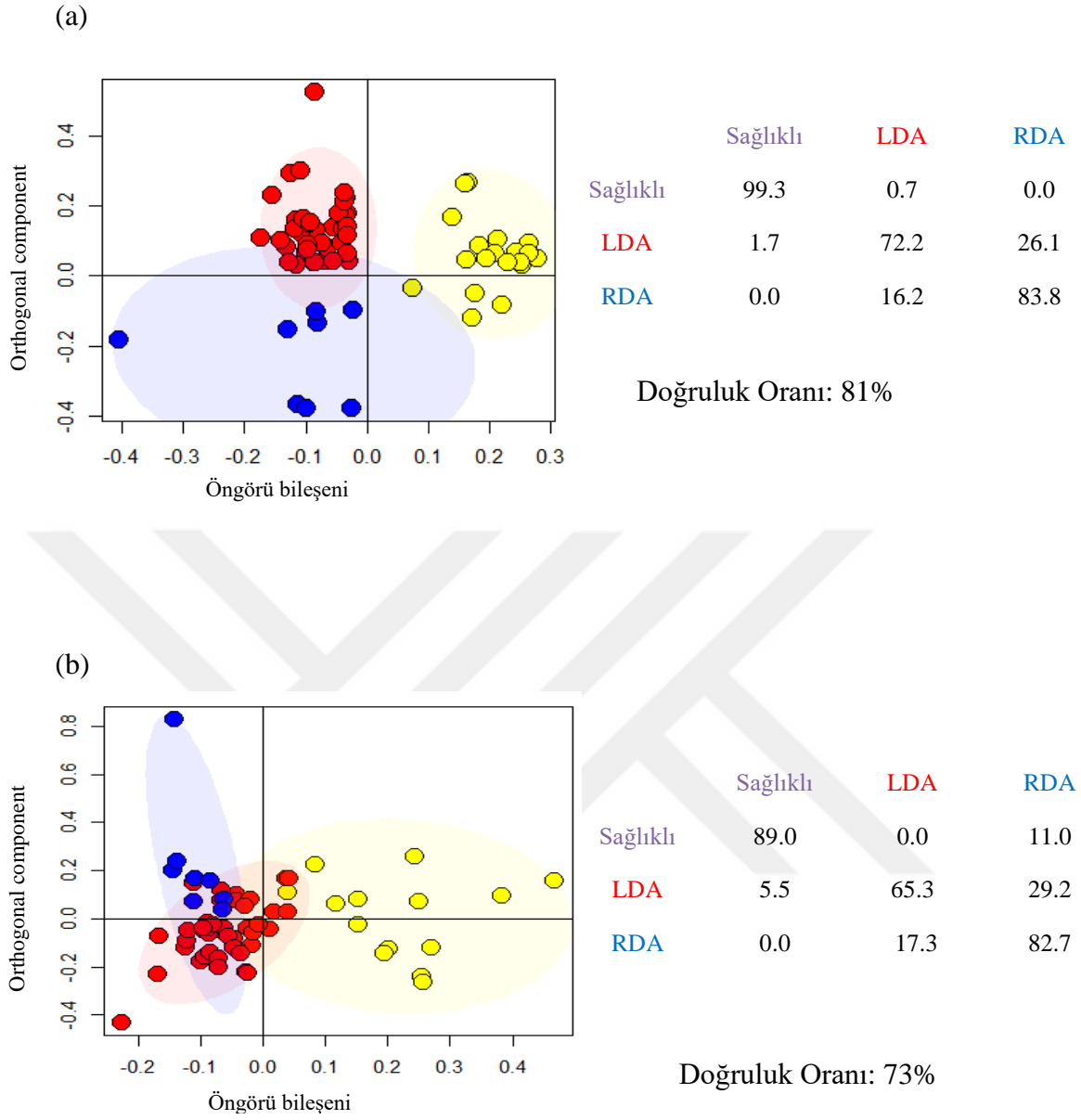
Şekil 3.18. Lipid bazlı idrar örneklerinde 1D NOESY spektrumu üzerinde tek değişkenli analiz, LDA ve RDA grubu karşılaştırması.



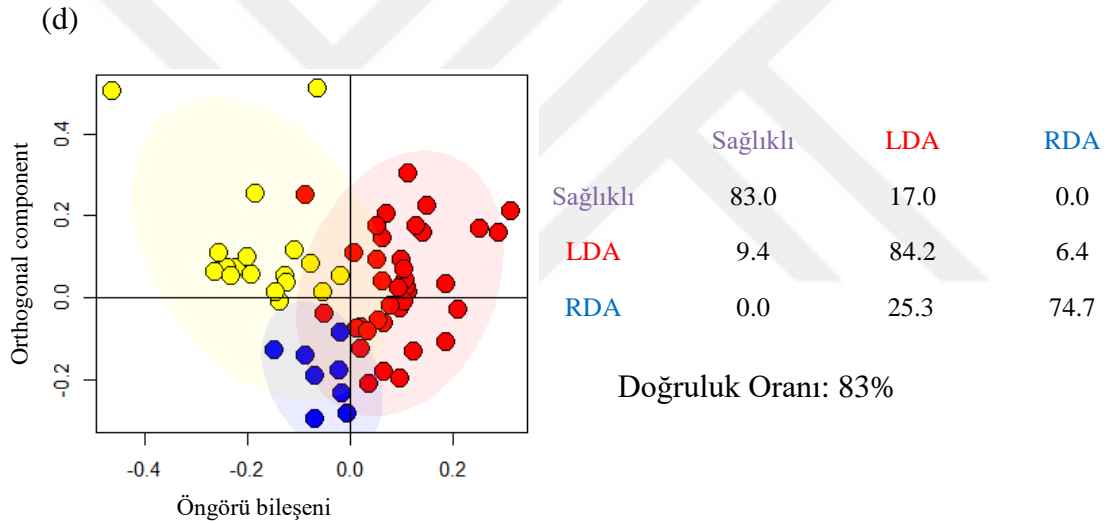
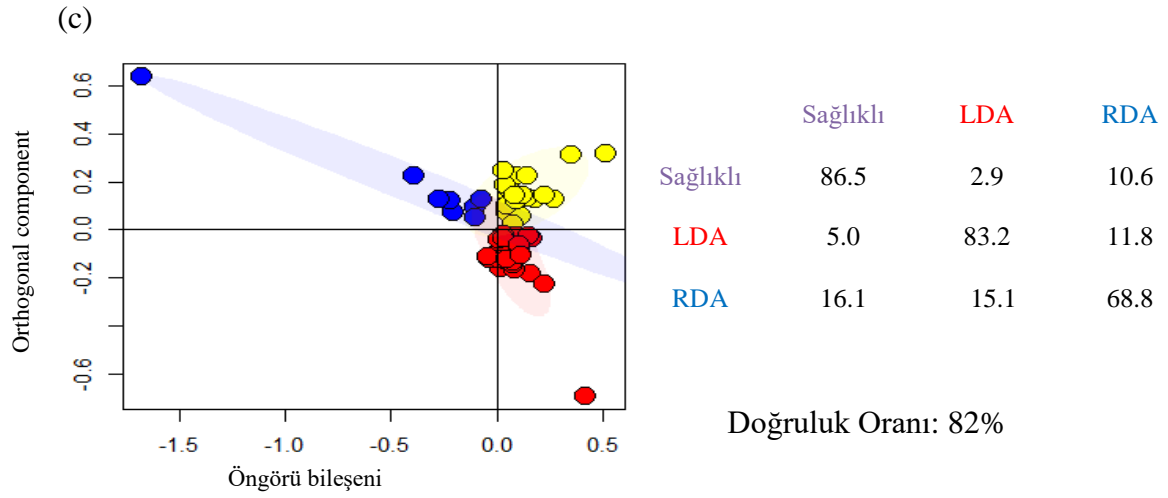
Şekil 4 (a) – (d). Çok değişkenli analiz 1D NOESY üzerinde PCA Skor Alanları. Skor alanlarının temel bileşenler analizi (PCA). Her bir nokta tek bir $^1\text{H-NMR}$ spektrumunu gösterir ve her bir renk farklı sığır gruplarını temsil eder: sağlıklı (sarı noktalar), LDA (kırmızı noktalar) ve RDA (mavi noktalar). (a) su bazlı serum örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde PCA; (b) lipid bazlı serum örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde PCA; (c) su bazlı karaciğer örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde PCA; (d) lipid bazlı karaciğer örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde PCA.



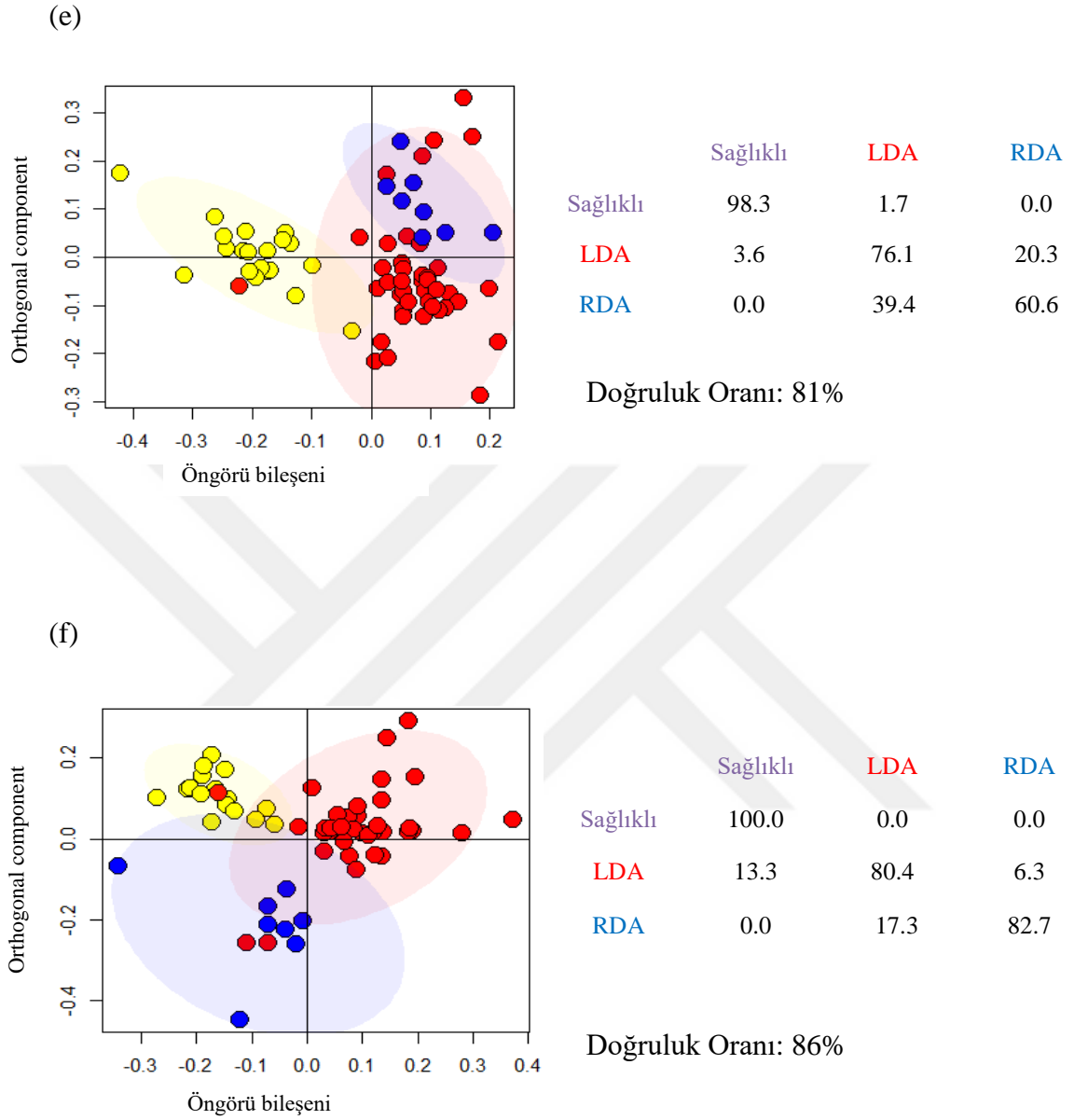
Şekil 4 (e) – (g). (e) su bazlı idrar örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde PCA; (f) lipid bazlı idrar örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde PCA; (g) su bazlı serum örneklerinin 1D CPMG spektrumu üzerinde PCA.



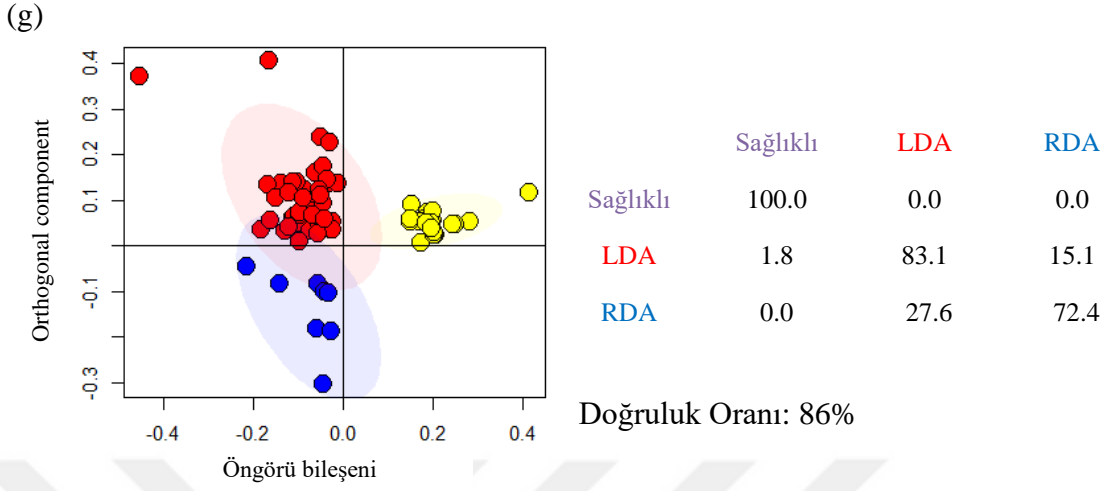
Şekil 5 (a) – (b). Tüm ekstrakt tiplerinin OPLS skor alanları. Her bir nokta tek bir $^1\text{H-NMR}$ spektrumunu gösterir ve her bir renk farklı sığır gruplarını temsil eder: sağlıklı (sarı noktalar), LDA (kırmızı noktalar) ve RDA (mavi noktalar). (a) su bazlı serum örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde OPLS; (b) lipid bazlı serum örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde OPLS. Karışıklık matrisleri ve kross-validasyon analizinin ilişkili öngörü doğruluğu her bir model için rapor edilmiştir.



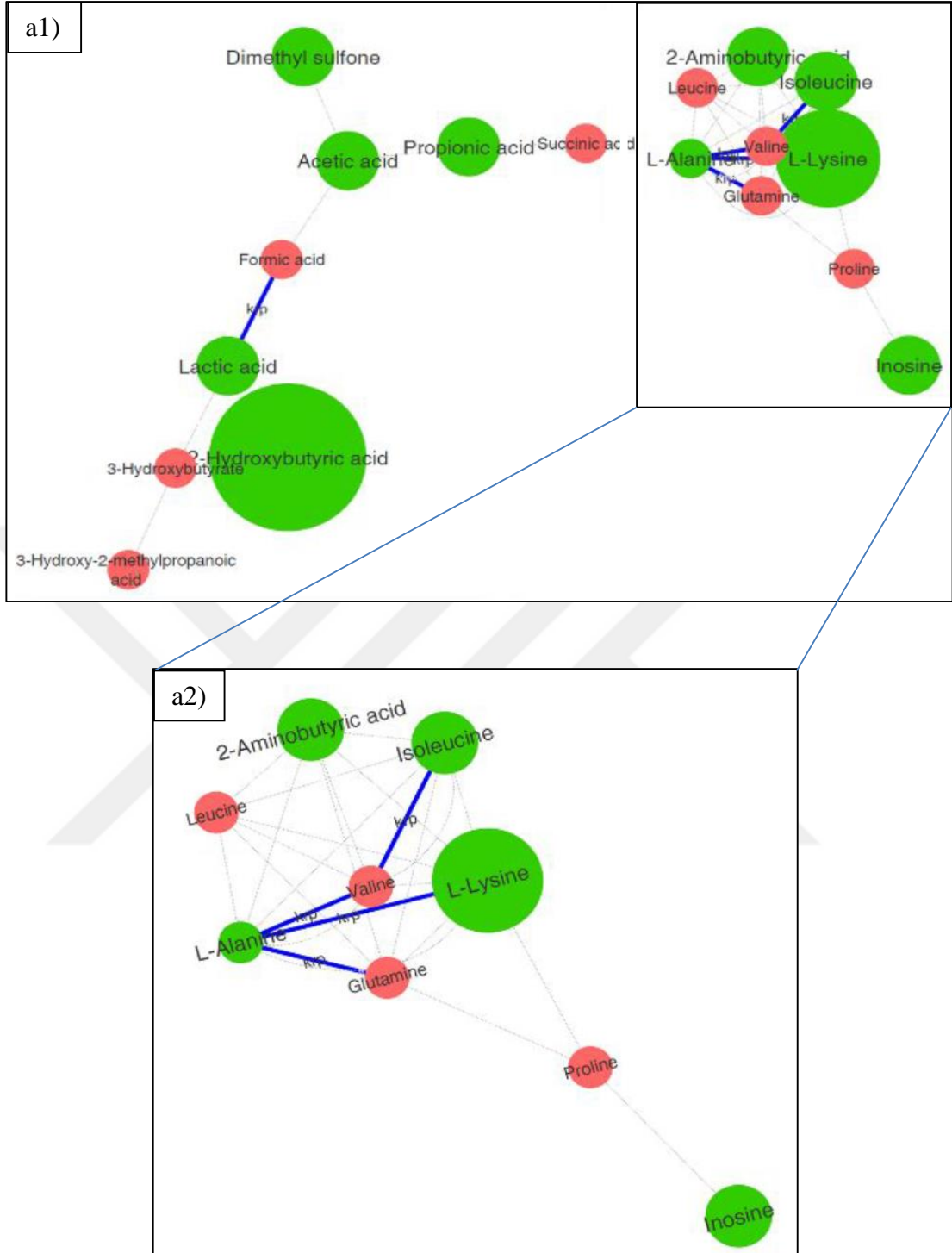
Şekil 5 (c) – (d). Tüm ekstrakt tiplerinin OPLS skor alanları. Her bir nokta tek bir $^1\text{H-NMR}$ spektrumunu gösterir ve her bir renk farklı sığır gruplarını temsil eder: sağlıklı (sarı noktalar), LDA (kırmızı noktalar) ve RDA (mavi noktalar). (c) su bazlı karaciğer örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde OPLS; (d) lipid bazlı karaciğer örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde OPLS. Karışıklık matrisleri ve kross-validasyon analizinin ilişkili öngörü doğruluğu her bir model için rapor edilmiştir.



