

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**LAKTASYONDAKİ KEÇİLERDE LÖKOSİT CaSR GEN
EKSPRESYON SEVİYESİ İLE PLAZMA KALSİYUM SEVİYESİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevda DALKIRAN

Danışman

Doç. Dr. Akın YAKAN

HATAY 2017

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**LAKTASYONDAKİ KEÇİLERDE LÖKOSİT CaSR GEN
EKSPRESYON SEVİYESİ İLE PLAZMA KALSİYUM SEVİYESİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevda DALKIRAN

Danışman

Doç. Dr. Akın YAKAN

HATAY 2017

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**LAKTASYONDAKİ KEÇİLERDE LÖKOSİT CaSR GEN
EKSPRESYON SEVİYESİ İLE PLAZMA KALSİYUM SEVİYESİNİN
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Sevda DALKIRAN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 22/12/ 2017 günü sözlü olarak yapılan
tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi Jüri Başkanı: Doç. Dr. Akın YAKAN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Oğuzhan Özcan

Üye: Yrd. Doç. Dr. Korhan Arslan

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

.../.../....

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmasını gerçekleőtirme fırsatı vererek akademik hayata ilk adımımı atmamı sağlayan, yüksek lisans öğrenimim boyunca bilimsel bakıő açısıyla bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen çalıőmamın her aőamasında duyduğu güven nedeniyle değerli danıőmanım Sayın Doç. Dr. Akın YAKAN'a, tez çalıőmamın laboratuvar aőamasında yardımlarını esirgemeyen Ar. Gör. Hüseyin ÖZKAN ve Ar. Gör. Aysel ERASLAN ŐAKAR'a teşekkür ederim.

Hayallerimin gerekleőtmesi için beni koőulsuz ve sabırla destekleyen ve her daim yanımda olan babam Rehim DALKIRAN'a, annem Rasime DALKIRAN'a, kardeőlerim Recep ile Esra'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Süt Verimi ve Kalsiyum Metabolizması ile İlişkisi.....	5
2.2. Kalsiyum Metabolizması.....	7
2.3. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör (CaSR) Geni.....	9
2.4. Gen Eksresyonu.....	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1. Hayvan Materyali.....	18
3.2. Örneklerin Toplanması.....	18
3.3. RNA İzolasyonu.....	19
3.4. Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR).....	20
3.5. Plazma Kalsiyum Ölçümü.....	21
3.6. İstatistiksel Analiz.....	22
4. BULGULAR.....	23
4.1. RNA İzolasyonu.....	23
4.2. Plazma Kalsiyum Ölçümü.....	24
4.3. CaSR Gen Ekspreyon Seviyesi.....	25

5. TARTIŞMA.....	28
6. SONUÇ.....	33
7. KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kalsiyum hemostazı	9
Şekil 2.2. DNA'dan proteine bilgi aktarımı	14
Şekil 2.3. qRT-PCR reaksiyonu	15
Şekil 2.4. SYBR Green metodu çalışma prensibi.....	16
Şekil 2.5. Erime Eğrisi Grafiği.....	17
Şekil 3.1. RNA jel görüntüsü.....	20
Şekil 4.1. RNA jel elektroforez görüntüsü.....	24
Şekil 4.2. CaSR geninin erime eğrisi grafiği	25
Şekil 4.3. CaSR geninin laktasyon dönemindeki ekspresyon seviyesi (Fold Regulation).....	26
Şekil 4.4. CaSR geninin laktasyon dönemindeki ekspresyon seviyesi (Fold Change).....	26
Şekil 4.5. CaSR geninin RT-qPCR ürünü elektroforez görüntüsü	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.Yıllara göre yetiştiriciliği yapılan keçi sayıları (baş) (TÜİK 2016).....	1
Çizelge 3.1. RNA konsantrasyon ve saflık miktarları.....	19
Çizelge 3.2. CaSR ve RPLP0 genleri primer sekansları.....	21
Çizelge 4.1. RNA konsantrasyon ve saflık miktarları.....	23
Çizelge 4.2. Laktasyon dönemindeki plazma kalsiyum miktarı (Median (% 25-75 percentile)) (n=10).....	24



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin Trifosfat
BMD	Kemik Mineral Yoğunluğu
C	Derece
Ca	Kalsiyum
cAMP	Adenozim Monofosfat
CaSR	Calcium Sensing Receptor
Ct	Threshold Cycle
dl	Desilitre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
g	Gram
GPCR	G-Protein-Coupled Receptors
HNO₃	Nitrik Asit
kg	Kilogram
L	Litre
MEC	Meme Epitel Hücresi
Mg	Miligram
mmol	Milimol
MP-AES	Mikroplazma Atomik Emisyon Spektrofotometresi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMCA2	ATPaz 2
PO₄	Fosfat
PTH	Paratiroit Hormon
PTHrP	Parathyroid Hormone-Related Protein
RNA	Ribonükleik Asit
RPLP0	Ribosomal Protein Large Subunit P0
rpm	Revolutions per Minute
RT-qPCR	Kantitatif Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon
SO₄	Sülfat
µl	Mikrolitre

ÖZET

Laktasyondaki Keçilerde Lökosit CaSR Gen Ekspresyon Seviyesi ile Plazma Kalsiyum Seviyesinin Belirlenmesi

Keçi yetiştiriciliğinde süt üretimi büyük öneme sahiptir. Süt içeriğindeki kalsiyum ve diğer bileşikler insan beslenmesinde oldukça önemli yer tutmaktadır. Kalsiyum; kas kasılması, kanın pıhtılaşması, enzim aktivitesi, sinirsel uyarım ve hormonların salınması ile hücre membranlarının geçirgenliği gibi biyolojik mekanizmalarda görev almaktadır. Bu nedenle kan kalsiyum düzeyinin devamlılığının sağlanması oldukça önemli olup hormonal kontrol mekanizmaları ile stabilitesi sağlanmaktadır. Bu mekanizmalar; paratiroid hormon (PTH) mekanizması, kalsitonin ve vitamin D mekanizmasıdır. PTH iyonize kalsiyum miktarını arttırırken fosfor düzeyini azaltmaktadır. Kalsitonin kan kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde görev alıp PTH'yı ters etkileyerek bu fonksiyonunu yerine getirmektedir. Vitamin D, PTH ile birlikte hareket etmektedir. Yani PTH salgılanmasıyla birlikte kemikten kalsiyum ve fosfat salınımını arttırarak kan kalsiyum ve fosfor dengesini sağlamaktadır. Kan kalsiyum konsantrasyonundaki küçük değişiklikler bu hormonal mekanizmayı harekete geçirmektedir. Özellikle laktasyon döneminde sütteki kalsiyum talebi artmaktadır. Laktasyon döneminde vücudun ihtiyacı olan kalsiyumu Kalsiyuma Duyarlı Reseptör (CaSR) geni yardımıyla süte koordine etmektedir. Bu çalışmada Damascus keçilerde laktasyon boyunca sütte CaSR gen ekspresyon seviyesi ile kan kalsiyum seviyesi ölçülmüştür. CaSR gen ekspresyon seviyesi RT-qPCR ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile Fold Regulation ve Fold Change grafikleri oluşturulmuştur. Laktasyonun 1. ayına göre 3, 5 ve 7. aylarında CaSR gen ekspresyonun önemli seviyede down- regüle olduğu tespit edilmiştir. Laktasyonun 1, 3,5 ve 7. aylarında alınan plazma örneklerinde kalsiyum seviyeleri sırasıyla 9,63; 9,57; 8,64 ve 8,32 (mg/dl) olarak bulunmuştur. Laktasyonun 1 ve 3. aylarına göre 5 ve 7. aylarda önemli seviyede azalma görülmüştür. Plazma kalsiyum miktarındaki bu azalma CaSR gen ekspresyon miktarındaki azalma ile uyum içerisinde olmuştur. Bu çalışma ile laktasyondaki keçilerde sütle birlikte meydana gelen kalsiyum kaybının kandaki regülasyonunun CaSR geni üzerinden sağlandığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Keçi, laktasyon, kalsiyum, CaSR, gen ekspresyonu

ABSTRACT

Determination of Leucocyte CaSR Gene Expression Level and Plasma Calcium Level in Lactated Goats

Milk manufacturing has an importance for goat breeding. It has a very important place in human nutrition in terms of calcium and other compounds in milk. Calcium; muscle contraction, blood clotting, enzyme activity, neural stimulation and together with the release of hormones, participate in biological mechanisms such as the permeability of cell membranes. For this reason, maintaining the level of blood calcium level is very important and its stability ensured with hormonal control mechanisms. These mechanisms are; mechanism of parathyroid hormone (PTH), calcitonin and vitamin D. PTH, increases the amount of ionized calcium and reduces the phosphorus level. Calcitonin participates in the regulation of blood calcium concentration and adversely affects PTH. Vitamin D moves in concert with PTH. With release of PTH, body balances blood calcium and phosphorus by increasing calcium and phosphate release from bone. Small changes in concentration of blood calcium, activate this hormonal mechanism. Demand of calcium in milk increases especially in period of lactation. In lactation period body coordinates calcium that needed, to milk with help of Calcium sensing receptor (CaSR) gene. In this research, through out lactation period CaSR gene expression and blood calcium levels were measured. CaSR gene expression was determined with RT-qPCR. Fold Regulation and Fold Change graphs were created with the results. It was determined significant down-regulated levels at 3, 5 and 7th months of lactation compared to 1st month of lactation. Blood plasma samples, 1st, 3rd, 5th and 7th month of lactation, was measured for plasma calcium levels and their quantity was found 9,63; 9,57; 8,64 and 8,32 (mg/dl), respectively. According to lactation's 1st and 3rd months in blood plasma calcium levels were detected higher than 5th and 7th months of lactation. The decreasing levels of CaSR gene expression were compatible with the plasma. In this study, it has been determined the regulation in blood of the calcium loss with the milk in the lactating goat via the CaSR gene.

Keywords: Goat, lactation, calcium, CaSR, gene expression

1.GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliği tarih boyunca insan hayatı için önemli olmuştur. İnsanların, kültür ve eğitim düzeyi ilerledikçe hayvan yetiştiriciliği faaliyeti artmış ve zamanla hayvancılık endüstri haline gelmiştir. Yetiştiricilik aynı zamanda insan hayatının sosyal ve ekonomik yönden gelişmesine de büyük katkı sağlamıştır. Bugün dünyada yapılan hayvancılık faaliyeti birçok ülke için önemli üretim alanlarından birisi olup, ülke ekonomilerine katkılar sağlamaktadır. Ülkelerin coğrafi yapısı ve iklim koşulları göz önünde bulundurularak yapılan hayvancılık faaliyetleri çeşitlilik göstermektedir (Akçapınar ve Özbeyaz 1999).

2000 yılından itibaren ülkemizdeki keçi sayısında önemli artış olmuştur (Çizelge 1). Keçi yetiştiriciliği genellikle et ve süt üretimi amacıyla yapılmaktadır. Ancak yetiştiriciliği yapılan diğer çiftlik hayvanlarına göre bakım beslenmelerinin kolay, adaptasyon yeteneklerinin yüksek olması ve hastalıklara karşı daha dirençli olması sebebiyle daha çok tercih edilmektedirler (Ceyhan 2014).

Çizelge 1.1. Yıllara göre yetiştiriciliği yapılan keçi sayıları (baş) (TÜİK 2016)

Yıllar	Keçi
2000	7. 201. 000
2003	6.771.675
2006	6.643.294
2009	5.128.285
2012	8.357.286
2015	10.416.166

Türkiye’de Suriye sınır boyundaki illerde (Hatay, Kilis, Gaziantep ve Şanlıurfa) genellikle sütçü verim özelliğine sahip Damascus keçisi yetiştirilmektedir. Cidago yüksekliği erkeklerde 80-85 cm dişilerde 70-75 cm’dir. Keçi ve tekeler genellikle boynuzsuzdur. Küçük boynuzlara da rastlanabilmektedir. Vücutları uzun kıllarla kaplıdır. Kulakları uzun (25-30 cm) ve sarkıktır. Baş uzun, burun öne büküktür (Günlü ve Alaşahan 2010). Canlı ağırlık erkeklerde 70-90 kg, dişilerde 55-65 kg arasındadır (Keskin 2002). Cinsel olgunluğa ulaşma 8-12 aydır (Akçapınar ve Özbeyaz 1999). Genellikle yılda 1 defa doğum yaparlar. Laktasyon süresi 7- 8 ay kadardır. Oğlaklar süttten kesildikten sonra keçiler 5-6 ay daha sağlıklırlar (Yakan ve ark. 2016).

Memelilerde doğumla beraber meme bezlerinden süt salgılanmaya başlar ve bu durum belli bir süre devam eder. Süt salgılanma olayı laktasyon olarak adlandırılır. Sütçü ırklardaki laktasyon süresi genellikle 7-8 aydır. Laktasyonun başında günlük süt verimi düşük olmasına karşılık ilerleyen süreçte süt verimi zamanla artma eğilimi gösterir. Ancak laktasyonun ilerleyen zamanlarında bu eğri sifıra kadar düşer. Bu düzey ırktan ırka değışiklik gösterir (Yakan 2012).

Keçilerde süt verimi genetik ve çevresel faktörlere bağlıdır. Süt veriminin toplamalı gen etkisinde olması sebebiyle çoğunlukla çevresel faktörlerden kısmen de genetik yapıdan etkilendiğı bilinmektedir. Süt verim ve kompozisyonunu etkileyen faktörler arasında hayvanın ırkı, yaşı, besleme şekli ve laktasyon dönemi yer almaktadır (Akçapınar ve Özbeyaz 1999).

Keçi sütünün içeriğinde laktoz, protein, yağ ve mineral madde (kalsiyum, magnezyum, fosfor vs.) gibi besleyici unsurlar bulunmaktadır. Bu mineral maddelerden kalsiyum metabolizma da aldığı önemli rollerden dolayı büyük öneme sahiptir. Kan kalsiyum seviyesi metabolizmada özellikle laktasyon gibi metabolik olayların içinde önemli yer alır. Keçi sütündeki kalsiyum miktarı süt kalitesi ve insan sağlığı bakımından da oldukça önemlidir (Çoşkun ve Öndül 2004). Kas gelişimi için keçi sütü, insan gıdası olarak tüketilebilecek sütler içerisinde, anne sütüne en yakın özellikte olan süt olması ile önem arz etmektedir. Kalsiyum içeriğinin anne sütüne göre 34 kat daha yüksek olması ve inek sütü tüketiminde zaman zaman karşılaşılan sindirim sistemi problemlerine neden olmaması ve alerjen özelliğinin az olması gibi birçok özellik keçi sütünü avantajlı kılmaktadır (Koşum 2010).

