



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

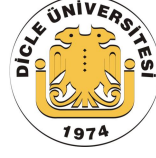
**KOYUNLARDA GEBELİK İLİŞKİLİ GLİKOPROTEİNLER
(PAGs) İLE GEBELİK TEŞHİSİ**

Veteriner Hekim UĞUR UÇAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. MEHMET OSMAN ATLI

DİYARBAKIR-2017



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOYUNLARDA GEBELİK İLİŞKİLİ GLİKOPROTEİNLER
(PAGs) İLE GEBELİK TEŞHİSİ**

Veteriner Hekim UĞUR UÇAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. MEHMET OSMAN ATLI

DİYARBAKIR-2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Uğur UÇAR'ın hazırladığı “**Koyunlarda Gebelik İlişkili Glikoproteinler (PAGs) İle Gebelik Teşhisi**” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak **kabul edilmiştir.**

Danışman Doç. Dr. Mehmet Osman ATLI

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı	Prof. Dr.	Servet BADEMKIRAN
Üye	Prof. Dr.	Nihat ÖZYURLU
Üye	Doç. Dr.	Mustafa Kemal SARIBAY
Üye	Doç. Dr.	Mehmet Osman ATLI
Üye	Yrd. Doç. Dr.	Mehmet KÖSE

Tarih:/.../201...

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

...../...../201.....

UĞUR UÇAR

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren sürekli bana destek olan, tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesi aşamasında her türlü desteğinden, bilimsel tecrübesinden ve yol gösterici yardımlarından dolayı çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Osman ATLI'ya,

Tez çalışmalarım sırasında laboratuvar çalışmalarında bana destek veren ve her türlü yardımı yapan Yrd. Doç. Dr. Mehmet KÖSE ve Doç. Dr. Salih KAYA'ya,

Yüksek lisans eğitimim süresince teorik ve pratik bilgilerinden yararlandığım Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Servet BADEMKIRAN'a, Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU'ya ve Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN'a,

Sabır ve desteklerinden dolayı sevgili babam Nizamettin UÇAR ve sevgili annem Necibe UÇAR'a,

Son Olarak her zaman yanımda olup destek veren sevgili eşim Gönül UÇAR'a ve bana enerji veren bebeğim Berfu Mira UÇAR'a,

TEŞEKKÜR ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖN SAYFALAR	Sayfa No
Dış Kapak	
İç Kapak	
Onay Sayfası	
Beyan	I
Teşekkür Sayfası	II
İçindekiler	III
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi	V
Şekiller Listesi	VII
Resimler Listesi	VIII
Tablolar Listesi	IX
ÖZET SAYFASI	
1. Türkçe Özet	1
2. İngilizce Özet	2
TEZ METNİ	
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Koyunlarda Erken Gebeliğin Fizyolojisi	5
2.1.1. Blastogenezis Dönemi	5
2.2. Gebeliğin Maternal Kabulü	6
2.2.1. İmplantasyon	7
2.2.2. Plasentasyon	8
2.3. Koyun Gebelik Tespitinde Kullanılan Güncel Tanı Yöntemleri	9
2.3.1. Ultrasonografi	10
2.3.2. Endokrinolojik Muayeneler	11
2.3.2.1. Süt Progesteron Analizi	11
2.3.2.2. Plazma Progesteron Analizi	11
2.3.3. Koryonik Somatotropin veya Plasental Laktojen	12
2.3.4. Gebelik İle İlişkili Proteinlerin Değerlendirilmesi	12

3. GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1. Çalışmadaki Kan Örneklerinin Kullanıldığı Gebe Koyunlarda Yapılmış İşlemler	15
3.2. Kitin Çalışma Prosedürü ve Laboratuvar Çalışması	16
3.2.1. Kitin İçeriği	17
3.3. Laboratuvar Çalışması	18
3.4. Sonuçların Hesaplanması	19
3.5. İstatistiksel Metot ve Analiz	20
4. BULGULAR	21
4.1. Çalışma 1	21
4.2. Çalışma 2	22
5. TARTIŞMA	23
6. SONUÇ	28
7. KAYNAKLAR	29
8. ÖZGEÇMİŞ	36

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

°C	:	Santigrat Derece
A-Mode	:	Amplitude Mode
ANOVA	:	Tek Yönlü Varyans Analizi
B-Mode	:	Brightness Mode
boPSPB	:	İnek Gebelik Spesifik Protein B
CL	:	Korpus Luteum
Cm	:	Santimetre
CRT	:	Katot Ray Tüp Ekranı
Ct	:	Cycle of threshold (Eşik Döngüsü)
EIA	:	Enzim İmmunoassay
ELISA	:	Enzym Linked İmmunosorbent Assay
gr	:	Gram
hCG	:	İnsan Koryonik Gonadotropini
HRP	:	Horseradish Peroxidase
IFN-τ	:	İnterferon Tau
ISGs	:	İnterferon-tau Tarafından Uyarılan Genler
kDA	:	Kilo Dalton
MHz	:	Megahertz
ml	:	Mililitre
μl	:	Mikrolitre
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
Na-EDTA	:	Sodyum-EDTA
ng/ml	:	Nanogram/Mililitre
Nm	:	Nanometre
OD	:	Optik Yoğunluk
ovPSPB	:	Koyun Gebelik Spesifik Protein B
PAGs	:	Gebelik ile İlişkili Glikoproteinler
PBLs	:	Periferel Kan Lökositleri
PGF₂α	:	Prostoglandin F2 Alfa

PL : Plasental Laktojen
PSPB : Gebelik Spesifik Protein B
RIA : Radio İmmunoassay



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 1. Ruminantlarda İmplantasyon	8
Şekil 2. Çift çekirdekli hücrelerin görünümü	12
Şekil 3. Standart Eğri	20
Şekil 4. Gebelik süresince görülen plazma PAGs değerleri	21
Şekil 5. Gebeliğin erken döneminde görülen plazma PAGs değerleri	22



Resim 1. Plaka ve mikro kuyucukların çalışma sonrası görünümü

19



Tablo 1. Materyaller

17



Koyunlarda Gebelik İlişkili Glikoproteinler (PAGs) İle Gebelik Teşhisi

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Uğur Uçar

Danışmanı: Doç. Dr. M. Osman ATLI

Anabilim Dalı: Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı (Veteriner), Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır, 2017

1. TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Gebelik ile ilişkili glikoproteinler (PAGs) koyunları da kapsayan ruminantlarda gebelikte trofoblastik hücrelerden köken alan iki çekirdekli hücreler tarafından üretilmektedir. Sunulan bu çalışmada koyunlarda erken gebelik ve tüm gebelik boyunca kan plazmasındaki PAGs konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışma için toplam 16 baş gebe koyun kullanıldı. Birinci çalışma (gebelik boyunca PAGs profilinin izlenmesi) için 8 baş koyundan gebeliğin 0, 55, 85, 113 ve 145. günlerinde kan plazması toplandı. İkinci çalışma (erken gebelikteki PAGs profilinin belirlenmesi) için ise gebeliğin 18, 21, 25, 28 ve 35. günlerinde kan plazma örnekleri toplandı. Elde edilen plazma örneklerinde PAGs değerleri ticari (Sheep Pregnancy Associated Glycoproteins) ELISA kiti ile ölçüldü.

Bulgular: Sonuçlar değerlendirildiğinde gebeliğin 0. gününde plazmada bazal seviyede PAGs olduğu tespit edilmiştir ($14,99 \pm 1,63$ ng/ml). Birinci çalışmada gebeliğin 0. günü ile kıyaslandığında; gebeliğin 55, 85, 113 ve 145. günlerindeki değerleri arasında istatistikî olarak önemli bir fark tespit edilmiştir ($p < 0,05$). İkinci çalışmada ise gebeliğin 35. gününde plazma PAGs değerinin 18. gün ile kıyaslandığında önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Sonuç: Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde koyunlarda gebelik boyunca plazma PAGs düzeyinin sürekli artan bir profil çizdiği görülmektedir. Yine bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan PAGs kiti ile en erken 35. günde gebelik teşhisi yapılabileceği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: gebelik ile ilişkili glikoproteinler (PAGs), gebelik, ELISA, koyun, gebelik teşhisi

Detection of Pregnancy in Ewes By Using Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs)

Student's Surname and Name: UCAR, Uğur

Adviser of Thesis: Associate Prof. Dr. M. Osman ATLI

Department: Department of Obstetrics and Gynecology, Institutes of Health Sciences (Veterinary), Master Thesis, Diyarbakır, 2017

2. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Aim: Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) are produced by embryonic binuclear trophoblast cells during pregnancy in ruminants, including ewes. The present study aimed to determine the PAGs concentration in blood plasma during early pregnancy and throughout pregnancy in ewes.

Material and Method: For this purpose; sixteen pregnant sheep were used. For the first study (PAGs profile monitoring during pregnancy), blood plasma samples were collected on days of 0, 55, 85, 113 and 145 during pregnancy in ewes (n=8). For the second study (determination of PAGs profile in early pregnancy), blood plasma samples were collected on days of 18, 21, 25, 28 and 35 during the early pregnancy in ewes (n=8). The plasma PAGs concentrations were measured by commercial ELISA kit.

Results: There was a basal PAGs concentration on the 0th day of pregnancy ($14,99 \pm 1,63$). In the first study, there was also a statistically significant difference on plasma PAGs concentration on days of 55, 85, 113, 145 in pregnancy, compared to the day ($p < 0, 05$). In the second study, it was determined that the plasma PAGs concentration significantly increased on the 35th day of pregnancy compared to the 18th day ($p < 0, 05$).

Conclusion: According to these results, the plasma PAGs concentrations are elevated during pregnancy in sheep. Moreover, it could be concluded that PAGs kit used for the present study could diagnose pregnancy as early as at 35 days after mating in ewes.

Key Words: Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs), pregnancy, ELISA, ewes, pregnancy diagnosis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hayvancılık işletmelerinde sürü devamlılığının sağlanabilmesi ve elde edilen ekonomik kazanç açısından döl verimi (yavru elde edilmesi) oldukça önemlidir. Koyun yetiştiriciliğinde döl veriminin optimal düzeyde tutulabilmesi için sürüdeki her koyunun her yıl doğum yapması gereklidir. Koyunların ineklerde olduğu gibi laktasyon ve yüksek süt verimi stresinde olmamaları reproduktif verimliliğin sürdürülmesinde önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Ancak ülkemizin de yer aldığı kuzey yarım kürede yetiştirilen koyun ırklarının büyük bir çoğunluğu mevsimsel poliöstrik hayvanlar olması nedeniyle koyunlar bir üreme sezonu içinde sınırlı sayıda östrüs siklusuna sahiptirler. Ayrıca yetiştiricilerin bilinçli olmamaları, koyunculğun ekstansif şartlarda yapılması nedeniyle bakım-besleme şartlarının yetersiz olması vb. faktörler de reproduktif verimliliğin sürdürülmesinde olumsuzluklar oluşturabilmektedir.

