

MEHMET AKKÖSE

DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA

YÜKSEL LİSANS

ŞANLIURFA-2018

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI

GEBELİK GLİKOPROTEİNLERİ ÜZERİNE
SENKRONİZASYON PROTOKOLLERİNİN ETKİSİ

YÜKSEL LİSANS TEZİ

Mehmet AKKÖSE

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ÇEBİ ŞEN

ŞANLIURFA

2018

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

GEBELİK GLİKOPROTEİNLERİ ÜZERİNE
SENKRONİZASYON PROTOKOLLERİNİN ETKİSİ

YÜKSEL LİSANS TEZİ

Mehmet AKKÖSE

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ÇEBİ ŞEN

Bu tez Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 17060 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2018

T. C.

HARRAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

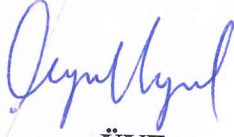
Mehmet AKKÖSE'nin hazırladığı "Gebelik Glikoproteinleri Üzerine Senkronizasyon Protokollerinin Etkisi" konulu çalışma 04/01/2018 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Dölerme ve Suni Tohumlama** Anabilim Dalı'nda *Yüksek Lisans Tezi* olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Prof. Dr. Nafiz YURTAYDIN

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

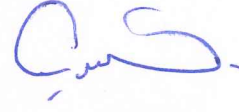
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



ÜYE

Prof. Dr. Ongun UYSAL

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi



ÜYE

Yard. Doç. Dr. Çiğdem ÇEBİ ŞEN

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

16.01/2018

ONAY

Prof. Dr. Mustafa DENİZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ-TEŞEKKÜR

Sunulan çalışmanın amacı sütçü düvelerde iki farklı senkronizasyon yönteminin serum PAG düzeylerine olan etkisini araştırmaktır. Dolaşımdaki PAG düzeyleri değerlendirilerek erken gebelik teşhisi yapılabildiği gibi geç embriyonik/erken fetal kayıpların da gebeliğin erken dönemlerinde belirlenebileceği belirtilmektedir. Serum PAG düzeyini etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin PAG gebelik testi sonuçlarını da etkileyebileceği belirtilmektedir. Büyük sütçü sürülerde, reproduktif yönetimde kullanılan çok sayıda senkronizasyon yöntemi bulunmaktadır. GnRH temelli senkronizasyon protokollerinde, dolaşımdaki progesteron yoğunluğunun düşük olmasından dolayı fertilitenin de düşük olduğu belirtilmiştir. Bizim bilgilerimize göre farklı senkronizasyon yöntemlerinin serum PAG düzeyleri üzerine etkileri ile ilgili bir literatür veri bulunmamaktadır. Çalışmada doğal kızgınlık göstererek tohumlanan hayvanların serum PAG düzeyi ile PGF_{2α} ve GnRH temelli ovulasyon senkronizasyon protokolü (Ovsynch veya cosynch protokolü) uygulanarak tohumlanan hayvanların serum PAG düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Çebi ŞEN'e, Prof. Dr. Nafiz YURDAYDIN'a ve değerli arkadaşım Furkan BAYRAKTAR'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamı destekleyen Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (HÜBAK)'ne ve Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM)'ne, çalışmanın yürütülmesi esnasında yardımlarını esirgemeyen Ceylanpınar Tarım İşletmesi Hayvancılık Şubesi personeline, istatistiksel analizlerin yapılmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Mushap KURU'ya ve Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ile aynı anabilim dalında lisansüstü eğitimlerini sürdüren arkadaşlarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Mehmet AKKÖSE

2018

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ	i
TABLolar DİZİNİ	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sığırlarda Hayvanlarında Erken Gebelik Tanısı	2
2.1.1. Görsel Gebelik Tanı Yöntemleri	2
2.1.2. Gebelik Tanısında Kullanılan Klinik Yöntemler	2
2.1.2.1. Rektal Palpasyon	2
2.1.2.2. Ultrasonografi.....	3
2.1.3. Gebelik Tanısında Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri	3
2.1.3.1. Progesteron.....	3
2.1.3.2. Östron Sülfat	4
2.1.3.3. Erken Gebelik Faktörü (EGF)	4
2.1.3.4. Interferon tau (IFN- τ)	4
2.1.3.5. Dolaşımdaki Mikro RNA'lar (miRNA'lar).....	5
2.1.3.6. Erken Gebelik Tanısında PAG'ların Kullanılması.....	6
2.2. Gebelikle İlişkili Glikoproteinler	7
2.2.1. Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Özellikleri	8
2.2.2. Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin İşlevleri	9
2.2.3. Ruminantlarda PAG Profili ve PAG Düzeyini Etkileyen Faktörler.....	10
2.2.4. Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Reprodüktif Yönetimde Erken Gebelik Tanısı Haricinde Kullanılması	13
2.2.4.1. Geç Embriyonik- Erken Fetal Ölümlerin Erken Tanısı.....	13
2.2.4.2. İkiz Gebeliklerin Tespit Edilmesi.....	14
2.2.4.3. Boğa Fertilitesi	14
2.3. Ovaryum Aktivitelerinin Ekzojen Hormonlarla Kontrolü	15
2.3.1. Prostaglandinler.....	17
2.3.2. GnRH ve Analogları.....	19

3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Etik Kurul Onayı	22
3.2. Hayvan Materyali	22
3.3. Senkronizasyon Protokolleri ve Suni Tohumlama	22
3.4. Kan Örneklerinin Toplanması.....	22
3.5. Gebelik Kontrolleri	23
3.6. Serum PAG Analizi.....	23
3.7. İstatistiki Analiz	24
4. BULGULAR	25
4.1. Senkronizasyon ve Gebelik Sonuçları.....	25
4.2. Serum PAG Düzeyleri.....	26
4.3. Fetal Ölümler	27
5. TARTIŞMA	28
5.1. Senkronizasyon ve Gebelik Sonuçları.....	28
5.2. Serum PAG Düzeyleri.....	30
5.3. Fetal Ölümler	30
6. SONUÇ	32
7. KAYNAKLAR	33
8. EKLER	45
EK-1: ETİK KURUL RAPORU	45
EK-2: İNTİHAL RAPORU.....	46
EK-3: ÖZGEÇMİŞ.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. PAG'ların gebelik boyunca dolaşımdaki yoğunlukları (A) ve Holştayn ineklerde gebeliğin 25-102'nci günleri arasında plazma ve süt PAG profili (B)	11
Şekil 2. Sağlıklı gebelikler ile gebeliğin 28-72 günleri arasında şekillenen embriyonik/fetal ölümlerde, gebeliğin 28'inci gündeki serum PAG yoğunluğu	14
Şekil 3. Bir östrus siklusunda oluşan foliküler dalgalar	16
Şekil 4. Gruplar arasında gebeliğin 28'inci gününde dolaşımdaki PAG (S-N) düzeyi	26
Şekil 5. Gebeliğin 120'nci gününde fetal ölüm tespit edilen hayvanların suni tohumlamadan sonraki 28'inci günde ortalama serum PAG (S-N) düzeyleri	27

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Gebelik glikoproteinleri (PAG) testlerinin sensitivite, spesifite, PTD ve NTD'leri	7
Tablo 2. PGF ve GNRH grupları arasında ST'den sonraki 28'inci günde gebelik ve konsepsiyon oranları	25
Tablo 3. Serum PAG ELISA gebelik testinin epidemiyolojik tanısal karakteristikleri	26
Tablo 4. Gruplar arasında ortalama serum PAG (S-N) değerleri	27
Tablo 5. Gebeliğin 120'nci günde fetal ölüm şekillenen hayvanlar ile sağlıklı hayvanların serum PAG (S-N) düzeyleri	27



KISALTMALAR VE SİMGELER

AP	Aspartik Proteinaz
ECP	Östradiol Sipionat
EGF	Erken Gebelik Faktörü
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
IFN-τ	Interferon-tau
KLH	Keyhol Limpet Hemosiyanin
LH	Lüteinleştirici Hormon
miRNA	mikroRNA
ml	mililitre
ng	nanogram
P4	Progesteron
PAG	Gebelikle İlişkili Glikoproteinler
PGF_{2α}	Prostaglandin F 2 alfa
PSPB	Pregnancy specific Protein-B
RP	Rektal Palpasyon
ST	Suni Tohumlama
USG	Ultrasonografi

ÖZET

Gebelik Glikoproteinleri Üzerine Senkronizasyon Protokollerinin Etkisi

Mehmet AKKÖSE

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Amaç: Sunulan çalışmanın amacı sütçü düvelerde suni tohumlamadan (ST) sonraki 28'inci günde serum PAG düzeyleri üzerine senkronizasyon protokollerinin etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmada 158 baş Siyah Alaca düve kullanılmıştır. Grup 1 (PGF)'e (n=70) 11 gün arayla iki doz prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) uygulandı. Grup 2 (GnRH)'ye (n=61) gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) temelli ovulasyon senkronizasyon protokolü (ovsynch veya cosynch) uygulandı. Grup 3 (Kontrol, n=27) ise çalışma döneminde doğal östrus göstererek tohumlanan hayvanlardan oluşturuldu. Grup 1 ve grup 2 arasında gebelik ve konsepsiyon oranları karşılaştırıldı. Tüm hayvanlardan ST'den sonraki 28'inci günde kuyruk venasından kan alındı. Kan örnekleri 2200 devirde 15 dk sanrifüj edilerek serumları çıkarıldı ve serumlar analiz yapılana kadar $-20^{\circ}C$ 'de saklandı. ST'den sonraki 28 ve 35'inci günlerde ultrasonografi (USG) ile 60 ve 120'nci günlerde ise rektal palpasyon ile gebelik kontrolleri yapıldı. Serum PAG analizi amacıyla, ST'den sonraki 28'inci gün USG bulgularına göre, 61 adet gebe (G1: 20; G2: 20; G3:21) ve 19 adet boş hayvanın (G1: 6; G2: 7; G3:6) serumu kullanıldı. Serum PAG düzeyleri spektrofotometre ile optik yoğunlukları (OD) tespit edilerek değerlendirildi. Testte iki adet negatif kontrol vardı. Örneklerin OD değerlerinden negatif kontrollerin OD değerlerinin ortalaması çıkarılarak S-N (Sample minus negative control) değeri elde edildi. Testteki renk yoğunluğu ile serum PAG düzeyi orantılı olduğu için S-N değerleri PAG düzeyinin göstergesi olarak kullanıldı.

Bulgular: Gebelik oranları Grup 1'de % 28,60; Grup 2'de % 32,80 idi. Konsepsiyon oranları Grup 1'de % 44,40; Grup 2'de % 38,50 idi. Ortalama serum PAG (S-N) düzeyi Grup 1'de $3,34\pm 0,14$; Grup 2'de $3,21\pm 0,13$; Grup 3'te ise $3,37\pm 0,148$ olarak tespit edildi. Gruplar arasında gebelik oranı, konsepsiyon oranı ve ortalama PAG (S-N) düzeyleri bakımından tespit edilen farklılıklar istatiki olarak önemli bulunmadı. ST'den sonraki 60'uncu günde gebeliği pozitif olan hayvanların %5,56'sında gebeliğin 120'nci gününe kadar fetal ölüm şekillendi.

Fetal ölüm tespit edilen hayvanların ST'den sonraki 28'inci günde serum PAG (S-N) düzeyleri $3,79\pm 0,87$ iken sağlıklı gebeliklerde $3,24\pm 0,08$ idi. Fetal ölüm şekillenen ve şekillenmeyen hayvanların serum PAG (S-N) düzeylerinde tespit edilen farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmadı.

Sonuç: Gruplar arasında, ST'den sonraki 28'inci günde, ortalama serum PAG düzeyleri bakımından farklılık bulunmamaktadır. Gebeliğin 60-120'nci günleri arasında fetal ölüm şekillenen ve şekillenmeyen gruplar arasında, gebeliğin 28'inci günündeki serum PAG düzeyleri bakımından farklılık bulunmamaktadır. Ayrıca gebelik ve konsepsiyon oranları bakımından da iki senkronizasyon grubu arasındaki sonuçların benzer olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Cosynch, Düve, Fetal ölüm, Ovsynch, PAG, $PGF_{2\alpha}$

ABSTRACT

Effect of Synchronization Protocols on Pregnancy Associated Glycoproteins

Mehmet AKKÖSE

Department of Reproduction and Artificial Insemination, Master Thesis

Objectives: The objectives of the present study is to investigate the effect of synchronization methods on serum PAG levels on the 28th day after artificial insemination (AI) in the dairy heifers.

Material and Methods: One hundred fifty eight Holstein heifers were used in the study. Two doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) were administered to Group 1 (PGF) (n = 70) for 11 days interval. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) based ovulation synchronization protocols (Ovsynch or cosynch) was applied to Group 2 (GnRH) (n = 61). Group 3 (control, n = 27) was formed from animals that showed natural estrus during the study period. The pregnancy and conception rates were compared between Group 1 and Group 2. Blood samples were collected from all animals on the 28th day after AI from the tail vein. Blood samples were centrifuged at 2200 g for 15 min and the sera were stored at -20 °C until analysis. Ultrasonography (USG) was performed on the 28th and 35th days after AI and rectal palpation at 60 and 120 days for pregnancy diagnosis. For serum PAG analysis, 61 pregnant (G1: 20; G2: 20; G3: 21) and 19 open (G1: 6; G2: 7; G3:6) animals' sera were used according to USG findings on the 28th day after AI. Serum PAG levels were assessed by spectrophotometric determination of optical densities (OD). There were two negative controls in the test. The OD values of the samples were subtracted from the mean OD values of the negative controls to obtain a value of S-N (Sample minus negative control). The S-N values were used as a measure of the PAG level as the color intensity in the test was proportional to the serum PAG level.

Results: Pregnancy rates were 28,60 % in group 1 and 32,80 in group 2. Conception rates were 44,40 % in group 1 and 38,50 in group 2. The mean serum PAG (S-N) level was $3,34 \pm 0,14$ in group 1; $3,21 \pm 0,13$ in group 2 and $3,37 \pm 0,14$ in group 3. The differences between the groups at pregnancy rates, conception rates and mean serum PAG (S-N) levels

were not statistically significant. Fetal deaths occurred in 5,56 % of pregnant animals from 60 to 120 days of gestation. The serum PAG (S-N) levels of the fetal deaths in the 28th days after AI were $3,79\pm 0,87$, while the healthy pregnancies were $3,24\pm 0,08$. Serum PAG (S-N) levels were not statistically different between no loss and fetal death groups

Conclusion: There were no difference the serum PAG levels on the 28th days after AI between three groups. Circulating concentrations of PAG on day 28 of pregnancy were not different between no loss and fetal deaths groups between day 60 to 120 of the pregnancy. In addition, pregnancy and conception rates were found to be similar between the two synchronization groups.

Key Word: Cosynch Fetal death, Ovsynch, PAG, $PGF_{2\alpha}$

1. GİRİŞ

Çiftlik hayvanlarında erken ve kesin gebelik tanısı koymak, iyi bir reproduktif yönetim açısından önemli bir kriterdir (1). Erken gebelik tanısının asıl amacı gebe olmayan hayvanları doğru bir şekilde tespit etmektir. Böylece boş hayvanlar bir an önce tespit edilerek tekrar tohumlanmak için hazırlanır ve iki doğum arası süre kısaltılabilir (2).

Gebelikle ilişkili glikoproteinler (Pregnancy Associated Glycoproteins-PAG), ruminant plasentasından salınarak maternal dolaşıma geçmektedir. Bu nedenle gebelik tanısı için spesifik belirteçlerdir. PAG'ların erken gebelik tanısı yanında, embriyonik/fetal ölümlerin tespit edilmesi, ikiz gebeliklerin belirlenmesi ve plasental fonksiyonların izlenmesi amacıyla da kullanılabilenleri belirtilmektedir (3-5).

Büyük sürülerde östrus tespit etkinliğinin düşük olmasından dolayı, reproduktif alandaki çalışmalar hayvanların daha pratik olarak gebe bırakılabileceği ovulasyon ve kızgınlık senkronizasyon protokolleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) temelli senkronizasyon protokollerinde gebelik oranlarının düşük, erken embriyonik ölüm oranlarının ise yüksek olduğu belirtilmektedir. Bunun nedeni olarak ise suni tohumlamadan sonraki dönemde progesteron artış oranının az olması ve dolaşımdaki progesteron yoğunluğunun düşük olması gösterilmektedir.

Serum veya süt PAG düzeylerini süt verimi (6,7), gebelikte geçen gün sayısı (6), parite (7), ırk (8,9), ikizlik (10,11), fetal cinsiyet, annenin ağırlığı (12), mevsim (8), postpartum dönemde görülen hastalıklar (13) ve embriyonik/fetal ölümler (14-16) gibi çok sayıda faktörün etkilediği belirtilmektedir. Ancak literatürlerde farklı senkronizasyon protokollerinin serum PAG düzeyi üzerine etkileriyle ilgili veri bulunmamaktadır. Sunulan çalışmada sütçü düvelerde 2 farklı senkronizasyon yönteminin serum PAG düzeylerine olan etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Çiftlik hayvanlarında erken ve kesin gebelik tanısı koymak, iyi bir reproduktif yönetim açısından önemli bir kriterdir (1). Gebelik kontrolünün amacı gebe hayvanları tespit etmekten ziyade gebe olmayan hayvanları doğru bir şekilde tespit etmektir (2). Erken gebelik tanısı ile gebe kalmayan hayvanlar bir an önce tespit edilerek tekrar tohumlanmaya hazırlanır ve böylece buzağılama aralığı kısaltılabilir. İdeal bir gebelik testinin, tohumlamayı izleyen ilk östrüstan önce gebelik durumunu doğru bir şekilde ortaya koyması istenir. Ne yazık ki günümüzde, pratik bir şekilde sahada kullanılabilecek, böyle bir test bulunmamaktadır. Gebelik tanısına yönelik geliştirilen birçok test ile gebeliğin 25-40'ıncı günleri arasında gebelik tanısı konulabilmektedir. Böylece tohumlamadan sonraki ikinci östrüstan önce gebe kalmayan hayvanlar tespit edilebilmektedir (17). Bu nedenle erken gebelik tanı yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalar ayrı bir öneme sahip olmaktadır.

2.1. Sığırlarda Hayvanlarında Erken Gebelik Tanısı

2.1.1. Görsel Gebelik Tanı Yöntemleri

Tohumlanan/çiftleşen hayvanların bir sonraki siklusta tekrar kızgınlık göstermesi gebe olmayan hayvanların tespit edilmesindeki en ucuz ve kolay yöntemdir. Görsel gebelik tanı yöntemlerinin doğruluk oranları düşüktür. Bu nedenle diğer gebelik tanı yöntemleriyle desteklenmelidir (2,3).