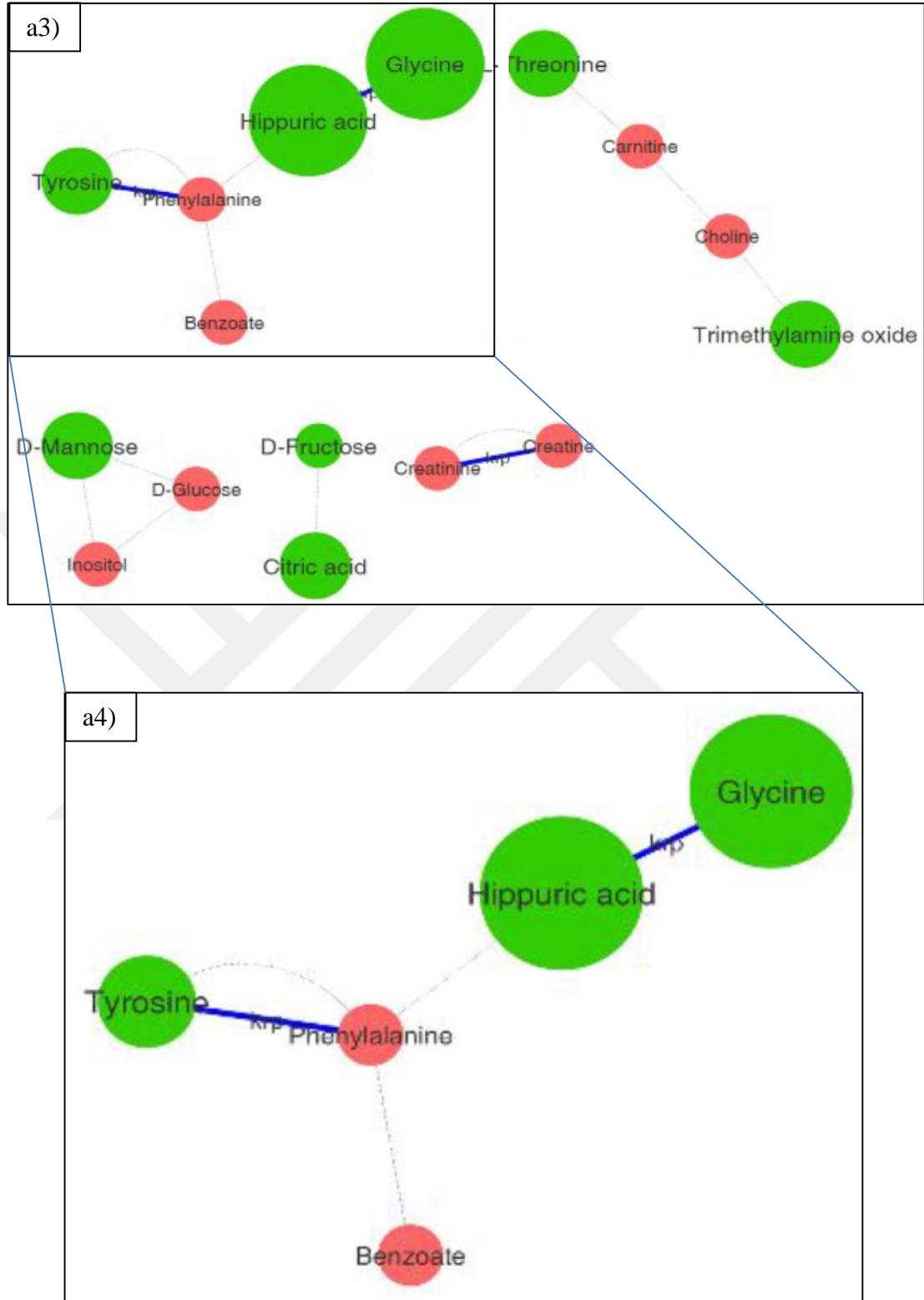
Şekil 5 (e) – (f). Tüm ekstrakt tiplerinin OPLS skor alanları. Her bir nokta tek bir $^1\text{H-NMR}$ spektrumunu gösterir ve her bir renk farklı sığır gruplarını temsil eder: sağlıklı (sarı noktalar), LDA (kırmızı noktalar) ve RDA (mavi noktalar). (e) su bazlı idrar örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde OPLS; (f) lipid bazlı idrar örneklerinin 1D NOESY spektrumu üzerinde OPLS. Karışıklık matrisleri ve kross-validasyon analizinin ilişkili öngörü doğruluğu her bir model için rapor edilmiştir.



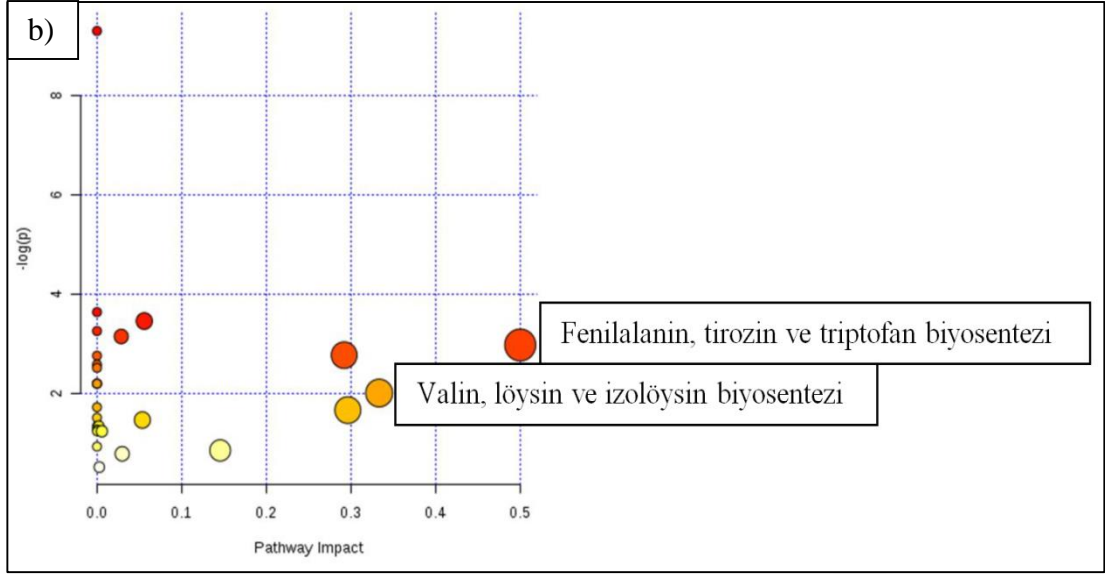
Şekil 5 (g). Tüm ekstrakt tiplerinin OPLS skor alanları. Her bir nokta tek bir $^1\text{H-NMR}$ spektrumunu gösterir ve her bir renk farklı sığır gruplarını temsil eder: sağlıklı (sarı noktalar), LDA (kırmızı noktalar) ve RDA (mavi noktalar). (g) su bazlı serum örneklerinin 1D CPMG spektrumu üzerinde OPLS. Karışıklık matrisleri ve kross-validasyon analizinin ilişkili öngörü doğruluğu her bir model için rapor edilmiştir.



Şekil 6 (a1) – (a2). Sağlıklı ve LDA’lı sığırların karşılaştırılması için biyokimyasal ağ haritası ve serum su bazlı metabolitlerin ilişkili yolak analizleri. Metabolitlerin global ağ grafiği MetaMapp online aracı kullanılarak elde edilmiştir. Karşılaştırmada yeşil noktalar konsantrasyonu anlamlı olarak farklı (ayarlanmış $p < 0,05$) olanları, kırmızı noktalar ise istatistiksel olarak anlamlı olmayanları göstermektedir. Nokta büyüklükleri Fold-change değerlerini göstermektedir. Metabolitler arasındaki biyokimyasal ve kimyasal ilişkiler KRP (KEGG reaksiyon eşleri) ve TMSIM (Tanimoto benzerliği) ile kalın mavi kenarlar ve siyah tire bağlantıları ile gösterilmiştir.



Şekil 6 (a3) – (a4). Sağlıklı ve RDA'lı sığırların karşılaştırılması, yeşil noktalar konsantrasyonu anlamlı olarak farklı (ayarlanmış $p < 0,05$) olanları, kırmızı noktalar ise istatistiksel olarak anlamlı olmayanları göstermektedir. Nokta büyüklükleri Fold-change değerlerini göstermektedir. Metabolitler arasındaki biyokimyasal ve kimyasal ilişkiler KRP (KEGG reaksiyon eşleri) ve TMSIM (Tanimoto benzerliği) ile kalın mavi kenarlar ve siyah tire bağlantıları ile gösterilmiştir.



Şekil 6 (b). MetaboAnalyst yolak haritası sadece istatistiksel olarak anlamlı (ayarlanmış $p < 0,05$) olan metabolitler için rapor edilmiştir. Detaylı olarak bakıldığında her bir nokta, yolak etkisi ve ilişkili $-\log(p)$ değeri'ne bağlı olarak çizilmiş spesifik metabolik yolları ifade etmektedir. Bu çizilmiş alan, etki ve $-\log(p)$ değeri için en anlamlı olan valin, löysin ve izolöysin biyosentezi ve fenilalanin, tirozis ve triptofan biyosentezi (çizilmiş alanın sağ kısmı) metabolik yolağı şeklin A panelinin sağ tarafında bulunan magenta ve turuncu renkli kutular ile ifade etmektedir.

4. TARTIŞMA

Sütçü sığırlarda AD'nin etiyopatogenezini araştıran ulusal ve uluslararası düzeyde birçok çalışma bulunmaktadır. Bilgimiz dahilinde bu çalışma AD (LDA ve RDA)'li multiparous sütçü sığırlarda serum, idrar ve karaciğer metabolom profillerinin birlikte (700 MHz'lik NMR spektroskopisi ile) değerlendirildiği ilk çalışmadır. Bu çalışma ile AD'li sütçü sığırlarda metabolizma; serum, idrar ve karaciğer metabolomları üzerinden daha kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada hasta grupların klinik semptomları ve ultrasonografik bulguları literatürlerle (Ok ve ark 2002, Braun ve Feller 2008, Li ve ark 2018) uyumlu olmuştur. Düşük Ca ve K konsantrasyonları ile yüksek apo B100, AST ve GGT konsantrasyonlarının AD oluşumu ile ilişkili olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Sevinc ve ark 2002, Civelek ve ark 2006, Sen ve ark 2006, Seifi ve ark 2011, Constable ve ark 2013). Bu çalışmada da yukarıdaki referanslar ile uyumlu olarak özellikle RDA'lı sığırlar, hipokalemik ve hipokloremikti. Na ve Ca gibi mineral seviyelerinde düşüklük gözlenirse de bunlar referans sınırları içerisindeydi. RDA'lı grupta eğilim olmakla beraber hastalarda metabolik alkaloz gelişmemiştir. Ayrıca hasta grupların serum GGT seviyeleri, özellikle RDA'lı grupta, yüksek bulunmuştur. Bu da aşağıda tartışılacak olan yüksek NEFA konsantrasyonları ile birlikte değerlendirildiğinde hasta gruplarda karaciğer yağlanmasına işaret etmektedir. RDA'lı sütçü sığırlarda plazma L-laktat konsantrasyonunun prodüktif sonuçlar için faydalı bir prediktör olabileceği vurgulanmıştır (Figueiredo ve ark 2006). Bu çalışmada da metabolomik analizle belirlenen laktat seviyeleri, hasta grupların serum ve idrar örneklerinde yüksek iken LDA'lı grubun karaciğer örneklerinde düşük bulunmuştur. Buna göre laktatın L ve D izomerlerinin ölçümünün prognostik indeks için daha yararlı olabileceği ifade edilebilir.

Hem kuru hem de puerperal dönemlerde sığırların enerji durumunu yansıtan en yaygın indikatörler NEFA ve BHBA; puerperal dönemde ise total protein ve albumin konsantrasyonlarıdır (Puppel ve Kuczynska 2016). Ayrıca, periparturient dönemde zamanlama, şiddet ve süre bakımından dolaşımdaki yüksek NEFA ve BHBA konsantrasyonları, AD ve uterus hastalıkları riski ile birlikte olurken reproduktif performansı da 1 ile 20 hafta boyunca etkilerler (LeBlanc 2010). Genel olarak subklinik ketozis tanısı için kullanılan kan BHBA konsantrasyonunun cut-off

değeri 1,2-1,4 mmol/L'dir (Suthar ve ark 2013). Klinik ketoziste ise genel olarak kan BHBA konsantrasyonu >3 mmol/L ile karakterizedir (Oetzel 2007). Referanslar (Figueiredo ve ark 2006, Stengarde ve ark 2010, Dezfouli ve ark 2013) ile uyumlu olarak çalışmamızda da AD'li sığırların serum ve idrar örneklerinde NEFA ve BHBA seviyelerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Yüksek BHBA konsantrasyonları ile AD gelişim riski arasındaki prediktif ilişki bu çalışmada da desteklenmiştir. Aynı zamanda, metabolomik olarak ölçülen 3-hidroksibütirat seviyeleri LDA'lı sığırların serum ve idrar örneklerinde sağlıklı ve RDA'lı gruplara göre daha yüksek bulundu. Bu parametre ile, bu çalışmada kullanılan LDA'lı sığırlarda daha yüksek oranda (yaklaşık %50) ketozis olduğu metabolomik olarak izah edilmektedir. Ketotik sığırlarda kanda isopropanol seviyelerinin yüksek olduğu gözlenir (Sato 2009). Bu çalışmada da RDA'lı sığırların karaciğer örneklerinde metabolomik olarak ölçülen isopropanol ve asetat, diğer gruplara göre daha yüksek bulundu. Bu da RDA'lı sığırlarda ruminal mikroorganizma metabolizmasına bağlı olarak asetondan daha fazla isopropanol üretildiğini gösterebilmektedir.

LDA veya RDA'lı sığırlarda serum amiloid A ve haptogloblin seviyeleri yüksek bulunmuştur. Bu artış AD'li sığırlarda hepatik lipidozis varlığının bir belirteci olabilir (Güzelbektes ve ark 2010). Sütçü sığırlarda yapılan başka bir çalışmada en yüksek CRP ve haptogloblin konsantrasyonlarının doğumdan sonraki ilk ayda gözlendiği rapor edilmiştir (Dębski ve ark 2016). Bu çalışmada da en yüksek CRP konsantrasyonu RDA'lı sığırlarda gözlendi. Bu durum, serum amiloid A, haptogloblin ve CRP seviyelerinin yüksek GGT ve NEFA seviyeleri ile birlikte değerlendirildiğinde, AD'li sığırlarda karaciğer yağlanmasına atfedilebilir.

Ruminantlarda başlıca glikoneojenik substratlar propiyonat, laktat ve gliserol; glikoneojenik amino asitler de glutamat, glutamin, aspartat, glisin, histidin, prolin ve valindir. Glikoneojenik substratların eksikliği ketozis patogenezi için önemli bir risk faktörüdür. Ketojenik amino asitler (örneğin löysin ve lizin) de oksidatif deaminasyon ile trikarboksilik asit siklusuna girerler. Trikarboksilik asit siklusundaki bir bozukluk, klinik ketozis oluşumuna katkı sağlar (Sun ve ark 2014). Metabolomik olmayan yaklaşımla yapılan bir çalışmada (Hamana ve ark 2010), LDA'lı sığırların plazmasında serbest yağ asidi ve BHBA seviyeleri önemli ölçüde yüksek; metiyonin, alanin ve serin gibi glikojenik amino asit seviyeleri düşük; kandaki serbest amino

asitler arasında löysin ve lizin gibi ketojenik amino asit seviyeleri de yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada da sağlıklı sığırlar ile karşılaştırıldığında LDA'lı ve RDA'lı sığırlarda tirozin, fenilalanin, izolöysin ve treonin gibi hem glikoneojenik hem de ketojenik amino asitler ile, sadece ketojenik (löysin, lizin) ve sadece glikoneojenik (alanin, izolöysin, glisin, glutamin, prolin ve valin) amino asitler benzer şekilde düşük bulunmuştur. LDA'lı sığırlar ile karşılaştırıldığında lizin, glisin ve hatta löysin RDA'lı grupta daha da düşüktü. LDA'lı sığırlarda ketozis, glikoneojenik substratların (propiyonat, gliserol ve glikoneojenik asit) eksikliğine ve ketotik sığırların ketojenik maddeleri fazla miktarda tüketmelerine atfedilebilir.

Lipid metabolomu değişikliklerini değerlendiren bir diğer çalışmada (Humer ve ark 2016), postpartum erken dönemde aşırı lipolizli sütçü sığırlarda insulin sensitivitesinin bozulduğu; asilkarnitin, sfingomyelin, fosfatidilkolin ve lizofosfolipid metabolom profillerindeki karakteristik kaymaların daha az lipomobilizasyon bulunanlara göre arttığı gösterilmiştir. Tespit edilen fosfatidilkolinlerden ağırlıklı olarak diasil-rezidü bulunanlar, lipoliz grupları arasında farklılık göstermiştir. Buna ek olarak serum asilkarnitin seviyelerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Üstelik, tespit edilen sfingomyelinlerin yarısından fazlasının, yüksek lipomobilizasyonlu sığırlarda daha yüksek seviyede olduğu rapor edilmiştir. Ek olarak, lipolizli gruplar arasında serum asetilkarnitin seviyeleri belirgin farklılıklar göstermiştir (Humer ve ark 2016). Karnitin, aktive edilmiş yağ asitlerini uyumlu karnitin esterleri ile sitosolden mitokondriye taşır (Stanley ve ark 1992). En kısa asilkarnitin olan asetilkarnitin, asetil-CoA'nın mitokondri matrislerine hareketini kolaylaştırır. Üstelik mitokondride karnitin asetil-CoA transferaz, asetil-CoA'nın C2'ye dönüşümünü katalize eder. C2 aşırı asetil-CoA'nın mitokondrial dışı akışını kolaylaştıran bir membran permeabl metabolitidir. Yüksek hepatik karnitin konsantrasyonları doğumdan sonraki ilk haftada gözlenir. Bu artış, NEB geliştiği durumlarda dolaşımdaki aşırı miktardaki NEFA'nın hepatositlere taşınması için gerekli karnitin konsantrasyonunu sağlama amacıyladır (Schlegel ve ark 2012). Özellikle spesifik gliserofosfolipidler, sfingolipidler ve asilkarnitinlerin rolü, geçiş dönemindeki sütçü sığırlarda metabolik adaptasyonun potansiyel biyobelirteçleri olarak düşünülmelidir (Kenez ve ark 2016). Bu çalışmada da hasta sığırlardaki, özellikle LDA grubunda, serum karnitin seviyesi, sağlıklı gruba göre daha yüksek

bulunmuştur. Bu durum ketojenik ve glikoneojenik amino asitlerin mitokondrial oksidasyonunun arttığını gösterebilmektedir.

Valin, löysin ve izolöysin biyosentezi, süt protein sentezi için hayati rol oynar. Hippürat, nikotinamid ve pelargonik asit süt protein biyobelirteçleridir (Wu ve ark 2018). Aromatik bir bileşik olan hippürat triptofan, tirozin ve fenilalanin gibi aromatik amino asitlere dönüşebilir ve daha sonra nikotinamide çevrilebilir. Yüksek serum hippürat seviyesi, glikoz metabolizması ve hormon regülasyonu ile daha çok enerjinin sağlandığını ifade edebilir (Pero 2010). Üriner hippürat seviyesi diyet bileşenini, hepatic fonksiyonu, hastalık durumunu ve hatta metabolizma değişimlerini yansıtır. Yüksek üriner hippürat seviyesi daha fazla nitrojen kaybına ve daha düşük kaliteli yemlerle beslenen sığırlarda ekskretorik bir ürün olan hippüratın diyetdeki protein yıkımlanmasından üretildiği hipotezini destekleyen düşük süt proteinine sebep olur (Sun ve ark 2016). Bu çalışmada da hippürat, tespit edilen en önemli metabolitlerden biri olmuştur. Hasta grupta (özellikle LDA grubunda) serumdaki valin, löysin ve izolöysin ile birlikte hippüratın düşük serum ve idrar seviyeleri, AD'li sığırlarda daha az enerji sağlandığını ve daha az nitrojen kaybını gösterebilir.