Günümüzde koyunculuk işletmelerinin çoğunda sütçü inek işletmelerinin aksine östrüs ve gebelik kontrolü yapılmadığından fertilité parametrelerini değerlendirmek zorlaşmaktadır. Ancak hem koyunlarda üremenin mevsimsel karakterli olması hem de döl veriminin optimal düzeyde tutulabilmesi için özellikle entansif yetiştiricilik yapılan işletmelerde, koçun değerli ve sayısının az olduğu sürülerde, bilimsel çalışmalarda ve suni tohumlama, embriyo transferi gibi biyoteknolojik uygulamalarda gebeliğin mümkün olan en kısa sürede tespit edilmesi oldukça önemlidir. Erken gebelik tanısı ile gebe olmayan koyunların belirlenerek tekrar tohumlanmaları mümkün olmaktadır. Ayrıca herhangi bir problem nedeniyle infertil olan koyunların üreme sezonu içerisinde tedavi edilmeleri ve tohumlanmaları için de bir fırsat oluşturulmaktadır. Bu uygulamalar kısırılık nedeniyle kesim ya da satış yoluyla sürüden uzaklaştırılacak koyun sayısının ve kısır koyunların beslenmesi yoluyla oluşacak ekonomik kayıpların da azaltılmasına imkân sağlamaktadır.

Ayrıca gebe ve gebe olmayan koyunların ayrılması; besleme stratejilerinin oluşturulması, koyun ve kuzuların aşılınması, kuzuların süttten kesilmesi, ürünlerin pazarlaması gibi işler yönünden sürü idaresini kolaylaştırmaktadır (1, 2).

Koyunlarda gebelik tanısı amacıyla pek çok yöntem (abdominal palpasyon, ultrasonografi, gebelik spesifik protein B, gebelik ilişkili glikoprotein, fetal

elektrokardiyogram, vaginal smear, vaginal biyopsi, servikal mukus kaynatma testi, radyografi, progesteron analizi vb.) geliştirilmiştir. Ancak günümüzde bu yöntemlerden sadece birkaçı erken gebelik tespiti amacıyla kullanılabilir. Geliştirilen yöntemlerin birçoğunun ekonomik, pratik ve saha şartlarında uygulanabilir olmaması, erken dönemde sonuç vermemesi, doğruluk oranının düşük olması, anne ve yavruya zararlı etkilerinin bulunması, deneyimli laboratuvar elemanı ve/veya donanımlı laboratuvara ihtiyaç duyulması gibi sebeplerden dolayı kullanılmamaktadır (3,4). Koyunculukta kullanılacak olan gebelik tanı yönteminin; kolay uygulanabilir, tekrar edilebilir, düşük maliyetli, non-invaziv, sonuçlarının güvenilir ve uygulayıcı sağlığı açısından en az düzeyde risk oluşturması gereklidir (2).

Özet olarak, hayvansal üretime önemli düzeyde katkısı olan koyun yetiştiriciliğinde erken gebelik tanısının önemi son yıllarda daha da artmıştır ve bu konuda yeni çalışmaların yapılması gereklidir. Sunulan bu tez çalışmasında koyunlarda gebeliğin erken döneminde (18, 21, 25, 28 ve 35. günler) ve gebelik boyunca (0, 55, 85, 113 ve 145. günler) gebelik spesifik protein ailesine ait olan gebelik ile ilişkili glikoproteinlerin (PAGs) seviyesi Enzym Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ticari kit kullanılarak araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koyunlarda Erken Gebeliğin Fizyolojisi

Fertilizasyon ile başlayıp doğuma kadar olan gebelik süresi, koyunlarda ortalama 150 gündür. Bu süreç konseptusun yapısı, fonksiyonları ve maternal ortama olan bağlantılarına göre üç ayrı dönemde incelenmekte ve şu şekilde tanımlanmaktadır (5);

1) Blastogenezis dönemi; erken embriyonal dönem olarak ta tanımlanan bu süreç fertilizasyondan gebeliğin maternal kabulüne kadar olan (implantasyon öncesi) dönemi (fertilizasyonun gerçekleşmesinden sonra ki 12. güne kadar olan dönemdir) kapsamaktadır.

2) Embriyonal dönem; gebeliğin maternal kabulünün ve embriyonun uterusu implantasyonunun tamamlandığı ve gebelik süresince yavrunun korunması ve beslenmesi için gerekli maternal kan akışını sağlayacak olan plasantasyonun başlangıcını içeren, gebeliğin oluşumu ve devamlılığı açısından çok önemli olayların gerçekleştiği 34. güne kadar olan süreçtir.

3) Föetal dönem; embriyonal dönemi izleyen yavrunun devamlı gelişme gösterdiği doğuma kadar olan süreçtir.

2.1.1. Blastogenezis dönemi

Çoğu memeli canlıda olduğu gibi koyunlarda da fertilizasyon ampulla bölgesinde gerçekleşmekte olup, 8-16 hücreli morula döneminde embriyo uterusu ulaşır. Embriyonun zona pellucida dışına çıkışı (hatching) ise koyunlarda tohumlama sonrası 8. günde olduğu bildirilmiştir. Blastosit zona pellucidadan çıktıktan sonra inner cell mass hücreler; hipoblast ve epiblast olmak üzere çift katlı disk oluştururlar. Bu disk oluştuğunda embriyo ovoid şekildedir, 11. günden sonra ip (filament) gibi uzar. Plasantasyon 15. günden sonra başlar. Uzayan konseptus hem gebe olan kornuya hem de gebe olmayan kornuya ulaşır (6, 7).

2.2. Gebeliğin Maternal Kabulü

Gebeliğin maternal kabulü; embriyo, uterus ve korpus luteum arasında gerçekleşen embriyonun varlığını anneye bildirmesi ve luteolizisin durdurulması ile progesteron sentez ve salınımının sürekliliğini sağlayan korpus luteumun ömrünün uzatılması ile sonuçlanan fizyolojik bir süreçtir (8).

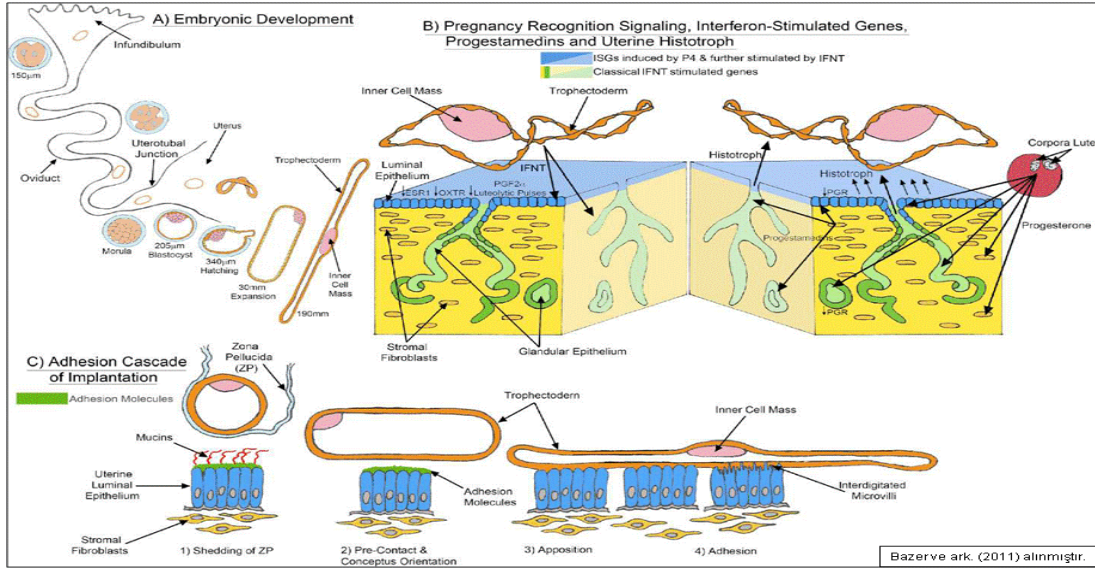
Siklik koyunlarda, östrüs siklusunun son günlerinde ovaryumda gelişmekte olan folliküllerden salgılanan östrojen, endometriyumda oksitosin reseptörlerinin artışına neden olur. Hipofiz arka lobu ve korpus luteumdan salınan oksitosin, endometriyumdan pulsatil Prostoglandin F2 Alfa ($PGF_{2\alpha}$) salınımını stimüle eder. Oksitosin reseptörlerinin sayısındaki artışla gerçekleşen sinerjik etkileşimle $PGF_{2\alpha}$ salınımı daha fazla ve sık aralıklarla gerçekleşir (9). Uterus venasından ovaryum arterine aktarılan $PGF_{2\alpha}$ CL'nin fonksiyonel ve yapısal regresyonuna neden olur ve plazma progesteron düzeyi bazal seviyelere geriler. Gebelik durumunda ise embriyo fertilizasyon sonrası 3-4. günlerde uterusu ulaşır. İner cell mass ve trofoektoderm hücrelerinden teşekkül olan yapı 7. günde blastosist (konseptus) aşamasına gelir. Blastosist 8. gününde yukarıda ifade edildiği gibi kendisini çevreleyen zona pellusidadan kurtulur (hatching) ve endometriyumla ilk teması gerçekleşir. Bu aşamada gebeliğin sürdürülebilmesi için luteolizisin engellenmesi ve progesteron düzeyinin yüksek kalması gerekmektedir. Ruminantlarda gebeliğin maternal kabulünün gebeliğin 12-24. günleri arasında trofoblastik hücrelerden salgılanan ve interferon-tau ($IFN-\tau$) adı verilen bir sitokin tarafından başlatıldığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (10,11). İnterferon-tau, anti-luteolitik etkisini östradiol reseptörlerini baskılayarak oksitosin reseptörlerinin artışına mani olmak suretiyle oluşturmaktadır (12). İnterferon-tau, anti-luteolitik etkinin yanı sıra konseptusun uzaması, gelişmesi ve implantasyonu için gerekli olan uterusun reseptivitesinde düzenleyici etkileri olan endometriyumdaki bazı genlerin ekspresyonunu da düzenleyici bir etkiye de sahiptir (13).

2.2.1. İmplantasyon

İmplantasyon; embriyonun ekstra embriyonik keseleri oluşturacak olan trofoektoderm hücreleri aracılığıyla endometriyuma tutunması, uygun şekilde endometriyum ile karşı karşıya gelmesi (oryante olması) ve gelişiminin devamlılığının sağlanmasıdır. Koyunlarda gebeliğin 12. gününde başlayan implantasyon yavaş gelişen bir süreç olup ve yaklaşık gebeliğin 22. gününde tamamlanmaktadır (14, 15). İmplantasyonun oluşma zamanı türün gebelik süresi ile ilişkili değildir. İmplantasyonun gerçekleşmesi için öncelikle mononükleer trofoblast hücrelerinin endometriyal luminal hücrelere yapışması gerekmektedir (15). Bu iki tabakanın kaynaşmasıyla endometriyumun luminal yüzeyini döşeyen epitelyum hücrelerinin mononükleer trofoblastik hücreler ile adezyonu ve luminal epitelyumda binükleer hücrelerin birleşerek sinsityum adı verilen çok çekirdekli büyük hücreler oluşmaktadır (6).

