**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# SÜTÇÜ KEÇİLERİN GEBELİK DÖNEMİ KORTİZOL KONSANTRASYONLARININ FARKLI BİYOBELİRTEÇLER KULLANILARAK BELİRLENMESİ

**Fatma Mira GÜVEN**

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA**
**2024**

**Her hakkı saklıdır**

# ÖZET


Yüksek Lisans Tezi

SÜTÇÜ KEÇİLERİN GEBELİK DÖNEMİ KORTİZOL KONSANTRASYONLARININ FARKLI BİYOBELİRTEÇLER KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Fatma Mira GÜVEN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Erkan PEHLİVAN

Bu araştırmada 1,5 yaşlı 5 baş (primapar) ve 3,5 yaşlı 4 baş (multipar) olmak üzere toplam 9 baş dişi Akkeçi'de gebelik döneminde ortaya çıkan kronik stresi değerlendirmek amacıyla serum ve kıl kortizol konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu amaçla sürüye teke katıldığı tarihten itibaren Ekim, Kasım, Aralık aylarında ve doğum sonrası ilk 12 saat içerisinde (1., 2., 3. ve 7. örnek alımlarında) kıl örnekleri toplanmış, Ocak, Şubat ve Mart aylarında (4., 5., ve 6. örnek alımlarında) ise yeterli örnek büyümesi/uzaması gerçekleşmediği için kıl örneği toplanamamıştır. Kan örnekleri ise gebelik süresince Ekim ve Mart ayları arasında aylık olarak ve doğum sonrası ilk 12 saat içerisinde alınmıştır. Alınan kan ve kıl örnekleri laboratuvara getirilerek hormon analizi için hazır hale getirilmiştir. Serum ve kıl örneklerinde kortizol analizleri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü'nde bulunan Üreme Biyolojisi ve Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı'nda enzim immunoassay (EIA) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda serum matrisinde kortizol bakımından ne dönemin ne de grupların seviye ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemli bulunmamışken, kıl matrisindeki kortizol düzeyleri bakımından sadece dönemlerin seviye ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Sonuç olarak, Akkeçilerde gebelik döneminde saptanan kıl kortizol konsantrasyonlarının serum kortizol konsantrasyonlarına göre uzun vadeli stresin belirlenmesinde daha uygun bir biyobelirteç olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



**Haziran 2024, 43 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Akkeçi, kıl, serum, kronik stres, glikokortikoit

## ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF CORTISOL CONCENTRATIONS OF DAIRY GOATS USING DIFFERENT BIOMARKERS DURING PREGNANCY PERIOD

Fatma Mira GÜVEN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Erkan PEHLİVAN

In this study, serum and hair cortisol concentrations were determined in a total of 9 female Akkeci goats, including 5 primiparous (1.5 years old) and 4 multiparous (3.5 years old) goats, to evaluate chronic stress during the pregnancy period. For this purpose, hair samples were collected in October, November, and December from the date the bucks were introduced to the herd and within the first 12 hours postpartum (at the 1st, 2nd, 3rd, and 7th sample collections). Hair samples were not collected in January, February, and March (at the 4th, 5th, and 6th sample collections) due to insufficient sample growth/length. Blood samples were collected monthly between October and March during pregnancy and within the first 12 hours postpartum. The collected blood and hair samples were prepared for hormone analysis in the laboratory. Cortisol analyses in serum and hair samples were performed using the enzyme immunoassay (EIA) method in the Reproductive Biology and Animal Physiology Laboratory at the Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ankara University. Statistical analysis revealed no significant differences in cortisol levels between periods or groups in the serum matrix, whereas significant differences were found only between period mean levels in the hair matrix ($p<0.01$). Consequently, it was concluded that hair cortisol concentrations detected during pregnancy in Akkeci goats are a more suitable biomarker for determining long-term stress compared to serum cortisol concentrations.



**June 2024, 43 pages**

**Key Words:** Akkeci, hair, serum, chronic stress, glucocorticoid

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamı hazırlamamda değerli tavsiyeleri ve yönlendirmeleriyle üniversite hayatım boyunca yanımda olduğunu bildiğim danışman hocam sayın Doç. Dr. Erkan PEHLİVAN'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı), akademik kariyerime yön vermemde desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Anabilim Dalındaki sayın hocam Prof. Dr. Gürsel DELLAL başta olmak üzere bana destek olan tüm hocalarıma, tezimin saha çalışmalarında destek olan başta Arş. Gör. Dr. Ayşe Övgü ŞEN'e, Arş. Gör. Muzaffer ÇEVİK'e, Öğr. Gör. Ali ŞENOK'a (Ankara Üniversitesi Bala Meslek Yüksekokulu) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü lisans öğrencileri İhsan Fırat UÇAR ve Hilmi Eray YOLSAL'a, istatistik analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Rabia ALBAYRAK DELİALİOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı) ve hayatım boyunca beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

Fatma Mira GÜVEN
Ankara, Haziran 2024

## İÇİNDEKİLER

**TEZ ONAY SAYFASI**
**ETİK** ..... **i**
**ÖZET** ..... **ii**
**ABSTRACT** ..... **iii**
**TEŞEKKÜR** ..... **iv**
**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ** ..... **vi**
**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **vii**
**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... **viii**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
**2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ** ..... **4**
**2.1 Stres Fizyolojisi** ..... **4**
**2.2 Stresin Ölçülmesi** ..... **8**
**2.2.1 Kortizol analizinde kullanılan geleneksel matrisler** ..... **10**
**2.2.2 Kortizol analizinde kullanılan yeni matrisler** ..... **11**
**2.3 Kaynak Özetleri** ..... **16**
**3. MATERYAL ve YÖNTEM** ..... **24**
**3.1 Materyal** ..... **24**
**3.1.1 Hayvan materyali** ..... **24**
**3.1.2 Kan örnekleri** ..... **24**
**3.1.3 Kıl örnekleri** ..... **25**
**3.2 Yöntem** ..... **25**
**3.2.1 Araştırma hayvanlarının yönetimi** ..... **25**
**3.2.2 Kan örneklerinin alınması ve analize hazır hale getirilmesi** ..... **25**
**3.2.3 Kıl örneklerinin alınması ve analize hazır hale getirilmesi** ..... **26**
**3.2.4 Hormon analizleri** ..... **27**
**3.2.5 İstatistik analizler** ..... **27**
**4. BULGULAR ve TARTIŞMA** ..... **28**
**5. SONUÇ** ..... **33**
**KAYNAKLAR** ..... **34**
**ÖZGEÇMİŞ** ..... **43**

## SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---|---|
| g | Gram |
| l | Litre |
| µg | Mikrogram |
| µm | Mikrometre |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| ng | Nanogram |
| nmol | Nanomol |
| pg | Pikogram |
| °C | Santigrat derece |
| Mg | Magnezyum |
| Zn | Çinko |
| Al | Alüminyum |

**Kısaltmalar**

| | |
|---|---|
| ACTH | Adrenokortikotropik Hormon |
| CBG | Kortizol Bağlayıcı Globulin |
| CRH | Kortikotropin Salgılatıcı Hormon |
| EIA | Enzim İmmunoassay |
| GC | Glikokortikoit |
| GH | Büyüme Hormonu |
| HCC | Kıl Kortizol Konsantrasyonu |
| HPA | Hipotalamus-Hipofiz-Adrenokortilal |
| HS | Termal Stres |
| MSS | Merkezi Sinir Sistemi |
| NEFA | Esterleşmemiş Yağ Asitleri |
| PBS | Fosfat Tamponlu Salin |
| PG | Progesteron |
| SA | Sempato-Adreno |
| $T_3$ | Triiyoditironin (Triiodothyronine) |
| $T_4$ | Tiroksin (Thyroxine) |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kortizol salınımının negatif geri bildirim yoluyla kontrolü ..... 7

Şekil 3.1 Örnekleme şeması ..... 26

Şekil 4.1 Akkeçilerde gebelik döneminde serum kortizol konsantrasyonlarına ait değişim grafiği ..... 31

Şekil 4.2 Akkeçilerde gebelik döneminde kıl kortizol konsantrasyonlarına ait değişim grafiği ..... 32

# ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kortizol konsatrayonlarının belirlenmesinde kullanılan için çeşitli matrislerin özelliklerinin karşılaştırması ..... 9

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan keçilere ait bilgiler ..... 24

Çizelge 3.2 Araştırmada kullanılan kortizol hormonu kitlerine ait özellikler ..... 27

Çizelge 4.1 Akkeçilerde gebelik döneminde serum ve kıl kortizol konsantrasyonlarına ait tanımlayıcı değerler ..... 28

Çizelge 4.2 Akkeçilerde gebelik döneminde serum ve kıl kortizol konsantrasyonlarına ait tanımlayıcı değerler (homojenliği bozan keçiler deneme dışı bırakıldığında) ..... 30

# 1. GİRİŞ

Dünyada son yarım yüzyılda hayvansal üretim sektöründe bilim ve teknoloji alanındaki gelişmelere bağlı olarak bir dizi değişim yaşanmış ve toplam üretimde önemli düzeyde artışlar meydana gelmiştir. Bu değişimlere paralel olarak hayvansal üretim sistemlerinde de önemli dönüşümler gerçekleşmiş ve gerçekleşmeye de devam etmektedir. Bu dönüşümler sonucunda bir yandan küresel düzeyde yetiştirici/çiftçi (işletme/çiftlik) sayısı azalırken, diğer yandan mevcut hayvancılık işletmelerinde yetiştirilen hayvan sayılarında artış yaşanmaktadır (Norton 2017). Hayvansal üretim sistemlerinde gerçekleşen dönüşüm neticesinde entansifleşmenin artması, esas olarak hayvan başına verim ve toplam üretim artışını hedeflemekle birlikte aynı zamanda bir dizi yeni problemi de beraberinde getirmektedir. İşletme büyüklüklerinin artması nedeniyle yetiştiriciler sürüde bulunan her bir hayvanın bakımı için daha az zaman ayırabilmekte, üretimin entansifleşmesine bağlı olarak refah kaygıları daha da artış göstermektedir (Berckmans 2017).

Hayvansal üretim sistemlerinde gerçekleşen bu dönüşümlerin yanı sıra tüketicilerin hayvansal ürünlere olan taleplerinde de küresel düzeyde önemli artışlar yaşanacağı öngörülmektedir. Nitekim hayvansal ürünlere yönelik küresel talebin 2050 yılına kadar ürün bazında değişiklik göstermesiyle birlikte yaklaşık %70'in üzerinde artış göstereceği bildirilmektedir (Berckmans 2017). Çiftlik hayvanları yüksek düzeyde talep edilen hayvansal ürünleri üretebilmek için üretim sürecinin her aşamasında çeşitli stresörlere maruz kalmakta ve bunlarla davranışsal ve fizyolojik yollarla mücadele etmeye çalışmaktadır (Blokhuis vd. 1998). Verilen bu mücadelenin başarılı olamaması durumunda ise kronik stres olarak isimlendirilen uzun süreli stresin tipik belirtileri ortaya çıkmaktadır. Buna ek olarak çiftlik hayvanları üzerinde uzun yıllardır yapılan ıslah çalışmaları, hayvanların genetik yapısını katabolik olan savunma mekanizmaları yerine, anabolik olacak şekilde yani verim artışına yönlendirmiştir (Dantzer ve Mormede 1983). Gelinen noktada ıslah edilen kültür ırklarının verim düzeyleri önemli ölçüde yükseltilmiş olmakla birlikte stres, hastalık vb. olumsuz çevresel etmenlere karşı dayanıklılık azaltılmıştır. Bu durum ise hayvanların stres faktörlerinden daha fazla etkilenmesine ve dolayısıyla işletme gelirinde önemli kayıplara yol açmaktadır.

Endüstriyel hayvansal üretim sistemlerindeki gelişmelere bağlı olarak bilim çevreleri ve kamuda hayvan refahı konularına olan ilginin artması, hayvan refahının nasıl sağlanacağı sorusunu ve tartışmalarını da beraberinde getirmiştir. Bu konuda uzun yıllardır çok sayıda araştırmanın gerçekleştirilmiş olması ve bunlardan elde edilen sonuçlara göre hayvan refahı konusunda birçok düzenlemenin getirilmesi ile birlikte, hayvan refahının potansiyel göstergesinin esas olarak, hayvanın stres halinde olmaması olduğu kabul edilmiştir (Möstl ve Palme 2002).

Çiftlik hayvanlarında stresin ölçülmesinde ya da değerlendirilmesinde birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında hipotalamus-hipofiz-adrenokortikal (HPA) aksı fonksiyonu yaygın bir şekilde kullanılmakta olup bu aksın son çıktısı olan glikokortikoitlerin seviyeleri kronik stresin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, glikokortikoitlerin seviyelerinin değerlendirilmesinde sirkadiyen ritmin, fizyolojik durumun, hayvanın yaşamış olduğu deneyimlerin vb. faktörlerin etkisi de göz önünde bulundurulmalıdır (Squires 2003).

Memeli hayvanlarda gebelik dönemi fizyolojik olarak en stresli dönemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu dönemde maternal kortizol seviyelerinin düzenlenmesi, sağlıklı yavruların doğması için zorunluluk arz etmektedir. Gebelik döneminde strese bağlı olarak kortizol konsantrasyonlarının yükselmesi, fertilite ve fetüsün sağlığını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu durumda hayvanlarda yavru atma riski artmakta ve doğan yavruların da daha düşük doğum ağırlığına sahip olması, yaşama güçlerinin azalmasına ve dolayısıyla telefatın artmasına neden olabilmektedir. Bununla birlikte, gebelik dönemi boyunca bazal plazma kortizol seviyeleri, gelişmekte olan embriyonun besin ihtiyaçlarını karşılamak ve fetal organların gelişimine yardımcı olmak için kademeli olarak artış göstermektedir. Koyunlarda yapılan çalışmalarda maternal plazma kortizol konsantrasyonlarının gebeliğin son döneminde, gebe olmayan koyunlardan üç katı kadar yüksek olabileceği bildirilmiştir (Sawyer vd. 2019).

Memeli çiftlik hayvanlarında kronik stresi belirlemeye yönelik gerçekleştirilen çalışmaların büyük çoğunluğunda kortizol hormonunun ölçümü kan serumunda veya

plazmasında gerçekleştirilmiştir. Kıl matrisinde kortizol ölçümü son yıllarda çalışılan konular arasında yer almakta olup bu matris kullanılarak evcil keçilerde kortizol konsantrasyonlarını saptamaya yönelik sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Kıl kortizolünü belirlemeye yönelik gerçekleştirilen çalışmalar yoğunlukla sığır, koyun, at, domuz ve diğer türler üzerinde yapılmıştır. Bu noktadan hareketle, bu çalışmada sütçü bir ırk olan Akkeçi'de gebelik döneminde ortaya çıkan kronik stresi değerlendirmek amacıyla yeni bir biyobelirteç olan kıl kortizol konsantrasyonları belirlenmiş ve aynı dönemlerde örneklenen kan serum kortizol konsantrasyonları ile karşılaştırılmıştır.

