

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM ve JİNEKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SÜT İNEKLERİNDE ERKEN GEBELİK TEŞHİSİ AMACIYLA KAN VE
SÜTTE KULLANILAN PAG (PREGNANCY ASSOCIATED
GLYCOPROTEIN) TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.**

Veteriner Hekim Hanefi AYDIN

DOKTORA TEZİ

DOĞUM ve JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ

KONYA-2017

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM ve JİNEKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SÜT İNEKLERİNDE ERKEN GEBELİK TEŞHİSİ AMACIYLA KAN VE
SÜTTE KULLANILAN PAG (PREGNANCY ASSOCIATED
GLYCOPROTEIN) TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.**

Veteriner Hekim Hanefi AYDIN

DOKTORA TEZİ

DOĞUM ve JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ

KONYA-2017

Veteriner Hekim Hanifi AYDIN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mehmet GÜLER
Selçuk Üniversitesi

İmza

Danışman : Prof. Dr. D. Ali Dinç
Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye : Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ
Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye : Prof. Dr. H. Ahmet ÇELİK
Afyon Kocatepe Üniversitesi

İmza

Üye : Doç. Dr. M. Osman ATLI
Dicle Üniversitesi

İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Rutin gebelik teşhisi fertilité kontrol programlarının en önemli parçasıdır. Gebeliğin mümkün olan en erken dönemde belirlenmesi ise ciddi ekonomik kazanç sağlar.

Reprodüktif performansı etkileyen birçok faktör vardır. Bunlardan en önemlileri gönüllü bekleme süresinin hemen sonunda hayvanların tohumlanması, tohumlanan hayvanlarda gebeliğin mümkün olan en kısa sürede belirlenmesi ve gebe olmayan hayvanların da ilk östrüslerinde tekrar tohumlanmasını sağlamaktır. Buzağılama aralığını 12–13 aya ve laktasyon süresini 305 güne denkleme ve maksimum karlılık sağlamak için bu elzemdir.

Hayvanlarda doğum gebe kalma aralığını kısaltmak veya ilk tohumlamada gebe kalmayan hayvanların en kısa sürede yeniden tohumlanmasını sağlamak için öncelikle erken gebelik teşhisi yapılması gerekmektedir. Erken gebelik teşhisi reprodüktif performansı ve karlılığı etkileyen önemli bir faktördür. Gebelik teşhisinin ekonomik yararı; öncelikle gebelik teşhisinin yapıldığı döneme, teşhisin doğruluğuna, embriyonik kayıplar üzerine olan etkisine, östrüs tespit etkinliğine ve hayvan gebe değilse nasıl bir önlem alınacağına bağlıdır.

Son zamanlarda doğruluk oranı yüksek olan PAG testi ile de erken dönemde gebelikler teşhis edilebilmekte ve senkronizasyon ve resenkronizasyon programlarının etkinliği artırılabilir. PAG düzeyi farklı biyolojik sıvılarda (serum, plazma, süt) ve farklı yöntemlerle (RIA, ELISA) ölçülebilmektedir. Ancak kan ve süt değerleri arasında farklılıklar bulunmaktadır ve her iki yöntemin uygulamada avantaj ve dezavantajları vardır. Süt PAG testinin örneklemeler için daha az stres oluşturmaması ve non-invaziv yöntem olması önemli avantaj sayılmaktadır. Sunulan çalışmada kan ve süt PAG ELISA testlerinin etkinliği ve güvenilirliği karşılaştırmalı olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Tez projesinin yürütülmesi içine materyal temininde işletmesini bize açan EFELER Çiftliği İşletme Müdürü Ziraat Mühendisi Başak Mutlu ERDEM hanımefendiye, ELISA testlerinin uygulama ve değerlendirilmesinde katkı sağlayan Agrilab çalışanlarına, süt PAG ELISA testini temininde katkı sağlayan IDEXX Türkiye Distribütörü DİAGEN Ankara temsilcisi Mehmet GÜLŞEN ve Konya temsilcisi Orhan BÖYÜKELHAN ve Efeler Çiftliği Danışman Veteriner Hekimi Ziya BAĞCIK'a teşekkürlerimizi arz ederiz.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZET	3
2. 1. İneklerde Erken Gebelik Fizyolojisi	3
2. 2. Spermatozoonun Dişi Genital Kanalında Taşınması	3
2. 3. Spermanın Kapasitasyonu	4
2. 4. Fertilizasyon	4
2. 5. Preimplantasyon Döneminde Embriyo	5
2. 6. Zona Pellusida İçindeki Gelişmeler	5
2. 7. Blastosistin Zona Pellusidadan Çıkışı (Hatching) Ve Embriyonun Uzaması Dönemi	6
2. 8. Erken Gebelikte Hormonal Düzen	7
2. 9. Erken Gebelikte Luteolizis.....	8
2. 10. Gebeliğin Tanınması	9
2. 11. Plasantasyon.....	10
2. 12. Yavru Zarları Ve Yavru Keseleri	10
2. 13. İneklerde Gebelik Tanısı	10
2. 13. 1. İneklerde Gözleme Dayalı Gebelik Tanısı	11
2. 13. 2. Rektal palpasyon yöntemi ile gebelik tanısı	12
2. 13. 3. Ultrasonografik görüntüleme yöntemi ile gebelik tanısı.....	13
2. 13. 4. Progesteron düzeyinin belirlenmesi ile gebelik tanısı.....	14
2. 13. 5. Östron sülfat	16
2. 13. 6. Erken gebelik faktörünün belirlenmesi ile gebelik tanısı.....	16
2. 13. 7. miRNA tespiti ile gebelik tanısı	17
2. 13. 8. Serbest dolaşan nükleik asit tespiti ile gebelik tanısı	18
2. 14. Gebelik İlişkili Proteinler	19
2. 15. Gebelik İlişkili Glikoproteinler	19
2. 16. Tek Çekirdekli Trofoblast Hücreler	21

2. 16. 1. Gebeliğin tanınmasındaki görevi	22
2. 16. 2. Fötal beslenmedeki rolü	23
2. 17. Çift Çekirdekli Trofoblast Hücreler	24
2. 17. 1. Konseptüsün implantasyonundaki rolü	26
2. 17. 2. Çift çekirdekli hücrelerin endokrin görevleri.....	28
2. 17. 3. PAG'lerin fizyolojik işlevleri	30
2. 17. 4. Sığırlarda gebelik süresince PAG seviyesi	32
2. 17. 5. Gebelik süresince PAG düzeyini etkileyen faktörler	33
2. 17. 6. Gebelik teşhisi ve izlenmesinde PAG kullanımı.....	34
2. 18. Sütte PAG bulunuşu	34
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	37
3. 1. Materyal	37
3. 2. Yöntem.....	37
3. 2. 1. Östrüs tespiti ve tohumlamalar	37
3. 2. 2. Bakım Şartları	37
3. 2. 3. Beslenme Şartları	37
3. 2. 4. Numunelerinin Alınması.....	38
3. 2. 5. Ultrason Muayenelerinin Gerçekleştirilmesi	38
3. 2. 6. PAG Tayini	39
3. 3. İstatistik analiz	42
3. BULGULAR	43
3. 1. Genel Bulguları	43
3. 2. Kan PAG testi bulguları	43
3. 3. Süt PAG testi bulguları	44
4. TARTIŞMA	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
6. KAYNAKLAR	59
7. ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER ve KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribonükleik asit
ZP	: Zona pellusida
ng	: Nanogram
ml	: Mililitre
P₄	: Progesteron
E₂	: Östrogen
PGF_{2α}	: Prostaglandin F _{2α}
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
IFN-τ	: Interferon tau
CL	: Korpus luteum
PAG	: Gebelikle ilişkili glikoprotein
EPF	: Erken gebelik faktörü
RIA	: Radioimmunoassay
ELISA	: Enzimimmünassay
kDa	: Kilo dalton
bPAG	: Sığır gebelikle ilişkili glikoproteini
PSPB	: Gebeliğe spesifik glikoprotein (gebeliğe özgü protein B)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Memeli embriyosunda gelişim aşamaları.....	6
Şekil 2: Gelişim aşamasındaki blastosist.	20
Şekil 3: Trofoektoderm yapısı.	21
Şekil 4: Bir birine yapışık iki trofoektoderm hücresi.	22
Şekil 5: Çift çekirdekli hücre.	26
Şekil 6: Çift çekirdekli hücre göçü.	27
Şekil 7: Çift çekirdekli hücre göçü ve üç çekirdekli hücre oluşumu.....	27

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1. Ultrasonografi, kan ve süt PAG ELISA yöntemleriyle tespit edilen gebelik bulguları.....	43
Çizelge 3.2. Kan PAG düzeyine göre gebe, gebe olmayan ve şüpheli inek sayıları	44
Çizelge 3.3. Süt PAG düzeyine göre gebe, gebe olmayan ve şüpheli inek sayıları	44
Çizelge 3.4. Kan ve süt PAG testinin duyarlılık, özgüllük, gebe olan ve olmayanları gösterme değeri, doğruluk ve uyumluluk oranları	45

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT İNEKLERİNDE ERKEN GEBELİK TEŞHİSİ AMACIYLA KAN ve SÜTTE KULLANILAN PAG (PREGNANCY ASSOCIATED GLYCOPROTEIN) TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.

Hanefi AYDIN

Veterinerlik Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2017

Sunulan araştırmada, süt ineklerinde kan ve süt örneklerinde PAG-ELISA düzeyinin erken gebelik teşhisindeki etkinliklerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amaçlandı.

Yaşları 3-7 arasında değişen, gönüllü bekleme süresini tamamladıktan sonraki ilk doğal östrüslerinde tohumlanan ve tohumlama sonrası 18-24 günlerde östrüsleri geri dönmeyen 229 baş inek materyal olarak kullanıldı. Erken gebelik teşhisi amacıyla tohumlama sonrası 29. günde ultrasonik muayene yapıldı ve PAG düzeyini belirlemek için aynı gün kan ve süt örnekleri alındı. Kan ve süt örneklerinde PAG düzeyi ticari ELISA kitleri (DG29 Agrilab-TR ve IDEXX Milk Pregnancy Test-DIAGEN AŞ-TR) kullanılarak belirlendi. Ultrasonik muayene referans test olarak kullanıldı.