2.1.2. Gebelik Tanısında Kullanılan Klinik Yöntemler

2.1.2.1. Rektal Palpasyon

Rektal palpasyon (RP), süt sığırlarında kullanılan en eski ve en yaygın gebelik tanı yöntemidir (18). RP ile erken gebelik tanısı, hekimin tecrübesine ve gebelik kontrolü yapılacak hayvanın yaşı ve büyüklüğüne bağlı olarak suni tohumlamadan (ST) sonraki 30'uncu günden itibaren yapılabilmektedir (17). Amniyon kesesinin palpasyonu veya koryoallantoik membranın başparmak ile işaret parmağı arasında kaydırılması ile gebelik doğrulanır (1). Gebe kornudaki fetal membranların kayması gebeliğin yaklaşık 35'inci gününde tespit edilebilir. Plasentomların palpasyonu en erken gebeliğin 75-80'inci günlerinde, fetusun palpasyonu ise gebeliğin ikinci ayından itibaren mümkündür (17). RP ile erken gebelik tanısının en önemli

dezavantajı embriyonik ölümlere neden olmasıdır (1). Ayrıca gebeliğin 40'inci gününden önce amniyon kesesinin palpasyonunun atrezia koli gibi anomalilere neden olabileceği belirtilmektedir (19). Bunun yanında RP tekniği ile fetal membran kaymasının nazikçe kontrol edilmesinin embriyo/fetus canlılığını etkilemediğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (20).

2.1.2.2. Ultrasonografi

Ultrasonografi erken gebelik tanısı yanında, ikiz gebeliklerin tespit edilmesi, fetal cinsiyetin belirlenmesi, fetal yaş tayini, fetusun canlılığının belirlenmesi, embriyonik ölümlerin tespit edilmesi ve uterus ve ovarium patolojilerinin belirlenmesine de olanak tanır (21,22). Ultrasonun görüntü kalitesindeki gelişmeler, taşınabilir ultrasonografi ekipmanlarının piyasaya sürülmesi ve farklı fiyat seçeneklerinin sunulması ile ultrasonografi veteriner hekimliğin vazgeçilmez ekipmanları arasındadır (22). Ultrasonografinin en önemli avantajları hayvanların reproduktif fizyolojilerini etkilemeden ve embriyo/fetus üzerinde herhangi bir yan etki oluşturmadan reproduktif kanalın tekrarlayan muayenelerine izin vermesidir. Sığırlarda saha koşullarında transrektal ultrasonografi ile suni tohumlamadan sonraki 26'ncı günden itibaren hızlı ve doğru bir şekilde gebelik tanısı konulabilir. Ultrasonografinin sensitivitesi ST'dan sonraki 26'ncı günden önce %50'den düşüktür ancak 26'ncı günden sonra %95'ten daha fazla ve 29'uncu günden sonra hemen hemen %100'dür (21,23).

2.1.3. Gebelik Tanısında Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri

2.1.3.1. Progesteron

Progesteron, pubertastan sonra her östrus siklusunun spesifik dönemlerinde salınan ve gebeliğin devamı için gerekli olan dişi steroid hormondur. Korpus luteum tarafından üretilir ve kana salınır, aynı zamanda süte de geçer. Kan ve süt progesteron düzeyi fonksiyonel bir korpus luteumun güvenilir bir göstergesidir. Progesteron düzeyi gebe olmayan hayvanlarda 1ng/ml'nin altında iken; gebelerde 2-11 ng/ml arasında değiştiği belirtilmektedir (24). Progesteron ölçümü halen, sığırlarda gebeliğin en erken olarak tespit edilebilmesine yardımcı olan bir tanı yöntemidir (1). Sığırlarda östrus siklusunun 21 veya 22'nci günlerinde (18-24 günler arası), gebe kalmayan hayvanlar tespit edilebilir (24).

2.1.3.2. Östron Sülfat

Östron sülfat ise plasentanın fetal/kotiledonlar bölümü tarafından üretilen ve konjuge edilen gebelikle ilişkili bir hormondur (25). Östron sülfat fetal sıvılarda ve maternal plazmada en fazla bulunan östrojen türüdür (26). Plazma östron sülfat düzeyi, plasenta fonksiyonunun ve bununla ilişkili olarak da fetal gelişimin iyi bir göstergesidir (27,28). Plazma veya süt östron sülfat düzeyi fetal sayı, ırk, laktasyon sayısı, ağırlık ve fetal cinsiyet gibi faktörlerden etkilenmektedir (12,28). Östron sülfat ölçümü ile gebelik tanısı sığırlarda gebeliğin 100'üncü gününden sonra yapılabildiği (17) için erken gebelik tanısına olanak sağlamamaktadır.

2.1.3.3. Erken Gebelik Faktörü (EGF)

Erken gebelik faktörü (EGF), gebelikle ilişkili ve immunsupresif etkili bir proteindir (29,30). Fertilizasyondan sonraki 6-24 saat içinde gebe dişilerin serumunda tespit edilmekle birlikte embriyo ölümü veya embriyonun uterustan uzaklaştırılmasından 24-48 saat sonra da ortadan kalkar (1). Bu nedenle, EGF embriyo canlılığının güvenilir bir indikatörüdür (31). EGF'nin EGF-A ve EGF-B olmak üzere iki bileşeni bulunmaktadır. EGF-A oviduktan salgılırken, EGF-B ovaryumdan salgılır. EGF-B üretimi fertilize ovumdan gelecek bir sinyale (ovum faktörü) bağlıdır (32). EGF immunmodülatör etkili bir protein olup, anne tarafından antijen olarak algılanan embriyoyu, maternal immun yanıtı baskılayarak korumaya yardımcı olur (33). EGF Rozet-inhibisyon testi (Rosette Inhibition Test-RIT) ile tespit edilmektedir. RIT testinin sütçü sığırlarda erken gebelik tanısı ve embriyonik ölümlerin tespiti amacıyla kullanılabileceği belirtilmektedir (34). Ancak RIT testinin saha koşullarında uygulanması pratik değildir (35). EGF'nin sütçü sığırlarda erken gebelik yöntemi olarak kullanılabilmesi için ticari bir test kiti geliştirilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda bu test kitinin güvenilir bir gebelik tanı yöntemi olmadığı sonucuna varılmıştır (33). Henüz EGF'nin tespit edilebileceği pratik bir yöntem bulunmamaktadır.

2.1.3.4. Interferon tau (IFN- τ)

Interferon-tau (IFN- τ)'nun ise, gebeliğin anne tarafından kabulü sürecini başlatan bir sitokin olduğu bilinmektedir. Gebeliğin anne tarafından tanınması ve devam etmesi embriyonun trofoblast hücrelerinden salınan proteinler vasıtasıyla başlatılır. Bu spesifik trofoblast proteinlerinden birinin interferon proteinleri ile homolog olduğu tespit edilmiş ve daha sonra Interferon-tau (IFN- τ) olarak tanımlanmıştır (36). Sığırlarda IFN- τ , embriyonun

blastosit safhasından implantasyon aşamasına kadar trofektoderm'in mononükleer hücrelerinden salgılanır (1,36). INT- τ salınımı geçicidir. Gebeliğin 20-24'üncü günlerinde maksimum düzeyde olan INT- τ , gebeliğin 30'uncu gününde ortadan kalkar. Kan veya idrara da geçmez. Bu nedenlerden dolayı gebelik tanı yöntemi olarak kullanılmamaktadır.

2.1.3.5. Dolaşımdaki Mikro RNA'lar (miRNA'lar)

Gelecekte sütte bulunan gebelik belirteçlerini algılayabilen, sağım sistemine entegre edilmiş sensörlerin gebelik tanısı amacıyla kullanılması öngörülmektedir. Bunun için yeni gebelik belirteçlerinin keşfedilmesi yanında mevcut gebelik belirteçlerinin sütteki düzeylerini algılamaya yönelik yeni teknolojiler üzerinde çalışılmaktadır (2). Erken gebelik tanısı amacıyla yeni biyomarkırların tespit edilmesi ile ilgili çalışmalar içinde geleceğe yönelik en umut verici adayların mikroRNA'lar (miRNA) olduğu belirtilmektedir (4).

Yaşamsal süreçleri kontrol eden yollarla ilgili tüm bilgiler, tüm vücut hücrelerinde bulunan deoksiribonükleik asit (DNA) moleküllerinde saklanır. DNA molekülleri, transkripsiyon işlemi ile RNA elementlerine dönüştürülür. Protein kodlayan genler (ekzonlar) RNA polimeraz enzimleri tarafından haberci RNA'lara (mRNA'lar) aktarılır. Diğer RNA ara türlerinin (tRNA, rRNA, snRNA, siRNA, snoRNA, miRNA vb.) sentezi ve işlevi de nükleer bilginin başarılı yorumlanması için aynı derecede önemlidir. Protein kodlamadaki temel işlevlerine dayanarak, messenger RNA (mRNA) kodlama yapan (coding) RNA olarak diğer RNA türleri (tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, siRNA, miRNA vb.) ise kodlama yapmayan (non-coding) RNA'lar (ncRNA) olarak bilinirler. Kodlama yapmayan RNA'ların çeşitli işlevsel yolların düzenlenmesinde etkili oldukları belirtilmektedir. Bununla birlikte, ncRNA moleküllerinin spesifik fonksiyonları hakkında hala çok az şey bilinmektedir. MikroRNA molekülleri, çeşitli yaşam süreçlerinde son derece önemli olan bu kodlama yapmayan, fakat düzenleyici moleküllerden biridir (37).

Mikro RNA'lar, küçük, endojen, yaklaşık 19-25 nükleotid uzunluğunda, ncRNA moleküllerinden oluşan bir ailedir (37). Mikro RNA'lar, plazma zarına bağlı ekstraselüler kesecikler içinde, birçok doku türünün hücrelerinden salınır (4) ve serum, amniyotik sıvılar, idrar, salya ve süt gibi biyolojik sıvılarda bulunur (38). Kanserden kalp damar hastalıklarına kadar birçok hastalığın belirteci olarak kullanılmaya başlanan mikroRNA'ların (39), hayvanlarda potansiyel gebelik biyomarkırı olarak kullanılabileceği ile ilgili kanıtlar da

bulunmaktadır (40,41). Memelilerde oositlerinin büyümesi ve olgunlaşması, erken embriyonik gelişim, embriyonik kök hücrelerin farklılaşması ve embriyonun implantasyonunda mikroRNA'ların rol oynadığı belirlenmiştir (42). Dolaşımdaki mikroRNA düzeylerindeki değişikliklerin, sığırlarda gebeliğin 8'inci günü kadar erken bir dönemde tespit edilebileceği belirtilmektedir (43). Gebelik tanısı için en etkili mikroRNA'ları belirlemek ve bunları biyolojik sıvılarda tespit etmek için daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır (4).

2.1.3.6. Erken Gebelik Tanısında PAG'ların Kullanılması

Sığırlarda dolaşımdaki PAG yoğunluğu gebeliğin 15'inci gününden 35'inci güne kadar artmaktadır ancak PAG testi ile gebelik tanısı en erken ST'den sonraki 26-30'uncu günlerde yapılabilmektedir. Gebeliğin 26'ncı gününden önce ineklerdeki plazma PAG düzeyleri farklılık gösterebildiği için gebeliğin güvenilir bir göstergesi değildir (2). PAG1 (PBSB) maternal dolaşımda gebelik boyunca tespit edilmesinden dolayı, erken gebelik tanısı amacıyla en çok ilgi duyulan PAG türü olmuştur. Ancak Green ve ark (44), gebelik tanısı amacıyla PAG1'i kullanmanın iki önemli olumsuz yönü olduğunu bildirmişlerdir. Bunlardan ilki gebeliğin ilk ayında dolaşımdaki PAG1 yoğunluğunun düşük olması ve değişkenlik göstermesi nedeniyle gebeliğin riske atılmasıdır. İkinci olumsuz yönü ise PAG1'in yarılanma ömrünün uzun olması (~8 gün) nedeniyle, embriyonik ölümlerden veya doğumdan sonra uzun süre dolaşımda kalmasıdır. Bu iki önemli olumsuzluk nedeniyle erken gebelik tanısı amacıyla diğer PAG'ların kullanılmasının daha güvenilir olduğu belirtilmiştir (44). PAG'lar RIA (radioimmunoasay) (45) veya ELISA (enzim linked immunosorbent assay) (46,47) teknikleriyle tespit edilebilir. Sütçü ve etçi sığırlarda (48-50) kan serumu, süt veya tam kan örnekleri kullanılarak (51-53) ticari PAG testleri ile erken gebelik teşhisi yapılabilmektedir. Kan veya sütte PAG'ları tespit eden gebelik testlerinin doğruluğunun % 92-100 arasında değiştiği ve sonuçlarının genellikle güvenilir olduğu belirtilmektedir (48,50). Tablo 1'de PAG elisa testlerinin sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri verilmiştir.

Tablo 1. Gebelik glikoproteinleri (PAG) testlerinin sensitivite, spesifite, PTD ve NTD'leri

Referans	ST'den sonra geçen gün	Test	Sensitivite	Spesifite	PTD	NTD
Zoli ve ark (45)	22-30	RIA (kan PAG)	98,8	87,5	93	97,9
Silva ve ark (50)	27	ELISA (kan PAG)	94-96	92-97	90-98	97-98
Romano ve Larson (49)	28-35	ELISA (PSPB)	94-97	94-96	92-95	95-98
LeBlanc (51)	>60	ELISA (süt PAG)	99,2	95,5	99,8	80,8
Ricci ve ark (7)	32	ELISA (süt PAG)	100	87	84	100
		ELISA (kan PAG)	98	83	79	99

PTD: Pozitif tahmini değer
NTD: Negatif tahmini değer
ST: Suni tohumlama

2.2. Gebelikle İlişkili Glikoproteinler

PAG'lar, Cetartiodactyla (Ruminantia, Cetacea, Suidae) takımı içindeki türlerin plasentasından bol miktarda salınan (54), plasental antijenler olarak tanımlanmıştır (55). İlk tanımlandıklarında pregnancy-specific protein B (PSPB) (56), pregnancy-specific protein 60 (PSB-60) (57) ve SBU-3 antijen (58) gibi çeşitli isimlerle de adlandırılmışlardır.

Embriyonun trofoblast hücreleri tarafından üretilen PAG'lar maternal dolaşıma geçmektedir. Ruminant plasentasını synepitheliochorial tip plasentadır. Bu plasenta tipinde koryon epitelleri ve endometriyum epitelleri birbiriyle sıkıca bağlıdır. Ruminant koryon epitelleri mononükleer ve binükleer olmak üzere iki tip hücre içerir. Binükleer hücreler implantasyon aşamasında mononükleer trofoblast hücrelerinden farklılaşır ve oluşumları sırasında içlerinde birtakım proteinlerin bulunduğu granüller sentezlerler. Plasentasyon aşamasında binükleer hücreler, trofoblasttan maternal endometriyal epitel hücrelerine doğru göç ederler ve endometriyal hücreler arasına yerleşirler. Bazı binükleer hücreler uterus epitel hücreleriyle birleşerek trinükleer hibrit hücrelerini oluşturur. Endometriyuma yerleşen binükleer ve trinükleer hücreler içerdiği salgı granüllerini maternal doku içerisine salırlar. Bu salgılar PAG'ların büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır (59,60). Embriyonun uterusu implantasyonu aşamasında başlayan PAG salınımı, gebelik boyunca devam eder (35,55). PAG'lar gebelik tanısı için spesifik belirteçlerdir. PAG'lar erken gebelik tanısı yanında, embriyonik/fetal ölümlerin tespit edilmesi, ikiz gebeliklerin belirlenmesi ve plasental fonksiyonların izlenmesi amacı ile de kullanılabilen belirtilmektedir (2-4).

2.2.1. Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Özellikleri

PSPB sığırlarda tanımlanan ilk gebelik proteindir (35). Butler ve ark (56), fetal membran ekstraktlarından izole ettikleri iki adet proteini, gebelik spesifik protein A ve B (PSPA/PSPB) olarak adlandırmıştır. PSPB daha sonra diğer PAG'ların da tanımlanmasıyla PAG-1 olarak adlandırılmıştır. PSPB'nin plasenta spesifik olduğu buna karşın PSPA'nın ise alfa-fetoprotein olduğu belirtilmiştir (56). Alfa-fetoprotein fetal karaciğer ve vitellüs kesesi tarafından üretilen, 68 kDA molekül ağırlığında embriyo spesifik bir glikoproteindir (61). Zoli ve ark (62), 1991 yılında "bovine pregnancy associated glycoprotein" (PAG) olarak adlandırdıkları diğer gebelik spesifik proteinleri izole etmişlerdir. Sonraki çalışmalarda sığır (63), koyun (63-65), keçi (66,67), manda (68), zebu sığırları (69), deve (70), lama (71), alageyik (72) ve beyaz kuyruklu geyik (73) gibi evcil ve yabani ruminantlardan da yeni PAG'lar izole edilmiştir.

Gevişgetirenler alt takımında yer alan türlerde PAG'lar büyük bir aileyi kapsamaktadır (63). Sığırlarda 22 PAG gen ailesi tespit edilmiştir (74). Hughes ve ark (75) tarafından PAG'lar eski PAG'lar (ancient PAGs) ve modern PAG'lar olmak üzere iki ayrı gruba ayrılmıştır. Eski PAG'ların yaklaşık 83 milyon yıl önce, modern PAG'ların ise 54 milyon yıl önce ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (75). Eski PAG'lar genellikle kotiledonların binükleer ve mononükleer trofoblast hücrelerinden salınırlar ve salınımları gebelik boyunca devam eder. Modern PAG'lar ise öncelikli olarak binükleer hücrelerden salınır ve salınımları gebelik süresince değişiklik gösterir (44).

PAG'ların aspartik proteinaz (AP) ailesinin inaktif üyeleri olduğu belirtilmektedir (76-79). AP ailesi, pepsin ve kimozin gibi gastrik enzimleri, katepsin D gibi lizozomal enzimleri ve kan basıncı ve tuz homeostazisini sağlamada kritik bir enzim olan renin enzimini içeren bir gruptur (80,81). PAG'ların molekül ağırlıkları genellikle yüksek değerlerdedir ve oldukça değişkenlik göstermektedir. Western blot analizinde 48, 60, 67, 65, 78, ve 85 kDa bantlar verdikleri belirtilmektedir (82). Yapılan çalışmalarda peptid -N-glikanaz-F (PNGase F) enzimi uygulanarak N-glikan yapısı uzaklaştırılan PAG'ların hepsinin yaklaşık 37 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu belirtilmiştir. Buna göre PAG'ların molekül ağırlığını belirleyen asıl faktörün N-glikan olduğu ve N-glikanın PAG'ların yarılanma ömrü ile de ilişkili olabileceği belirtilmektedir (82).