# 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

## 2.1 Stres Fizyolojisi

Stres, organizmanın homeostazisini korumayı veya iyileştirmeyi amaçlayan, fizyolojik bir tepkiye neden olan çeşitli zararlı veya öngörülemeyen uyaranların (stres etkenleri) meydana getirdiği karmaşık, çok boyutlu bir olgu olarak tanımlanmaktadır (Moberg 2000, von Borell 2021). En genel ifadeyle ise stres, hayvanın içinde bulunduğu çevre faktörleri ile mücadele etmedeki başarısızlığı olarak değerlendirilmektedir (Pehlivan ve Dellal 2014).

Hayvanların farklı üretim çevrelerinde yetiştirilmesi, farklı çevresel faktörlere maruz kalmasına ve dolayısıyla farklı fizyolojik değişimlerin ortaya çıkmasına neden olmakta ve bu değişimler akut ve kronik tepki olmak üzere genel olarak iki temel başlık altında toplanabilmektedir (Dantzer ve Mormede 1983). Gerek akut gerekse kronik stres olsun, merkezi sinir sistemi bir tehdit algıladığında, dört genel biyolojik savunma tepkisinin (davranışsal, otonom sinir sistemi, nöroendokrin ve bağışıklık) bazı kombinasyonlarından oluşan bir yanıt ortaya çıkmaktadır (Moberg 2000). Hayvanın bir stres etkenine tepki vermesi için yukarıda sayılan dört biyolojik savunma sisteminin tümü mevcut olmasına karşın, dördünün de stres etkenlerinin tümüne karşı kullanılması zorunlu olmamaktadır. Özellikle homeostazis yalnızca ilk iki savunma mekanizmasının (davranışsal, otonom sinir sistemi) dahil olması durumunda korunabilmektedir (Trevisi ve Bertoni 2009).

Akut stres, kısa süreli fiziksel, duygusal veya psikolojik olumsuz bir durumun sonucu olarak ortaya çıkmakta ve genel olarak fizyolojik dengenin hızlı ve tam olarak iyileşmesine olanak tanımaktadır. Bu nedenle, bu durumun organizma tarafından tanımlanması kolay olmasına karşın, bu tepki sonucunda ortaya çıkan değişikliklerin ölçülmesi zordur. Bunun nedeni organizmada hızlı seyreden bir biyolojik tepkiden kaynaklanmaktadır. Akut stres tepkisi sırasında MSS (merkezi sinir sistemi), SA (symphatho-adreno-medullary) ve HPA aksları uyarılmakta ve çok sayıda hormon çok kısa bir süre içerisinde (birkaç saniye veya dakika) dolaşıma salınmaktadır. Bunlar

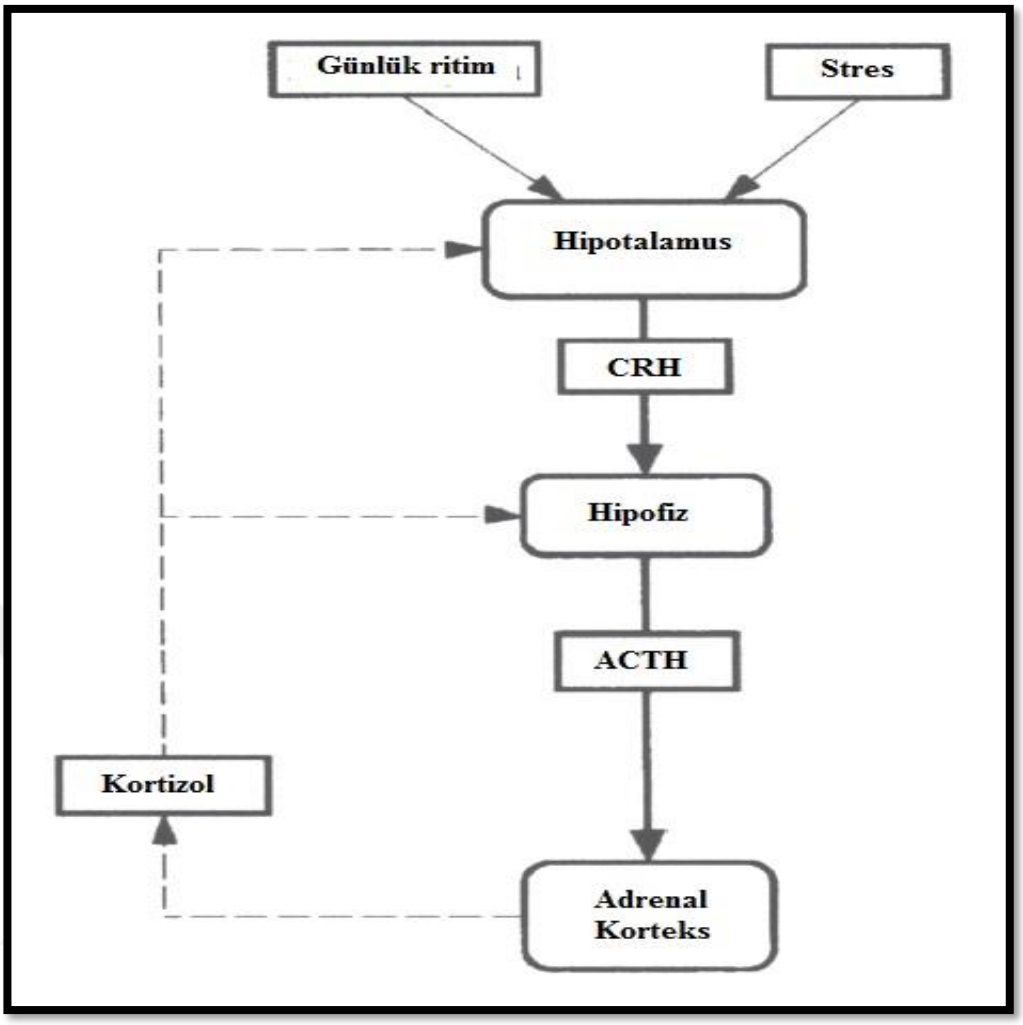
arasında yer alan katekolaminler, CRH (kortikotropin salgılatıcı hormon), ACTH (adrenokortikotropik hormon), opioitler, vazopressin, prolaktin, glukagon, GH (büyüme hormonu) ve glikokortikoitler artış gösterirken, serotonin, gonadotropinler vb. hormonlar azalış göstermektedir. Ayrıca diğer fizyolojik ve metabolik etkiler hemen veya biraz gecikmeli olarak ortaya çıkabilmektedir. Bunlar arasında en yaygın olanları kalp atış hızının ve solunum sayısının artması, kan basıncının yükselmesi, enerji mobilizasyonunun artması (glikoz ve NEFA'nın yükselmesi), bağışıklık fonksiyonunun uyarılması ile iştahın azalmasıdır (Sapolsky vd. 2000, Squires 2003, Trevisi ve Bertoni 2009).

Akut stres koşullarında yukarıda sayılan birçok göstergedeki değişiklikler çok belirgin olmasına rağmen, bunların çoğu yalnızca stres oluşumunu takip eden kısa bir süre içinde tespit edilebilmektedir. Stresli durum sona erdiğinde, MSS, SA ve HPA aksları daha fazla uyarılmamakta ve ilgili efektörler veya hormonlar bazal düzeylerine inmektedir (Squires 2003). Akut stresin aksine kronik stres, devam eden bir fizyolojik uyarılma durumudur (Mendoza vd. 2000). Bu durum ise organizmanın çok fazla stres etkenine maruz kalması veya aynı akut veya kronik strese tekrar tekrar maruz kalması durumunda daha şiddetli yanıt oluşturmasına yol açmaktadır (Trevisi ve Bertoni 2009).

Kronik stres, organizmanın tamamen normale dönemediği ve bu duruma etki eden birçok faktörün bulunduğu uzun vadeli bir süreçtir. Stresle mücadele tepkilerinin uzun vadeli aşırı uyarılması, organizmada doğrudan (yüksek sıcaklık, düşük enerji, kaygı, acı vb.) ve dolaylı etkilere (endokrin, bağışıklık, metabolik ve ayrıca spesifik işlev düzeyinde meydana gelen değişiklikler) neden olmaktadır. Bu etkiler hayvanlarda refahın azalmasına neden olan prepatolojik veya patolojik sonuçlardan sorumlu olmaktadır (Moberg 2000, Romero 2004). Bu nedenle kronik stres, refah düzeyinde doğrudan bir azalmayla ilişkilendirilebilecek bir uyumsuzluk durumudur. Ayrıca bu, hastalığın başka bir nedeni olsa bile, hastalığın başlangıcını veya duyarlılığını ve ilerlemesini etkileyebilmektedir (Trevisi ve Bertoni 2009).

Organizma strese maruz kaldığında iki ana (SA ve HPA aksları) endokrin sistem aktive olmaktadır (Moberg 2000). Stres esnasında öncelikle SA aksı aktive olur ve bu durum adrenal medulladan katekolaminlerin (epinefrin/adrenalin ve norepinefrin/noradrenalin) salınmasına neden olur. Katekolaminler, vücudu bir tehdide tepki vermeye hazırlayarak vazodilatasyona ve kalp atış hızının artmasına neden olmaktadır (Martínez-Miró vd. 2016). Katekolaminler, hızla kan dolaşımına salınır ve dolaşımdaki yarı ömürleri genellikle 10-100 saniye arasındadır (Young 2010). Norepinefrin dolaşımda çok çabuk parçalanabildiğinden (Einarsson vd. 2008) ve katekolaminlerin tükürükte oldukça değişken ve kararsız olduğundan kanda çok değişken olduğu düşünülmektedir (Martínez-Miró vd. 2016). Bu nedenle stresin değerlendirilmesinde kullanılmazlar (Everding 2021).

Stres veya refahın en yaygın kullanılan objektif ölçüsü, HPA aksının aktivitesidir. HPA aksı CRH, ACTH ve glikokortikoitlerden esas olarak da kortizol veya metabolitlerinden oluşur. Hipotalamus, fiziksel veya psikolojik strese yanıt olarak CRH salgılar ve bu, algılanan bir tehdide karşı "savaş, kaç veya donma" tepkisinin ilk başlatıcısıdır. CRH, ACTH'nin hipofiz bezinden salınmasını tetikler ve adrenal korteksten glikokortikoit salınımı, negatif geri bildirim yoluyla düzenlenmektedir (Şekil 2.1) (Contoreggi 2015, Everding 2021).




Şekil 2.1 Kortizol salınımının negatif geri bildirim yoluyla kontrolü (Pehlivan 2015)

Kortizol, çoğu memelide temel glikokortikoitdir ve ACTH uyarımının bir sonucu olarak adrenal korteksten salınmaktadır. İnsanlarda, insan olmayan primatlarda ve diğer birçok memeli türünde kortizol en yaygın glikokortikoit iken, kemirgenler dahil diğer omurgalılarda kortikosteron birincil stres hormonudur (Russell vd. 2012). Kortizol, çeşitli stres etkenleri sırasında salınmakta çünkü katekolaminlerle birlikte vücudun potansiyel bir tehdide tepki vermeye hazırlanmasında önemli bir metabolik rol oynamaktadır. Hızlı kasılan kaslar glikozu birincil enerji kaynağı olarak kullandığından ve güçlü aktivite patlamalarına dahil olduklarından (Baskin vd. 2015), glikoz mevcudiyeti potansiyel bir tehlikeye karşı kritik öneme sahiptir. Kortizolün birincil metabolik rolü, akut stres dönemlerinde glukagon ve epinefrin ile birlikte hareket ederek dolaşımdaki kan glikoz düzeyini artırmaktır. Kortizol ayrıca bir sonraki stres olayına

hazırlık olarak karaciğerde birkaç saat boyunca lipolizi, proteolizi, glikojenolizi ve glikoneogenezi uyarmaktadır (Sapolsky vd. 2000).

Kortizol, fiziksel ve psikolojik stres de dahil olmak üzere çeşitli stresli deneyimler sırasında glikoz homeostazisini korumak için birçok metabolik süreci etkilemesi nedeniyle stres hormonu olarak bilinmektedir (Everding 2021). Buna karşın kortizol salınımı tür/ırk, sirkadiyen ritim, fizyolojik durum, yaş, yönetim ve diğer faktörler tarafından etkilenmektedir (Möstl vd. 1985, Trevisi ve Bertoni 2009).

## 2.2 Stresin Ölçülmesi

Hayvanlar, stres faktörleri ile esas olarak birçok davranışsal ve fizyolojik tepkiler geliştirerek mücadele etmektedir. Farklı hayvan türleri farklı koşullarda maruz kaldıkları çevresel streslere karşı, esas olarak fizyolojik ve davranımsal değişimleri kullanarak yaşamlarını ve üretimlerini sürdürürler. Fizyolojik ve davranımsal bu değişimlerin izlenmesi, ölçülebilmesi ve değerlendirilmesi yoluyla stresin tipi, aşaması ve alınacak önlemler konusunda karar verilebilmektedir (Pehlivan ve Dellal 2014).

Stresin fizyolojik tepkiler yoluyla değerlendirilmesinde fizyolojik, hematolojik, biyokimyasal ve hormonal olmak üzere çok sayıda değişken kullanılabilmektedir. Bu değişikenler arasında stresle doğrudan ilişkili olması nedeniyle hormonal parametrelerin değerlendirilmesi önemli bir yer tutmaktadır. Stres durumu ile başa çıkmada öncü hormonlar glikokortikoitler ve katekolaminlerdir. Bu hormonlar adrenal aktivite ve buna bağlı olarak meydana gelen yıkımın göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Möstl ve Palme 2002). Kortizol, termal stres de dahil olmak üzere strese verilen fizyolojik tepkinin önemli bir biyobelirtecidir (Ghassemi Nejad vd. 2014). Başlangıçta, stres yanıtının neden olduğu fizyolojik değişiklikler, vücut stres etkenine rağmen homeostazı sürdürmeye çalışırken uyum sağlayıcı bir role hizmet etmekte, ancak allostatik yükte sürekli bir artış, organizmada bir dizi zararlı sonuca neden olmaktadır. Bu nedenle kortizol düzeylerinin belirlenmesi, potansiyel olarak stresin erken tespitini kolaylaştırmaya yardımcı olabilir, sağlığa zararlı sonuçlar açısından risk altındaki

hayvanların belirlenmesini sağlayabilir ve stresi azaltmak için etkili yöntemlerin uygulanmasını kolaylaştırabilir (Russel vd. 2012).