Üç dallı amino asitler zincirinden biri olan löysin, tüm amino asit ve protein metabolizmasının düzenlenmesinde sinyalizasyon molekülü olarak görev yapar. Löysin ayrıca pankreasın β -hücrelerinden insulin sekresyonunun güçlü bir uyarandır (Sadri ve ark 2017). Esansiyel amino asitler olarak sınıflandırılan üç dallı zincirli amino asitler (löysin, izolöysin ve valin) tüm amino asit ve protein metabolizmasında önemli roller oynarlar. Primer ketozisli sığırlarda yapılan bir çalışmada serumda glutamin, glutamik asit, izolöysin ve tirozin konsantrasyonlarının yüksek, asparajin, histidin, metiyonin, serin, alanin, löysin ve prolin konsantrasyonlarının düşük olduğu rapor edilmiştir (Marczuk ve ark 2018). Bu çalışmada da serum örneklerinde löysin, izolöysin, tirozin, trimetilamin N-oksit ve valin seviyelerinin AD'li gruplarda düşük olduğu gözlemlendi. Böylece çalışmamızda AD'li sığırlarda protein ve amino asit metabolizmalarının olumsuz olarak etkilendiği metabolomik olarak izah edilebilmektedir.

Yüksek verimli sütçü sığırlarda yapılan bir çalışmada glisin:alanin oranının iyileştirilmesi ile süt üretiminin ve süt kalitesinin arttığı bildirilmiştir (Shibano ve ark

2005). Ayrıca, glisin:alanin oranı, geçiş döneminden pik dönemine geçişteki nutrisyonel eksikliklerin göstergesi olarak faydalı bulunmuştur. Bu yüzden serum glisin:alanin oranının ölçümü, periparturient sütçü sığırlarda nutrisyonel durumun değerlendirilmesinde faydalı olabilir. Bu çalışmada da RDA grubunda bu oranın daha fazla bozulduğu belirlenmiştir. Buna göre bu grubun iyi beslenmediğini ifade edilebilir.

Karaciğer biyopsisi, yağlı karaciğerin varlığını, özellikle toplam lipid ve trigliserit miktarlarının tahmini ile şiddetini saptamak için tek güvenilir yöntemdir. Postpartum 8-14. günler arası yapılan karaciğer biyopsileri, sığırların sınıflandırılması için faydalıdır (Kirovski 2017). Son yıllarda metabolomiklerin hastalık biyobelirteci olarak kullanımı popüler hale gelmiştir. Karaciğer yağlanmalı sığırlarda yapılan NMR-bazlı metabolomik bir çalışmada plazma örneklerinde BHBA, aseton, glisin, valin, trimetilamin N-oksit, sitrülün ve izobütirattaki artışla birlikte alanin, asparajindeki düşüş primer değişiklikler olarak ortaya konmuştur (Xu ve ark 2016). Plazma triasilgliseridlerin konsantrasyonu, doğumda düşerken birçok fosfatidilkolinlerin ve sfingomyelinlerin plazma seviyeleri erken laktasyonda düzenli bir şekilde artar (Imhasly ve ark 2015). Plazma fosfatidilkolinlerin spesifik temsilcilerinin ölçümü ile, sütçü sığırlarda yağlı karaciğer sendromu için yeni diagnostik bir biyobelirteç sağlanabileceği bildirilmiştir (Gerspach ve ark 2017). Kolin, kritik biyolojik rollere sahip olup betain, fosfatidilkolin ve asetilkolin gibi çeşitli ürünlere metabolize olabilir (Garcia ve ark 2018). Bazı spesifik fosfatidilkolinlerin ve sfingomyelinlerin anormal düşüşü, yağlı karaciğer sendromunu gösteren önemli bir biyobelirteç olabilir (Artegoitia ve ark 2014, Imhasly ve ark 2015). Bu çalışmada da hasta grupların serum ve idrar örneklerinde birçok yağ asidi fraksiyonları ve kolesterol seviyeleri düşük iken, aynı metabolitler hasta grupların karaciğer örneklerinde daha yüksek olma eğilimindeydi. Yağ asitleri $CH_3-(CH_2)_n$ ve yağ asitleri $-(CH_2)_n$, LDA'lı sığırların idrar örneklerinde RDA'lı gruba göre daha düşüktü. Bu çalışmada da hasta sığırların serum örneklerinde fosfolipidler, fosfolipidler ve doymamış ve çoklu doymamış yağ asitleri ile sfingomyelin sağlıklı sığırlara göre daha düşük bulundu. Benzer düşüşler karaciğer örneklerinde önemli değildi. Yağ asidi fraksiyonlarının ve fosfatidilkolin seviyelerinin genellikle LDA'lı grubun serum ve karaciğer örneklerinde daha düşük

oluşu dikkat çekmiştir. Bu da LDA'lı grupta karaciğer yağlanması daha şiddetli olabileceğine atfedilebilir.

Abomazum deplasmanlı sığırlarda ilk defa, Başoğlu ve arkadaşları (2014) tarafından ön çalışma mahiyetinde sadece plazma örneklerinde 400 MHz'lik NMR spektroskopisi kullanarak metabolomik değerlendirme yapılmış, tanımlanmış ve kantifiye edilen metabolitler valin, BHBA, alanin, glutamin, glutamat ve süksinat olarak rapor edilmiştir. LDA ve RDA grupları arasında önemli değişimler glutamin, glutamat ve BHBA'da olmuştur. RDA'lı sığırlarda süksinat seviyesi önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Buna göre, süksinat canlılarda önemli bir biyokimyasal araçtır. Glutamin, metabolik olarak hepatositlerdeki amonyum detoksifikasyonu ile bağlantılıdır. Glutamat, glutamin sentez reaksiyonunun prekürsörüdür. Düşük glutamin seviyesi, hepatik disfonksiyonu ve/veya hepatosit yıkımını gösterir. Yukarıdaki parametreler bu çalışmada da doğrulanmıştır.

Sadece LDA'lı sığırların plazma örneklerinde yapılan MS bazlı yeni bir metabolomik çalışmada, tanımlanmış metabolitlerdeki değişikliklerden 13 metabolik yolağın (histidin, metabolizması, tirozin metabolizması; valin, löysin ve izolöysin biyosentezi; fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi; arjinin ve prolin metabolizması; triptofan metabolizması; keton cisimciklerinin sentez ve yıkımı; linoleik asit metabolizması; araşidonik asit metabolizması; sitrat siklusu; butanoate metabolizması, vitamin B6 metabolizması ve pirimidin metabolizması) etkilendiği ifade edilmiştir (Guo ve ark 2019). Bu çalışmada da serum metabolitleri üzerinde gerçekleştirilen biyokimyasal bağlantı ve yolak haritaları özellikle valin, löysin ve izolöysin biyosentezini vurgulamıştır. AD'li sığırlarda en çok değişime uğramış metabolik yolağın fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi olduğu açıkça ortaya konmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hem LDA'lı ve hem RDA'lı sığırların metabolizması; serum, idrar ve karaciğer örneklerinde su ve lipid bazlı 700 MHz'lik NMR spektroskopisi ile daha geniş kapsamlı olarak değerlendirilmiş, AD'nin enerji metabolizması ile ilişkili patojenik mekanizmaları daha anlaşılır olmuştur. Sonuç olarak AD'li sığırlarda lipoliz, ketogenez ve oksidatif kapasite gibi birkaç fizyopatolojik olayın entegrasyonu glikoneojenik ve ketojenik amino asitler, yağ asit fraksiyonları, kolesterol, keton cisimcikleri, kolin ürünleri, karnitin ve hippürat ile kombine edildiğinde, klasik yaklaşım olan NEFA ve BHBA'nın ölçümleri ile kıyaslandığında daha kapsamlı bilgi sağlamaktadır.

Hastalıkların patojenik mekanizmalarının anlaşılmasında metabolomik yaklaşım kapsamlı bilgi sağlasa da, bu kapsamı daha da genişletmek için diğer omiklerle (genomik, transkriptomik ve proteomikler) entegrasyonu tavsiye edilir.

6. KAYNAKLAR

- Aebersold R, Mann M, 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, 6928, 198–207.
- Ametaj BN, Zebeli Q, Saleem F, 2010. Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows. *Metabolomics*, 6, 583–94.
- Ametaj BN, 2017. *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach*. Springer, Basel, Switzerland, 1-6.
- Artegoitia VM, Virginia M, Middleton JL, Harte FM, Campagna SR, de Veth MJ, 2014. Choline and choline metabolite patterns and associations in blood and milk during lactation in dairy cows. *PLOS One*, 26, 9, 1-14.
- Bai YS, Sartor M, Cavalcoli J, 2012. Current status and future perspectives for sequencing livestock genomes. *J Anim Sci Biotechnol*, 3, 1, 3-8.
- Basoğlu A, Baspınar N, Coskun A, 2014. NMR-based metabolomic evaluation in dairy cows with displaced abomasum. *Turk J Vet Anim Sci*, 38, 325-30.
- Basoglu A, Baspınar N, Tenori L, Hu X, Yildiz R, 2014. NMR Based Metabolomics Evaluation in Neonatal Calves with Acute Diarrhea and Suspected Sepsis: A New Approach for Biomarker/S. *Metabolomics*, 4, 2, 1-6.
- Benjamini Y, Hochberg Y, 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol*, 289–300.
- Blom JY, 1993. Disease and feeding in Danish dairy herds. *Acta Vet Scand Suppl*, 89, 17–22.
- Braun U, Feller B, 2008. Ultrasonographic findings in cows with right displacement of the abomasum and abomasal volvulus. *Vet Rec*, 162, 311-15.
- Breukink HJ, 2003. Abomasal displacement, etiology, pathogenesis, treatment and prevention. *Bovine Pract*, 26, 148–53.
- Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M, Vandenesch F, Garin J, 2007. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 6, 2139–149.
- Cairolì F, Battocchio M, Veronesi MC, Brambilla D, Conserva F, Eberini I, Wait R, Gianazza E. 2006. Serum protein pattern during cow pregnancy: acute-phase proteins increase in the peripartum period. *Electrophoresis*, 27, 1617–25.
- Caixeta LS, Herman JA, Johnson GW, McArt JAA, 2018. Herd-level monitoring and prevention of displaced abomasum in dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 34, 83-99.
- Cameron REB, Dyk PB, Herdt TH, Kaneene JB, Miller R, Bucholtz HF, Liesman JS, Vandehaar MJ, Emery RS, 1998. Dry cow diet, management, and energy balance as risk factors for displaced abomasum in high producing dairy herds. *J Dairy Sci*, 81, 132–39.
- Capomaccio S, Milanese M, Bomba L, Vajana E, Ajmone-Marsan P, 2015. MUGBAS: a species free gene-based programme suite for post-GWAS analysis. *Bioinformatics*, 31, 2380–381.

- Cecilian F, Lecchi C, Urh C, Sauerwein H, 2018. Proteomics and metabolomics characterizing the pathophysiology of adaptive reactions to the metabolic challenges during the transition from late pregnancy to early lactation in dairy cows. *J Proteomics*, 30,178, 92-106.
- Chandramouli K, Qian PY, 2009. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics*, 8, 204-39.
- Choe C, Park JW, Kim ES, Lee SG, Park SY, Cho MJ, Kang KR, Han J, Kang D, 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine endometrium with endometritis. *Korean J Physiol Pharmacol*, 14, 205-12.
- Civelek T, Sevinc M, Boydak M, Basoglu A, 2006. Serum apolipoprotein B100 concentrations in dairy cows with left displaced abomasum. *Revue Méd Vét*, 157, 361-65.
- Constable P, Grünberg W, Staufienbiel R, Stämpfli HR, 2013. Clinicopathologic variables associated with hypokalemia in lactating dairy cows with abomasal displacement or volvulus. *J Am Vet Med Assoc*, 242, 826-35.
- Constable PD, Miller GY, Hoffsis GF, Hull BL, Rings DM, 1992. Risk factors for abomasal volvulus and left abomasal displacement in cattle. *Am J Vet Res*, 53, 1184–192.
- Coppock CE, Noller CH, Wolfe SA, Callahan CJ, Baker JS, 1972. Effect of forage-concentrate ratio in complete feeds fed ad libitum on feed intake prepartum and the occurrence of abomasal displacement in dairy cows. *J Dairy Sci*, 55, 783–93.
- Correa MT, Curtis CR, Erb HN, Scarlett JM, Smith RD, 1990. An ecological analysis of risk factors for postpartum disorders of Holstein–Friesian cows from thirty-two New York farms. *J Dairy Sci*, 73, 1515–524.
- Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Kronfeld DS, 1985. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *J Dairy Sci*, 68, 2347–360.
- Daniel RC, 1983. Motility of the rumen and abomasum during hypocalcaemia. *Can J Comp Med*, 47, 276–80.
- Davies DC, Jebbett IH, 1981. Liver biopsy of cattle. *In Practice*, 3, 6, 14-6.
- Dawson LJ, Aalseth EP, Rice LE, Adams GD, 1992. Influence of fiber form in a complete mixed ration on incidence of left displaced abomasum in postpartum dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, 200, 1989–992.
- Dębski B, Nowicki T, Zalewski W, Ochota M, Mrowiec J, Twardoń J, 2016. Evaluation of acute phase proteins in clinically healthy dairy cows in perinatal period and during lactation. *Pol J Vet Sci*, 19, 519-23.
- Dervishi E, Zhang G, Mandal R, Wishart DS, 2018. Targeted metabolomics: new insights into pathology of retained placenta in dairy cows and potential risk biomarkers. *Animal*, 12, 5, 1050-59.
- Dezfouli MM, Eftekhari Z, Sadeghian S, Bahounar A, Jeloudari M, 2013. Evaluation of hematological and biochemical profiles in dairy cows with left displacement of the abomasum. *Comp Clin Pathol*, 22, 175-79.

- Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H, 2006. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal Chem*, 78, 4281–90.
- Doll K, Sickinger M, Seeger T, 2009. New aspects in the pathogenesis of abomasal displacement. *Vet J*, 181, 90-96.
- Doll K, 2015. Abomasal displacement in dairy cattle: A hereditary disease? *Vet J*, 205, 329-30.
- Dong SW, Zhang SD, Wang DS, 2015. Comparative proteomics analysis provide novel insight into laminitis in Chinese Holstein cows. *BMC Vet Res*, 11, 161, 63-9.
- Eckel E, Ametaj B, 2017. An omics approach to transition cow immunity. *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach*. Springer, Basel, Switzerland, 31-9.
- Eiler H, 1997. Retained placenta. In: Youngquist RS (ed) *Current therapy in large animal. Theriogenology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 4, 340–48.
- El-Deeb WM, 2015. Ketosis and associated Oxidative Stress in Ruminants. *J Veterinar Sci Technolo*, 6, 1, 431-40.
- Erb HN, Grohn YT, 1988. Epidemiology of metabolic disorders in the periparturient dairy cow. *J Dairy Sci*, 71, 2557–571.
- Erb HN, Smith RD, Hillman RB, Powers PA, Smith MC, White ME, Pearson EG, 1984. Rates of diagnosis of six diseases of Holstein cows during 15-day and 21-day intervals. *Am J Vet Res*, 45, 333–35.
- Fadden AN, Bobe G, 2016. Serum visfatin is a predictive indicator of retained placenta and other diseases in dairy cows. *J Vet Sci Med Diagn*, 5, 1, 1-6.
- Figueiredo MD, Nydam DV, Perkins GA, Mitchell HM, Divers TJ, 2006. Prognostic value of plasma L-lactate concentration measured cow-side with a portable clinical analyzer in Holstein dairy cattle with abomasal disorders. *J Vet Intern Med*, 20, 1463-70.
- Fu XY, Yang MF, Cao MZ, Li DW, Yang XY, Sun JY, Zhang ZY, Mao LL, Zhang S, Wang FZ, Zhang F, Fan CD, Sun BL, 2016. Strategy to Suppress Oxidative Damage-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells by Curcumin: the Role of ROS-Mediated DNA Damage and the MAPK and AKT Pathways. *Mol Neurobiol*, 53, 1, 369-78.
- Garcia M, Mamedova LK, Barton B, Bradford BJ, 2018. Choline regulates the function of bovine immune cells and alters the mRNA abundance of enzymes and receptors involved in its metabolism in vitro. *Front Immunol*, 25, 2448, 1-14.
- Geishauser T, Leslie K, Duffield T, Edge V, 1997. An evaluation of milk ketone tests for the prediction of left displaced abomasum in dairy cows. *J. Dairy Sci*, 80, 3188–192.
- Geishauser T, Reiche D, Schemann M, 1998. In vitro motility disorders associated with displaced abomasum in dairy cows. *Neurogastroenterol Motil*, 10, 395–401.
- Geishauser T, Seeh H, 1996. Duodeno-abomasal reflux in cows with abomasal displacement. *J Vet Med*, 43, 1-10.
- Geishauser T, 1995. Abomasal displacement in the bovine—a review on character, occurrence, aetiology and pathogenesis. *Zentralbl Veterinaermed A*, 42, 229–51.
- Gerspach C, Imhasly S, Gubler M, Naegeli H, Ruetten M, Laczko E, 2017. Altered plasma lipidome profile of dairy cows with fatty liver disease. *Res Vet Sci*, 110, 47-59.

- Goddard ME, Hayes BJ, 2007. Genomic selection. *J Anim Breed Genet*, 124, 323–30.
- Gondro C, JVD W, Hayes B, 2013. Genome-wide association studies and genomic prediction, *Methods of molecular biology*, vol 1019, Humana Press, New York, 2-6.
- Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J Dairy Sci*, 88,1399–403.
- Grohn YT, Eicker SW, Hertl JA, 1995. The association between previous 305-day milk yield and disease in New York state dairy cows. *J Dairy Sci*, 78, 1693–702.
- Guard C, 1996. Abomasal displacement and volvulus. In: Smith, B.P. (Ed.), *L Anim Intern Med*. Mosby, 2, 868–74.
- Guo YS, Tao JZ, Xu LH, Wei FH, He SH, 2019. Identification of disordered metabolic networks in postpartum dairy cows with left displacement of the abomasum through integrated metabolomics and pathway analyses. *J Vet Med Sci*, 17, 10, 115-24.
- Guzelbektes H, Sen I, Ok M, Constable PD, Boydak M, Coskun A, 2010. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations and liver fat percentage in lactating dairy cows with abomasal displacement. *J Vet Intern Med*, 24, 213-19.
- Hamana M, Ohtsuka H, Oikawa M, Kawamura S, 2010. Blood free amino acids in the postpartum dairy cattle with left displaced abomasum. *J Vet Med Sci*, 72, 1355–58.
- Herdt TH, Gerloff BJ, Liesman JS, Emery RS, 1982. Hepatic lipidosis and liver function in 49 cows with displaced abomasums. In: *World Congress on Diseases of Cattle*, 12th World Association for Buiatrics, 522–25.
- Hesselholt M, Grymer J. 1979. Linksseitigen Labmagenverlagerung: Vorkommen in Danemark. *Dtsch Tierarztl Wschr*, 86, 490–94.
- Holmes E, Foxall PJ, Nicholson JK, Neild GH, Brown SM, Beddell CR, 1994. Automatic data reduction and pattern recognition methods for the analysis of 1H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Anal Biochem*, 220, 284–96.
- Holtenius P, Niskanen R, 1985. Leberzellverfettung bei Kuhen mit Labmagenverlagerung. *Dtsch Tierarztl Wschr*, 92, 398–400.
- Humer E, Khol-Parisini A, Metzler-Zebeli BU, Gruber L, Zebeli Q, 2016. Alterations of the lipid metabolome in dairy cows experiencing excessive lipolysis early postpartum. *PLOS One*, 6, 11, 3-18.
- Imhasly S, Bieli C, Naegeli H, Nyström L, Ruetten M, Gerspach C, 2015. Blood plasma lipidome profile of dairy cows during the transition period. *BMC Vet Res*, 7, 252, 2-14.
- Ingvartsen KL, Andersen JB, 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci*, 83, 1573–597.
- Ingvartsen KL, Boisclair Y, 2001. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domest Anim Endocrinol*, 21, 215–50.