Kalsiyum birçok fizyolojik olayın gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Vücutta bulunan kalsiyumun yaklaşık % 99'u iskelet yapısında bulunurken, %1 kadarı ekstraselüler sıvıda bulunmaktadır (Goodman ve Quarles 2002). Ekstraselüler sıvıdaki kalsiyum, plazma proteine bağlı, kompleks oluşturmuş veya iyonize kalsiyum şeklindedir (Wills ve ark. 1970). Kanda total kalsiyum konsantrasyonunun yaklaşık olarak yarısı iyonize formdadır. Geri kalan kısmı ise iyonik olarak negatif yüklü proteinlere bağlıdır. Bir kısmı esas olarak albumin ve immunglobulinlere bağlanır. Bir kısmı da PO₄, CO₃, sitrat, SO₄, okzalat veya diğer anyonlarla gevşek olan kompleksler yapar. Bu nedenle plazma protein konsantrasyonlarındaki değişimler, direkt olarak kan total kalsiyum konsantrasyonunu, iyonize kalsiyum konsantrasyonunun normal kalmasına karşın değiştirebilmektedirler (Sözen ve Gogas 2013). Laktasyon süresi boyunca süt emme dönemindeki yavrunun özellikle iskelet sistemi gelişiminin yeterince sağlanabilmesi için dolaşımdan büyük miktarda kalsiyum süte geçmektedir (Kirby ve ark. 2011, Zheng ve ark. 2014).

Kalsiyuma duyarlı reseptör (CaSR); kalsiyumun ekstraselüler sıvılardaki değişimine bağlı olarak, kalsiyumun G proteine bağlanarak 7-transmembranlı geçişini sağlayan bir yüzey reseptörüdür (Brennan ve Conigrave 2009). Bu sebeple CaSR geni vücutta kalsiyum homeostazisini sağlayan esas faktörlerden birisidir. Dolaşımdaki küçük kalsiyum konsantrasyon değişikliklerini algılayıp bu bilgiyi intraselüler sinyal yollarına aktararak PTH salınımının düzenlenmesini sağlamaktadır. Mineral iyon homeostazisinde CaSR temel rol oynamaktadır (Harpio ve Einarsson 2004). Reseptörün aktivitesi fosfatidilinositol-kalsiyum ikinci mesaj sistemini tetikleyen G proteini ile gerçekleşir. Ekstraselüler iyonik kalsiyum konsantrasyonundaki küçük değişiklikler paratiroid bezinin plazma kalsiyumunu düzenlemesini sağlar (Nalefski ve Falke 1996). Bununla birlikte hücrel farklılaşma, apoptozis ve hormon sekresyonu gibi çok önemli metabolik olaylarda da rol oynar (Kantham ve ark. 2009, Molostvov ve ark. 2008, Tu ve ark. 2008). CaSR geninin lökositlerdeki ekspresyon seviyesini gösteren sınırlı sayıda çalışmada enflamasyonla ilişkilendirilebileceğini göstermektedir (İvona ve ark. 2000, Tingting ve ark. 2013). Ancak kan plazma kalsiyum seviyesi ile ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Laktasyon döneminde süt verimi ile orantılı olarak kalsiyum ihtiyacı da artmaktadır. İskelet sisteminde bulunan kalsiyumun kana geçişi ile artan kalsiyum talebi karşılanmaktadır. Buda kemik mineral yoğunluğunu olumsuz etkilemektedir. Özellikle

sütçü ırktan olan Damascus keçilerinde bu durum laktasyonun ilerleyen dönemlerinde hipokalsemiye yol açmaktadır. Yapılan literatür taramalarında da laktasyondaki kalsiyum kaybının plazma kalsiyum seviyesi ile ilişkisi veya bunun genetik dayanağı olarak herhangi bir bilgiye henüz rastlanılmamıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Süt Verimi ve Kalsiyum Metabolizması ile İlişkisi

Süt, insan beslenmesinde önemli bir yer tutar ve artan nüfusla orantılı olarak toplumların beslenmesinde önem kazanmaktadır (Akçapınar ve Özbeyaz 1999).

Süt verimi tür, ırk, genetik yapı, beslenme, gebelik ve iklim gibi genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Memedeki süt salgı bezlerinin büyük bir kısmı gebeliğin son haftalarında süt salgılanması için hazırlanmaktadır. Yaklaşan doğuma paralel olarak süt salgılanması da artar. Doğum öncesinde salgılanan sıvıya kolostrum (ağız sütü) denir. Doğum öncesi memeler büyümüş ve gergin olup memeden süt gelmesiyle de (laktasyon) doğum başlar. Gebelik döneminde kanda yükselen progesteron seviyesi doğum gerçekleşikten sonra düşüş gösterirken, prolaktin seviyesinde de yükselme gözlenmektedir. Progesteron gebelik döneminde süt salgılanmasını durdurucu etkiye sahiptir. Bu nedenle gebeliğin 5. ayından itibaren süt verimindeki azalma; progesteron seviyesinin yükselmesi ve bunun sonucu olarak prolaktinin etkisinin azalması ile açıklanmıştır (Akçapınar ve Özbeyaz 1999).

Meme bezi, embriyonik yaşamın başlangıcında tomurcuk benzeri bir uzantı olarak oluşmaktadır. Küçük olan bu bezin gelişimi ergenliğe kadar devam etmektedir. Daha sonra meme yağ tabakası olarak bilinen yağlı stromal kompartıman içine gömülü dallı tüp şeklinde basit bir dizi olarak epidermisten aşağı büyümektedir (Cowin ve Wysolmerski 2010, Mikkola ve Millar 2006). Hormonlar kanal sisteminin büyümesini ve dallanmasını harekete geçirerek ve tüm meme sistemini dolduracak şekilde genişlemesine neden olmaktadır (Briskin ve O'Malley 2010, Robinson 2007). Pubertal meme gelişimi, öncelikle östrojen ve büyüme hormonunun sinerjik etkilerine bağlı olarak gerçekleşmektedir (Robinson 2007, Watson ve Khaled 2008). Yetişkin bireylerde kanal sistemi miyoepitelyal ve lumen epitel hücrelerinden meydana gelen basit iki-tabakalı hücreden oluşmaktadır. Meme bezlerinin gelişmesi ve involü olmasında üreme döngüleri sırasında oluşmaktadır. Gebelik esnasında progesteron aktivitesi kanala lümeni ile birlikte

düz olmayan yapıda olan üzümsü ya da alveolar hücreleri oluşturmak için terminal kanalcık ve lumen epitel hücrelerinin çoğalmasını sağlar (Anderson ve ark. 2007, Robinson 2007). Aynı zamanda alveolar epitel hücreleri süt oluşumu içinde uyarılmaktadır. Süt üretiminde ayrıca, büyük miktarlarda trigliserit, immünoglobülin, laktoz, proteinler, kalsiyum ve fosfor gibi minerallerin sentezi, taşınması ve salgılanması da gerekmektedir (Anderson ve ark. 2007). Süt salınımı doğum ile birlikte, progesteron seviyelerindeki düşme ve prolaktin seviyesindeki artış ile uyarılmaktadır (Anderson ve ark. 2007, Brisken ve O'Malley 2010). Süt salgısı, emme yoluyla ve sistemik olarak hipofiz bezinden salgılanan prolaktin ile lokal olarak devam etmektedir. Emme sona erdiğinde meme bezi, involüsyon olarak bilinen doku yenileme modeli vasıtasıyla gerilemektedir (Watson ve Kreuzaler 2011). Bu sürecin sonucunda doğum yapmamış bireydeki gibi basit duktal yapıya geri dönüş gerçekleşmektedir (Joshua ve ark. 2013).

Süt, neonatal dönemde iskelet sisteminin hızlı büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan tüm kalsiyum ve fosforu sağlamaktadır. Emme döneminde salgılanan sütün içeriğinde her gün 300-400 mg kalsiyum (salgılanan süt miktarına bağlıdır) bulunmaktadır (Kirby ve ark. 2011, Mamillapalli ve Wysolmerski 2010).

Laktasyon döneminde artan kalsiyum talebi maternal kalsiyum homeostazı ile sağlanır. Sonuç olarak laktasyon, kalsiyum ve kemik metabolizmasını içeren bir dizi adaptasyon ile devam eder (Wysolmerski 2010). Süt verme döneminde, gastrointestinal sistem tarafından kalsiyumun emilimini uyararak maternal hiperfaji aynı zamanda prolaktinin de salgılanmasına neden olur (Ajibade ve ark. 2010, Smith ve Grove 2002). Bu nedenle, laktasyon için gereken ekstra kalsiyumun bir kısmı diyetten gelir. Laktasyon sırasında böbrekler kalsiyumu tutar ve idrarla kalsiyum atılımı çok düşük seviyelere iner. Böylece kalsiyum idrardan geri kazanılır. Her ne kadar bazı mekanizmalar laktasyonda kalsiyum atılımını sınırlasa da süt yoluyla elimine edilen kalsiyum, kemiklerden sağlanan mobilizasyon ile tedarik edilmeye çalışılır ve böylece süte bulunan kalsiyumun büyük çoğunluğu maternal iskelet sisteminden salgılanmış olur (Kovacs ve Kronenberg 1997, VanHouten 2005). İnsanlardaki 6 aylık düzenli emzirme süresi boyunca, Kemik mineral yoğunluğu (BMD) % 5 -8 arasında azalmaktadır. Bu azalma tahmini olarak ayda % 1 -3 arasında bir oranda değişmektedir (Kovacs ve Kronenberg 1997). Süt salgısı insanlardan daha fazla olan ruminantlar, 3 haftalık laktasyondan sonra kemik kütlelerinin % 20-30'unu

kaybederler (VanHouten 2005, VanHouten ve Wysolmerski 2003). Bu sebeple keçilerde laktasyondaki kalsiyum metabolizması ve bu durumun genetik alt yapısı büyük önem taşımaktadır.

2.2. Kalsiyum Metabolizması

Kalsiyum vücutta en çok bulunan mineraldir ve vücutta toplam 1,2-1,4 kg kalsiyum bulunur (Goodman ve Quarles 2002). %1'i ekstrasüler sıvıda bulunurken %99'u iskeletin inorganik ve yapısal bölümünü oluşturmak üzere fosfat ile hidroksiapatit [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] kristalleri şeklinde kemikte yer almaktadır (Onat ve ark. 2006). Plazma kalsiyum miktarı 8,4-10,2 mg/dl (2,1-2,6 mmol/L) arasında değişmektedir. Plazma kalsiyumu vücutta; %5'i organik asitlerle (sitrat, fosfat ve diğer anyonlarla) kompleks halinde bulunurken, %45'i proteine (albumin (%80)-globulin (%20)) bağlı, %50'si de iyonize şeklinde bulunmaktadır (Richard ve Denise 2007). İyonize kalsiyum aktif formdur ve kalsiyumun iyonize olması pH ve protein yoğunluğuna bağlıdır (Aksoy 2000, Baysal 2009). Serumda iyonize olmuş kalsiyumun düzeyi de birçok evcil hayvanda yaklaşık 1,25-1,6 mmol/L (6,0-10,6 mg/dL) değerleri arasındadır (Kaneko ve ark. 1997).

İskelet yapısında hidroksi apatit şeklinde bulunan kalsiyum fosfat tuzlarının iki önemli fonksiyonu bulunmaktadır. İlki, yaşamsal öneme sahip iç organların korunmasını ve hareket kolaylığını sağlayan iskelet yapısını oluşturmak, diğeri ise böbrek ve ince bağırsaklardan yeterli kalsiyum emiliminin olmadığı durumlarda ekstrasellüler sıvıya kalsiyum ve fosfor sağlamaktır (Şimşek ve Kocabey 2002).

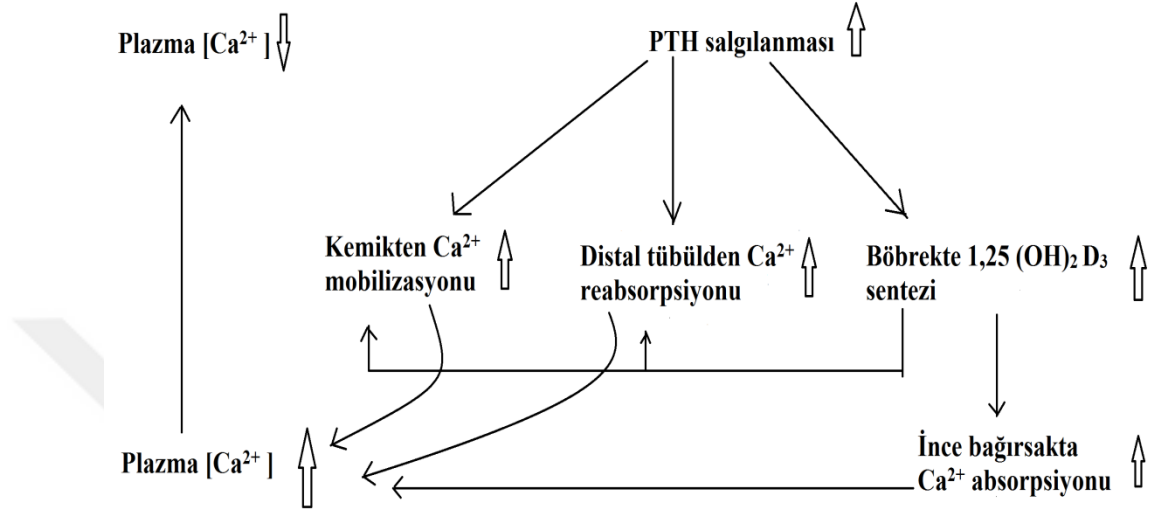
Vücutta iskelet sistemi başta olmak üzere yumuşak dokularda, hücre içi ve hücre dışı sıvılarda bulunan kalsiyum, organizmada meydana gelen biyolojik olayların pek çoğunda anahtar rol oynamaktadır (Kaneko ve ark. 1997). Kalsiyum; kas kasılması, kanın pıhtılaşması, enzim aktivitesi, sinirsel uyarım ve hormonların salınması ile hücre membranlarının geçirgenliği gibi biyolojik mekanizmalarda da önemli görev yapmaktadır. Bu nedenle, kalsiyum intrasellüler ve ekstrasellüler fizyolojik olaylarda oynadığı önemli rol ile omurgalı canlılarda homeostazisin devamını sağlamaktadır (Pineda 2003).

İskelet sistemi, hücre içi ve hücre dışı sıvılara kalsiyum sağlayan ana depo olarak fonksiyon görmektedir. Kandaki kalsiyum dengesinin sağlanması için iskelette bulunan toplam kalsiyum deposundan sadece %1 oranında kalsiyum hücre dışı sıvıya geçmektedir (Kaneko ve ark. 1997). Kan kalsiyum düzeyinin devamlılığının sağlanması için hormonal kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar paratiroid hormon (PTH), kalsitonin ve vitamin D (1,25-dihidroksikolekalsiferol) olmak üzere üç hormondan oluşmaktadır (Fidan ve Dünder 2007, Niranjana ve ark. 2002, Oleszek ve Marston 2000).