Glikokortikoitlerin (esas olarak kortizol) konsantrasyonları, farklı matrislerde ölçülebilmektedir (Möstl ve Palme 2002). Bu matrislerin özellikleri ve karşılaştırılması çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Kortizol konsatrayonlarının belirlenmesinde kullanılan çeşitli matrislerin özelliklerinin karşılaştırması (Russel vd. 2012)

| **Özellik/Matris** | **Serum** | **Tükürük** | **İdrar** | **Kıl** |
|---|---|---|---|---|
| İnvazivlik düzeyi | Yüksek | Düşük | Orta | Düşük |
| Kortizol, örnekleme prosedürünün stresinden etkilenir mi? | Muhtemel | Muhtemel | Muhtemel | Hayır |
| Depolama gereksinimleri | Santrifüj, ayırma ve dondurma | Soğutma veya dondurma | Soğutma veya dondurma | Oda sıcaklığında yıllarca muhafaza edilebilir. |
| Temsil edilen kortizol üretiminin zaman periyotları | Örnekleme anındaki ölçüm | Örnekleme anındaki ölçüm | 12-24 saat (değişkenlik gösterir) | Ay-yıl (örnek uzunluğuna bağlı) |
| Kortizol bağlayıcı globulindeki (CBG) değişikliklerden etkilenir mi? | Evet. Çünkü toplam kortizol düzeyi ölçülmektedir. | Hayır. Çünkü yalnızca serbest kortizol düzeyi ölçülmektedir. | Hayır. Çünkü yalnızca serbest kortizol düzeyi ölçülmektedir. | Hayır. Çünkü yalnızca serbest kortizol düzeyi ölçülmektedir. |
| Klinik olarak ilgili referans aralıkları belirlendi mi? | Evet | Evet | Evet | Hayır |

Hayvanlarda kronik stresi hormonal analiz yoluyla değerlendirmeye yönelik uygun biyolojik numunelerin hazırlanması, ekstraksiyonu ve analizi için farklı teknikler uygulanması, klinik laboratuvarlardaki deneylerde zamandan ve maliyetten tasarruf sağlamaktadır. Bu bağlamda hayvanlarda stres incelenirken, stres türleri, bunların sınıflandırılması ve farklı hayvan türlerindeki stres düzeylerinin uygun matrisler kullanılarak doğru değerlendirilmesi önem taşımaktadır (Ghassemi Nejad vd. 2022).

Kortizol hormonu kan, tükürük, idrar, dışkı, kıl vb. birçok vücut dokusundan/salgısından ölçülebilmektedir (Heimbürge vd. 2019). Bu matrisler farklı zaman dilimlerindeki kortizol salgısını temsil etmektedir. Kan ve tükürük stresli bir uyaranın ardından birkaç dakika içinde kortizolün salgılandığı nispeten kısa bir zaman dilimini (Guzik vd. 2006, Bozovic vd. 2013), dışkı ve idrar 2-48 saat arasında değişen daha uzun kortizol dolaşımını (Hay vd. 2000, Palme vd. 2005) ve kıl ise aylar düzeyinde (Bacci vd. 2014) kortizol birikimini temsil etmektedir (Everding 2021). Bu nedenle kortizol ölçümü için uygun bir matris belirlenmesinde kortizol salınım ve birikim modellerine göre seçim yapılması büyük önem taşımaktadır. Günümüzde hayvanlarda kortizol analizi için kullanılan matrisler geleneksel ve yeni olmak üzere iki grup altında sınıflandırılmaktadır.

### 2.2.1 Kortizol analizinde kullanılan geleneksel matrisler

Kortizol analizinde kullanılan gelenekesel matrisler kan serumu ve plazması, tükürük, idrar ve dışkı gibi matrislerdir (Heimbürge vd. 2019). Tükürük numunesi kortizol konsantrasyonunun sirkadiyen bir ritim göstermesi ve pulsatil dalgalanmaları nedeniyle kan serumuna benzer olarak örnekleme zamanındaki konsantrasyonu göstermektedir. Bu nedenle, kan serumu ile benzer olarak akut değişiklikleri test etmek için kullanılabilirler (Russel vd. 2012).

Toplam serum kortizolü, stres veya serbest kortizol konsantrasyonlarında herhangi bir artış olmamasına rağmen, ölçülen toplam kortizol konsantrasyonunda artışlara neden olabilecek kortizol bağlayıcı globulin (CBG) seviyelerindeki değişikliklerden etkilenir (Russel vd. 2012). Ayrıca serum numunelerinde kortizol ölçümü, hem proteine bağlı

hem de biyoaktif (serbest) kortizol içeren toplam serum kortizolünü yansıtmaktadır (Heimbürge vd. 2019). Ek olarak damar delinmesi yoluyla numunenin alınması da kendi başına bir stres kaynağı olabilir ve kortizol konsantrasyonlarını artırabilir (Heimbürge vd. 2019).

Serum kortizolünün aksine tükürük ve idrar kortizolü, serbest (bağlanmamış) kortizolü yansıtan ve daha az invaziv bir yöntem olmasına karşın, kortizolün gün içerisindeki dalgalanmalarından etkilenmektedir (Russel vd. 2012). Diğer bir biyolojik matris olan dışkı ise bağırsak geçiş süresi boyunca HPA aksı aktivitesinin kısa vadeli entegre bir ölçüsünü sağlamaktadır. Bununla birlikte, oluşan metabolit türleri ve atılım yolları ve zaman süreci türe, cinsiyete, yaşa ve besleme gibi faktörlere göre değişkenlik gösterebilmektedir (Dulude-de Broin vd. 2019).

Bir organizmanın fizyolojik strese maruz kalması durumunda kortizol, enerji depolarını harekete geçirmek ve bağışıklık sistemini modüle etmek için fonksiyon göstermektedir. Hem hayvanlarda hem de insanlarda stres süreçlerindeki rolünün iyi bilinmesine karşın kortizolün uzun süreler boyunca stres seviyelerini yansıtma yeteneği sınırlıdır. Bu büyük ölçüde kortizolün örneklendiği geleneksel matrislerin doğasından kaynaklanmaktadır (Gatti vd. 2009).

Geleneksel olarak kan serumu veya plazması en yaygın kullanılan örnekler olmakla birlikte kandaki kortizol konsantrasyonunun sirkadiyen bir ritim göstermesi ve pulsatil dalgalanmaları ile örnek almak amacıyla hayvanların yakalanması/kısıtlanması gibi faktörlere bağlı olarak konsantrasyonun değişmesi, tükürük, idrar, dışkı ve kıl gibi alternatif biyolojik matrisler kullanan tekniklerin geliştirilmesine yol açmıştır (Dulude-de Broin vd. 2019).

### 2.2.2 Kortizol analizinde kullanılan yeni matrisler

Hayvanlarda kıl (lif), tırnak, pençe ve balık pulu gibi matrisler stresin ölçülmesinde kullanılan yeni matrisler olarak değerlendirilmektedir. Bunlar içerisinde en yaygın

kullanılanı ise kıl (lif) matrisidir. Hayvan ve insan modellerinde geleneksel olarak kullanılan matrisleri (kan, dışkı, tükürük vb.) kılla karşılaştıran veya stresle ilgili koşulların kıl kortizol konsantrasyonu üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda, kıl örneğinin glikokortikoit analizi için daha uygun bir biyolojik matris olduğu bildirilmiştir (Dulude-de Broin vd. 2019).

Gerçekten de kılda yapılan örnekleme, sirkadiyen dalgalanmadan etkilenmeyen ve kümülatif kortizol salınımının uzun vadeli geriye dönük ölçümlerini sağlayabilen yeni bir matristir. Türe/ırka özgü uzama profiline bağlı olarak birkaç aylık glikokortikoit yanıtını kaydetme potansiyeline sahip olan kıl matrisi, belirlenen herhangi bir dönemdeki kortizol üretimini geriye dönük olarak, ilgili dönemin başlangıcında örnek almaya gerek kalmadan saptamaya olanak sağlamaktadır. Alternatif olarak, stresin henüz oluşmadığı bir dönem için de temel kortizol değerlendirmesi sağlayabilir. Örneklenecek materyal, hayvan türüne ve tür içerisindeki ırkın kıl/lif uzama profiline göre uygun bir bölgeden 1 -2 cm çapındaki küçük bir alandan non-invaziv bir şekilde toplanabilmektedir. Ayrıca kıl örnekleri, analizden önce özel depolama koşulları gerektiren diğer matrislerin (serum, idrar, dışkı, vb.) aksine, kolayca taşınabilmekte ve oda sıcaklığında depolanabilmektedir. Bununla birlikte, bu yeni stres biyobelirtecini uygularken çeşitli kısıtlılıklar da bulunmaktadır. Nitekim bu matrisin akut strese verilen yanıtları ölçemediği ve bu nedenle kronik strese ek olarak bu tür değişikliklerin de gözlemlenmesi gerekiyorsa, kortizol ölçümü için diğer matrislerin de kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Russell vd. 2012).

Kronik stresi belirlemek amacıyla yapılacak örneklemelerde kıl matrisinin kullanılması önerilmektedir. Çünkü entegre kortizol salgılanmasının ve stresin daha uzun süreli geriye dönük belirtecinin kıl kortizol konsantrasyonu olduğu varsayılmaktadır. Kıl kortizol konsantrasyonu, insanlarda psikonöroendokrinolojik çalışmalarda ve aynı zamanda hayvan stresi ve refahı araştırmalarında giderek daha fazla kullanılmaktadır (Heimbürge vd. 2019).

Kıl kortizol değerlendirmesinin ilk araştırması, yabani erkek farelerde (Koren vd. 2002), ardından ise Rhesus maymunlarında (Davenport vd. 2006) barınma ve nakliyeden

kaynaklanan stresi saptamak için gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, evcil kedi ve köpeklerde (Accorsi vd. 2008), süt sığırlarında (del Rosario vd. 2011) ve çeşitli yabani hayvan türlerinde (Ashley vd. 2011, Terwissen vd. 2013) çalışılmıştır. Daha yakın zamanlarda ise, primatlarda (Yamanashi vd. 2013) ve kemirgenlerde (kortikosteron) (Scorrano vd. 2015, Erickson vd. 2017) stresi değerlendirmek için kıl kortizol analizi kullanılmıştır (Greff vd. 2019).

Kortizol konsantrasyonlarının tespitinde kıl matrisinin kullanımı, uzun vadeli ve non-invaziv bir ölçüm sağlamakta ve bu durum da başka bir strese maruz bırakılmadan analiz sonuçlarının daha doğru değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte kıl kortizol düzeylerinin kronik stresin bir belirteci olarak kullanılabilmesi için, sonuçların hem bireyler hem de gruplar arasında karşılaştırmalar yapılarak kontrol edilmesi ve kıl kortizol konsantrasyonuna etki eden faktörlerin dikkate alınması önemlidir. Kıl kortizol konsantrasyonlarını potansiyel olarak etkileyen faktörler arasında yaş, cinsiyet, gebelik, mevsim, kıl rengi ve vücut bölgesi gibi faktörlerin etkili olduğu bildirilmektedir (Heimbürge vd. 2019). Nitekim, yapılan araştırmalarda 15 günlük buzağılardan alınan kıl örneklerinde 2 yaşındaki ineklerden alınanlara kıyasla (del Rosario vd., 2011) ve yeni doğan taylarda 30 60 günlük taylara kıyasla yüksek kortizol seviyeleri saptandığı bildirilmiştir (Comin vd. 2012; Montillo vd. 2014). Ek olarak, genç primatlar ve yavrularda, yetişkinlerden daha yüksek glikokortikoit seviyeleri görülmüş ve benzer şekilde kıl kortizol konsantrasyonlarında yaşa bağlı bir düşüş meydana geldiği bildirilmiştir (rhesus maymunları: Dettmer vd. 2014; vervet maymunları ve babunlar: Laudenslager vd. 2012; Fourie ve Bernstein, 2011; diğer primatlar: Fourie vd. 2016). Ancak Fourie vd. (2015), babunlarda kıl kortizol konsantrasyonlarının yaşamın ilerleyen dönemlerinde tekrar artabileceğini bildirmiştir (Heimbürge vd. 2019). Bununla birlikte, bu bulgular kıl kortizol konsantrasyonlarında genç yaştan yetişkin yaş gruplarına doğru yaşa bağlı bir düşüş olduğunu göstermektedir (Heimbürge vd. 2019).

Amerikan kara ayılarındaki (Lafferty vd. 2015) ve çakallardaki bulgular (Schell vd. 2017), erkeklerin dişilerden daha yüksek kıl kortizol konsantrasyonlarına sahip olduğuna işaret etmektedir. Genç erkeklerde artan testosteron seviyelerinin, stresli olaylar olarak deneyimlenebilen ve yüksek kortizol konsantrasyonlarıyla sonuçlanabilen

üreme ile ilgili davranışlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bergman vd. 2005). Bunun aksine kutup ayıları (Bechshøft vd. 2011), boz ayılar (Cattet vd. 2014) ve primatlar (Laudenslager vd. 2012; Dettmer vd. 2014; Fourie vd., 2016) üzerinde yapılan çalışmalar dişilerde erkeklerden daha yüksek kıl kortizol konsantrasyonlarına rastlandığını göstermektedir. Özetle, bu sonuçlara göre kıl kortizol konsantrasyonları üzerinde cinsiyetin etkisi tutarsız görünmektedir. Erkekler ve dişiler arasındaki farklı kortizol seviyeleri, farklı davranış modeli, vücut durumu ve gonadal steroidlerin metabolizması gibi çok sayıda faktöre bağlı olabilmektedir (Heimbürge vd. 2019).

Kortizol, fetal organ sistemlerinin olgunlaşmasında ve doğumun başlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Challis vd. 2001). Birçok türde yapılan çalışmalar, doğuma kadar ilerleyen gebelikle birlikte dolaşımdaki kortizolde bir artış olduğunu göstermektedir (Obel vd. 2005; Edwards ve Boonstra, 2018). Dişi domuzlarda gebeliğin son döneminde ve laktasyon döneminde, erken ve orta gebelik dönemlerine göre daha yüksek kıl kortizol seviyeleri bildirilmiştir (Bacci vd. 2014). İneklerde, kıl kortizol konsantrasyonları gebelik sırasında büyük ölçüde değişmemiş, ancak doğum yaklaştıkça önemli ölçüde artmıştır (Braun vd. 2017). Sonuç olarak farklı hayvan türlerinde yapılan birkaç çalışmaya göre gebelik sırasında kıl kortizol konsantrasyonlarında genel bir artış olduğu gösterilmiştir (Heimbürge vd. 2019).

Domuzlarda (Bacci vd. 2014) ve köpeklerde (Roth vd. 2016) kış aylarında yüksek, yaz aylarında ise daha düşük kıl kortizol konsantrasyonları gözlenmiştir. Sincaplarda (Martin ve Réale 2008) yaz aylarında ilkbahara kıyasla daha yüksek kortizol seviyeleri bildirmiştir. Boz ayılarda, yaz sonunda ve sonbaharda kortizol seviyeleri ilkbahara göre daha yüksek olma eğilimi göstermiştir (Cattet vd. 2014). Farklı türlerde yapılan çeşitli araştırmalarda, mevsimsel etkiler için tutarsız sonuçlar olduğu görülmektedir (Heimbürge vd. 2019).

Sığırlarda (del Rosario vd. 2011, Burnett vd. 2014) ve şempanzelerde (Yamanashi vd. 2013) gerçekleştirilen çalışmalarda, beyaz kılda siyah kıldan daha yüksek bir kıl kortizol konsantrasyonu saptanmıştır. Bunun aksine siyah kılda beyaz kıla kıyasla daha yüksek kıl kortizol seviyeleri bulunduğunu bildiren araştırmalar da bulunmaktadır

(Tallo-Parra vd. 2015). Sığırlarda yapılan diğer çalışmalarda ise farklı renkli kıllar arasında kortizol konsantrasyonları bakımından önemli farklılıklar olmadığı bildirilmiştir (Ghassemi Nejad vd. 2016, Nedić vd. 2017). Kıl rengi ve kıl kortizol konsantrasyonları arasındaki ilişki ile ilgili çelişkili bildirişlerin nedenleri tam olarak anlaşılamamakla birlikte bu durumun kıl gövdesindeki fiziksel boşluk, siyah kılla kaplı deride artan kan akışı, melanin ile etkileşimler veya ultraviyole radyasyona maruz kalmanın koyu kıllarda daha yüksek kıl kortizol konsantrasyonları bulunmasına neden olabileceği de ileri sürülmüştür (Gratacós Cubarsi vd. 2006, Pragst ve Balikova 2006, Burnett vd. 2015, Neumann vd. 2017). Sonuç olarak, kıl renginin kıl kortizol konsantrasyonları üzerindeki etkisine ilişkin çalışmalar tutarsız sonuçlar göstermektedir (Heimbürge vd. 2019).