Kan ve süt PAG-ELISA testinde duyarlılık, özgüllük, gebe ve gebe olmayanları gösterme ve doğruluk oranlarının sırasıyla %93.4, %100, %100, %93.7, %96.7 ve %92, %100, %100, %91.7, %95.8 olduğu bulundu ve her iki test de uyumluluğun mükemmel olduğu gözlemlendi ($\kappa=0.935$ ve 0.919). Kan ve süt PAG-ELISA testlerinin geçerliliği sırasıyla %96.66 ve %95.75 olarak bulundu. Yanlış negatif oranları kan PAG-ELISA testinde %6.6, süt PAG-ELISA testinde %8 olarak bulundu. Yanlış negatiflerin embriyonik ölümlerden kaynaklandığı düşünüldü.

Sonuç olarak, kan PAG-ELISA testinin yanı sıra süt PAG-ELISA testinin de süt ineklerinde erken gebelik teşhisinde güvenilir bir test olduğu kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: ELISA, PAG, erken gebelik teşhisi, inek.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

EVALUATION of the PAG (pregnancy associated glycoprotein) TEST WHICH is USED FOR EARLY PREGNANCY DIAGNOSIS in BLOOD and MILK in DAIRY CATTLE

Hanefi AYDIN

Department of Veterinarian Obstetrics and Gynaecology

PhD THESIS / KONYA-2017

It was aimed to evaluate and compare the effectiveness of PAG level in blood and milk specimens in the early pregnancy diagnosis in dairy cows.

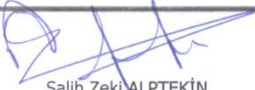
A total of 229 Holstein cows, aged 3-7 years old, inseminated in the first natural oestrus after completed the voluntary waiting period and not returning their estrus at 18-24 days after insemination were used as a material. Ultrasonographic examination was performed on the 29th day after insemination to diagnose of the early pregnancy, and blood and milk samples were collected on the same day to determine PAG level. PAG levels in blood and milk samples were measured using commercial ELISA kits (DG29/AgriLab-TR and IDEXX Milk Pregnancy Test/DIAGEN AŞ-TR). Ultrasonic examination was used as reference test.

The sensitivity, specificity, predictive values and accuracy rates of blood and milk PAG-ELISA test were found to be 93.4%, 100%, 100%, 93.7%, %96.7 and 92%, %100, 100%, %91.7, 95.8%, respectively, and the compliance was excellent in both tests according to the Kappa values ($\kappa=0.935$ and 0.919 respectively). The overall validity of both tests were found out 96.66% and 95.75%, respectively. The false negative rates were found as 6.6% in the blood PAG-ELISA test and 8% in the milk PAG-ELISA test. The false negative results were thought to be caused by embryonic deaths.

It was concluded that milk PAG-ELISA test is a reliable test as well as blood PAG-ELISA test for early pregnancy diagnosis in cows.

Key words: ELISA, PAG, early pregnancy diagnosis, dairy cows.

Ek 8. Etik kurul kararının örneği, varsa tezden üretilmiş yayınlar ve verilmesi gerekli izin belgeleri vs.

Toplantı Tarihi	29.01.2016	Toplantı Sayısı	2016/01	Karar Sayısı	2016/02
S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. D. Ali DİNÇ tarafından sunulan “Süt ineklerinde erken gebelik tespiti amacıyla kan ve sütte kullanılan PAG (pregnancy associated glycoprotein) testinin değerlendirilmesi” başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir. Bu çalışmada kullanılacak süt PAG (pregnancy associated glycoprotein) testinin, zaman ve iş gücünden tasarruf sağlamanın yanı sıra, uygulamanın daha kolay olması nedeniyle bazı stres faktörlerinin ortadan kalkmasına olanak sağlayacağı ifade edilmektedir. Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından “Uygun olduğuna” oy birliği ile karar verilmiştir.					
 Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ Başkan		 Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı			
 Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ Üye		 Doç. Dr. Serdar İZMİRLİ Raportör Üye			
Doç. Dr. Mustafa GARİP Üye (Katılmadı)		Ayşegül KURTBEYOĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi (Katılmadı)		 Salih Zeki ALPTEKİN Sivil Üye	

1. GİRİŞ

Reprodüktif performans sütçü işletmelerin sürdürülebilirliğinde kritik öneme sahiptir. Sütçü işletmelerde tohumlama sonrası gebelik durumunun belirlenmesi reprodüktif yönetim için anahtar role sahiptir. Gebeliğin mümkün olan en erken dönemde ve en güvenilir yöntem ile belirlenmesi önemlidir. Bu önem buzağılama aralığının kısaltılması amacıyla gebe olmayan ineklerin en kısa sürede tespit edilip gebe kalmalarının sağlanması için yeniden tohumlanmasında yatmaktadır. Bu şekilde sürüdeki infertil hayvanlar daha kısa süre içinde belirlenip tedavi edilebilir veya sürüden uzaklaştırılarak ekonomik kayıp azaltılabilir.

Sütçü sığırlarda gebelik teşhisi amacıyla yararlanılan çok sayıda yöntem bulunmaktadır. İşletmelerde gebe olmayan bir ineğin işletmede bekletilmesi ekonomik kayıp oluşturur. Bu nedenle işletmelerde erken gebelik teşhis programı geliştirilerek gebe olmayan bir anlamda problemlili hayvanların tespit edilmesi ve sorunun giderilmesi uygulaması reprodüktif etkinliği artırır.

Uygun bir gebelik teşhis yönteminin doğruluk oranı ve özgüllüğü yüksek, saha şartlarında kolaylıkla uygulanabilir ve maliyeti düşük olmalıdır (Fricke ve ark., 2016). Test aynı zamanda embriyonik veya fetal canlılık ile yavru cinsiyeti hakkında bilgi verirse kullanım ve yararlılığı artar.

Sütçü işletmelerde buzağılama aralığı fertilitenin önemli bir göstergesidir. Östrüslerin tespit edilememesi, erken embriyonik ölüm, yetersiz beslenme ve postpartum anöstrüsün uzun sürmesi gibi nedenler buzağılama aralığının uzamasına neden olur. Tüm bu faktörlerin olumsuz etkilerinin azaltılması veya önlenmesi için işletmelerde erken, spesifik, güvenli, hızlı sonuç veren ve ekonomik bir gebelik teşhis yöntemi kullanılmalıdır.

Memeli plasentası çok sayıda protein ve hormon üretmektedir. Araştırmacıların dikkatini çeken bu ürünlerden bir kısmı gebeliğe özel veya en azından gebelikle ilişkili bulunmuştur. Bu protein yapılı moleküllerden biri de konsepsin tarafından trofoektoderm hücrelerince üretilen gebelikle ilişkili glikoproteinlerdir. Bu

glikoproteininin sığır kan ve süt örneklerinde immunolojik yolla tespit edilmesine imkân veren gebelik teşhis yöntemleri geliştirilmiştir.

Sunulan bu araştırmada; ineklerde tohumlama sonrası kan ve süt örneklerinde PAG düzeyinin gebelik teşhisindeki etkinliklerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZET

2. 1. İneklerde Erken Gebelik Fizyolojisi

Dişi ve erkek cinsiyet hücrelerinin oviduktun ampulla bölgesinde karşılaşılarak, spermatozoonun oosite bileşmesi ve yeni bir canlının başlangıcı olan zigotun oluşmasına fertilizasyon veya fekdasyon denir (Senger 2003). Fertilizasyonun şekillenebilmesi için oositin ve spermatozoonun olgunlaşmaları ve fertilizasyon bölgelerine taşınmaları gerekmektedir (Vural ve ark 2015, García-Vázquez ve ark 2016).

2. 2. Spermatozoonun Dişi Genital Kanalında Taşınması

Ejakulasyon ile anteriyör vajina-serviks bölgesine bırakılan spermatozoonlar ilk olarak serviks engeli ile karşılaşırlar (Suarez ve Pacey 2006, Hytell ve ark 2010, García-Vázquez ve ark 2016). Bu arada aktif spermatozoonlar 1-2 dakikada ovidukta ulaşılır. Buna spermatozoonun hızlı taşınımı denir (Senger 2003, Suarez ve Pacey, 2006, Hytell ve ark 2010). Serviks, patolojik, zayıf ve güçsüz spermatozoonlar için birincil seleksiyon yeridir. Yaşama kabiliyeti yüksek olan spermatozoonlar için ise birinci depo görevi görür. Spermatozoonlar için ikinci seçim ve depo endometriyal kıvrımlar, üçüncü engel ve depo ise uterotubal birleşme noktasıdır. Ejakulasyon noktasından fertilizasyon noktasına kadar olan yarıştta sadece bir kaç yüz spermatozoon ampullaya ulaşır ve bunlardan sadece 1 tanesi oosite nüfuz edebilme şansını yakalar (Senger 2003, Hytell ve ark 2010, García-Vázquez ve ark 2016).

Dişi genital kanal yukarıda açıklanan morfolojik/stratejik noktaları ile yarıştta katılan patolojik, zayıf ve güçsüz spermatozootleri elimine eden, yaşama kabiliyeti yüksek olanları ise koruyan ve fekdasyon yeteneği kazandıran bir sistemdir (Senger 2003). Seminal plazma sıvıları vajina ve uterustan emilmekte, ölü spermatozoonlar ise fagositoz ile ortadan kaldırılmaktadır. Spermatozoonlar dişi genital kanalda kimyasal mesajlar ile uterus sıvılarının akışının tersi istikamette aktif hareketleri ile ilerlemektedir (Senger 2003). Ancak bazı hormonların da sperma taşınmasında önemli rolleri vardır. Örneğin ejakulatta bulunan prostaglandinler, kopulasyon refleksinin

oluşumunda etkili oksitosin ve östrojen'in (E₂) uterusu kazandırdığı motilite ile taşınmaktadırlar. Bu taşınma esnasında spermatozoon ejakulasyon noktasından başlamak üzere özellikle ovidukt sıvılarında dölleme yeteneği kazanmakta bu olguya da kapasitasyon adı verilmektedir (Visconti ve ark 1998, Ickowicz ve ark 2012).