PTH, gastrointestinal sistemde intestinal kalsiyum ve fosfor emilimini hızlandıran D₃ vitamininin böbrekte 1,25-dihidroksikolekalsiferolden oluşumunu uyarmaktadır. Bu uyarım sonucunda da bağırsaktan kalsiyum ve fosforun emiliminin artmasına neden olmaktadır (Onat ve ark. 2006).

PTH iyonize kalsiyum miktarını arttırmakta ve fosfor düzeyini azaltmaktadır (Onat ve ark. 2006). PTH salgılanması kalsiyum tarafından düzenlenmektedir. İyonize kalsiyum düzeyinin herhangi bir nedene bağlı olarak azalması sonucunda PTH salgılanmasında ani bir artış gerçekleşmektedir. Kalsiyum seviyesinin normal aralığa dönmesiyle PTH'ın salgılanması da baskılanır (Fischer ve ark. 1973, Lopez ve ark. 1990). İyonize kalsiyum paratiroid hücrelerinde cAMP sentezini kısıtlamaktadır. Bu nedenle iyonize kalsiyum miktarındaki azalma cAMP miktarında artışa neden olduğundan hormon salınımına da neden olmaktadır. 1,25-dihidroksikolekalsiferole ait reseptörlerin paratiroid hücrelerde bulunması nedeniyle, 1,25-dihidroksikolekalsiferolün yüksek konsantrasyonunun da PTH'ın salgılanması ve sentezini baskılamaktadır (Onat ve ark. 2006).

Vücutta kalsiyum dengesi barsak ve böbrekten emilimi, salgılanması, kemikten rezorbsiyonu ve kemiğe reabsorbsiyonu olarak çeşitli şekillerde düzenlenmektedir. Yetişkin bireyler diyetle günlük ortalama 800-1200 mg kalsiyum almakta iken alınan bu kalsiyumun 400-500 mg vücudun ihtiyacını karşılamaktadır (Popovtzer 2005). Çiftlik hayvanlarının rasyonlarında da özellikle laktasyon döneminde mutlaka %5 oranından az olmamak üzere kalsiyum kaynağı kullanılır. Rasyonla alınan kalsiyumun %20-70 gibi büyük bir kısmı bağırsaktan emilimi gerçekleşirken bu miktar bireyin ihtiyaçlarına göre değişmektedir (Wills 1973). Günde yaklaşık 200 mg kadar kalsiyumun bağırsaktan kana geçişi sağlanmaktadır. (Şekil 2.1) (Pineda 2003).



Şekil 2.1. Kalsiyum hemostazı (Kayaalp 2005)

2.3. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör (CaSR) Geni

Ekstrasellüler kalsiyuma duyarlı reseptör (CaSR) ilk olarak 1993 yılında sığır paratiroid bezinden klonlanmıştır (Brown ve ark. 1993). Kalsiyum iyonlarını bağlayan ve hücrelerin hücre dışı kalsiyum konsantrasyonundaki değişikliklere tepki vermesini sağlayan G proteinine bağlı bir hücre yüzeyi reseptörüdür (Brown 1991, Brown ve MacLeod 2001). Kalsiyumun ekstrasellüler sıvıdaki değişimine bağlı olarak kalsiyumun G proteinine bağlanıp 7-transmemrandan geçişini sağlayan bir yüzey reseptörüdür (Brennan ve Conigrave 2009). Aynı zamanda koku, tad ve feromon sensörleri içeren G proteinine bağlı reseptör gen süper ailesinin alt grubunun bir üyesidir (Brown ve MacLeod 2001). CaSR ve bu alt grubun diğer üyeleri bakterilerdeki besin veya periplazmik bağlayıcı protein ailesine mensup olarak görünmektedir (Brown ve MacLeod 2001, Conklin ve

Bourne 1994, Oh ve ark. 1993). CaSR geni keçi de 1. kromozomda bulunmaktadır (Genbank 2013).

CaSR geni vücutta kalsiyum homeostazisini sağlayan esas faktörlerden birisidir. (Kantham ve ark. 2009, Molostvov ve ark. 2008, Tu ve ark. 2008). CaSR'nin en önemli rolü kalsiyum homeostazinin düzenlenmesi olmasına rağmen, kalsiyotropik olmayan dokularda CaSR eksprese edilmektedir. Bu dokularda CaSR çok sayıda hücrenel faaliyeti düzenlemektedir (Brown ve MacLeod 2001). Bu sebeple kan kalsiyum seviyesine CaSR geninin ne derecede etkilediğini bilmek tüm sistem bakımından oldukça önemlidir.

Santral sinir sisteminde CaSR; oligodendroglial hücrelerin olgunlaşması ve fonksiyonunun yanı sıra nöronal hücre büyümesinin düzenlenmesinde yer alır. Sinir uçlarında, plastisite ve sinir iletimi gibi sinaptik fonksiyonları düzenler (Ruat ve Traiffort 2013). Epidermiste, hücre-hücre yapışmasını ve farklılaşmasını düzenler (Tu ve Bikle 2013). Pankreasda CaSR, hücrenel adhezyon, hücre-hücre iletişimi ve insülin salgılanmasına aracılık eder (Squires ve ark. 2014). Kardiyovasküler sistemde kan basıncını düzenler (Schepelmann ve ark. 2015). Eritrositlerde CaSR varlığı henüz tarif edilmemiştir ve bu hücrelerde rolü belirsizdir (Ho ve ark. 1995). CaSR, paratiroid bezlerinde ekstraselüler kalsiyum değişikliklerine, böbrek tübüllerinde kalsiyumun taşınmasına ve kemik oluşumuna yanıt olarak PTH salınımını düzenler. Ayrıca paratiroid hormonu sekresyonu ve gen ekspresyonunun yanı sıra kalsiyum homeostazı, büyük oranda ekstraselüler CaSR tarafından düzenlenir (VanHouten ve ark. 2004). Başka bir ifade ile CaSR paratiroidlerde, ekstraselüler kalsiyumdaki değişikliklere yanıt olarak PTH salgılanmasını düzenler (Brown 1991, Brown ve MacLeod 2001). Böbrek tübüllerinde kalsiyumun tutulmasını düzenler ve böbrekte belirgin olarak eksprese edilir (Brown ve MacLeod 2001, Quamme 1982). Bununla birlikte yapılan sınırlı sayıdaki çalışma CaSR geninin lökositlerdeki ekspresyon seviyesinin enflamasyonla ilişkilendirilebileceğini göstermektedir (İvona ve ark. 2000, Tingting ve ark. 2013). CaSR aynı zamanda kemik döngüsünün düzenlenmesi, 1,25-dihidroksivitamin D'nin renal üretimi ve gastrointestinal kalsiyum emilimine de katılabilir (Brown 1991, Brown ve MacLeod 2001). Memede ise CaSR, laktasyon döneminde süte kalsiyumun taşınmasını sağlar (Mamillapalli ve ark. 2013).

Memede süte kalsiyumun taşınmasında önemli rol oynar. Bu taşınım meme epitel hücrelerinin (MEC) içerisinde yüksek konsantrasyon da bulunan kalsiyumun transferi ile gerçekleşmektedir. Kalsiyumun hücre içersindeki artışına karşın, MEC'ler toksisiteyi önlemek için serbest kalsiyum konsantrasyonlarının da korumalıdır. Süt içerisine paralel olarak kalsiyum geçişi bulunmasa da (Neville 2005, Shennan ve Peaker 2000), MEC'de transepitelyal süreç ile kalsiyumun hücre dışına salınması gerçekleşmektedir. Transepitelyal proseste MEC'lerden kalsiyum salınmaktadır. MEC'ler içindeki kalsiyum hakkında fazla bilgi bulunmamakla beraber bu kalsiyumun salınımı prosesinin aktif iyon kanalları üzerinden gerçekleştiği bilinmektedir (Shennan 1998, Shennan ve Peaker 2000). Süt kalsiyumunun çoğu, kazeinlere (Neville 2005) ve fosfoproteinlere (Farrell ve ark. 2002) bağlıdır. Bu nedenle, yaygın olarak kabul gören görüş, kalsiyumun öncelikle kazein miselleri içerisinde bulunan salgı yolu ile süte girdiği ve serbest kalsiyumun neredeyse tamamen apikal membrandan taşınmakta olduğu belirtilmiştir (Neville 2005, Neville ve Watters 1983). MEC'lerde kalsiyum taşınmasından sorumlu spesifik moleküllerle ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar ile, kalsiyumun ATPaz 2 (PMCA2)'nin aktivasyonunu laktasyon döneminde arttırdığı öne sürülmüştür (Reinhardt ve ark. 2004, Reinhardt ve ark. 2000). PMCA2'nin, laktasyon döneminde MEC'lere dolayısıyla süte, kalsiyum taşımada görevli olduğu belirtilmiştir (Joshua ve ark. 2007). Reinhardt ve ark. (2004) plazma membranı kalsiyum PMCA2'nin süt içine normal kalsiyum salınımı için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan başka bir çalışma ile de CaSR'nin aktivasyonu, plazma PMCA2 pompasının aktivitesini arttırarak süt içine kalsiyum taşınmasını uyarmaktadır (VanHouten ve ark. 2004). Sonuç olarak laktasyon sırasında MEC'lerin bazolateral yüzeyinden süte kalsiyum taşınması CaSR geni ile düzenlenmektedir (Ardeshirpour ve ark. 2006, VanHouten ve ark. 2004).

CaSR'nin aktivitesi fosfatidilinositol-kalsiyum ikinci mesaj sistemini tetikleyen G proteini ile gerçekleşir. Kalsiyum sensör protein ekstraselüler iyonik kalsiyum konsantrasyonundaki küçük değişiklikler ile aktifleşerek paratiroid bezinin serum kalsiyumunu düzenlemesini sağlar (Nalefski ve Falke 1996). Bununla birlikte hücrel farklılaşma, apoptozis ve hormon sekresyonu gibi çok önemli metabolik olaylarda da rol oynar (Kantham ve ark. 2009, Molostvov ve ark. 2008, Tu ve ark. 2008). CaSR geninin paratiroid hormon sekresyonu ve renal kalsiyumun düzenlenmesinde rol oynayan

paratiroid bezlerde ve böbrekte yüksek düzeyde eksprese olduğu bilinmektedir (Joshua ve ark. 2013)

CaSR organlara kalsiyumu algılama kabiliyetini kazandırarak, vücudun entegre kalsiyum homeostazını yönlendirir. Sistemik kalsiyum homeostazında yer almayan çok çeşitli organlarda da tespit edilmiştir (Brown 1991, Brown ve MacLeod 2001). Bu bölgelerde, iyon ve su taşımacılığı, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi bir dizi hücre prosesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Nonparatiroid bölgelerin birçoğunda CaSR'nin işlevlerinden biri, paratiroid hormonu ile ilgili proteinin (PTHrP) üretiminin düzenlenmesi olarak görünür. PTHrP, hormonal hiperkalsemiyi malignitenin klinik sendromunun nedeni olarak keşfedilen bir sitokindir (Philbrick ve ark. 1996, Strewler 1997). PTH ve PTHrP genleri birbirleriyle ilişkilidir ve her ikisi de ortak bir atasal genin kopyalanmasından türemiştir. PTHrP, klasik bir peptid hormonu görevi gören PTH'in tersine normal olarak, hücresel işlevin lokal parakrini veya otokrin modülatörü gibi davranır. Bununla birlikte, her iki peptid de ortak tip 1 PTH / PTHrP reseptörüne bağlanır ve etkinleştirir (Philbrick ve ark. 1996). Dolayısıyla PTHrP dolaşıma girerse, sistemik kalsiyum metabolizmasını PTH'nun hareketlerini taklit ederek değiştirebilir. Emzirme sırasında meme kan dolaşımından büyük miktarda kalsiyumu süte koordine eder (Horst ve ark. 1989, Shennan ve Peaker 2000).

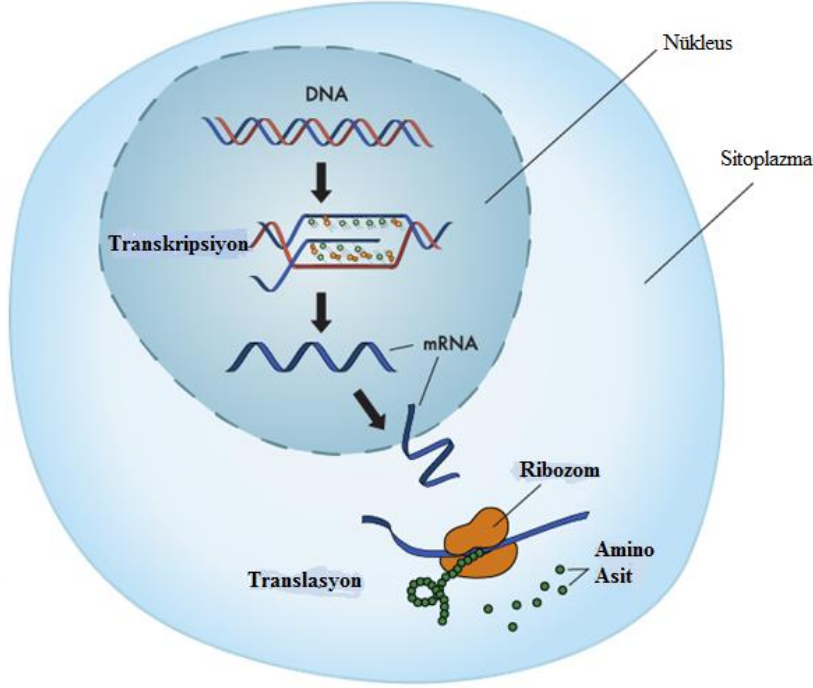
Laktasyon sırasında ihtiyaç duyulan kalsiyum, memeden alveoler hücreler yoluyla süte aktarımı ile temin edilmektedir. Kalsiyum sitotoksitesini önlemek için, laktasyon döneminde trans-sellüler kalsiyum miktarının düzenlenmesi ve kalsiyumun tutulması gerekmektedir. İnekteki meme bezi süt için yeterli kalsiyumu 12 saatte depoladığı göz önüne alındığında bu sitotoksitenin meydana gelmesi çok zordur (Swanson ve ark. 1956). Laktasyon döneminde olan ineklerde meme dokusundaki değeri 30-40 $\mu\text{mol Ca/g}$ 'dır (Baumrucker 1978). Meme bezinde kalsiyumun depolanması, doğumda ölümcül hipokalsemiye neden olabileceğini düşündürmektedir (Horst ve ark. 1997, Reinhardt ve ark. 1988). Meme bezindeki büyük hücre içi kalsiyum havuzunun golginin çevresinde yoğunlaştığı düşünülmektedir (Cameron ve ark. 1980). Endoplazmik retikulum ve golgideki mmol kalsiyum normal protein sentezi, işlenmesi ve salınımı için gereklidir (Duncan ve Burgoyne 1996, Taylor ve ark. 1997). Sıçan ve inek sütü sırasıyla 60 ve 30 milimolar kalsiyum miktarı bulunmaktadır. Bu kalsiyumun üçte ikisi, kazein miselinin bir

parçası olarak süte ulaşmaktadır. Dolayısıyla, kalsiyum girişinin endoplazmik retikulum ve golgiyi destekleyici bir mekanizmaya sahip olduğunu düşündürmektedir. Buna ek olarak, hücreden süte doğru geçişte taşınması gereken miktar 1-4 mmol serbest kalsiyumdur (Neville ve ark. 1994, Neville ve Watters 1983). Golgi plazma membranı üzerinde, PMCA2 ile süte kalsiyum geçişini düzenlemektedir (Carafoli 1997, Carafoli ve Stauffer 1994). Ayrıca, kalsiyumun transepitelyal akışı süt içine aktarılmasında meme epitel hücreleri tarafından kullanılan moleküler mekanizmalarında çok azı bilinmektedir (Joshua ve ark. 2013). Bu sebeple süte sekrete edilen kalsiyum seviyesine olan etkisini belirlemek tüm metabolizmanın işleyişinin kalsiyum bakımından tanımlanması adına önemlidir.