2.2.2. Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin İşlevleri

Henüz PAG'ların işlevleri tam olarak açıklanabilmiş değildir. Bununla birlikte, PAG'ların sığırların ve diğer ilgili türlerin plasentasından salınma şekilleri ve bazı PAG'ların proteolitik aktivitesi, gebelik sırasındaki PAG'ların işleviyle ilgili bilgiler sağlayabilir. Örneğin bovine PAG-2 ve porcine PAG-2 gibi çok sayıda PAG, plasentanın maternal-fetal ara yüzeyine salınır (83). Bovine PAG-2 ve porcine PAG-2'nin proteolitik etkinliğe sahip oldukları bilinmektedir (84,85). Bu PAG'ların trofoblast-uterus epitelleri arasında protein döngüsü ve yapımında görev aldıkları (83), preteolitik aktiviteleri ile bazı biyomolekülleri ve büyüme faktörlerini aktive ettikleri (86,87) düşünülmektedir. Proteaz olarak hareket etme yeteneğinden yoksun bazı PAG'lar da vardır ki bunların uterus-fetus ara yüzeyinde peptit bağlanması gibi başka bir role sahip olabileceği belirtilmektedir. PAG'lar, substrat bağlayıcı yarıklar vasıtasıyla peptit ligandları ile etkileşime girebilirler (88). Böylece PAG'lar, maternal-fetal ara yüzeydeki diğer proteinlerle veya transmembran reseptörleri ile etkileşime girerek maternal-fetal ara yüzeye yerleşebilirler. Enzimatik etkili PAG'lar proteolitik etkinliklerini nispeten daha düşük pH'da gösterirler (84,85). Proteinazların maternal-fetal ara yüzeye yerleşmesi, ara yüzün mikro ortamının pH'sının düştüğü, doğum sonrasında karunkül üzerindeki kriplerden kotiledonların ayrılmasını kolaylaştırabilir (83).

PAG'ların maternal immun sistem üzerinde, immunsupresif faktörler olarak rol oynayabileceği belirtilmektedir (89). Örneğin sığır kemik iliği hücrelerine PAG1/PSPB uygulaması, hemopoietik hücre proliferasyonunda düşmeye neden olduğu belirtilmiştir (90). Bir başka çalışmada ise sığır endometriyal hücrelerine PAG1/PSPB uygulamasının, granülosit kemotaktik protein 2 (GCP2) salınımını indüklediği belirtilmiştir. Bu kemotaktik sitokinin erken implantasyona bağlı adezyon, yangı ve anjiyogeneze aracılık etmede etkili olabileceği belirtilmiştir (91). Ayrıca PAG'ların uterus serpinlerini bağlayabildikleri in vitro olarak gösterilmiştir (92). Uterus serpinlerinin immunmodülatör etkinliğe sahip oldukları bilinmektedir (54). Doğum sürecinde maternal dolaşımında en yüksek düzeye ulaşan PAG'ların, ineklerde immun fonksiyonların baskılanmasında doğrudan veya dolaylı etkilerinin olabileceği belirtilmektedir (54,89).

Koyun ve sığırlarda PAG1/PSPB'nin luteolitik aktivite üzerinde de etkinliğe sahip olabileceği belirtilmektedir. Örneğin PSPB uygulamasına karşı sığır luteal doku hücrelerinde prostaglandin E₂ (PGE₂) üretiminde artış olduğu belirtilmektedir. PGE₂ ruminantlarda

luteotropik ve antiluteolitik etkinliğe sahiptir. Luteotropik bileşik olarak işlev gören bir protein luteal dokudan progesteron salınımında artışa neden olabilir (93-95). Bunun yanında luteal hücrelere bovine PSPB uygulamasının progesteron yoğunluğunu arttırdığı rapor edilmiştir. Ancak bu artış sürekli değildir. İlginç bir şekilde, bovine PSPB uygulaması sonucunda sadece östrus siklusundaki (14'üncü gün) korpus luteumda progesteron artışı olduğu; gebeliğin 200'üncü günündeki korpus luteumda ise herhangi bir artış şekillenmediği belirtilmiştir (94,95).

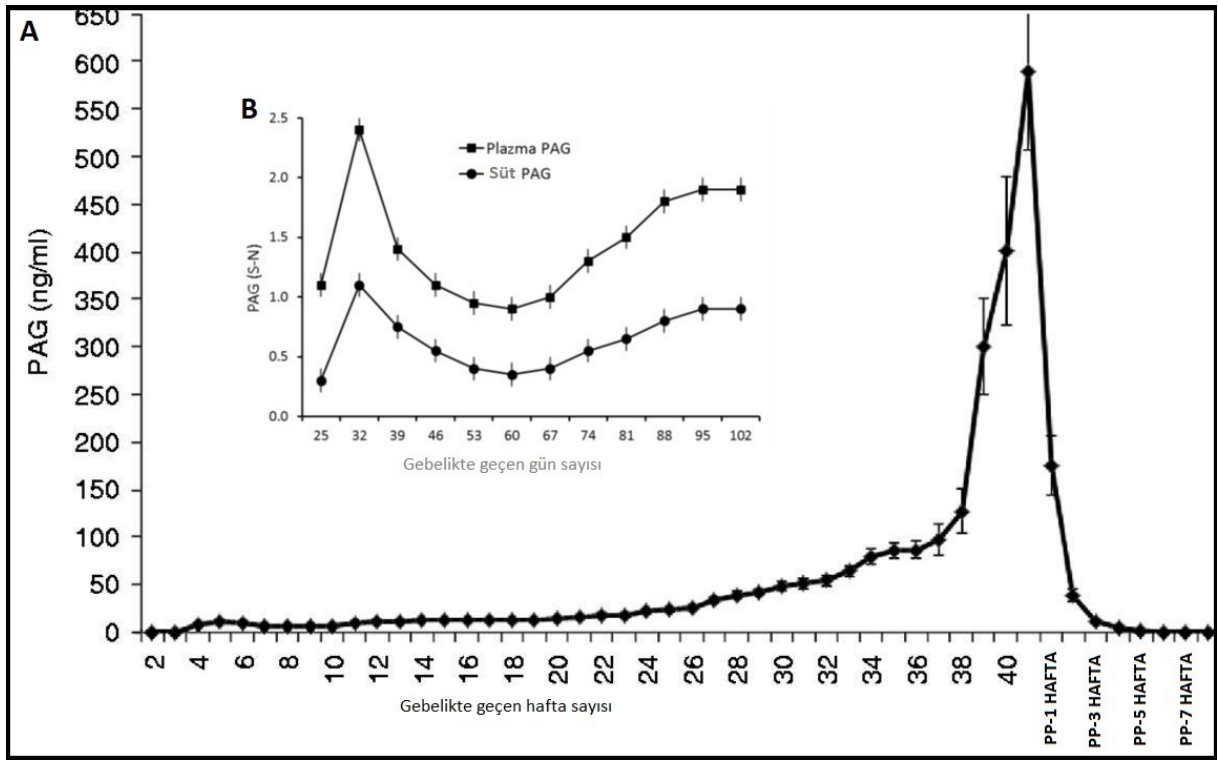
Egen ve ark (96), PAG'lara karşı aşılanan koyunlarda gebelik boyunca serum PAG yoğunluğunun gebelik oluşumu ve sürekliliği üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla PAG'lar pepstatin affinite kromatografi ile ayrıştırılmış ve immunojenik bir protein olan keyhol limpet hemosiyanin (KLH) (PAG-KLH) ile konjuge edilmiştir. Koyunlar PAG-KLH ile ve sadece KLH (kontrol) ile aşılanarak koçlara aşım yaptırılmıştır. Kan örnekleri 0, 10, 15 ve 25'inci günlerde ve gebelik boyunca da haftalık olarak toplanmıştır. PAG-KLH ile aşılanan koyunların bir kısmında zayıf immun yanıt oluşmuş bazıları ise yüksek yanıt oluşmuştur. KLH'ya karşı aşılanan hayvanlarda ise yüksek immun yanıt oluşmuştur. PAG-KLH grubundaki zayıf reaksiyon oluşan hayvanlarla kontrol grubundakiler arasında serum PAG profilinde farklılık tespit edilmemiştir. PAG-KLH grubundaki yüksek immun yanıt oluşturan koyunlarda ise PAG profilinin belirgin derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre aşılı hayvanlarda serum PAG profilindeki düşüş ile gebelik oranı, kuzuların doğum ağırlığı veya ikizlik yönünden bir ilişki tespit edilememiştir. Bu bulgulara göre PAG'ların gebeliğin oluşumu ve sürdürülmesinde etkilerinin olmadığı görülmekte olsa da gebelik oluşumundaki rollerinin maternal-fetal arayüzeyde gerçekleştiği, plasenta dışındaki alanlardaki etkinliklerinin sekonder olarak kaldığı belirtilmiştir.

Tür içinde ve türler arasındaki PAG çeşitliliği dikkate alındığında, PAG'ların plasental gelişim ve işlev açısından gebelik süreci ve sonrasında çok sayıda işlevlerinin olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, çift tırnaklılarda gebelikte PAG'ların işlevini daha iyi tanımlamak için daha fazla deneysel çalışma yapılması gerektiği açıktır (54).

2.2.3. Ruminantlarda PAG Profili ve PAG Düzeyini Etkileyen Faktörler

Sığırlarda, PAG'lar gebeliğin yaklaşık üçüncü haftasında maternal dolaşımında tespit edilir (97). Gebeliğin 4'üncü haftasında hızlı bir şekilde yükselmeye başlayan serum PAG

yoğunluğu, gebeliğin yaklaşık 5'inci haftasında pik düzeye ulaşır ve 8-10'uncu haftalar arasında azalır. Daha sonra gebeliğin yaklaşık 240'uncü gününe kadar yavaş yavaş yükselir. Doğum döneminde ise maksimum yoğunluğa ulaşır ve doğumdan sonraki birkaç hafta boyunca dolaşımda kalır (Şekil 1A) (7,46,57,98). Plazma PAG düzeyleri, sütteki düzeyleri ile kıyaslandığında yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Şekil 1B) (7). PAG'ların yarılanma ömrünü belirlemek için benzer birkaç çalışmada, indüklenerek oluşturulan geç embriyonik ölümlerde dolaşımdaki PAG profili izlenmiştir (15,99). PAG'ların ortalama yarılanma ömrününün $35,8 \pm 21,9$ saatten (15) 2,7-3,9 güne (99) kadar değişim gösterdiği belirtilmiştir.



Şekil 1. PAG'ların gebelik boyunca dolaşımdaki yoğunlukları (A) (54) ve Holştayn ineklerde gebeliğin 25-102'nci günleri arasındaki plazma ve sütteki PAG profili (B) (7).

Serum veya sütte PAG profilinin takip edildiği çalışmalarda gebelikte geçen gün sayısının plazma PAG düzeyi üzerine belirgin derecede pozitif etkisinin olduğu belirtilmiştir (6,7). Plazma PAG düzeylerinin düvelerde laktasyondaki ineklere göre (100) ve ilk laktasyondaki ineklerde laktasyon sayısı daha fazla olan ineklere göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (7,13). Ancak bu verilerin aksine yüksek verimli Holstein-Friesian ırkı ineklerde laktasyon sayısının PAG düzeyi üzerine önemli bir etkisinin olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (6,8).

Serrano ve ark. (2009) (8), Holstein-Friesian veya Limousin spermaları ile tohumlanan, yüksek verimli Holstein-Friesian ırkı ineklerde, Limousin sperması kullanılmasının plazma PAG-1 düzeyini önemli ölçüde arttırdığını belirtmiştir. Bir başka çalışmada gebeliğin 4. haftasında Borana ırkı sığırlarda serum PAG düzeyi 1,5-5,5 ng/ml iken melez sığırlarda (Borana X Holstein-Friesian) 2,1-4,4 ng/ml olduğunu belirtilmiştir (12). Mercadante ve ark (9) da Bos indicus genetiğine sahip ineklerin (Brahman ve Brangus) Bos taurus genetiğine sahip ineklere (Angus) göre, PAG yoğunluğunun daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu verilere göre farklı ırklar arasında plazma PAG yoğunluğu arasında önemli bir farklılık bulunmaktadır.

Dolaşımdaki progesteron düzeyi ile PAG düzeyi arasında bir ilişki bulunup bulunmadığı ile ilgili veriler farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalarda plazma progesteron yoğunluğunun PAG düzeyine önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (6,8). Ancak dolaşımdaki PAG yoğunluğu ile serum progesteron düzeyi arasında korelasyon bulunduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur (102-104).

Gebeliğin 28-120 günleri arasında şekillenen embriyonik/fetal ölümlerde, gebeliğin yaklaşık 4-5'inci haftalarındaki plazma ve süt PAG düzeylerinin, gebeliği devam eden hayvanlara göre daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür (105-107). Bununla birlikte bazı boğalardan elde edilen gebeliklerde, boğanın bireysel özelliğinden dolayı, embriyonik ölüm oranları fazla olduğu için PAG yoğunluklarının daha düşük olduğu belirtilmektedir (14,16,108).

Süt verimi gebe ineklerde serum veya sütteki PAG yoğunluğunu olumsuz etkileyen faktörlerden biridir (6,7). Bunun nedenlerinden biri, süt veriminin artmasıyla embriyo tarafından üretilen PAG düzeyinin azalması olarak belirtilmektedir (7). Bu verilerin aksine Serrano ve ark. (2009) (8), yüksek verimli Holstein-Friesian ırkı ineklerde gebelik boyunca PAG-1 düzeyini takip ettikleri bir çalışmada süt veriminin serum PAG-1 düzeyine etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Lobago ve ark. (2009) (12), fetal cinsiyet, annenin ağırlığı ve buzağının doğum ağırlığının PAG düzeylerini etkilediği belirtmektedir. Ancak bir başka çalışmada plazma PAG-1 düzeyi üzerine fetal cinsiyet farklılığının herhangi bir etkisinin olmadığı belirtilmektedir (8). Breukelman ve ark (109), embriyo transferi yapılan ineklerde, in vivo

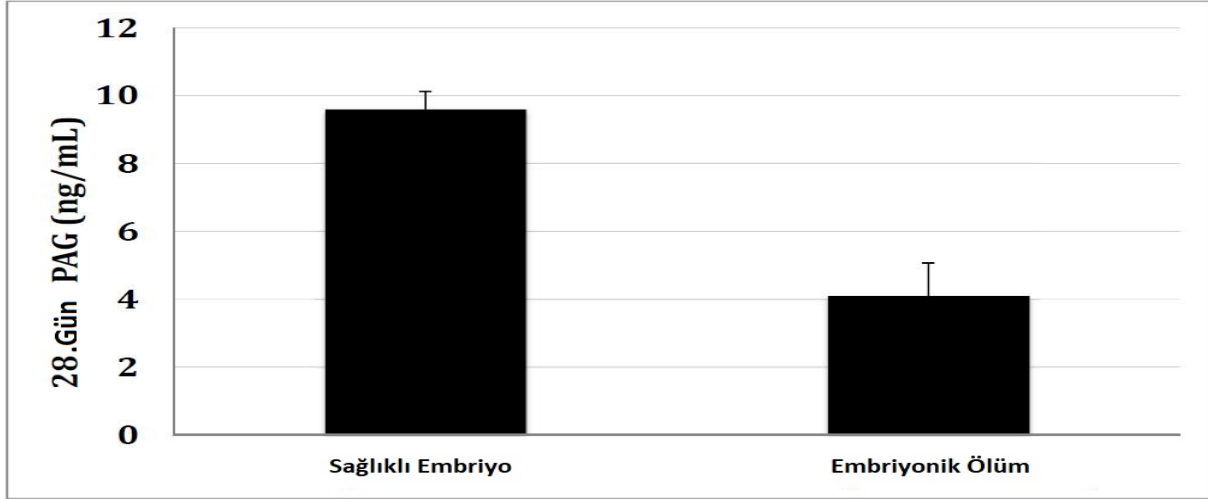
veya in vitro yöntemle embriyo üretiminin gebeliğin ilk 119 günü boyunca plazma PAG düzeyi üzerine etkilerini araştırmışlar, sonuç olarak embriyo üretim yönteminin plazma PAG profilini etkilemediğini belirtmişlerdir. Hayvanların gebe kalma yaşının plazma PAG düzeyini belirgin olarak etkilediği belirtilmiştir (109). İki veya daha fazla tohumlama yapılan hayvanlarda tek tohumla gebe kalanlara göre PAG düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (13). Farklı mevsimlerde gebe kalan (sıcak dönem: Mart-Kasım, serin dönem: Aralık-Şubat) yüksek verimli Holstein-Friesian ırkı ineklerde, serin dönem boyunca şekillenen gebeliklerde, sıcak döneme göre plazma PAG-1 düzeyinin önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir (8). Kuru dönem boyunca sıcak stresine maruz kalan ineklerde gebeliğin son bir haftalık döneminde PSPB'nin belirgin derecede düşük olduğu belirtilmiştir (110). Ayrıca portpartum dönemde klinik metritis, metabolik problemler veya abomazum deplasmanı görülen hayvanlarda plazma PAG düzeylerinin daha yüksek olduğu (ancak klinik hastalık geçiren hayvanların embriyonik ölüm riskinin arttığı) belirtilmiştir (13).

2.2.4. Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Reprodüktif Yönetimde Erken Gebelik Tanısı Haricinde Kullanılması

2.2.4.1. Geç Embriyonik- Erken Fetal Ölümünün Erken Tanısı

PAG'ların işlevleri henüz tam olarak bilinmemesine rağmen ruminantların maternal dolaşımında bulunmalarından dolayı, gebeliklerin erken tanısı ve embriyonik/fetal ölümlerin tespiti amacıyla güvenilir bir şekilde kullanılabilir (54). Sığırlarda geç embriyonik/erken fetal ölümlerin oranının % 4-10 arasında değiştiği belirtilmektedir. Plasentasyon aşamasındaki reprodüktif kayıplar ile ilişkili mekanizmalar bilinmemektedir ancak plasental gelişim veya işlevsel yetersizliklerle ilişkili olabileceği belirtilmektedir (16,194). PAG'ların erken gebelik tanısı amacıyla kullanılması yanında embriyo/fetus canlılığının ve plasental fonksiyonların izlenmesi amacıyla da kullanılması mümkündür (14,99,112). Örneğin 72'nci günden sonra gebeliğini sürdüren ineklerin 28'inci gündeki PAG yoğunluklarının daha yüksek olduğu buna karşın embriyonik/fetal ölüm şekillenen ineklerde 28-72 günler arasında PAG yoğunluğunun düşük olduğu belirtilmiştir (Şekil 2) (15). Bir başka çalışmada gebeliğin 31'inci gününde PAG yoğunluğu 1,4 ng/ml'nin altında olan sığırların %95'inde gebeliğin 60'ıncı gününe kadar, embriyonik ölüm şekillendiği tespit edilmiş, sonuç olarak 31'inci gündeki PAG yoğunluğunun, 31-59'uncu günler arasındaki embriyonik ölümlerin tanımlanmasında iyi bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir

(105). Pohler ve ark (106), gebeliğin 28'inci günündeki PAG yoğunluğunun, 28-100 günler arasındaki embriyonik/fetal ölümlerin belirlenmesinde %95 doğruluğunun olduğunu belirtmişlerdir. Breukelman ve ark (107), embriyo transferi sonrasında 26-120'nci günlerde gebeliği sonlanan ineklerde, 25-32. günler arasındaki bovine PAG-1 yoğunluğu 120'nci günden sonra abort şekillenen veya gebeliği devam eden sığırlardan daha düşük olduğu bildirilmiştir.