Yabani ve evcil hayvanlarda yapılan çok sayıda çalışma, vücut bölgesine bağlı olarak kıl kortizol konsantrasyonlarında farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır (Caribou ve ren geyiği: Ashley vd. 2011; şempanzeler: Yamanashi vd. 2013; Carlitz vd. 2015; dağ sıçanları: Acker vd. 2018; kangurular: Sotohira vd. 2017; Kanada vaşağı: Terwissen vd. 2013; sığır: Moya vd. 2013; Burnett vd. 2015; domuzlar: Casal vd. 2016 ve Casal vd. 2017; atlar: Duran vd. 2017). Vücut bölgeleri arasındaki kıl kortizol konsantrasyonları farklılıklarının olası bir açıklaması, hayvanlarda döngüsel kıl uzamasının ve dökülme ritminin neden olduğu anagen, katagen ve telogen fazlarındaki kıl foliküllerinin değişen oranları olabilmektedir. Nitekim kortizol esas olarak anagen büyüme fazı sırasında kıla dahil olmakta böylece, anagen fazda daha fazla folikül bulunan veya anagen fazı daha uzun olan foliküllerin bulunduğu vücut bölgelerinde daha yüksek kıl kortizol konsantrasyonları bulunması olasıdır (Burnard vd. 2017). Ek olarak, farklı hava koşullarına maruz kalma, dışkı ile kontaminasyon, tımar etme, farklı kıl uzama oranları ve deriye kan akışı, hayvan vücudundaki bölgeye özgü farklılıkların nedenleri olarak sayılabilir (Moya vd. 2013, Burnett vd. 2015, Carlitz vd. 2015, Casal vd. 2016).

## 2.3 Kaynak Özetleri

Yapılan literatür taramasında memeli çiftlik hayvanlarında kan serumunda ve kılda kortizol konsantrasyonlarını belirlemeye yönelik gerçekleştirilen bazı araştırmaların özetleri aşağıda verilmeye çalışılmıştır.

Alila-Johansson vd. (2003) tarafından 5-13 yaşlı Finnish Landrace ırkı 7 baş dişi keçide günlük ve yıllık farklı aydınlatma koşullarının progesteron, melatonin ve kortizol konsantasyonları üzerine etkilerini saptamak amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, deneme keçilerinden doğal fotoperiyodun taklit edildiği yapay aydınlatma koşullarında (kış, erken ilkbahar, geç ilkbahar, yaz, erken sonbahar, geç sonbahar kış mevsimlerinde) 2 saatlik aralıklarla kan örnekleri alınmıştır. Araştırma sonucunda kortizol hormonu bakımından en yüksek seviye kış mevsiminde saptanmışken, en düşük seviye erken ilkbahar-yaz mevsimlerinde saptanmıştır.

Meza-Herrera vd. (2007), Granadina, Nubya, Saanen, Toggenburg, Alpin ve Saanen x Criollo olmak üzere 6 farklı genotipteki (5'er baş) toplam 30 baş dişi keçiden farklı mevsimlerde (ilkbahar, yaz, sonbahar, kış) alınan kan örneklerinde kortizol ve glikoz düzeylerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda kortizol ve glikoz düzeyleri bakımından genotipler arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır. Bununla birlikte kortizol düzeylerinin farklı mevsimlerdeki ortalamaları bakımından sadece ilkbahar mevsimi diğer mevsimlerden önemli ($p<0.01$) düzeyde düşük bulunmuştur.

Taşkın vd. (2008) tarafından Saanen keçilerinin termal strese karşı tepkilerini belirlemek amacı ile yapılan araştırmada, 4 yaşlı 15 baş sağmal Saanen keçisi kullanılmıştır. Keçilerden alınan kan örneklerinde kortizol, $T_3$ ve $T_4$ hormonlarının seviyeleri ölçülmüş ve araştırma sonucunda kortizol, $T_3$ ve $T_4$ hormon seviyeleri sırası ile 8.84 nmol/l, 1.54 nmol/l ve 42.37 nmol/l olarak bulunmuştur. Sonuç olarak kortizol, $T_3$ ve $T_4$ hormon seviyelerine göre Saanen keçilerinin termal strese uyum gösterdiği bildirilmiştir.

Idris (2011) tarafından gerçekleştirilen araştırmada 8 baş erkek ve 8 baş dişi olmak üzere toplam 16 baş Batı Afrika Cüce keçisinden sabah ve akşam saatlerinde alınan kan örneklerinde günlük kortizol düzeyleri ölçülmüş ve kortizol düzeyleri üzerine yaş, cinsiyet ve gömlek renginin etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda Batı Afrika Cüce keçilerinde yaşın, cinsiyetin ve gömlek renginin günlük kortizol düzeyleri üzerinde etkili olmadığı bildirilmiştir.

Peric vd. (2013), 142 baş Holstein ve 148 baş İsveç Kırmızısı x Montbéliarde melezi ($F_1$) olmak üzere toplam 290 baş düvede HPA aksı aktivitesini değerlendirmek için topladıkları kıl örneklerinde kortizol konsantrasyonlarını belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda, melez düvelerde ölçülen kortizol konsantrasyonları, Holstein düvelerin kortizol konsantrasyonlarından düşük bulunmuş olup bu durumun Holstein ve melez düveler arasındaki HPA aktivitesi ve allostatik yükteki farklılıklardan kaynaklandığını ve melez hayvanların çevreye daha iyi uyum sağladığını bildirmişlerdir.

Bacci vd. (2014) tarafından dişi domuzlarda ardışık iki üreme döngüsünde 3 fizyolojik durum (gebelik başlangıcı, doğum öncesi ve sütten kesim) karşılaştırılmış, ortalama kıl kortizol konsantrasyonları diğer fazlara kıyasla gebelik başlangıcı 1 (20.1 ± .95 pg/mg) ve gebelik başlangıcı 2 (16.29 ± 2.15 pg/mg) önemli derecede yüksek bulunurken ($p < 0,001$) 1. ve 2. döngü arasında gebelik başlangıcında anlamlı bir farklılık görülmediğini bildirmişlerdir. Üstelik HCC, doğum öncesi 1 (5,17 ± 0,51 pg/mg) ve sütten kesim 1 (6,01 ± 0,47 pg/mg) ile karşılaştırıldığında doğum öncesi 2 (10,48 ± 0,96 pg/mg) önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$).

Ghassemi Nejad vd. (2014) tarafından termal stres altında bulunan 3 yaşlı 9 baş dişi Corriedale koyunu üzerinde gerçekleştirilen araştırmada, sıcaklık stresi altındaki koyunlarda su kısıtlamasının kan ve yapağı kortizol seviyeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmada deneme hayvanları üç gruba ayrılmıştır. Metabolik kafeslerde barındırılan üç gruptan birincisi su kısıtlaması uygulanmayan grup (kontrol grubu), ikincisi besleme sonrası 2 saatlik su kısıtlamasına tabi tutulan grup ve üçüncüsü ise besleme sonrası 3 saatlik su kısıtlmasına tabi tutulan grup olarak oluşturulmuştur. Araştırma sonucunda, sıcaklık stresi koşullarında stres seviyesinin belirlenmesinde

yapağı kortizol konsantrasyonlarının kan kortizol konsantrasyonlarından daha hassas ve doğru bir belirteç olduğu bildirilmiştir.

Burnett vd. (2015) 118 baş Hosltein ırkı ineğin kuyruk ucundan alınan kıl örneklerinde, kıl kortizolünün hayvanlarda klinik hastalıklar, üreme durumu ve subklinik endometrit gelişimi ile ilişkisini araştırmak için gerçekleştirdikleri çalışmada, kıl kortizol ölçümlerinin klinik hastalıklar ve gebelik durumu ile doğrudan ilişkisi olduğunu, buna karşın kıl kortizol konsantrasyonlarının, subklinik hastalık gelişimi gibi daha düşük şiddetteki stres durumlarını ayırt etmek için uygun olmadığını bildirmişlerdir.

Braun vd. (2017) tarafından 3-17 yaşlı toplam 27 baş sütçü sığırdan bir yıl süresince aylık olarak alınan kıl örneklerinde kıl kortizol konsantrasyonları üzerine gebeliğin ve hastalık durumunun etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda doğum gibi kısa süreli stres faktörlerinin kıl kortizol konsantrasyonları üzerindeki etkisinin aylık örneklenen kıllarda daha kolay tespit edildiği bildirilmiştir.
Fischer-Tenhagen vd. (2018) tarafından 68 baş sütçü sığırdan toplanan kıl örneklerinden belirlenen kıl kortizol konsantrasyonlarının, kronik topallık nedeniyle meydana gelen stresin bir göstergesi olarak değerlendirilebilirliğinin araştırıldığı çalışmada, kıl kortizol konsantrasyonlarının kronik topallığın ayırt edilmesinde kullanılamayacağı bildirilmiştir.

Baier vd. (2019), melez kastre besi sığırlarında kıl kortizol konsantrasyonları üzerine kıl rengi, kıl uzunluğu ve yaşın etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla araştırmada kullanılan sığırlar siyah kıl örtüsüne sahip yaşlı, beyaz kıl örtüsüne sahip yaşlı ve siyah kıl örtüsüne sahip genç olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre kıl renginin etkisinin önemli olmadığı, yaşlı grupta genç gruptakilere göre daha yüksek kıl kortizol konsantrasyonları saptandığı ve kıl kortizol düzeylerinin kıl uzunluğu ile zayıf bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir.

Dulude-de Broin vd. (2019), Kayalık Dağ Keçilerinde (*Oreamnos americanus*) beş hafta süreyle tekrarlanan ACTH enjeksiyonu sonrasında dışkı ve kıl matrislerinde, endojen (yaş, cinsiyet, üreme durumu) ve metodolojik (dışkı numunesi toplama tarihi,

donma gecikmesi ve kıl tipi) değişkenlerin kortizol konsantrasyonları üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda genç keçilerin erginlere göre ve ergin dişilerin ergin erkeklere göre daha yüksek kıl kortizol düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, kayalık dağ keçilerinde HPA aksı aktivitesinin geçerli biyobelirteçleri olarak dışkı ve kılın kullanılabileceği bildirilmiştir.

Ghassemi Nejad vd. (2019), termal konfor aralığında aynı çevresel koşullara sahip ve suya serbest erişimi olan kapalı endüstriyel bir çiftlikte barındırılan 47 baş multipar Holstein inek ve 23 baş Holstein düvenin çeşitli vücut bölgelerinden alınan kıl örneklerinde ve serumda kortizol konsantrasyonları analiz edilmiştir. Analiz verilerine göre, kıl kortizol konsantrasyonlarının örnekleme bölgelerine ve yaşa bağlı olmadığı ve serum kortizol konsantrasyonlarının düveler ve laktasyondaki inekler arasında önemli bir farklılık göstermediği bildirilmiştir.

Sharma vd. (2019), Hindistan'da (54 işletme) geleneksel barınaklarda (sundurmalarda) barındırılan ergin sığırlardan saptanan kıl kortizol seviyeleri ile stres arasındaki ilişkiyi belirlemek ve kıl kortizol konsantrasyonlarının diğer refah göstergeleri ile ilişkisinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, yüksek kıl kortizol seviyeleri hayvanların eklem ve vücutlarındaki yaralanmalar, dehidrasyon, yaşlılık ve kıl dökme seviyesi ile ilişkilendirilmiştir. Araştırma sonucunda kıl kortizolünün sundurma altında yetiştirilen ineklerde stres düzeylerini değerlendirmek için etkili bir araç olduğu sonucuna varılmıştır.

Sawyer vd. (2019), ilk defa çiftleştirilen 22-25 aylık 46 baş Avustralya Merinosu dişi koyunlarda üç faklı kırkım zamanında (koçlar sürüden çıkarılmadan önce, doğuma 2 hafta kala ve doğumdan 2 ay sonra) alınan yapağı örneklerinde üreme süreçlerindeki progesteron ve kortizol hormonlarının konsantrasyonlarını belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda kıl kortizol konsantrasyonlarının çiftleşme öncesinden doğuma kadar ki süreçte önemli ölçüde arttığı, gebelik sonrası kıl kortizol konsantrasyonlarının önemli ölçüde düştüğü gözlenmesine rağmen çiftleşme öncesi kıl kortizol seviyelerine göre yüksek olduğu bildirilmiştir.

Ghassemi Nejad vd. (2020) tarafından 9 baş dişi Corriedale ırkı koyun ve 18 baş dişi Holstein ırkı sığırdan topladıkları kan ve kıl örneklerinde iki farklı test (RIA ve ELISA) kullanarak kortizol ölçümünün erişilebilirliği, basitliği ve doğruluğunun değerlendirilmesi üzerinde çalışılmış ve ayrıca laktasyondaki inekler ve düveler arasında sıcak ve nemli ortam koşullarında kıl kortizol konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, kıl/yapağı kortizol analizi için ELISA yönteminin daha güvenilir, daha çevre dostu olduğu ve laktasyondaki ineklerin düvelere göre termal strese karşı daha savunmasız olduğu bildirilmiştir.

Senthilkumar vd. (2020), 120'si kış, 120'si yaz mevsiminde olmak üzere toplam 240 baş Tellicherry keçisinde kış ve yaz mevsiminde serum kortizol düzeylerini belirlemek üzere yapılan çalışmada her mevsim için seçilen hayvanlar altı deney grubuna ayrılmıştır. Grup I, II, III, IV, V (uygulama grupları) ve VI (kontrol grubu) olmak üzere her gruba farklı senkronizasyon protokolleri uygulanmıştır. Araştırma bulgularına göre, kış ve yaz mevsimlerinde, kan alımının tüm aşamalarında gebe olmayan keçilerde ki kortizol seviyesi tüm gruplarda gebe keçilere göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur.

Everding (2021) tarafından domuzlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, gebelik esnasında kıl kortizol düzeylerinin belirlenmesine yönelik olarak 3 farklı deneme gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerin ilkinde ACTH uygulamasının kıl kortizol düzeyi üzerine etkisi araştırılmıştır. 2. denemede bireysel ve grup olarak yetiştirilen domuzlarda farklı barındırma uygulamasının kıl kortizol düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır. 3. denemede ise primipar ve multipar domuzlarda maternal kortizol seviyesi ile fetal kortizol düzeyi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Araştırma sonucunda ACTH uygulamasının kıl kortizol düzeylerini etkilemediği, grup olarak barındırılan dişi domuzların bireysel olarak barındırılanlardan daha yüksek kıl kortizol düzeylerine sahip olduğu ve maternal kortizol seviyesi ile fetal kortizol seviyesi arasında güçlü bir korelasyon olduğu bildirilmiştir.