Kalsiyumun meme bezinden süte geçişi sırasında transport yolu kan plazmasıdır. Kanda bu geçişe bağlı olarak yani laktasyonun erken ya da geç dönemlerinde hipokalsemi şekillenebilmektedir. Özellikle Damascus keçisi gibi sütçü özelliği ile tanınan ırklarda böyle sorunlara sıklıkla rastlanabilmektedir. Laktasyon süresince kaybolan kalsiyumun kandaki değişimi ile ilgili henüz bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Özellikle laktasyon süresince kandaki kalsiyum seviyesindeki değişimin gen ekspresyonu ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

2.4. Gen Ekspresyonu

Genel bir tanım olarak DNA'da bulunan genetik bilginin protein düzeyinde ifade edilmesi Gen Ekspresyonu olarak bilinmektedir. Proteine dönüşüm sürecindeki ilk basamak, DNA'daki bilginin mRNA'ya aktarılmasıdır. mRNA'ya aktarılan bu bilginin miktar ve içeriğiyle ilişkili olarak protein sentezi gerçekleşmektedir. Kısaca hücre içinde bilgi akışı DNA'dan RNA'ya son basamak olarak ta protein formuna geçişi şeklinde gerçekleşmektedir (Çelebiler 2006) (Şekil 2.2).

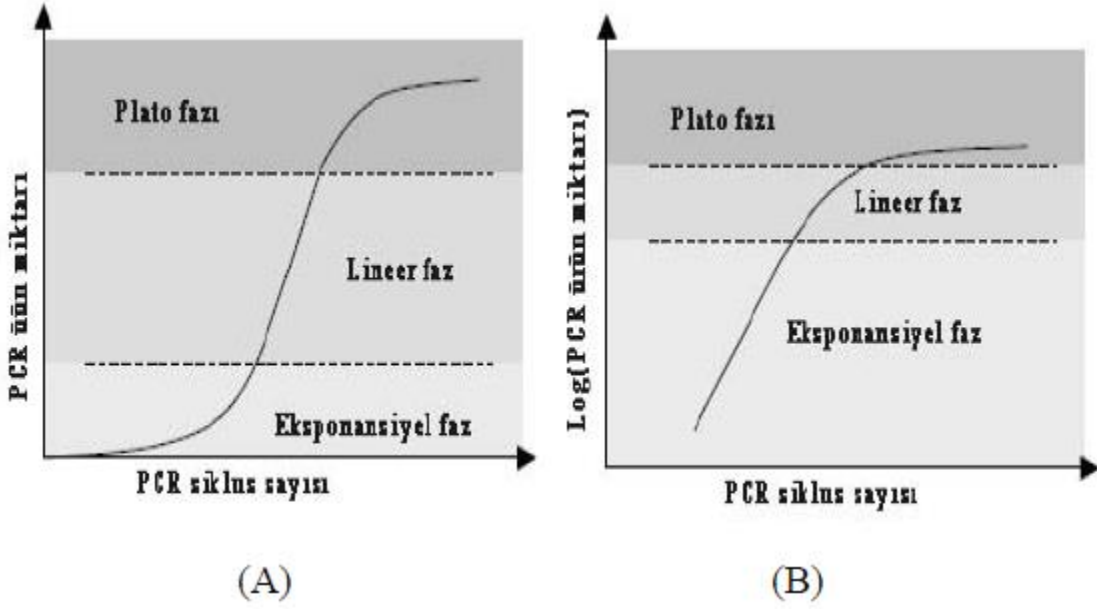


Şekil 2.2. DNA'dan proteine bilgi aktarımı (Anonim 2016)

Moleküler yöntemlerden Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-qPCR) metodu mRNA miktarının ölçümünü sağlayarak, genin aktivasyonu hakkında bilgi vermektedir. DNA'dan sentezlenen mRNA'lar Revers Transkriptaz enziminin yardımıyla cDNA'ya dönüşür ve gene spesifik primer ile PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gerçekleştirilir. Bu yöntem kullanılarak gen ekspresyonu semikantitatif veya kantitatif olarak analiz edilebilmektedir. RT-qPCR analizlerinde Real Time PCR cihazları kullanılmaktadır. Bununla birlikte bütün genlerin eş zamanlı olarak kantitatif ekspresyon analizlerinin yapılabilmesi sağlanmaktadır (Yüzbaşıoğlu 2008).

RT-qPCR, nükleik asit artışını eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir teknolojidir. RT-qPCR yöntemi gen ekspresyon analizinde duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir (Heid ve ark. 1996). SYBR Green DNA çift sarmalına bağlanarak floresan ışığa yapar veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob dizileri aracılığıyla amplifikasyon miktarını gözlemlenmede yardımcı olmaktadır. SYBR Green her bir PCR döngüsü sonunda meydana gelen ürün miktarının ölçülebilmesi ve kantitatif analizlerin yapılmasında

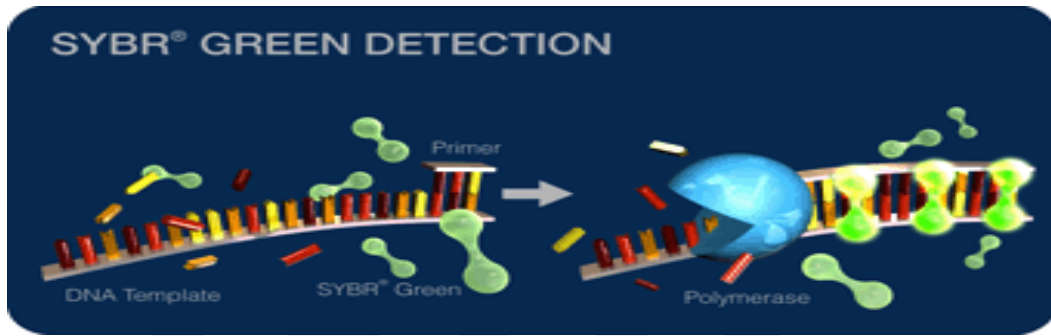
kullanılmaktadır (Bustin ve Mueller 2005, Nolan ve ark. 2006). PCR Ekspansiyonel faz, lineer faz ve plato fazı olarak üç fazdan oluşmaktadır.



Şekil 2.3. (A) RT-qPCR reaksiyonu PCR ürün miktarına karşı PCR döngü sayısının teorik grafiği: Ekspansiyonel faz, lineer faz ve plato fazı. (B) PCR ürün miktarının logaritmasına karşı PCR döngü sayısının teorik grafiği (Heid ve ark. 1996).

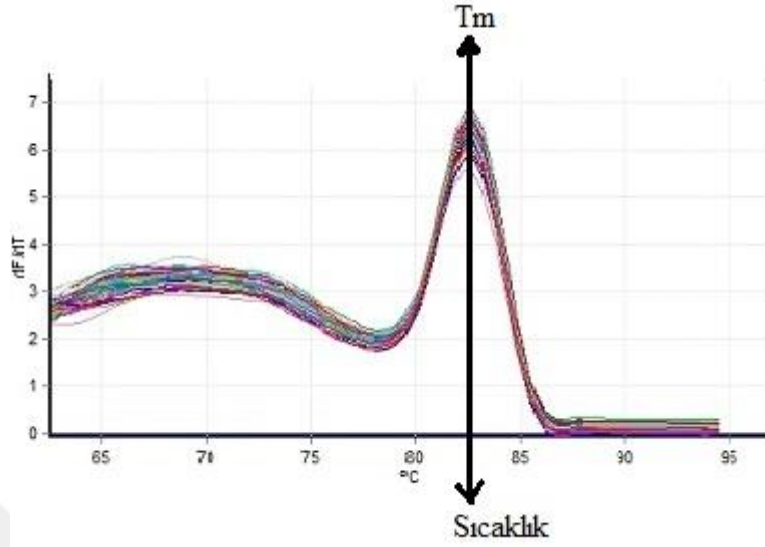
PCR'ın ilk segmenti olan ekspansiyonel fazda ortamda yeterince reaktif bulunduğu için ürün çoğalmaya başlar; ikinci segment olan lineer fazda ürün artışı devam eder ancak reaktif yeterliliği azalmaya başlar; üçüncü ve son fazda ortamdaki reaktif tükendiği için çoğalma durur. Son segment olan plato fazında reaktifler tükenmesine karşılık ürün miktarı değişmez. RT- qPCR'ın ekspansiyonel fazında ideal koşullar altındaki PCR ürünlerinin miktarı başlangıçtaki kalıp miktarı ile orantılıdır (Gibson ve ark.1996, Heid ve ark. 1996) ve bu faz sırasında ortam koşulları optimum ise her döngüde ürün iki katına çıkar. Bu miktarı gözlemek için DNA bağlayan boyalar, veya hibridizasyon problemleri kullanılır (Bustin 2000). SYBR Green'in bu bağlanması sonucunda ürün miktarıyla orantılı olarak floresans açığa çıkar (Şekil 2.4). Gen ekspresyonunun kantitasyonu için uygun primer kullanımı SYBR Green tekniğinde oldukça önemli bir basamaktır ve başarılı şekilde gerçekleştirilmesi için; primerin sadece cDNA'ya spesifik bağlanması, özgül olmayan amplifikasyon ürünleri ve primer-dimer oluşturmaması, RNA izolasyonu sırasında DNA

kontaminasyonun gerçekleşmemesi gibi hususlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Özgül amplifikasyon ürünü elde etmek için dikkat edilmesi gereken unsurlar; primerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi, 120-250 baz arasında değişen ampikon uzunlukları arasında bulunması ve amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesidir (Yüzbaşıoğlu 2008).



Şekil 2.4. SYBR Green metodu çalışma prensibi (Anonim 2015)

SYBR Green'in özgül amplifikasyon elde etmek için bir spesifitesi bulunmamaktadır. SYBR Green özgül çift zincirli DNA moleküllerine de bağlanabilmektedir (Bustin ve Mueller 2005). Bu nedenle SYBR Green'in bağlanması sonucu oluşan floresans artışı her zaman özgül amplifikasyon ürünlerini temsil etmeyebilir. Elde edilen bu amplifikasyon ürünlerinin özgün olup olmadığı agaroz jel elektroforezi yardımıyla kontrol edilmektedir. Ayrıca özgül olmayan amplifikasyon ürünlerini tespit etmek için RT- PCR cihazında "erime eğrisi" (melting curve) analizi yapılabilmektedir. Her DNA molekülünün kendine özgül bir "erime sıcaklığı (T_m)" değeri bulunmaktadır. Amplifikasyon gerçekleştikten sonra sıcaklık miktarını yavaşça arttırılarak belirli aralıklarla floresans miktarının tespiti yapılmaktadır. DNA çift sarmalı denature olmaya başladığında SYBR Green'in floresans verme özelliğide azalmaya başlamaktadır. SYBR Green'inin floresans verme özelliğinden ve buna bağlı olarak erime eğrisinden faydalanılarak amplifikasyonun özgüllüğünün kontrolü sağlanmaktadır. T_m değerini hesaplanmasında en çok başvurulan yöntem; erime eğrisinin zamana karşı oluşturduğu grafikdir (Wong ve Medrano 2005) (Şekil2.5).



Şekil 2.5. Erime Eğrisi Grafiği

Real Time PCR uygulamalarında eşik döngü değeri önemli bir parametre olup eşik döngü sayısı Ct (threshold cycle) olarak tanımlanır. Ct değeri başka bir ifade ile, amplifikasyon sırasında meydana gelen floresansın eşik değerinin döngü sayısı ya da ekspresyon işleminde meydana gelen ilk anlamlı artışın gerçekleştiği noktayı belirtmektedir. Farklı biçimlerde gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında kullanılan kalıp örneklerin miktarlarının belirlenmesinde Ct değerleri karşılaştırılarak yapılmaktadır (Wong ve Medrano 2005).

Bu çalışma laktasyonda olan Damascus keçilerinde, kan kalsiyum seviyesinin laktasyon süresince değişimini ve bu değişimin CaSR gen ekspresyonu ile olan ilişkisini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Çalışma Hatay ili Aşağıoba Mahallesi'nde yetiştirici elinde bulunan Damascus ırkı 10 baş keçi üzerinde yürütülmüştür. Çalışma materyali olan keçiler 4m²/baş zemin alanlı ağılda bulunan 2. yada 3. doğumlarını yapanlar arasından seçilmiştir. Seçilen keçiler ikiz doğum yapmış olup çalışma boyunca konsantre yem ile beslenmişlerdir. Çalışmaya başlamadan önce tüm keçiler genel sağlık yönünden muayene edilmişler ve sağlıklı olanlarda çalışmaya başlanılmıştır.

3.2. Örneklerin Toplanması

Laktasyonun 1, 3, 5 ve 7. aylarında her bir keçiden kan örnekleri toplanmış ve bu örneklerin plazma ve lökositleri ayrılmıştır. Plazma ayrımı için Etilen Diamin Tetra Asetik Asit(EDTA) li tüplere alınan 5 ml kan örnekleri 15 dk +4°C' de 3000 rpm'de santrifüj edilmiş ve üstte kalan plazma numunesi ependorf tüplere alınarak -80°C'de analizler yapılana kadar saklanmıştır. Lökositler ise plazma ayrılan örneklerden yine pipet vasıtasıyla mümkün olduğunca eritrosit tabakaya bulaşmayacak şekilde ayrı bir falkon tüpe alınmıştır. Falkon tüplerdeki lökositlerin üzerine 5 ml eritrosit cell lysis bufer solüsyon ilave edilerek orbital shaker'da 10 dk çalkalandıktan sonra +4°C' de 6000 rpm'de santrifüj edilerek lökositler dibeye çöktürülmüştür. Süpernatant dökülerek hücre peleti oluşturulmuştur. Bu işlem ikinci defa uygulanarak saf lökosit hücre peleti elde edilmiş ve bu lökositler önce sıvı azota ardından da -80°C'de analizler yapılana kadar saklanmıştır.