Şekil 2. Sağlıklı gebelikler ile gebeliğin 28-72 günleri arasında şekillenen embriyonik/fetal ölümlerde, gebeliğin 28'inci gündeki serum PAG yoğunluğu (20)

2.2.4.2. İkiz Gebeliklerin Tespit Edilmesi

İkiz gebeliklerin plazma PAG düzeyi üzerine belirgin derecede pozitif etkisinin olduğu belirtilmiştir (10,11,101). Bu nedenle PAG'ların erken gebelik tanısı ve embriyonik/fetal ölümlerin tespit edilmesi yanında, ikiz gebeliklerin belirlenmesinde de kullanılabileceği belirtilmektedir (113). İneklerde yapılan bir çalışmada (114) gebeliğin 28'inci gününde PAG-1, PAG-2 ve progesteron düzeylerinin ikiz gebelikleri tek gebelikten ayırmada kullanılabileceği belirtilmiştir. Araştırmacılar gebeliğin 28'inci gününde PAG-1 ve PAG-2 için ikizlik gebelik eşik değerlerini sırasıyla 5,5; 0,25 ng/ml olarak belirlemişler ve bu değerler üzerinden ikiz gebeliklerin %70'ten daha fazlasını tespit ettiklerini belirtmişlerdir (114).

2.2.4.3. Boğa Fertilitesi

Franco ve ark (2017) (16), ST'den sonraki 30'uncu günde serum PAG düzeyi üzerine ST boğasının ırkının ve fertilitesinin etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla 1228 baş Nelore etçi

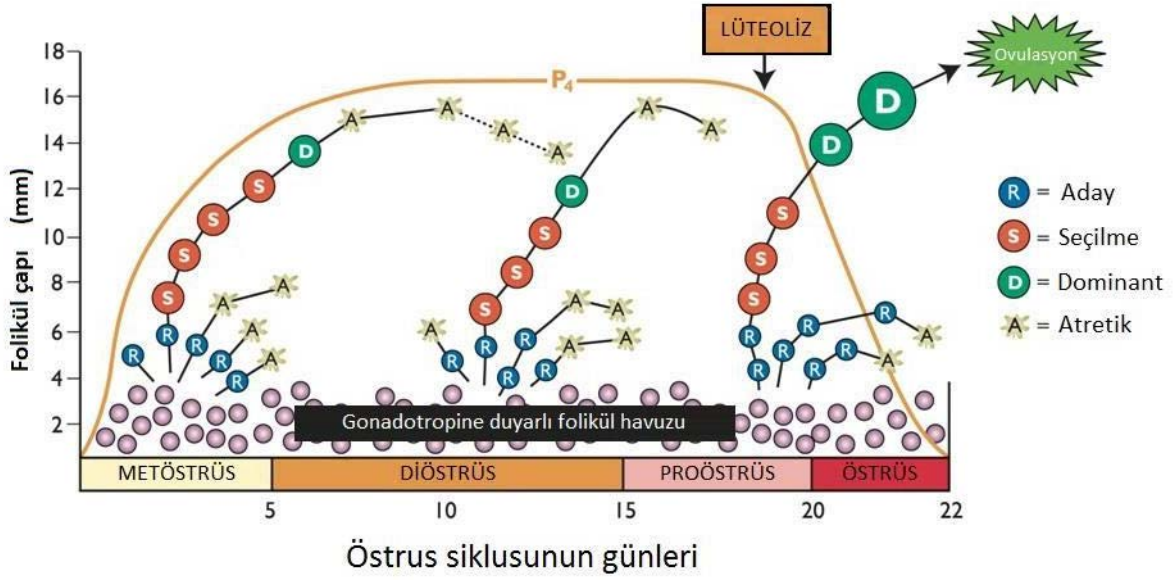
sığırı ovulasyonları sinkronize edilerek tohumlanmıştır. Bunlardan 492 başı ticari Angus veya Nelore boğası spermasıyla tohumlanmış geri kalan 736'sı ise fertilesi bilinmeyen 6 boğanın sperması ile tohumlanmıştır. Tüm ineklerden ST'den sonraki 30'uncu günde kan örneği alınmış ve ultrasonografi ile ineklerin gebelikleri kontrol edilmiştir. Toplam gebelik oranı %53,75; geç embriyonik mortalite oranı %6,1 olarak tespit edilmiştir. Serum PAG düzeyinin Angus spermasıyla tohumlanan ineklerde Nelore'ye göre belirgin derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (Nelore $9,67 \pm 0,48$ ng/ml vs. Angus $11,87 \pm 0,52$ ng/ml; $P=0.0023$). Geç embriyonik mortalitelerin %70'inin üç boğanın spermasıyla tohumlanan ineklerde şekillendiği ve bu ineklerde ortalama serum PAG düzeylerinin değer üç boğanın spermasıyla tohumlananlara göre daha düşük olduğu belirtilmiştir ($8,5 \pm 0,35$ ng/ml vs. $9,48 \pm 0,36$ ng/ml; $P=0.0562$). Araştırmacılar bu bulgulara göre serum PAG düzeyinin boğa fertilesini değerlendirmede kullanılabilecek yeni bir markır olabileceğini belirtmektedirler.

2.3. Ovaryum Aktivitelerinin Ekzojen Hormonlarla Kontrolü

Sütçü ve etçi sığırlarda verimliliği ve ekonomik başarıyı etkileyen en önemli husus reproduktif etkinliktir. Suni tohumlama (ST) uygulanan sürülerde, östrus tespit etkinliği ve buzağılama oranı, iki buzağılama arasında geçen süreyi belirleyen en önemli faktörlerdir. Büyük sürülere östrus tespiti etkinliğinin düşük olmasından dolayı, reproduktif araştırmalar ineklerin daha pratik gebe bırakılabileceği protokoller üzerine yoğunlaşmıştır (115). Uygun senkronizasyon protokolünün seçimi, laktasyon ve sayısı, yaş, vücut kondisyon skoru, siklik aktivite durumu, postpartum dönem, sürü büyüklüğü, uygulama mevsimi, mevcut iş gücü, ekonomik maliyet, senkronizasyon preparatlarının ulaşılabilirliği, uygulama kolaylığı, sürüye ulaşabilme kolaylığı (mera) vb. birçok faktörün etkileşimlerine bağlıdır (116). Hangisi kullanılırsa kullanılsın bütün östrus senkronizasyon protokollerinin en önemli hedefi, belirlenen zaman aralığında tespit edilebilir ve yüksek östrus ve ovulasyon oranı sağlamak ve tek tohumlama ile en yüksek gebelik oranı elde etmektir (115).

Östrus siklusu, gebelik ve diğer reproduktif dönemler boyunca, gelişim ve atrezi gösteren sürekli bir foliküler aktivite vardır. Östrus siklusu boyunca 2 veya 3 nadiren de 4 (%5) folliküler dalga şekillenir. Her bir folikül dalgası 7-10 günlük bir süreyi kapsar ve bu dalgalar aday, seçilme ve dominantlık evrelerinden oluşur (Şekil 3). Bir östrus siklusunda kaç dalga olacağı kesin olarak belli değildir. Genel olarak yaşlı ineklerde ve gençlerin % 60'ında iki folikül dalgası şekillenirken diğerlerinde üç dalga şekillenmektedir. Siyah Alaca ineklerde

genelde 2 dalga görülürken, etçi ve sütçü düvelerde ise 2 veya 3 dalga görülmektedir. İlk foliküler dalga çıkışı her iki şekilde de ovulasyon (0. Gün) şekillendiği gün başlar. İkinci foliküler dalga çıkışı iki dalgalı sıklusta 9-10. günlerde, üç dalgalı sıklusta 8-9. günlerde başlar. Üçüncü foliküler dalga çıkışı ise 15-16. günlerde başlar. Korpus luteum iki dalgalı sıklusta 16, üç daldalı sıklusta ise 19'uncu günde regrese olmaya başlar (117).



Şekil 3. Bir östrus siklusunda oluşan foliküler dalgalar

İneklerde foliküler dalga çıkışı 3-4 mm çaplarda 8-41 adet arasında küçük folikülün birden gelişmeye başlaması ile karakterizedir. Büyüme hızı ilk 2 gün boyunca hemen hemen aynı olan bu foliküllerden biri dominant folikül olarak seçilir ve büyümesine devam eder. Diğerleri ise atreziye uğrayarak regrese olurlar. Dominant folikül progesteron etkisi altında atreziye uğrar. Bu nedenle östrus siklusunun ilk foliküler dalgasında gelişen dominant folikül yüksek progesteron düzeyinden dolayı gelişemeyip atreziye olmaktadır (117). Luteolizis şekillendiği esnada ovaryum üzerinde bulunan dominant folikül ise ovulatör folikül olur (118).

Foliküler dalga çıkışı ve dominant folikülün seçilmesi dolaşımdaki folikül uyarıcı hormonun (FSH) artışı ve azalması ile ilgilidir. Folüküler dalga çıkışından 2,5 gün sonra dominant folikül seçilimi gerçekleşir. Dominant folikülün gelişimine devam etmesi yaklaşık 8 mm çapa ulaştığında FSH etkisinden lüteinleştirici hormon (LH) etkisi altına girmesi ile olur. Luteolizisin başlaması ile dolaşımdaki progesteron düzeyi azaldığında, hipotalamus ve hipofiz üzerindeki negative feedback etki ortadan kalkar ve LH salınım frekansı artar. LH artışı

ovulator folikülün maturasyonu için gereklidir. Preovulatör LH artışı ovaryan matriks değişiklikleri (vasküler değişiklikler, vasküler membranın parçalanması ve folikül duvarının yırtılması), teka ve granuloza hücre yanıtları (kumulus hücre katmanının genişlemesi ve luteinizasyon) ve mayozisin yeniden başlaması üzerine etkilidir. Ovulasyondan sonra granuloza ve teka hücrelerinin hipertrofisi ve proliferasyonu ile geçici bir süre endokrin etkinliği bulunan korpus luteum şekillenir. Korpus luteumun durumuna göre östrus siklusu dört aşamaya ayrılmıştır. (i) proöstrus: korpus luteumun regrese olduğu ve ovulator folikülün geliştiği dönem, (ii) östrus: fonksiyonel bir korpus luteumun bulunmadığı, seksüel aktivitelerin görüldüğü ve folikülün final maturasyonunun şekillenerek ovulasyonun olduğu dönem, (iii) metöstrus: korpus luteumun şekillendiği dönem ve (iv) diöstrus: korpus luteumun fonksiyonel olarak progesteron ürettiği dönem. Proöstrus ve östrus foliküler dönem olarak, metöstrus ve diöstrus ise luteal dönem olarak da adlandırılmaktadır (117,119-121).

İneklerde senkronizasyon protokolleri ovulasyonların senkronizasyonu ve kızgınlıkların senkronizasyonu olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır. Kızgınlıkların senkronizasyonu ile hayvanların östrusu belli bir döneme toplulaştırılmaktadır. Ovulasyonların senkronizasyonu ile planlı suni tohumlama yapılabilmektedir.

Östrüs siklusunun kontrolü amacıyla uygulanan senkronizasyon yöntemleri genel olarak iki esasa dayanır. Bu yöntemlerden birincisi luteolitik ajanlar ile ovaryumlardaki luteal yapının lize edilerek luteal dönemin kısaltılmasıdır. Bu amaçla prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ve sentetik analogları yaygın olarak kullanılmaktadır. İkinci yöntem ise ekzojen progestagen uygulaması ile kan progesteron düzeyinin yüksek tutularak luteal evrenin uzatılmasıdır (122).

Ovulasyonların senkronizasyon amacıyla uygulanan yöntemler ise GnRH ile prostaglandinlerin kombine kullanımı şeklinde olmaktadır. Bu amaçla çok çeşitli protokoller geliştirilmiştir. Bunlardan en bilineni ovsynch protokolüdür (122). Diğer birçok protokol de ovsynch protokolünde yapılan değişikliklerle geliştirilmiştir (123).

2.3.1. Prostaglandinler

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), luteolizise neden olarak hayvanın tekrar kızgınlığa dönmesini sağlayan, ineğin uterusu tarafından üretilen bir hormondur (124). $PGF_{2\alpha}$ ve analogları kullanılarak östrusların senkronize edilmesi en eski yöntemlerden biridir (125). $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonları ile oluşan luteolizis ile doğal olarak oluşan luteolizis arasında fizyolojik

ve hormonal yönden bir farklılık bulunmadığı belirtilmektedir (126). Prostaglandin ile senkronizasyon yöntemlerinde gebelik oranları ile ilgili alınan sonuçlar da yüksek olup doğal kızgınlık gösteren sığırlarla benzerdir (125,126).

PGF_{2α} uygulamasından sonra hayvanların kızgınlık belirtilerini gösterebilmeleri için, bu hayvanların PGF_{2α} uygulama anında diöstrusta olmaları ya da ovaryumları üzerinde PGF_{2α} uygulamasına cevap verebilecek aktif bir korpus luteumlarının bulunması gerekmektedir (115,126). Östrus siklusunun 0-5 günleri arasında PGF_{2α} uygulanan hayvanların hiçbiri kızgınlık belirtisi göstermemektedir (126). Siklusun 6'ncı gününde hayvanların yaklaşık %25'i, 7'nci gününde yaklaşık %33'ü ve 8-16'ıncı günlerinde %100'e yakın bir kısmının kızgınlık göstereceği belirtilmektedir (115).

Fonksiyonel bir korpus luteumun bulunduğu dönemde PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 2-5 gün içinde kızgınlıklar görülür. Kızgınlık belirtilerinin görülmesindeki bu varyasyon PGF_{2α} enjeksiyonu anında dominant folikülün çapının farklı olmasıyla açıklanmaktadır (127). Örneğin siklusun 6'ncı gününde PGF_{2α} enjeksiyonu yapıldığında kızgınlık gösterme aralığının ortalama 3,7 gün olduğu, 10'uncu günde PGF_{2α} enjeksiyonu yapıldığında ortalama 4,9 güne yükseldiği ve 16'ncı günde PGF_{2α} enjeksiyonu yapıldığında ise ortalama 3,4 güne düştüğü belirtilmiştir (128).

Östrus siklusunun hangi aşamasında olduğu bilinmeden 10-14 gün arayla iki PGF_{2α} enjeksiyonu yapılır. Östrus siklusunun hangi aşamasında olduğuna bağlı olmaksızın tüm hayvanlar ikinci doz PGF_{2α} enjeksiyonundan sonra kızgınlık gösterirler (125). İlk prostaglandin enjeksiyonunda, ovaryumlarında aktif bir korpus luteumu bulunmayan hayvanlar (proöstrus, östrus, metöstrus dönemlerinde bulunan) ikinci prostaglandin enjeksiyonundan sonra diöstrus döneminde olacaklardır. Aynı şekilde ilk PGF_{2α} enjeksiyonunda diöstrusta olan hayvanlar da ikinci enjeksiyonda diöstrus döneminde olacaklardır. Böylece sürüdeki hayvanların tamamının kızgınlıkları senkronize edilebilecektir (126).

Düvelere 11 gün arayla ineklere ise 14 gün arayla PGF_{2α} enjeksiyonu yapılması önerilmektedir. Bunun nedeni olarak düvelerde PGF_{2α} enjeksiyonundan kızgınlığa kadar geçen sürenin ineklere göre daha kısa olması, düvelerin korpus luteumunun PGF_{2α}'ya cevap verebilecek olgunluğa daha kısa sürede ulaşması ve ineklerin diöstrus süresinin düvelere göre

daha uzun olması gösterilmektedir. Sütçü ineklerde 14 gün arayla iki PGF_{2α} enjeksiyonundan sonra daha yüksek gebelik elde edilmiştir. Bu durum ikinci PGF_{2α} enjeksiyonu anında daha fazla ineğin diöstrusta bulunmasıyla açıklanmaktadır (126). Kızgınlıklar ikinci PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 2-7 güne yayılmaktadır. İş gücünü azaltmak için ineklerde PGF_{2α} enjeksiyonundan 72-80 saat sonra tek tohumlama veya 72 ve 96'nci saatlerde iki tohumlama, düvelerde PGF_{2α} enjeksiyonundan 60-68 saat sonra tek tohumlama veya 60 ve 80'inci saatlerde iki tohumlama yapılabileceği belirtilmektedir (126). Fogwel ve ark (129), 11 gün arayla iki doz PGF_{2α} uyguladıkları düveleri, kızgınlıkları gözlem yoluyla takip ederek hayvanlar kızgınlık gösterdikten sonraki 12'nci saatte veya kızgınlık takibi yapmadan ikinci PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 80'inci saatte tohumlamışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre toplam gebelik oranları % 50,9 olarak belirlenmiş, gebelik oranlarının kızgınlıkları tespit edilerek tohumlanan düvelerde diğerlerine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (% 62,8'e karşın % 39,1).

2.3.2. GnRH ve Analogları

Ovaryumlarında büyüyen bir dominant folikül (çapı 10 mm olan) bulunan sığırlarda, GnRH uygulaması LH salınımına ve ovulasyona neden olur ve yaklaşık 2 gün sonra yeni bir folikül dalgası ortaya çıkar. GnRH uygulamasından sonraki 6 veya 7 gün sonra prostaglandin uygulaması ovaryum üzerinde bulunan muhtemel bir korpus luteumu lize eder. PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 36-48'inci saatlerde uygulanan ikinci GnRH enjeksiyonu sonucu yeni oluşan dominant folikül ovule olur. İkinci GnRH enjeksiyonundan 16-20 saat sonra suni tohumlama yapılır (123). Bu ovulasyon senkronizasyon yöntemi ovsynch protokolü olarak adlandırılmaktadır (122). Günümüzde sabit zamanlı ST uygulamalarında kullanılan protokollerin birçoğu ovsynch protokolünün varyasyonları şeklindedir (123).

Ovsynch protokolündeki ikinci GnRH enjeksiyonu yerine östradiol sipionat (ECP) uygulanarak heatsynch protokolü geliştirilmiştir. Ovsynch protokolündeki ineklerin bir kısmı (yaklaşık %10) prostaglandin enjeksiyonundan önce kızgınlık gösterdiği için sabit zamanlı ST öncesinde ovulasyon şekillenmektedir. Ovsynch protokolünde erken kızgınlık gösteren bu ineklerin belirlenip tohumlanması durumunda bu yeni protokol select-synch olarak isimlendirilmektedir (126).