Hayashi vd. (2021) tarafından Holstein ırkı 6-24 haftalık 21 baş buzağı ve kuru dönemde (1-2 aylık prepartum) ve laktasyondaki (10., 50., 150. ve 250. günler) 51 baş inek üzerinde gerçekleştirilen araştırmada büyüme ve doğumun plazma, tükürük ve kıl

(omuz ve sağrı bölgelerinden) örneklerinin kortizol konsantrasyonları üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda plazma ve tükürük kortizol konsantrasyonları arasında önemli bir pozitif korelasyon saptanmış ve kıl kortizol konsantrasyonlarının örnekleme bölgesine, kıl rengine, yaşa veya doğuma bağlı olarak büyük ölçüde değişebildiği bildirilmiştir.

Wiechers vd. (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, farklı çiftlik sistemlerinin stres üzerindeki etkilerini araştırmak ve farklı yetiştirme sistemlerinde yetiştirilen dişi domuzların stres düzeylerini değerlendirmek için kıl kortizol seviyeleri ölçülmüştür. Kıl kortizol düzeylerinin kronik stres sırasında HPA aksının aktivitesinin azalmasından etkilenebileceği ve bunun da zamanla daha düşük kortizol seviyelerine neden olacağı saptanmıştır. Dişi domuzlardaki kıl kortizol düzeylerinin ayrıca, doğum ve laktasyon gibi baskın bir stres etkeninden de etkilenebildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, kronik stres ile ilgili farklı yetiştirme sistemlerinin karşılaştırılması için kıl kortizol ölçümünün kullanımı sınırlı bulunmuştur.

Otten vd. (2022) tarafından 18 baş Alman Landrace dişi domuz ve 12 baş Holstein Friesian inek üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, domuz ve sığırların kıl segmentlerinde idrar kontaminasyonunun ve farklı temizleme protokollerinin kıl kortizol konsantrasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre kontamine sığır kıllarına ilave olarak temizleme prosedürü uygulanmasının kılın distal segmentinde belirgin olan kortizolün yıkanmasına neden olduğu ve idararla kontaminasyonun HCC seviyesini arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca bu etkinin her iki türde de proksimal kıl segmentlerine kıyasla distalde daha belirgin olduğu bildirilmiştir.

Agradi vd. (2023) tarafından gerçekleştirilen çalışmada İtalya Frisa keçilerinin ilkbaharın sonunda ağıldan meraya geçişine verdiği fizyolojik tepkiyi iz elementler, ağır metaller ve kıl kortizol konsantrasyonları açısından değerlendirilmesi amacıyla Frisa keçilerinin ilk kırkımdan sonra uzayan kılları 2 yıl boyunca her ay örneklenmiştir. Analiz verilerine göre meraya çıktıktan sonraki 2. ayda Mg, Zn ve Al seviyelerinin düştüğü, kıl kortizol konsantrasyonlarının da yükseldiği bildirilmiştir.

Medill vd. (2023a) tarafından Kanada'nın Nova Scotia kentinde ki Sable Adası'nda olan bir yabani at popülasyonundaki 113 baş dişi ve 135 baş erkek üzerinde gerçekleştirilen çalışmada toplanan kıl örneklerinden HCC'nin cinsiyet, yaş, vücut durumu ve yavru varlığı üzerine ilişkisi araştırılmıştır. HCC'nin ağırlıklı olarak cinsiyet, yaş, vücut durumu ile ilişkili olduğu ve bağımlı yavruları (taylar) olan dişilerde HCC'nin bağımlı yavruları olmayan dişilere göre yüksek olduğu ayrıca dişilerde HCC'nin sürü büyüklüğü ve sürüdeki yetişkin erkeklerin sayısı gibi sosyal faktörlerden etkilendiği sonucuna varılmıştır.

Medill vd. (2023b) tarafından Kanada'nın Nova Scotia kentinde ki Sable Adası'nda olan bir yabani at popülasyonundaki erkek atlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, atların kuyruk kıllarının kortizol ve testosteron konsantrasyonları hayvanların yaşları ve sürü içindeki sosyal pozisyonlarına göre araştırılmıştır. Erkek hayvanlar cinsel olgunluğa erişmemiş olanlar (2-4 yaş), cinsel olarak olgun ancak henüz çiftleşmemiş olanlar ve cinsel olarak baskın aygırlar olarak gruplandırılmıştır. Üreme açısından baskın erkeklerin (aygır) kıl kortizol ve testosteron konsantrasyonlarının diğer sosyal pozisyondaki hayvanlara göre önemli ölçüde yüksek olduğu ve cinsel olgunluğa erişmemiş atların ise kıl kortizol ve testosteron konsantrasyonlarının önemli ölçüde düşük olduğu saptanmıştır.

Contreras-Jodar vd. (2023) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Haziran-Ekim 2020 tarihleri arasında Köppen iklim sınıflandırmasına göre kışın çok soğuk yazın ise yarı kurak bir iklime sahip İspanya Alcarràs, Lleida'da bulunan ticari bir domuz çiftliğinde Lean Duroc×(Landrace×Large White) ırkının ticari bir melezi olan dişi ve kastre edilmiş erkek domuzlar üzerinde barınma yoğunluğunun azaltılması ve yüksek sıcaklıkların olumsuz etkilerini hafifletmek için soğutma sistemlerinin kullanımının etkileri değerlendirilmiştir. Domuzlarda termal stres (HS), hayvanların performansındaki değişiklikler, hayvan bazlı göstergeler (kirlilik ve aktivite) ve fizyolojik göstergeler (nötrofil/lenfosit oranı ve kıl kortizol) aracılığıyla ölçülmüştür. Araştırma sonuçlarına göre, havalandırma sisteminin kullanımı, barınma yoğunluğunun azaltılması ve özellikle her iki stratejinin kombinasyonunun domuzların vücut ağırlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bu stratejilerin bir arada

kullanılmasının domuz refahını ve performansını iyileştirmede etkili olduğu bildirilmiştir.

Otten vd. (2023) tarafından gerçekleştirilen çalışmada laktasyonun farklı dönemlerindeki ineklerin süt üretim özellikleri ile kıl kortizol düzeyleri arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla ortalama 4 yaşlı 41 baş multipar Holstein Friesian ırkı inekten doğumdan itibaren 100 gün aralıklarla 300 güne kadar kıl örnekleri alınmıştır. Araştırma bulgularına göre kıl kortizol konsantrasyonunun doğumdan sonra arttığı ve doğumdan sonraki 200. günde en yüksek seviyeye ulaştığı saptanmıştır. Ayrıca kıl rengine ilişkin sonuçların, sığırlarda siyah kılların beyaz kıllardan daha yüksek kortizol konsantrasyonuna sahip olduğu yönündeki bulguları doğruladığı bildirilmiştir.

Cotticelli vd. (2024) tarafından 30 baş multipar ve 38 baş primipar Akdeniz mandası üzerinde gerçekleştirilen çalışmada laktasyonun farklı günlerinde örneklenen kan, kıl, peynir altı suyu ve sütte kortizol konsantrasyonları incelenmiştir. Plazma kortizol seviyeleri laktasyonun ilk 90 gününde ve 91.- 150. günleri arasında, 150 gün ve üzerine kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuş, kıl kortizol seviyelerinin ise laktasyonda 150 günün üzerindeki mandalarda, 90 günün altındaki ve 91.- 150. gün arasındaki mandalara kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Manuel vd. (2024) tarafından ortalama 4,5 yaşlı 20 baş Targhee koyunu üzerinde gerçekleştirilen çalışmada aşım öncesi, gebelik ve doğum sonrası dönemlerinde örneklenen yapağıda kortizol, progesteron ve testosteron konsantrasyonları farklı fizyolojik dönemlere göre değerlendirilmiştir. Araştırmadan elde edilen bulgulara göre aşım öncesinde ve gebeliğin başlangıcında örneklenen yapağılarda kortizol, progesteron ve testosteron konsantrasyonlarında önemli bir farklılık bulunmadığı, kortizol ve progesteron konsantrasyonlarının gebeliğin 110. gününde azaldığı, doğum sonrası 40. günde örneklenen yapağıda ise incelenen hormonların konsantrasyonlarında bir artış gözlendiği bildirilmiştir.

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan hayvanlar ve uygulanan yöntemler için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Karar No: 2022-12-117).

## 3.1 Materyal

### 3.1.1 Hayvan materyali

Bu çalışma, A.Ü.Z.F. Zootekni Bölümü Hayvancılık İşletmesinde yetiştirilen 1,5 yaşlı 5 baş doğum yapmamış (primapar) ve 3,5 yaşlı 4 baş en az bir doğum yapmış (multipar) olmak üzere toplam 9 baş dişi Akkeçi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılan keçilere ait bilgiler çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan keçilere ait bilgiler

| Kulak No | Irkı | Doğum Yılı | Deneme Başı Yaşı | Doğum Sayısı | Oğlaklama Tarihi | Oğlaklama Tipi |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 | Akkeçi | 2019 | 1,5 | Primapar | 28.03.2023 | Tek |
| 74 | Akkeçi | 2019 | 1,5 | Primapar | 26.03.2023 | İkiz |
| 927 | Akkeçi | 2019 | 1,5 | Primapar | 27.03.2023 | İkiz |
| 931 | Akkeçi | 2019 | 1,5 | Primapar | 28.03.2023 | Tek |
| 932 | Akkeçi | 2021 | 1,5 | Primapar | 29.03.2023 | Tek |
| 99 | Akkeçi | 2021 | 3,5 | Multipar | 02.04.2023 | İkiz |
| 148 | Akkeçi | 2021 | 3,5 | Multipar | 31.03.2023 | İkiz |
| 151 | Akkeçi | 2021 | 3,5 | Multipar | 28.03.2023 | Tek |
| 157 | Akkeçi | 2021 | 3,5 | Multipar | 27.03.2023 | İkiz |

### 3.1.2 Kan örnekleri

Araştırmaya dahil edilen keçilerden gebelik dönemi süresince aylık periyotlarla (her ayın ortasında) ve doğumu takiben ilk 12 saat içerisinde alınan kanlar bu çalışmanın kan örneklerini oluşturmuştur.

### 3.1.3 Kıl örnekleri

Araştırmaya dahil edilen keçilerden gebelik dönemi süresince aylık periyotlarla (kan alımının yapıldığı günlerde) ve doğumu takiben ilk 12 saat içerisinde alınan kıllar bu çalışmanın kıl örneklerini oluşturmuştur.

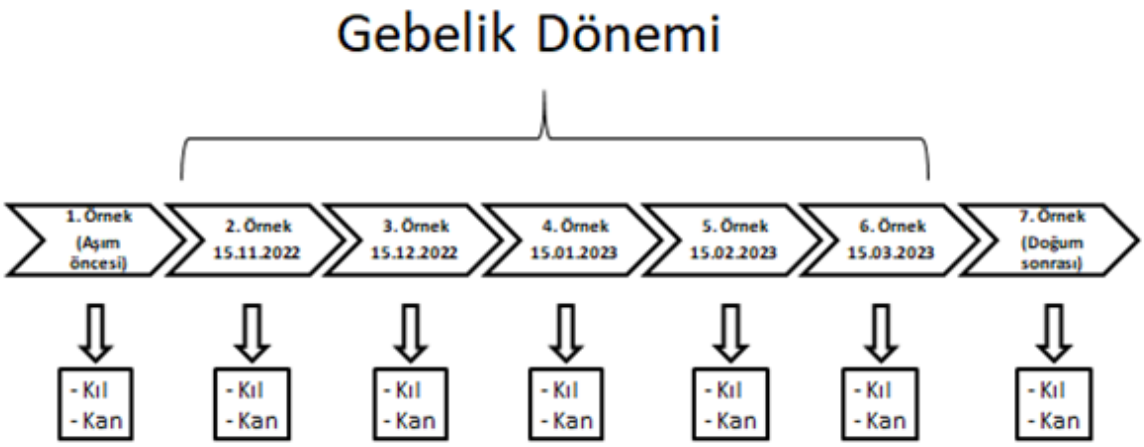
## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Araştırma hayvanlarının yönetimi

Denemeye dahil olan keçiler, A.Ü.Z.F. Zootekni Bölümü Hayvancılık İşletmesi'nde gölgelikli açık ağılda serbest olarak barındırılmıştır. Araştırma süresince keçilere saman, kuru yonca ve kesif yem (keçi süt yemi) grup yemlemesi şeklinde verilmiştir. Araştırmaya dahil edilen keçilerin bulunduğu bölmeye 15.10.2022 tarihinde teke katılmış ve 45 gün süreyle sürüde tutulmuştur. Deneme hayvanlarının yönetiminde işletmenin genel işleyişine müdahale edilmemiş olup, aynı yetiştirme, besleme ve iklim koşullarına maruz bırakılmıştır.

### 3.2.2 Kan örneklerinin alınması ve analize hazır hale getirilmesi

Araştırmaya dahil olan her keçiden 14.10.2022 tarihinden (sürüye teke katıldığı günden 1 gün önce) itibaren gebelik dönemi boyunca sabah yemlemesinden önce 6 (Ekim, Kasım, Aralık, Ocak, Şubat ve Mart) kez ve doğum sonrası ilk 12 saat içerisinde alınan örnek ile birlikte toplam 7 kez keçilerin boyun toplardamarından (vena jugularis) anti koagülant içermeyen (BD Vacutainer® SST II Advance) 5 ml'lik tüplere kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örnekleri serum kortizol analizleri için 4000 devir/dak'da 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve serumları ayrılmış olup, ayrılan serumlar laboratuvar analizleri gerçekleştirilene kadar -20℃'de depolanmıştır. Örnekleme şeması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.




Şekil 3.1 Örnekleme şeması

### 3.2.3 Kıl örneklerinin alınması ve analize hazır hale getirilmesi

Kıl örnekleri, kan örneklemesinin yapıldığı günlerde keçilerin omuz/yan bölgesindeki 3x6 cm'lik bir alandan şarjlı tıraş makinesi yardımıyla deriye en yakın noktadan tıraşlanarak alınması planlanmış olmakla birlikte sadece 1., 2., 3. ve 7. örnek alımlarında (Ekim, Kasım, Aralık aylarında ve doğum sonrası ilk 12 saat içerisinde) örnekleme bölgesinden kıl örnekleri toplanmış, 4., 5., ve 6. örnek alımlarında (Ocak, Şubat ve Mart aylarında) ise yeterli kıl büyümesi/uzaması gerçekleşmediği için örnek toplanamamıştır. Toplanan kıllar labaratuvara getirilerek analiz edilene kadar kilitli poşetlerde ışık ve nemden etkilenmeyecek şekilde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Alınan kıl örneklerinin analize hazır hale getirilmesinde Ghassemi Nejad vd., (2020) tarafından bildirilen yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemde her keçiden yukarıda beliritilen dönemlerde toplanan kıl örneklerinden hassas terazi ile 250 mg kıl örneği tartılıp 5 ml'lik % 96'lık izoproponol ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kıl örnekleri oda sıcaklığında bir hafta süre ile kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kıl örneklerinden 50 mg kıl örneği hassas terazi ile tartılıp ayrı bir kaba alınmış ve lam üzerinde bistüri yardımıyla çok kısa (1mm'den daha kısa) parçalara ayrılmıştır. Küçük parçalara ayrılan kıl örnekleri 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarılarak, üzerine 1 ml methanol eklenmiştir. Eppendorf tüpler oda sıcaklığında 30 rpm hızda 24 saat boyunca çalkalanmıştır. Çalkalama işlemi tamamlandıktan sonra örnekler 30 saniye süreyle mikrosantrifüj cihazı ile santrifüj edilmiştir. Bu işlem tamamlandıktan sonra örneğin üst

kısmından yaklaşık 0.6 ml'lik süpernatant başka bir tüpe aktarılıp 38℃'de kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kuruyan tüpe 0.4 ml PBS (pH: 7.5) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Bu aşamadan sonra örnekler analize hazır hale gelmiştir.