Koyunlarında dahil olduğu ruminantlarda implantasyon olayı; sırasıyla 1) blastosist'in zona pellusidadan kurtulması, 2) blastosist'in endometriyum ile ilk temasıyla kornu uteriye longitudinal yerleşmesi 3) trofoektoderm hücreleri ile luminal süferfisiyal glandular epitelyumun karşılaşması, 4) blastosist'in bu tabakalara adezyonu ve 5) sınırlı endometriyal invazyon şeklinde (Şekil 1) gerçekleşmektedir (16).

İmplantasyon, plasentanın formasyonu ile sonuçlanan gebelik boyunca embriyonik ve fetal gelişmeyi destekleyen bir oluşumdur. Embriyo uterus endometriyumuna temas etmeden önce (zona pellusidadan kurtulmadan önce) uterus bezlerinden sekrete edilen ve histotrof adı verilen (uterus sütü) karışımla difüzyon yoluyla beslenmektedir. Histotrof embriyonun gelişimi için yetersiz kaldığı durumda implantasyon ve plasentasyon başlamaktadır (17).



Şekil 1. Ruminantlarda İmplantasyon (16)

2.2.2. Plasentasyon

Plasenta, yavruya ait koryon ve anneye ait uterus mukozası arasında gebelikte gelişen ekstra embriyonal geçici bir dokudur. İçeriden dışarıya doğru amniyon, allantois ve koryon şeklinde sıralanan üç katmandan oluşan plasenta gebelik süresince yavrunun beslenmesi ve gelişimi için dolaşım, boşaltım, solunum gibi ana fonksiyonların yanında immünolojik bariyer ve hormonal üretim gibi çok önemli fonksiyonları gerçekleştirmektedir. İmplantasyonun başlangıcıyla beraber uterus mukozası ve koryonun farklı katmanlarının kombinasyonu ile oluşmaya başlayan bu doku kompleksi memeli türlerine özgü anatomik, histolojik ve jinekolojik farklılıklar göstermekte ve bu farklılıklarına ilişkin olarak farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır.

İmplantasyonla birlikte plasenta şekillenmeye başlar. İçten dışa doğru amniyon, allantois ve koryon olmak üzere üç ayrı zardan oluşur. Yavru zarları ayrı ayrı veya belli kombinasyonlar halinde plasenta oluşumunda yer alırlar ve plasenta oluşumunda yer alan yavru zarına göre farklılık gösteren üç temel tip (koryonik, koryoallantoik plasentasyon gibi) plasentayı meydana getirirler (3, 18).

Küçük ruminantlarda plasenta tarafından salgılanan en önemli hormonlar progesteron, östrojenler ve plasental laktojenlerdir (19).

Koyunlarda plasentom çapı 10–50 mm olup fetüs başına 20–70 adet arasında değişmektedir (19). Ruminantlarda koryon üzerindeki villuslar belli odaklarda topluluk halinde bulunurlar ve bu odaklar kotiledon olarak isimlendirilir. Koyunda sayıları 80-100 civarındadır. Plasentomların fötal kısmı kotiledonlar, maternal kısmı ise karunkulardır. Karunkuların bulunduğu bölge implantasyon alanlarıdır. İmplantasyon sürecinde endometriyal yüzeyde derin karunkular kriptler şekillenir, fötal koryoallantoisin kotiledoner villilerine çok miktarda dallanarak girmektedir. Plasentomların çapı konseptus geliştikçe artmaktadır. Uterusun luminal çapının gelişmesiyle birlikte karunkular kriptlerin derinlikleri de artmakta, özellikle karunkulalar da vaskülarizasyon artmaktadır (4).

Küçük ruminantlarda plasenta desidualı plasentalar ile adesidual tip plasentalar arasında yer alır ve bu nedenle intermedia tip plasentadan söz edilebilir. Histolojik yönden sindesmokoryal, morfolojik yönden villi koryalislerin yerleşmesine göre lokal plasentadır. Villi koryalisler yuvarlak veya oval kümeler halinde lokalize olmuşlardır. Bu yapılardan dolayı kotiledoner plasenta sınıfına girerler. Bunlar endometriyumda karunkulalar ile birleşerek plasentom adı verilen yapıları oluştururlar (4).

Sonuç olarak, koyunlarda implantasyon aşım sonrası 15–16. günlerde başlamakta plasentasyon ise 50–60. günler arasında tamamlanmaktadır (20).

2.3. Koyun Gebelik Tespitinde Kullanılan Güncel Tanı Yöntemleri

Aşım veya tohumlama sonrası hayvanın doğum yapması en basit ve en kesin test olmakla birlikte artan dünya nüfusunun ihtiyaçlarının kıt kaynaklardan karşılanabilmesinin gerekliliği gebeliğin mümkün olduğu kadar erken teşhisini zorunlu kılmaktadır (21). Koç veya tekenin sürü içerisinde serbest dolaştığı işletmelerde erken gebelik tanısı önemsenebilir. Ancak modern yetiştiricilikte, kontrollü üremenin yapıldığı sürülerde, sezon dışı uygulamalarda, koçun kıymetli ve sayıca yetersiz olduğu durumlarda ve suni tohumlama uygulamalarında erken gebelik tanısı büyük önem taşımaktadır (3).

Koyunlarda erken gebeliğin tanısı gebe hayvanların kesiminin önlenmesi ve gebelik süresince uygun gıda rasyonları uygulanarak yavru doğum ağırlığının normal olmasının sağlanması yönünden önemlidir (22).

Günümüzde evcil çiftlik hayvanları için zaman içerisinde geliştirilen doğrudan veya dolaylı gebelik teşhisi amacıyla kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır.

2.3.1. Ultrasonografi

Bu alan ile ilgili olarak koyunlarda gebelik tanısı yönünden ilk bilimsel çalışmanın 1966 yılında yayınlandığı görülmektedir. Önceleri gebelik tanısı A-Mode ya da Doppler sistem olarak uygulanmıştır. Daha sonra ise B-Mode ultrason 1980'lerde kullanılmaya başlanmıştır (23).

B-model, dokulardan geriye dönen ses dalga yankıların zemini genellikle siyah olan bir ekran (CRT, katot ray tüp ekranı) üzerinde ışık noktaları şeklinde gösterilmesidir. Koyunlarda ultrasonografik muayene transrektal ve transabdominal yolla yapılır. Gebelik tanısı, canlılık muayenesi, fetal sayı ve yaş tahmininde hızlı, güvenilir ve pratik bir yöntemdir (24). Gebeliğin 17–19. gününden itibaren transrektal olarak yapılan gebelik tanısı, 25. gününden itibaren embriyo sayımı, 30. gününden itibaren ise transabdominal yoldan muayeneler yapılabilmektedir (2, 25, 26, 27).

Ultrasonla bakıldığında konseptusun etrafında kese şeklinde sıvı birikimi sirküler-yuvarlak ya da biraz uzamış olarak (anekoik-siyah) görülür ve uterus dokusundan ayrılır. Yaklaşık her bir kesenin çapı birkaç mm'dir. Birden fazla anekoik alan olması gebe olduğuna yorumlanabilir. Fakat hidrometra gibi durumlar gebelik ile karıştırılabilir. Günümüz teknolojisi ile uterus içerisindeki sıvı birikimi gebeliğin 14-20. günleri arasında transrektal teknik kullanılarak deneyimli bir operatör tarafında teşhis edilebileceği bildirilmesine rağmen sıvı birikimi en kolay ve pratik olarak 21. günde görülür. Yine aynı şekilde embriyonun transrektal yolla 18. günde olabileceği bildirilmiştir (28). Embriyonik kalp atımları ilk olarak 18-23. günler arasında görülebileceği gözlemlenebilir. Plasentomlar gebeliğin 26-28. günlerinde görülebilir, tam görüntü ise 35. günde olur (23).

Gerçek zamanlı B-Mode ultrasonografinin; basit ve güvenilir olduğu, non invaziv görüntü elde etmek için fazla bekleme ihtiyacı duyulmadığı, hayvan ve operatöre herhangi bir zararının olmadığı bildirilmiştir. İlk zamanlarda erken gebelik tanısı için kullanılan bu teknik günümüzde doğum sonrası problemlerin (güç doğum, kuzu ve embriyonik ölümler) anlaşılması için kullanılmaya başlamıştır. Özellikle 30. güne kadar yanlış pozitif sonucu etkileyen durumlar (embriyonik ve fetal ölümler) olabilir. Transrektal muayene için mikrokonveks ya da linear prob, abdominal muayene için ise konveks ya da mikrokonveks prob tercih edilir (23).

2.3.2. Endokrinolojik Muayeneler

2.3.2.1. Süt Progesteron Analizi

Aşımdan sonra 18. günde yapılan süt progesteron analizinde doğruluk oranı %92–100 arasında değişmektedir (12). Aşımdan sonraki 22–26. günlerde 10 ng/ml'nin üzerinde olması gebelik yönünden pozitif olarak değerlendirilmektedir. Gebe olanları doğru belirleme oranı %86, gebe olmayanları doğru belirleme oranı %100 olarak bildirilmektedir (1). Sütte bulunan özel proteinlerin daha yüksek seviyede olması gebe olan hayvanların tanısında doğruluk oranının düşük çıkmasının nedeni olarak bildirilmektedir (4).

2.3.2.2. Plazma Progesteron Analizi

Plazma progesteron düzeyinin belirlenmesi koyunlarda aşımdan sonraki 17-18. günlerde, keçilerde ise 18-22. günlerde enzim immunoassay (EIA), radio immunoassay (RIA) ve enzim linked immuno sorbent assay (ELISA) yöntemleri kullanılarak yapılmaktadır. Bu testler kullanılarak aşımdan sonraki 17-18. günlerde gebe olmayan koyunlarda %100, gebe hayvanlarda %85-100 oranında doğru tanı konulabilmektedir. Progesteron düzeyinin belirlenmesinin diğer muayene yöntemlerini destekleyen güvenilir bir yöntem olduğu, ancak erken embriyonik ölümlerin her zaman düşünülmesi gerektiği belirtilmektedir. Progesteron

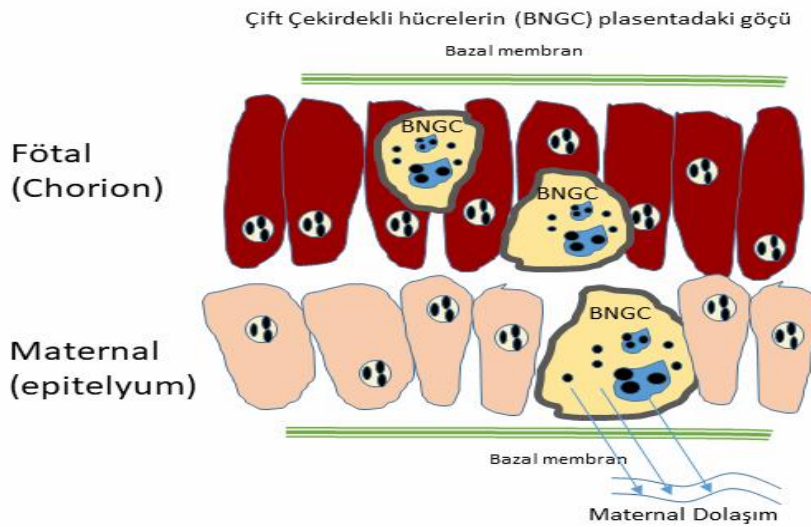
analizlerinin maliyetinin yüksek olması, fazla zaman alması, donanımlı bir laboratuvara gereksinim göstermesi ve tekli-çoklu gebeliklerin ayırt edilmesindeki doğruluğunun düşük olması yöntemin dezavantajları olarak kabul edilmektedir (3, 12, 24, 29).