Ovsynch protokolünde gebelik oranlarının östrus tespiti sonrasında ST uygulaması ile benzer olduğu belirtilmektedir. Ancak konsepsiyon oranlarının (tohumlanan hayvanlar içinde gebe kalan hayvanların oranı) genellikle daha düşük olduğu çünkü hayvanların yaklaşık üçte birinin ovulasyonlarının yeterince senkronize edilemediği belirtilmektedir (123). Colazo ve ark (130), ovsynch protokolündeki hayvanların %11'inde sabit zamanlı ST'den önce ovulasyon şekllendiğini, % 15'inin PGF_{2α}'ya yanıt vermediğini, % 9'unda ise ikinci GnRH enjeksiyonundan sonra ovulasyon şekillenmediğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak ovulasyon senkronizasyon oranının sadece % 68 dolaylarında olduğu belirtilmiştir (123). Ovsynch protokolüne başlanıldığı anda, östrus siklusunun aşaması da ovulasyon ve gebelik oranlarını etkilemektedir. İlk GnRH enjeksiyonu siklusun 1-4 veya 14-21'inci günleri arasına denk geldiğinde gebelik oranlarının düştüğü belirtilmiştir (131).

GnRH temelli ovulasyon senkronizasyon protokollerinin etkinliğini arttırmak için çeşitli girişimlerde bulunmaktadır. Ovsynch protokolünde ilk GnRH enjeksiyonu siklusun 5-12'nci günleri arasında yapıldığında protokolün başarı oranının en yüksek olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle iki PGF_{2α} enjeksiyonu ile presenkronizasyon yapılarak ovsynch protokolüne siklusun 5-12 günleri arasında başlanabilmektedir. Bu protokole presynch-ovsynch adı verilmektedir (132). Başka bir presenkronizasyon yöntemi de iki ovsynch protokolünün arka arkaya uygulandığı double-ovsynch protokolüdür (133). Double-ovsynch protokolünde pirimipar ineklerde gebelik oranlarının presynch-ovsynch protokolüne göre daha yüksek olduğu ancak multipar ineklerde herhangi bir farklılığın bulunmadığı belirtilmektedir (133). Ovsynch protokolünden önce PGF_{2α} ve GnRH ile pre-senkronizasyon yapılarak oluşturulan bir başka protokol de G6G olarak adlandırılmaktadır (134). G6G protokolünde, PGF_{2α} enjeksiyonu ve iki gün sonra GnRH enjeksiyonu yapılır ve takip eden altıncı günde ovsynch protokolüne başlanır. Ovsynch protokolünün modifiye bir şekli olan cosynch protokolünde ise ikinci GnRH enjeksiyonu ile ST aynı anda yapılır. Böylelikle ovsynch protokolünde dört defa elden geçirilen hayvanlar, cosynch protokolünde üç defa elden geçirilir ve iş gücünden tasarruf edilir. Cosynch protokolü daha çok etçi sığırlarda kullanılmaktadır (123).

Ovsynch veya cosynch protokollerinde GnRH ve PGF_{2α} enjeksiyonları arasında progesteron takviyesi yapılması östrus/ovulasyonların senkronizasyonunu ve konsepsiyon

oranını arttırmaktadır. Bu protokoller daha çok anöstrustaki veya kistik ovaryum hastalığı bulunan ineklerde uygulanmaktadır (115).

İnekler ile düveler arasındaki foliküler dinamiklerdeki farklılıklar (düvelerde osynch'e başlanıldığında 10 mm'den daha küçük olan foliküllerin GnRH enjeksiyonundan etkilenmemesi, düvelerde folikül gelişimi ve gerilemelerinin daha hızlı olması) nedeniyle sütçü düvelerde ovsynch protokolünün başarı oranı azalmaktadır. Ovsynch protokolü uygulanan sütçü düvelerin birçoğu ST'dan önceki GnRH enjeksiyonundan önce kızgınlık göstermektedir. Bu nedenle, sütçü düvelerde cosynch protokolü kısaltılarak, 5 gün boyunca progesteron destekli toplam 8 gün süren bir senkronizasyon protokolü geliştirilmiştir. Bu protokole göre ilk GnRH enjeksiyonu ile beraber intravaginal progesteron salan aygıt kullanılmakta, 5 gün sonra PGF_{2α} uygulanarak progesteron kaynağı uzaklaştırılmakta ve 3 gün sonra GnRH enjeksiyonu ile birlikte ST yapılmaktadır. Bu protokol etçi ve sağmal sütçü ineklerde uygulandığında 12 saat arayla iki PGF_{2α} enjeksiyonu yapılır (126).

Günümüzde çok sayıda GnRH ve PGF_{2α} temelli sabit zamanlı ST protokolü bulunmaktadır (123). Ancak bu protokollerin uygulaması tartışmalıdır. Sabit zamanlı ST protokolleri büyük sürülerde kızgınlık tespiti işlemini ortadan kaldırdığı ve hayvanların planlanan zamanda tohumlanmalarına izin verdiği için önerilmektedir. Buna karşın bazı araştırmacılar GnRH ile indüklenen ovulasyonlarda ovumun maturasyonunu tamamlamadan ovule olduğu için gebelik oranlarının düştüğü ve embriyonik/fetal kayıpların arttığını belirtmektedir (135-137).

Bu tez çalışması ile Siyah Alaca düvelerde iki farklı senkronizasyon protokolünün serum PAG düzeylerine olan etkileri araştırıldı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışmanın yapılmasına 30.09.2016 tarihli ve 2016/26 sayılı karar ile Döllvet Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul Komitesi tarafından izin verildi.

3.2. Hayvan Materyali

Sunulan çalışma Kasım 2016-Şubat 2017 tarihleri arasında Ceylanpınar Tarım İşletmesinde bulunan, 15-20 aylık yaşta 158 baş Siyah Alaca düve kullanılarak yürütülmüştür.

3.3. Senkronizasyon Protokolleri ve Suni Tohumlama

Birinci gruptaki yer alan düvelerin (n=70) östrusları 11 gün arayla iki doz PGF_{2α} uygulaması (129) ile senkronize edildi (G1, PGF grubu). Bu amaçla, siklusun herhangi bir gününde (0. gün) im 500 µg PGF_{2α} (JURAMATE®, Ege Vet Hayvancılık, İzmir) uygulandı. İlk PGF_{2α} enjeksiyonundan 11 gün sonra ikinci PGF_{2α} enjeksiyonu yapıldı. İkinci PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 2-5'inci günlerde, östruslar gözlem yoluyla tespit edilerek tohumlamalar yapıldı. İkinci grupta yer alan düveler (n=61), GnRH temelli ovulasyon senkronizasyon protokolü (Ovsynch veya cosynch protokolü) (122,138) uygulanarak senkronize edildi (G2, GNRH grubu). Bu amaçla, 0. Gün 100 µg im GnRH (OVARELIN®, Ceva Hayvan Sağlığı A.Ş. İstanbul), 7. gün 500 µg im PGF_{2α} (JURAMATE®, Ege Vet Hayvancılık, İzmir) ve 9. gün ikinci doz GnRH enjeksiyonu yapıldı. İkinci doz GnRH enjeksiyonu esnasında kızgınlık gösteren düvelere ST yapıldı (cosynch), diğerlerine ise ikinci doz GnRH enjeksiyonundan 16 saat sonra ST yapıldı (ovsynch). Sunulan çalışmada GNRH grubundaki hayvanların sadece ovulasyonları senkronize olanlar tohumlandı, ovulasyonları senkronize olmayan hayvanlara ise ST yapılmadı. Üçüncü grupta yer alan düveler (n=27) ise östrusları gözlem yoluyla tespit edilerek ST yapılan hayvanlardan oluşturuldu ve hayvanlara herhangi bir hormonal müdahale yapılmadı (G3, Kontrol grubu).

3.4. Kan Örneklerinin Toplanması

Kan örnekleri tüm hayvanlardan suni tohumlamadan sonraki 28. günde kuyruk venasından vakumlu tüplere toplandı. Toplanan kan örnekleri 2200g de 15 dakika santrifüj

edilerek serumları çıkarıldı. Serumları çıkarılan örnekler analiz yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

3.5. Gebelik Kontrolleri

ST'den sonraki 28 ve 35'inci günlerde ultrasonografi (USG) ile 60 ve 120'nci günlerde rektal palpasyon ile gebelik kontrolleri yapıldı. USG ile yapılan kontrollerde amniyon kesesinin görülmesi veya embriyonun görülmesi ile gebelik tanısı konuldu. Rektal muayenede 60. günde yavru zarlarının kayması değerlendirilerek, 120'nci günde ise plasentomların veya yavrunun palpasyonu ile gebelikler teyit edildi.

PGF ve GNRH grupları arasında gebelik ve konsepsiyon oranları karşılaştırıldı. Gebelik oranı, senkronizasyon protokolüne alınan hayvanların içinde gebelerin oranı şeklinde; konsepsiyon oranı ise ST yapılan hayvanların içinde gebelerin oranı şeklinde hesaplandı (138). Kontrol grubunda gebelik ve konsepsiyon oranları hesaplanmadı.

3.6. Serum PAG Analizi

Serum PAG düzeyinin tespit edilmesi amacıyla, ST'den sonraki 28'inci günde USG ile yapılan gebelik kontrolü sonuçlarına göre, 61 adet gebe (G1: 20; G2: 20; G3:21) ve 19 adet boş hayvanın serumu (G1: 6; G2: 7; G3:6) kullanıldı.

Serum örneklerindeki PAG seviyesi, ticari PAG ELISA test kitleri (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME) kullanılarak, üretici firmanın Türkiye distribütörü olan DIAGEN AŞ. laboratuvarlarında deneyimli personel tarafından yapıldı. PAG elisa testi, bir anti-PAG monoklonal antikorun kuyucuk (mikro-plate) üzerine kaplanması ile konfigüre edilmiştir. PAG monoklonal antikor, PAG-4, PAG-6, PAG-9, PAG-16, PAG-18 ve PAG-19 içeren PAG-55 protein fraksiyonuna karşı yükseltilmiştir (139). Seyreltilmiş test örneğinin kaplanmış kuyudaki inkübasyondan sonra yakalanan PAG, dedektör çözeltisi (PAG spesifik antikor) ve konjugat (horseradish peroksidaz) ile tespit edildi. Bağlanmamış konjugat yıkandı ve kuyucuklara 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidin substrat eklendi. Numunelerdeki renk değişimi, 450 nm dalga boyunda, spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar, numunenin optik yoğunluğu (OD) üzerinden elde edilen S-N (sample minus negative control) değeri ile karşılaştırıldı. Testte iki adet negatif kontrol vardı. S-N değeri, örneklerin OD değerlerinden negatif kontrollerin OD değerlerinin ortalaması çıkarılarak elde edildi. Testteki renk

yoğunluğu ile serum PAG düzeyi orantılı olduğu için S-N değerleri PAG düzeyinin göstergesi olarak kullanıldı. Gebelik sonuçları, PAG ELISA üreticisi tarafından belirlenen eşik değerlerine dayanılarak belirlendi. Plazma PAG ELISA için, S-N değeri <0.300 olduğunda, inek "gebe değil" olarak, S-N değeri ≥ 0.300 olduğunda, inek "gebe" olarak sınıflandırıldı.

3.7. İstatistik Analiz

Gruplar arasında gebe hayvanların serum PAG düzeylerindeki farklılıklar varyans analizi ile tespit edildi. Grupların birbirinden farklılık düzeyi Tukay testi kullanılarak kontrol edildi. PGF ve GNRH grupları arasındaki gebelik ve konsepsiyon oranları arasındaki farklılıklar Ki-Kare testi ile değerlendirildi. İstatiksel analizler Windows 7 programı altında çalışan SPSS version 24 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Serum PAG ELISA testinin epidemiyolojik tanısallık test karakteristiklerinin (sensitivite, spesifite, pozitif ve negatif prediktif değer ve doğruluk oranı) belirlenebilmesi için gerçek pozitif (a; ultrason sonucu gebe, test sonucu gebe), hatalı pozitif (b; ultrason sonucu gebe değil, test sonucu gebe), hatalı negatif (c; ultrason sonucu gebe, test sonucu gebe değil) ve gerçek negatif (d; ultrason sonucu gebe değil, test sonucu gebe değil) sonuçlar belirlendi. Bu verilerden yararlanılarak aşağıda verilen formülasyonlarla PAG ELISA kitinin sensitivite ($a/(a+c) \times 100$), spesivite ($d/(b+d) \times 100$), pozitif prediktif değer ($a/(a+b) \times 100$), negatif prediktif değer ($d/(c+d) \times 100$) ve doğruluk oranları ($(a+d)/(a+b+c+d) \times 100$) hesaplanarak gebelik tanısındaki etkinlikleri araştırıldı (140).

Sensitivite: Gerçekte gebe olan hayvanların içinde testin gebe dediği hayvanların oranı

Spesifite: Gerçekte boş (gebe değil) olan hayvanların içinde testin boş dediği hayvanların oranı

Tahmini pozitif değer: Testin gebe olarak tespit ettiği hayvanların içindeki gerçek gebe hayvanların oranı

Tahmini negatif değer: Testin boş dediği hayvanların içindeki gerçek boş hayvanların oranı

Doğruluk oranı: Tüm hayvanların içinde testin gebe ve boş dediği hayvanların oranıdır.

4. BULGULAR

4.1. Senkronizasyon ve Gebelik Sonuçları

PGF uygulanan gruptaki düveler, ikinci PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 2-5 gün içinde kızgınlıkları gözlem yoluyla takip edilerek ST yapıldı. PGF grubunda toplam toplam 70 düveden 45'i (% 64,3) kızgınlıkları tespit edilerek tohumlandı. Geri kalan hayvanların kızgınlıkları tespit edilemediği için suni tohumlama yapılmadı. GNRH grubundaki toplam 61 düveden 39'u (% 63,9) ikinci GnRH enjeksiyonunun yapıldığı gün kızgınlık gösterdikleri için aynı gün ST yapıldı (cosynch protokolü uygulandı), 13'ü (% 21,3)'ne ikinci GnRH enjeksiyonundan 16 saat sonra ST yapıldı (ovsynch protokolü uygulandı). Geri kalan 9 (% 14,75)'una ise hayvanlar senkronizasyon protokolüne yanıt vermediği için ST yapılmadı. Sonuç olarak GnRH temelli senkronizasyon protokolünde düvelerin 52 (% 85,25)'sine ST yapıldı.

ST'den sonraki 28'inci gündeki gebelik oranları PGF grubunda % 28,6; GNRH grubunda % 32,8 iken konsepsiyon oranları PGF grubunda % 44,4; GNRH grubunda % 38,5 olarak saptanmıştır (Tablo 2). Gebelik ve konsepsiyon oranları bakımından iki grup arasında tespit edilen farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 2. PGF ve GNRH grupları arasında ST'den sonraki 28'inci günde gebelik ve konsepsiyon oranları

Grup	N	ST yapılan hayvan sayısı	Gebe hayvan sayısı	Gebelik oranı	Konsepsiyon oranı
PGF	70	45	20	28,6	44,4
GNRH	61	52	20	32,8	38,5
p				>0,05	>0,05

ST'den sonraki 28 ve 35'inci günlerde USG ile yapılan gebelik kontrollerinde ikiz gebelik tespit edilmemiştir.

Serum PAG ELISA gebelik testinin sensitivitesi %100; spesifitesi %89,47; pozitif prediktif değeri %96,8; negatif prediktif değeri %100; doğruluk oranı 97,5 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Serum PAG ELISA gebelik testinin epidemiyolojik tanısal karakteristikleri

	PGF	GNRH	KONTROL	Toplam
Gerçek pozitif tanı (a)	20	20	21	61
Hatalı pozitif tanı (b)	2	-	-	2
Hatalı negatif tanı (c)	-	-	-	-
Gerçek negatif tanı (d)	4	7	6	17
Sensitivite (%)	100	100	100	100
Spesivite (%)	66.67	100	100	89.47
Pozitif prediktif tanı (%)	90.91	100	100	96.83
Negatif prediktif tanı (%)	100	100	100	100
Doğruluk oranı (%)	92.30	100	100	97.50

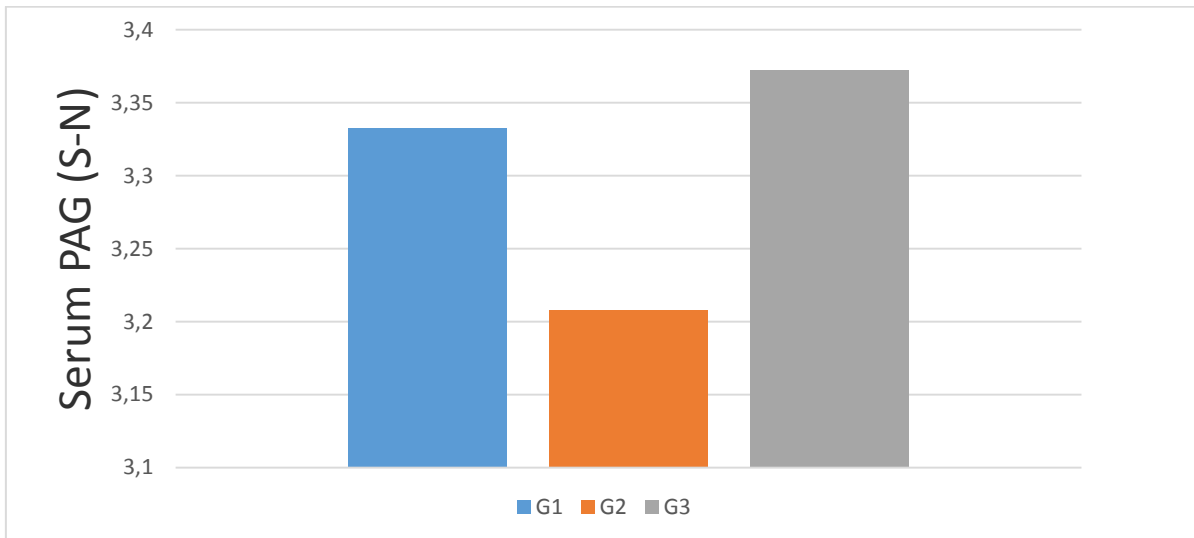
*a: gerçek pozitif (ultrason sonucu gebe, test sonucu gebe), b: hatalı pozitif (ultrason sonucu gebe değil, test sonucu gebe), c: hatalı negatif (ultrason sonucu gebe, test sonucu gebe değil), d: gerçek negatif (ultrason sonucu gebe değil, test sonucu gebe değil)

Sensitivite ($a/(a+c) \times 100$), Spesivite ($d/(b+d) \times 100$), Pozitif prediktif değer ($a/(a+b) \times 100$), Negatif prediktif değer ($d/(c+d) \times 100$) ve

Doğruluk oranları ($(a+d)/(a+b+c+d) \times 100$)

4.2. Serum PAG Düzeyleri

Ortalama serum PAG (S-N) düzeyi PGF grubunda $3,34 \pm 0,14$; GNRH grubunda $3,21 \pm 0,14$; Kontrol grubunda ise $3,37 \pm 0,15$ olarak tespit edilmiştir (Tablo 4). GNRH grubunda ortalama serum PAG düzeyi diğer gruplara göre daha düşük olmasına rağmen (Şekil 4), gruplar arasında serum PAG (S-N) düzeyleri bakımından tespit edilen farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$).