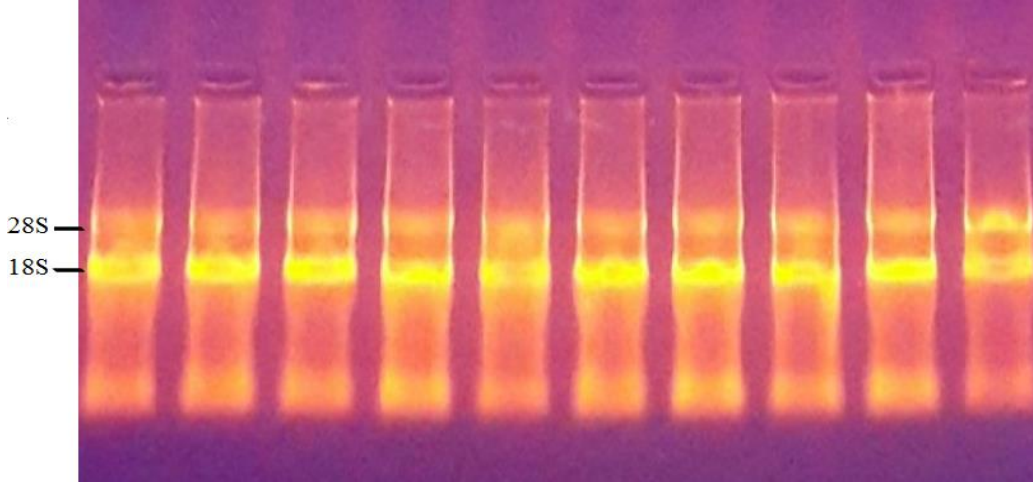
3.3. RNA İzolasyonu

– 80°C’den çıkarılan lökosit hücre peletinin üzerine 1 ml trizol ilave edildikten sonra lökositlerin parçalanması için 30 sn sonikasyon 30 sn soğutma protokolüne göre 3 siklus sonikasyon uygulanmıştır. Daha sonra TRI-Reagent protokolüne göre (Protokolüne no: T9424, Sigma- Aldrich, USA) RNA izolasyonu yapılmıştır. İlgili protokole göre elde edilen total RNA peletinin üzerine 50 µl DEPC su ilave edilerek nükleik asitölçerde (Merinton SMA 1000 UV Spectrophometer, Pulton Tech. Ltd., China) konsantrasyon ve saflık ölçümleri yapılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. RNA konsantrasyon ve saflık miktarları

Özellik	Laktasyonun 1. ayı	Laktasyonun 3. ayı	Laktasyonun 5. ayı	Laktasyonun 7. ayı
Konsantrasyon (ng/ µl)	448,28±227,76	652,62±193,12	722,29±247,43	504,80±142,83
Saflık (A260/280)	1,99 ± 0,23	1,87 ± 0,16	1,85 ± 0,09	1,84 ± 03

Konsantrasyonu 125 ng/µl’ den küçük olan örnekler kullanılmayarak tekrar izolasyon yapılmıştır. Konsantrasyon ve saflık bakımından uygun olan örnekler jel-elektroforezde koşturularak RNA bütünlüğü bakımından kontrol edilmişlerdir (Şekil 3.1). 18S ve 28S bantları bütün olarak tespit edilen örneklerde cDNA dönüşüm işlemine başlanmıştır.



Şekil 3.1. RNA jel elektroforez görüntüsü

cDNA dönüşümünün ilk basamağı olarak tüm örnekler DNase ile muamele edilmişlerdir. Bunun için 1 µl RNA, 1µl 10xReaction Buffer with MgCl₂, 1µl DNase I ve 7µl Nuclease free su bir tüp içinde 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. Ardından 1 µl 50 mM EDTA ilave edilen tüpler 65°C’de 10 dk inkübasyona bırakılmışlardır. Böylece örneklerdeki olası DNA kontaminasyonu engellenmiştir. cDNA sentezi için; total RNA’dan 5µl, oligo (dT) Primerden 1µl, 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibito, 2µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl RevertAid M-MuLVRT ve 6 µl Nuclease free su ilave edilen tüpler 60°C’de 42 dk, 25°C’de 5 dk, 42°C’de 60 dk ve 70°C’de 5 dk inkübe edilen protokolu uygulanmıştır. Oluşan cDNA örnekleri son hacim 100 µl ulaşacak şekilde DEPC’li su ile sulandırılarak RT- qPCR uygulamaları için -20°C’de saklanmıştır.

3.4. Reverse Transkripsiyon- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- qPCR)

CaSR geninin ekspresyon seviyesini belirlemek için RPLP0 geni internal kontrol olarak kullanılmıştır. Her örnek duplike olarak amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon için 5µl cDNA, 10 µl SYBR Green Master Mix (Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix, Bio- Rad, USA), 4 µl Primer (Forward- Reverse) ve 1 µl Nuclease free su ile hazırlanan 20 µl’lik örnekler RT-qPCR’da amplifiye edilmişlerdir. RT-qPCR protokolü;

10 dk 95°C’de, 15 sn 95°C’de, 60 sn 60°C’de (40 siklus) ve 30 sn 72°C olarak ayarlanmıştır. Kullanılan primerlerin büyüklükleri ve sekansları Çizelge 3.2.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. CaSR ve RPLP0 genleri primer sekansları

Gen		Sekans	Kaynak
CaSR	Forward	CGAGACGCCTTACATGGATTAT	Bu çalışmada dizayn edilmiştir.
	Reverse	TTGTAGGGCATGGGCAATAG	
RPLP0	Forward	CAACCCTGAAGTGCTTGACAT	Finot ve ark.(2011)
	Reverse	AGGCAGATGGATCAGCCA	

Çalışmada RT-qPCR analizleri amacıyla genlerin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerinden Primer-BLAST aracılığıyla belirlenmiştir.

3.5. Plazma Kalsiyum Ölçümü

Plazma kalsiyum seviyesini belirlemek için; 50 ml’lik cam balonlarda 0,5 gr plazma örneklerinin üzerine 10 ml Nitrik Asit ilave edilerek 6 saat süreyle kapalı devre yaş yakma uygulanmıştır. Daha sonra çekerocak altındaki geri soğutucuda toplanan nitrik asitten sonra cam balonlara 10 ml ultra saf su ilave edilerek örnekler soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan örnekler 1 numara Watmann filtresinden geçirilerek 50 ml’lik falkon tüplere alınmıştır. Falkon tüplerdeki örnekler 25 ml hacme ulaşana kadar ultra saf su ile tamamlanmıştır. İlgili örnekler için kalsiyum ölçümü Mustafa Kemal Üniversitesi Teknoloji ve Ar-Ge Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürlüğünde bulunan MP- AES (Agilent Tech, USA) cihazında yapılmıştır.

MP- AES, mikrodalga ile indüklenmiş plazmadan oluşmaktadır. Büyük ve küçük elementlerin aynı anda birden fazla analiz tayinin sağlayan bir yöntemdir. MP- AES cihazı içindeki silindirden sağladığı azotu kullanarak veya ortam havasından çıkarılan bir plazma deşarjı üretmek için mikrodalga enerjisi kullanır. MP-AES ölçümlerinde kullanılacak numuneler plazma ile etkileşimden önce nebulize edilir. Atomize edilmiş numune

plazmadan geçer ve elektronlar uyarılarak yükselirler. Yayılan elektronlar zemine geri dönerken ışık bir spektruma ayrılır ve her emisyon çizgisinin yoğunluğu dedektörde ölçülür (Anonim 2017).

MP- AES cihazında ölçüm gerçekleştirilmeden önce 1000 ppm'lik bir Multi IV standartı hazırlanmıştır. . Hazırlanan standart 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 (ppm) şeklinde seyreltilerek %0,5 HNO₃ içeren ultra saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hesaplanarak hazırlanan standart ile kalibrasyon grafiği (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 (ppm)) oluşmuştur. Cihaz çalışma koşulları; Uptake time 30 sn, Rinse time 15 sn, stabilization time 25 sn, Pumpspeed 15 rpm, dalga boyu 393 nm, nebulizer basıncı 120 kPa olarak ayarlanmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında verilerinin değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc. ABD) paket program kullanılmıştır. Plazma kalsiyum değeri için gruplar arasındaki farklılığın önem kontrolü Friedman testi ile belirlenirken, ikili gruplar arasındaki farklılığın karşılaştırması ise Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Gen ekspresyonu verileri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak ve Schmittgen 2001) yöntemine göre değerlendirilerek Fold Change ve Fold Regulation olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

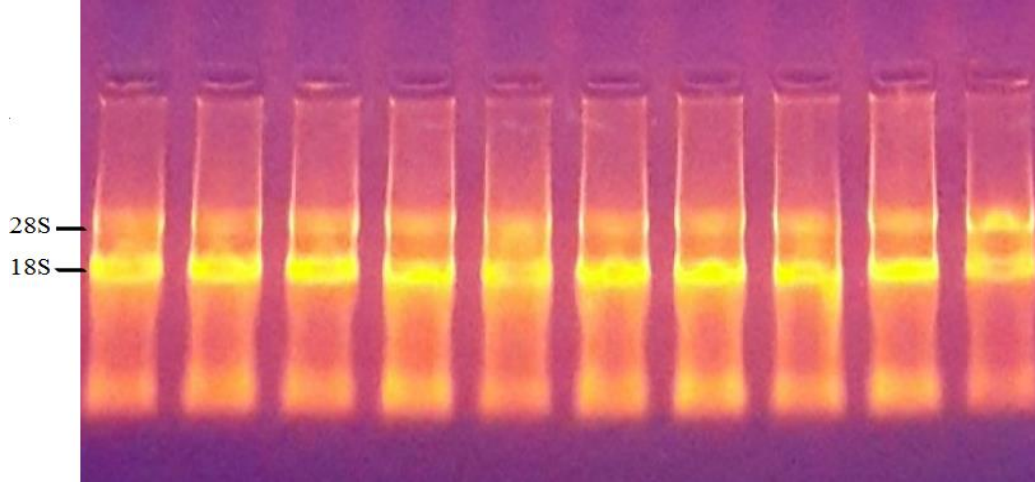
4.1. RNA İzolasyonu

Laktasyon sırasında lökositlerden elde edilen RNA konsantrasyon ve saflık bakımından ölçümü Nükleik asit ölçer ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. RNA konsantrasyon ve saflık miktarları

Özellik	Laktasyonun 1. ayı	Laktasyonun 3. ayı	Laktasyonun 5. ayı	Laktasyonun 7. ayı
Konsantrasyon (ng/ μ l)	448,28 \pm 227,76	652,62 \pm 193,12	722,29 \pm 247,43	504,80 \pm 142,83
Saflık (A260/280)	1,99 \pm 0,23	1,87 \pm 0,16	1,85 \pm 0,09	1,84 \pm 0,03

Nükleik asit ölçümü gerçekleştirilen RNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. RNA jel elektroforez görüntüsü

4.2. Plazma Kalsiyum Ölçümü

Laktasyon boyunca (1, 3, 5 ve 7. aylarda) alınan plazma örneklerinin kalsiyum seviyesi MP-AES cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar aylara göre sırasıyla 9,63; 9,57; 8,64 ve 8,32 mg/dl olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Laktasyonun 1. ve 3. ayına göre diğer aylarda anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($P<0,05$).

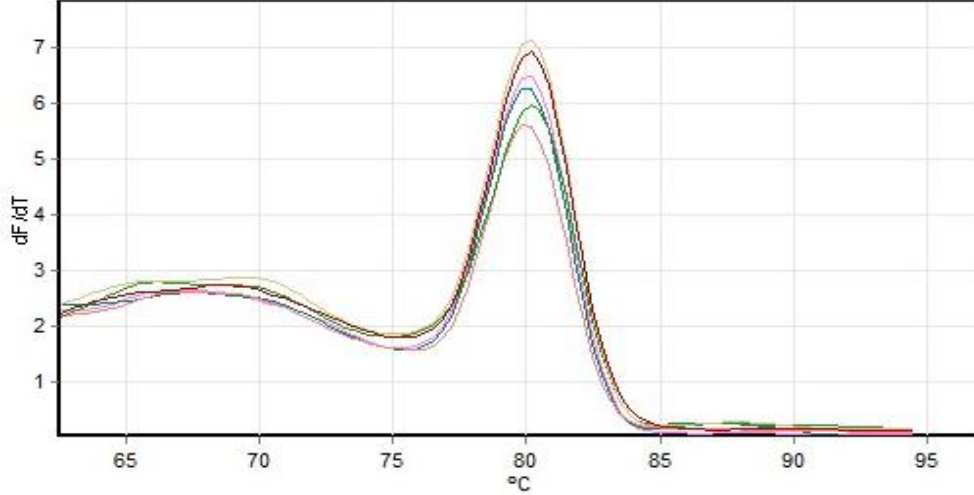
Çizelge 4.2. Laktasyon dönemindeki plazma kalsiyum miktarları (Median (Percentile % 25 75)) (n=10)

Özellik	Laktasyonun 1. ayı	Laktasyonun 3. ayı	Laktasyonun 5. ayı	Laktasyonun 7. ayı	P
Plazma Kalsiyum seviyesi (mg/dl)	9,63 (8,49-10,07) ^a	9,57 (8,58-10,73) ^a	8,64 (8,09-9,31) ^b	8,32 (7,32-8,81) ^b	0,021

^{a, b}: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar birbirinden farklıdır.

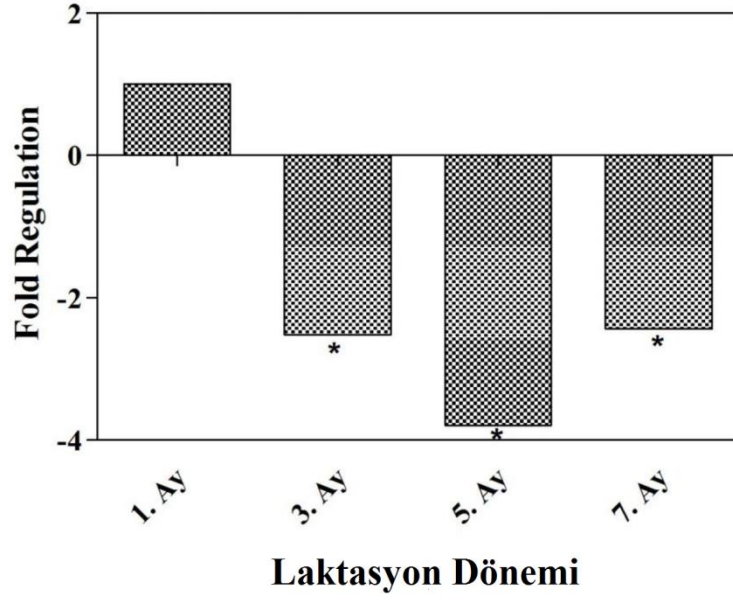
4.3. CaSR Gen Ekspresyon Seviyesi

Laktasyon döneminde elde edilen örnekler RT- qPCR’da amplifiye edilmişlerdir. Bu reaksiyon sonucunda “erime eğrisi” protokolü de uygulanarak olası “primer dimer” veya “hedef olmayan gen bölgesi” çoğaltılma durumu da kontrol edilmiştir (Şekil 4.2).