2.3.3. Koryonik Somatotropin veya Plasental Laktojen(PL)

Memenin gelişimi ve laktasyondan sorumlu olan koryonik somatotropin gebeliğin 55. gününden sonra kanda önemli derecede artış göstermektedir. Gebeliğin 64. gününde PL'nin RIA yöntemi ile ölçülmesiyle gebe hayvanlarda %97, gebe olmayan hayvanlarda %100 doğrulukta sonuç elde edilmiştir (2, 12).

2.3.4. Gebelik İle İlişkili Proteinlerin Değerlendirilmesi

Bu proteinler gebeliğin implantasyon aşamasında (koyunlarda 14, ineklerde 18. günden itibaren) trofoblasttan köken alan iki çekirdekli dev hücrelerden üretilirler. Bu hücreler gebelik boyunca plasentadaki hücrelerin %20'sini oluştururlar ve gebelik boyunca sürekli yenilenmektedirler.



Şekil 2. Çift çekirdekli hücrelerin görünümü (9)

Bu hücreler Şekil 2’de görüldüğü gibi embriyodan köken alıp endometriyuma göç ederler. Bu hücreler ruminantlara özgü Gebelik Spesifik Protein B (PSPB) veya diğer adı gebelik ilişkili glikoproteinler (PAGs) üretirler. Gebelik spesifik protein B (PSPB) ilk olarak inek plasentasında bulunmuş olup bu protein fetal trofoektodermin binükleat hücrelerinden salınan aslında bir gebelik ilişkili glikoproteindir. RIA yöntemi ile miktar ölçümleri gerçekleştirilebilir. Bu protein gebelik süresince aktiftir. PSPB’nin fizyolojik rolünün başlangıçta PGF₂α’yı uyararak korpus luteumun (CL) devamını sağlamak olarak düşünülmüş fakat günümüzde IFN-τ’nun bu rolü olduğu bilinmekte olup PSPB’nin bundan daha başka fonksiyonlarının olabileceği sanılmaktadır. Willard ve ark. (30) tarafından Koyun Gebelik Spesifik Protein B (ovPSPB)’ye karşı RIA kiti geliştirilmiştir. Tohumlama sonrası gebeliğin 19-20. günlerinde PSPB tespit edilebilmektedir. Bu PSPB gebelikte 30. güne kadar artmakta ve düzeyi 10,8±0,4 ng/ml düzeyine ulaşmaktadır. Doğum sonrası hızla periferik dolaşımdan elimine edilirler ve periferik kandaki konsantrasyonları postpartum 3. hafta içerisinde belirlenebilen düzeyin altına iner. Koyunlarda İnek Gebelik Spesifik Protein B (boPSPB) test kiti ile gebeliğin 26-106. günleri arasında gebe olanlarda %100 ve gebe olmayanlarda %83 oranında kesin gebelik tanısı yapılabilir. PSPB konsantrasyonu sayısal olarak ölçülemez, çünkü koyun antijenleri sadece boPSPB antikolarıyla tam olmayan ters reaksiyonlar gösterir. PSPB konsantrasyonları fetüsün cinsiyeti tarafından etkilenmemektedir. Gebeliğin 50 ve 100. günleri arasında PSPB konsantrasyonları plasental doğum ağırlığıyla pozitif orantılıdır (12, 29, 31, 32).

Sasser ve ark. (34) tarafından gebe ineklerin kanındaki proteinleri tanımladıkları zaman yapılmıştır. İzole ettikleri protein “gebeliğe özgü protein B” ya da “PSPB” olarak adlandırılmıştır. PSPB, plasenta tarafından üretilen PAGs ailesinin üyesidir. Biyokimyasal bakış açısıyla, PSPB ile boPAGs-1 aynı şeydir (35). Günümüzde çok az çalışma PAGs moleküllerinin gebeliğin devamında ve immün modülasyonunda rolü olduğunu bildirmesine rağmen PAGs’ın gebelik üzerine fonksiyonları halen bilinmemektedir (21). Yapılan bir çalışmada PAGs’ların plasenta bariyerini geçip fetal kan dolaşımına da girdiği bu yönüyle de yeni doğanda ve fetal yaşamda da rollerinin olabileceği iddia edilmiştir. Özellikle erken postnatal periyotta neonatal sirkülasyondaki PAGs’ların pasif transfer immunitésinin de rolünün olduğu

sanılmaktadır (36). Gebelik proteinlerinin yapısı ruminant türleri arasında korunmuştur. İnek ve koyun PAGs'larının yapısı yaklaşık %70 oranında benzerlik gösterir. Bu yönüyle inek PAGs'ı ve PSPB ölçüm yöntemleri koyun PAGs'larının tespitinin yapılmasına izin verir (29). Ruminantlarda gebelik sırasındaki PAGs profili ırk, alt tür, fetüs sayısı, doğum ağırlığı, annenin beslenme durumu çevre şartları ve kullanılan ölçüm yönteminden de etkilenir (37, 38).

PAGs ile ilgili güncel bilgiler ışığında günümüzde 30'dan farklı alt türünün tespit edildiği ve ilk tespit edilen molekülün PSPB olduğu dikkate alındığında koyunlarda gebelik boyunca trofoblastın iki çekirdekli hücreleri tarafından birçok glikoproteinlerin sentezlendiği söylenebilir (33). PAGs'lar aspartik proteinaz ailesine aittir. Aspartik proteinaz ailesi ruminantlarda farklı derecelerde glikosilasyon yapan 10 antijenik protein içerir. Bu glikoproteinlerin birçoğu enzim aktivitelerine sahip değildir. Moleküler ağırlıkları 43–67 kDA'dır. Föto maternal sinsityum şekillendiği, çift çekirdekli trofoblast hücrelerinin endometriyuma göçtüğü plasantasyonun başladığı dönemde kanda belirlenebilir. Merinos koyunlarında kanda aşımından sonra 3. haftada 30 koyunun 20'sinde, 4. haftada ise bütün koyunlarda tespit etmişlerdir. Gebeliğin 3-9. haftasından itibaren gebelik glikoproteinleri düzeyinde artış daha yavaştır (2). Farklı tip koyun ırklarında plazma PAGs profili gebeliğin 9.-17. haftaları arasında değişken olduğu, gebeliğin 17. haftasından doğuma kadar olan sürede ise tüm ırklarda arttığı bildirilmiştir. Postpartum 4. haftada PAGs düzeyi hızlı bir şekilde bazal seviyeye iner (49).

Sunulan bu tez çalışmasında yukarıdaki bilgiler ışığında ticari bir koyun PAG ELISA ölçüm kitinin koyunlarda erken gebelik tanısında kullanılabilirliği, tüm gebelik boyunca kan plazmasındaki PAGs konsantrasyonunun belirlenmesi, elde edilen sonuçların klinik veteriner hekimlerin bilgisine sunulması ve sahada kullanılabilirliğin belirlenmesi amaçlandı. Bu yönü ile elde edilen sonuçların koyunlarda erken gebelik tespitinde bu kitin kullanılabilirliği de test edildi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan çalışma için canlı hayvan materyali kullanılmamış olup, çalışmada Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji laboratuvarında (-80 °C) saklanan, önceden toplanmış gebe koyun kan plazmaları kullanılmıştır.

3.1. Çalışmadaki kan örneklerin kullanıldığı gebe koyunlarda yapılmış işlemler

Çalışma iki aşamada tamamlandı ve hayvan materyali olarak gebeliği doğumla teyit edilen hayvanlar arasından toplam 16 baş gebe konya merinosu ırkı koyun seçilip kullanıldı. Birinci çalışma (gebelik boyunca PAGs profilinin izlenmesi) için 8 baş koyundan gebeliğin 0, 55, 85, 113 ve 145. günlerinde kan plazması toplandı. İkinci çalışma için ise gebeliğin 18, 21, 25, 28 ve 35. günlerinde kan plazma örnekleri toplandı. Ayrıca negatif kontrol amacı ile 2 adet (koç ve kuzu) kan plazması kullanıldı. Çalışmadaki koyunlar klinik olarak sağlıklı, 2-5 yaşlı ve en az bir doğum yapmış olanlardan seçildi. Hayvanlara işletmede rutin olarak uygulanan bakım besleme ve yönetim şartları uygulandı. Koyunlar gündüzleri merada otlatılırken geceleri kapalı ağıllarda tutuldu. Mera otlatılmasına ilave olarak üreme sezonu boyunca karma yemden koyun başına 300 gr verildi. Koyunların çiftleştirilmesinde de aynı ırk damızlık koçlar kullanıldı. Koyunlar doğal östrüste çiftleştirildi. Koyunların östrüsleri arama koçları ile tespit edildi. Arama koçu atladığında koyunun hareketsiz durması östrüs tespitinde kriter olarak kullanıldı. Arama koçları ile östrüste olduğu belirlenen koyunlar bireysel bölmelerde aynı ırktan damızlık koçlarla çiftleştirildi ve çiftleştirme günü, gebelik gününün tespiti için 0. gün olarak kabul edildi.