**Şekil 4.** Gruplar arasında gebeliğin 28'inci gününde dolaşımdaki PAG (S-N) düzeyi

Tablo 4. Gruplar arasında ortalama serum PAG (S-N) değerleri

Grup	n	Ortalama (\bar{X})	Standart hata ($S\bar{x}$)
PGF	20	3,34	0,146
GNRH	20	3,21	0,136
KONTROL	21	3,37	0,148
Toplam	61	3,28	0,082

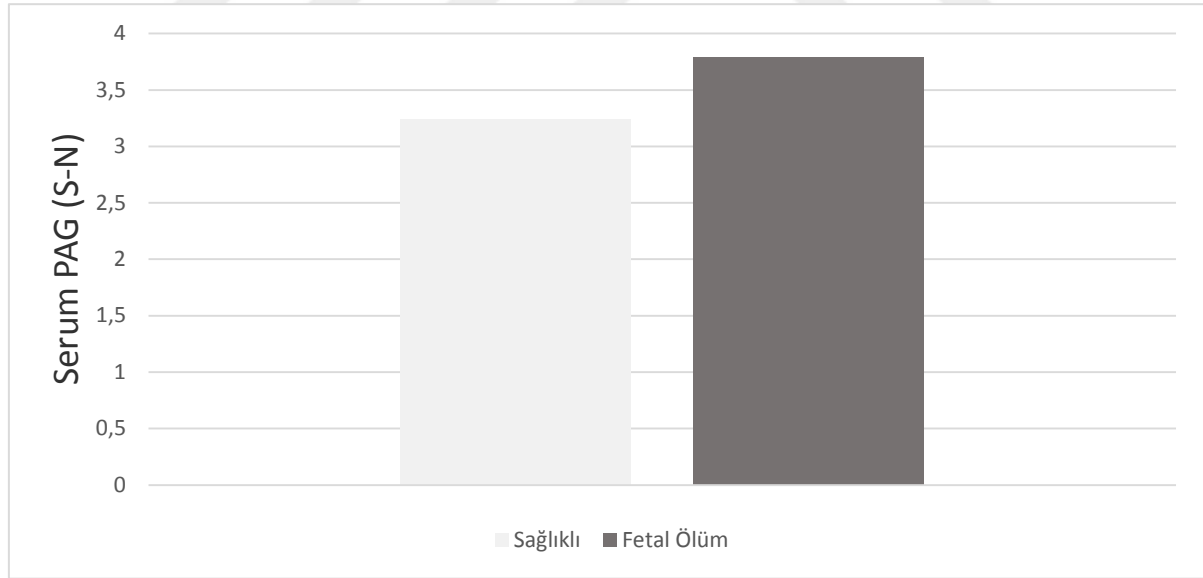
*F:0,353; P>0,05 gruplar arasında tespit edilen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

4.3. Fetal Ölümler

ST'den sonraki 120'nci günde yapılan gebelik kontrolünde, hayvanların %5,56'sında fetal ölüm şekillendiği tespit edilmiştir (PGF grubunda 1; GNRH grubunda 1, kontrol grubunda 2). Fetal ölüm tespit edilen hayvanların ST'den sonraki 28'inci günde ortalama serum PAG (S-N) düzeyi $3,79\pm 0,87$ iken sağlıklı gebeliklerde $3,24\pm 0,09$ olarak belirlenmiştir (Tablo 5) (Şekil 5). Gruplar arasında tespit edilen farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (P>0,05).

Tablo 5. Gebeliğin 120'nci gününde fetal ölüm şekillenen hayvanlar ile sağlıklı hayvanların serum PAG (S-N) düzeyleri

	Sağlıklı ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)	Fetal ölüm ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)	Toplam ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)
Ortalama PAG (S-N)	$3,24\pm 0,09$	$3,79\pm 0,190$	$3,28\pm 0,090$



Şekil 5. Gebeliğin 120'nci gününde fetal ölüm tespit edilen hayvanın suni tohumlamadan sonraki 28'inci günde ortalama serum PAG (S-N) düzeyleri

5. TARTIŞMA

İneklerde suni tohumlama ve embriyo transferi uygulamalarını kolaylaştırmak için östrus veya ovulasyonların senkronizasyonu sıklıkla tercih edilmektedir. Bu amaçla farklı senkronizasyon yöntemleri uygulanmaktadır (123,138). Suni tohumlama uygulamalarında uygulanan östrüs veya ovulasyonların senkronizasyonunun amacı, östrusları kısa bir zaman aralığında toplulaştırmak, kızgınlık tespit etkinliğini arttırmak veya kızgınlık tespit işlemi tamamen ortadan kaldırarak sabit zamanlı ST yapmaktır. GnRH temelli protokollerde, tohumlamadan sonra progesteron artış oranı ve dolaşımdaki progesteron yoğunluğunun düşük olduğu bu nedenle gebelik oranlarının daha düşük, erken embriyonik ölüm oranının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (135-137) Farklı senkronizasyon protokolleri ile serum PAG düzeyleri arasında bir ilişkinin olup olmadığı bizim bilgilerimize göre daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmemiştir. Sunulan tez projesinde, 11 gün arayla iki doz PGF_{2α} uygulaması ve GnRH temelli ovulasyon senkronizasyon protokolleri (Ovsynch+cosynch) ile senkronize edilen sütçü düvelerde gebeliğin 28'inci günündeki serum PAG düzeyleri değerlendirilmiştir.

5.1. Senkronizasyon ve Gebelik Sonuçları

Xu ve ark (141) ilk PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 7 gün içinde hayvanların % 78,5'inin kızgınlık gösterdiğini, ikinci PGF_{2α} enjeksiyonundan sonra bu oranın % 82,5'e yükseldiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde King ve Robertson (142), iki doz PGF_{2α} ile senkronize edilen düvelerde, hayvanların % 83'ünün ikinci PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 2-4 gün içinde kızgınlık gösterdiğini belirtmiştir. Sunulan çalışmada ise PGF grubundaki hayvanların %64,3'ü ikinci PGF_{2α} enjeksiyonundan sonraki 2-5 gün içinde kızgınlık göstererek tohumlanmıştır. Kızgınlık gösteren hayvanların oranının düşük olmasının nedeninin, işletmedeki kızgınlık takip sisteminin etkinliği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Colazo ve ark (123), ovsynch protokolündeki hayvanların ovulasyon senkronizasyon oranının yaklaşık % 68 dolaylarında olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada GNRH grubunda hayvanların % 85,25'inde ovulasyonların senkronize edildiği tespit edilmiş ve bu hayvanlara ST yapılmıştır. Ovulasyonların senkronizasyon oranının yüksek olmasının

nedeninin ovsynch ve cosynch protokollerinin birlikte uygulanmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Fogwell ve ark (129), $PGF_{2\alpha}$ ile senkronize edilen sütçü düvelerde gebelik oranlarını % 50,9 olarak belirtmiştir. Bir başka çalışmada ise $PGF_{2\alpha}$ ile senkronize edilen sütçü düvelerde gebelik oranları % 40 olarak belirtilmiştir (142). Xu ve ark (141) $PGF_{2\alpha}$ ile senkronize edilen sütçü ineklerde konsepsiyon oranlarını % 62,1 olarak belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada PGF grubunda elde edilen gebelik (% 28,6) ve konsepsiyon oranları (%44,4) Fogwell ve ark (129) ile Xu ve ark (141) tarafından bildirilen sonuçlardan daha düşük bulunmuş buna karşın King ve Robertson (142)'un sonuçlarından daha yüksek bulunmuştur. Gebelik oranlarının düşük olmasının nedenleri olarak tohumlama zamanı, mevsim, kızgınlık tespit etkinliği, senkronizasyon döneminde yapılan aşılama ve ST için aynı anda çözdürülen payet sayısı gibi yönetimsel faktörler belirtilmektedir (129). Konsepsiyon oranlarının ise $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonları siklusun erken dönemlerinde (5-9 günler) yapıldığında düşüş gösterdiği belirtilmiştir (141). Sunulan çalışmada gebelik oranlarının düşük olmasının, kızgınlık takibinin etkinliğiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Daha önceki çalışmalarda ovsynch ve cosynch protokolleri için bildirilen gebelik ve konsepsiyon oranları farklılık göstermektedir. Örneğin ovsynch protokolünde gebelik oranları etçi düvelerde % 57 (143) ve % 22,1 (144), sütçü düvelerde % 35,1 (145) ve % 29,2 (146) olarak, konsepsiyon oranı pirimipar ineklerde % 37,9 (147) olarak; cosynch protokolünde gebelik oranları sütçü düvelerde % 51 (148), etçi düvelerde % 49 (143), % 31 (149), % 40 (150) ve % 43 (151) olarak belirtilmiştir. Sunulan çalışmada GNRH grubunda elde edilen gebelik (% 32,8) ve konsepsiyon oranları (% 38,5) Pursley ve ark (145), Kara ve ark (146), Tenhagen ve ark (147) ve Thompson ve ark (149) tarafından bildirilen sonuçlar ile paralellik göstermekle birlikte, Geary ve ark (143), Demiral ve ark (148), Grieger ve ark (150), Wickersham ve ark (151) tarafından yapılan çalışmalardan düşük, Dahlen ve ark (144)'ının bildirdiği sonuçlardan yüksek bulunmuştur.

Ovsynch protokolünde gebelik veya konsepsiyon oranlarının $PGF_{2\alpha}$ 'yla benzer olduğu belirtilmektedir (152). Sunulan çalışmada değerlendirilen iki senkronizasyon yönteminden elde edilen gebelik ve konsepsiyon oranları arasında tespit edilen farklılıkların istatistiki olarak önemli olmadığı görülmüştür.

PAG elisa test kitlerinin doğruluğunun % 92-100 arasında değiştiği ve sonuçlarının genellikle güvenilir olduğu belirtilmektedir (48,50). Sunulan çalışmada serum PAG düzeylerinin değerlendirildiği test kitinin doğruluk oranı % 97,5 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar diğer çalışmalarla uyumludur.

5.2. Serum PAG Düzeyleri

PAG elisa test kitleri ile gebelik tanısı en erken ST'den sonraki 26-30'uncu günler arasında yapılabilmektedir (2,50). Son çalışmalarda bu süre ST'den sonraki 24'üncü güne kadar indirilmeye çalışılmaktadır (153). Serum veya sütte PAG düzeylerini etkileyen çeşitli faktörlerin gebelik tanısı sonuçlarını da etkileyebileceği belirtilmektedir. Gebelikte geçen gün sayısı (7,45,109), ırk (8,9,13), hayvanların gebe kalma yaşı (109), ikiz gebelikler (8,10,11,101) ve sıcak stresinin (110) serum PAG veya PSPB düzeylerini etkileyebileceği belirtilmektedir.

Sunulan çalışmada GNRH grubunda ST'den sonraki 28'inci günde ortalama PAG (S-N) düzeyinin daha düşük olduğu belirlenmiştir ancak gruplar arasında ortalama serum PAG (S-N) düzeylerinde tespit edilen farklılıkların istatistiki olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir.

Daha önceki çalışmalar incelendiğinde gebeliğin 4'üncü haftasındaki serum PAG (S-N) değerinin 1,000-4,000 arasında değiştiği ve düvelerde ineklere göre daha yüksek olduğu görülmektedir (7,100). PAG elisa kitlerinin gebelik tanısı için iki PAG (S-N) eşik değeri bulunmaktadır. Numunenin PAG (S-N) değeri 0,300'den küçük olduğunda gebelik negatif; 1,000'den büyük olduğunda gebelik pozitifdir. Bu iki eşik değer arasındaki (0,300-1,000) değerlerde ise hayvanın gebelik yönünden tekrar kontrol edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Sunulan çalışmadaki gebe düvelerin tamamında, gebeliğin 28'inci günündeki serum PAG (S-N) düzeyleri (1,150-3,980), erken gebelik tanısı için belirlenen eşik değerlerden daha yüksekti. Ayrıca diğer çalışmalarda (7,100) belirtilen gebeliğin 4'üncü haftasındaki serum PAG (S-N) düzeyleri ile benzerlik göstermektedir.

5.3. Fetal Ölümler

İneklerde reproduktif verimliliği etkileyen önemli faktörlerden birisi embriyonik ve fetal kayıplardır. Embriyonal dönemdeki kayıpların çok önemli bir kısmının (% 47,5)

gebeliğin 28-42'nci günleri arasında oluştuğu ifade edilmektedir (154). Fötal kayıpların ise en fazla gebeliğin 45-60. günler arasında oluştuğu ve % 12'ye kadar ulaşabileceği belirtilmektedir (155). Sunulan çalışmada ST'den sonraki 60-120 günler arasında % 5,56 gebelik kaybı şekillendi. Perry ve ark (135), GnRH ile indüklenen ovulasyonlarda geç embriyonik ölümleri arttırdığını belirtmektedir. Sunulan çalışmada her üç grupta da fetal ölüm şekillendi ancak gruplar arasında bir farklılık tespit edilmedi.

Çeşitli çalışmalarda gebeliğin 28-120 günleri arasında şekillenen embriyonik/fötal ölümlerde, gebeliğin yaklaşık 4-5'inci haftalarındaki plazma PAG düzeylerinin daha düşük düzeyde olduğu belirtilmiştir (7,14,15,105-107). Sunulan çalışmada bu bulguların aksine gebeliğin 120'nci gününde boş olan hayvanlarda 28'inci gündeki serum PAG (S-N) düzeyi grup ortalamasının üzerinde çıktı.

6. SONUÇ

Çiftlik hayvanlarında, boş hayvanların suni tohumlamadan sonraki en kısa sürede belirlenmesi iyi bir reproduktif yönetim açısından önemli bir kriterdir. Erken gebelik tanısı amacıyla PAG elisa test kitlerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. PAG'lar, plasentadan salınarak maternal dolaşıma geçtikleri için gebeliğin spesifik belirteçleridir. PAG'ların erken gebelik tanısı yanında, embriyonik/fetal ölümlerin tespit edilmesi, ikiz gebeliklerin belirlenmesi ve plasental fonksiyonların izlenmesi amacı ile de kullanılabilen PAG'ların kullanılabileceği belirtilmektedir. Serum PAG düzeyleri ikizlik, embriyonik ölümler, ırk, mevsim, süt verimi, buzağının cinsiyeti, parite, gebelikte geçen gün sayısı gibi çok sayıda faktörden etkilenmektedir.

Büyük sürülere östrus tespiti etkinliğinin düşük olmasından dolayı, reproduktif araştırmalar ineklerin daha pratik gebe bırakılabileceği protokoller üzerine yoğunlaşmıştır. Bu protokoller ovulasyonların senkronizasyonu ve kızgınlıkların senkronizasyonu olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır. Günümüzde ovulasyonların senkronizasyonu amacıyla uygulanan çok sayıda GnRH ve PGF_{2α} temelli sabit zamanlı ST protokolü bulunmaktadır. Bu protokollerin avantajları bulunmakla birlikte, bazı araştırmacılar GnRH ile indüklenen ovulasyonlarda ovumun maturasyonunu tamamlamadan ovule olduğu için gebelik oranlarının düştüğü ve embriyonik/fetal kayıpların arttığını belirtmektedir. Sunulan tez çalışmasında Siyah Alaca düvelerde farklı senkronizasyon protokollerinin (Ovysnch+cosynch ve 11 gün arayla iki doz PGF_{2α}) serum PAG düzeylerine olan etkileri araştırılmıştır.

Sonuç olarak sütçü düvelerde, gebeliğin 28'inci günündeki serum PAG düzeyleri üzerine senkronizasyon protokollerinin etkisi bulunmamaktadır. Ayrıca fetal ölümler ile gebelik ve konsepsiyon oranları bakımından da iki senkronizasyon grubu arasındaki sonuçların benzer olduğu tespit edilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Balhara AK, Gupta M, Singh S, Mohanty AK, Singh I. Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. *The Scientific Worl Journal*, 2013; 2013:1-10.
2. Fricke PM, Ricci A, Giordano JO, Carvalho PD. Methods for and implementation of pregnancy diagnosis in dairy cows. *Vet Clin Food Anim* 2016; 32: 165-80.
3. Bekele N, Addis M, Abdela N, Ahmed WM. Pregnancy diagnosis in cattle for fertility management: a review. *Global Veterinaria*, 2016; 16(4): 355-64.
4. Pohler KG, Franco GA, Reese ST, Dantas FG, Ellis MD, Payton RR. Past, present and future of pregnancy detection methods. *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 2016; September 7-8, DesMoines, Iowa.
5. 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. Fert.* 1997; 109: 53-8.
6. López-Gatius F, Garbayo JM, Santolaria P, Yaniz J, Ayad A, deSousa NM, Beckers JF. Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2007; 32: 29–42.
7. Ricci A, Carvalho PD, Amundson MC, Fourdraine RH, Vincenti I, Fricke PM. Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. *J Dairy Sci.* 2015; 98: 2502–14.
8. Serrano B, López-Gatius F, Santolaria P, Almería S, García-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Sulon J, De Sousa NM, Beckers JF, Yániz YL. Factors affecting plasma pregnancy-associated glycoprotein 1 concentrations throughout gestation in high-producing dairy cows. *Reprod. Dom. Anim.* 2009; 44: 600–5.
9. Mercadante PM, Waters KM, Mercadante VR, Lamb GC, Elzo MA, Johnson SE, Rae DO, Yelich JV, Ealy AD. Subspecies differences in early fetal development and plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations in cattle. *J Anim. Sci.* 2013; 91(8):3693-701.
10. Patel OV, Sulon J, Beckers JF, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N, Domeki I. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *Eur. J Endocrinol.* 1997; 137(4):423-8.
11. Vasques MI, Horta AEM, Marques CC, Sasser RG, Humblot P. Levels of bPSPB throughout single and twin pregnancies after AI or transfer of IVM/IVF cattle embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 1995; 38(4): 279-89.
12. Lobago F, Bekana M, Gustafsson H, Beckers JF, Yohannes G, Aster Y, Kindahl H. Serum profiles of pregnancy-associated glycoprotein, oestrone sulphate and progesterone during gestation and some factors influencing the profiles in Ethiopian Borana and crossbred cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 2009; 44(4):685-92.