### 3.2.4 Hormon analizleri

Kortizol hormonu analizleri A.Ü.Z.F Üreme Biyolojisi ve Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Serum ve kıl kortizol konsantrasyonları enzim immunoassay (EIA) yöntemiyle çizelge 3.2'de gösterilen kitler ile önerilen test prosedürüne uygun olarak çalışılmıştır.

Çizelge 3.2 Denemede kullanılan kortizol hormonu kitlerine ait özellikler

| Çalışılan Matris | Hormon Kitleri | Marka ve Menşei | Katalog No | Çalışma Aralığı |
|---|---|---|---|---|
| Serum | Goat Cortisol ELISA Kit | Sunlong Biotech Co., Ltd, China | SL0103Gt | 30-200 ng/ml |
| Kıl | Cortisol ELISA Kit | Cayman Chemical, U.S.A. | 500360 | 6,6-4.000 pg/ml |

### 3.2.5 İstatistik analizler

Araştırmada elde edilen ölçümler tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile analiz edilmiştir. Araştırmada serum kortizol konsantrasyonları için dönem faktörünün 7 (Ekim, Kasım, Aralık, Ocak, Şubat, Mart ve Doğum sonrası), kıl kortizol konsantrasyonları için ise dönem faktörünün 4 (Ekim, Kasım, Aralık ve Doğum sonrası) ve grup faktörünün de doğum yapmamış (primapar) ve en az bir doğum yapmış (multipar) olmak üzere 2 seviyesi bulunmaktadır. Tekrarlanan ölçümler dönem faktörünün seviyelerinde gerçekleştirilmiştir. Farklı grupların belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma yöntemi kullanılmıştır. İstatistik analizlerde IBM SPSS Statistics v.23 paket programı kullanılmıştır. Araştırmada ölçülen kortizol değerleri varyans analizi tekniğinin ön şartlarını sağlamadığı için logaritmaları alınarak transforme edilmiş ve analizler bu transforme edilmiş verilere uygulanmıştır (Gürbüz vd. 2003).

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu araştırmada Akkeçilerde gebelik döneminde serum ve kıl matrislerinden elde edilen kortizol konsantrasyonlarına ilişkin tanımlayıcı değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda serum matrisinde kortizol bakımından hem dönemin hem de grupların seviye ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemli bulunmuşken ($p<0.05$), kıl matrisindeki kortizol düzeyleri bakımından sadece dönemlerin seviye ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Akkeçilerde serum matrisinde kortizol hormonunun en düşük konsantrasyonu primapar grupta Mart ayında gözlenirken, multipar grupta doğum sonrası dönemde gözlenmiştir. En yüksek serum kortizol konsantrasyon değerlerine ise pirimapar grupta Kasım ayında, multipar grupta ise Mart ayında ulaşılmıştır.

Çizelge 4.1 Akkeçilerde gebelik döneminde serum ve kıl kortizol konsantrasyonlarına ait tanımlayıcı değerler

| **Aylar** | **Serum (ng/ml)** ($\overline{X} \pm S_{\overline{x}}$) | | | **Kıl (pg/ml)** ($\overline{X} \pm S_{\overline{x}}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Primapar (n=5)** | **Multipar (n=4)** | **Genel (n=9)**** | **Primapar (n=5)** | **Multipar (n=4)** | **Genel (n=9)*** |
| **Ekim** (1. Örnek) | 26,42±4,9 | 235,7±136,0 | 119,4±66,8 **a** | 5114±1020 | 1329±206 | 3432±859 **ab** |
| **Kasım** (2. Örnek) | 30,42±7,2 | 230,6±149,0 | 119,4±70,3 **a** | 2663±828 | 1158±349 | 1994±530 **bc** |
| **Aralık** (3. Örnek) | 21,59±2,7 | 151,5±77,4 | 79,3±39,0 **ab** | 1384±467 | 1316±330 | 1354±281 **c** |
| **Ocak** (4. Örnek) | 18,93±2,4 | 203,2±120,0 | 100,8±58,6 **ab** | - | - | - |
| **Şubat** (5. Örnek) | 16,64±1,7 | 161,7±88,7 | 81,1±44,3 **ab** | - | - | - |
| **Mart** (6. Örnek) | 15,00±2,2 | 238,5±127,0 | 114,3±64,9 **ab** | - | - | - |
| **Doğum sonrası** (7. Örnek) | 18,39±2,4 | 115,0±71,9 | 61,3±33,9 **b** | 6158±1638 | 5735±1611 | 5970±1088 **a** |
| **Genel** | 21,1±1,6 **B** | 190,9±38,8 **A** | | | | |

a,b,c Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (* $p<0.01$, ** $p<0.05$).

A,B Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 4.1'den görülebileceği gibi dişi Akkeçilerde multipar grupta gebelik döneminde serum kortizol konsantrasyonları bütün aylarda önemli düzeyde ($p<0.05$) yüksek seyretmiştir. Primapar grupta serum kortizol konsantrasyonlarında Ekim ayından itibaren gebeliğin sonuna kadar genel bir azalış gerçekleşmişken, doğum sonrasında hafif düzeyde bir artış saptanmıştır. Multipar grupta ise primapar gruptan farklı olarak aynı dönemde dalgalı bir seyir görülmüştür. Gebelik döneminde paritenin/yaşın keçilerde serum kortizol konsatrasyonları üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya ulaşılamamasına karşın, koyunlarda (Gregula-Kania vd. 2021) ve sığırlarda (O'Driscoll vd. 2012) yapılan çalışmalarda kan kortizol konsantrasyonları üzerine yaşın etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada multipar grupta serum kortizol konsantrasyonlarının primapar gruptan önemli düzeyde yüksek çıkmasının nedeni grup içerisinde yer alan iki keçiden (99 ve 157 nolu keçiler) kaynaklandığı söylenebilir. Nitekim bu keçilere ait veriler grup ortalamasının çok üzerinde olması ve analize dahil edildiğinde grup ortalamasını önemli düzeyde yükseltmesi nedeniyle analiz dışı bırakıldığında, gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmamakta olup (Çizelge 4.2), bu bulgu yukarıda bildirilen koyunlarda ve sığırlarda gerçekleştirilen çalışmalar ile uyum göstermektedir.

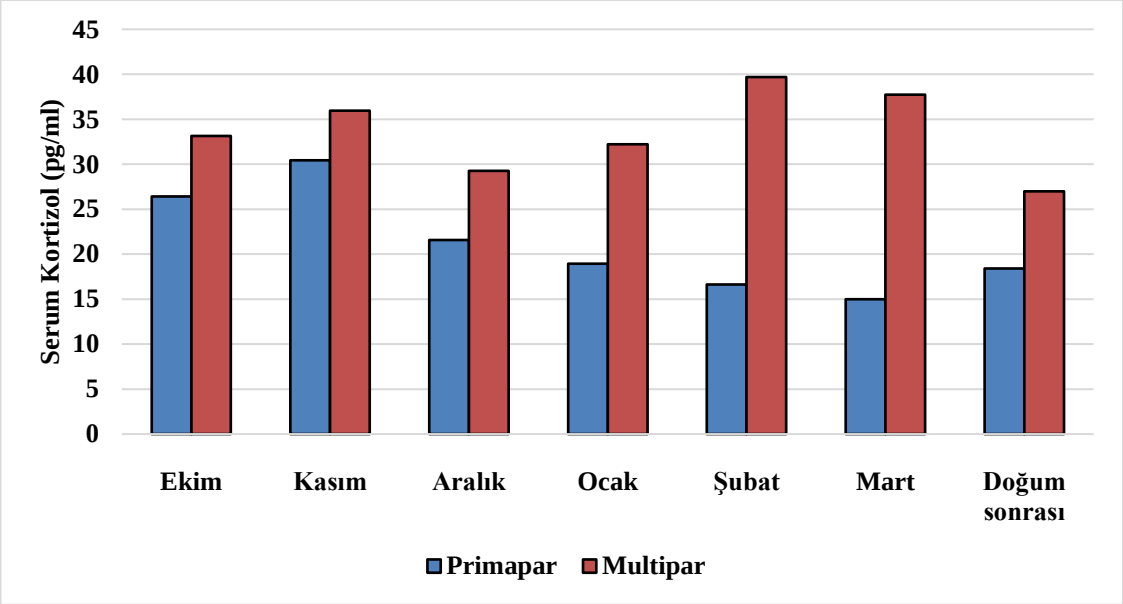
Dolayısıyla bu araştırmada serum kortizol konsantrasyonlarında homojenliği bozan keçiler analiz dışı bırakılmıştır. Çizelge 4.2'den görülebileceği gibi homojenliği bozan keçiler deneme dışı bırakıldığında serum matrisinde kortizol bakımından ne dönemin ne de grupların seviye ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.2 Akkeçilerde gebelik döneminde serum ve kıl kortizol konsantrasyonlarına ait tanımlayıcı değerler (homojenliği bozan keçiler deneme dışı bırakıldığında)

| **Aylar** | **Serum (ng/ml)** ($\overline{X} \pm S_{\overline{X}}$) | | |
|---|---|---|---|
| | **Primapar (n=5)** | **Multipar (n=2)** | **Genel (n=7)** |
| **Ekim** (1. Örnek) | 26,4±4,9 | 33,1±13,0 | 28,34±4,57 |
| **Kasım** (2. Örnek) | 30,4±7,2 | 36,90±24,3 | 32,00±7,34 |
| **Aralık** (3. Örnek) | 21,6±2,7 | 29,3±16,1 | 23,79±4,23 |
| **Ocak** (4. Örnek) | 18,9±2,4 | 32,2±11,0 | 22,73±3,79 |
| **Şubat** (5. Örnek) | 16,6±1,7 | 39,7±19,7 | 23,22±6,15 |
| **Mart** (6. Örnek) | 15,0±2,2 | 35,7±20,9 | 20,93±6,13 |
| **Doğum sonrası** (7. Örnek) | 18,9±2,4 | 27,0±7,2 | 20,85±2,80 |
| **Genel** | 21,06±1,58 | 33,29±4,84 | |

Şekil 4.1'den görülebileceği gibi Akkeçilerde serum matrisinde istatistik olarak önemli olmamakla birlikte kortizol hormonunun en düşük konsantrasyonu primapar grupta Mart ayında gözlenirken, multipar grupta doğum sonrası dönemde gözlenmiştir. En yüksek serum kortizol konsantrasyon değerlerine ise pirimapar grupta Kasım ayında, multipar grupta ise Şubat ayında ulaşılmıştır. Aynı şekilden görülebileceği gibi primapar grupta serum kortizol konsantrasyonlarında Ekim ayından gebeliğin sonuna kadar genel olarak bir azalış gerçekleşmişken doğum sonrasında hafif düzeyde bir artış saptanmıştır. Multipar grupta ise primapar gruptan farklı olarak aynı dönemde dalgalı bir seyir görülmüştür. Keçilerde gerçekleştirilen bir araştırmada (Manalu vd. 1997), kortizol hormonu düzeylerinde gebeliğin ilk aylarında meydana gelen artışın, artan metabolik yükten kaynaklandığı ve gebeliğin son döneminde gerçekleşen azalışın ise maternal dolaşımdan plasentaya olan besin maddeleri geçişini kontrol eden hormonların düzeylerindeki artışlarla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Pehlivan ve Dellal 2017). Bu çalışmada da özellikle primapar grupta görülen değişim benzer şekilde gerçekleşmiştir. Bununla birlikte kronik stresi tespit etmek amacıyla serum matrisinin kullanılması, serum kortizolünün sirkadiyen ritimden etkilenmesi ve nispeten kısa bir zaman dilimindeki değişiklikleri yansıtması (Everding 2021) nedeniye uygun

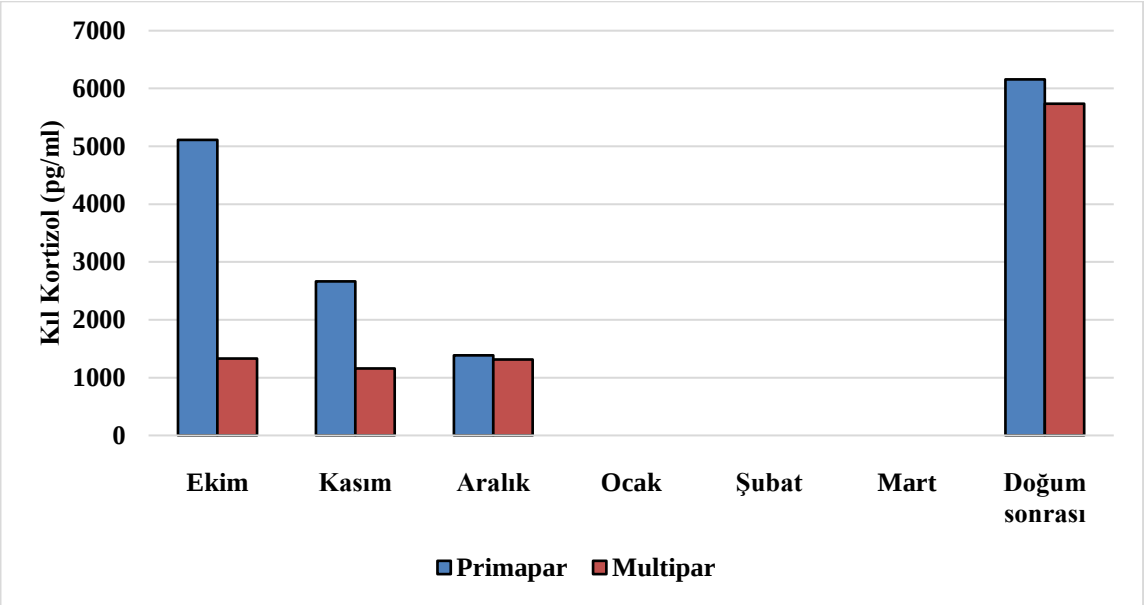
görülmemektedir. Ayrıca hayvanlardaki stres durumlarının değerlendirilmesinin yalnızca tek bir stres hormonunun ölçümüne dayanmaması gerektiği ve ek olarak farklı stres değişkenlerinin farklı durumlar/türler için kullanılmasının daha uygun olacağı bildirilmiştir (Hydbring-Sandberg vd. 2022).