2. 3. Spermanın Kapasitasyonu

r Ejakulasyon sırasında spermatozoonla, epididimis ve seminal plazmadan köken alan glikoprotein tabiatında bir tabaka ile kaplıdır (Leahy ve Gadella 2011, Ashrafzadeh ve ark 2013). Bu tabakanın başlangıçtaki rolü, farklı DNA ve protein yapısında sahip olan spermatozoonun genital kanalda antijenik etki oluşturmamasını engellemektedir. Spermatozoonun oosite penetre olabilmesi için bu tabakadan kurtulması, spermatozoonun oosite girişi ve gerekli olan enzimlerin ortaya çıkması için akrozomu saran zarlardan kurtulması gerekmektedir. Bu olguya akrozom reaksiyonu adı verilir. Akrozom reaksiyonu genital kanal sıvılarının, spermatozoon başının ön bölgesi olan akrozomu saran zarlarda vakuolleşme ve dejenerasyona yol açması ile karakterize bir olgudur. Evcil hayvanlarda kapasitasyon süresi bir kaç dakika ile 10 saat arasında değişkenlik göstermektedir (Leahy ve Gadella 2011).

2. 4. Fertilizasyon

Evcil hayvanlarda gebelik sürecinin başlangıcı olarak; bazı araştırmacılara göre çiftleşme/tohumlama, bazılarına göre zigot oluşumu, bir kısmına göre ise embriyonun uterusu implantasyonu kabul edilmektedir. Ejakulasyon sonrasında spermatozoon serviksi geçip fertilizasyonun şekilleneceği oviduktteki uygun bölgeye (ampulla-istmik birleşim yeri) ulaşmak zorundadır (Gadella ve Carolina 2014). Kapasitasyonu takiben zigot oluşumu için spermatozoonun oosite bağlanması gerekmektedir. Spermatozoon akrozom üzerinde oositin zona pellusida proteinlerine bağlanan bazı özel yüzey proteinlerine sahiptir. Zona pellusida, zona protein 1, 2 ve 3 olmak üzere 3 adet farklı glikoprotein içerir (Ashrafzadeh ve ark 2013). Zona protein 1 ve zp2, zonanın yapısını korurken zp3 spermatozoon için reseptör görevi görür. Fertilizasyon esnasında yaklaşık olarak 10.000 ile 50.000 arasında zp3 molekülü spermatozoon ile bağlanır. Spermatozoon plazma membranı üzerinde iki adet zona bağlanma bölgesi vardır. Birincisi zona pellusida üzerine bağlanma sağlarken ikincisi akrozom

reaksiyonunu başlatır. Akrozomal enzimlerin salınması spermatozoonun zona pellusida içerisinde ilerlemesini sağlar (Hytell ve ark 2010, Ashrafzadeh ve ark 2013, Gadella ve Carolina 2014). Zona pellusidayı tamamen geçen spermatozoon perivitellin boşluğa ulaşır ve oosit plazma membranı ile etkileşime girer (Kölle ve ark 2010, Liu 2011). Bunun sonucunda oosit içerisinde erken embriyogeneze hazırlık başlar. İlk olarak kortikal reaksiyon gerçekleşir. Spermatozoon oosit membranlarının birleşmesi sonucu daha önceden oogenezinin birinci ve ikinci mayoz bölünmelerinde oositin sitoplazmasında perifer kısma yerleşen kortikal granüller perivitellin boşluğa geçerler. Zona pellusida birtakım kimyasal reaksiyonlar gerçekleşerek zona blok oluşturur ve bu sayede polispermi önlenir (Coy ve Aviles 2010, Hytell ve ark 2010, Liu 2011). Kortikal reaksiyon aynı zamanda vitellin blok oluşturarak oositin plazma membranının başka spermatozoon ile birleşmesini engelleyerek polispermi için başka bir önlem almış olur. Spermatozoonun nükleusu oosit plazmasına girdikten sonra erkek pronükleusu haline gelir. Daha sonra nükleus çözünerek kromozomlarını açığı çıkarır ve bu olay sonucunda dişi pronükleusundaki kromozomlar ile karşılıklı dizilirler. Fertilizasyonun son aşamasında erkek ve dişi pronükleusları birleşir ve buna singami denir. Singamiyi takiben zigot, embriyogeneze aşamasına girer (Noakes ve ark 2001, Liu 2011, Gadella ve Carolina 2014).

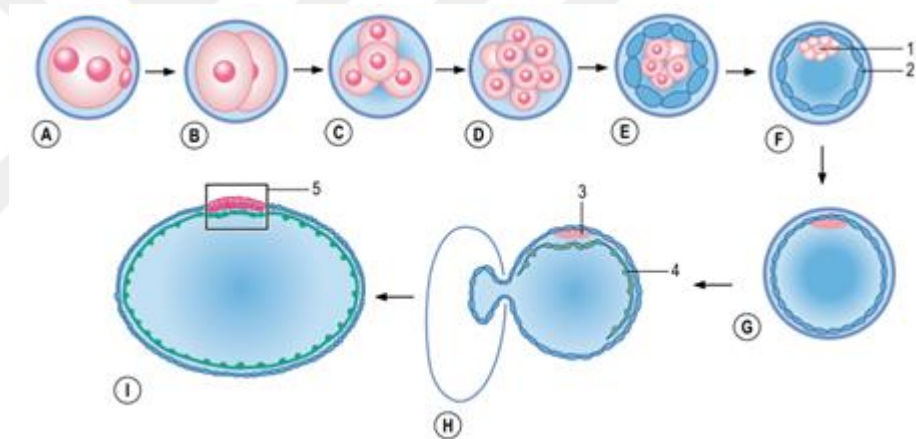
2. 5. Preimplantasyon Döneminde Embriyo

Ovidukt içerisinde singami şekillendikten sonra zigot embriyo olarak isimlendirilir. Embriyo, gelişiminin en erken safhasındaki bir organizmadır. Anatomik olarak bir embriyonun hangi türe ait olduğu belirlenemez. Uterus içinde gelişimine devam eden ancak hangi türe ait olduğu belirlenebilen embriyolar fetüs olarak isimlendirilir. Fertilizasyon sonrasında implantasyon şekillenmeden önce gerçekleşmesi zaruri olan fizyolojik olaylar aşağıda sıralanmıştır (Hytell ve ark 2010).

2. 6. Zona Pellusida İçindeki Gelişmeler

Tek hücreli zigot oluştuktan sonra seri halde mitoz bölünme aşamalarından geçer. İlk bölünme sonrasında iki hücreli embriyo şekillenir ve her bir hücre blastomer olarak isimlendirilir. Her bir blastomer mitoz bölünme geçirerek iki ve katları şeklinde bölünmeye başlar. Evcil hayvanlarda genellikle 8 blastomere kadar olan aşamalarda

blastomerler totipotentdir ve her bir blastomerdan bir birine tıpatıp benzeyen yavrular biyotekneolojik yöntemlerle üretilabilmektedir. Blastomerlerdeki mitoz bölünmeler eş zamanlı olarak gerçekleşir ve zona pellusida içinde tek tek sayılamayacak kadar çoğalırlar. Bu aşamada embriyo morula olarak isimlendirilir. Morulanın ileri safhasında dış katman hücrelerindeki aktif sodyum pompaları iyon artışına ve dolayısıyla embriyo içerisine sıvı akışına neden olur. Embriyo içerisinde sıvı dolu bir boşluk oluşur ve bu aşamadaki embriyo blastosist olarak adlandırılır. Bu aşamada blastosistte iki farklı hücre popülasyonu vardır; iç hücre katmanı ve trofoblast (Şekil 1). İç hücre katmanı ileri aşamalarda asıl embriyoyu oluştururken, trofoblast hücreleri koryonu oluştururlar ki bu da plasantanın yapısına katılır. Morula aşamasında itibaren fertilizasyon sonrası yaklaşık olarak 4-7 günden sonra ineklerde embriyo uterus içinde gelişmeye devam eder (Hytell ve ark 2010).



Şekil 2.1. Memeli embriyosunda gelişim aşamaları. A: Zigot, B: 2-hücreli embriyo, C: 4-hücreli embriyo, D: Erken morula, E: Kompakt morula, F: Blastosist, G: Genişlemiş blastosist, H: Sarkmış (Hatching-çatlamış) blastosist, I: Oval blastosist ve embriyonik disk, J, 1: İç hücre kütlesi; 2: Trofoektoderm; 3: Epiblast; 4: Hypoblast; 5: Embrionik disk (Hytell ve ark 2010).

2. 7. Blastosistin Zona Pellusidadan Çıkışı (Hatching) Ve Embriyonun Uzaması Dönemi

Blastosist içerisindeki boşluk sıvı ile dolarak iç basıncı artırır ve proteolitik enzimler, steroid hormonlar ve prostaglandinlerin katkısı ile incelen noktadan zona pellusida çatlayarak blastosit hücreleri zona pellusidadan ayrılır (Hytell ve ark 2010, Lonergan ve ark 2016, Ribeiro ve ark 2016). Bu gelişme evresi fertilizasyon sonrası 7-

12. günlere denk gelmektedir. Embriyo zp'dan ayrıldıktan sonra küre şeklinde olup; hızla büyümeye başlar ve bir iplikçik tarzında hızlı bir şekilde büyümeye devam ederek 7. günde yaklaşık olarak 250 mm uzunluğa ulaşmış olur. Bu büyümede en büyük katkı yavru zarlarından kaynaklanır. Embriyonun uterusu tutunması için mutlaka bu zarların gelişmesi gereklidir. Trofoblast hücrelerinden köken alan bu zarlar, dıştan içe doğru koryon, allantois ve amniyon olarak isimlendirilirler (Hytell ve ark 2010, Lonergan ve ark 2016).

Koryon ve endometriyum arasında oluşan ve çok sayıda fonksiyonları bulunan kompleks yapıya plasenta denir. İmplantasyon, uterusu ulaşan embriyonun endometriyum ile yavru zarları aracılığı ile bağlantı kurması olgusuna verilen isimdir. Gebeliğin mekanik olarak başladığı dönem olarak da tanımlanmaktadır. Bazı yazarlara göre, implantasyon, embriyo ile uterus arasında ilk yüzeysel temas ile başlamakta, bazılarına göre ise yavru zarları ile endometriyumun sıkıca bağlantısının başladığı an olarak kabul edilmektedir. İmplantasyon başladığında trofoblastın endometriyum ile temas sağlayan tek çekirdekli hücreleri, endometriyal stroma ile temasa geçtiğinde çok çekirdekli forma dönüşürler. Bu farklılaşmış hücrelere sinsityum denir. Sinsityum bağlantıyı sağlamasının yanı sıra erkek orjinli yabancı DNA taşıyan embriyoyu immunolojik reaksiyonlardan da korumaktadır. Uterusa temas eden embriyo trofoblast hücrelerden salgıladığı enzimler ile temas noktasındaki endometriyumu lize ederek uterusun stromasına yerleşir. Uterus stroma hücrelerinin transformasyonu ve proliferasyonu ile desidua hücreleri oluşur. Özellik plasentanın sınıflandırılmasında kriter olarak kullanılmaktadır (Hytell ve ark 2010).