13. Mercadante PM, Ribeiro ES, Risco C, Ealy AD. Associations between pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy outcomes, milk yield, parity, and clinical diseases in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 2016; 99(4): 3031-40.
14. López-Gatius F, Hunter RH, Garbayo JM, Santolaria P, Yániz J, Serrano B, Ayad A, de Sousa NM, Beckers JF. Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) in high producing dairy cows suffering early fetal loss during the warm season. *Theriogenology* 2007; 67: 1324–30.
15. Pohler KG, Geary TW, Johnson CL, Atkins JA, Jinks EM, Busch DC, Green JA, MacNeil MD, Smith MF. Circulating bovine pregnancy associated glycoproteins are associated with late embryonic/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. *J Anim. Sci.* 2013; 91:4158–67.
16. Franco GA, Peres RFG, Martins CFG, Vasconcelos JLM, Pohler KG. Sire effect of pregnancy associated glycoprotein (PAG) concentrations in Nelore beef cows. *J Anim. Sci.* 2017; 95, Supp. 1, 40.
17. Youngquist RS. Pregnancy Diagnosis. In: Youngquist RS, Threlfall WR, eds. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* Saunders-Elsevier, USA, 2007; 294–303.
18. Cowie AT. *Pregnancy Diagnosis Tests: A Review.* Commonwealth Agricultural Bureaux, Joint Publication, Number 13, 1948.
19. Ducharme N, Gilbert R, Smith DF. Atresia coli: genetics or iatrogenics? *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology.* 1990.
20. Romano JE, Thompson JA, Kraemer DC, Westhusin ME, Forrest DW, Tomaszewski MA. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology* 2007; 67: 486–93.
21. Fricke PM. Scanning the future –ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2002; 85:1918-26.
22. Vural R, Güzeloğlu A, Küplülü Ş. Gebelik ve Fizyolojisi. In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A, eds. *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji.* 2. baskı, Medipres, Malatya, 2012; 125-55.
23. DesCôteaux L, Colloton J, Gayrard V, Picard-Hagen N. Bovine Pregnancy. In DesCôteaux L, Colloton J, Gnemmi G, eds. *Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography.* Willey Blackwell, Hong Kong, 2010; 81-124.
24. Alaçam E. Gebelik Tanısı. In: Alaçam E, eds. *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite.* 8. Baskı, Medisan, Ankara. 2015, 115-26.
25. Hoffman B, Wagner WC, Hixon JE, Bahr J. Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow. *Anim Reprod Sci.* 1979; 2(3-4):253-66.
26. Robertson H, King GJ. Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy. *J Reprod Fert.* 1979; 55:463-70.
27. Echemkamp SE. Relationship between placental development and calf birth weight in beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1993; 32(1-2):1-13.

28. Hirako M, Takahashi T, Domeki I. Peripheral changes in estrone sulfate concentration during the first trimester of gestation in cattle: comparison with unconjugated estrogens and relationship to fetal number. *Theriogenology*, 2002; 57(7):1939-47.
29. Ohnuma K, Kazuei ITO, Miyake YI, Takahashi J, Yasuda Y. Detection of early pregnancy factor (EPF) in mare sera. *J Reprod. Dev.* 1996; 42(1): 23–8.
30. Morton H, Hegh V, Clunie GJA. Studies of the rosette inhibition test in pregnant mice: evidence of immunosuppression? *Proceedings of the Royal Society B*, 1976; 193:413–9.
31. Sakonju I, Enomoto S, Kamimura, S, Hamana K. Monitoring bovine embryo viability with early pregnancy factor. *J Vet. Med. Sci.* 1993; 55: 271-4.
32. Youngquist RS. Pregnancy diagnosis using palpation, ultrasound, and blood testing. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 30-31 August 2006, St. Joseph, Missouri.
33. Gandy B, Tucker W, Ryan P, Williams A, Tucker A, Moore A, Godfrey R, Willard S. Evaluation of the early conception factor (ECF_{tm}) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 637-47.
34. Ghaffarilaleh V, Ghaffarilaleh R, Pirany N, Ahrabi MM. Measurement of EPF for detection of cow pregnancy using rosette inhibition test. *Theriogenology*, 2008; 70(1):105-7.
35. Cain AJ, Christiansen D. Biochemical Pregnancy Diagnosis. In. Hopper RM, eds. *Bovine Reproduction*. 1th ed. Wiley Blackwell, Pondicherry, India. 2015; 320-325.
36. Güzeloğlu A. İneklerde gebeligin maternal kabulü sürecinde anti-luteolizisin moleküler mekanizması. *Vet. Bil. Derg.* 2006; 22(1-2): 83-8.
37. Ahmad SF, Panigrahi M, Bhushan B. MicroRNAs in farm animal reproduction: a mini review. *SKUAST Journal of Research* 2017; 19(1): 1-11.
38. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee M J, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*, 2010; 56(11): 1733-41.
39. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2011; 80: 193-208.
40. Cameron A, da Silveira JC, G Bouma, Bruemmer JE. Evaluation of exosomes containing miRNA as an indicator of pregnancy status in the mare. *J Equine Vet. Sci.* 2011; 31(5-6):314-5.
41. Ioannidis J, Donadeu FX. Circulating miRNA signatures of early pregnancy in cattle. *BMC Genomics*, 2016; 17:184-196.
42. Hossain MM, Salilew-Wondim D, Schellander K, Tesfaye D. The role of microRNAs in mammalian oocytes and embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 2012; 134(1): 36-44.
43. Ioannidis J, Donadeu FX. Changes in circulating microRNA levels can be identified as early as day 8 of pregnancy in cattle. *PloS one*, 2017; 12(4), e0174892.

44. Green JA, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, Beckers JF, Roberts RM. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol. Reprod.* 2000; 62:1624-31.
45. Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, Ortiz WB, Beckers JF. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.* 1992; 46(1): 83-92.
46. Green JA, Parks TE, Avasle MP, Telugu BP, McLain AL, Peterson AJ, McMillan W, Mathialagan N, Hook RR, Xie S, 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: 1481–503.
47. Friedrich M, Holtz W. Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. *Reprod. Domest. Anim.* 2010; 45(1): 142-6.
48. Roberts JN, Byrem TM, Grooms DL. Application of an ELISA milk pregnancy test in beef cows. *Reprod. Dom. Anim.* 2015; 50: 651-8.
49. Romano JE, Larson JE. Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Theriogenology.* 2010; 74(6):932-9.
50. Silva E, Sterry RA, Kolb D, Mathialagan N, McGrath MF, Ballam JM, Fricke PM. Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 4612-22.
51. LeBlanc SJ. Short communication: field evaluation of a pregnancy confirmation test using milk samples in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2013; 96:2345–8.
52. Commun L, Velek K, Barbry JB, Pun S, Rice A, Mestek A, Egli C, Leterme S. Detection of pregnancy-associated glycoproteins in milk and blood as a test for early pregnancy in dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2016; 28(3): 207-13.
53. Kaya MS, Bademkiran S, Köse M, uçar EH, Mutlu H, Atlı MO. Sığırlarda gebelikle ilişkili glikoproteinlerin tespitinde kullanılan iki test kitinin karşılaştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 2017; 12(1): 45-53.
54. Wallace RM, Pohler KG, Smith MF, Green JA. Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. *Reproduction,* 2015; 149(3):115-26.
55. Sousa NM, Ayad A, Beckers JF, Gajewski Z. Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2006; 57, Supp 8: 153-71.
56. Butler JE, Hamilton WC, Sasser RG, Ruder CA, Hass GM, Williams RJ. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol Reprod.* 1982; 26:925-33.
57. Mialon MM, Camous S, Renand G, Martal J, Menissier F. Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 1993; 33:269-82.

58. Atkinson YH, Gogolin-Ewens KJ, Hounsel EF, Davies MJ, Brandon MR, Seamark RF. Characterization of placentation-specific binucleate cell glycoproteins possessing a novel carbohydrate. *J Biol. Chem.* 1993; 268: 26679-85.
59. Roberts RM, Green JA, Schulz LC. The evolution of the placenta. *Reproduction.* 2016; 152(5):R179-89.
60. Telugu BP, Green JA. Comparative Placentation. In: Schatten H, Constantinescu GM, eds. *Comparative Reproductive Biology.* Blackwell, Iowa, USA, 2007, 271-319.
61. Gillespie JR, Uversky VN. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1480(1-2):41-56.
62. Zoli AP, Beckers JF, Wouters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol Reprod* 1991; 45:1-10.
63. Garbayo JM, Serrano B, Lopez-Gatius F. Identification of novel pregnancy-associated glycoproteins (PAG) expressed by the peri-implantation conceptus of domestic ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 103:120-34.
64. El Amiri B, Remy B, Sousa NM, Joris B, Ottiers NG, Perenyi Z, Mboko HB, Beckers JF. Isolation and partial characterization of three pregnancy associated glycoproteins from the ewe placenta. *Mol. Reprod. Dev.* 2003; 64: 199-206
65. El Amiri B, Remy B, de Sousa NM, Beckers JF. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high levels in the ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reprod. Nutr. Dev.* 2004; 44: 169–81.
66. Garbayo JM, Remy B, Alabart JL, Folch J, Wattiez R, Falmagne P, Beckers JF. Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biol. Reprod.* 1998; 58:109-115.
67. Garbayo JM, Green JA, Manikkam M, Beckers JF, Kiesling DO, Ealy AD, Roberts RM. Caprine pregnancy-associated glycoproteins (PAG): their cloning, expression, and evolutionary relationship to other PAG. *Mol. Reprod. Dev.* 2000; 57: 311-22.
68. Barbato O, Sousa NM, Klisch K, Clerget E, Debenedetti A, Barile VL, Malfatti A, Beckers JF. Isolation of new pregnancy-associated glycoproteins from water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta by *Vicia villosa* affinity chromatography. *Res. Vet. Sci.* 2008; 85: 457–66.
69. Sousa NM, Remy B, El Amiri B, De Figueiredo JR, Banga-Mboko H, Dias Gonçalves PB, Beckers JF. Characterization of pregnancy-associated glycoproteins extracted from zebu (*Bos indicus*) placentas removed at different gestational periods. *Reprod. Nutr. Dev.* 2002; 42: 227–41.
70. Majewska M, Panasiewicz G, Klisch K, Olivera LVM, Mamani JM, Abd-Elnaeim MM, Szafranska B. Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) family: transcripts and gene amplicons in camelids. *Reprod. Biol.* 2009; 9(2): 127-50.
71. Majewska M, Panasiewicz G, Szafranska B. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family localized in chorionic cells within the epitheliochorial/diffuse placenta of the alpaca (*Lama pacos*) *Acta Histochem.* 2011; 113: 570–7.

72. Bériot M, Tchimbou AF, Barbato O, Beckers JF, de Sousa NM. Identification of pregnancy-associated glycoproteins and alpha-fetoprotein in fallow deer (*Dama dama*) placenta. *Acta Vet. Scan.* 2014; 56(4):1-11.
73. Brandt GA, Parks TE, Killian G, Ealy AD, Green JA. A cloning and expression analysis of pregnancy-associated glycoproteins expressed in trophoblasts of the white-tail deer placenta. *Mol. Reprod. Dev.* 2007; 74:1355–62.
74. Telugu PB, 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; 10:185-202.
75. Hughes AL, Green JA, Garbayo JM, Roberts RM. Adaptive diversification within a large family of recently duplicated, placentally expressed genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 3319-23.
76. Hughes AL, Green JA, Piontkivska H, Roberts RM. Aspartic proteinase phylogeny and the origin of pregnancy-associated glycoproteins. *Mol. Biol. Evol.* 2003; 20(11):1940–45.
77. Davies DR: The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1990; 19:189-215.
78. Xie S, Low BG, Nagel RJ, Kramer KK, Anthony RV, Zolit AP, Beckerst JF, Roberts RM. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88:10247-51.
79. Xie S, Low BG, Nagel RJ, Beckers JF, Roberts RM. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoblast. *Biol. Reprod.* 1994; 51:1145-53.
80. Szecsi PB: The aspartic proteases. *Scand. J Clin. Lab. Invest.* 1992; Suppl, 210: 5-22.
81. Tang J, Wong RN. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem.* 1987; 33:53-63.
82. Klisch K, De Sousa NM, Beckers JF, Leiser R, Pich A. Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and -17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 2005; 71(4):453-60.
83. Wooding FB, Roberts RM, Green JA: Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta* 2005; 26:807-27.
84. Telugu BP, Green JA: Characterization of the peptidase activity of recombinant porcine pregnancy-associated glycoprotein-2. *J Biochem.* 2008;144:725-32.
85. Telugu BP, Palmier MO, Van Doren SR, Green JA. An examination of the proteolytic activity for bovine pregnancy-associated glycoproteins 2 and 12. *Biol. Chem.* 2010;391:259-70.
86. Moussad EE, Rageh MA, Wilson AK, Geisert RD, Brigstock DR. Temporal and spatial expression of connective tissue growth factor (CCN2;CTGF) and transforming growth

- factor beta type 1 (TGF-beta1) at the utero-placental interface during early pregnancy in the pig. *Mol. Pathol.* 2002; 55:186-92.
87. Munger JS, Harpel JG, Giancotti FG, et Rifkin DB. Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin alphavbeta1. *Mol Biol Cell* 1998; 9:2627-38.
 88. Green JA, Xie S, Roberts RM. Pepsin-related molecules secreted by trophoblast. *Rev. Reprod.* 1998; 3:62-9.
 89. Dosogne H, Massart-Leen AM, Bervenich C. Immunological Aspects of Pregnancy-Associated Glycoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000; 480:295-305.
 90. Hoeben D, Burvenich C, Massart-Leen AM, Lenjou M, Nijs G, Van Bockstaele D, Beckers JF. In vitro effect of ketone bodies, glucocorticosteroids and bovine pregnancy-associated glycoprotein on cultures of bone marrow progenitor cells of cows and calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999; 68:229-40.
 91. Austin KJ, King CP, Vierk JE, Sasser RG, Hansen TR. Pregnancy-specific protein B induces release of an alpha chemokine in bovine endometrium. *Endocrinol.* 1999; 140:542-5.
 92. Mathialagan N, Hansen TR. Pepsin-inhibitory activity of the uterine serpins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996; 93(24):13653-58.
 93. Del Vecchio RP, Sutherland WD, Sasser RG: Bovine luteal cell production in vitro of prostaglandin E2, oxytocin and progesterone in response to pregnancy-specific protein B and prostaglandin F2 alpha. *J Reprod. Fertil.* 1996;107:131-6.
 94. Weems YS, Lammoglia MA, Vera-Avila HR, Randel RD, King C, Sasser RG, Weems CW: Effect of luteinizing hormone (LH), PGE2, 8-EPI-PGE1, 8-EPI-PGE2, trichosanthin, and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of progesterone in vitro by corpora lutea (CL) from nonpregnant and pregnant cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1998; 55:27-42.
 95. Weems YS, Lammoglia MA, Vera-Avila HR, Randel RD, Sasser RG, Weems CW. Effects of luteinizing hormone (LH), PGE2, 8-Epi-PGE1, 8-Epi-PGF2 alpha, trichosanthin and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of prostaglandin (PG) E (PGE) or F2 alpha (PGF2alpha) in vitro by corpora lutea (CL) from nonpregnant and pregnant cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1998; 55:359-36.
 96. Egen TE, Ealy AD, Landon LA, Roberts RM, Green JA. Autoimmunization of ewes against pregnancy-associated glycoproteins does not interfere with the establishment and maintenance of pregnancy. *Animal* 2009; 3:850-7.
 97. Perényi ZS, Szenci O, Sulon J, Drion PV, Beckers JF. Comparison of the Ability of Three Radioimmunoassay to Detect Pregnancy-associated Glycoproteins in Bovine Plasma. *Reprod. Dom. Anim.* 2002; 37(2):100-4.
 98. Haugejorden G, Waage S, Dahl E, Karlberg K, Beckers JF, Ropstad E. Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring. *Theriogenology.* 2006; 66(8):1976-84.

99. Szenci O, Beckers JF, Sulon J, Bevers MM, Börzsönyi L, Fodor L, Kovács F, Taverne MA. Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profiles of pregnancy associated glycoprotein 1 in heifers. *Vet. J* 2003; 165(3):307-13.
100. Kaya MS, Köse M, Bozkaya F, Mutlu H, Uçar EH, Atlı MO. Early pregnancy diagnosis using a commercial ELISA test based on pregnancy-associated glycoproteins in Holstein-Friesian heifers and lactating cows. *Turk. J Vet. Anim. Sci.* 2016; 40:1-6.
101. Echtenkamp SE, Vonnahme KA, Green JA, Ford SP. Increased vascular endothelial growth factor and pregnancy-associated glycoproteins, but not insulin-like growth factor-I, in maternal blood of cows gestating twin fetuses. *J Anim. Sci.* 2006; 84: 2057–64.
102. Ayad A, Sousa NM, Sulon J, Hornick JL, Watts J, Lopez-Gatius F, Iguer-Ouada M, Beckers JF. Influence of progesterone concentrations on secretory functions of trophoblast and pituitary during the first trimester of pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 2007; 67:1503–11.
103. Barbato O, Merlo M, Celi P, Sousa NM, Guarneri L, Beckers JF, Gabai G. Relationship between plasma progesterone and pregnancy-associated glycoprotein concentrations during early pregnancy in dairy cows. *Vet. J*, 2013; 195(3):385-387.
104. Roberts JN, May KJ, Veiga-Lopez A. Time-dependent changes in pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in commercial crossbred sheep. *Theriogenology*, 2017; 89: 271-9.
105. Pohler KG, Pereira MH, Lopes FR, Lawrence JC, Keisler DH, Smith MF, Vasconcelos JL, Green JA. Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. *J Dairy Sci.* 2016, 99(2): 1584-94.
106. Pohler KG, Peres RF, Green JA, Graff H, Martins T, Vasconcelos JL, Smith MF. Use of bovine pregnancy-associated glycoproteins to predict late embryonic mortality in postpartum Nelore beef cows. *Theriogenology*. 2016; 85(9):1652-9.
107. Breukelman SP, Z, Taverne MA, Jonker H, van der Weijden GC, Vos PL, de Ruigh L, Dieleman SJ, Beckers JF, Szenci O. Characterisation of pregnancy losses after embryo transfer by measuring plasma progesterone and bovine pregnancy-associated glycoprotein-1 concentrations. *Vet. J*, 2012; 194(1):71-76.
108. Pohler KG, Peres RFG, Green JA, Moley LA, Doran KM, Graff HB, Vasconcelos JLM, Smith MF. The effect of sire on circulating concentrations of bovine pregnancy associated glycoproteins (bPAGs) in beef cows. *Proceedings of the 28th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*. 14-17 August 2014, Natal, RN, Brazil, p. 375.
109. Breukelman SP, Perényi Z, de Ruigh L, van Wagendonk-de Leeuw AM, Jonker FH, Vernooij JC, Beckers JF, van der Weijden GC, Vos PL, Dieleman SJ, Taverne MA. Plasma concentrations of bovine pregnancy-associated glycoprotein (bPAG) do not differ during the first 119 days between ongoing pregnancies derived by transfer of in vivo and in vitro produced embryos. *Theriogenology*. 2005, 63(5):1378-89.
110. Thompson IM, Tao S, Branen J, Ealy AD, Dahl GE. Environmental regulation of pregnancy-specific protein B concentrations during late pregnancy in dairy cattle. *J Anim. Sci.* 2013: 1:168–73.