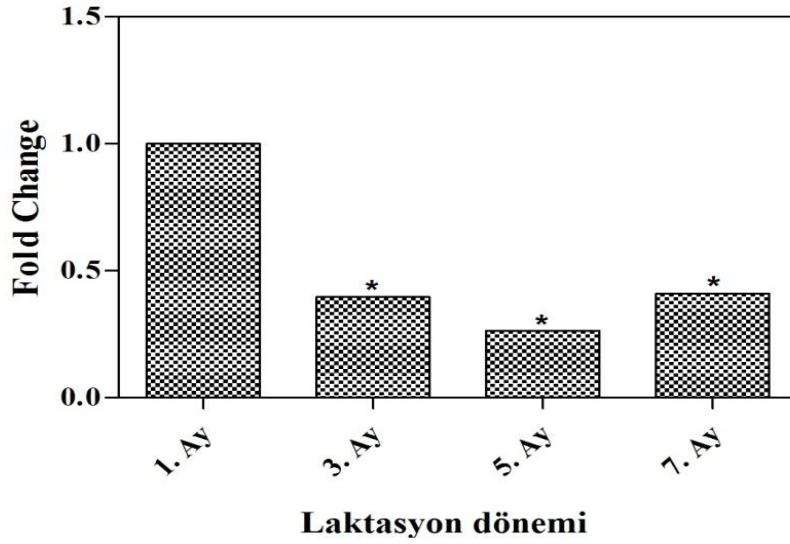


Şekil 4.2. CaSR geninin erime eğrisi grafiği

RT- qPCR da analizleri yapılan CaSR genine ait ekspresyon seviyesi Fold Change ve Fold Regulation olarak gösterilmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4). Laktasyonun 1. ayı kontrol olarak kabul edildiği zaman diğer aylarda CaSR geninin ekspresyon seviyesinde önemli düzeyde down-regülasyon olmuştur ($P < 0,05$).



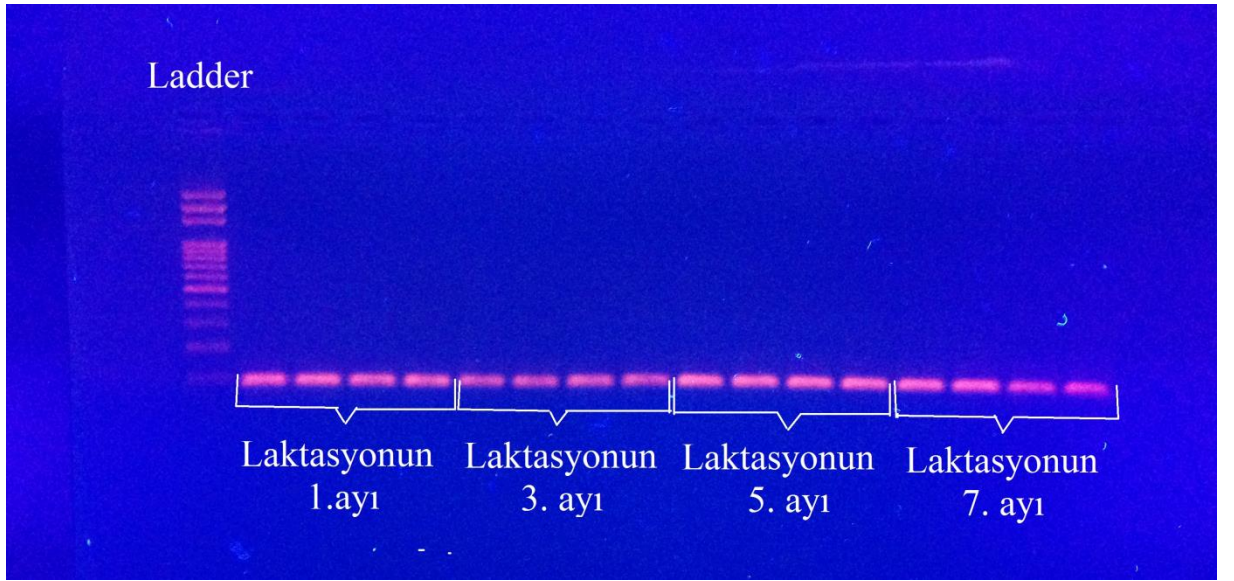
Şekil 4.3. CaSR geninin laktasyon dönemindeki ekspresyon seviyesi (Fold Regulation)



Şekil 4.4. CaSR geninin laktasyon dönemindeki ekspresyon seviyesi (Fold Change)

Laktasyon sırasında artan kalsiyum talebini karřılamak için kemikten kana kalsiyum geçiři de artmaktadır. Buna baęlı olarak CaSR genin ekspresyon dűzeyi de artmakta ancak laktasyonun ilerleyen dűnemlerinde artan kemik kaybını ۆnlemek için CaSR'nin ekspresyon seviyesi de azalmaktadır.

RT-qPCR sonucunda elde edilen ۆrünler hedef genin ۆęalıp ۆęalmadıęını test etmek için agaroz jele yۆklenerek elektroforezde yۆrűtűlműřtűr. Elde edilen gűrűntűde sadece CaSR geninin ۆęaltıldıęı tespit edilmiřtir (řekil 4.5).



řekil 4.5. CaSR geni RT-qPCR ۆrűnű jel elektroforez gűrűntűsű

5. TARTIŞMA

Keçi sütü içeriği bakımından insan sağlığı için oldukça önemlidir bu nedenle yetiştiriciliği yıllar geçtikçe sürekli bir artış göstermektedir. İçeriğinde laktoz, protein, yağ ve mineral madde (kalsiyum, magnezyum, fosfor vs.) gibi birçok besleyici unsur bulunmaktadır (Çoşkun ve Öndül 2004). Bir başka deyişle keçi sütü, neonatal büyüme için gerekli olan kalsiyum dahil tüm besin maddelerini içermektedir (Kovacs 2005, Wysolmerski 2010). Sütteki kalsiyum oranı %13 olup laktasyon süresince bu oran değişkenlik göstermektedir. Zira sütle eksrete olan kalsiyumun CaSR gen regülasyon mekanizmaları ile kompanse edilmeye çalışıldığı düşünülmektedir.

Gebelik sırasında keçilerde kalsiyum ihtiyacı günde 10,5 g iken laktasyon döneminde bu miktar günde 30 g'a kadar yükselmektedir (Kessler 1999). Doğumla birlikte laktasyonun başlaması ile kalsiyum ihtiyacı artmaktadır. Her litre süt ile 1-1,5 g kalsiyum atılmaktadır (Allen ve Samson 1985) ve doğum sonrası erken dönemde kalsiyum mobilizasyonundaki yetersizlik, ruminantlar için önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu kritik süre boyunca kana kalsiyum sağlamak için kemikten kalsiyum mobilizasyonunun arttığı yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Liesegang ve ark. 2006, Liesegang ve ark. 1998). Brendehaug ve Abrahamsen (1986), Norveç'te yaşayan laktasyon dönemindeki keçilerden süt örnekleri olarak kalsiyum miktarının ölçümünü gerçekleştirmişler ve laktasyon dönemindeki keçilerin sürekli sütle birlikte kalsiyum kaybettiklerini bildirmişlerdir. Fredeen ve ark. (1988), keçilerde kalsiyum emiliminin laktasyon ile yükseldiğini daha sonra zamanla azaldığını bildirmişlerdir. Fleet ve Peaker (1978), laktasyon döneminde bulunan keçilerden süt örnekleri olarak yaptıkları çalışma da kalsiyumun miktarının ilk dönemde bu miktarın $31,2 \pm 0,9$ (mM) olarak bulmuşlarsa da laktasyonun diğer aylarında ilk aya oranla azaldığını bildirmişlerdir. Voutsinas ve ark. (1990), laktasyon dönemi boyunca Alp keçilerinden aldıkları süt örnekleri ile yaptıkları çalışmada ortalama kalsiyum değerinin 140,06 (mg/100g) olarak bildirmişlerdir. Bu miktarın laktasyonun ilerleyen zamanlarında azaldığını yine yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir. Liesegang ve ark. (2007), laktasyon dönemindeki Saanen keçileri ile yaptıkları çalışmada

sütteki total kalsiyum miktarını laktasyonun 1, 2, 3 ve 4. aylarda sırasıyla 8,1; 4,8; 4,0 ve 3,8 (g/day) olarak bildirmişlerdir. Zamora ve Davide (1969), laktasyon dönemindeki Saanen keçilerinden serum örnekleri almışlardır. Alınan süt ve serum örnekleri laktasyon boyunca kalsiyum bakımından ölçülmüştür. Sütteki kalsiyum miktarı ortalama 139,4 (mg/100 g) olarak bildirilirken serum kalsiyum miktarının ortalama değeri 41,9 (mg/100 g) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmaların tamamında sütle eksrete edilen kalsiyumun genetik regülasyonu hakkında bir fikir bulunmamaktadır. Ancak CaSR geninin vücut kalsiyum homeostazında primer etkili gen olması sebebi ile laktasyondaki kalsiyum kaybını düzenlediği düşünülmektedir. Yakan ve ark. (2016), laktasyondaki Damascus keçilerinde yaptıkları çalışmada laktasyonun 1, 3, 5 ve 7. aylarında süt kalsiyum seviyesini sırasıyla 1156, 594, 485 ve 629 µg/lt olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada laktasyon süresince tespit edilen kan kalsiyum seviyesindeki azalma (laktasyonun 1, 3, 5 ve 7. aylarında sırasıyla 9,63; 9,57; 8,64 ve 8,32 mg/dl) Yakan ve ark. (2016) laktasyonun 5 ve 7. aylarında süt kalsiyum seviyesindeki belirttikleri azalma ile uyum göstermektedir. Laktasyonun 3. ayında 1. aya göre sütle kalsiyum seviyesi önemli düzeyde (1156 µg/lt'den 594 µg/lt'ye) azalma olurken benzer etki kanda olmamıştır (9,63 mg/dl'ye karşı 9,57 mg/dl). Bu durum sütle ekstrete olan kalsiyumun kan tablosunda bir müddet regüle olabildiği ancak sütle meydana gelen kalsiyum kaybının devam etmesi halinde (laktasyonun 5 ve 7. ayı) tablonun kana da yansıdığı tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda laktasyon döneminde özellikle kalsiyum depolarında azalma meydana geleceğinden diyetle kalsiyum alınması önerilmektedir. Laktasyondan sonra kemik yoğunluğundaki kazancın yine yemle alınacak kalsiyum ile artacağı düşünülmektedir. Thomas ve Weisman (2006) yaptıkları çalışmada, maternal kalsiyum depolarını tükendiği takdirde, kemik sağlığı üzerinde olumsuz etkilerini belirterek gebelik ve laktasyon sırasında özellikle önemli olduğunu vurgulamışlardır. Yapılan diğer çalışmalarda ise, kalsiyum desteğini laktasyondaki bireyin kemik kaybını ve bu kaybın yalnızca laktasyon sırasında önlemediğini bildirmesine rağmen, özellikle gebelik ve emzirme döneminde tüketilen maternal iskelet kalsiyum depolarının yerini alması için kalsiyum tüketimine teşvik edilmesi gerektiğini göstermektedir. Sütten kesildikten sonra kemik yoğunluğundaki kazancı arttıracığı kanıtlanmıştır (Kalkwarf ve ark. 1997). Ntailianas ve Whitney (1964), yapmış oldukları çalışmada süt ile atılan kalsiyumun boşalan rezervlerinin laktasyon sonrasında yerine geldiği belirtmişlerdir. Laktasyon

süresince azalan kalsiyum rezervlerinin CaSR ile korunmaya çalışıldığı düşünülmektedir. Zira yapılan bu çalışmada laktasyonun 1. ayına göre laktasyonun 3, 5 ve 7. aylarında CaSR geni önemli seviyede down-regüle olmuştur ($P<0,05$). Böylece kalsiyum mobilizasyonunu azaltarak rezervler korunmaya çalışılmıştır. Başka bir ifade ile, laktasyon ile meydana gelen kalsiyum kaybının CaSR geninin homeostaz yeteneği ile düzenlenmeye çalışıldığı ortaya konulmuştur.

Kandaki kalsiyum aralığı birçok mekanizma ile denetlenmektedir. Bu mekanizmalar paratiroid hormon (PTH), kalsitonin ve vitamin D (1,25-dihidroksikolekalsiferol) olmak üzere üç hormondan oluşmaktadır (Fidan ve Dündar 2007, Niranjan ve ark. 2002, Oleszek ve Marston 2000). Kalsitonin kan kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde görev almakta ve bu fonksiyonu PTH'nu ters etkileyerek yapmaktadır. Vitamin D (1,25-dihidroksikolekalsiferol) ise PTH ile birlikte hareket etmektedir (John ve Hall 2001, Onat ve ark. 2006). Christophers ve ark. (1997) yaptıkları bir çalışmada 1,25-dihidroksivitamin D ve diğer mekanizmalardaki artışlara aracılık ettiği, kalsiyumun bağırsak emiliminde laktasyon döneminde 2 kat artış olduğunu göstermektedir. Yani PTH salgılanmasıyla birlikte kemikten kalsiyum ve fosfat salınımını arttırarak kan kalsiyum ve fosfor dengesini sağlamaktadır (Holick 2006). Bu çalışmalar, kalsiyumun vücuttaki regülasyonunun beslenme ile doğrudan ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu sebeple laktasyon boyunca beslenme ile CaSR gen ekspresyon ilişkisinin incelenmesinin konunun daha iyi açıklanması bakımından önemli olacağı düşünülmektedir.

Kohler ve ark. (2013), laktasyon döneminde bulunan keçilerde serum kalsiyum miktarını ölçmüşler ve laktasyonun ilerlemesiyle plazma kalsiyum seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir. Bu bulgular mevcut çalışma ile uyum göstermektedir. Samardžija ve ark. (2011), puerperium dönemdeki Boer keçilerinde yaptıkları çalışmada serum kalsiyum miktarının 2,29- 2,39 (mmol/L) olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada laktasyonun ilk 40 gününde plazma kalsiyum seviyesi takip edilmiş ve laktasyon ile birlikte sabit bir seviye tespit edilmiştir. Bu durum mevcut açılma ile uyum göstermektedir. Zira bu çalışmada da plazma kalsiyum seviyesi laktasyonun 1 ve 3. aylarında benzer olarak anlamlı bir azalma görülmemiş ve sabit kalmıştır.