2. 8. Erken Gebelikte Hormonal Düzen

Gebeliğin devamlılığında birinci derecede sorumlu hormon progesterondur (Lemley ve ark 2015). İneklerde progesteronun ana kaynağı gebeliğin 150-200 gününe kadar CL'dur. Bu dönemden itibaren ise CL'u progesteron sentezi ile plasenta dokusu destekler. Gebeliğin ilk 14 günü periferik sirkülasyondaki progesteron seviyesi gebe olmayan hayvanların seksüel sikluslarının diöstrüs dönemleri ile paralellik gösterir. Ancak gebe olmayan hayvanlarda ovulasyonu izleyen 16-18 gün aralığında kan progesteron seviyesi hızla bazal seviyeye düşmeye başlar. Gebe ineklerde ise anılan

dönemde hafif bir düşme olmasına rağmen progesteron seviyesi gebeliğin yaklaşık 60. gününe kadar bir yükselme gösterir. Gebeliğin 60. gününden prepartum 20-30 güne kadar sabit yoğunluktadır. Progesteron prepartum 20-30 günden doğum zamanına kadar geçen süreçte bazal seviyeye iner. Erken ve orta gebelik süresince östrojen konsantrasyonu 100 pg/ml'den daha az bir seviyede iken gebeliğin son dönemlerinde, özellikle prepartum 2-5 gün aralığında en yüksek seviyeye ulaşır ve doğum sonrası yaklaşık 8. saatte bazal seviyeye iner. Prolaktin seviyesi, gebelik süresince bazal düzeyde seyir gösterirken prepartum 20. saatte en yüksek seviyeye ulaşır. Ancak doğum sonrası 30. saatte bazal seviyeye düşer. Plasental laktojen gebeliğin 200. günü ile doğum anına kadar geçen süreçte en yüksek seviyede bir seyir gösterir (Vural ve ark 2015).

2. 9. Erken Gebelikte Luteolizis

Memelilerde gebeliğin şekillenebilmesi ve devam edebilmesi için CL'dan salınan progesteron'a ihtiyaç vardır. Progesteron bir taraftan endometriyal proliferasyonu uyararak embriyonun implantasyonu için uygun ortam hazırlarken diğer yandan da endometriyal kontraksiyonları baskılayarak embriyonun rejeksiyonunu engellemektedir (Okuda ve ark 2002, Lonergan ve ark 2013). İneklerde lüteolitik PGF_{2α} salınımı CL regresyonuna ve progesteron salınımının kesilmesine neden olur. Siklusun 15-17. günlerinde korpus luteumdan salınan oksitosin, endometriyal epitel hücre zarı üzerindeki reseptörlere bağlanarak endometriyumdan PGF_{2α} salınımını uyarır. Prostaglandin F_{2α} endometriyum epitel hücrelerinden pulzatil olarak salgılanarak lüteolizise neden olur (Mc Cracken ve ark 1999, Okuda ve ark 2002). Lüteolizis, uterus, hipotalamus, hipofiz ve ovaryumlar arasında etkileşimlerin olduğu kompleks bir mekanizmadır. Lüteolizis, öncelikle progesteron üretiminin durması ile başlayan fonksiyonel lüteolizis ve bunu takiben CL'un regresyonu ile olan yapısal lüteolizis olmak üzere iki kısımda karakterize edilmektedir. Oksitosin uterustan PGF_{2α} salınımına neden olmaktadır. Progesteron östrüs siklusunun yaklaşık 12. gününden itibaren endometriyumdaki kendi reseptörlerini baskılayarak duyarsız hale getirir. Bunu takiben ovaryumda gelişmekte olan follikülde kaynaqlanan östradiol endometriyumda önce östrojen reseptör alfa ve sonra da oksitosin reseptörlerinin artmasına neden olur. Ayrıca, östradiol tarafından hipotalamustaki

oksitosin salınım merkezi uyarılarak nörohipofizden sık aralıklarla oksitosin salınımı başlatılır (Mc Cracken ve ark 1999). Oksitosinin bu şekildeki salınımı neticesinde;

1. Endometriyumdan düşük miktarlarda $\text{PGF}_{2\alpha}$ salınır,
2. Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, CL üzerindeki duyarlılığı yüksek $\text{PGF}_{2\alpha}$ reseptörlerini uyarır ve CL'dan oksitosin salınımına neden olur.
3. Lüteal oksitosin endometriyumdan yüksek miktarda $\text{PGF}_{2\alpha}$ salınımını uyarır
4. Korpus luteumdaki duyarlılığı düşük $\text{PGF}_{2\alpha}$ reseptörler uyarılarak progesteron salınımı durdurulur.

Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ lökotrienler veya endotelin-1 vasıtası ile CL'a giden kan akışında azalma ve steroidik akut regulatory protein aktivitesini engelleyerek lüteolizise sebep olur. Progesteron üretiminde en önemli nokta, kolesterolü mitokondriye taşıyan star proteindir ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ kolesterol taşınımını kısıtlayarak progesteron sentezini engeller (Mc Cracken ve ark 1999).

2. 10. Gebeliğin Tanınması

Uterus içerisinde sağlıklı bir embriyo olması halinde, gebeliğin oluşması ve devamlılığı için ilk olarak embriyo, uterus ve CL arasında bir takım kompleks mekanizmaların devreye girmesi gerekmektedir (Roberts ve ark 1996, Fuller ve ark 2008). Embriyonun varlığının anne tarafından tanındığı mekanizmaların bütününe gebeliğin maternal kabulü denir. İnekte gebeliğin maternal kabulünün ilk safhası embriyo tarafından lüteolitik mekanizmanın engellenmesidir (Roberts ve ark 1996, Bazer 2013). Bu kompleks mekanizma embriyonun trofoblast hücrelerinden salgılanan proteinler vasıtası ile başlatılır. Bu spesifik trofoblast proteinlerinden birisinin interferon proteinleri ile homolog olduğu tespit edilmiş ve daha sonra interferon tau ($\text{IFN-}\tau$) olarak tanımlanmıştır (Roberts ve ark 1996, Wooding ve ark 2005). $\text{IFN-}\tau$ inek ve koyunlarda gebeliğin 12 ile 24. günleri arasında embriyonun trofoblast hücreleri tarafından salgılanan ve gebeliğin anne tarafından kabulünü başlatan bir sitokindir. Ruminantlarda $\text{IFN-}\tau$, embriyonun blastosist safhasında uterus duvarına tutunduğu implantasyona kadar olan preimplantasyon süresince trofoektodermin tek çekirdekli hücrelerinden salgılanır. İnkelerde $\text{IFN-}\tau$ 'nin fonksiyonlarından bir tanesi ve en önemlisi endometriyumdan $\text{PGF}_{2\alpha}$ pulsatil salınımını durdurarak CL regresyonunu engellemektir. $\text{IFN-}\tau$ uterus endometriyumundaki epitel hücreler

tarafından $PGF_{2\alpha}$ üretilmesini engeller ve bunu endometriumdaki östrojen reseptör alfa ve oksitosin reseptörlerini baskılayarak gerçekleştirir (Roberts ve ark 1996, Bazer 2013).

2. 11. Plasentasyon

İmplantasyonun başlaması ile birlikte yavruya ait koryon zarı ile endometrium değişik katmanları arasında oluşturulan ortak doku kompleksine plasenta adı verilir (Wooding ve ark 2005, Adeyinka 2012, Haeger ve ark 2016). İmplantasyon esnasında trofoblast hücrelerinin enzimatik ve invaziv etkileri ile endometriumdaki stroma hücrelerinin proliferasyonu ve transformasyonu sonucu desidua hücreleri oluşur (Wooding ve ark 2005, Adeyinka 2012, Carter ve Enders 2013). Buna desidua reaksiyonu denir. İnvaziv implantasyonda desidua hücreleri görülmektedir. Karşılıklı doku kayıpları olmaksızın şekillenen plasentalarda desidua reaksiyonu yoktur (Wooding ve ark 2005, Adeyinka 2012, Carter ve Enders 2013).

2. 12. Yavru Zarları Ve Yavru Keseleri

İmplantasyonun başlaması ile birlikte trofoektodermden köken alan ve git gide fonksiyonel zarlar haline dönüşen bu yapılar aynı zamanda yavru keselerini de oluştururlar. Bu zarlar dıştan içe doğru koryon, allantois ve amniondur. Bu zarların oluşturduğu amnion ve allantois keselerinin yanı sıra yumurta sarısı kesesi bulunmaktadır (Wooding ve ark 2005, Adeyinka 2012, Carter ve Enders 2013).

2. 13. İneklerde Gebelik Tanısı

Günümüzde, damızlık işletmelerde, tohumlamayı izleyen en erken dönemde gebe olmayan hayvanların belirlenmesi ve bu hayvanların yeniden gebe kalma olanağının sağlanması, ekonomik yetiştiricilik için oldukça önemlidir. İneklerde, çok sayıda gebelik tanı yöntemi bulunmasına rağmen doğruluk oranı yüksek ve hata payı düşük olan gebelik tanı yöntemi arayışları devam etmektedir (Purohit 2010, Bekele ve ark 2016).

Gebelik teşhis yöntemlerini 2 ana sınıfa ayırabiliriz. İlki gebeliği görme veya hissetmeye izin veren direk yöntem, ikincisi ise gebeliğin bulunduğunu bazı işaretlerle gösteren dolaylı yöntemlerdir (Bekele ve ark 2016, Pohler ve ark 2016).

Gebelik tanı yöntemlerinin bir diğer sınıflandırılması da görsel muayene, klinik muayene yöntemleri ve laboratuvar metotları şeklinde yapılmaktadır. Görsel muayene yönteminde; kayıtların değerlendirilmesi, östrüs göstermeme, metöstrüs kanaması ve ilerleyen günlerde annede meydana gelen değişiklikler sayılmaktadır. Klinik muayene yöntemleri olarak; rektal palpasyon ve ultrasonografik muayene yöntemleri, laboratuvar yöntemleri olarak ise; süt ve kan plazma/serum progesteron seviyeleri, erken gebelik faktörü ve gebelik spesifik proteininin belirlenmesi sayılabilir. Ancak bu yöntemler arasında, ultrasonografik muayene ve rektal palpasyon yöntemi en sık kullanılan ve en geçerli yöntemler olarak kabul edilmektedir (Purohit 2010, Bekele ve ark 2016).