- Ingvartsen KL, Dewhurst RJ, Friggens NC, 2003. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livest Prod Sci*, 73, 277–308.
- Ismael M, Elshahawy I, Abdulaziz I, 2018. New Insights on Left Displaced Abomasum in Dairy Cows. *AJVS*, 56, 127-36.
- Itenov TS, Murray DD, Jensen JUS, 2018. Sepsis: Personalized Medicine Utilizing “Omic” Technologies-A Paradigm Shift? *Healthcare*, 6, 111, 2-9.
- Itoh N, Koiwa M, Hatsugaya A, Yokota H, Taniyama H, Okada H, Kudo K, 1998. Comparative analysis of blood chemical values in primary ketosis and abomasal displacement in cows. *J Vet Med Ass*, 45, 293-98.
- Jordan ER, Fourdraine RH, 1993. Characterization of the management practices of the top milk producing herds in the country. *J Dairy Sci*, 76, 10, 3247-56.
- Kelton DF, Lissemore KD, Martin RE, 1998. Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *J Dairy Sci*, 81, 2502–509.
- Kenéz Á, Dánicse S, Rolle-Kampczyk U, von Bergen M, Huber K, 2016. A metabolomics approach to characterize phenotypes of metabolic transition from late pregnancy to early lactation in dairy cows. *Metabolomics*, 12, 165, 112-8.
- Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC, 2009. Alfalfa pellet induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *J Dairy Sci*, 92, 1712–724.
- Kim HR, Han RX, Yoon JT, Park CS, Il Jin D, 2010. A two-dimensional electrophoresis reference map for the bovine placenta during late pregnancy. *Proteomics*, 10, 564–73.
- Kirovski D, 2017. Prediction and Diagnosis and Fatty Liver in Dairy Cows. *J Gastroenterol*, 3, 1005, 3-11.
- Klein MS, Buttchereit N, Miemczyk SP, Immervoll AK, Louis C, Wiedemann S, Junge W, Thaller G, Oefner PJ, Gronwald W, 2012. NMR metabolomic analysis of dairy cows reveals milk glycerophosphocholine to phosphocholine ratio as prognostic biomarker for risk of ketosis. *J Proteome Res*, 11, 2, 1373-381.
- Kuhla B, Albrecht D, Kuhla S, Metges CC, 2009. Proteome analysis of fatty liver in feed-deprived dairy cows reveals interaction of fuel sensing, calcium, fatty acid, and glycogen metabolism. *Physiol Genomics*, 37, 2, 88-98.
- Kurz JP, Yang Z, Weiss RB, Wilson DJ, Rood KA, Liu GE, Wang Z, 2019. A genome-wide association study for mastitis resistance in phenotypically well-characterized Holstein dairy cattle using a selective genotyping approach. *Immunogenetics*, 71, 1, 35-47.
- LeBlanc S, 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Dev*, 56, 29-35.

- Lehner S, Zerbin I, Doll K, Rehage J, Distl O, 2018. A genome-wide association study for left-sided displacement of the abomasum using a high-density single nucleotide polymorphism array. *J Dairy Sci*, 101, 1258-266.
- Li S, Wang Q, Lin X, Jin X, Liu L, Wang C, Chen Q, Liu J, Liu H, 2017. The use of “Omics” in lactation research in dairy cows. *Int J Mol Sci*, 18, 983-1000.
- Li XW, Xu QS, Zhang RH, Yang W, Li Y, Zhang YM, Tian Y, Zhang M, Wang Z, Liu GW, Xia C, Li XB, 2018. Ultrasonographic findings in cows with left displacement of abomasum, before and after reposition surgery. *BMC Vet Res*, 12, 14, 40-4.
- Lippolis JD, Reinhardt TA, 2008. Centennial paper: Proteomics in animal science. *J Anim Sci*, 86, 2430–441.
- Loor JJ, 2010. Genomics of metabolic adaptations in the peripartal cow. *Animal*, 4, 1, 110–39.
- Maden M, Ozturk AS, Bulbul A, Avci GE, Yazar E, 2012. Acute-Phase proteins, oxidative stress and enzyme activities of blood serum and peritoneal fluid in cattle with abomasal displacement. *J Vet Intern Med*, 26, 1470-475.
- Marczuk J, Brodzki P, Brodzki A, Kurek Ł, 2018. The concentration of free amino acids in blood serum of dairy cows with primary ketosis. *Pol J Vet Sci*, 21, 149-56.
- Markusfeld O, 1987. Periparturient traits in seven high dairy herds. Incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. *J Dairy Sci*, 70, 158–66.
- Markusfeld, O, 1986. The association of displaced abomasum with various periparturient factors in dairy-cows—a retrospective study. *Prev Vet Med*, 4, 173–83.
- Massey CD, Wang C, Donovan GA, Beede DK, 1993. Hypocalcemia at parturition as a risk factor for left displacement of the abomasum in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, 203, 852–53.
- May C, Brosseron F, Chartowski P, Schumbrutzki C, Schoenebeck B, Marcus K, 2011. Instruments and methods in proteomics. *Methods Mol Biol*, 696, 3–26.
- McArt JA, Nydam DV, Overton MW, 2015. Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: a deterministic estimate of component and total cost per case. *J Dairy Sci*, 98, 2043–54.
- McNaughton AP, Murray RD, 2009. Structure and function of the bovine fetomaternal unit in relation to the causes of retained fetal membranes. *Vet Rec*, 165, 615–22.
- Meiboom S, Gill D, 1958. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instrum*, 29, 688–91.
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME, 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157, 1819–829.
- Mills KE, Weary DM, von Keyserlingk MAG, 2019. Identifying barriers to successful dairy cow transition management. *J Dairy Sci*, 19, 67-77.
- Nagaraja TG, Titgemeyer EC, 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J Dairy Sci*, 90, 17–38.
- NAHMS-USDA. National Animal Health Monitoring System: dairy cattle management practices in the United States. In: Agriculture UDo, ed. Available at: https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/monitoring-and-surveillance/nahms/nahms_dairy_studies2007. Accessed on May 22, 2017.

- Neuhauser M, 2011. Wilcoxon–Mann–Whitney Test. in *International Encyclopedia of Statistical Science*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1656– 658.
- Nicolazzi EL, Biffani S, Biscarini F, Orozco Ter Wengel P, Caprera A, Nazzicari N, Stella A, 2015. Software solutions for the livestock genomics SNP array revolution. *Anim Genet*, 46, 343–53.
- Nocek JE, English JE, Braund DG, 1983. Effects of various forage feeding programs during dry period on body condition and subsequent lactation health, production, and reproduction. *J Dairy Sci*, 66, 1108–118.
- Oetzel GR, 1996. Effect of calcium chloride gel treatment in dairy cows on incidence of periparturient diseases. *J Am Vet Med Assoc*, 209, 958–61.
- Oetzel GR, 2007. Herd-level ketosis–diagnosis and risk factors. *Bovine Practitioners*. 40th Annual Conference. Vancouver, BC, Canada. *Am Assoc Dairy Sci*, 96, 2925–938.
- Ogunade I, Pech-Cervantes A, Schweickart H, 2019. Metatranscriptomic analysis of sub-acute ruminal acidosis in beef cattle. *Animals*, 9, 232, 1-12.
- Ohtsuka H, Ohki K, Motoshi T, 1997. Evaluation of blood acid–base balance after experimental administration of endotoxin in adult cow. *Jap Vet Med Sci*, 59, 483–85.
- Ok M, Arıcan M, Turgut K, 2002. Ultrasonographic findings in cows with left and right displacement of abomasum. *Revue Med Vet*, 153, 1, 15-8.
- Pehrson BG, Shaver RD, 1992. Displaced abomasum: clinical data and effects of periparturient feeding and management on incidence. In: XVII World Buiatrics Congress. Proceedings of the XXV American Association of Bovine Practitioners Conference, St. Paul, MN, USA 5, 116–21.
- Pero RW, 2010. Health consequences of catabolic synthesis of hippuric acid in humans. *Curr Clin Pharmacol*, 5, 67-73.
- Piras C, Morittu VM, Spina AA, Soggiu A, Greco V, Rame C, Briant E, Mellouk N, Tilocca B, Bonizzi L, Roncada P, Dupont J, 2019. Unraveling the adipose tissue proteome of transition cows through severe negative energy balance. *Animals*, 21, 9, 12-32.
- Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet J*, 176, 21–31.
- Poddar S, Kesharwani D, Datta M, 2017. Interplay between the miRNome and the epigenetic machinery: implications in health and disease. *J Cell Physiol*, 232, 2938-945.
- Puppel K, Kuczynska B, 2016. Metabolic profiles of cow's blood; a review. *J Sci Food Agric*, 96, 4321-328.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC, 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81, 559–75.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW, 2000. *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, ninth ed. W.B. Saunders. 3, 1840–877.
- Rivers J, Simpson DM, Robertson DH, Gaskell SJ, Beynon RJ, 2007. Absolute multiplexed quantitative analysis of protein expression during muscle development using QconCAT. *Mol Cell Proteomics*, 6, 1416–427.

- Romao JM, Jin W, Dodson MV, Hausman GJ, Moore SS, Guan LL, 2011. MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. *Exp Biol Med*, 236, 997–1004.
- Sadri H, von Soosten D, Meyer U, Kluess J, DaËnicke S, Saremi B, 2017. Plasma amino acids and metabolic profiling of dairy cows in response to a bolus duodenal infusion of leucine. *PLOS One*, 12, 1-24.
- Sarashina T, Ichijo S, Takahashi J, Osame S, 1990. Origin of abomasum gas in the cows with displaced abomasum. *Jpn J Vet Sci*. 52, 371–78.
- Sasaki K, Yamagishi N, Kizaki K, Sasaki K, Devkota B, Hashizume K, 2014. Micro-array based gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in dairy cows with experimental hypocalcemia and milk fever. *J Dairy Sci*, 97, 247-58.
- Sato H, 2009. Increased blood concentration of isopropanol in ketotic dairy cows and isopropanol production from acetone in the rumen. *Anim Sci J*. 80, 381–86.
- Sauerwein H, Bendixen E, Restelli L, Ceciliani F, 2014. The adipose tissue in farm animals: a proteomic approach. *Curr Protein Pept Sci*, 15,146–55.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO, 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467–70.
- Schlegel G, Keller J, Hirche F, Geißler S, Schwarz FJ, Ringseis R, 2012. Expression of genes involved in hepatic carnitine synthesis and uptake in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *BMC Vet Res*, 8, 28, 26-32.
- Seifi HA, Leblanc SJ, Leslie KE, Duffield TF, 2011. Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet J*, 188, 216-20.
- Sen I, Ok M, Coskun A, 2006. The level of serum ionised calcium, aspartate aminotransferase, insulin, glucose, betahydroxybutyrate concentrations and blood gas parameters in cows with left displacement of abomasums. *Pol J Vet Sci*, 9, 227-32.
- Sen I, Wittek T, Guzelbektas H, 2015. Metabolic indicators and risk factors of the left displaced abomasum in dairy cattle. *Eurasian J Vet Sci*, 31, 2, 63-9.
- Serkova N, Fuller TF, Klawitter J, Freise CE, Niemann CU, 2005. H-NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants. *Kidney Int*, 67, 1142–151.
- Sevinc M, Basoglu A, 2011. Etiopathogenesis of Ketosis and Fatty Liver and Relationships with Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 2, 2, 123-30.
- Sevinc M, Ok M, Basoglu A, 2002. Liver function in dairy cows with abomasal displacement. *Revue Méd Vét*, 153, 477-80.
- Shahzad K, Lopreiato V, Liang Y, Trevisi E, Osorio JS, Xu C, Lood J, 2019. Hepatic metabolomics and transcriptomics to study susceptibility to ketosis in response to prepartal nutritional management. *J Anim Sci Biotechno*, 10, 96-115.
- Shaver RD, 1997. Nutritional risk factors in the etiology of left displaced abomasum in dairy cows: a review. *J Dairy Sci*, 80, 2449–453.
- Shibano K, Kawamura S, Hakamada R, Kawamura Y, 2005. The relationship between changes in serum glycine and alanine concentrations in non-essential amino acid and milk production in the transition period in dairy cows. *J Vet Med Sci*, 67, 191-93.

- Sickinger M, Leiser R, Failing K, Doll K, 2008. Evaluation of differences between breeds for substance p, vasoactive intestinal polypeptide, neurofilament 200 in the abomasal wall of cattle. *Am J Vet Res*, 69, 1247-253.
- Sickinger M, 2017. Abomasal displacement in cattle-short overview of recent research results. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 45, 187-90.
- Stanley CA, Hale DE, Berry GT, DeLeeuw SJ, Bonnefont JP, 1992. A deficiency of carnitine-acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane. *N Engl J Med*, 327, 19-23.
- Stengarde L, Holtenius K, Traven M, Hultgren J, Niskanen R, Emanuelson U, 2010. Blood profiles in dairy cows with displaced abomasum. *J Dairy Sci*, 93, 4691-699.
- Sun HZ, Wang B, Wang JK, Liu HY, Liu JX, 2016. Biomarker and pathway analyses of urine metabolomics in dairy cows when corn Stover replaces alfalfa hay. *J Anim Sci Biotechnol*, 7, 49, 107-17.
- Sun LW, Zhang HY, Wu L, Shu S, Xia C, Xu C, 2014. (1)H-Nuclear magnetic resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with clinical and subclinical ketosis. *J Dairy Sci*, 97, 1552-562.
- Sun Y, Xu C, Li C, Xia C, Xu C, Wu L, Zhang H, 2014. Characterization of the serum metabolic profile of dairy cows with milk fever using ¹H-NMR spectroscopy. *Vet Q*, 34, 3, 159-63.
- Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W, 2013. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *J Dairy Sci*, 96, 2925-938.
- Svendsen P, 1969. Etiology and pathogenesis of abomasal displacement in cattle. *Nord Vet Med*, 21, 1-60.
- Swanson KM, Stelwagen K, Dobson J, Henderson HV, Davis SR, Farr VC, 2009. Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis*-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. *J Dairy Sci*, 92, 117-29.
- Taguchi K, Satoh T, Hirota K, 1992. Relationship between half-time for sulfobromophthalein clearance and postsurgical prognosis in cows with abomasal displacement. *J Vet Med Sci*, 54, 425-28.
- Takis PG, Ghini V, Tenori L, Turano P, Luchinat C, 2018. Uniqueness of the NMR approach to metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry*, 10, 36, 365-79.
- Trygg J, Wold S, 2002. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J Chemom*, 16, 119-28.
- Vailati-Riboni M, Palombo V, Loor J, 2017. What are omic sciences? Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach. Springer, Basel, Switzerland, 1-7.
- Van Widen SC, Kuiper R, 2003. Left displacement of the abomasum in dairy cattle: Recent developments in epidemiological and ethiological aspects. *Vet Res*, 34, 47-56.
- Veenstra T, 2012. Metabolomics: the final frontier? *Genome Medicine*, 4, 40, 274-85.

- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD, 2009. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*, 55, 641–58.
- Wang PX, Shu S, Xia C, Wang Z, Wu L, Wang B, C.C. Xu, Liu J, 2016. Protein expression in dairy cows with and without subclinical hypocalcaemia. *NZ Vet J*, 64, 101–06.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I, 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16, 1090–094.
- Willeberg P, Grymer J, Hesselholt M, 1982. Left displacement of the abomasum—relationship to age and medical history. *Nord Veterinaermed*, 34, 404–11.
- Wisnieski L, Norby B, Pierce SJ, Becker T, Sordillo LM, 2019. Prospects for predictive modelling of transition cow disease. *Anim Health Res Rev*, 20, 19-30.
- Wold S, 1998. PLS in chemistry in *Encyclopedia of computational chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, 3, 2006-021.
- Wu X, Sun H, Xue M, Wang D, Guan LL, Liu J, 2018. Serum metabolome profiling revealed potential biomarkers for milk protein yield in dairy cows. *J Proteomics*, 184, 54-61.
- Xu C, Sun LW, Xia C, Zhang HY, Zheng JS, Wang JS, 2016. 1H-Nuclear magnetic resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with fatty liver. *Asian-Australas J Anim Sci*, 29, 219-29.
- Zadoks R, Fitzpatrick J, 2009. Changing trends in mastitis. *Irish Vet J*, 62, 59–70.
- Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH, 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16, 4, 357-72.
- Zamet CN, Colenbrander VF, Erb RE, Callahan CJ, Chew BP, Moeller NJ, 1979. Variables associated with peripartum traits in dairy cows. II. Interrelationships among disorders and their effects on intake of feed and on reproductive efficiency. *Theriogenol* 11, 245–60.
- Zerbin I, Lehner S, Distl O, 2015. Genetics of bovine abomasal displacement. *Vet J*, 204, 17-22.
- Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X, 2012. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, 137, 293–300.
- Zhang G, Hailemariam D, Dervishi E, Deng Q, Goldansaz SA, Dunn SA, Ametaj BN, 2015. Alterations of innate immunity reactants in transition dairy cows before clinical signs of lameness. *Animals*, 5, 717–47.
- Zhang Y, Kuang Y, Xu K, Harris D, Lee Z, LaManna J, Puchowicz MA, 2013. Ketosis proportionately spares glucose utilization in brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 33, 8, 1307-311.

7. EKLER

EK A: Etik Kurul Onayı



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI

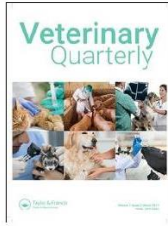


Toplantı Tarihi	26.07.2017	Toplantı Sayısı	2017/08	Karar Sayısı	2017/68
<p>S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Abdullah BAŞOĞLU tarafından sunulan "Abomazum deplasmanlı sütçü sığırlarda NMR bazlı serum idrar ve karaciğer metabolom profili" başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.</p> <p>Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deneysel Hayvanlar Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "Uygun olduğuna" oy birliği ile karar verilmiştir.</p>					
 Prof. Dr. Oya BULUT Başkan			 Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı		
 Prof. Dr. İbrahim AYDIN Üye			 Doç. Dr. Ayşe ER Raportör Üye		
Doç. Dr. Özlem DERİNBAŞ EKİCİ Üye (Katılmadı)		Gökhan KILIÇ Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi (Katılmadı)		Gökhan GÜLER Sivil Üye (Katılmadı)	

Nurcan KURŞUN
Personel İşleri

ASLI GİBİ

EK B: Tezden üretilmiş yayım



Veterinary Quarterly



ISSN: 0165-2176 (Print) 1875-5941 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/tveq20>

Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolome profile evaluation in dairy cows with and without displaced abomasum

Abdullah Basoglu, Nuri Baspinar, Leonardo Tenori, Cristina Licari & Erdem Gulersoy

To cite this article: Abdullah Basoglu, Nuri Baspinar, Leonardo Tenori, Cristina Licari & Erdem Gulersoy (2020) Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolome profile evaluation in dairy cows with and without displaced abomasum, *Veterinary Quarterly*, 40:1, 1-15, DOI: [10.1080/01652176.2019.1707907](https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1707907)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1707907>



© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



[View supplementary material](#)



Accepted author version posted online: 20 Dec 2019.
Published online: 07 Jan 2020.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 140



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tveq20>

Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolome profile evaluation in dairy cows with and without displaced abomasum

Abdullah Basoglu^a, Nuri Baspinar^b, Leonardo Tenori^c, Cristina Licari^d and Erdem Gulersoy^a

^aDepartment of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Selcuklu, Konya, Turkey; ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Selcuklu, Konya, Turkey; ^cInteruniversity Consortium for Magnetic Resonance of Metalloproteins (C.I.R.M.M.P.), Sesto Fiorentino (Florence), Italy; ^dMagnetic Resonance Center (CERM), University of Florence, Sesto Fiorentino (FI), Italy

ABSTRACT

Background: Displaced abomasum (DA) is a condition of dairy cows that severely impacts animal welfare and causes huge economic losses.