111. Pohler KG, Gatea AO, Peres RFG, Pereira MHC, Vasconcelos JLM. Application of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) to improve reproductive efficiency in cattle. *Clinical Theriogenology*, 2015. 7(3): 215-221. Proceedings of the Society for Theriogenology Annual Conference, Aug. 5 – 9, San Antonio, TX, USA.
112. Gábor G, Tóth F, Ozsvári L, Abonyi-Tóth Z, Sasser RG. Early detection of pregnancy and embryonic loss in dairy cattle by ELISA tests. *Reprod. Domest. Anim.* 2007; 42(6):633-6.
113. Szelényi Z, Répási A, de Sousa NM, Beckers JF, Szenci O. Accuracy of diagnosing double corpora lutea and twin pregnancy by measuring serum progesterone and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 in the first trimester of gestation in dairy cows. *Theriogenology*, 2015; 84(1), 76-81.
114. García-Ispuerto I, Rosselló-Visa MA, Serrano-Pérez B, Mur-Novales R, de Sousa NM, Beckers JF, López-Gatius F. Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoproteins I and II and progesterone on day 28 post-AI as markers of twin pregnancy in dairy cattle. *Livestock Science*, 2016; 192, 44-47.
115. Kasimanickam R. Pharmacological Intervention of Estrus Cycles. In Hopper RM, eds. *Bovine Reproduction*. Iowa, Wiley Blackwell, 2015; 304-313.
116. Köse M, Bülbül B, Kırbaş M, Dursun Ş, Çolak M. Dondurulmuş Sığır Embriolarının Transferinden Elde Edilen Gebelik Oranı Üzerine Taşıyıcı Senkronizasyon Protokolünün Etkisi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 2012; 7(3): 185-92.
117. Adams GP, Singh J. Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. In Hopper RM, eds. *Bovine Reproduction*. Iowa, Wiley Blackwell. 2015; 219-244.
118. Kastelic JP, Knopf L, Ginther, OJ. Effect of day of prostaglandin treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 1990; 23:169–80.
119. Çolak, A. Üreme Fizyolojisi ve Endokrinoloji In: Alaçam E, eds. *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*, 8. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, 2015, 15-22.
120. Kalkan C, Öcal H. Üreme fizyolojisi. In. Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A, eds. *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji*. 2. Baskı, Medipres, Malatya, 2012, 15-57.
121. Noakes DE. Endogenous and Exogenous Control of Ovarian Cyclicity. In. Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, eds. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, Ninth ed. United Kingdom. Saunders Elsevier, 2009; 3-58.
122. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2a} and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44: 915-23.
123. Colazo MG, Mapletoft RJ. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can. Vet. J.* 2014; 55(8):772-80.
124. Hall JB, Liles A, Whitter WD. Estrus synchronization for heifers. Virginia Cooperative Extension, Publication 2009; 400-302:1-7.

125. Islam R. Synchronization of estrus in cattle: a review. *Veterinary World*, 2011; 4(3):136-41.
126. Semacan A, Pancarcı ŞM, Üremenin Denetlenmesi. In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A, eds. *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji*. 2. Baskı, Medipres, Malatya, 2012, 99-124.
127. Macmillan KL Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *J Reprod. Dev.* 2010; 56:S42-S47.
128. Macmillan KL, Henderson HV Analysis of the variation in the interval from the injection of the prostaglandin F_{2α} to estrus as method of studying patterns of follicle development during diestrus in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1984; 6(4):245-254.
129. Fogwell RL, Reid WA, Thompson CK, Thome MJ, Morrow DA. Synchronization of Estrus in Dairy Heifers: A Field Demonstration. *J Dairy Sci.* 1986; 69(6), 1665-72.
130. Colazo MG, Gordon MB, Rajamahendran R, Mapletoft RJ, Ambrose DJ. Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with gonadotropin releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology*, 2009;72:262–70.
131. Vasconcelos JLM, Silcox RW, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999; 52:1067–78.
132. Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F and Thatcher WW Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2001; 84:1646–59.
133. Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 2008; 70:208–15.
134. Bello NM, Steibel JP and Pursley JR Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2006; 89:3413–24.
135. Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *PNAS*, 2005, 102:5268–73.
136. Atkins JA, Smith MF, Wells KJ, Geary TW. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part I: Cycling cows. *J Anim. Sci.* 2010; 88(7), 2300-10.
137. Atkins JA, Smith MF, Wells KJ, Geary TW. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part II: Anestrous cows. *J Anim. Sci.* 2010; 88(7):2311-20.
138. Lamb GC, Larson JE, Dahlen CR. Estrus synchronization protocols for cows. *Proc. Appl. Reprod. Strateg. Beef Cattle*, 11-12 September 2007, Billings, Montana, USA, 99-114.

139. Nagappan M, McGrath M, Schenkel R. Inventors. Methods for early detection of pregnancy in cows. Monsanto Technology LLC, assignee. 2009; US Pat. No. 7,604,950 B2.
140. Kastelic JP. Critical evaluation of scientific articles and other sources of information: an introduction to evidence-based veterinary medicine. *Theriogenology*, 2006; 66:534-42.
141. Xu ZZ, Burton LJ, Macmillan KL. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF 2α and progesterone. *Theriogenology*, 1997; 47(3):687-701.
142. King GJ, Robertson HA. A two injection schedule with prostaglandin F 2α for the regulation of the ovulatory cycle of cattle. *Theriogenology*, 1974; 1(3):123-8.
143. Geary TW, Whittier JC, Thrift FA, Dolezal SL. Effects of a timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or CO-Synch protocol in beef cows. *The Professional Animal Scientist*, 1998; 14(4):217-20.
144. Dahlen CR, Lamb GC, Zehnder CM, Miller LR, DiCostanzo A. Fixed-time insemination in peripuberal, lightweight replacement beef heifers after estrus synchronization with PGF 2α and GnRH. *Theriogenology*, 2003; 59: 1827- 37.
145. Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci.* 1997; 80:295-300.
146. Kara U, Ayaşan T, Hızlı H, Gök K. Ovsynch protokolünün inek ve düvelerin gebelik oranı üzerine etkisi. *Erciyes Üniversitesi Vet. Fak. Derg.* 2011; 8(1):1-8.
147. Tenhagen BA, Surhold R, Wittke M, Vogel C, Drillich M, Heuwieser W. Use of ovsynch in dairy herds-differences between primiparous and multiparous cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 82: -11.
148. Demiral O, Ün M, Abay M, Bekyürek T, Öztürk A. The effectiveness of cosynch protocol in dairy heifers and multiparous cows. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2006; 30(2):213-7.
149. Thompson AW, Holladay CD, Eborn DR, Grieger DM. Timed artificial insemination in yearling beef heifers: 7-11 Cosynch VS. Cosynch. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports, Cattleman's Day*, 2003; 1:103-4
150. Grieger DM, Holladay CD, Eborn DR. Timed-insemination of beef heifers using Cosynch with one or two initial injections of GnRH. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports, Cattleman's Day*, 2002; 1:119-20.
151. Wickersham TA, Cochran RC, Grieger DM. Timed-insemination of beef heifers using Cosynch with or without MGA. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports, Cattleman's Day*, 2001; 1:15-6.
152. Rabiee AR, Lean IJ, Stevenson MA. Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: A meta-analysis. *J Dairy Sci.* 2005; 88(8):2754-70.

153. 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*, 2018; 106:178-85.
154. Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 96(3):297-311.
155. López-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Garbayo JM, Hunter RHF. Timing of early fetal loss for single and twin pregnancies in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 2004; 39:429–33.



8. EKLER

EK-1: ETİK KURUL RAPORU

DOLLVET A.Ş.

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DOLLVET-HADYEK)

Karar No : 2016/26

Konu : Yerel Etik Kurul Kararı

25.08.2016 tarihinde kurulumuza yapmış olduğunuz “ Kan ve Süt Gebelik Glikoproteinleri Üzerine Senkronizasyon Protokollerinin Etkisi ” isimli HÜBAK projenizde yapacağınız hayvan denemeleri kurulumuza taahhitle bulunduğunuz çerçeve dâhilinde olması şartı ile uygun bulunmuştur.

Yapılan başvuru formunun incelenmesi sonucu çalışmanın uygun olduğu görüşüne oy birliğince karar verilmiştir.

Dr. Hüseyin ZENGİN
Sorumlu Yönetici

Hülya KAPLAN
Veteriner Hekim
Deney Hayvanları Üretim ve
Araştırma Laboratuvarı
Sorumlusu

Dr. Nilay ÜNAL
Veteriner Hekim
Kalite Güvence Birimi
Sorumlusu

Cahit BAYBURS
Veteriner Hekim
Üretim Sorumlusu

Müzeyyen KENDİRCİ
Veteriner Hekim
Kalite Kontrol Birimi
Sorumlusu

Rojda KIZILTAŞ
Veteriner Hekim
Hayvan Refahı Birimi
Sorumlusu

İbrahim YAŞAR
Biyolog
Bakteriyel Aşılar Üretim
Laboratuvarı

Ramazan ABİKOĞLU
Biyolog
Parazites Aşılar Üretim
Laboratuvarı Sorumlusu

Ahmet Özgür YAHLIZADE
Veteriner Hekim
Damızlık Sığır Yetiştiricileri
Birliği Üyesi
Sivil Üye (T.C. Vatandaşı)

Aziz YALÇIN
Veteriner Hekim
Süt Üreticileri Birliği Üyesi
Sivil Üye (T.C. Vatandaşı)

EK-2: İNTİHAL RAPORU

GEBELİK GLİKOPROTEİNLERİ ÜZERİNE SENKRONİZASYON PROTOKOLLERİNİN ETKİSİ

ORIGINALITY REPORT

5%

SIMILARITY INDEX

3%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

e-dergi.atauni.edu.tr

Internet Source

1%

2

GÜLCÜ, Aylın, AKKOÇLU, Atila, YILMAZ, Erkan, ÖZTÜRK, Berat, OSMA, Emine and ŞENGÜN, Belgin. "Pulmoner emboli tanısında klinik olasılıkların bilgisayarlı tomografi pulmoner anjiyografi bulguları ile karşılaştırılması", Türk Tüberküloz ve Toraks Derneği, 2007.

Publication

<1%

3

www.asas.org

Internet Source

<1%

4

Submitted to TechKnowledge Turkey

Student Paper

<1%

5

www.akademik.adu.edu.tr

Internet Source

<1%

6

BAKİ ACAR, Duygu. "Melez Irk Bir Köpekte Yalancı Erkek Hermafrodizm Olgusu", Afyon

<1%

Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
2016.

Publication

7	acikarsiv.ankara.edu.tr Internet Source	<1 %
8	okul.selyam.net Internet Source	<1 %
9	GÜZELOĞLU, Aydın. "İneklerde gebeliği maternal kabulü sürecinde anti-luteolizisin moleküler mekanizması", Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2006. Publication	<1 %
10	KÖSE, Mehmet, BÜLBÜL, Bülent, KIRBAŞ, Mesut, DURSUN, Şükrü and ÇOLAK, Mehmet. "Dondurulmuş sığır embriyolarının transferinden elde edilen gebelik oranı üzerine taşıyıcı senkronizasyon protokolünün etkisi", Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2012. Publication	<1 %
11	www.freepatentsonline.com Internet Source	<1 %
12	docplayer.net Internet Source	<1 %
13	fbeh Haber.com Internet Source	<1 %

14	J. A. Burton-MacLeod. "Evaluation and Comparison of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Detection of Antigenically Diverse Human Noroviruses in Stool Samples", Journal of Clinical Microbiology, 06/01/2004 Publication	<1%
15	Submitted to Harran Üniversitesi Student Paper	<1%
16	BENLİ, Erdal and ÖZGÜR, Güner Kemal. "Mesane tümörlerinin erken tanısında ve takibinde NMP22 bladderçek testinin yeri", Tıp Araştırmaları Derneği, 2010. Publication	<1%
17	F Lopez-Gatius. "Timing of Early Foetal Loss for Single and Twin Pregnancies in Dairy Cattle", Reproduction in Domestic Animals, 12/2004 Publication	<1%
18	www.journalagent.com Internet Source	<1%
19	repositorio.pucrs.br Internet Source	<1%
20	Dimitris Sanidas. "Activation of human leukocytes by acute hypoxia", Experimental Physiology, 05/2000	<1%

Publication

21	www.mku.edu.tr Internet Source	<1%
22	aves.istanbul.edu.tr Internet Source	<1%
23	kutuphane.nku.edu.tr Internet Source	<1%
24	ÇETİN, Seval and GÜRCAN, İ. Safa. "Kahverengi ve beyaz yumurtacı hibrit tavuk yemlerine istiridye kabuğu ilavesinin yumurta kabuk kalitesine ve serum kalsiyum düzeyine etkileri", Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, 2006. Publication	<1%
25	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 Internet Source	<1%
26	EMRE, Birten, ZONTURLU, K. Abuzer and KORKMAZ, Ömer. "Sütçü ineklerde ovsynch protokolünü takiben uygulanan flunixin meglumin in gebelik oranı üzerine etkisi", Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eyyübiye Kampüsü 63200 Şanlıurfa, 2012. Publication	<1%
27	www.nobelmedicus.com Internet Source	<1%

28 ALICI, Tuğrul, ESENYEL, Cem Zeki, ESENYEL, Meltem, İMREN, Yunus, AYANOĞLU, Semih and ÇUBUK, Rahmi. "Relationship between meniscal tears and tibial slope on the tibial plateau", TUBITAK, 2011. <1%

Publication

29 Vincenzo Chiofalo. "Effects of the administration of *Lactobacilli* on body growth and on the metabolic profile in growing Maltese goat kids", Reproduction Nutrition Development, 09/2004 <1%

Publication

30 Oreshkova, Nadia, Lucien van Keulen, Jet Kant, Rob J. M. Moormann, and Jeroen Kortekaas. "A Single Vaccination with an Improved Nonspreading Rift Valley Fever Virus Vaccine Provides Sterile Immunity in Lambs", PLoS ONE, 2013. <1%

Publication

31 "Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi Sözlü Bildiriler", Acta Orthopaedica Traumatologica Turcica, 2014. <1%

Publication

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off

EK-3: ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Mehmet AKKÖSE

2. **Doğum Tarihi:** 22 Temmuz 1988

3. **Unvanı:** Veteriner Hekim

4. **Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Veteriner Hekimliği	Veteriner Hekimliği	Ankara Üniversitesi	2007-2012
Ön lisans	Bitkisel ve Hayvansal Üretim (Tarım Programı)	Anadolu Üniversitesi	2014-2017
Yüksek Lisans	Cerrahi (Vet)	Selçuk Üniversitesi	2014-2017
Yüksek Lisans	Reproduksiyon ve Suni Tohumlama	Harran Üniversitesi	2014-2018

5. **Katıldığı Sertifika Eğitimleri:**

Sertifika Adı	Düzenleyen Kurum	Yıl
Radyoloji Sertifikası	Ankara Üniversitesi	2012
Yan dal Sertifikası (Biyoloji)	Ankara Üniversitesi	2012
Recto-vaginal Yolla Suni Tohumlama Sertifikası	Hayvancılık Genel Müdürlüğü	2013
Embriyo Üretim ve Transfer Sertifikası	Hayvancılık Genel Müdürlüğü	2017
Deney Hayvanları Kullanımı Sertifikası	Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (ANKÜSEM)	2017

6. **Mesleki Deneyim**

Askerlik görevini 01.08.2012 - 31.07.2013 tarihleri arasında Edirne/Uzunköprü’de bulunan 102’nci Topçu Alayı’nda “Muayene ve Kabul Komisyonu Üyesi” olarak tamamladı.

2013 yılında Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Emirdağ (Afyonkarahisar) Gıda Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü’nde yaklaşık 2 ay çalıştı. Buradaki görevinden ayrılarak 17.09.2013 tarihinde Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM)’ne bağlı Ceylanpınar Tarım İşletmesi’nde göreve başladı. Halen aynı işletmede çalışmaktadır.

Sütçü sığırlarda, “reproduksiyon yönetimi, buzağı sağlığı, topallıkların kontrolü, meme sağlığı, besleme yönetim ve sürü immunizasyonu” disiplinlerini kapsayan, sürü sağlığı ve yönetimi alanında çalışmaktadır.

7. Yayınlar:

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

İzci C, Akköse M, Gerçekcioğlu M. Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Yapılan Topallık Skorlaması Sonuçlarının Değerlendirilmesi. 1'inci Uluslararası Türkiye Veteriner Cerrahi Kongresi ve 15'inci Ulusal Veteriner Cerrahi Kongresi, 11-14 Mayıs 2016, Erzurum.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Akköse M, İzci C. 2017. Koyun ve Keçilerde Digital Dermatitis. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimler Dergisi, 12(1):99-110.

Akköse M, İzci C. 2017. Süt İneklerinde Yatma Süresinin Topallıklara Etkisi ve Yatma Süresini Etkileyen Faktörler. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 57(1):44-51

Akköse M, İzci C. 2017. İnek Konforunun Topallıklar Üzerine Etkisi ve Konforun Değerlendirilmesi. Hayvansal Üretim, 58(1):33-45.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Akköse M, Çebi-Şen Ç, İzci C, Kılıç K, Kaya N. PAG-Elisa Gebelik Testlerinin Hayvan Refahı Açısından Değerlendirilmesi. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 05-09 Ekim 2016, Antalya.

Akköse M, Çebi-Şen Ç, Kaya N, Kılıç K. Hemolizin PAG-Elisa Kan Gebelik Testi Sonuçlarına Etkisi. 8. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 05-09 Ekim 2016, Antalya.

8. Projeler

Tamamlanan Projeler

Sütçü Düvelerde Gebeliğin Son Bir Ayındaki Barınak Şartlarının Postpartum Dönemdeki Tırnak Sağlığı Üzerine Etkileri

Devam Eden veya Öneri Aşamasında olan Projeler

Sütçü Düvelerde Gebelik Dönemi ve Barınak Koşullarının Tırnak Lezyonları Üzerine Etkisi

Yenidoğan Buzagalarda Serum İmmunoglobulin G Düzeyinin Tahmininde Refraktometrelerin Güvenilirliği

09.01.2018- Şanlıurfa