Rektal palpasyon ve ultrasonografi erken gebelik teşhisinde kullanılan direk yöntemlerdir. Her iki yöntemde gebeliğin teşhisinde etkilidir ancak tecrübe ve özel ekipman gerektiren yöntemlerdir. Gebelik teşhisinin yapılmasını gerektiren bazı durumlarda veteriner hekim desteğinin yeterli olmaması olgularıyla karşılaşılabildiği için alternatif gebelik teşhisi yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacı oluşmuştur. Bu nedenle araştırmacılar annenin biyolojik sıvılarında bulunan ve canlı embriyoyu gösteren hormon veya embriyoya özel işaretlerin miktar veya olup olmadığını ölçen yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmalar sonucunda; erken gebelik faktörü (EPF), interferon uyarılan genler (ISG), progesteron ve gebelikle ilişkili glikoproteinler (PAG)'i tespit edebilen kitler geliştirilmiştir (Purohit 2010, Bekele ve ark 2016).

2. 13. 1. İneklerde Gözleme Dayalı Gebelik Tanısı

Kayıt

En eski, basit ve kesin olan gebelik teşhis yöntemi bir yavrunun doğumunu beklemektir. İneklerde fertilizasyon yüksek olmasına rağmen tohumlamaların yaklaşık %50'si belirlenebilir gebelikle sonuçlanmaktadır. Aksine gözlenemeyen,

planlanmamış, kayıt edilmemiş çiftleşmeler de az değildir. Bu nedenle hayvanın tohumlamayla ilgili geçmişi gebelik durumunun güvenli bir göstergesi değildir ve bazen de aldatıcı olabilir (Purohit 2010, Bekele ve ark 2016).

Östrüs göstermeme

İnekler genelde ortalama her 21 günde bir östrüs gösterirler. Tohumlama sonrası inek ya gebe kalmıştır ya da gebe kalmamıştır ve yeniden tohumlanacaktır. İnek gebe kalmamış ise CL geriler ve progesteron düzeyi düşer ve inek tohumlama sonrası 18-24. günler arasında yeniden östrüs gösterir. Bu nedenle eğer inek tohumlamadan sonra östrüs gösterirse ineğin gebe olmadığı kabul edilir. Tersine eğer inek östrüs göstermemişse hayvan gebe kabul edilir. Çünkü gebelik esnasında embriyo CL'un gerilemesini sonrasında da östrüs göstermesini engeller (Purohit 2010, Bekele ve ark 2016).

Metöstrüs Kanaması

İneklerde östrüsten 24-48 saat sonra kanlı bir vaginal akıntı yaygın gözlenir. Bu akıntının nedeni ovulasyon sonrası östrojenin ani şekilde azalması sonrasında uterustaki kapiller damarların kanamasıdır. Eğer bir kaç gün öncesinde östrüs gözlenemeyen bir inekte metöstrüs kanaması görülmüş ise östrüsün kaçırıldığı ve hayvanın gebe kalamadığını belirtisidir (Bekele ve ark 2016).

Gözleme Dayalı Diğer Gebelik Tanı Bulguları

İneklerde bu gözlem bulguları yanında gebeliğin ilerleyen dönemlerinde annede; abdomenin genişlemesi, meme bezinin gelişmesi, ileri dönemde vaginal akıntı ve fötüsün hareketleri gibi görsel belirtilerle gebelik teşhisi yapılabilmektedir. Ancak bu görsel yöntemlerin doğruluk derecesi düşüktür (Youngquist 2006).

2. 13. 2. Rektal palpasyon yöntemi ile gebelik tanısı

İneklerde gebelik tanısında 1900'lü yılların başlarından itibaren kullanılan ve günümüzde de güncelliğini kaybetmeyen biri rektal muayene yöntemidir. Deneyimli

bir veteriner hekim bu yöntemi kullanarak tohumlamayı/aşımı izleyen 30 gün gibi erken bir dönemde gebelik tanısını gerçekleştirebilir. Gebelik süresince uterusun hacmi, içeriği, konumu ve kıvamı farklılık gösterse de veteriner hekim gebe tanımlaması yapmadan önce; fetal membran kayması, amnion kesesinin, plasentomların ve fütüsün palpasyonu şeklindeki muayene bulgularından en az birisini belirlemelidir (Purohit 2010, Balhara ve ark 2013, Dee Whittier 2013).

Rektal palpasyon uygulamalarında hatalı negatif gebelik sonuçları ile çoğunlukla, yavrunun abdominal tabanda olduğu gebeliğin 5-7. ayları arasında karşılaşılır. Bu dönemde uterusun tamamen abdomen tabanına doğru yönelmesi, uterus ve yavruya rektal yol ile ulaşma sorunları nedeni ile hatalı gebelik tanısı sonucuyla karşı karşıya kalınabilmektedir. Hatalı pozitif sonuçlar ise, bazı maternal yapıların fütüs olarak algılanması ile şekillenir. Örneğin, rumenin dorsal kesiti, sol böbrek, genişlemiş lenf yumruları, abdominal yağ dokularının nekrozu yanıltıcı sonuçlara yönlendirebilir (Romano 2004, Broaddus ve de Vries 2005, Youngquist 2006, Purohit 2010, Dee Whittier 2013, Balhara ve ark 2013, Pohler ve ark 2016).

2. 13. 3. Ultrasonografik görüntüleme yöntemi ile gebelik tanısı

Ultrasonografik görüntüleme yönteminin hayvan reproduksiyonunda ilk kullanımı 1980 yılında kısıraklarda ve kedilerde gebelik görüntülemesi ile başlamıştır. Sonrasında ultrasonografik görüntüleme yöntemi tüm evcil hayvanların genital organlarının fizyolojik ve patolojik oluşumlarını değerlendirmede rutin klinik muayene ve uygulama tekniği olarak adapte edilmiştir (Romano 2004, Broaddus ve de Vries 2005, Youngquist 2006, Purohit 2010, Dee Whittier 2013, Balhara ve ark 2013, Pohler ve ark 2016).

Ultrasonografik görüntüleme yönteminde, görüntüleme kalitesindeki sürekli gelişmeler taşınabilir ultrasonografi ekipmanlarının piyasaya sürülmesi ve rekabete dayalı olarak farklı fiyat seçeneklerinin sunulması, ultrasonografinin veteriner hekimlerin olmazsa olmaz ekipmanları arasında yer almasında önemli rol oynamıştır. Ultrasonografinin en önemli avantajlarından biri invaziv olmaması, diğer bir deyimle hayvanların seksüel yaşamlarını etkilemeden ve embriyo/fütüs üzerinde her hangi bir yan etki oluşturmada reprodüktif kanalın tekrarlanan muayenelerine olanak tanımasıdır. Transrektal ultrasonografi, sedasyon gerektirmeyen, non invaziv ve iyi

tolere edilebilen bir klinik muayene yöntemidir (Romano 2004, Youngquist 2006, Purohit 2010, Balhara ve ark 2013, Dee Whittier 2013, Pohler ve ark 2016). İneklerde aşım/tohumlama sonrası 12-14. günlerinde ultrasonografi ile gebeliğin belirlenebileceği bildirilmektedir. Ultrasonografik tekniğin ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte gebeliğin 20. gününde %85, 24. gününden itibaren ise %100 doğruluk oranı ile belirlenmesi mümkündür (Romano 2004, Youngquist 2006, Purohit 2010, Balhara ve ark 2013, Dee Whittier 2013, Pohler ve ark 2016).

2. 13. 4. Progesteron düzeyinin belirlenmesi ile gebelik tanısı

İneklerde süt, kan plazması ve kan serumu progesteron seviyesi fonksiyonel bir CL varlığının veya yokluğunun göstergesidir. Süt ineklerinde progesteron değerinin ölçülmesi ve bilinmesi diğer bazı olgular yanında erken gebelik tanınmasında da etkilidir (Broaddus ve de Vries 2005, Prvanović ve ark 2009, Purohit 2010, Balhara ve ark 2013).

Süt, kan plazması ve kan serumu progesteron seviyesi renk değişimi esasına dayalı kalitatif yöntem veya miktar esasına dayalı kantitatif yöntemlerle belirlenebilir. Kalitatif yöntemler genelde saha koşullarında kullanılabilirken, miktar esasına dayalı kantitatif yöntemler laboratuvar koşullarında gerçekleştirilir (Broaddus ve de Vries 2005, Balhara ve ark 2013).

Süt, kan plazması ve kan serumu progesteron düzeyleri, gelişmiş aletlerle donatılmış endokrinoloji laboratuvarlarında uzman kişilerce radio Immunoassay (RIA) veya enzim immunoassay (ELISA) yöntemleri ile nanogram düzeyinde saptanabilmektedir. Ancak laboratuvar kurulmasının büyük parasal kaynaklara ve uzmanlara gereksinim göstermesi, numunelerin laboratuvara ulaştırılması esnasında ortaya çıkan aksaklıklar ve numunelerin belli bölgelerdeki laboratuvara gönderilmesi, değerlendirilmesi ve sonucun bildirilmesi için gerekli zamanın uzun olması, araştırmacıları saha şartlarında uygulanabilir progesteron ölçüm testlerine yönlendirmiştir (Broaddus ve de Vries 2005, Purohit 2010, Balhara ve ark 2013).