Objective: To assess the metabolic status of the disease using metabolomics in serum, urine and liver samples aimed at both water soluble and lipid soluble fractions.

Methods: Fifty Holstein multiparous cows with DA (42 left, 8 right) and 20 clinically healthy Holstein multiparous cows were used. Left DA was associated with concomitant ketosis in 19 animals and right in two. NMR-based metabolomics approach and hematological and biochemical analyses were performed. Statistical analysis was carried out on ¹H-NMR data after they have been normalized using PQN method.

Results: Contrary to generated PCA score plots the OPLS-supervised method revealed differences between healthy animals and diseased ones based on serum water-soluble samples. While water and lipid soluble metabolites decreased in serum samples, fatty acid fractions and cholesterol were increased in liver samples in DA affected cows. The metabolomic and chemical profiles clearly revealed that cows with DA (especially with LDA) were at risk of ketosis and fatty liver. Serum hippuric acid concentration was significantly higher in healthy cows in comparison with LDA, whereas serum glycine concentration was reported higher for healthy when compared to RDA affected animals.

Conclusion: A biochemical network and pathway mapping revealed 'valine, leucine and isoleucine biosynthesis' and 'phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis' as the most probable altered metabolic pathway in DA condition. Serum was advocated as the optimal biological matrix for the ¹H-NMR analysis.

ARTICLE HISTORY

Received 8 July 2019
Accepted 18 December 2019

KEYWORDS



Cattle; cow; metabolomics;
NMR; displaced abomasum

1. Introduction


Following parturition, up to 35–50% of high producing dairy cows are affected by metabolic and infectious diseases. Displaced abomasum is a multifactorial disorder usually diagnosed in early lactation dairy cows, and is a common inherited condition in Holstein cows (Zerbin et al. 2015; Doll 2015; Caixeta et al. 2018). The incidence of DA in the United States dairy herds was determined to be approximately 3.5% (NAHMS-USDA 2017). Economic analyses have determined that the average cost per DA diagnosis is more than \$700 when accounting for direct and indirect costs (McArt et al. 2015).

Understanding DA in cattle has been the objective of numerous in vitro and in vivo studies. However, a complete elucidation of its pathogenesis has still to be achieved (Sickingler 2017). Proteomics

and metabolomics have emerged as valuable techniques to characterize proteins and metabolite assets from tissue and biological fluids, such as milk, blood, and urine (Takis et al. 2018). There is a multitude of studies about the metabolic backgrounds of such so-called production diseases like ketosis, fatty liver, or hypocalcemia, although the investigations aiming to assess the complexity of the pathophysiological reactions are largely focused on gene expression, that is, transcriptomics. For extending the knowledge toward the proteome and the metabolome, the respective technologies are of increasing importance (Vignoli et al. 2019) and can provide an overall view of how dairy cows react to metabolic stress, which is needed for an in-depth understanding of the molecular mechanisms of the related diseases (Ceciliani et al. 2018). Displaced abomasum occurs

CONTACT Abdullah Basoglu  abbasoglu@selcuk.edu.tr  Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Selcuklu, Konya, Turkey.

This article has been produced from E. Gulersoy's doctorate thesis.

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1707907>.

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Characterizations of the Holstein cows (\pm SD).

Parameters	Cow groups		
	Healthy	LDA	RDA
Postpartum days	13 \pm 5	14 \pm 6	15 \pm 6
Age (yr)	3 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1
Parity	2 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1
Milk yield (kg/d)	24.82 \pm 7.55	24.07 \pm 7.38	23.00 \pm 1.68
Milk fat %	3.55 \pm 1	3.65 \pm 1	3.45 \pm 1
Milk protein %	3.06 \pm 1	3.0 \pm 1	3.05 \pm 1

simultaneously with fatty liver, but the relationship between the diseases are not clear (Ingvarlsen 2006).

The aim of this study was to reveal new potential biomarkers representing the metabolic status of DA by using NMR-based metabolome profile evaluation and providing possible clues into the pathogenic mechanisms for DA.

2. Materials and methods

The experimental design was approved by the Committee on Use of Animals in Research of the Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine (Protocol No. 68/2017).

2.1. Animals

Fifty with displaced abomasum (42 LDA and 8 RDA), and 20 healthy Holstein multiparous cows within 1 month of parturition were used as animal material (Table 1). Dietary composition and nutrient level daily for the diseased animals were as follows: corn silage 12 kg, sugar beet pulp 10 kg, wheat straw 4.5 kg and concentrate 8.5 kg. The concentrate was consisted of 35% barley, 19.85% wheat, 15% wheat bran, 25% cotton seed meal, 3% limestone, 0.3% salt, and 0.35% vitamin–mineral mixture. It will be contained 21.5% crude protein and 2,850 kcal/kg metabolizable energy.

Displacement diagnosis was based on the history, the presence of the characteristic ping on simultaneous auscultation and percussion and exclusion of other causes of left- or right-sided pings. Ultrasonography was performed in confirming a diagnosis of LDA and RDA. Among cows with LDA, 19 were associated with concomitant ketosis. Two cows with RDA had concomitant ketosis too. Ketosis was detected by urine chemistry analyzer using urine test strips (Bayer Clinitek 50, Leverkusen, Germany) and blood ketone meter using blood ketone test strips Abbott Optium Xceed Pro, Oxford, UK). A Liptak test-needle was placed in the viscus to remove fluid, and pH was measured when needed (Guard 1990). All diagnoses were confirmed during a surgical operation. Control animals were also multiparous within 1 month of lactation and chosen via the same clinical and hematological methods.

2.2. Blood, urine and liver sampling

Blood samples were collected from the coccygeal vein into heparin and K-EDTA coated tubes. Blood samples were immediately used for hematological measurements. Serum samples harvested within an hour by centrifugation for 15 min at 3000rpm were stored at -80°C until analysis. Urine samples were obtained via a sterile, rigid metal catheter (approximately 0.5 cm in diameter and 40 cm long). Liver biopsies were collected on the right side, proximal within the 11th or 12th intercostal space using a Tru-cut biopsy trocar (Merit Medical, Maastricht, The Netherlands).

Serum, urine, and liver samples were thawed on ice and extracted using a dual methanol-chloroform extraction (for protein precipitation and separation of hydrophilic and lipophilic fractions) as previously described (Serkova et al. 2005). This eliminates macromolecules (e.g., proteins) and establishes a fused metabolic profile for water-soluble and lipid-soluble metabolites. Briefly, 0.5 ml of ice-cold serum or urine (0.5 mg of the liver) was mixed with 0.5 ml of chloroform: methanol (1:1 vol/vol) (0.1 ml of chloroform:0.2 ml of methanol and 0.04 ml of distilled water for liver) and centrifuged. The supernatant (organic phase) was collected, and the pellet was resuspended with 0.5 ml of chloroform/methanol (0.2 ml of chloroform/methanol for liver) and centrifuged. The supernatants were combined, and 0.5 ml of ice-cold water (0.1 ml of ice-cold water for liver) was added to 'wash out' remaining water-soluble metabolites from the organic phase. After 15 min at -20°C , the upper (aqueous) phase was removed and added to the remaining pellet (to wash out remaining water-soluble metabolites from the pellet), 1 ml of water was added, and the sample was centrifuged and lyophilized by evaporation at 42°C .

2.3. Hematological analysis

Hematological analyses including complete blood count (erythrocytes and leukocytes counts, MCV, MCHC, PCV, and Hb) were performed by automated cell counter (MS4e, Melet Schloesing Laboratories, Osny, France) and blood gas analysis (pH, pCO_2 , pO_2 , HCO_3 and BE) by blood gas analyzer (Gem Premier 3000, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA 01730, USA).

2.4. Chemical analysis

Serum was harvested within 1 h by centrifugation for 15 min at 3000 rpm, and stored at -80°C until analysis. It was analyzed for glucose, lactate, cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, total bilirubin, BUN, creatinine, some minerals (Na, Mg, P, K, Ca and ionized Ca); some enzyme activities (AST, GGT, LDH,

and CPK), NEFA, and CRP by spectrometry (Autoanalyzer/BT3000 Plus, Rome, Italy). Blood BHBA levels were measured from whole blood by using Freestyle Optium H B-ketone, Abbott [®] test strips (Allschwil, Switzerland).

2.5. Samples preparation for ¹H-NMR spectroscopy

Dried water-soluble samples were dissolved in 700 μ L of ²H₂O (99.9 atom % D, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and homogenized by vortexing for 1 min. Then, they were centrifuged (3000 rpm at 4 °C for 15 min) and 630 μ L of each supernatant was added to 70 μ L of potassium phosphate buffer (1.5 M K₂HPO₄, 100% (v/v) ²H₂O, 2 mM NaN₃, 5.8 mM deuterated trimethylsilyl propanoic acid (TMSP); pH 7.4). After stirring, a total of 600 μ L from each mixture was transferred into 5 mm NMR tubes (Bruker BioSpin s.r.l) for the analysis.

The dried lipid extracts were dissolved in 700 μ L of CDCl₃ (99.8 atom % D, Sigma Aldrich) and homogenized by vortexing for 1 min. An aliquot of 600 μ L from each sample was transferred into 5 mm NMR tubes (Bruker BioSpin s.r.l) for the analysis.

2.6. NMR analysis

For each sample one-dimensional ¹H-NMR spectra were acquired using a Bruker 600 MHz spectrometer (Bruker BioSpin s.r.l; Rheinstetten, Germany) operating at 600.13 MHz proton Larmor frequency and equipped with a 5 mm PATXI ¹H-¹³C-¹⁵N and ²H-decoupling probe including α -z axis gradient coil, an automatic tuning and matching (ATM), and an automatic and refrigerated sample changer (SampleJet, Bruker BioSpin s.r.l; Darmstadt, Germany). For temperature stabilization, a BTO 2000 thermocouple was used at the level of approximately 0.1 K at the sample. Before starting the measurement, samples were kept for at least 5 minutes inside the NMR probe head to equilibrate temperature, at 300 K for urine water soluble samples and at 310 K for all the other extracts.

For each water and lipid-soluble sample, a one-dimensional ¹H NMR spectrum was acquired using a standard Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy pulse sequence (NOESY 1Dpresat; noesygppr1d.com; Bruker BioSpin) using 98,304 data points, a spectral width of 18,028 Hz, an acquisition time of 2.7 s, a relaxation delay of 4 s, a mixing time of 0.01 s and a different number of scans according to the type of extract (128 scans for both serum water/lipid soluble and liver-lipid soluble samples; 256 scans for liver water-soluble extracts; 64 scans for both urine water and lipid soluble samples).

In addition, for serum water-soluble extracts, another ¹H-NMR spectrum was acquired using a standard spin echo Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse sequence (CPMG) (Meiboom and Gill 1958) (cpmgpr1d.comp; Bruker BioSpin) with 128 scans, 73,728 data points, a spectral width of 12,019 Hz an acquisition time of 3.1 s, a relaxation delays of 4 s and a total spin-echo delay of 80 ms.

2.7. Spectral processing

Before applying Fourier transform, free induction decays were multiplied by an exponential function equivalent to 0.3 Hz line-broadening factor. Transformed spectra were automatically corrected for phase and baseline distortions and through TopSpin 3.2 (Bruker BioSpin software), they were calibrated using the anomeric glucose doublet at 5.24 ppm for serum water-soluble extracts, the TMSP singlet at 0.00 ppm for hydrophilic extracts of liver and urine and the chloroform singlet at 7.20 ppm for lipid soluble samples.

Using the bucketing procedure each 1D spectrum, in the range of 0.2 and 10.0 ppm, was segmented into 0.02 ppm chemical shift bins and the corresponding spectral areas were integrated using AMIX software (version 3.8.4, Bruker BioSpin). Through this technique, the number of total variables is reduced and small shifts in the signals are compensated, making the analysis more robust and reproducible (Holmes et al. 1994).

For water-soluble extracts, regions between 4.60 and 4.85 ppm containing residual H₂O signal were removed, instead, regions between 6.90 and 7.55 ppm containing chloroform signal were excluded from spectra of lipid-soluble extracts.

On the remaining bins, probabilistic quotient normalization (PQN; Dieterle et al. 2006) was applied prior to pattern recognition.

Of note, systemic biofluids, that is, urine and serum, are able to reflect the global response of an organism to a disease status contrary to tissue samples. They require a simple and minimally invasive collection (Vignoli et al. 2019). Therefore, both urine and serum represent optimal biological matrices for the ¹H-NMR analysis. However it should be realized that urine metabolites are more influenced by factors like age, diet, gut microbiota and/or other pathophysiological stimuli. Thus, urine ¹H-NMR spectra are often more variable and contain crowded regions with a lot of signal overlaps and shifts, while serum samples, being more simple to be analyzed, could actually find a practical veterinary use.

Table 2. Hematological analysis (\pm SD).

Parameters	Cow groups		
	Healthy	LDA	RDA
Leukocytes ($\times 10^9/L$)	13.71 \pm 4.81	16.70 \pm 11.05	11.52 \pm 3.21
Erythrocytes ($\times 10^{12}/L$)	7.35 \pm 1.40 ^b	8.36 \pm 1.22 ^{ab}	8.79 \pm 1.29 ^a
MCV	47.41 \pm 5.73	48.15 \pm 4.74	46.48 \pm 6.04
MCHC ($\times 10$ g/L)	34.62 \pm 2.77 ^a	31.64 \pm 2.47 ^b	30.73 \pm 1.96 ^b
Hematocrit ($\times 10^{-2}$ L/L)	34.15 \pm 4.51 ^b	40.11 \pm 6.61 ^a	41.05 \pm 8.51 ^a
Hemoglobin ($\times 10$ g/L)	11.77 \pm 1.28	12.75 \pm 1.95	12.53 \pm 2.22
Blood pH	7.44 \pm 0.03 ^{ab}	7.42 \pm 0.07 ^b	7.49 \pm 0.06 ^a
pO ₂ (mmHg)	35.72 \pm 6.89	31.80 \pm 5.05	31.87 \pm 2.98
pCO ₂ (mmHg)	36.70 \pm 5.80 ^b	38.67 \pm 5.68 ^b	44.43 \pm 3.92 ^a
Bicarbonate (μ mol/L)	25.30 \pm 2.14 ^b	24.88 \pm 5.21 ^b	33.47 \pm 7.16 ^a
Base excess (μ mol/L)	1.17 \pm 2.41 ^b	1.10 \pm 6.13 ^b	10.18 \pm 7.00 ^a

^{a, b, ab}Means within a row with different superscripts differ ($p < 0.05$). MCV = Mean corpuscular volume, MCHC = Mean corpuscular hemoglobin concentration.

2.8. Statistical analysis

Statistical significance was determined with one way ANOVA test for all the hematological and biochemical variables.

All metabolomic analysis was performed using R, an open source software for statistical analysis of data (Ihaka and Gentleman 1996). Multivariate analysis was applied on processed data and Principal Component Analysis (PCA) was used as a first exploratory approach. Orthogonal projections to latent structures (OPLS) analysis was applied as a supervised technique. In general, OPLS is a multivariate projection method which is normally used for modeling spectroscopic data. This algorithm is a modification of the PLS method (Wold 1998) and it is based on the idea to separate "response linearly related" and "response unrelated (orthogonal)" in data, providing a simpler method for interpreting them (Trygg and Wold 2002).

Accuracies and confusion matrices for different classifications were assessed by means of 100 cycles of Monte Carlo cross-validation scheme (MCCV, R script in-house developed). For this method, at each iteration, 90% of data are randomly chosen as a training set to build the model. The remaining 10% of data was tested and the accuracy for the classification was established. This procedure is repeated 100 times to derive an average discrimination accuracy for each group of subjects.

Univariate statistical analysis was carried on ¹H-NMR data after they have been normalized using PQN method. In particular, spectral regions related to the different metabolites were assigned by using AMIX 3.8.4 (a Bruker BioSpin software) and published literature data. The same regions were integrated to get concentration values of metabolites in arbitrary units. Resulting values were used to determine discriminating metabolites among the groups of cows. Wilcoxon signed-rank test (Neuhäuser 2011) was applied to deduce metabolite differences among groups on the biological assumption that metabolite

concentrations are not normally distributed. False discovery rate correction was used applying the Benjamini-Hochberg method (FDR) (Benjamini and Hochberg 1995) and the adjusted p value < 0.05 was considered statistically significant.

Biochemical network mapping and related pathway analysis were also performed for serum metabolites (see the Supplementary Material file for details).

3. Results

3.1. Blood and chemistry profile

The main differences in biochemical parameters of LDA group included increased NEFA ($p < 0.001$), BHBA ($p < 0.001$) and triglyceride ($p < 0.001$) as compared to controls. There were significant increases in lactate, BE and CRP in RDA levels, and decreased K in RDA affected animals group. In spite of significant changes in other biochemical, and hematological parameters, they were within normal reference ranges (Tables 2 and 3).

3.2. NMR-Based metabolomic evaluation

NMR spectra of serum, liver and urine samples were acquired. Two samples for serum water-soluble extracts; five for serum lipid extracts; six for liver lipid soluble samples and five for urine lipid soluble samples were removed from the statistical analysis because of the bad quality of the generated spectra.

Processed 1D spectra from all type of extracts including the three different groups of animals (healthy cows, cows with LDA and cows with RDA) have been analyzed firstly using PCA to have an overview of the main differences between healthy cows and those with the displacement of the abomasum. Figure 1a–g shows the PCA score plots on 1D NOESY of all types of extracts and on 1D CPMG of serum water soluble samples.

The resulting score plots are not sufficient to discriminate healthy animals from cows with abomasum displacement and no evident differences are reported for the discrimination between cows with left or right displacement.

To explore differences between healthy and diseased cows, the OPLS-supervised method was used. OPLS models were built on 1D NOESY spectra and on 1D CPMG spectra for serum water soluble samples (Figure 2a–g) and a different number of components were retained in the model depending on the type of samples. All models comparing healthy versus diseased animals, as shown by prediction accuracies of cross-validation analyses in Figure 2a–g, are able to discriminate each group of cows with high accuracies and in particular, healthy animals were discriminated

Table 3. Biochemical analyses (\pm SD).