Çalışmada kullanılan tüm koyunların gebelikleri çiftleştirme sonrası 18. günde transrektal yolla yapılan ultrasonografi ile tespit edildi. Ultrasonografik muayenede 5-7.5 Mhz linear prob donanımlı B-mode real time ultrason cihazı (Scanner 480 Vet, Pie Data Medical, Maastrich, Netherlands) kullanıldı. Cihazın probu muayene sırasında kornu uterilerilerin taramasının daha kolay yapılabilmesi için 3 cm çapında 64 cm uzunluğunda silindirik muayene çubuğuna yerleştirildi. Muayene özel olarak tasarlanmış muayene masasında yapıldı. Koyun muayene

masasına sırt üstü yatırıldı. Ön ve arka bacakları muayene masasının dikey çubuklarına bağlanarak koyunun zaptı-raptı gerçekleştirildi. Muayene masasının koyunun baş ve gövde kısmının geldiği taraftaki ayaklarının alt kısmına 10-15 cm yüksekliğindeki tahta takozlar yerleştirilerek abdominal organların etkisiyle reproduktif organların pelvis boşluğuna rektumun üstüne toplulaşması sağlandı. Bu uygulamalarla kornu uterilerin tamamının taraması için uygun bir düzenek oluşturuldu. Bu hazırlıklardan sonra öncelikle lateks eldiven ve kayganlaştırıcı amaçlı ultrason jeli ile kullanılarak işaret ve orta parmak aracılığıyla rektumdaki dışkı parçacıkları geriye çekilerek nazikçe boşaltıldı. Rektumun boşaltılmasından sonra probun yerleştirildiği muayene çubuğu ultrason jeli ile kayganlaştırıldı ve muayene çubuğu probun tarama yüzü yukarı gelecek şekilde yarım dairesel hareketlerle rektuma yerleştirildi. İlk olarak idrar kesesinin görüntülenmesi amaçlandı. İdrar kesesinin sınırlarının belirlenmesinden sonra kesenin kranio-ventarilinde konumlanan kornu uterilerin lumenleri, muayene çubuğu aracılığıyla probun tarama yüzü soldan-sağa veya sağdan-sola yönlendirilerek tarandı. Kornu uteri lumeninde embriyonik vezikül içerisinde embriyonun izlenmesiyle gebelik tanısı yapıldı. Gebeliklerin devamlılığı sırasıyla 25. ve 35. günlerde yapılan ikinci ve üçüncü transrektal ultrasonografik muayene ile teyit edildi. Gebelikler, kuzu doğumları ile teyit edildi.

Çalışmadaki bütün koyunların vena jugularisinden Na-EDTA içeren vakumlu kan tüplerine alınan kan örneği 3000 devir/dakika'da 20 dakika santrifüj edilip, -80 °C' de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2. Kitin Çalışma Prosedürü ve Laboratuvar Çalışması

Sunulan çalışmada Sheep Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs) Elisa kiti (cat MBS750306 MyBioSource, Southern California, San Diego USA) kullanılmıştır. Bu kit koyun PAGs'mın tespiti için 1,5 saatlik solid-faz ELISA ölçümü olarak dizayn edilmiştir. PAGs ELISA kiti içeriğinde monoklonal anti-PAGs antikorunu ve bir PAGs-HRP (Horseradish Peroxidase) konjugatını içermektedir. Kitin çalışma protokolü gereği örnek ve sulandırma tamponu 1 saat boyunca önceden kaplanmış ELISA pleyti içinde (kuyucuğu) inkübe edildi. İnkübasyondan sonra,

kuyucuklar boşaltılıp 5 kere yıkandı. Kuyucuklar daha sonra HRP enzimi için uygun substrat (Enzim-alt madde) ile inkübe edildi. Enzim-alt madde reaksiyonun son ürünü, mavi renge dönüşen bir kompleks oluşturur. Son olarak, durdurucu bir solüsyon, reaksiyonu durdurmak için eklenir ve bu da son ürünü sarı renge dönüştürür. Rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak mikropalak bir okuyucuda 450 nm'de ölçülür. Rengin yoğunluğu, PAGs konsantrasyonuyla orantılıdır, bağlanan tarafta örneklerdeki PAGs ve PAGs-HRP konjugatı anti-PAGs antikoru için yarışır. Alanların sayısı sınırlı olduğu için, ne kadar çok alan örneklerdeki PAGs ile ele geçirildiyse o kadar az alan bağlı PAGs-HRP konjugatı için kalır. Rengin yoğunluğunu standart konsantrasyon ile ilişkilendirmek için standart bir eğri çizilmiştir. Her örnekteki PAGs konsantrasyonu bu eğriyle değerlendirilir.

3.2.1. Kiti İçeriği

Bütün sağlanan tüpler 2-8 °C arasında depolanmıştır. Etiketledeki son kullanma tarihi dikkate alınmış olup materyaller Tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo 1. Materyaller

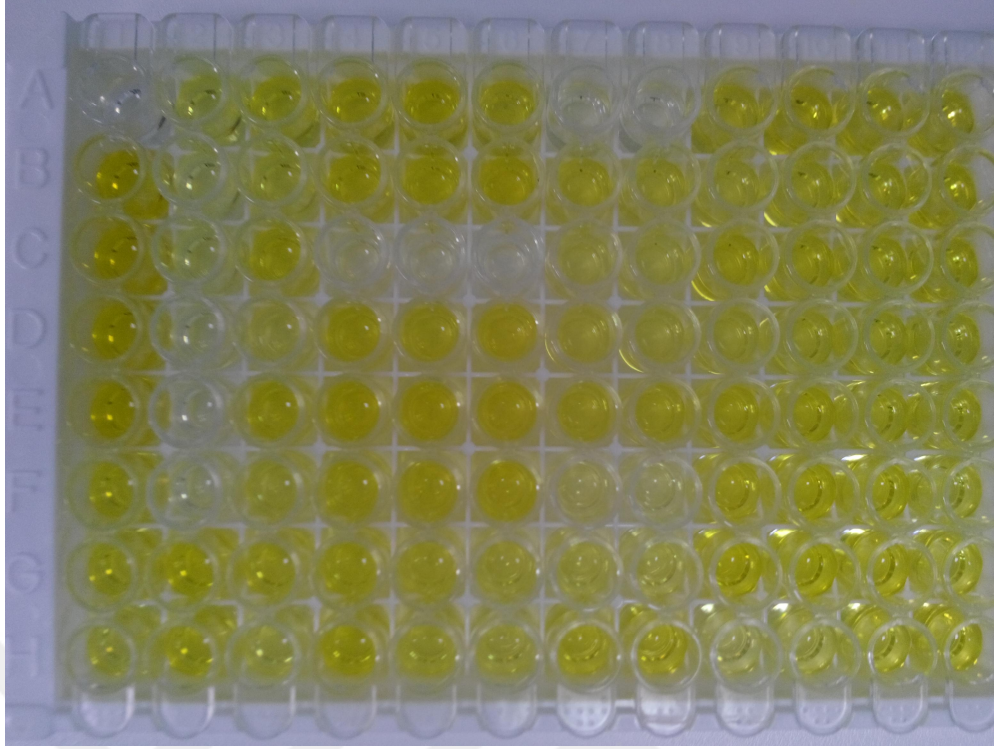
MATERYAL	AÇIKLAMA	MİKTAR
MİKTOTİTTER PLAKA	96 kuyucuk	stripwell
ENZİM KONJUGATI	6.0 ml	1 küçük şişe
STANDART A	0 ng/ml	1 küçük şişe
STANDART B	5 ng/ml	1 küçük şişe
STANDART C	10 ng/ml	1 küçük şişe
STANDART D	25 ng/ml	1 küçük şişe
STANDART E	50 ng/ml	1 küçük şişe
STANDART F	100 ng/ml	1 küçük şişe
ALT MADDE A	6 ml	1 küçük şişe
ALT MADDE B	6 ml	1 küçük şişe
DURDURUCU SOLÜSYON	6 ml	1 küçük şişe
DENGE SOLÜSYONU	3 ml	1 küçük şişe
YIKAMA SOLÜSYONU(100 x)	10 ml	1 küçük şişe
KİT KULLANMA TALİMATI		1 adet

Gerekli olan diğerk materyal ve araçlar aşağıda belirtilmiştir.

1. Duyarlılık pipetleri ve tek kullanımlık pipetler, 10-1000 μ l (mikrolitre)'lik geniş deneyler için çok kanallı pipetler tercih edilir.
2. 100 ml ve 1 litre kademeli silindirler.
3. Distile ya da deiyonize su.
4. Örnekleri seyreltmek için tüpler.
5. Emici kâğıtlar.
6. 450 nm'deki emilimi ölçebilen mikroplak okuyucular.
7. 3000 x g yapabilen santrifüj.
8. Mikroplak yıkayıcı ya da yıkama şişesi
9. İnkübatör (37 °C)
10. Veri analizi ve grafik yazılımı.

3.3. Laboratuvar Çalışması:

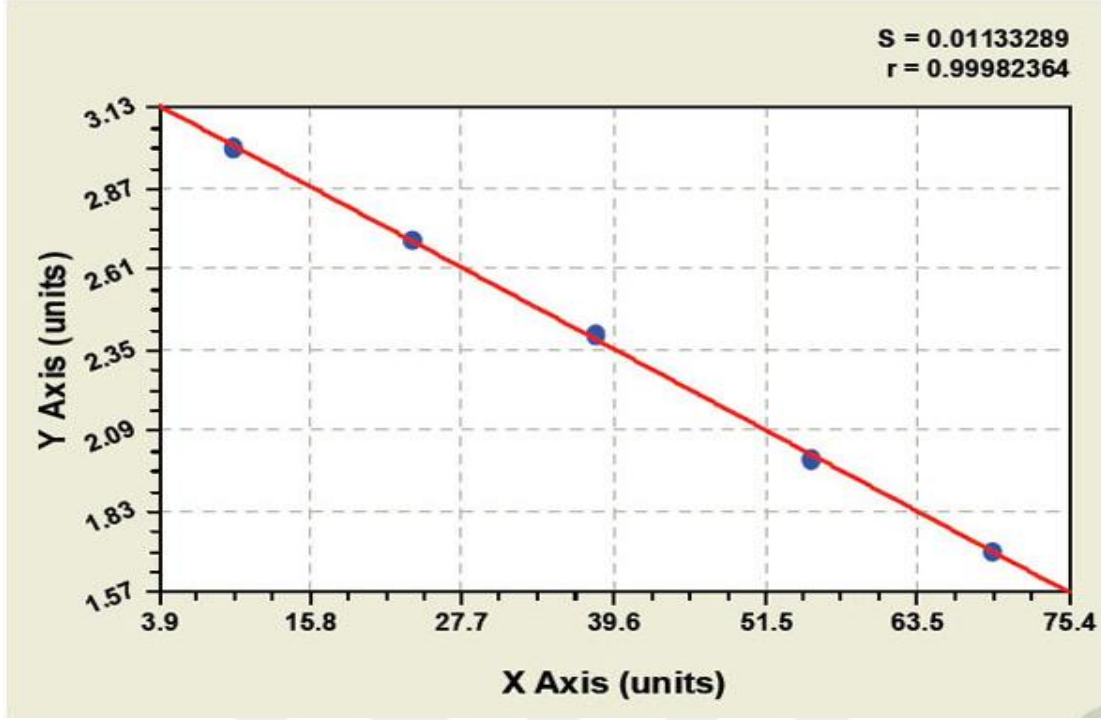
Çalışmaya başlamadan önce yukarıda ayrıntılı ifade edilen bütün kit bileşenleri ve alınan plazma örnekleri oda sıcaklığına getirildi (20-25 °C). Daha sonra 990 ml deiyonize su ile 10 ml solüsyonu konsantrasyonu (100x) sulandırılıp 1000 ml yıkama solüsyonu (1x) elde edildi. Daha sonra kuyucukların üzerine standartlar ve plazma örnekleri eklendi. Bu işlemi takiben kuyucuklara 50 μ l eşlenik eklenerek 37 °C'de inkübatör içerisinde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Örnekler inkübatörlerden alınarak otomatik yıkayıcı ile yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı. Daha sonra 50 μ l alt örnek A, 50 μ l alt örnek B bütün tüplere, boşluk içeren kuyucuklar dahil eklendi. Kuyucukların üstü kaplanıp 10-15 dakika 37 °C'de tekrar inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonrasında kuyucuklar içerisinde 50 μ l durdurucu solüsyonu bütün tüplere, boşluk içeren tüp dâhil eklendi ve bu da son ürünü Resim 1'de görüldüğü gibi sarı renge dönüştürdü. Tüpler iyice karıştırdı. Vakit kaybetmeden kuyucuklar mikroplak okuyucu (ELISA reader) kullanarak optik yoğunluğu (O.D.) 450 nm'ye hızlıca okundu.