Farklı keçi ırklarında yapılan çalışmalarda serum kalsiyum seviyeleri 2,11-2,90 (mmol/L) olarak bildirilmiştir (Erdoğan ve ark. 2002, Kaneko ve ark. 2008). Mbassa ve Poulsen (1991), laktasyon döneminde bulunan Danimarka keçi ırkında yaptıkları çalışmada serum kalsiyum seviyesinin laktasyonun ilerlemesi ile düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir. Damascus keçilerinde yapılan bu çalışmada plazma kalsiyum seviyesi bakımından tespit edilen bulgular Danimarka keçi ırkı ile benzerlik göstermiştir.

Milewskil ve ark. (2012), koyunlarda serum kalsiyum miktarını laktasyonun ilk döneminde 2,53 (mmol/L) olarak bildirirken, laktasyonun ilerleyen zamanlarında bu seviyenin düzenli olarak azaldığını bildirmişlerdir. Damascus keçilerinde yapılan mevcut çalışmada, laktasyonun 1, 3, 5 ve 7. aylarında alınan plazma örnekleri üzerinde yapılan kalsiyum ölçümü sonuçlarında laktasyonun 1 ve 3. aylarındaki tespit edilen değerler (9,63 ve 9,57 mg/dl) benzer olurken 5 ve 7. aylarda bir azalma (8,64 ve 8,32 mg/dl) tespit edilmiştir. Bu durum laktasyondaki koyunlarda serum kalsiyum seviyesi için tespit edilen laktasyon boyunca düzenli azalma ile farklılık göstermektedir. Bu durumun koyun ve keçiler için tür farkından kaynaklandığı düşünülmektedir. Genel bir tanım olarak “küçük ruminantlar” olarak tanımlanan ve metabolizma olarak birbirlerine benzetilen koyun ve keçi türleri arasında böyle bir farklılık olduğu da tespit edilmiştir.

Kalsiyum duyarlı reseptör (CaSR), ekstraselüler sıvılardaki kalsiyum ve diğer organik ve inorganik katyonlardaki değişikliklere yanıt olarak sinyal veren 7-transmembran yayımlı, G proteinine bağlı bir reseptördür (Brown ve ark. 1993, Brown ve MacLeod 2001). CaSR geni vücutta kalsiyum homeostazisini sağlayan esas faktörlerden birisidir. Başlangıçta bir paratiroid kalsiyum sensörü olarak keşfedildi ve daha sonra sistemik kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinde kritik bir bileşen olduğu belgelendi (Brown ve ark. 1993, Tfelt-Hansen ve Brown 2005). CaSR, paratiroid hormonunun sentezi ve sekresyonunu düzenleyerek plazma kalsiyum konsantrasyonundaki değişikliklere cevap veren bir proteindir (Brown ve ark. 1993). Genetik deneyler, bu reseptörün paratiroid bezleri ve böbrekler tarafından kalsiyum algılamasından sorumlu olduğunu ve dolaşımdaki kalsiyum miktarının korunmasında gerekli olduğunu göstermiştir (Ho ve ark. 1995, Pollak ve ark. 1994). Loupy ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada CaSR'nin PTH'dan bağımsız kan kalsiyum konsantrasyonunun doğrudan bir belirleyicisi olduğunu belirtmişlerdir. Ardeshirpour ve ark. (2006) yaptıkları çalışma ile paratiroid ve renal CaSR arasındaki

sinyalleşmelerin normal kalsiyum homeostazında kritik olduğu bildirilmiştir. Böbrek ve tiroid bezi üzerinde yapılan çalışmalara destek olarak bu çalışma ile CaSR geninin kan dokuda da kalsiyum sentezini regüle ettiği ortaya konulmuştur. Zira, süte kalsiyum geçişinin kaynağı olan kanda CaSR genini laktasyon ilerledikçe laktasyonun başına göre down-regüle olmaktadır ($P<0,05$). Bu nedenle CaSR geninin down- regülasyonuna bağlı olarak kana dolayısıyla süte kalsiyum geçişinin azaldığı düşünülmektedir.

Laktasyonun 1, 3, 5 ve 7. aylarında kan örneklerinden izole edilen RNA ile CaSR ekspresyon seviyesi ölçülmüştür. CaSR'nin ekspresyon seviyesi laktasyon dönemi başlarına göre daha sonraki süreçte down- regüle olduğu gözlemlenmiştir ($P<0,05$). Yapılan bir başka çalışmada (Mamillapalli ve ark. 2013) farelerin laktasyon döneminde süte geçen kalsiyumun CaSR geni tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. Keçilerde de CaSR ekspresyonunun laktasyon sırasında zamanla down- regüle olması bireyin hipokalsemi riskinin azaltıldığı düşüncesini oluşturmaktadır.

6. SONUÇ

1. Laktasyon döneminin 1, 3, 5 ve 7. aylarındaki Damascus keçilerinden alınan kan örnekleri hem plazma kalsiyum miktarı hemde CaSR geni ekspresyon seviyesi bakımından değerlendirilmiştir.
2. Plazma kalsiyum miktarı laktasyonun 1 ve 3. aylarında benzer olurken laktasyonun 5 ve 7. aylarında daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir.
3. Lökosit CaSR gen ekspresyonu laktasyonun 1. ayına göre 3, 5 ve 7. aylarda down-regüle olmuştur.
4. Bu çalışmada elde edilen lökosit CaSR gen ekspresyon seviyesi bulguları, laktasyondaki keçilerin plazma kalsiyum metabolizmasının CaSR geni ile regüle edildiği fikrini oluşturmuştur.
5. CaSR geninin lökositlerdeki ekspresyon seviyesinden yola çıkarak laktasyondaki çiftlik hayvanlarında meydana gelebilecek “Hipokalsemi” gibi metabolik bozuklukların tahmini ve prognozu hakkında fikirler üretilebileceği düşünülmektedir.
6. Bu çalışma sırasında yapılan literatür tarama bilgileri ve çalışma bulguları beraber değerlendirildiğinde; tür, ırk, yaş, doğum tipi ve beslenme gibi faktörlerin CaSR gen ekspresyonu ve plazma kalsiyum seviyelerini etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu sebeple ilgili özelliklerin CaSR gen ekspresyonu ile ilişkisi hakkında yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. **Ajjibade DV, Dhawan P, Fechner AJ ve ark.** Evidence for a role of prolactin in calcium homeostasis: regulation of intestinaltransient receptor potential vanilloid type 6, intestinal calcium absorption, and the 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha hydroxylase gene by prolactin. *Endocrinology*, **2010**, 151: 2974–2984.
2. **Akçapınar H, Özbeyaz C.** *Hayvan Yetiştiriciliği Temel Bilgileri*. ISBN:975-96978-0-7. 1.Baskı, Kariyer Matbaacılık Ltd. Şti., ANKARA, **1999**, s. 6-125.
3. **Aksoy M.** Beslenme Biyokimyası, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Hatipoğlu, Ankara, **2000**.
4. **Allen WM, Samson BF.** Milk fever and calcium metabolism. *J Vet Pharmacol Therap*, **1985**, 8: 19–29.
5. **Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL ve ark.** Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis!. *Breast Cancer Research*, **2007**, s. 9: 204.
6. **Anonim.** <http://www.sabiosciences.com/images/sybrdetection.gif>. **2015**. Erişim Tarihi: 16.07.2015
7. **Anonim.** A Brief Review of Protein Synthesis. <https://sites.duke.edu/missiontomars/the-mission/dna-protein-synthesis/a-brief-review-of-protein-synthesis/> **2016**. Erişim Tarihi: 16.07.2016.
8. **Anonim.** CBRN Tech. Index. <http://www.cbrnetechindex.com/Chemical-Detection/Technology-CD/Elemental-Analysis-CD-T/Microwave-Plasma-Atomic-Emission-Spectroscopy-CD-EA>. **2017**. Erişim Tarihi: 27.12.2017.
9. **Ardeshirpour L, Dann P, Pollak M, Wysolmerski J, VanHouten J.** The calcium-sensing receptor regulates PTHrP production and calcium transport in the lactating mammary gland. *Bone*, **2006**, 38(6): 787–793.
10. **Baumrucker CR.** *Calcium transport in lactation*. In: Lactation: A Comprehensive Treatise, edited by B. L. Larson. NewYork: Academic, **1978**, p. 463–474.
11. **Baysal A.** Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, *Beslenme*, Yenilenmiş 12. Baskı, Hatipoğlu Ankara, **2009**.
12. **Brendehaug J, Abrahamsen RK.** Chemical composition of milk from a herd of Norwegiangoats. *J Dairy Res*, **1986**, 53(2): 211-21.
13. **Brennan SC, Conigrave AD.** Regulation of cellular signal transduction pathways by the extracellular calcium-sensing receptor. *Curr Pharm Biotechnol*, **2009**, 10 (3): 270-281.
14. **Brisken C, O'Malley B.** Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives on Biology*, **2010**, 2: a003178.
15. **Brown EM.** Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol*, **1991**, Rev. 71: 371–411.
16. **Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters ve ark.** Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, **1993**, 366: 575–580.
17. **Brown EM, MacLeod RJ.** Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev*, **2001**, 81(1):239–297.
18. **Bustin SA, Mueller R.** Review: Real-time reverse transcription PCR (qrt-pcr) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, **2005**, 109: 365-379.
19. **Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Mol. Endocrinol*, **2000**, 25: 169-93.
20. **Cameronn IL, Sparks RL, Seelig LL Jr.** Concentration of calcium and other elements at a subcellular level in the lactating epithelium of rat. *Cytobios*, **1980**, 27: 89–96.
21. **Carafoli E.** Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic Res. Cardiol*, **1997**, 92: 59–61.
22. **Carafoli E, Stauffer T.** The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J. Neurobiol*, **1994**, 25: 312–324.
23. **Ceyhan A.** Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Hayvan Yetiştirme ve Islahı Bölümü, Keçi Yetiştirme Şubesi Kilis ili Damızlık Koyun Keçi Yetiştiricileri Birliği. **2014**.

24. **Christopher S. Kovacs, Henry M, Kronenberg.** Maternal-Fetal Calcium and Bone Metabolism During Pregnancy, Puerperium, and Lactation. *Endocrine Reviews*, **1997**, 18(6): 832–872.
25. **Conklin BR, Bourne HR.** Homeostatic signals. Marriage of the flytrap and the serpent. *Nature*, **1994**, 367: 22.
26. **Cowin P, Wysolmerski J.** Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harbor Perspectives on Biology*, **2010**, 2: a003251.
27. **Çelebiler A.** İnvaziv Meme Kanserinde 34 Genin Epigenetik İncelenmesi ve Gen Ekspresyon Analizi. Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Programı, İzmir, **2006**.
28. **Çoşkun H, Öndül E.** Keçi sütü ve insan beslenmesindeki önemi. Türkiye 8. Gıda Kongresi bildirimi. **2004**, 29 (6): 411-418.
29. **Duncan JS, Burgoyne RD.** Characterization of the effects of Ca depletion on the synthesis, phosphorylation and secretion of caseins in lactating mammary epithelial cells. *Biochem. J*, **1996**, 317: 487–493.
30. **Erdoğan S, Ergün Y, Erdoğan Z, Konaş T.** Hatay Bölgesinde Merada Yetiştirilen Koyun ve Keçi Serumlarında Bazı Mineral Madde Düzeyleri. *Turk J. Vet. Anim. Sci*, **2002**, 26: 177-182. TÜBİTAK.
31. **Farrell Jr HM, Kumosinski TF, Malin EL, Brown EM.** The caseins of milk as calcium-binding proteins. *Methods Mol Biol*, **2002**, 172: 97–140.
32. **Fidan AF, Dünder Y.** Yucca schidigera ve içerdiği saponinler ile fenolik bileşiklerinin, hipokolesterolemik ve antioksidan etkileri (derleme). *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg*, **2007**, 47(2): 31-39.
33. **Finot L, Marnet PG, Dessauge F.** Reference gene selection for quantitative realtimePCR normalization: application in the caprine mammary gland. *Small Rumin*, **2011**, Res. 95, 20–26.
34. **Fischer JA, Blum JW, Binswanger U.** Acute Parathyroid Hormone Response to Epinephrine in Vivo. *J. Clin Invest*, **1973**, 52: 2434-40.
35. **Fleet IR, Peaker M.** Mammary Function and Its Control at the Cessation of Lactation in the Goat. *J. Physiol*, **1978**, pp. 491-507.
36. **Fredeen AH, DePeters EJ, Baldwin RL.** Characterization of Acid-Base Disturbances and Effects on and Phosphorus Balances of Dietary Fixed Ions in Pregnant or Lactating Does. *J Anim Sci*, **1988**, 66: 159-173.
37. **Gen Bank.** *Capra hircus calcium sensing receptor (CASR), mRNA*. NCBI. Japan. **2013**. NCBI Reference Sequence: NM_001286092.1
38. **Gibson UE, Heid CA, Williams PM.** A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, **1996**, 6: 995-1001.
39. **Goodman WG, Quarles LD.** *Mineral Homeostasis and Bone Physiology*. Olgaard K. Bone and Mineral Metabolism in CKD. 1st Ed., **2002**, s.3-10.
40. **Günlü A, Alaşahan S.** Türkiye’de keçi yetiştiriciliği ve geleceği üzerine bazı değerlendirmeler. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **2010**, 81 (2): 15- 20.
41. **Harpio R, Einarsson R,** S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem*, **2004**, 37 (7): 512–8.
42. **Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.** Real time quantitative PCR. *Genome Res*, **1996**, 6: 986-994.
43. **Ho C, Conner DA, Pollak MR, Ladd DJ, Kifor O, Warren HB ve ark.** A Mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat. Genet*, **1995**, 11: 389–394.
44. **Holick MF.** High Prevalence of Vitamin D İnadequacy and İmplications for Health. *Mayo Clin Proc*, **2006**, 81: 353-73.
45. **Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA.** Calcium and vitamin D metabolism during lactation. *J. Mammary Biol. Gland Neoplasia*, **1997**, 2: 253–263.
46. **Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA.** Age reduces, while pregnancy and lactation increase, intestinal 1,25 dihydroxyvitamin D receptor concentration in the rat and cow. Seventh international conference on production disease in farm animals, New York, USA, **1989**, s. 224–227.
47. **İvona TO, Mark CP, Richard HE, Douglas O, Claudine K ve ark.** Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, **2000**, 105: 1299-1305.