Parameters	Cow groups		
	Healthy	LDA	RDA
Na (mmol/L)	146.90 \pm 5.41 ^a	139.76 \pm 5.30 ^b	139.75 \pm 5.20 ^b
Cl (mmol/L)	104.60 \pm 3.25 ^a	98.30 \pm 7.67 ^a	85.25 \pm 13.93 ^b
K (mmol/L)	4.24 \pm 0.38 ^a	3.43 \pm 0.64 ^b	2.92 \pm 0.73 ^b
P (mmol/L)	2.3256 \pm 0.42313 ^a	1.59239 \pm 0.54587 ^b	1.9057 \pm 0.9108 ^{ab}
Mg (mmol/L)	0.8877 \pm 0.17673 ^a	0.63705 \pm 0.17673 ^b	0.8918 \pm 0.3945 ^a
Ca (mmol/L)	3.2625 \pm 0.275 ^a	2.7375 \pm 0.33 ^b	2.63 \pm 0.395 ^b
GGT (U/L)	15.90 \pm 5.87 ^b	41.52 \pm 34.26 ^{ab}	70.75 \pm 63.33 ^b
CK (U/L)	326.10 \pm 212.07	487.64 \pm 498.11	395.37 \pm 279.31
AST (U/L)	134.40 \pm 45.56	191.38 \pm 120.86	175.62 \pm 137.23
ALP (U/L)	58.30 \pm 12.97	63.47 \pm 29.59	79.62 \pm 41.76
LDH (U/L)	2070.60 \pm 247.84	2005.59 \pm 571.85	2109.75 \pm 381.83
BUN (mmol)	2.96 \pm 0.6 ^b	3.64 \pm 2.19 ^b	7.81 \pm 5.85 ^a
Creatinine (μ mol/L)	96.36 \pm 13.26 ^b	101.66 \pm 33.59 ^b	143.21 \pm 79.56 ^a
Total bilirubin (μ mol/L)	37.28 \pm 18.1 ^a	12.9 \pm 6.8 ^b	12.9 \pm 7.0 ^b
Glucose (mmol/L)	2.93 \pm 0.54 ^b	4.59 \pm 2.84 ^b	7.06 \pm 3.12 ^a
Lactate (mmol/L)	1.49 \pm 1.01 ^b	2.80 \pm 2.39 ^{ab}	3.97 \pm 3.99 ^a
Cholesterol (mmol/L)	3.390 \pm 1.5 ^b	2.3 \pm 1.04	2.86 \pm 1.21
Triglyceride (mmol/L)	0.35 \pm 0.34 ^{ab}	0.63 \pm 0.51 ^a	0.24 \pm 0.16 ^b
Total protein (g/L)	0.08 \pm 0.01 ^a	0.07 \pm 0.01 ^b	0.07 \pm 0.01 ^b
Albumin (g/L)	0.036 \pm 0.00 ^a	0.0324 \pm 0.01 ^{ab}	0.03 \pm 0.00 ^b
NEFA (mmol/L)	0.28 \pm 0.36 ^b	1.26 \pm 0.60 ^a	1.09 \pm 0.56 ^a
BHBA (mmol/L)	0.82 \pm 0.50 ^b	1.94 \pm 1.35 ^a	0.97 \pm 0.77 ^{ab}
CRP (nmol/L)	5.52 \pm 4.57 ^a	10 \pm 5.81 ^{ab}	12.67 \pm 6.38 ^b

^a, ^b, ^{ab} Means within a row with different superscripts differ ($p < 0.05$).

NEFA = Non-esterified fatty acid, BHBA = β -hydroxybutyrate, CRP = C-reactive protein.

from the diseased ones with higher accuracies than 80% regardless of the type of sample under study. However, systemic biofluids, that is, urine and blood serum, are able to reflect the global response of an organism to a disease status with respect to tissues biopsies. They required a simple and minimally invasive collection (Vignoli et al. 2019). Therefore, both urine and blood serum represent optimal biological matrices for the ¹H-NMR analysis of the DA disease, however urine metabolites are more influenced by, for example, age, lifestyle, diet, the activity of gut microflora or another symbiotic organism and/or other pathophysiological stimuli. Thus, urine ¹H-NMR spectra are often more variable and contain crowded regions with a lot of signal overlaps and shifts, while serum blood samples, being more simple to be analyzed, could actually find a practical veterinary use.

¹H-NMR spectra were also analyzed to identify which metabolites are altered in the three groups of cows. The complete list of identified and quantified metabolites from both the lipophilic and the hydrophilic fractions from each type of sample is in Table 4; adjusted p values are reported only for metabolites that differ significantly (p value < 0.05) among the various comparisons performed. In particular, for each type of sample, healthy cows were compared to subjects with both LDA and RDA. To highlight metabolites that are significantly different between the two types of displacements, the comparison between cows with left and right abomasum dislocation was performed too.

From the analysis of serum samples, it appeared that healthy cows showed higher levels of hippuric acid, glycine, citrate, trimethylamine N-oxide,

tyrosine, propionate, 2-aminobutyric acid, acetate, isoleucine, and alanine both when they were compared to LDA and RDA. In particular, hippuric acid is very high in healthy in comparison with LDA, instead, a high level of glycine was reported for healthy when compared to RDA. Furthermore, healthy cows showed higher levels of lipids respect to the diseased animals.

Diseased cows (with left or right displacement) compared with healthy animals appeared to be richer in 2-hydroxybutyrate, inosine, and lactate. Furthermore, glycine and 2-aminobutyrate were significantly higher for LDA than for RDA cows. Serum and liver contained high concentrations of 2-hydroxybutyrate in diseased cows compared with those from healthy ones.

In addition, the liver of diseased cows showed higher levels of myoinositol. Instead, healthy animals appeared to have higher levels of glucose in their liver and glycerol phosphocholine appeared to be higher in LDA subjects when compared to RDA animals.

Interesting information arises also from the analysis of liver lipids. Indeed, it resulted in that signal of glycerol backbone protons $-(CH_2)-$ was very high in cows with LDA when compared to healthy, but not in the case of the comparison with RDA animals. Then, signals of fatty acids arising from $-(CH_2)_n$, $CH_3(CH_2)_n$ and $-CH_2-CO$ protons were higher in diseased both when we considered LDA and RDA groups related to healthy.

At the end, from urine samples, high levels of hippuric acid and trimethylamine N-oxide in healthy subjects were confirmed and high levels of dimethylamine, choline, and creatinine resulted in diseased

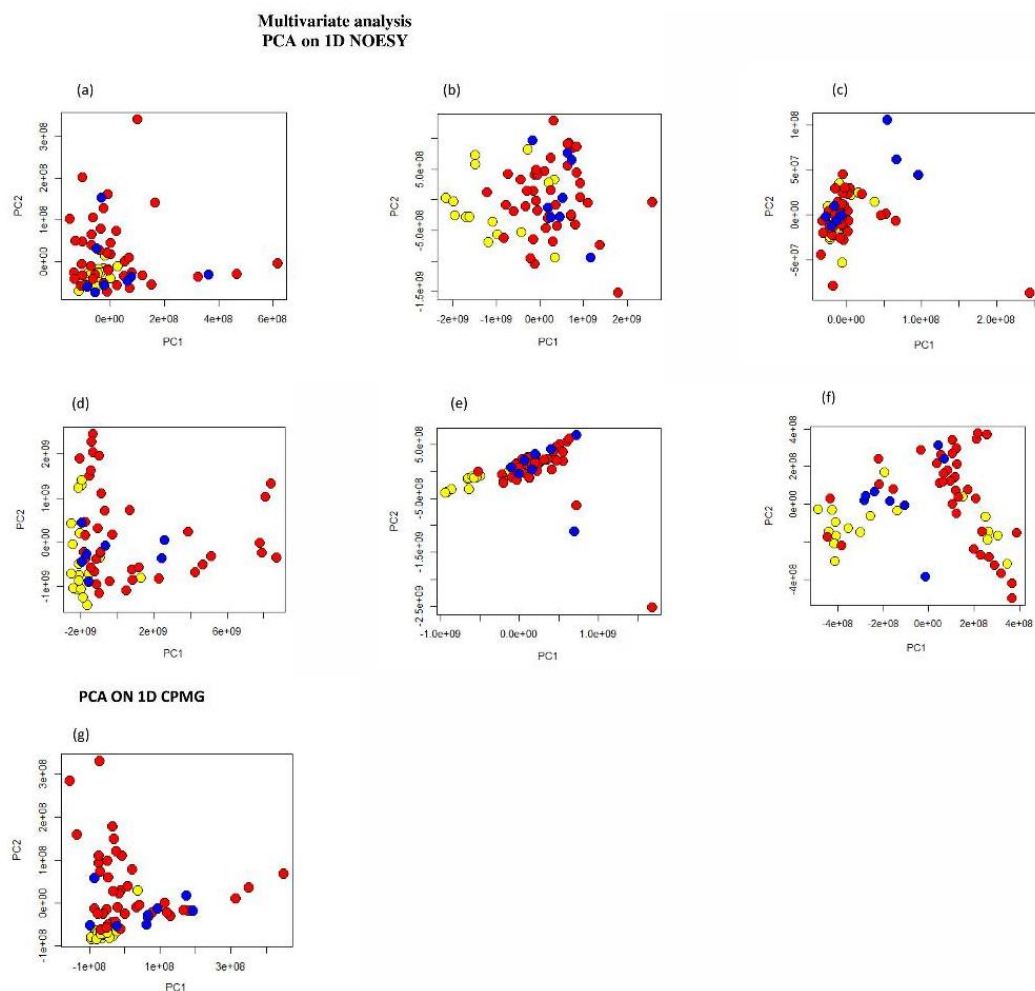


Figure 1. Principal component analysis (PCA) score plots. Each dot represents a single $^1\text{H-NMR}$ spectrum and each color represents a different group of cows: healthy (yellows dots), LDA (red dots) and RDA (blue dots). (a) PCA on 1D NOESY spectra of serum water soluble samples; (b) PCA on 1D NOESY spectra of serum lipid soluble samples; (c) PCA on 1D NOESY spectra of liver water soluble samples; (d) PCA on 1D NOESY spectra of liver lipid soluble samples; (e) PCA on 1D NOESY spectra of urine water soluble samples; (f) PCA on 1D NOESY spectra of urine lipid soluble samples; (g) PCA on 1D CPMG spectra of serum water soluble samples.

animals (both LDA and RDA). Furthermore, cows with LDA showed a very high level of 2-hydroxy-3-methyl valerate when compared to healthy animals; instead, cows with RDA have a very high level of dimethylamine.

The analysis of urine lipids is less straightforward because of the reduced number of lipids in urine, but among the eight lipophilic assigned fractions, it resulted that signals corresponding to glycerol backbone protons $-(\text{CH}_2)-$ were higher for diseased animals, as described for liver samples. Signals arising from $-(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ protons of fatty acids are higher in RDA group when compared to LDA subjects.

Summarizing the most significant findings obtained from the analysis of the three different matrices (serum, liver and urine samples), it is

obvious that hippuric acid, citrate, dimethyl sulfone, trimethylamine oxide, tyrosine, propionate and 2-aminobutyric acid concentrations were lower (adjusted p values <0.01) in serum in both LDA and RDA cows. In addition, liver glucose concentration was very low (adjusted p value <0.001) in both LDA and RDA cows as compared to controls. Finally, only urine trimethylamine oxide concentration was (adjusted p value <0.05) lower for both right and left abomasal displacements. Moreover, phosphoglycerides, phospholipids, unsaturated and polyunsaturated fatty acids and sphingomyelin were lower (adjusted p values <0.05) in diseased cows' serum only. Finally, the biochemical network and pathway mappings performed on serum metabolites highlighted the "valine, leucine and isoleucine

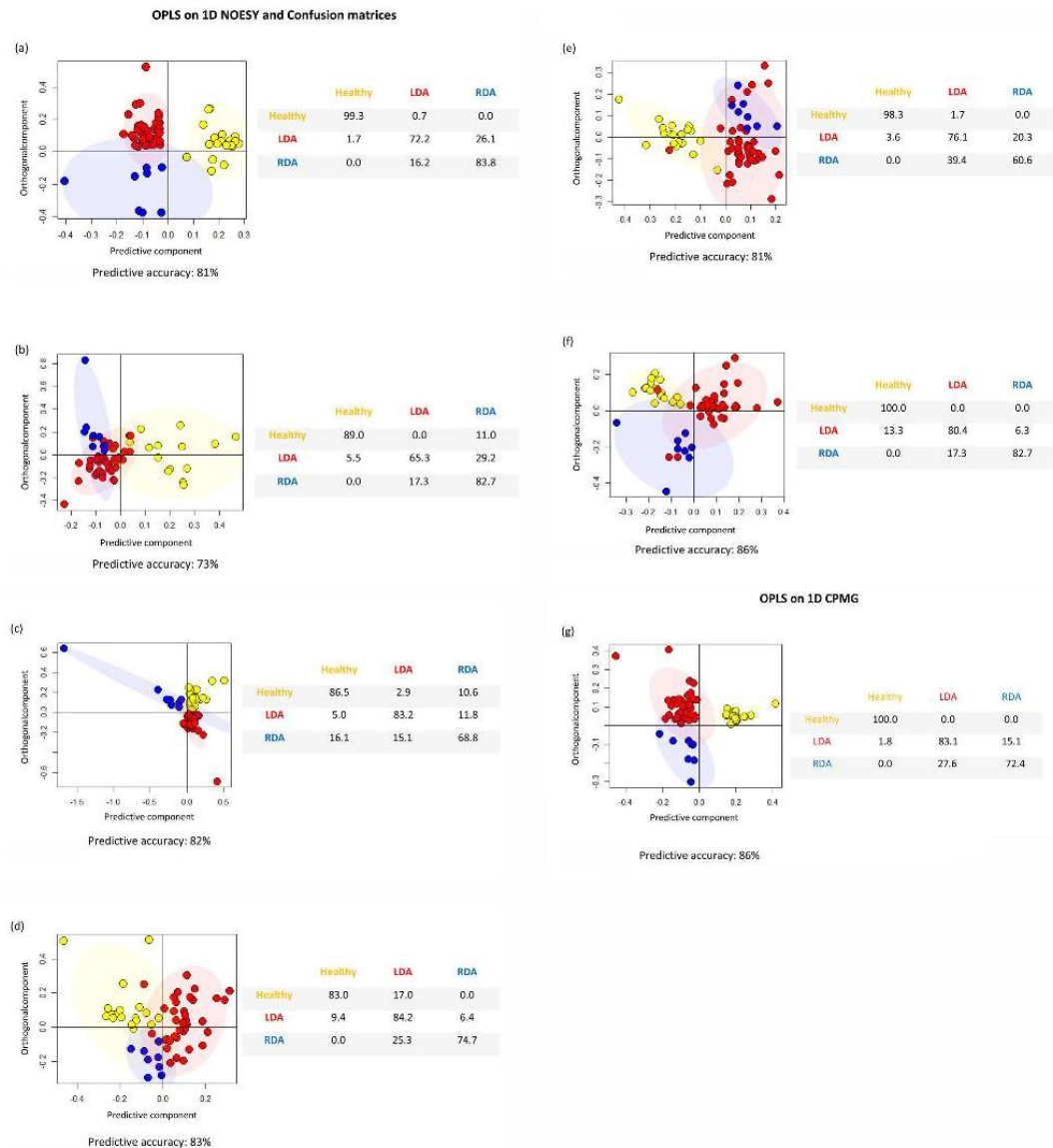


Figure 2. OPLS score plots of all type of extract. Each dot represents a single ¹H-NMR spectrum and each color represents a different group of cows: healthy (yellows dots), LDA (red dots) and RDA (blue dots). (a) OPLS on 1D NOESY spectra of serum water soluble samples; (b) OPLS on 1D NOESY spectra of serum lipid soluble samples; (c) OPLS on 1D NOESY spectra of liver water soluble samples; (d) OPLS on 1D NOESY spectra of liver lipid soluble samples; (e) OPLS on 1D NOESY spectra of urine water soluble samples; (f) OPLS on 1D NOESY spectra of urine lipid soluble samples; (g) OPLS on 1D CPMG spectra of serum water soluble samples. Confusion matrices and related predictive accuracy of cross-validation analysis are reported for each model.

biosynthesis” and the “phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis” as the most probable altered metabolic pathway in DA condition (see Supplementary Figures S1 and S2).

4. Discussion

Displaced abomasum was evaluated more comprehensively using serum, urine and liver metabolome of dairy cows in the present study.

The most commonly used indicators of energy status are NEFA and BHBA concentrations during both the dry and puerperal periods, as well as total protein and albumin during the puerperal period (Puppel and Kuczyńska 2016). A predictive association of elevated concentrations of BHBA with the risk of DA has been reinforced. Furthermore, low Ca and K concentrations, and high apo B100 concentration as well as, AST and GGT activities are related to the subsequent occurrence of DA (Sevinc et al. 2002;

Table 4. Concentrations in arbitrary units (median \pm Median Absolute Deviation (MAD)) of the metabolites assigned in serum, liver and urine samples (both hydrophilic and lipophilic fractions).

	Metabolites	Healthy (arbitrary units)	LDA (arbitrary units)	RDA (arbitrary units)	"adjusted" p value (<0.05)
Serum water soluble (SWS)	2-aminobutyrate	145.0 \pm 63.4	67.9 \pm 28.5	20.6 \pm 10.1	<0.05 (healthy versus LDA) <0.001 (healthy versus RDA) <0.001 (LDA versus RDA)
	2-hydroxybutyrate	3.2 \pm 3.2	201.2 \pm 155.3	311.4 \pm 165.4	<0.0000001 (healthy versus LDA) <0.001 (healthy versus RDA)
	3-hydroxybutyrate	4896.0 \pm 984.3	8454.3 \pm 5252.8	3221.2 \pm 810.1	<0.05 (healthy versus LDA)
	3-hydroxyisobutyrate	212.3 \pm 58.0	228.9 \pm 68.2	265.9 \pm 101.9	<0.05 (healthy versus LDA)
	Acetate	15866.6 \pm 2143.8	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	<0.00001 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	Alanine	1603.0 \pm 305.1	1082.9 \pm 337.3	800.8 \pm 230.0	<0.001 (healthy versus LDA) <0.0001 (healthy versus RDA)
	Benzoate	27.2 \pm 14.8	18.5 \pm 18.5	150.2 \pm 130.7	<0.05 (healthy versus LDA)
	Carnitine	681.9 \pm 97.0	1000.0 \pm 451.8	752.3 \pm 354.5	<0.0000001 (healthy versus LDA)
	Citrate	2814.4 \pm 242.9	698.6 \pm 333.4	907.5 \pm 188.2	<0.0001 (healthy versus RDA)
	Choline	456.2 \pm 86.6	531.9 \pm 146.7	393.5 \pm 110.8	<0.05 (healthy versus LDA)
	Creatine	2285.0 \pm 357.1	1788.7 \pm 385.9	1518.3 \pm 703.9	<0.05 (healthy versus LDA)
	Creatinine	943.9 \pm 139.0	819.1 \pm 172.9	1087.8 \pm 449.4	<0.00000001 (healthy versus LDA) <0.00001 (healthy versus RDA)
	Dimethyl sulfone	661.9 \pm 189.9	179.7 \pm 82.8	136.3 \pm 41.3	<0.05 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	formate	650.8 \pm 77.0	509.9 \pm 155.6	564.1 \pm 97.1	<0.05 (healthy versus LDA)
	Fructose	675.5 \pm 110.5	745.0 \pm 244.7	1466.1 \pm 378.3	<0.05 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	Glycine	2180.8 \pm 213.5	1270.3 \pm 460.7	184.8 \pm 184.8	<0.05 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA) <0.05 (LDA versus RDA)
	Glucose	1233.0 \pm 106.3	1105.7 \pm 256.1	1434.0 \pm 342.2	<0.001 (healthy versus LDA)
	Glutamine	19.3 \pm 7.8	40.1 \pm 13.7	15.7 \pm 13.2	<0.00000001 (healthy versus LDA) <0.00001 (healthy versus RDA)
	Hippurate	437.2 \pm 115.7	58.2 \pm 33.2	54.0 \pm 15.8	<0.001 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	inosine	6.13 \pm 6.13	25.1 \pm 18.8	38.3 \pm 10.1	<0.001 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	Isoleucine	675.8 \pm 106.4	352.1 \pm 118.2	150.2 \pm 50.3	<0.00001 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	lactate	2240.6 \pm 426.1	3023.0 \pm 1328.1	3024.6 \pm 900.6	<0.05 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	leucine	1169.5 \pm 195.8	816.5 \pm 318.1	481.4 \pm 136.5	<0.05 (healthy versus LDA)
	Lysine	559.9 \pm 44.9	545.9 \pm 58.3	468.9 \pm 38.1	<0.05 (healthy versus RDA) <0.05 (LDA versus RDA)
	Mannose	205.0 \pm 40.9	265.0 \pm 72.5	457.2 \pm 68.2	<0.001 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	Myoinositol	83.7 \pm 17.4	83.7 \pm 24.0	93.9 \pm 43.6	<0.001 (healthy versus LDA)
	Phenylalanine	486.9 \pm 60.0	342.7 \pm 79.3	297.2 \pm 98.2	<0.05 (healthy versus LDA)
	Proline	176.9 \pm 27.8	146.0 \pm 35.4	139.4 \pm 61.5	<0.00001 (healthy versus LDA)
	Propionate	60.3 \pm 16.0	27.6 \pm 13.0	24.7 \pm 8.6	<0.001 (healthy versus RDA)
	Succinate	791.9 \pm 142.8	570.7 \pm 170.8	558.5 \pm 194.9	<0.05 (healthy versus LDA)
	Threonine	57.1 \pm 10.1	47.0 \pm 13.0	31.5 \pm 10.4	

(continued)

Table 4. Continued.