Şekil 4.1 Akkeçilerde gebelik döneminde serum kortizol konsantrasyonlarına ait değişim grafiği

Şekil 4.2'de Akkeçilerde kıl matrisinde gebelik dönemi kortizol konsantrasyonlarının değişim grafiği verilmiştir. Şekil 4.2'den görülebileceği gibi Akkeçilerde gebelik dönemi içerisinde yer alan Ocak, Şubat ve Mart aylarında kortizol analizi için yeterli kıl büyümesi/uzaması gerçekleşmediği için örnek toplanamamış ve dolayısıyla ilgili aylara ait kortizol konsantrasyonları belirlenememiştir. Bununla birlikte diğer aylarda saptanan kortizol konsantrasyonları değerlendirildiğinde istatistik olarak önemli bir farklılık görülmemekle birlikte primapar gruptaki keçilerin kıl kortizol konsantrasyonları bütün aylarda multipar gruptan daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada kıl kortizol konsantrasyonları üzerine yaşın etkisine ilişkin elde edilen bulgular literatür bildirişleri ile uyumlu bulunmuştur. Nitekim Dulude-de Broin vd. (2019) tarafından Kayalık Dağ Keçilerinde (*Oreamnos americanus*) yürütülen araştırmada genç keçilerin erginlere göre daha yüksek kıl kortizol düzeylerine sahip olduğu, del Rosario vd. (2011) tarafından süt sığırlarında gerçekleştirilen bir çalışmada iki haftalık buzağıların kıl kortizol

konsantrasyonlarının 2 yaşındaki ineklerden daha yüksek olduğu, Comin vd. (2012) ve Montillo vd. (2014) tarafından atlarda yürütülen bir araştırmada ise yeni doğan taylarda 30-60 günlük taylara kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Heimbürge vd. 2019).




Şekil 4.2 Akkeçilerde gebelik döneminde kıl kortizol konsantrasyonlarına ait değişim grafiği

Yine şekil 4.2'den görülebileceği gibi Akkeçilerde gebelik dönemi içerisinde kıl kortizol konsantrasyonlarının saptandığı aylar olan Ekim, Kasım ve Aralık ayları incelendiğinde, her iki grupta da gebeliğin başından ortasına doğru kıl kortizol konsantrasyonlarının genel olarak azaldığı, gebeliğin ikinci yarısında ise kıl örneği olmadığından analiz yapılamadığı için herhangi bir veri edilememiş olmakla birlikte doğum sonrasında önemli düzeyde bir artış gerçekleştiği görülmüştür. Doğum sonrası dönemde ortaya çıkan artışın gebeliğin ilerlemesine bağlı olarak dolaşımda artan kortizol nedeniyle olduğu ileri sürülebilir. Nitekim insanda (Obel vd. 2005), koyunlarda (Sawyer vd. 2019, Manuel vd. 2024), domuzlarda (Bacci vd. 2014, Everding 2021), sığırlarda (Braun vd. 2017) ve atlarda (Medill vd. 2023a) gerçekleştirilen çalışmalarda da bu çalışmada elde edilen bulgulara benzer olarak, gebeliğin ilerlemesiyle kıl kortizol konsantrasyonlarının artış gösterdiği ve doğum sonrası dönemde yüksek seviyede saptandığı bildirilmiştir.

## 5. SONUÇ

Araştırma sonucunda, Akkeçilerde gebelik döneminde her iki matristen ölçülen kortizol konsantrasyonları üzerine yaşın etkisi istatistik olarak önemli olmamakla birlikte serum matrisinde multipar grup daha yüksek konsantrasyonlara sahip bulunmuşken, kıl matrisinde primapar grup daha yüksek konsantrasyonlara sahip bulunmuştur. Akkeçilerde gebelik süresince kortizol konsantrasyonları üzerine dönemin etkisi ise sadece kıl matrisinde önemli ($p<0.01$) bulunmuştur.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, bazı aylarda örnek toplanamamasıyla birlikte serum kortizol konsantrasyonlarına kıyasla kıl kortizol konsantrasyonlarının daha tutarlı sonuç verdiği ve uzun vadeli stresin belirlenmesinde daha uygun bir biyobelirteç olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte bu çalışmada gebelik döneminin ikinci yarısında kıl matrisinin analiz için yeterli büyüme/uzama gerçekleştirmemesi de önemli bir kısıt olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, benzer çalışmaların kıl matrisinin büyüme/uzama paterni dikkate alınarak daha fazla hayvan/örnek üzerinde gerçekleştirilmesi ve farklı matrisler arasındaki ilişkilerin araştırılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR


Accorsi, P. A., Carloni, E., Valsecchi, P., Viggiani, R., Gamberoni, M., Tamanini, C. and Seren, E. 2008. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. General and Comparative Endocrinology 155(2); 398-402.

Acker, M., Mastromonaco, G. and Schulte-Hostedde, A. I. 2018. The effects of body region, season and external arsenic application on hair cortisol concentration. Conservation Physiology, 6(1);1-9. doi:10.1093/conphys/coy037

Agradi, S., Munga, A., Barbato, O., Palme, R., Tarhan, D., Bilgiç, B., Dokuzeylül, B., Ercan, A.M., Or, M. E., Brecchia, G., Curone, G., Draghi, S., Vigo, D., Marongiu, M. L., Gonz´alez-Cabrera, M. and Menchetti, L. 2023. Goat hair as a bioindicator of environmental contaminants and adrenal activation during vertical transhumance. Frontiers in Veterinary Science,. 10; 1274081. doi: 10.3389/fvets.2023.1274081

Alila-Johansson, A., Eriksson, L., Soveri, T. and Laakso, M.-L. 2003. Serum Cortisol Levels in Goats Exhibit Seasonal But Not Daily Rhythmicity. Chronobiology International, 20(1); 65–79. doi:10.1081/cbi-120017684

Ashley, N. T., Barboza, P. S., Macbeth, B. J., Janz, D. M., Cattet, M. R. L., Booth, R. K. and Wasser, S. K. 2011. Glucocorticosteroid concentrations in feces and hair of captiva caribou and reindeer following adrenocorticotropic hormone challenge. General and Comparative Endocrinology 172(3); 382-391.

Bacci, M. L., Nannoni, E., Govoni, N., Scorrano, F., Zannoni, A., Forni, M., Martelli, G. and Sardi, L. 2014. Hair cortisol determination in sows in two consecutive reproductive cycles. Reproductive Biology, 14(3); 218–223. doi:10.1016/j.repbio.2014.06.001

Baier, F., Grandin, T., Engle, T. and Edwards-Callaway, L. 2019. Evaluation of Hair Characteristics and Animal Age on the Impact of Hair Cortisol Concentration in Feedlot Steers. Frontiers in Veterinary Science, 6(323). doi:10.3389/fvets.2019.00323.

Baskin, K. K., Winders, B. R. and Olson, E. N. 2015. Muscle as a "mediator" of systemic metabolism. Cell Metabolism, 21(2); 237-248. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.021.

Bechshøft, T. Ø., Sonne, C., Dietz, R., Born, E. W., Novak, M. A., Henchey, E. and Meyer, J. S. 2011. Cortisol levels in hair of East Greenland polar bears. Science of The Total Environment, 409(4); 831–834. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.10.047.

Berckmans, D. 2017. General introduction to precision livestock farming. Animal Frontiers. 7(1); 6-11.

Bergman, T. J., Beehner, J. C., Cheney, D. L., Seyfarth, R. M. and Whitten, P. L. 2005. Correlates of stress in free-ranging male chacma baboons, Papio

hamadryas ursinus. Animal Behaviour, 70(3); 703–713. doi:10.1016/j.anbehav.2004.12.017.

Blokhuis, H. J., Hopster, H., Geverink, N.A., Korte, S. M. and Reenen, C. G. 1998. Studies of stress in farm animals. Comparative Haematology International, 8; 94-101.

Bozovic, D., Racic, M. and Ivkovic, N. 2013. Salivary cortisol levels as a biological marker of stress reaction. Medical Archives, 67(5); 374-377.

Braun, U., Michel, N., Baumgartner, M. R., Hässig, M. and Binz, T. M. 2017. Cortisol concentration of regrown hair and hair from a previously unshorn area in dairy cows. Research in Veterinary Science, 114; 412–415. doi:10.1016/j.rvsc.2017.07.005

Burnard, C., Ralph, C., Hynd, P., Hocking Edwards, J. and Tilbrook, A. 2017. Hair cortisol and its potential value as a physiological measure of stress response in human and non-human animals. Animal Production Science, 57(3); 401-414. http://dx.doi.org/10.1071/AN15622

Burnett, T. A., Madureira, A. M. L., Silper, B. F., Nadalin, A., Tahmasbi, A., Veira, D. M. and Cerri, R. L. A. 2014. Short communication: Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 97(12); 7685–7690. doi:10.3168/jds.2014-8444

Burnett, T.A., Madureira, A.M.L., Silper, B.F., Tahmasbi, A. and Nadalin, A. 2015. Relationship of concentrations of cortisol in hair with health, biomarkers in blood, and reproductive status in dairy cows. J. Dairy Sci. 98(7); 4414–4426.

Carlitz, E. H. D., Kirschbaum, C., Miller, R., Rukundo, J. and van Schaik, C. P. 2015. Effects of body region and time on hair cortisol concentrations in chimpanzees (Pan troglodytes). General and Comparative Endocrinology, 223; 9–15. doi:10.1016/j.ygcen.2015.09.022

Casal, N., Manteca, X., Escribano, D., Cerón, J. J. and Fàbrega, E. 2016. Effect of environmental enrichment and herbal compound supplementation on physiological stress indicators (chromogranin A, cortisol and tumour necrosis factor-α) in growing pigs. Animal, 11(07); 1228–1236. doi:10.1017/s1751731116002561

Casal, N., Manteca, X., Peña L, R., Bassols, A. and Fàbrega, E. 2017. Analysis of cortisol in hair samples as an indicator of stress in pigs. Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research, 19; 1–6. doi:10.1016/j.jveb.2017.01.002

Cattet, M., Macbeth, B. J., Janz, D. M., Zedrosser, A., Swenson, J. E., Dumond, M. and Stenhouse, G. B. 2014. Quantifying long-term stress in brown bears with the hair cortisol concentration: a biomarker that may be confounded by rapid changes in response to capture and handling. Conservation Physiology, 2(1); cou026. doi:10.1093/conphys/cou026

Challis, J. R. G., Sloboda, D., Matthews, S. G., Holloway, A., Alfaidy, N., Patel, F. A., Whittle, W., Fraser, M., Moss, T. J. M. and Newnham, J. 2001. The fetal

placental hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. Molecular and Cellular Endocrinology, 185(1-2); 135–144. doi:10.1016/s0303-7207(01)00624-4

Comin, A., Veronesi, M. C., Montillo, M., Faustini, M., Valentini, S., Cairoli, F. and Prandi, A. 2012. Hair cortisol level as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary- adrenal axis activity in horse foals. The Veterinary Journal (194); 131-132.

Contoreggi, C. 2015. Corticotropin releasing hormone and imaging, rethinking the stress axis. Nuclear Medicine and Biology, 42(4); 323-339.

Contreras-Jodar, A., Escribano, D., Cerón, J.J., López-Arjona, M., Aymerich, P., Soldevila, C., Fàbrega, E. and Dalmau, A. 2023. Reducing Stocking Densities and Using Cooling Systems for More Adapted Pigs to High Temperatures When Reared in Intensive Conditions. Animals 2023, 13(15); 2424. https:// doi.org/10.3390/ani13152424.

Cotticelli, A., Bifulco, G., Pividori, I., Matera, R., Verde, M. T., Santinello, M., Prandi, A. and Peric, T. 2024. Assessing cortisol concentration in different matrices: predictive potential and relationship with production levels, lactation stage and parity in dairy buffaloes. Italian Journal of Animal Science, 23(1); 802-812. DOI: 10.1080/1828051X.2024.2354502

Dantzer, R. and Mormede, P. 1983. Stres in farm animals: A need for reevaluation. J. Anim. Sci., 57(1); 6-18.

Davenport, M. D., Tiefenbacher, S., Lutz, C. K., Novak, M.A. and Meyer, J. S. 2006. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. General and Comparative Endocrinology 147(3); 255-261.

del Rosario, G. D. L. V., Valdez, R. A., Lemus-Ramirez, V., Vázquez-Chagoyán, J. C., Villa-Godoy, A. and Romano, M. C. 2011. Effects of adrenocorticotropic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. Canadian Journal of Veterinary Research, 75(3); 216-221.

Dettmer, A. M., Novak, M. A., Meyer, J. S. and Suomi, S. J. 2014. Population desity-dependent hair cortisol concentrations in rhesus monkeys (Macaca mulatta). Psychoneuroendocrinology 42; 59-67.

Dulude-de Broin, F., Côté, S.D., Whiteside, D.P. and Mastromonaco, G.F. 2019. Faecal metabolites and hair cortisol as biological markers of HPA-axis activity in the Rocky mountain goat. General and Comparative Endocrinology 280; 147–157.

Duran, M. C., Janz, D. M., Waldner, C. L., Campbell, J. R. and Marques, F. J. 2017. Hair Cortisol Concentration as a Stress Biomarker in Horses: Associations With Body Location and Surgical Castration. Journal of Equine Veterinary Science, 55; 27–33. doi:10.1016/j.jevs.2017.03.220

Edwards, P. D. and Boonstra, R. 2018. Glucocorticoids and CBG during pregnancy in mammals: diversity, pattern, and function. General and Comparative Endocrinology, 259; 122–130. doi:10.1016/j.ygcen.2017.11.012.

Einarsson, S., Brandt, Y., Lundeheim, N. and Madej, A. 2008. Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. Acta Veterinaria Scandinavica, 50 (48); 1-8.

Erickson, R. L., Browne, C. A. and Lucki I. 2017. Hair corticosterone measurement in mouse models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. Physiology & Behavior 178; 166-171.

Everding, T. 2021. Cortisol in Hair as a Measure of Chronic Stress during Sow Gestation and the Pattern of Cortisol in Blood during Parturition in Sows. Master of Science. Major in Animal Science, South Dakota State University, Brookings. Electronic Theses and Dissertations. 5775.

Fischer-Tenhagen, C., Ladwig-Wiegard, M., Heuwieser, W. and Thöne-Reineke, C. 2018. Is hair cortisol a potential indicator for stress caused by chronic lameness in dairy cows?. Journal of Dairy Science, 101(6); 5439–5443.

Fourie, N. H. and Bernstein, R. M. 2011. Hair cortisol levels track phylogenetic and age related differences in hypothalamic- pituitary- adrenal (HPA) axis activity in non- human primates. General and Comparative Endocrinology, 174(2); 150-155.

Fourie, N. H., Jolly, C. J., Phillips-Conroy, J. E., Brown, J. L. and Bernstein, R. M. 2015. Variation of hair cortisol concentrations among wild populations of two baboon species (Papio anubis, P. hamadryas) and a population of their natural hybrids. Primates, 56(3); 259–272. doi:10.1007/s10329-015-0469-z.

Fourie, N. H., Brown, J. L., Jolly, C. J., Phillips-Conroy, J. E., Rogers, J. and Bernstein, R. M. 2016. Sources of variation in hair cortisol in wild and captive non-human primates. Zoology, 119(2); 119–125. doi:10.1016/j.zool.2016.01.001.

Gatti, R., Antonelli, G., Prearo, M., Spinella, P., Cappellin, E. and De Polo, E. F. 2009. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. Clinical Biochemistry, 42(12); 1205-1217.