Hızlı progesteron test kitlerinin çalışma prensipleri, test edilen serum, plazma veya sütteki progesteronun alkalen fozfatazla işaretli progesteron ile birlikte bilinen ve belli antikor ile karşı karşıya getirilmesi (rekabet esasına göre) ve ilave edilen substrat

ile renk değişiminin oluşturulmasıdır (Broaddus ve de Vries 2005, Purohit 2010). Burada rengi 5-bromo-4-kloro-3-indolil ve tetrazolium blue şekillendirmektedir. Süt, kan plazması ve kan serumu örneğinde yeterli miktarda progesteron yok ise enzim alkale fosfataz ile progesteronlar tüp yüzeyindeki antikorla bağlanır ve sonradan ilave edilen substratla bu bileşik reaksiyona girerek değişik tonlarda renk ortaya çıkar. Hayvanlardan alınan örneklerde progesteron düzeyi yüksek ise, enzim alkale fosfataz ile işaretli progesteronlar, tüp yüzeyindeki antikorla bağlanamaz ve dolayısıyla substratla renk reaksiyonu oluşturmaz. Keçilerde ve ineklerde renk esasına dayalı kalitatif progesteron test kitleri ile miktar esasına dayalı kantitatif progesteron test kitlerinin karşılaştırılmasında keçilerde gebe olmayanları %80-100, ineklerde ise %90-91 oranında belirlenmiştir. Araştırıcılar sonuç olarak; renk esasına dayalı progesteron test kitlerinin basit, daha kısa sürede uygulanabilir ve doğruluk oranının miktar esasına dayalı test kitleri ile benzer sonuçlar verdiğini belirtmiş ve bu test kitlerinin özellikle gebe olmayan ve östrüste bulunan hayvanların belirlenmesinde oldukça etkili olduğunu açıklamıştır (Purohit 2010, Balhara ve ark 2013).

Plazma veya kan serum düzeyine göre, progesteronun süt yağında daha yüksek yoğunlukta bulunması ve örneklerin alım yöntemlerinin sütte diğer yöntemlere göre daha kolay olması nedeni ile test tekniği yönünden sütte progesteron tayini sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Genelde öğleden sonra (bu zaman diliminde süt yağı en yüksek seviyededir) 20 ml süt örneği alınır ve içine potasyum dikromat ve merkürük klorit tabletinden koruyucu amaçlı ilave edilir. Süt örnekleri yüksek ısı ve ultraviyole ışıklara maruz kalmamalıdır. Aksine progesteron aktivitesi kaybolur. Süt örnekleri ve test kitleri daima +4 derecede tutulmalıdır (Purohit 2010, Balhara ve ark 2013).

Gebelik tanısında tohumlamayı izleyen 20-24. günlerde arasında alınan örneklerde progesteron 2 ng/ml altında ise inek kesinlikle gebe değildir. Progesteron test yöntemlerinde yanlış negatif sonuçlar; hayvanın kimlik hataları, süütün saklanmasıdaki aksamalar (yüksek ısı ve ultraviyole altında kalması), CL'un düşük düzeyde progesteron üretmesi, süt örneğinin karıştırılmaması sonucu süt yağı düzeyinin düşük olması gibi nedenlerle ortaya çıkabilir (Purohit 2010, Balhara ve ark 2013,).

Yanlış pozitif sonuçlar ise; ineğin iki östrüs aralığının kısa olması, tohumlamayı izleyen 16. günden itibaren embriyonik ölümlerin şekillenmesi, CL'un yaşam süresinin uzamasına neden olan patolojiler (luteal kist olguları, postpartum dönem uterus enfeksiyonları), hatalı tohumlama zamanı (hatalı olarak östrüs sonrası tohumlamalar) gibi sebeplere bağlı olarak şekillenebilir (Purohit 2010, Balhara ve ark 2013).

2. 13. 5. Östron sülfat

Östron sülfat bağlı bir östrojendir. Sığırlarda süt örneklerinde gebelik teşhisi için kullanılmıştır. Konseptus (embriyo-fötüs ve ilişkili zarlar) tarafından üretilir. Bu nedenle gebeliğin direk göstergesidir. Östron sülfat ve östradiol 17 beta düzeyleri RIA ve EIA ile ölçülebilmekte, ancak bunların erken gebelik yönünden değerlendirilme şansları zayıf ve şüphelidir. Gebeliğin ileri dönemlerinde plasental östrojenler ile doğru tanı konulabilmektedir. Ancak anılan dönemlerde tanı için geç kalındığından, bu hormonun tayini ile gebelik teşhisi ekonomik ve pratik bulunmamıştır (Purohit 2010).

2. 13. 6. Erken gebelik faktörünün belirlenmesi ile gebelik tanısı

Gebe memeli dişilerinin kan serumlarında fertilizasyondan sonra 6 ile 24 saat içinde belirlenebilen erken gebelik faktörü, kaynağının ovaryum veya ovidukt olduğu düşünülen, 10.84 kDa ağırlığında bir proteindir (Broaddus ve de Vries 2005, Lucy ve ark 2011, Nandre ve ark 2012). Bu protein embriyonun uzaklaştırılması veya ölümünden 24 ile 48 saat sonra serumda tespit edilemez. Protein gebeliğin 2/3'ünde serumda bulunur. Serumda bulunan, fertilizasyon ve dolayısıyla gebeliği gösteren en erken işarettir. Rozet inhibisyon testi ile gösterilen gebelik ile ilişkili bu protein kuvvetli bir immunsupresif etki gösterir. İlk önce farelerde ölçümü yapılmıştır. Ancak yapılan çalışmalarla gebe olmayan hayvanı belirleme oranı düşük belirlenmiştir (Broaddus ve de Vries 2005, Lucy ve ark 2011). Erken gebelik esnasında salgılanmasına rağmen tümör hücreleri ve değişim geçiren hücreler gibi plasenta dışı dokularca da salgılandığı için gebeliği teşhis gücü yeterli bulunmamıştır (Nandre ve ark 2012). İneklerde tohumlamayı izleyen 24 saat içindeki gebelikleri %87,5 doğrulukla

belirleyebilmekte ve uygulamalardan %12,5 oranında da yalancı pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Erken gebelik faktörü ısı şok proteinleri (hsp 60) ailesine aittir ve hücre dışı bulunur ve immunsupresif ve büyüme faktörü özelliklerine sahiptir. Bu özellikleri antijenik yapısı nedeni ile T lenfositlere bağlanarak yabancı olan embriyonun reddedilmesini engeller ve gelişimini destekleyici rol oynar. Biyoloji biliminin ilerlemesi ile birlikte oldukça erken dönemde gebeliğin belirlenmesine yönelik bu molekülden yararlanma olanağı olacaktır. Ancak, gebeliğin ilk 15 gününde gebelik kayıp oranları yüksek olduğu için bu testin güvenilirliği düşük kalacaktır (Broadus ve de Vries 2005, Lucy ve ark 2011, Nandre ve ark 2012).

2. 13. 7. miRNA tespiti ile gebelik tanısı

Bilimsel alanda yaşanan gelişmeler bilim insanlarına yeni fırsatlar sunmaktadır. Bunlardan birisi de ineklerde erken gebelik teşhisinde kullanılabilecek farklı yöntemlerin geliştirilmesidir. Bu aşamada anne kanında ve diğer biyolojik sıvılarda farklı fonksiyonları gözlendiği olan miRNA'lardır. miRNA'lar küçük RNA sınıfına ait, yaklaşık 19-25 nükleotid uzunluğunda yapılardır. Hücre siklusu, farklılaşması, dönüşümü ve mesaj iletimi gibi hücresel süreçlerde gen bulunuşunu düzenlediklerine inanılmaktadır. Yaklaşık genlerin %60'ının miRNA tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (Fatima ve Morris 2013).

Günümüzde değişik biyolojik yollarda genlerin miRNA'larca düzenlenme süreçleri yoğun şekilde çalışılmıştır. Serum, plazma, idrar ve süt gibi biyolojik sıvılarda stabil şekilde bulunması bu yapıların bir çok otoimmün, metabolik, kalp damar ve kanser hastalıklarının biyolojik işaretleri olmaya aday olabileceklerini akla getirmektedir. Çiftlik hayvanlarında yapılan çalışmalar sonrasında; ovaryum korteksinde diğer bölgelerinden, oosit ve kumulus hücreleri arasında, olgunlaşmamış ve olgunlaşmış oositler arasında, 8 hücreli embriyo ile blastosist aşamasındaki embriyolar arasında, olgunlaşmamış ve olgun oositler ile onları çevreleyen kumulus hücreleri arasında, oogenezin farklı dönemleri arasında, folliküler gelişim dönemindeki granuloza hücreleri arasında, erkek ve dişi gonad gelişimi arasında, olgun testis ile olgun olmayan testis arasında, fertilitesi yüksek ve düşük spermatozoonlar arasında, normal ve anormal spermler arasında, gelişmekte olan ve preovulatr

folliküller arasında, folliküler evreden luteal evreye geçiş sürecinde, folliküler farklılaşma aşamasında, gelişmiş korpus luteum ile gerileyen korpus luteum arasında, genç ve yaşlı hayvanların folliküler sıvıları arasında ve plasental gelişim dönemleri arasında farklı miRNA belirlenmiştir (Fatima ve Morris 2013).

Bahsedilen çok sayıda biyolojik süreçlerde olduğu gibi ineklerde erken gebelik sürecinde de miRNA'lar özel görevleri yerine getirdiği düşünülmektedir. Bu görevleri yerine getirirken farklı miRNA yapıları farklı dönemlerde bulunabilir. Araştırmacılar (Ioannidis ve Donadeu 2016, Gecaj ve ark 2017, Ioannidis ve Donadeu 2017, Pohler ve ark 2017) bu şekilde tohumlama sonrası erken gebelik dönemlerinde dolaşımdaki miRNA belirlenmesi ile gebelik teşhisinin yapılabileceğine inanmaktadır. Nitekim; (Ioannidis ve Donadeu 2016) tarafından yapılan araştırmalarda gebe olmayan ve gebeliğin 19-24. Günlerinde olan inekler üzerinde yaptıkları çalışmada erken gebelik teşhisinde kullanılmaya aday miRNA'lar belirlenmiştir. Daha sonra gerçekleştirilen bir çalışmada ise (Ioannidis ve Donadeu 2017) gebeliğin 8. Gününde dolaşımda gebeliği gösteren farklı bir miRNA tespiti bildirilmektedir. Gecaj ve ark (2017) tarafından da gebeliğin devam ettiği ineklerin korpus luteumlarında bulunan miRNA ile gebeliğin devam etmediği hayvanın korpus luteumundaki miRNA farkının olduğu, Pohler ve ark (2017) tarafından embriyonun canlılığı ve yaşama kabiliyetini gösteren farklı miRNA'ların bulunduğu bildirilmektedir.