	Metabolites	Healthy (arbitrary units)	LDA (arbitrary units)	RDA (arbitrary units)	"adjusted" p value (<0.05)
Serum lipid soluble (SLS)					<0.05 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	Trimethylamine N-oxide	4120.1 ± 1074.2	1263.6 ± 340.4	1535.7 ± 281.8	<0.000000001 (healthy versus LDA) <0.0001 (healthy versus RDA)
	Tyrosine	210.2 ± 39.3	79.7 ± 26.5	65.7 ± 12.4	<0.000000001 (healthy versus LDA) <0.0001 (healthy versus RDA)
	Unknow	806.8 ± 101.5	724.0 ± 210.9	755.7 ± 373.1	<0.05 (healthy versus LDA)
	Valine	1037.2 ± 222.9	798.0 ± 267.0	360.8 ± 116.9	<0.00001 (healthy versus LDA)
	Cholesterol C(18)H ₃	92228.9 ± 23815.5	47223.8 ± 13086.6	51198.9 ± 8451.9	<0.05 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	Cholesterol -C(20,22,23)H ₂ -	96059.4 ± 23169.5	48743.5 ± 13234.9	53844.7 ± 7671.8	<0.00001 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	Cholesteryl ester -C(3)H	18006.6 ± 4574.6	7914.7 ± 2524.0	9110.7 ± 1023.9	<0.000001 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	Free cholesterol C(3)-H	8083.6 ± 1364.7	5712.1 ± 2134.8	6336.3 ± 896.8	<0.05 (healthy versus LDA)
	Fatty acid -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-	17792.4 ± 3499.8	16022.5 ± 6185.2	14097.5 ± 7392.1	
	Fatty acid -(CH ₂) _n -	1615749.3 ± 254434.4	1233196.9 ± 171325.7	1173938.0 ± 83905.6	<0.0001 (healthy versus LDA) <0.001 (healthy versus RDA)
	Fatty acid -CH ₃	142111.4 ± 43363.0	80141.0 ± 18795.6	88449.1 ± 11524.3	<0.00001 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	Fatty acid -CH ₂ -CO	56704.1 ± 13705.7	28166.0 ± 5875.4	29411.3 ± 2962.7	<0.0000001 (healthy versus LDA) <0.001 (healthy versus RDA)
	Fatty acid =CH-CH ₂ -CH ₂	81686.8 ± 24564.3	34361.4 ± 11049.9	30264.7 ± 6366.5	<0.0000001 (healthy versus LDA) <0.001 (healthy versus RDA)
	Glycerol backbone -(CH ₂) ₂ -	2870.3 ± 665.6	1761.0 ± 404.6	1337.1 ± 235.6	<0.000001 (healthy versus LDA) <0.0001 (healthy versus RDA)
	Phosphoglycerides -CH-	13212.6 ± 2528.7	8006.1 ± 1844.0	5869.4 ± 1368.8	<0.000001 (healthy versus LDA) <0.0001 (healthy versus RDA)
	Phospholipids N(CH ₃) ₃	169112.5 ± 33440.1	107897.8 ± 23962.2	93096.8 ± 14665.1	<0.000001 (healthy versus LDA) <0.0001 (healthy versus RDA)
	Polyunsaturated fatty acids (18:2, bis allylic protons)	57311.7 ± 18174.2	25810.8 ± 7702.0	21921.8 ± 4081.7	<0.0000001 (healthy versus LDA) <0.001 (healthy versus RDA)
	Sphingomyelin -CH=CH-	2997.6 ± 513.0	2024.2 ± 522.9	2359.6 ± 358.0	<0.05 (healthy versus LDA)
	Unsaturated fatty acid -CH=CH-	185955.1 ± 52747.7	117222.1 ± 28036.2	109687.6 ± 20646.2	<0.00001 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
Liver water soluble (LWS)	Unknow lipid	719.2 ± 85.1	872.8 ± 171.5	709.8 ± 73.7	<0.05 (healthy versus LDA)
	2-aminobutyrate	84.6 ± 35.1	105.7 ± 55.1	84.3 ± 37.0	
	2-hydroxybutyrate	39.1 ± 13.4	57.1 ± 23.1	58.5 ± 10.7	<0.05 (healthy versus LDA) <0.05 (healthy versus RDA)
	3-hydroxybutyrate	649.8 ± 210.0	638.5 ± 431.6	321.4 ± 235.7	
	2-hydroxyvalerate acetate	192.8 ± 75.2 156.7 ± 54.5	113.2 ± 76.0 99.7 ± 38.6	206.4 ± 100.1 202.5 ± 52.1	<0.05 (healthy versus LDA) <0.05 (LDA versus RDA)

(continued)

Table 4. Continued.

	Metabolites	Healthy (arbitrary units)	LDA (arbitrary units)	RDA (arbitrary units)	"adjusted" p value (<0.05)	
Liver lipid soluble (LLS)	Alanine	1684.8 ± 317.7	1251.5 ± 335.9	901.6 ± 486.6		
	Aspartate	223.3 ± 45.0	137.5 ± 40.5	117.9 ± 66.5	<0.05 (healthy versus LDA)	
	Choline	5494.4 ± 1219.7	6712.6 ± 1175.0	6621.9 ± 2257.1		
	Creatine	613.5 ± 223.1	663.8 ± 331.4	1152.4 ± 298.8	<0.05 (healthy versus RDA)	
					<0.05 (LDA versus RDA)	
		Creatinine	429.1 ± 107.8	463.8 ± 182.7	401.9 ± 153.6	
		Formate	42.7 ± 17.4	51.0 ± 19.8	85.2 ± 64.0	
		Fumarate	51.7 ± 21.6	67.5 ± 18.4	47.6 ± 46.0	
		Glycerol	335.5 ± 78.1	678.9 ± 93.9	638.2 ± 201.4	<0.000000001 (healthy versus LDA)
					<0.05 (healthy versus RDA)	
		sn-Glycero-3-phosphocoline	6496.9 ± 1722.2	5391.4 ± 1085.4	3154.2 ± 1317.5	<0.05 (healthy versus LDA)
					<0.001 (LDA versus RDA)	
		Glycine	1180.1 ± 275.8	2091.9 ± 306.7	1759.6 ± 543.4	<0.0001 (healthy versus LDA)
		Glucose	316.3 ± 144.4	25.7 ± 25.7	3.1 ± 3.1	<0.0001 (healthy versus LDA)
					<0.001 (healthy versus RDA)	
		Glutamate	91.8 ± 26.9	116.5 ± 35.7	73.8 ± 59.5	
		Isoleucine	43.3 ± 19.9	31.6 ± 11.8	35.0 ± 7.5	
		Isopropanol	16.5 ± 6.4	19.2 ± 8.7	37.3 ± 10.6	<0.05 (healthy versus RDA)
					<0.05 (LDA versus RDA)	
		Lactate	977.6 ± 247.6	657.6 ± 120.0	837.5 ± 438.1	<0.05 (healthy versus LDA)
		Leucine	27.9 ± 27.9	44.0 ± 20.6	34.2 ± 15.3	
		Myoinositol	39.5 ± 16.9	91.2 ± 28.0	117.0 ± 35.0	<0.00001 (healthy versus LDA)
					<0.001 (healthy versus RDA)	
		O-phosphocoline	1956.1 ± 474.6	2171.6 ± 548.4	3725.5 ± 1229.3	
		Succinate	236.6 ± 42.7	223.0 ± 31.8	193.7 ± 62.6	
		Uracil	52.7 ± 46.5	56.5 ± 37.3	71.1 ± 46.3	
		Uridine	69.3 ± 30.1	125.3 ± 22.6	113.3 ± 39.7	<0.00001 (healthy versus LDA)
		Unknow	278.6 ± 78.2	122.3 ± 37.7	82.6 ± 65.2	<0.05 (healthy versus LDA)
					<0.05 (healthy versus RDA)	
		Valine	111.4 ± 36.9	78.1 ± 23.3	82.3 ± 29.4	
		Free cholesterol -(C3)H-	873.5 ± 393.6	1112.8 ± 395.5	1205.4 ± 349.2	
		Total cholesterol -(C18)H ₃	3367.7 ± 818.9	4317.6 ± 1699.1	4667.2 ± 686.1	<0.05 (healthy versus RDA)
	Multiple cholesterol protons	4930.3 ± 373.3	6027.2 ± 1271.3	6327.8 ± 567.6	<0.05 (healthy versus LDA)	
				<0.05 (healthy versus RDA)		
	Fatty acids -CH ₃ -(CH ₂) _n -	78874.6 ± 7424.3	130014.7 ± 32490.4	97446.8 ± 9668.3	<0.0000001 (healthy versus LDA)	
				<0.05 (healthy versus RDA)		
	Fatty acids -(CH ₂) _n -	672145.9 ± 75460.2	1034204.0 ± 270216.9	853648.9 ± 106179.1	<0.000001 (healthy versus LDA)	
				<0.05 (healthy versus RDA)		
	Fatty acids -CH ₂ -CH ₂ -CO	455655.5 ± 113667.9	549820.1 ± 115872.8	601105.4 ± 43428.1		
	Fatty acids -CH ₂ -CH=	34891.7 ± 10498.9	57371.2 ± 39746.7	52710.2 ± 16408.1	<0.05 (healthy versus LDA)	
	Fatty acids -CH ₂ -CO	47047.6 ± 10198.8	79889.6 ± 33886.7	64893.3 ± 13046.1	<0.001 (healthy versus LDA)	
				<0.05 (healthy versus RDA)		
	Fatty acids =CH-CH ₂ -CH=	26475.0 ± 10383.5	30851.1 ± 15070.1	24588.6 ± 4016.0		
	Fatty acids -CH=CH-	47835.0 ± 17628.7	78192.9 ± 42839.6	56367.3 ± 8661.7		
	Glycerol backbone -(CH ₂)-	199.2 ± 199.2	9267.3 ± 9212.6	1655.4 ± 1438.7	<0.001 (healthy versus LDA)	
	Phosphoglycerides -CH-	13916.0 ± 4406.2	13895.6 ± 5307.9	16490.1 ± 3156.4		
	Phosphatidylcholine	12167.2 ± 4147.0	9516.6 ± 3512.6	12207.6 ± 3018.5		
	Sphingomyelin-choline	40154.9 ± 13163.9	29159.9 ± 11177.4	38578.1 ± 9073.0		
	Unknow 1	949.2 ± 156.8	581.2 ± 68.1	654.5 ± 82.1	<0.000001 (healthy versus LDA)	
				<0.05 (healthy versus RDA)		
	Unknow 2	3851.5 ± 629.2	3129.0 ± 318.4	3089.0 ± 365.6	<0.05 (healthy versus LDA)	
	3-hydroxybutyrate	2057.4 ± 675.8	3756.0 ± 3329.4	1168.0 ± 895.7		

(continued)

Table 4. Continued.

	Metabolites	Healthy (arbitrary units)	LDA (arbitrary units)	RDA (arbitrary units)	"adjusted" <i>p</i> value (<0.05)	
Urine water soluble (UWS)					<0.05 (healthy versus LDA)	
					<0.05 (LDA versus RDA)	
					<0.05 (healthy versus LDA)	
		2-hydroxy-3-methyl-valerate	1526.9 ± 419.4	2988.3 ± 1348.7	1687.1 ± 409.5	<0.001 (healthy versus LDA)
		4-hydroxyphenylacetate	572.2 ± 60.0	388.4 ± 138.6	444.2 ± 183.7	<0.001 (healthy versus LDA)
		Alanine	6830.7 ± 2345.6	1482.6 ± 1266.6	4481.2 ± 4150.3	<0.001 (healthy versus LDA)
		Allantoin	336.6 ± 108.1	417.8 ± 379.1	243.7 ± 52.1	<0.000001 (healthy versus LDA)
			349.2 ± 61.7	5061.5 ± 3542.5	5761.6 ± 5104.0	<0.05 (healthy versus RDA)
		Benzoate	22.8 ± 22.8	212.6 ± 212.6	0.8 ± 0.8	<0.05 (healthy versus LDA)
		Citrate	4678.6 ± 3277.1	1507.7 ± 1286.6	1985.2 ± 1733.5	<0.001 (healthy versus LDA)
		Choline	51.9 ± 51.9	365.0 ± 200.3	389.0 ± 89.4	<0.000001 (healthy versus LDA)
						<0.001 (healthy versus RDA)
		Creatine	8791.9 ± 2611.7	21502.2 ± 8430.5	12218.0 ± 9821.0	<0.0000001 (healthy versus LDA)
		Creatinine	10687.5 ± 2748.9	16234.4 ± 6726.3	23289.9 ± 10904.7	<0.0001 (healthy versus LDA)
						<0.001 (healthy versus RDA)
		Dimethylamine	27.9 ± 18.2	2248.5 ± 1265.4	2272.1 ± 1613.8	<0.0000001 (healthy versus LDA)
						<0.05 (healthy versus RDA)
		Dimethyl sulfone	1348.3 ± 300.8	275.6 ± 196.8	484.4 ± 220.2	<0.0000001 (healthy versus LDA)
						<0.05 (healthy versus RDA)
		Formate	1068.1 ± 143.3	231.5 ± 182.6	1282.3 ± 748.7	<0.00001 (healthy versus LDA)
						<0.05 (LDA versus RDA)
		Fumarate	29.1 ± 26.9	33.2 ± 22.1	26.2 ± 12.5	<0.05 (healthy versus LDA)
		Glyoxilate	49.8 ± 28.7	21.0 ± 20.7	49.3 ± 48.6	<0.000000000001 (healthy versus LDA)
		Hippurate	95714.3 ± 5107.3	24948.8 ± 14254.0	26049.2 ± 7194.1	<0.00001 (healthy versus RDA)
		Isobutyrate	347.6 ± 207.2	637.1 ± 346.9	333.2 ± 258.0	<0.05 (healthy versus LDA)
		Lactate	1473.5 ± 1473.5	5027.5 ± 4525.9	360.1 ± 151.7	<0.05 (healthy versus LDA)
						<0.05 (healthy versus RDA)
	Lactose	360.1 ± 151.7	1704.5 ± 1254.4	225.4 ± 225.4	<0.001 (healthy versus LDA)	
					<0.05 (RDA versus LDA)	
	N-phenylacetylglucine	18749.8 ± 4876.8	16422.8 ± 4249.5	15927.5 ± 2047.1		
	3-hydroxybutyrate	2352.4 ± 1941.6	1657.9 ± 1253.0	1903.9 ± 1513.0		
	Trimethylamine N-oxide	40396.6 ± 3423.7	11389.4 ± 6067.4	9964.5 ± 3920.7	<0.0000001 (healthy versus LDA)	
					<0.05 (healthy versus RDA)	
	Tyrosine	567.0 ± 125.3	145.2 ± 145.2	497.0 ± 474.1	<0.05 (healthy versus LDA)	
	Unknow 1	7163.5 ± 1254.9	9895.8 ± 3864.0	10944.8 ± 3811.2	<0.05 (healthy versus LDA)	
					<0.05 (healthy versus RDA)	
	Unknow 2	388.2 ± 123.1	1715.2 ± 758.2	539.8 ± 167.9	<0.00001 (healthy versus LDA)	
					<0.05 (LDA versus RDA)	
	Unknow 3	643.9 ± 217.9	1255.1 ± 575.8	670.1 ± 163.3	<0.05 (LDA versus RDA)	
Urine lipid soluble (ULS)	Total cholesterol C(18)H ₃	171.8 ± 89.8	53.6 ± 53.6	0.01 ± 0.01		
	Glycerol backbone -(CH ₂) _n -	18.4 ± 18.4	197.6 ± 42.3	165.3 ± 37.2	<0.0000001 (healthy versus LDA)	
					<0.001 (healthy versus RDA)	
	Fatty acids -CH ₃ -(CH ₂) _n -	122298.2 ± 1434.7	9413.9 ± 806.0	14060.8 ± 351.8	<0.05 (healthy versus RDA)	
					<0.0001 (RDA versus LDA)	
	Fatty acids -(CH ₂) _n	85753.5 ± 12290.1	56153.8 ± 6561.3	94974.8 ± 7035.4	<0.001 (RDA versus LDA)	
	Fatty acids -CH ₂ -CH ₂ -CO	274637.5 ± 36310.8	214963.2 ± 26967.3	217487.8 ± 24605.4	<0.0001 (healthy versus LDA)	

(continued)

Table 4. Continued.

Metabolites	Healthy (arbitrary units)	LDA (arbitrary units)	RDA (arbitrary units)	"adjusted" <i>p</i> value (<0.05)
				<0.05 (healthy versus RDA)
Fatty acids =CH-CH ₂ -CH=	140.6 ± 73.5	51.6 ± 51.6	96.8 ± 17.8	<0.05 (healthy versus LDA)
Fatty acids -CH=CH-	643.0 ± 260.8	384.6 ± 189.4	325.7 ± 290.0	<0.05 (healthy versus LDA)
Unknow	1249.2 ± 93.4	1142.7 ± 126.7	983.2 ± 127.8	<0.001 (healthy versus RDA)
				<0.05 (LDA versus RDA)

p values adjusted for false discovery rate are reported only for metabolites that differ significantly (*p* value <0.05) among the various comparisons performed. In particular, for each type of sample, healthy cows were compared to subjects with both LDA and RDA. To highlight metabolites that are significantly different between the two types of displacements, the comparison between cows with left and right abomasum dislocation was performed too.

Civelek et al. 2006; Sen et al. 2006; Seifi et al. 2011; Constable et al. 2013). While serum and urine lactate levels from metabolomic analysis were increased in diseased groups, liver lactate was decreased in LDA cows. The timing, magnitude, and duration of peripartum increases in circulating concentrations of NEFA and BHBA are associated with the risk of the displaced abomasum, uterine disease, and reproductive performance from 1 through 20 weeks later (LeBlanc 2010). The generally used cut-off value for the diagnosis of subclinical ketosis is ≥ 1200 and up to $1400 \mu\text{mol/L}$ of blood BHBA (Suthar et al. 2013). Clinical ketosis is generally characterized by concentrations of BHBA in the blood $>3000 \mu\text{mol/L}$ (Oetzel 2007). The different metabolites in cows with milk fever reflected the pathological features of negative energy balance and fat mobilization (Sun et al. 2014). In accordance with the above references, increased lactate, NEFA, BHBA, but decreased K levels in diseased groups were observed in the present study. Although some cows with LDA and RDA had also concomitant ketosis, BHBA level (1.94 ± 1.35) was significantly increased in LDA group as well as 3-hydroxybutyrate in serum and urine samples of LDA cows were increased. The 3-hydroxybutyrate was higher in RDA group compared with LDA cows. Increased blood concentrations of isopropanol are observed in ketotic cows (Sato 2009). In the present study, isopropanol and acetate was found higher in liver samples of RDA group than in healthy and LDA cows. Increased serum amyloid A and haptoglobin were found in cows with LDA or RDA/AV. Such an increase may indicate the presence of hepatic lipidosis in cattle with DA (Guzelbektes et al. 2010). The highest values of CRP and haptoglobin were observed in cows during the first month after calving (Dębski et al. 2016). In the present study, the highest values of CRP was observed in RDA cows. This may be attributed to fatty liver in cows with DA.