Resim 1. Plaka ve mikro kuyucukların çalışma sonrası görünümü

3.4. Sonuçların Hesaplanması:

Şekil 3'te gösterilen standart eğri örneklerin miktarını hesaplamak için kullanıldı. Önce, bütün standart ve örnekler için tekrarlanmış ölçümlerin ortalamaları alındı. Sonuç yorumlanmadan önce bütün O.D. değerleri boşluk kontrolünün ortalama değerinden çıkarıldı. Bütün standartlar için ortalama O.D.'ler horizontal eksene (x), bütün konsantrasyonlar vertikal eksene (y) gelecek şekilde bir eğri oluşturun ve eğriyi 4 parametrelili (4-PL) lojistik curve-fit ya da logit-log doğrusal regresyon eğrisi oluşturmak için statistik yazılımı kullanarak çizildi. Veri, konsantrasyonun logaritması, O.D.'nin logaritmasına karşı çizilerek doğrusallaştırıldı ve en uygun doğru regresyon analizine göre kararlaştırıldı.



Şekil 3. Standart Eğri

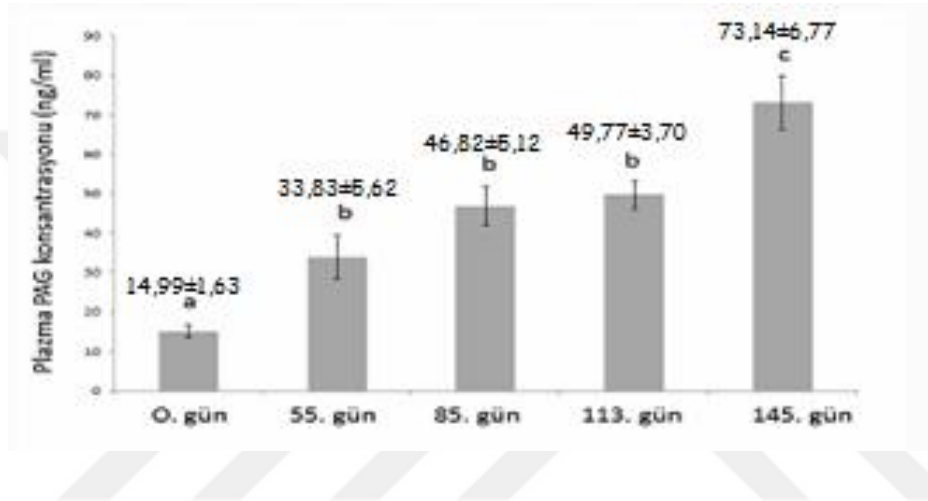
3.5. İstatistiksel Metod ve Analiz

Çalışmanın verileri tekrarlayan ölçümler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak SPSS programı ile analiz edildi. Değerler arasında ikili karşılaştırmalar için ise posthoc tukey karşılaştırılması yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği test edildi. Sonuçlar her bir grup için ortalama değer artı/eksi standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel önem $p < 0,05$ 'e göre önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma 1

Sunulan çalışmadaki koyunların tamamı tekli doğum gerçekleştirmiş olup aşım sezonu içinde 8 baş gebe koyundan gebelik boyunca (0, 55, 85, 113 ve 145. günlerde) toplanan plazma örneklerinden koyun PAGs ELISA kiti ile elde edilen sonuçlar şekil 4'te gösterilmiştir.

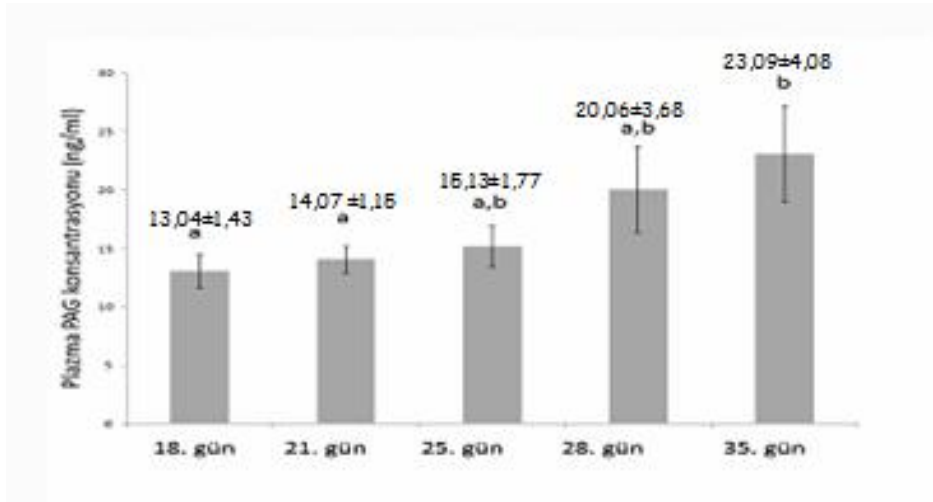


Şekil 4. Gebelik süresince görülen plazma PAGs değerleri

Aşım günü (0. günde) plazma PAGs değerinin $14,99\pm 1,63$ ng/ml olduğu görülmüştür. Gebeliğin 55. gününde ortalama PAGs değerinin $33,83\pm 5,62$ ng/ml, 85. gününde $46,82\pm 5,12$ ng/ml, 113. gününde $49,77\pm 3,70$ ng/ml, 145. gününde $73,14\pm 6,77$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonuçları değerlendirildiğinde gebeliğin 0. gününde bile ölçüm yapılan kitle belirli bir oranda bazal seviyede PAGs düzeyinin ölçüldüğü tespit edilmiştir ($14,99\pm 1,63$ ng/ml). Gebeliğin 0. günü ile kıyaslandığında gebeliğin 55. günündeki değer ile arasında istatistiki olarak önemli bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Yine aynı şekilde gebeliğin 85, 113, 145. günlerindeki plazma PAGs değeri 0. gün plazma PAGs değerine kıyasla önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Gebeliğin 145. gündeki plazma PAGs değerinin gebelik içindeki 55, 85 ve 113. günlerdeki plazma PAGs değerlerine oranla da istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

4.2. Çalışma 2

Sunulan çalışmadaki koyunların tamamı tekiz doğum gerçekleştirmiş olup aşım sezonu içinde 8 baş gebe koyundan erken gebelik boyunca (18, 21, 25, 28 ve 35. günler) toplanan plazma örneklerinden koyun PAGs ELISA kiti ile elde edilen sonuçlar Şekil 2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre ortalama PAGs değerleri Şekil 5’te görüldüğü gibi 18. günde $13,04 \pm 1,43$ ng/ml, 21. günde $14,07 \pm 1,15$ ng/ml, 25. günde $15,13 \pm 1,77$ ng/ml, 28. günde $20,06 \pm 3,68$ ng/ml, 35. günde ise $23,09 \pm 4,08$ ng/ml olarak ölçülmüştür.



Şekil 5. Gebeliğin erken döneminde görülen plazma PAGs değerleri

Gebeliğin 18. günü ile kıyaslandığında plazma PAGs değerinin 21, 25, 28. günlerde yükselme eğiliminde olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlenmiştir. Gebeliğin 35. gününde ise 18. gün ile kıyaslandığında plazma PAGs değerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca gebeliğin 35. günü ile kıyaslandığında 25 ve 28. günlerdeki plazma PAGs değerlerinin istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Koyunlarda erken gebelik döneminde oluşan olayların daha detaylı incelenmesini sağlayan günümüz moleküler yöntemlerinin hızla gelişmesi erken gebelik teşhisi için bilinen klinik yöntemlerin dışında, yeni laboratuvar yöntemlerinin kullanılmasına ve geliştirilmesine yol açmaktadır. Özellikle gebelik ile ilişkili gen ve/veya gebelik spesifik proteinlerin kanda araştırılması oldukça popüler konular olup bu alanda günümüzde birçok çalışma yapıldığı görülmektedir (21, 41). Sunulan bu tez çalışması kapsamında da gebelik ilişkili glikoproteinlerin (PAGs) koyun plazmasında gebelik boyunca değerleri incelenmiştir.

Periferal kanda embriyo ve/veya plasenta kaynaklı biyomarkırların tespit edilmesi minimal invaziv girişimle örnekleme yapılması mümkün olduğundan erken gebelik tanısı için oldukça önemlidir. Bu biyomarkırların tespiti erken gebelik tanısıyla birlikte bu moleküllerin embriyo/plasenta kaynaklı olmaları nedeniyle gebeliğin gidişatının izlenmesini de mümkün kılmaktadır (6, 15). Koyunlarda günümüzde moleküler olarak gebeliğin tespit edilmesinde kullanılan diğer bir yöntem embriyonik IFN- τ 'nın periferal beyaz kan hücrelerinde ekspresyonun belirlenmesidir. Bu molekül endometriyal oksitosin ve östrojen alfa reseptör alfa1 baskılayarak endometriyumdan gebeliğin devamlılığı için kritik PGF $_{2\alpha}$ sekresyonunu durdurur (6, 15). Embriyonik IFN- τ 'nın bu özelliğinin dışında anti-proliferatif ve immunmodülolatör olduğu, endometriyumda çeşitli genlerin ekspresyon profillerini değiştirdiği bildirilmiştir. Bu genler IFN- τ tarafından uyarılan genler olarak (ISGs) isimlendirilmiştir (39). Daha sonraki çalışmalarda ISGs ekspresyon profilinin sadece endometriyumda değil, CL ve periferal kan lökositlerinde de gebeliğe bağlı değiştiği çeşitli hayvan türlerinde gösterilmiştir. Özellikle periferal kanda IFN- τ tespit edilememesine rağmen ISGs ekspresyonların lökositlerde tespit edilmesi araştırmacıları bu tekniğin koyun ve ineklerin erken gebelik tespitinde kullanılabilirliğini araştırmaya itmiştir. Yankey ve ark. (40) tarafından koyun periferal kan lökositlerinde ISGs'lerden biri olan MX geni ve proteininin ekspresyonunun gebeliğin 15. gününden itibaren arttığı gözlemlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda benzer şekilde ineklerde 18. gündeki ISGs ekspresyon profilinin sıklık hayvanlara oranla önemli ölçüde değiştiğini bildirilmektedir. Güncel olarak yine Köse ve ark.