Ghassemi Nejad, J., Lohakare, J., Son, J., Kwon, E., West, J. and Sung, K. 2014. Wool cortisol is a better indicator of stress than blood cortisol in ewes exposed to heat stress and water restriction. Animal, 8(1); 128-132.

Ghassemi Nejad, J., Kim, B.-W., Lee, B.-H. and Sung, K.-I. 2016. Coat and hair color: hair cortisol and serotonin levels in lactating Holstein cows under heat stress conditions. Animal Science Journal, 88(1); 190–194. doi:10.1111/asj.12662

Ghassemi Nejad, J., Lee, B.H., Kim, J.Y., Kim, B.W., Chemere, B., Park, K.H. and Sung, K.I. 2019. Comparing hair cortisol concentrations from various body sites and serum cortisol in Holstein lactating cows and heifers during thermal comfort zone. Journal of Veterinary Behavior, 30; 92-95.

Ghassemi Nejad, J., Park, K.H., Forghani, F., Lee, H.G., Lee, J.S. and Sung, K.I. 2020. Measuring hair and blood cortisol in sheep and dairy cattle using RIA and ELISA assay: a comparison. Biological Rhythm Research, 51(6); 887-897.

Ghassemi Nejad, J., Ghaffari, M.H., Ataallahi, M., Jo, J. H. and Lee, H.-G. 2022. Stress concepts and applications in various matrices with a focus on hair cortisol and analytical methods. Animals, 12(22); 3096.

Gratacós-Cubarsí, M., Castellari, M., Valero, A. and García-Regueiro, J. A. 2006. Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production. Journal of Chromatography B, 834(1-2); 14–25. doi:10.1016/j.jchromb.2006.03.007.

Greguła-Kania, M., Kosior-Korzecka, U., Hahaj-Siembida, A., Kania, K., Szysiak, N. and Junkuszew, A. 2021. Age-Related Changes in Acute Phase Reaction, Cortisol, and Haematological Parameters in Ewes in the Periparturient Period. Animals, 11(12); 3459.

Greff, M. J. E., Levine, J. M., Abuzgaia, A. M., Elzagallaai, A. A., Rieder, M. J. and van Uum, S. H. M. 2018. Hair cortisol analysis: An update on methodological considerations and clinical applications. Clinical Biochemistry, 63; 1-9. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.09.010.

Guzik, A. C., Matthews, J. O., Kerr, B. J., Bidner, T. D. and Southern, L. L. 2006. Dietary tryptophan effects on plasma and salivary cortisol and meat quality in pigs. Journal of Animal Science, 84(8); 2251-2259.

Gürbüz, F., Başpınar, E., Çamdeviren, H. ve Keskin, S. 2003. Tekrarlanan ölçümlü deneme düzenlerinin analizi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Matbaası, Van.

Hay, M., Meunier-Salaün, M. C., Brulaud, F., Monnier, M. and Mormède, P. 2000. Assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system activity in pregnant sows through the measurement of glucocorticoids and catecholamines in urine. Journal of Animal Science, 78(2); 420-428.

Hayashi, H., Arai, C., Ikeuchi, Y., Yamanaka, M. and Hirayama, T. 2021. Effect of growth and parturition on hair cortisol in Holstein cattle. Animal Science Journal, 92(1); e13518.

Heimbürge, S., Kanitz, E. and Otten, W. 2019. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. General and Comparative Endocrinology 270; 10–17.

Hydbring-Sandberg, E., von Walter, L. W. and Forkman, B. 2022. Cortisol is not enough: A complex stress reaction in tethered goats. Animal Welfare, 31(1); 91-98.

Idris, Y.O. 2011. Effects of age, gender, coat colour and diurnal variations on plasma cortisol concentration in west african dwarf goats. Project Report, The Department of Animal Pyhsiology of the College of Animal Science and Livestock Production, University of Agriculture, 37, Abeokuta.

Koren, L., Mokady, O., Karaskov, T., Klein, J., Koren, G. and Geffen, E. 2002. A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. Animal Behaviour, 63(2); 403-406.

Lafferty, D. J. R., Laudenslager, M. L., Mowat, G., Heard, D. and Belant, J. L. 2015. Sex, Diet, and the Social Environment: Factors Influencing Hair Cortisol

Concentration in Free-Ranging Black Bears (Ursus americanus). PLOS ONE, 10(11); e0141489. doi:10.1371/journal.pone.0141489.

Laudenslager, M. L., Jorgensen, M. J. and Fairbanks, L. A. 2012. Development patterns of hair cortisol in male and female nonhuman primates: Lower hair cortisol levels in vervet males emerge at puberty. Psychoneuroendocrinology, 37(10); 1736-1739.

Manalu, W., Sumaryadi, M.Y. and Kusumorini, N. 1997. Maternal serum concentrations of total triiodothyronine, tetraidothyronine and cortisol in different status of pregnancy during late pregnancy in Ettewah-Cross does. AJAS, 10(4); 385-390.

Manuel, E. E., Bradbery, A. N., McCoski, S. R., Marques, R. S., Rpeder, B. L. and Posbergh, C. J. 2024. Variation in Wool Cortisol, Progesterone, and Testosterone in Targhee Ewes Across Physiological States and Varying Production Levels 1, 2. Sheep and Goat Research Journal, 39; 7-11.

Martin, J. G. A. and Réale, D. 2008. Animal temperament and human disturbance: Implications for the response of wildlife to tourism. Behavioural Processes, 77(1); 66–72. doi:10.1016/j.beproc.2007.06.004

Martínez-Miró, S., Tecles, F., Ramón, M., Escribano, D., Hernández, F., Madrid, J., Orengo, J., Martínez-Subiela, S., Manteca, X., and Cerón, J. J. 2016. Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. BMC veterinary research, 12(171); 1-9.

Medill, S.A., Janz, D.M. and McLoughlin, P.D. 2023a. Hair Cortisol Concentrations in Feral Horses and the Influence of Physiological and Social Factors. Animals, 13(13); 2133. https://doi.org/10.3390/

Medill, S.A., Janz, D.M. and McLoughlin, P.D. 2023b. Hair Cortisol and Testosterone Concentrations in Relation to Maturity and Breeding Status of Male Feral Horses. Animals, 13(13); 2129. https://doi.org/ 10.3390/ani13132129.

Mendoza, S.P., Capitanio, J.P. and Mason, W.A., 2000. Chronic Social Stress: Studies in Non-human Primates. In: G.P. Moberg and J.A. Mench (eds.) The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare. CABI Publishing, New York, NY, USA, pp. 227-247.

Meza-Herrera, C.A., Bocanegra V.J.A., Banuelos, R., Arechiga, C.F., Rincon, R.M., Ochoa-Cordero, M.A., Juarez-Reyes, A.S., Cerrillo-Soto., M.A. and Salinas, H. 2007. Circannual fluctuations in serum cortisol and Glucose concentrations and hair growth in goats. Journal of Applied Animal Research, 31(1); 79-82.

Moberg, G.P. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. Ed. Moberg G.P., Mench, J.A. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. CABI Publishing, pp. 1-21, ISBN: 0 85199 359 1.

Montillo, M., Comin, A., Corazzin, M., Peric, T., Faustini, M., Veronesi, M. C. and Prandi, A. 2014. The Effect of Temperature, Rainfall, and Light Conditions on

Hair Cortisol Concentrations in Newborn Foals. Journal of Equine Veterinary Science, 34(6); 774–778. doi:10.1016/j.jevs.2014.01.011

Moya, D., Schwartzkopf-Genswein, K. S. and Veira, D. M. 2013. Standardization of a non-invasive methodology to measure cortisol in hair of beef cattle. Livestock Science, 158(1-3); 138-144. doi:10.1016/j.livsci.2013.10.007

Möstl, E., Choi, H. S. and Bamberg, E. 1985. Stimulation of androgen and oestrogen concentrations in plasma of cows after administration of a synthetic glucocorticoid (flumethasone) at the end of gestation. Journal of Endocrinology, (105); 121-126.

Möstl, E., Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. Domestic Animal Endocrinology, 23(1-2); 67-74.

Nedić, S., Pantelić, M., Vranješ-Đurić, S., Nedić, D., Jovanović, L., Čebulj-Kadunc, N., Kobal, S., Snoj, T., and Kirovski, D. 2017. Cortisol concentrations in hair, blood and milk of Holstein and Busha cattle. Slovenian Veterinary Research, 54(4); 163-172. doi: 10.26873/SVR-398-2017

Neumann, A., Noppe, G., Liu, F., Kayser, M., Verhulst, F. C., Jaddoe, V. W. V., van Rossum, E. F. C. and Tiemeier, H. 2017. Predicting hair cortisol levels with hair pigmentation genes: a possible hair pigmentation bias. Scientific Reports, 7(1); 8529. doi:10.1038/s41598-017-07034-w

Norton, T. 2017. Precision Livestock Farming. Use of technologies to optimize animal production. Livestock Forum: Feed the Future Livestock Performance. 27 April 2017, Barcelona.

Obel, C., Hedegaard, M., Henriksen, T. B., Secher, N. J., Olsen, J. and Levine, S. 2005. Stress and salivary cortisol during pregnancy. Psychoneuroendocrinology, 30(7); 647-656. doi:10.1016/j.psyneuen.2004.11.006.

Otten, W., Heimbürge, S., Tuchscherer, A. and Kanitz, E. 2022. The age of hair matters- the incorporation of cortisol by external contamination is enhanced in distal hair segments of pigs and cattle. Animal, 16(4); 100495.

Otten, W., Heimbürge, S., Tuchscherer, A., and Kanitz, E. 2023. Hair cortisol concentration in postpartum dairy cows and its association with parameters of milk production. Domestic Animal Endocrinology, 84-85; 106792.

O'Driscoll, K., Olmos, G., Moya, S. L., Mee, J. F., Earley, B., Gleeson, D., O'Brien, B. and Boyle, L. 2012. A reduction in milking frequency and feed allowance improves dairy cow immune status. Journal of dairy science, 95(3); 1177-1187.

Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S. M. and Möstl, E. 2005. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. Annals of the New York Academy of Sciences, 1040(1); 162-171. doi: 10.1196/annals.1327.021.

Pehlivan, E. 2015. Ankara Keçilerinde Tiroid Uyarıcı Hormon (TSH), Tiroksin (T4), Triiyodotironin (T3) ve Kortizol Hormonlarının Yıllık Değişimi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı.

Pehlivan, E. ve Dellal, G. 2014. Memeli Çiftlik Hayvanlarında Stres, Fizyoloji ve Üretim İlişkileri. Hayvansal Üretim, 55(1); 25-34.

Pehlivan, E. and Dellal, G. 2017. Annual Changes of Thyroid Stimulating Hormone, Thyroxine, Triiodothyronine and Cortisol Hormones in Angora Goats. The Journal of Animal & Plant Sciences, 27(3); 819-824.

Peric, T., Comin , A., Corazzin , M., Montillo , M., Cappa , A., Campanile, G. and Prandi, A. 2013. Hair cortisol concentrations in Holstein-Friesian and crossbreed $F_1$ heifers. Journal of Dairy Science, 96(5); 3023–3027.

Pragst, F. and Balikova, M. A. 2006. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. Clinica Chimica Acta, 370(1-2); 17–49. doi:10.1016/j.cca.2006.02.019.

Ralph, C.R., and Tilbrook, A.J. 2016. Invited review: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. Journal of Animal Science 94(2); 457–470. doi:10.2527/jas.2015-9645

Romero, L.M. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biochemical research. Trends in Ecology & Evolution, 19(5); 249-255.

Roth, L. S. V., Faresjö, Å., Theodorsson, E. and Jensen, P. 2016. Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. Scientific Reports, 6(1); 19631. doi:10.1038/srep19631

Russell, E., Koen, G., Rieder, M. and Van Uum, S. 2012. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. Psychoneuroendocrinology, 37(5); 589-601.

Sapolsky, R.M., Romero, L.M. and Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocrine Reviews, 21(1); 55-89.

Sawyer, G., Webster, D. and Narayan, E. 2019. Measuring wool cortisol and progesterone levels in breeding maiden Australian merino sheep (*Ovis aries*). PLOS ONE 14(4); e0214734.

Schell, C. J., Young, J. K., Lonsdorf, E. V., Mateo, J. M. and Santymire, R. M. 2017. Investigation of techniques to measure cortisol and testosterone concentrations in coyote hair. Zoo Biology, 36(3); 220–225. doi:10.1002/zoo.21359.

Scorrano, F., Carrasco, J., Pastor-Ciurana, J., Belda, X., Rami-Bastante, A., Bacci, M. L. and Armario, A. 2015. Validation of the long-term assessment of hypothalamic–pituitary–adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker. The FASEB Journal, 29(3); 859–867. doi:10.1096/fj.14-254474.

Senthilkumar, K., Selvaraju, M., Napolean, R. E., Mohan, B. and Palanisam, M. 2020. Effect of serum cortisol levels during winter and summer seasons on kidding rate in Tellicherry goats. The Pharma Innovation Journal, SP-9(9); 151-153.

Sharma, A., Umapathy, G., Kumar, V. and Phillips, C. J. C. 2019. Hair Cortisol in Sheltered Cows and Its Association with Other Welfare Indicators. Animals, 9(5); 248. doi:10.3390/ani9050248

Sotohira, Y., Suzuki, K., Sano, T., Arai, C., Asakawa, M. and Hayashi, H. 2017. Stress assessment using hair cortisol of kangaroos affected by the lumpy jaw disease. Journal of Veterinary Medical Science, 79(5); 852–854. doi:10.1292/jvms.16-0633

Squires, E. J. 2003. Applied animal endocrinology. Cabi Publushing, ISBN: 0-85199-594-2, USA. pp. 234.

Tallo-Parra, O., Manteca, X., Sabes-Alsina, M., Carbajal, A. and Lopez-Bejar, M. 2015. Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. Animal, 9(6); 1059–1064. doi:10.1017/s1751731115000294

Taşkın, T., Demirören, E. ve Ataç, F.E. 2008. Termal Stresin Saanen keçilerinde T3, T4 ve kortizolhormon düzeyleri üzerine etkisi . Hayvansal Üretim 49(2); 15-22.

Terwissen, C. V., Mastromonaco, G.F. and Murray, D. L. 2013. Influence of adrenocorticotrophin hormone challenge and external factors (age, sex, and body region) on hair cortisol concentration in Canada Lynx (Lynx canadensis). General and Comparative Endocrinology, 194; 162-167.

Trevisi, E. and Bertoni, G. 1998. Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. Italian Journal of Animal Science, 8(Sup1); 265-286.

von Borel, E.H. 2001. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. Journal of Animal Science, 79(suppl_E); E260-E267.

Yamanashi, Y., Morimura, N., Mori, Y., Hayashi, M. and Suzuki, J. 2013. Cortisol analysis of hair of captiva chimpanzees( Pan troglodytes). General and Comparative Endocrinology, 194; 55-63.

Young, B., Dewey, C. E. and Friendship, R. M. 2010. Management factors associated with farrowing rate in commercial sow herds in Ontario. The Canadian Veterinary Journal, 51(2); 185.

Wiechers, D.-H., Brunner, S., Herbrandt, S., Kemper, N., and Fels, M. 2021. Analysis of hair cortisol as an indicator of chronic stress in pigs in two different farrowing systems. Frontiers in Veterinary Science, 8; 605078. doi: 10.3389/fvets.2021.605078