In ruminants, the principal gluconeogenic substrates include propionic acid, lactic acid, glycerol, and gluconeogenic amino acids (alanine, asparagine, arginine, aspartic acid, cysteine, glycine, histidine,

methionine, proline, propionic acid, serine, valine). A lack of gluconeogenic substrates is an important risk factor in the pathogenesis of ketosis. Ketogenic amino acids (e.g., leucine and lysine) can also enter the tricarboxylic acid cycle by oxidative deamination. A disturbance in the tricarboxylic acid cycle may contribute to clinical ketosis (Sun et al. 2014). A non-metabolomic approach showed that plasma from LDA cattle exhibited significantly higher free fatty acid and BHBA, lower glucogenic amino acids, such as methionine, alanine, and serine, and higher ratio of ketogenic amino acids among blood free amino acids such as leucine and lysine (Hamana et al. 2010). In the present study, both gluconeogenic and ketogenic amino acids such as phenylalanine, isoleucine, and threonine were found decreased as well as ketogenic (leucine, lysine) and gluconeogenic (alanine, isoleucine, glycine, glutamine, proline, valine) amino acids in diseased cows. Lysine and glycine, and even leucine were lower in RDA cows. Ketosis in cows with LDA may be attributed to a lack of gluconeogenic substrates (propionic acid, glycerol, and gluconeogenic acids) and ketotic cows' consumption of large amounts of ketogenic substances.

Carnitine transports the activated fatty acids from the cytosol into the mitochondrion via their corresponding carnitine ester (Stanley et al. 1992). Acetylcarnitine, as the shortest acylcarnitine, facilitates the movement of acetyl-CoA into the matrices of the mitochondria. Furthermore, in the mitochondria, carnitine acetyl-CoA transferase catalyzes the conversion of acetyl-CoA to C2, a membrane permeable metabolite which facilitates mitochondrial efflux of excess acetyl-CoA. Increased hepatic carnitine concentrations observed in 1 wk postpartum and might be regarded as a physiologic means to provide liver cells with sufficient carnitine required for transport of excessive amounts of NEFA during a negative energy balance (Schlegel et al. 2012). Especially the role of specific glycerophospholipids, sphingolipids, and acylcarnitines as potential biomarkers should be considered for metabolic adaptation of transition dairy cows (Kenéz et al. 2016). In the current study, serum carnitine level in diseased cows (especially in

LDA group) was higher than in a healthy group. This may point to an increase in the mitochondrial oxidation of the ketogenic and gluconeogenic amino acids.

Valine, leucine, and isoleucine biosynthesis plays a vital role in milk protein synthesis. Hippuric acid, nicotinamide, and pelargonic acid are milk protein biomarkers (Wu et al. 2018). Hippuric acid, as an aromatic compound, could be converted into aromatic amino acids such as tryptophan, tyrosine, and phenylalanine, then be transformed into nicotinamide. Higher serum hippuric acid might also indicate more energy supplied by glucose metabolism and hormone regulation (Pero 2010). Urinary hippuric acid might reflect the dietary composition, hepatic function, disease state, and even metabolism alterations. A higher urinary hippuric acid level leads to more nitrogen loss and lower milk protein yield in cows fed low-quality forages, which supports the hypothesis that hippuric acid as excretory products is mainly produced from dietary protein degradation (Sun et al. 2016). In this present study, hippuric acid was one of the most prominent metabolites. Its lower level in serum and urine of diseased groups (especially in LDA group) together with lower valine, leucine, and isoleucine in serum may indicate less energy supplied and less nitrogen loss in a cow with DA.

Leucine, one of the three branch chain amino acids, acts as a signaling molecule in the regulation of overall amino acid and protein metabolism. Leucine is also considered to be a potent stimulus for the secretion of insulin from pancreatic β -cells (Sadri et al. 2017). The three branched-chain amino acids, leucine, isoleucine, and valine that are classified as essential amino acids, play important roles in regulating overall amino acids and protein metabolism. Marczuk et al. (2018) found that higher concentrations of glutamine, glutamic acid, isoleucine, and tyrosine in cows with primary ketosis, and that significant decrease in the concentrations of asparagine, histidine, methionine, and serine, alanine, leucine, lysine, and proline. In the current study, significant decreases in leucine, isoleucine, tyrosine, trimethylamine N-oxide, and valine of diseased groups were observed. Thus, protein and amino acid metabolisms seem to be adversely affected in the present study.

According to Shibano et al. (2005), the improvement of the glycine/alanine ratio in high producing dairy cows may indicate increased milk production and milk quality. Furthermore, the glycine/alanine ratio may be a useful indicator for determining nutritional deficiency from the transition period to the peak lactation period. Measurement of glycine/alanine ratio in serum may be useful for evaluating the nutritional status of a periparturient dairy cow. In

the present study, this ratio was found much more impairment in the RDA group, suggesting their poor nutritional status.

The biopsy of the liver is the most reliable method for accurate estimation of the degree of fatty infiltration. It can be used to determine the concentration of triglycerides and the severity of the fatty liver (Herd et al. 1983). Due to the rapid development of metabolomics in recent years, the use of this approach for disease biomarker assessment has become popular. A metabolomic approach revealed the primary differences including increases in BHBA, acetone, glycine, valine, trimethylamine-N-oxide, citrulline, and isobutyrate, and decreases in alanine, asparagine in plasma samples of cows with fatty liver (Xu et al. 2016). A study evaluating alterations of the lipid metabolome in dairy cows experiencing excessive lipolysis early postpartum showed that overall, excessive lipolysis in the high group came along with impaired estimated insulin sensitivity and characteristic shifts in acylcarnitine, sphingomyelin, phosphatidylcholine, and lysophospholipid metabolome profiles compared to the low group. From the detected phosphatidylcholines mainly those with diacyl-residues showed differences among lipolysis groups. Furthermore, more than half of the detected sphingomyelins were increased in cows experiencing high lipomobilization. Additionally, strong differences in serum acylcarnitines were noticed among lipolysis groups (Humer et al. 2016). The concentration of triacylglycerides in plasma drops at the day of parturition whereas the plasma level of many phosphatidylcholines and sphingomyelins increases steadily during early lactation (Imhasly et al. 2015). The measurement of specific representatives of phosphatidylcholines in plasma may provide a novel diagnostic biomarker of fatty liver disease in dairy cows (Gerspach et al. 2017). Choline can be metabolized to several other products, including betaine, phosphatidylcholine, and acetylcholine, each with critical biological roles (Garcia et al. 2018). The abnormal decline of certain specific phosphatidylcholines and sphingomyelins could be regarded as a promising biomarker indicative of fatty liver disease (Artegoitia et al. 2014; Imhasly et al. 2015). In the current study, while a lower level of many fatty acid fractions and cholesterol were encountered in serum and urine samples, the similar metabolites tended to be higher in liver samples in diseased groups. Fatty acids $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n$ and fatty acids $\text{-(CH}_2)_n$ were lower in urine samples of LDA cows. Phosphoglycerides, phospholipids, and unsaturated and polyunsaturated fatty acids and sphingomyelin were found lower in diseased cows' serum samples. The similar decreases in liver samples were not significant. sn-Glycero-3-phosphocoline was lower in liver samples of RDA cows. In

our previous study (Basoglu et al. 2014), where metabolites identified and quantified by NMR analysis only in plasma samples were valine, 3 β -hydroxybutyrate, alanine, glutamine, glutamate, and succinate. Among these parameters, succinate decreased significantly in cows with RDA. Pronounced findings between LDA and RDA groups included significant changes in glutamine, glutamate, and 3 β -hydroxybutyrate. This previous study has been extended by the current one where different metabolites mentioned above were measured in serum, urine, and liver; thus pathogenic mechanisms related to energy metabolism of the disease have been more comprehensible.

5. Conclusions

The integration of several pathophysiological aspects, for example, lipolysis, ketogenesis, and oxidative capacity in cows with DA, by combining gluconeogenic and ketogenic amino acids, fatty acids fractions and cholesterol, ketone bodies, choline products, and carnitine, will likely provide more information than the classical measurement of NEFA and BHBA. The metabolomic profile, in the present study, clearly revealed that cows with DA (especially with LDA) have been at risk ketosis and fatty liver and that analyzing changes of the serum, urine and liver metabolome and identifying new biomarkers by metabolomic approach can help to understand the multifaceted disease. The biochemical network and pathway mappings performed on serum metabolites highlight the 'valine, leucine and isoleucine biosynthesis' and the 'phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis' as the most probable altered metabolic pathway in DA condition.

Disclosure statement

The authors declare there are no competing financial interests.

Funding

This work was financially supported by the Selcuk University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: 17102035). CERM/CIRMMP center of the ESFRI Instruct is gratefully acknowledged for the NMR access provision financially supported by the EC Contract INEXT No 653706.

References

Artegoitia VM, Virginia M, Middleton JL, Harte FM, Campagna SR, de Veth MJ. 2014. Choline and choline metabolite patterns and associations in blood and milk during lactation in dairy cows. *PLoS One*. 26:e103412.

Basoglu A, Baspinar N, Coskun A. 2014. NMR based metabolomics evaluation in dairy cows with displaced abomasum. *Turkish J Vet Anim Sci*. 38:325–330.

Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol*. 57:289–300.

Caixeta LS, Herman JA, Johnson GW, McArt J. 2018. Herd-level monitoring and prevention of displaced abomasum in dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 34(1):83–99.

Ceciliani F, Lecchi C, Urh C, Sauerwein H. 2018. Proteomics and metabolomics characterizing the pathophysiology of adaptive reactions to the metabolic challenges during the transition from late pregnancy to early lactation in dairy cows. *J Proteomics*. 30:92–106.

Civelek T, Sevinc M, Boydak M, Basoglu A. 2006. Serum apolipoprotein B100 concentrations in dairy cows with left displaced abomasum. *Revue Méd Vét*. 157:361–365.

Constable P, Grünberg W, Staufenberg R, Stämpfli HR. 2013. Clinicopathologic variables associated with hypokalemia in lactating dairy cows with abomasal displacement or volvulus. *J Am Vet Med Assoc*. 242(6):826–835.

Dębski B, Nowicki T, Zalewski W, Ochota M, Mrowiec J, Twardoń J. 2016. Evaluation of acute phase proteins in clinically healthy dairy cows in perinatal period and during lactation. *Pol J Vet Sci*. 19(3):519–523.

Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. 2006. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabolomics. *Anal Chem*. 78(13):4281–4290.

Doll K. 2015. Abomasal displacement in dairy cattle: A hereditary disease? *Vet J*. 205(3):329–330.

Garcia M, Mamedova LK, Barton B, Bradford BJ. 2018. Choline regulates the function of bovine immune cells and alters the mRNA abundance of enzymes and receptors involved in its metabolism in vitro. *Front Immunol*. 25:2448.

Gerspach C, Imhasly S, Gubler M, Naegeli H, Ruetten M, Laczko E. 2017. Altered plasma lipidome profile of dairy cows with fatty liver disease. *Res Vet Sci*. 110:47–59.

Guard C. 1990. Abomasal displacement and volvulus. In: Smith BP, editor. *Large animal internal medicine, diseases of horses, cattle, sheep, and goats*. St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company; p. 792.

Guzelbektes H, Sen I, Ok M, Constable PD, Boydak M, Coskun A. 2010. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations and liver fat percentage in lactating dairy cows with abomasal displacement. *J Vet Intern Med*. 24(1):213–219.

Hamana M, Ohtsuka H, Oikawa M, Kawamura S. 2010. Blood free amino acids in the postpartum dairy cattle with left displaced abomasum. *J Vet Med Sci*. 72(10):1355–1358.

Herdth TH, Goeders L, Liesman JS, Emery RS. 1983. Test for the estimation of bovine hepatic lipid content. *J Am Vet Med Assoc*. 182(9):953–955.

Holmes E, Foxall P.J.D, Nicholson J.K, Neild G.H, Brown S.M, Beddell C.R, Sweatman B.C, Rahr E, Lindon J.C, Spraul M, et al. 1994. Automatic data reduction and pattern recognition methods for the analysis of 1H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Anal Biochem*. 220(2):284–296.

Humer E, Khol-Parisini A, Metzler-Zebeli BU, Gruber L, Zebeli Q. 2016. Alterations of the lipid metabolome in

- dairy cows experiencing excessive lipolysis early post-partum. *PLoS One*. 11(7):e0158633.
- Imhasly S, Bieli C, Naegeli H, Nyström L, Ruetten M, Gerspach C. 2015. Blood plasma lipidome profile of dairy cows during the transition period. *BMC Vet Res*. 7: 252.
- Ihaka R, Gentleman RR. 1996. A Language for data analysis and graphics. *J Comput Stat Graph*. 5:299–314.
- Ingvartsen KL. 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow. Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim Feed Sci Technol*. 126(3-4):175–213.
- Kenéz Á, Dänicke S, Rolle-Kampczyk U, von Bergen M, Huber K. 2016. A metabolomics approach to characterize phenotypes of metabolic transition from late pregnancy to early lactation in dairy cows. *Metabolomics*. 12(11):165.
- LeBlanc S. 2010. Monitoring the metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Dev*. 56:29–35.
- Marczuk J, Brodzki P, Brodzki A, Kurek Ł. 2018. The concentration of free amino acids in blood serum of dairy cows with primary ketosis. *Pol J Vet Sci*. 21(1):149–156.
- McArt JA, Nydam DV, Overton MW. 2015. Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: a deterministic estimate of component and total cost per case. *J Dairy Sci*. 98(3): 2043–2054.
- Meiboom S, Gill D. 1958. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instrum*. 29: 68–691.
- NAHMS-USDA. 2017 National Animal Health Monitoring System: dairy cattle management practices in the United States. In: Agriculture UDo, ed. [accessed on 2017 May 22]. https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/monitoring-and-surveillance/nahms/nahms_dairy_studies2007.
- Neuhäuser M. 2011. Wilcoxon–Mann–Whitney Test. In *International Encyclopedia of statistical science* 1656–58. Berlin: Springer.
- Oetzel GR. 2007. Herd-level ketosis – diagnosis and risk factors. *American Association of Dairy Sci*. 96, 2925–38. *Bovine Practitioners*. 40th Annual Conference; Vancouver, BC, Canada.
- Pero RW. 2010. Health consequences of catabolic synthesis of hippuric acid in humans. *Curr Clin Pharmacol*. 5(1): 67–73.
- Puppel K, Kuczyńska B. 2016. Metabolic profiles of cow's blood; a review. *J Sci Food Agric*. 96(13):4321–4328.
- Sadri H, von Soosten D, Meyer U, Kluess J, Dänicke S, Saremi B, Sauerwein H. 2017. Plasma amino acids and metabolic profiling of dairy cows in response to a bolus duodenal infusion of leucine. *PLoS One*. 12(4):e0176647.
- Sato H. 2009. Increased blood concentration of isopropanol in ketotic dairy cows and isopropanol production from acetone in the rumen. *Anim Sci J*. 80(4):381–386.
- Schlegel G, Keller J, Hirche F, Geiszler S, Schwarz F J, Ringseis R, Stangl G I, Eder K. 2012. Expression of genes involved in hepatic carnitine synthesis and uptake in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. *BMC Vet Res*. 8(1):28.
- Seifi HA, Leblanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. 2011. Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet J*. 188(2):216–220.
- Sen I, Ok M, Coskun A. 2006. The level of serum ionized calcium, aspartate aminotransferase, insulin, glucose, betahydroxybutyrate concentrations and blood gas parameters in cows with left displacement of abomasums. *Pol J Vet Sci*. 9:227–232.
- Serkova N, Fuller TF, Klawitter J, Freise CE, Niemann CU. 2005. H-NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants. *Kidney Int*. 67(3):1142–1151.
- Sevinc M, Ok M, Basoglu A. 2002. Liver function in dairy cows with abomasal displacement. *Revue Méd Vét*. 153: 477–480.
- Shibano K, Kawamura S, Hakamada R, Kawamura Y. 2005. The relationship between changes in serum glycine and alanine concentrations in non-essential amino acid and milk production in the transition period in dairy cows. *J Vet Med Sci*. 67(2):191–193.
- Sickinger M. 2017. [Abomasal displacement in cattle - short overview of recent research results]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*. 45(3):187–190.
- Stanley C A, Hale D E, Berry G T, Deleeuw S, Boxer J, Bonnefont J-P. 1992. A deficiency of carnitine-acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane. *N Engl J Med*. 327(1):19–23.
- Sun HZ, Wang B, Wang JK, Liu HY, Liu JX. 2016. Biomarker and pathway analyses of urine metabolomics in dairy cows when corn Stover replaces alfalfa hay. *J Anim Sci Biotechnol*. 7(1):49.
- Sun LW, Zhang HY, Wu L, Shu S, Xia C, Xu C, Zheng JS. 2014. (1)H-Nuclear magnetic resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with clinical and sub-clinical ketosis. *J Dairy Sci*. 97(3):1552–1562.
- Sun Y, Xu C, Li C, Xia C, Xu C, Wu L, Zhang H. 2014. Characterization of the serum metabolic profile of dairy cows with milk fever using 1H-NMR spectroscopy. *Vet Q*. 34(3):159–163.
- Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W. 2013. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *J Dairy Sci*. 96(5):2925–2938.
- Takis PG, Ghini V, Tenori L, PaolaTurano P, Luchinat C. 2018. Uniqueness of the NMR approach to metabolomics. *Trends Anal Chem*. 120:115300.
- Trygg J, Wold S. 2002. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J Chemometrics*. 16(3):119–128.
- Vignoli A, Ghini V, Meoni G, Licari C, Takis PG, Tenori L, Turano P, Luchinat C. 2019. High-throughput metabolomics by 1D NMR. *Angew Chem Int Ed Engl*. 58:968–994.
- Wold S. 1998. PLS in chemistry. In *Encyclopedia of computational chemistry*. Chichester: Wiley.
- Xu C, Sun LW, Xia C, Zhang HY, Zheng JS, Wang JS. 2016. (1)H-Nuclear Magnetic Resonance-Based Plasma Metabolic Profiling of Dairy Cows with Fatty Liver. *Asian-Australas J Anim Sci*. 29(2):219–229.
- Wu X, Sun H, Xue M, Wang D, Guan LL, Liu J. 2018. Serum metabolome profiling revealed potential biomarkers for milk protein yield in dairy cows. *J Proteomics*. 184: 54–61.
- Zerbin I, Lehner S, Distl O. 2015. Genetics of bovine abomasal displacement. *Vet J*. 204(1):17–22.

8. ÖZGEÇMİŞ

3 Temmuz 1988’de Gölcük/Kocaeli’nde doğdu. İlkokulu eğitimini Gölcük’te, orta ve lise eğitimini Ankara’da tamamladı. 2006 yılında Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Astronomi ve Uzay Bilimleri Bölümünü kazandı. Eğitiminin 2. yılında tekrar üniversite giriş sınavına girerek 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı ve lisans eğitimine başladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2013 yılında mezun oldu. Ankara’da özel bir veteriner kliniğinde 1 yıl veteriner hekim olarak görev yaptı. 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı ve 50/d kapsamında Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda Veteriner Hekim olarak görevine devam etmektedir.