(41) gebe koyunların kan periferal lökositlerinin ISG15 ve MX1 gen ekspresyonlarının sırası ile yaklaşık 40 kat ve 8 kat arttığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde Kıyma ve ark. (28) ultrasonografiye göre kan PBLs hücrelerinde ISG15 artışının çok daha erken gebelik tespitinde doğru bir şekilde kullanılabileceğini ifade etmektedirler. Bu bilgiler erken gebeliğin kandaki ISGs ekspresyonundaki değişimle tespit edileceğini göstermektedir. Fakat özellikle tekniğin mRNA kandaki lökositlerde artışını göstermeye yönelik olduğu göz önüne alındığında mRNA molekülünün oldukça hassas olması (ısı değişimlerinde etkilenmesi vs) ve laboratuvar tekniğinin zaman alması (tüm aşamalar dahil yaklaşık yarım gün) gibi dezavantajları vardır. Buna alternatif olarak geliştirilen, sunulan tezde de kullanılan PAGs'ların periferal kan serum veya plazmasında tespit edilmesi erken gebeliğin tespitinde çok daha kolaylıkla uygulanabileceğini göstermektedir. Fakat ISGs'da olduğu gibi PAGs'ın tespiti yine çeşitli laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duymaktadır. Sunulan bu tez çalışmasında da PAGs'ın ISGs genlerinin tespitine göre başlıca avantajları; kan serumundan tespit edilebiliyor olması, mRNA'ya oranla daha stabil olduklarından kanın bekletme koşullarında +4 C bile bekletilebileceği, antikor antijen reaksiyonunun varlığının renk tespit edilmesi esasına dayanan spektrofotometrik ölçüm, mRNA'daki mRNA gen düzeyindeki artışının göstergesi olan cycle of threshold değerindeki (Ct, eşik döngüsü) artışın komplike matematik hesaplarla belirlenmesine oranla çok daha kolay olması olarak dikkati çekmiştir.

Koyunlar için saha şartlarında en yaygın gebelik yöntemi ise elle palpasyon ve transrektal/transabdominal ultrasonografidir. Bu iki yöntemden elle palpasyon oldukça geç bir dönemde (90 - 130. günler), transrektal ultrasonografi (embriyonik vezikülün görülmesi ile 18. günde) ve transabdominal olarak (35. günde) yapılabilmektedir (4). Fakat bu yöntemlerin başlıca dezavantajları elle palpasyonun oldukça geç bir dönemde yapılması, ultrasonografi uygulamaları ile ilgili olarak ta bir sürüdeki koyun sayısının fazlalığı, maliyeti yüksek ultrasonografi cihazı gerekliliği, transrektal ultrasonografinin zahmetli ve muayene hazırlığının zaman gerektirmesi dezavantajları olarak gösterilmiştir. Ayrıca bu uygulamaların yapılabilmesi için tecrübeli veteriner hekimlere olan ihtiyaç koyun ve ineklerde erken gebeliklerin tespiti için farklı alternatif gebelik teşhis yöntemlerini araştırmaya sevk etmiştir (21). Sunulan bu tez çalışması kapsamında koyunlarda

transrektal/transabdominal ultrasonografiye alternatif olabilecek gebelik ile ilişkili glikoproteinleri ölçen bir ticari kit ile gebeliklerin tespit edilmesi kullanılabilir mi sorusuna yanıt aranmıştır. Ayrıca koyunlarda gebelik boyunca gebelik ile ilişkili glikoproteinlerin profili belirlenmiştir.

Bu amaç kapsamında 2 grup halinde toplam 16 adet gebe koyundan ilk grup olarak gebeliğin 18, 21, 25, 28 ve 35. günlerinde, ikinci grup olarak ise 0, 55, 85, 113 ve 145. günlerde 2 çalışma olarak kan plazması örnekleri toplanmıştır. Alınan örnekler -80 °C' de saklanmış, koyunların gebelikleri doğum yapmaları ile ayrıca teyit edilmiştir. Elde edilen plazma örneklerinden Sheep Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs) (cat MBS750306 MyBioSource, Southern California, San Diego USA) ELISA ticari kiti kullanılarak plazma PAGs profili ölçülmüştür. Analiz sırasında testin pozitif ve negatif kontrol örnekleri plazma örnekleri ile beraber işlenerek testin güvenilirlik aralığı ve test sırasında olası hatalı pozitif ve negatif sonuçların oluşması engellenmiştir. Kullanılan test koyunlarda PAGs yapısına karşı monoklonal teknoloji ile üretilen antikorların ELISA platelerine yapıştırılması esasına dayanır. Bu tekniğe göre plazmada var olan PAGs molekülerinin ilgili antikorlara bağlanması, bu bağlanmasının sekonder işaretleri antikorlar ile tamamlanıp ortama ilgili substrat verilmesi (renk değişimini sağlayan) durumunda açığa çıkaracağı renk değişikliklerinin kolometrik olarak spektrofotometrede (elisa reader cihazı) 450 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmıştır. Sunulan bu tez çalışması kapsamında plazma örnekleri yukarıda ifade edildiği şekilde ölçülmüştür. Pozitif ve negatif kontroller testin ifade ettiği aralıkta bulunmuştur. Koyunlardan elde edilen plazma örneklerinde 0. günden itibaren PAGs profilinin plazmada bazal bir değere sahip olduğu saptanmıştır. Bu değer ortalama $14,99 \pm 1,63$ ng/ml'dir. Bu proteinlerin gebelik spesifik olmasından dolayı siklik hayvanlarda bulunmadığı var sayılmaktadır. Fakat sunulan çalışmada 0. gün (siklik olarak kabul edilebilir) plazmada belli bir miktarın üzerinde olmasından dolayı bu kullanılan ticari kitin plazmada bazı proteinlere bağlandığı ve bu şekilde bazal bir seviye olarak kabul edilen aralıkta renk değişimine neden olduğundan spektrofotometrik olarak okunduğunu işaret etmektedir. Bu değer sunulan tez için bazal aktivite olarak kabul edilmiştir. Benzer şekilde Vandaele ve ark. (42) ortalama PAGs konsantrasyonlarının gebe olmayan koyunlarda yüksek (2-4 ng/ml) olduğunu bildirmişlerdir (Suffolk ve

Texel koyunlarında 4 ng/ml). El Amiri ve ark. (43) benzer şekilde suni tohumlama yapılan günlerde ortalama PAGs konsantrasyonlarının 0,6 ng/ml'den daha yüksek olduğunu ifade etmektedirler (44). Yine güncel bir çalışmada gebe ineklerde 24. günde 3,5 ng/ml ölçülen PAGs değerinin gebe olmayan ineklerde 1 ng/ml olarak ölçüldüğünün gösterilmesi (45) PAGs ölçümlerinde hem ELISA hem de RIA'da belli bir oranda background okuması olduğunu işareti olarak değerlendirilebilir.

Vandaele ve ark. (42) tarafından radioimmuno assay (RIA) ile yapılan ovPAGs testinde gebelik teşhisi için minimum değerin 6 ng/ml üzerinde olması gerektiği ifade edilmişti. Ayrıca ovPAGs konsantrasyonu 25. günde 15 ng/ml'ye, 35. günde 20-40 ng/ml'ye ulaşmıştır (46). Sunulan çalışmada ELISA ile ölçülen koyun PAGs'ı için bu değerin 35. günde 23,09 ng/ml olduğu saptanmıştır. Elde edilen plazma PAGs değerleri sunulan çalışma ile benzer olduğu söylenebilir.

Önceki çalışmalarda Karen ve ark. (2) koyunlarda RIA ile PAGs ekspresyonunun en erken 3. haftada %66,7 doğruluk oranıyla 4. haftadan sonra ise %100 doğruluk oranında tespit edilebileceği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise RIA ile 25. günde %98 oranında gebelik teşhisi yapılabildiği gösterilmiştir (46). Barbato ve ark. (44) ise RIA-SrPool kit 18. günde %95, 24. günde %100 doğruluk oranıyla teşhis yapılabildiğini bildirmektedir. Sığır ELISA kiti ile laboratuvarımızda tamamlanan bir bitirme tezinde ise koyunlarda 49. günden sonra doğru gebelik tespiti yapılabileceği ifade edilmektedir (48). Sunulan bu çalışmada ise koyun spesifik PAGs ELISA kiti ile 35. günde gebeliklerin %100 doğru teşhis edilebileceği saptanmıştır. RIA'nın, ELISA yöntemine göre oldukça hassas bir yöntem olmasından dolayı RIA'nın, ELISA'ya oranla koyunlarda çok daha erken gebelik tespitinde kullanılabileceği söylenebilir. Fakat RIA özellikle testin ölçümlerin yapılması için radyoaktif maddeler kullanılması gerektiğinden ELISA'ya göre testi uygulayıcıları açısından önemli riskler içerdiği söylenebilir.

Sığır ve koyunlarda PAGs'ı kodlayan 30'dan fazla gen tespit edilmiştir. Bu yönü ile birden fazla PAGs molekülü olduğu söylenebilir. Ticari olarak üretilen kitteki PAGs molekülünün çeşidi ve hassasiyeti de yukarıda açıklanan gün farklılıklarının bir nedeni olabilir. Benzer şekilde Barbato ve ark. (44), gebeliğin farklı zaman ve periyotlarında koyun plasentasında 11 adet farklı gen bölgesini kodlayan cDNA (ovPAGs-1 ve ovPAGs-11) bölgesi identifiye ettiklerini ve

çalışmada erken gebelik teşhisi için koyun PAGs tespitinde ilk defa farklı antiserumların toplanması (havuz yapılarak) ile farklı PAGs-RIA sistemi geliştirdiklerini ifade etmişlerdir (44).

Sunulan bu tez çalışması kapsamında 0, 18, 21, 25, 28, 35, 55, 85, 113 ve 145. gün bakıldığından kan plazma PAGs değerinin gebelik boyunca artış eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Bu tez çalışmasına benzer olarak Roberts ve ark. (46) yaptığı çalışmada gebe koyunlarda PAGs1'in düzenli olarak 30-120. günler arasında arttığını ifade etmektedirler. Fakat önceki bazı çalışmalar gebelik spesifik protein B'nin hem koyun hem de ineklerde bifazik (önce artma, sonra azalma, tekrar artma) olduğu ifade edilmektedir (37, 47). Bu durumun sunulan PAGs çalışmaları için geçerli olmadığı söylenebilir. Ayrıca PAGs ile progesteron konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişkinin varlığı saptanmasına rağmen yukarıda ifade edildiği gibi PSPB bifazik olmasından dolayı bu ilişki PSPB için tespit edilememektedir. Bu yönü ile plazma progesteron ile PAGs'ın arasındaki bu ilişki ileride yapılacak çalışmalar için plasental ve fetal fonksiyonların sağlık durumlarının incelenmesinde önemli bir markır olabilir (46).

6. SONUÇ

Çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

Buna göre;

1- Sunulan tez çalışması kapsamında koyunların birinci ve ikinci çalışmadaki plazma PAGs değerleri incelendiğinde plazma PAGs değerinin gebelik boyunca artış eğiliminde olduğu söylenebilir.