48. **John E, Hall.** *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji*. 13. Baskı, Güneş Tıp Kitapevi, Onuncu Edisyon. Kasım 2001,s. 430.
49. **Joshua N, VanHouten, Ph.D, Assistant Professor, Wysolmerski JJ, Professor MD.** The calcium-sensing receptor in the breast. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 27: 403–414.
50. **Joshua N, VanHouten, Margaret C, Neville, Wysolmerski JJ.** The Calcium-Sensing Receptor Regulates Plasma Membrane Calcium Adenosine Triphosphatase Isoform 2 Activity in Mammary Epithelial Cells: A Mechanism for Calcium-Regulated Calcium Transport into Milk. *Endocrinology*, 2007,148(12):5943–5954.
51. **Kalkwarf HJ, Specker BL, Bianchi DC, Ranz J, Ho M.** The effect of calcium supplementation on bone density during lactation and after weaning. *N Engl J Med*,1997, 337: 523–528.
52. **Kaneko JJ, Harvey W, Bruss ML.** *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th edition Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto, 2008, s. 355
53. **Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss M.** *Clinical Biochemistry of Domestic Animals Academic*. 4th Edition, ISBN: 9780080529196, Academic Press, San Diego California, 25th July 1997,s. 932
54. **Kantham L, Quinn SJ, Egbuna OI, Baxi K, ButtersR, Pang JL ve ark.** The calcium-sensing receptor(CaSR) defends against hypercalcemia independently of its regulation of parathyroid hormone secretion. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolizm*, 2009, 297: E915-E923.
55. **Kayaalp O.** *Akılıcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 11. Baskı, 2. Cilt. Feryal Matbaacılık San. Ve Tic. Ltd.Şti., Ankara, 2005, s. 1128
56. **Keskin, M.** Effect of rearing systems on kid performance, lactation traits and profitability of Shami (Damascus) goats, *J. Appl. Anim. Res*, 2002, 22: 267- 271.
57. **Kessler J.** Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere, RAP Fütterungsempfehlungen und Nährwerttabellen für Wiederkäuer. LBL, 1999, s. 174–208.
58. **Kirby BJ, Ardeshirpour L, Woodrow JP, Wysolmerski JJ, Sims NA ve ark.** Skeletal Recovery after weaning does not require PTHrP. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(6): 1242-1251.
59. **Kohler M, Leiber F, Willems H, Merbold L, Liesegang A.** Influence of altitude on vitamin D and bone metabolism of lactating sheep and goats. *J. Anim. Sci*, 2013, 91: 5259–5268.
60. **Koşum N.** Her Yönüyle Keçi Sütü. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü. Bornova- İZMİR.2010.
61. **Kovacs CS.** Calcium and bone metabolism during pregnancy and lactation. *J Mamm Gland Biol Neoplasia*, 2005, 10(2): 105–118.
62. **Kovacs CS, Kronenberg HM.** Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev*, 1997, 18(6): 832– 872.
63. **Liesegang A, Risteli J, Wanner M.** Bone metabolism of milk goats and sheep during second pregnancy and lactation in comparison to first lactation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2007, 91: 217–225.
64. **Liesegang A, Risteli J, Wanner M.** The effects of first gestation and lactation on bone metabolism in dairy goats and milk sheep. *Bone*, 2006, 38: 792–802.
65. **Liesegang A, Sassi ML, Risteli J, Eicher R, Riond JL, Wanner M.** Comparison of bone resorption markers during hypocalcemia in dairy cows. *J Dairy Sci*, 1998, 81: 2614–22.
66. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods*. 2001, Pages 402-408.
67. **Lopez- Hilker S, Duso AS, Rapp NS ve ark.** Phosphorus Restriction Reverses Hyperparathyroidism in Uremia Independent of Changes in Calcium and Calcitriol. *AMJ Physiol*, 1990, 28: F432 F437.
68. **Loupy A, Ramakrishnan SK, Wootla B, Chambrey R, Renaud de la Faille ve ark.** PTH-independent regulation of blood calcium concentration by the calcium-sensing receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, Volume 122.
69. **Mamillapalli R, VanHouten J, Dann P, Bikle D, Chang W, Brown E, Wysolmerski J.** Mammary-Specific Ablation of the Calcium-Sensing Receptor During Lactation Alters Maternal Calcium Metabolism, Milk Calcium Transport, and Neonatal Calcium Accrual. Calcium-Regulating Hormones. *Endocrinology*, 2013, 154: 3031–3042.
70. **Mamillapalli R, Wysolmerski J.** The calcium-sensing receptor couples to Galpha(s) and regulates PTHrP and ACTH secretion in pituitary cells. *Journal of Endocrinology*, 2010, 204: 287–297.

71. **Mbassa GK, Poulsen JSD.** Influence of pregnancy, lactation and environment of haematological profiles in danish landrace dairy goats (*capra hircus*) of different party. *In Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **1991**, Pages 403-412.
72. **Mikkola ML, Millar SE.** The mammary bud as a skin appendage: unique and shared aspects of development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **2006**, 11: 187–203.
73. **Milewskil S, Sobiech P, Zqbekl K, Zarczyriska K, Antoszkiewicz Z, Wielgosz-Groth Z.** Effect Of *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast On Milk Protein Content and Composition and Serum Mineral Concentrations in Sheep. *J. Elem*, **2012**, s. 79-86.
74. **Molostvov G, Fleatcher S, Bland R, Zehnder D.** Extracellular calcium-sensing receptor mediated signalling is involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **2008**, 22, 413-422.
75. **Nalefski EA, Falke JJ.** The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*, **1996**, 5 (12): 2375–90.
76. **Neville MC.** Calcium secretion into milk. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia*, **2005**, 10: 119–128.
77. **Neville MC, Keller RP, Casey C, Allen JC.** Calcium partitioning in human and bovine milk. *J. Dairy Sci*, **1994**, 77: 1964–1975.
78. **Neville MC, Watters CD.** Secretion of calcium into milk: review. *J. Dairy Sci*, **1983**, 66: 371–380.
79. **Niranjan PS, Bebusudeb A, Oleszek W.** Advances in Structural Determination of Saponins and Terpenoid Glycosides. *Current Organic Chemistry*, **2002**, 5, 315-334.
80. **Nolan T, Hands RE, Bustin SE.** Quantification of mRNA using real-time RTPCR. *Nature Protocols*, **2006**, 1(3): 1559-1582
81. **Ntailianas HA, Whitney RMcL.** Calcein as an Indicatorfor the Determination of Total Calcium and Magnesium and Calcium Alone in the Same Aliquot of Milk. *Journal of DairyScience*, **1964**, Pages 19-27.
82. **Oh BH, Pandit J, Kang CH, Nikaido K, Gokcen S ve ark.** Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J. Biol. Chem*, **1993**, 268: 11348–11355.
83. **Oleszek W, Marston A.** Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal. *Kluwer Academic Publishers*, **2000**, s. 260.
84. **Onat T, Emerk K, Sözmen Y.** *İnsan Biyokimyası*. 2. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, **2006**, s. 521-537.
85. **Philbrick WM ve ark.** Defining the roles of parathyroid hormonerelated protein in normal physiology. *Physiol. Rev*, **1996**, 76: 127–173.
86. **Pineda MH.** *Mc Donald'sVeterinary Endocrinology and Reproduction*. 5th Revised edition, ISBN10 0813811066, Iowa State University Press, Arnes, AI, United States, **2003**, s.102.
87. **Pollak MR, Brown EM, Estep HL ve ark.** Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca²⁺-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*, **1994**, 8(3):303–307.
88. **Popovtezer M.** *Kalsiyum, Fosfor, D Vitamini ve Paratiroid Hormon Aktivitesi Bozuklukları*. 6.baskı, Güneşkitabevi Süleymanlar G.Böbrek ve Elektrolit Hastalıkları, Ankara, **2005**, s. 235-237.
89. **Quamme GA.** Effect of hypercalcemia on renal tubular handling of calcium and magnesium. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, **1982**, 60: 1275–1280.
90. **Reinhardt TA, Filoteo AG, Penniston JT, Horst RL.** Ca²⁺-ATPase protein expression in mammary tissue. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2000**, 279: C1595–C1602.
91. **Reinhardt TA, Horst RL, Goff JP.** *Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants*. In: *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, edited by T. H. Herdt. Philadelphia, PA: Saunders, **1988**, p. 331–350.
92. **Reinhardt TA, Lippolis JD, Shull GE, Horst RL.** Null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 impairs calcium transport into milk. *J Biol Chem*, **2004**, 279:42369–42373.
93. **Richard H, Denise F.** *Biyokimya Lippincott's Illustrated Reviews*. 3. Baskı, Nobel Kitapevi, Ankara, **2007**, s.567-574.
94. **Robinson GW.** Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nature Reviews Genetics*, **2007**, 8: 963–972.
95. **Ruat M, Traiffort E.** Roles of the calcium sensing receptor in the central nervous system, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*, **2013**, 27: 429–442.
96. **Samardžija M, Dobranić T, Lipar M, Harapin I, Prvanović N ve ark.** Comparison of blood serum macromineral concentrations in meat and dairy goats during puerperium. *Veterinarski Arhiv*, **2011**, 81 (1): 1-11.

97. **Schepelmann M, Yarova PL, Lopez-Fernandez I, Davies TS, Brennan SC ve ark.** The vascular Ca²⁺-sensing receptor regulates blood vessel tone and blood pressure, *Am. J. Physiol. Cell Physiol*, **2015**, (ajpcell.00248.02015).
98. **Shennan DB.** Mammary gland membrane transport systems. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **1998**, 3:247–258.
99. **Shennan DB, Peaker M.** Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol Rev*, **2000**, 80: 925–951.
100. **Smith MS, Grove KL.** Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **2002**, 23: 225–256.
101. **Squires PE, Jones PM, Younis MY, Hills CE.** The calcium-sensing receptor and β - cell function, *Vitam. Horm*, **2014**, 95: 249–267.
102. **Strewler GJ.** *Mineral Metabolizm and Metabolic Bone Disease*. Greenspan FS, Stewler GJ. Basic and Clinical Endocrinology, 5th ed. Prentice Hall International Inc, London, **1997**, s. 253-316.
103. **Sözen T, Gogas DY.** *Metabolik kemik hastalıkları*. Türkiye endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. ISBN: 978-605-4011-17-9, BAYT Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın ve Tanıtım Ltd. Şti. Ankara, **2013**, s. 199-12.
104. **Swanson EW, Monroe RA, Zilversmit DB, Visek WJ, Comar CL.** A study of variations in secretion of Ca⁴⁵ by the mammary glands of dairy cows. *J. Dairy Sci*, **1956**, 39: 1594–1608.
105. **Şimşek E, Kocabey K.** Kalsiyum, Fosfor ve Magnezyum Homeostasisi. *Türkiye Klinikleri J Pediatr*, **2002**, 11(4): 211-20.
106. **Taylor RS, Jones SM, Dahl RH, Nordeen MH, Howell KE.** Characterization of the Golgi complex cleared of proteins in transit and examination of calcium uptake activities. *Mol. Biol*, **1997**, Cell 8: 1911–1931.
107. **Tfelt-Hansen J, Brown EM.** The calciumsensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **2005**, 42: 35-70.
108. **Thomas M, Weisman SM.** Calcium supplementation during pregnancy and lactation: effects on the mother and the fetus. *Am J Obstet Gynecol*, **2006**, 194: 937–945.
109. **Tingting L, Mingrui S, Xin Y, Chunli W, Qiuyue W ve ark.** Expression of the calcium sensing receptor in human peripheral blood T lymphocyte and its contribution to cytokine secretion through MAPK or NF- κ B pathways. *Molecular Immunology*, **2013**, 53: 414-420.
110. **Tu CL, Chang W, Xie Z, Bikle DD.** Inactivation of the calcium sensing receptor inhibits E-cadherine-mediated cell-cell adhesion and calcium-induced differentiation in human epidermal keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, 283: 3519-3528.
111. **Tu CL, Bikle DD.** Role of the calcium-sensing receptor in calcium regulation of epidermal differentiation and function, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*, **2013**, 27: 415–427.
112. **Türkiye İstatistik Kurumu.** *Küçükbaş Hayvan Sayısı*. TÜİK. Türkiye. **2016**. www.tuik.gov.tr
113. **VanHouten J.** Maternal calcium and bone metabolism during lactation. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*, **2005**, 12: 477–482.
114. **VanHouten JN, Dann P, McGeoch G, Brown EM, Krapcho K.** The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport. *J Clin Investig*, **2004**, 113:598–608.
115. **Voutsinas L, Pappas C, Katsiari M.** The composition of Alpine goats' milk during lactation in Greece. *Journal of Dairy Research*, **1990**, pp. 41-51.
116. **VanHouten JN, Wysolmerski JJ.** Low estrogen and high parathyroid hormone-related peptide levels contribute to accelerated bone resorption and bone loss in lactating mice. *Endocrinology*, **2003**, 144(12):5521–5529.
117. **Watson CJ, Khaled WT.** Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development*, **2008**, 135: 995–1003.
118. **Watson CJ, Kreuzaler PA.** Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *The International Journal of Developmental Biology*, **2011**, 55: 757–762.
119. **Whitfield JB, Martin NG.** The effects of inheritance on constituents of plasma: a twin study on some biochemical variables. *Ann Clin Biochem*, **1984**, 21 (Pt 3): 176–183.
120. **Wills MR.** Intestinal Absorption of Calcium. *Lancet*, **1973**, 1: 820-822.
121. **Wills MR, Zisman E, Worstman J, Evans R, Pak CY, Bartter FC.** The Measurement of Intestinal Calcium. *Clinical Science*, **1970**, 39 (1): 95-106.

122. **Wong ML, Medrano JF**, Review: Real Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, **2005**, 39(1): 75-85.
123. **Wysolmerski JJ**. Interactions between breast, bone, and brain regulate mineral and skeletal metabolism during lactation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2010**, 1192:161–169.
124. **Yakan A**. Koyun ve keçilerde süt verim kontrol yöntemleri ve laktasyon süt veriminin hesaplanması. *Avkae Dergisi*, **2012**, s.18-23.
125. **Yakan A, Doğruer G, Ateş CT, Özbeyaz C, Ünal N, Koçak Ö**. Damascus keçilerinde süt üretimindeki farklı uygulamaların süt verimi ve kalitesi üzerine etkileri. Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje kesin raporu (Proje no: 10560), **2016**.
126. **Yüzbaşıoğlu A**. Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Ankara. **2008**.
127. **Zamora, RG, Davide CL**. Calcium and phosphorus contents of blood and milk of goats during the lactation period. *Philippine Agriculturist*, **1969**, pp.238-245.
128. **Zheng H, Li H, Li L, Ma S, Liu X**. Fos B regulates Ca²⁺ release and proliferation of goat mammary epithelial cells. *Gene*, **2014**, 545 (2): 241-246.

ÖZGEÇMİŞ

Sevda DALKIRAN; İlk, orta ve lise eğitimini İskenderun'da tamamladı. Önlisans eğitimini 2010 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Meslek Yüksek Okulunda tamamladı. Lisans eğitimini ise 2014 yılında Ordu Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği'nde tamamladı.