2. 13. 8. Serbest dolaşan nükleik asit tespiti ile gebelik tanısı

Kan ve süt örneklerinden erken gebelik teşhisi yapılan analizlerle günümüzde tohumlama sonrası 28-30 günler arasında güvenli sonuçlara ulaşılmaktadır. Bu teşhis günlerinin daha erken (tohumlama sonrası 20. gün veya daha önce) yapılabilmesi önemlidir. Bu şekilde hayvanlar daha erken yeniden tohumlanabileceklerdir. Serbest dolaşan nükleik asitler son yıllarda dikkati çeken yeni biyolojik işaretlerdir (Mayer ve ark 2013a).

İneklerde erken gebelik tanısında kullanım için en ümit verici moleküllerden birisi de serbest dolaşan nükleik asitler (CNS)'dir. Serbest dolaşan nükleik asitler, kan dolaşımında bulunan, hücreden bağımsız DNA/RNA molekülleridir. Önemli bir biyolojik işaret kabul edilen CNA'lar, hücre dışı nükleik asitlerdir ve vücut içinde her

gün uzun mesafeleri dolaşarak kolayca tüm dokulara diffuze olurlar. Vücutta neler olup bittiğinin anlaşılmasını sağlarlar. Moleküllerin düzeyinin değişmesi insan ve hayvanlarda çok çeşitli olgularda tanı amacıyla kullanılabilir (Işık 2015). Nitekim bu moleküller son yıllarda beşeri hekimlikte başlıca tümörlerin ve diğer hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadırlar. Lo ve ark (2007) insanlarda gebeliğin 7. haftasında maternal plazma veya serumda bulunduğunu ve gebelik esnasında düzeyinde belirlenebilen artış olduğunu bildirmektedirler. Ayrıca hamilelikte CNA'lar genetik hastalıkların teşhisinde de kullanılmaktadır.

İnsanlardan farklı olarak sığırlarda fetal trofoblast katmanının maternal kan ile direk teması yoktur. Bu nedenle genetik materyal geçişi insanlardaki gibi kolay gerçekleşmez. Ancak henüz tam ortaya konulamayan bir mekanizma ile epiteliyokorial plasenta yapısına rağmen fetal DNA'nın maternal dolaşıma geçiş yapabildiği ortaya çıkartılmıştır. Bu geçişten faydalanılarak sığırlarda tohumlama sonra 30. günde fetal cinsiyet tespiti yapılabilmektedir. Cinsiyet tayini yanında gebelik ile ilişkili oluşabilecek düzensizliklerde de kullanılabilir. Mayer ve ark (2013b) tarafından gebeliğin 20. gününde gebe olan ve gebe kalmayan hayvanların CNA kompozisyonunda fark olduğu ortaya konulmuştur. Bu sonuca göre teknolojik gelişme ile birlikte inek ve düvelerde tohumlama sonrası 0. gün ile 20. günlere kadar düzeyi artan CNA gebelik teşhisinde kullanılabilir ve gebe ile gebe olmayan hayvan ayırt edilebilir.

2. 14. Gebelikle İlişkili Proteinler

Gebelik spesifik ilk güvenli hormon ölçümü plasenta kaynaklı proteinlerle yapılmıştır. Bunlardan ilk ölçüleni gebelik-spesifik protein B'dir. Bu protein gebelik ile ilişkili glikoprotein ailesinin bir üyesidir. Gebelik ile ilişkili glikoproteinler kan dolaşımı yanında meme bezine de geçerler ve sütteki düzeylerinin belirlenmesine yönelik testler geliştirilmiştir (Ali 1999, Nandre ve ark 2012).

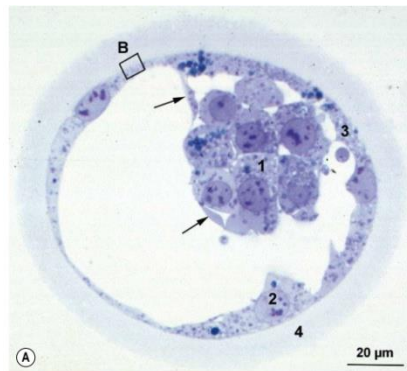
2. 15. Gebelikle İlişkili Glikoproteinler

Tüm memeli hayvanların plasentaları benzer yapısal ve fonksiyonel özelliğe sahiptir, ancak plasantanın mikro ve makro anatomik yapısında ve görünümünde

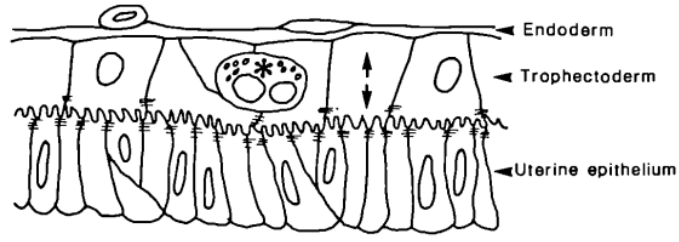
farklılıklar vardır (Ali 1999, Nandre ve ark 2012). Çift tırnaklı geniş getiren hayvanlarda plasenta; anatomik yapısına göre kotiledoner tipte sınıflandırılmıştır. Bu plasenta tipi, koriyoallantois ile endometriumun karşılıklı etkileşimi neticesinde özel bir bağlanma şeklidir. Plasentomun fetal kısmı kotiledon, maternal bağlanma bölgesi ise karunkul olarak adlandırılır. Gelişimin blastosit aşamasında embriyoda sıvı dolu bir merkezi boşluk şekillenir (Şekil 2). Blastosel denilen bu boşluk tek katlı trofoektoderm olarak bilinen hücrelerce çevrelenmiştir. Bu hücreler plasentanın dış yüzeyini oluşturan tek katlı hücre katmanını şekillendirir. Bu katman mesoderm ile birlikte koryonu oluşturur. Kese benzeri yapı olan allantois sonunda koryon ile birleşmek için genişler ve koryoallantois oluşur (Schlafer ve ark 2000).

Damarlar yönünden zengin olan koryoallantois dış yüzeyindeki trofoektodermal epitel hücreleri tarafından sınırlandırılmıştır (Şekil 3). Trofoblast hücreler olarak adlandırılan bu dış hücrelerin özel fonksiyonları olduğu düşünülmektedir (Schlafer ve ark 2000).

Geviş getiren hayvanların plasentasının trofoektoderminde morfolojik ve fonksiyonel olarak farklı iki hücre bulunmaktadır. Bunlar; tek çekirdekli trofoblast hücreler ile çift çekirdekli trofoblast hücrelerdir. Tek çekirdekli hücreler karşılaşma yüzeyinde çoğunlukta olan hücrelerdir ve başlıca besin maddelerinin değişiminden sorumludur. Buna karşılık çift çekirdekli hücreler plasental laktojen ve progesteron gibi hormonları üreten hücrelerdir (Duello ve ark 1986, Myers ve Reimers 1988).



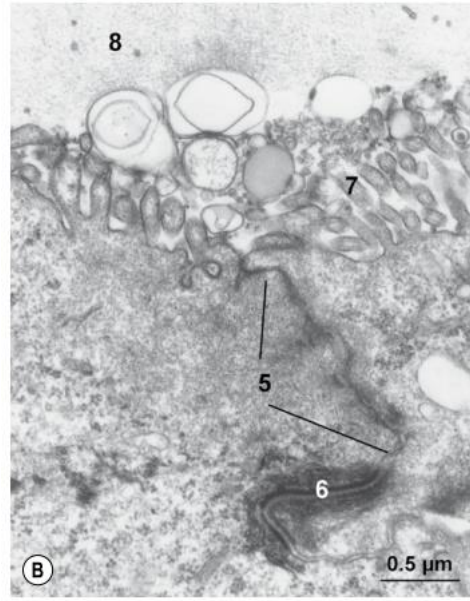
Şekil 2.2. Gelişim aşamasındaki blastosit (Hytell ve ark 2010).



Şekil 2.3. Trofoektoderm yapısı (Peter 2013).

2. 16. Tek Çekirdekli Trofoblast Hücreler

Tek çekirdekli trofoblast hücreler; tek çekirdekli, küboidalden kübik şekle değişebilen, kendine özgü görünümü olan hücrelerdir (Ali 1999, Haeger ve ark 2016). Bu hücreler bazal laminada yerleşmişlerdir ve bir birleri ile sıkı bağlantıları da içeren kompleks şekilde bağlanmışlardır (Şekil 4). Bu hücreler trofoblast popülasyonunun yaklaşık dört katı miktarındadır. Her tek çekirdekli trofoblast hücresi büyük, tek çekirdekçikli, kromatinle iyi boyanan, düzensiz şekilli çekirdeğe sahiptir. Hücrelerin sitoplazması; küçük golgi cisimciği, plasmosomlar, endoplazmik retikulum ve hücrenin ucuna doğru yerleşmiş oval şekille geniş mitokondri bulundurur. Sitoplazmada ayrıca, lipid damlacığı yığınları, farklı büyüklüklerde dejenere edici materyal içeren veziküller görülür. Tek çekirdekli trofoblast hücrelerin apikal membran yüzeyleri maternal uterus epitel hücrelerinin benzer çıkıntılarına uygun şekilde mikrovilli uzantılara (Şekil 4) modifiye olur ve bu şekilde fötüs ile anne arasında temas bölgesi oluşturur (King ve ark 1980, Haeger ve ark 2016).



Şekil 2.4. Bir birine yapışık iki trofoektoderm hücresi. 5: Sıkı bağlantı, 6: Desmosom, 7: Mikrovilluslar (Martins ve ark 2004).