2- Çalışılan ticari ELISA kiti ile 0. günde PAGs ölçümünde belirli bir değer elde edilmesi gebe olmayan koyunlarda çalışan kitin bir bazal seviyesinin olabileceği akıldan çıkarılmamalıdır.

3- Tüm gebeliğe ait veriler incelendiğinde gebeliğin 55. gününde 0. güne oranla önemli ölçüde bir PAGs artışının olduğu söylenebilir.

4- Yine benzer şekilde artışın 85 ve 113. günlerde benzer olduğu fakat 145. günde önceki günlere oranla çok daha arttığı görülmüştür.

5- İkinci çalışmadan elde edilen PAGs verileri incelendiğinde ise koyunlarda istatistikî olarak bazal değerden farklı olarak gebelik tespitinde bu kitin 35. günden önce artmadığı saptanmıştır. Yine bu sonuçlara göre erken gebelik tanısı için çalışmada kullanılan PAGs kiti ile en erken 35. günde gebelik teşhisi yapılabileceği söylenebilir.

7. KAYNAKLAR

- 1) Ishwar AK. Pregnancy diagnosis in sheep and goats. A review, *Small Rum Res* 1995; 17:37-44.
- 2) Karen A, Kovacs P, Beckers JF, Szenci O. Review article pregnancy diagnosis in sheep: Review of the most practical methods. *Acta Vet Brno* 2001; 70:115-126.
- 3) Alaçam E, Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. 7. Baskı, Ankara: Medisan Yayınları; 2010.
- 4) Erdem H, Sarıbay MK, Gebelik ve Tanı Yöntemleri. In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. 1. Baskı. Malatya: Medipres; 2012, p:567-583.
- 5) Michels H, Vanmontfort D, Dewil E, Decuypere E. Genetic variation of survival in relation to ovulation rate in sheep. *Small Rum Res* 1998; 29:129-142.
- 6) Bazer FW, Guoyao W, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless H. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Molecular Human Reproduction* 2010; 16 (3):135–52.
- 7) Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 2004a; 82-83:537-550.
- 8) Güzeloğlu A. İneklerde gebeliğin maternal kabulü sürecinde anti-luteolizisin moleküler mekanizması. *Vet Bil Derg* 2006; 22:83-88.
- 9) Senger PL. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 1st Edition. Ephrata: The Mack Printing Group Science Press; 1999.

- 10)** Kim S, Choi Y, Spencer TE, Bazer FW. Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003; 58. Doi: 10.1186/1477-7827-1-58.
- 11)** Guzeloglu A, Michel F, Thatcher WW. Differentia! Effects of Interferon-t on the Prostaglandin Synthetic Pathway in Bovine Endometrial Cells Treated with Phorbol Ester. *J. Dairy Sci* 2004b; 87:2032-41.
- 12)** Gordon I. *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*. 1st Edition. Cambridge: CAB International, 1997.
- 13)** Gray CA, Abbey CA, Beremand PD, Choi Y, Farmer JL, Adelson DL, Spencer TE. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus. *Biology of reproduction* 2006; 74(2):383-394.
- 14)** Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Guoyao W. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology* 2008; 8 (3):179-207.
- 15)** Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 2004c; 128:657-668.
- 16)** Bazer FW, Wu G, Johnson GA, Kim J, Song G. Uterine histotroph and conceptus development: select nutrients and secreted phosphoprotein 1 affect mechanistic target of rapamycin cell signaling in ewes. *Biology of Reproduction* 2011; 85:1094-1107.
- 17)** Bowen JA, Burghardt RC. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm. *Anin Cell develop Biol* 2000; 11:93-104.
- 18)** Bell AW, Ehrhardt RA. Regulation macronutrient partitioning between maternal and conceptus tissues in the pregnant ruminant. In: Cronje PB (Editor) *Ruminant*

Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. New York: CAB International 2000; 275-293.

19) Sammim D, Markey B, Bassett H, Buxton D. The ovine placenta and placentitis: A review. *Vet Microbiol* 2009; 135:90-97.

20) Guillomot M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fertil* 1995; 49:39-51.

21) Lucy M, Green J, Poock S. Pregnancy determination in cattle: A review of available alternatives. *Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle, Joplin/Missouri, USA, August 31-September 31, 2011*; pages: 367-76. <http://www.appliedreprostrategies.com/2011/joplin/proceedings/27lucy.pdf>. Son Erişim Tarihi: 04.09.2014.

22) Ulusoy H, Kaymaz M. Koyunlarda Gebelik Tanısı. *Vet Hekim Der Derg.* 2009; 80(1):31- 36.

23) Barbagianni MS, Ioannidi KI, Vasileiou NGC, Mavrogianni VS, Orfanou DC, Fthenakis GC, Valasi I. Ultrasonographic examination of pregnant ewes: from early diagnosis of pregnancy to early prediction of dystocia. *Small Ruminant Research* 2017; 152:41-55.

24) Sarıbay MK. Koyunlarda Real-time Ultrason ile Embriyonik Ölümünün Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2005, Konya.

25) Ward WR. The breeding season and the estrous cycle. In: Morrow DA (Editor). *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders Co; 1986.

- 26)** Taşal İ, Ataman MB, Dinç DA, Ergin A, Erdem H. Koyunlarda gebelik teşhisi amacıyla A ve B-mode real-time ultrason tekniklerinin karşılaştırılması. *Vet Bil Derg* 1995; 41-45.
- 27)** Dinç DA, Erdem H, Taşal İ, Semacan A, Ergin A. Early pregnancy diagnosis in ewes by means of transrektal real-time ultrasonography. *Arch Tierz Dummerstorf* 2001; 44, 1:65-69.
- 28)** Kiyma Z, Kose M, Kaya MS, Atli MO. Early and efficient pregnancy diagnosis in ewes: expression profile of ISG15 mRNA in peripheral blood leucocytes compared to transrectal ultrasonography. *Indian Journal of animal sciences* 2017; 87(1):49-52.
- 29)** Karen A, Beckers JF, Sulon J, Melode SN, Szabados K, Reczigel J, Szenci O. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Theriogenology* 2004; 59:1941-1948.
- 30)** Willard JM, Ruder CA, Sasser RG, Stellflug JN. Ovine pregnancy-specific protein B concentration in the sera of early pregnant and peripartum ewes. *Journal of animal science (USA)*; 1987.
- 31)** Ruder CA, Stellflug JN, Dahmen JJ, Sasser RG. Detection of pregnancy in sheep by radioimmunoassay of sera for pregnancy-specific protein B. *Theriogenology* 1988; 29:905-912.
- 32)** Wallace JM, Aitken RP, Cheyne MA, Humblot P. Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in relation to nutritional regimen, placental mass and pregnancy outcome in growing adolescent ewes carrying singleton fetuses. *J Reprod Fertil* 1997; 109:53-58.

- 33)** Telugu BP, Walker AM, Green JA. Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family-analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes. *BMC Genomics* 2009; 10:185.
- 34)** Sasser RG, Crock J, Ruder-Montgomery CA. Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 1989; 37:109-113.
- 35)** Green JA, Parks TE, Avalle MP, Telugu BP, McLain AL, Peterson AJ, Roberts RM. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology* 2005; 63(5):1481-1503.
- 36)** Haugejorden G, Waage S, Dahl E, Karlberg K, Beckers JF, Ropstad E. Pregnancy associated glycoproteins (PAGs) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring. *Theriogenology* 2006; 66:1976-84.
- 37)** Ranilla MJ, Sulon J, Carro MD, Mantecon AR, Beckers JF. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep. *Theriogenology* 1994; 42:537-45.
- 38)** Ranilla MJ, Sulon J, Mantecon AR, Beckers J-F, Carro MF. Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Rum Res* 1997; 24:125–31.
- 39)** Roberts RM, Ezashi T, Rosenfeld CS, Ealy AD & Kubisch HM. Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. *Reproduction Supplement* 2003; 61:239–251.
- 40)** Yankey SJ, Hicks BA, Carnahan KG, Assiri AM, Sinor SJ, Kodali K, Stellflug JN, Ott TL. Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. *J Endocrinol* 2001; 170:7-11.

41) Kose M, Kaya MS, Aydilek N, Kucukaslan I, Bayril T, Bademkiran S, Kiyima Z, Özyurtlu N, Kayış S.A, Guzeloğlu A, Atli MO. Expression profile of interferon tau-stimulated genes in ovine peripheral blood leukocytes during embryonic death. *Theriogenology* 2016; 85(6):1161-1166.

42) Vandaele L, Verberckmoes S, El Amiri B, Sulon J, Duchateau L, Van Soom A, de Kruif A. Use of a homologous radioimmunoassay (RIA) to evaluate the effect of maternal and foetal parameters on pregnancy-associated glycoprotein (PAGs) concentrations in sheep. *Theriogenology* 2005; 63(7):1914-1924.

43) El Amiri B, Sulon J, Karen A, Alvarez AV, Cognie` Y, Sousa NM, Oxiley AV, Cognie Y, Beckers JF. Measurement of ovine pregnancy-associated glycoprotein (PAGs) during early pregnancy in lacaune sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 2007;42:257–62.

44) Barbato O, Sousa NM, Debenedetti A, Canali C, Todini L, Beckers JF. Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. *Theriogenology* 2009; 72(7):993-1000.

45) Reese ST, Pereira MC, Edwards JL, Vasconcelos JL, Pohler KG. Pregnancy diagnosis in cattle using pregnancy associated glycoprotein concentration in circulation at day 24 of gestation. *Theriogenology* 2017.

46) Roberts JN, May KJ, Veiga-Lopez A. Time-dependent changes in pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in commercial crossbred sheep. *Theriogenology* 2017; 89: 271-279.

47) Thompson IM, Tao S, Branen J, Ealy AD, Dahl GE. Environmental regulation of pregnancy-associated glycoprotein B concentrations during late pregnancy in dairy cattle. *J Anim Sci* 2013; 91:168-73.

48) Yavuz O. Koyunlarda PAGs İle Gebelik Tanısı. D.Ü. Veteriner Fakültesi, Bitirme Tezi, 2014, Diyarbakır.

49) Kaya MS, Kose M, Coban S, Mutlu H, Ucar EH, Guzeloglu A, Atli MO. Profile of Pregnancy Associated Glycoproteins in bovine plasma during postpartum period; is it usable for detecting pregnancy loss?. *Reproduction in Domestic Animals* 2017; 50, 41.



8. ÖZGEÇMİŞ

Adı	UĞUR	Soyadı	UÇAR
Doğum Yeri	DIYARBAKIR	Doğum Tarihi	19.08.1987
Uyruğu	T.C.	Tel	05057108335
E-posta	vethekugurucar21@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans		
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011
Lise	Diyarbakır Atatürk Lisesi	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Veteriner Hekim	Pasur Veteriner Kliniği	2011-2013
Veteriner Hekim	Ergani Gıda, Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü	2013-Halen

Yabancı Dil Sınav Notu

KPDS/ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
51.25								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	78,97559	77,75961	65,01445
(Diğer) Puanı			