2. 16. 1. Gebeliğin tanınmasındaki görevi

Gebeliğin anne tarafından tanınması terimi annenin kendi üreme kanalındaki zigota fizyolojik olarak nasıl cevap verdiğini tanımlamak için kullanılır (Ali 1999, Igwebuike 2006). İmplant olan konseptus tarafından kurtarılmadıkça CL gerileyeceği için plasenta annede erken konseptusun bulunuşunu yönetmek üzere evrimleşmiştir. Uygun zamanda konseptusun varlığının sinyalinin verilememesi gebelik kaybına yol açar. Ruminantlar erken gebelik esnasında CL'un kurtarılması yönünde evrimleşmiştir (Ali 1999, Igwebuike 2006). Korpus luteumun bu şekildeki kurtuluşu implantasyonu hem yüzeysel hemde geç olduğu bu türlere özgü bir olgudur. Bu türlerde; normal östrüs siklusunun sonunda $PGF_{2\alpha}$ 'nın pulsatil salınımı sonucunda CL regrese olur. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ uterus endometriyumundan üretilir. Luteolitik $PGF_{2\alpha}$ salınımlarının oluşturulması luteal dokunun oksitosin sekresyonunu ve dolaşımdaki oksitosinin özellikle endometrial epitel hücrelerindeki reseptörleri ile etkileşimini gerektirir. Bu nedenle oksitosin kontrolü altındaki bu salınım luteolizisin oluşması için temel önemdedir. Ancak canlı bir embriyo varlığında $PGF_{2\alpha}$ 'nın pulsatil salınımı azalır veya çoğu zaman durur. Erken gebelik sırasında CL'un varlığının devamı, implantasyon öncesi embriyo tarafından üretilen protein yapılı bir faktörün varlığına bağlıdır. Bu

faktör, başlangıçta trofoblastin, sonra trofoblast proteini, son olarak ise IFN- τ olarak isimlendirilmiştir. Sığır IFN- τ 'su, sığır konseptusunun trofoblast hücrelerinin üretim salgıladığı bir üründür. Sığır IFN- τ 'su gebeliğin 10 ile 24. günleri arasında üretilir ve antiluteolitik özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Ruminant plasentasındaki trofoblast hücreleri gebeliğin anne tarafından tanınmasında ve konseptusun canlılığını sürdürmesinde IFN- τ sekresyonu ile önemli bir rol oynarlar. İneklerde en yüksek interferon üretimi gebeliğin 17. gününde gerçekleşir. İnterferon-tau'nun CL regresyonunu engellemesinin birincil mekanizması olarak pulsatil endometrial PGF_{2 α} salınımının baskılanması önerilmektedir. İnterferon hipofiz ve luteal çıkışlı oksitosinin endometrial PGF_{2 α} sentez ve salınımını engelleyerek endometrial epitelyumdaki oksitosin reseptörünün oluşumunun önüne geçer. Bu etkinin gen transkription seviyesinde gerçekleştiği belirlenmiştir. İnterferon oksitosin reseptörünü gen düzeyinde engellemesi yanında konseptusun ret edilmesini engellemek için bağışıklık sistemini düzenleyerek diğer sitokinlerin sentezini de etkiler. İnterferon, in vitro şartlarda sığır lenfositlerinde interlokin-4 ve interferon gamma bulunuşunu artırır ve lenfositlerin interferon-2'nin proliferatif cevabını artırır. Aynı zamanda endometrial cox-2 konsantrasyonunu artırır ve luteotrofik özellikte olan PGE₂ üretimini artırır. Ayrıca hücrel bağlanmada görevli moleküllerin bulunuşunu uyarır. Bu şekilde implantasyon esnasında blastosistin endometrial yüzeye bağlanmasını da kapsayacak şekilde rol oynar (Ali 1999, Fuller ve ark 2008).

2. 16. 2. Fötal beslenmedeki rolü

Plasenta konseptusa besin taşınmasındaki tek kanaldır . Bu gereksinim doğuma kadar yapısal değişikliklerle birlikte giderek artar. Rumintant plasentası histiotrofik transferi kapsayan interplasentomal bölge ve anne ile fötüs arasında besin maddeleri ile metabolitlerin geçişinin olduğu hemopoitik değişim fonksiyonunun gerçekleştiği plasentomal bölge şeklinde iki ana bölüme ayrılmıştır. İnterplasentomal alanlar, fötal membranlar ile uterus endometriyumunun basitçe karşılaştığı yerdir. Fakat, plasentomlarda endometrium yüzeyinde derin karunkular girintiler bulunur ve fötal koriyoallantoisin kotiledoner kollarının uzun çıkıntıları bu girintilere penetre olurlar. Bu düzenleme plasentomlarda fötal ve maternal bölümler arasında büyük temas alanı

oluşturur. Ruminant plasentasındaki plasentomal ve interplasentomal bölgelerdeki trofoblast hücrelerin özel fonksiyonlarında ve gen bulunuşunda farklılık belirlenmiştir. Ancak bu iki bölgedeki trofoblast hücrelerin morfolojik özellikleri hücrelerin apikal yüzeylerinde mikrovilli olması ve diğer trofoblast hücrelerle bağlantı yapıları bulunacak şekilde benzerdir (Ali 1999, Igwebuike 2006). Mikrovilliler materyal emilimi için artmış yüzey alanı sağlamasına rağmen bağlantı bölgeleri fetal ve maternal bölümlerin ayrı kalmasını sağlamaya devam ederler. Araştırmacılara göre plasental aktarımda trofoblastik katmanda daha fazla direnç oluşur. Plasentada besin maddelerinin ve diğer yapıların geçişine karşı seçici bariyer bulunur. Belli büyüklükteki moleküller difüzyon ile taşınırken büyük moleküller farklı şekilde taşınır (Touzard ve ark 2013).

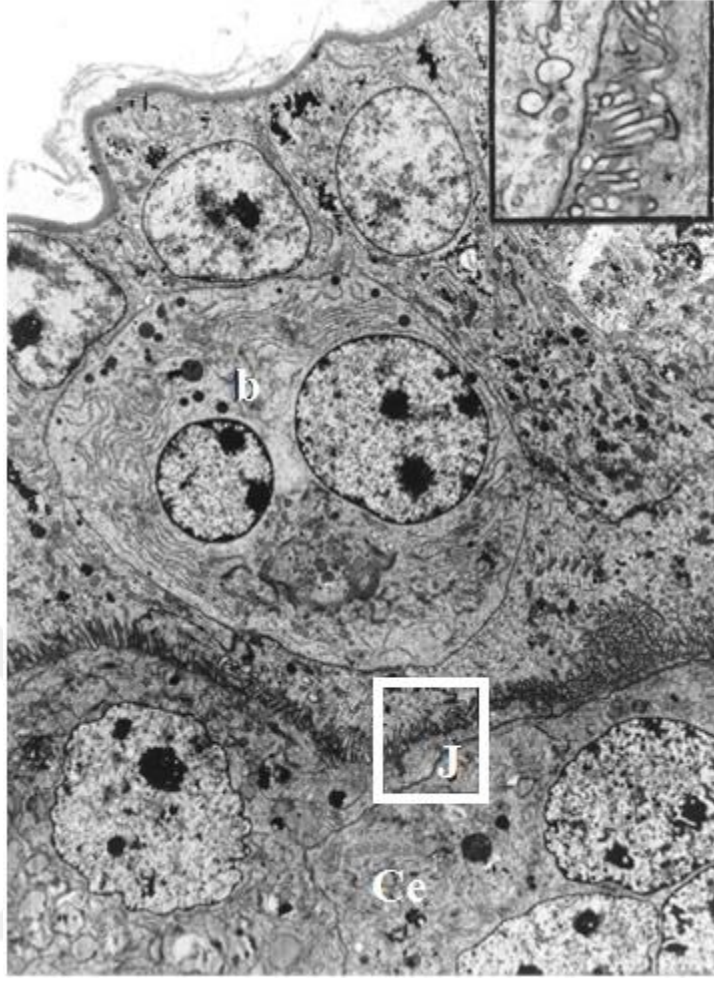
İmplantasyon esnasında, konseptusun uterus bezi açıklığına karşılık gelen bölgesinde trofoblast papili gelişir. Bu geçici yapılar gebeliğin erken döneminde kaybolur. Bu trofoblast papilleri uterus bezinin lumeni içine doğru penetre olur. Bu sayede konseptus uterus epiteli üzerinde hareketsiz durur ve sekresyonu yapılan ürünlerle histiotrop mekanizma oluşur. Endometriyal bezler karışık proteinleri ve ilgili yapıları sentezler. Bu bezler ruminant plasentasında interplasentomal bölgededir. Enzimler, büyüme faktörleri, sitokinler, lenfokinler, hormonlar, transport proteinleri ve diğer yapılardan oluşan karmaşık karışım konseptusun beslenmesi için gereklidir ve birincil şekilde konseptus canlılığı, gelişimi, gebeliğin tanınması sinyalini üretmesi, implantasyon ve plasantasyonu düzenleyicidir. Haemotrofik beslenmeye ek olarak ruminantlar gibi synepiteliochorial plasental hayvanlarda histiotrop beslenme gebelik süresince kritik önemde kalır. Uterus bezinin sekre ettiği histiotrof konseptusu kaplar ve özellikle plasental alanlardaki trofoblast hücrelerce absorbe edilir. Plasental areolar bölgeler ruminantlarda histiotrofun taşınması ve absorpsiyonu için uterus bezinin ağız kısmında gelişmiş ve farklılaşmış farklı plasental yapılardır (Ali 1999, Igwebuike 2006, Touzard ve ark 2013).

2. 17. Çift Çekirdekli Trofoblast Hücreler

Ruminant olgun çift çekirdekli trofoblast hücreleri çevresindeki trofoektodermal tek çekirdekli hücrelerden oldukça farklı, kendilerine özgü yapıda büyük hücrelerdir. Bu çift çekirdekli trofoblast hücreleri implantasyonun

başlangıcından gebelik süresince trofoektodermal hücrelerin yaklaşık %15-20'sini oluşturur (Igwebuike 2006). Çift çekirdekli trofoblast hücrelerin asitokinetik mitoz ile tek çekirdekli hücrelerden köken aldıklarına inanılmaktadır (Şekil 5). Bu hücrelerin direk olarak trofoblast kök hücrelerden kaynaklandıkları da düşünülmektedir (Ali 1999, Igwebuike 2006). Konu ile ilgili olarak her hangi bir tek çekirdekli hücrenin sitoplazma bölünmesi olmadan çekirdek bölünmesi sonrasında çift çekirdekli hücreye dönüştüğü önerilmektedir (Wooding 1992, Wooding ve Flint 1994). Gelişimlerinin erken dönemlerinde çift çekirdekli trofoblast hücreler trofoektodermal katta intraepitelial pozisyonda, trofoektodermin apikal mikrovilliar ile veya bazal memebrian ile temas etmeksizin gelişi güzel yerleşmişlerdir. Bu küçük oval immatur hücreler etraflarındaki tek çekirdekli hücrelere göre daha koyu boyanan sitoplazmaya sahiptirler. Bu koyu boyanmanın sebebi çift çekirdekli hücrelerin çok sayıda sitoplazmik ribozoma sahip olmasıdır (Wango ve ark 1990). Olgun çift çekirdekli hücrelerin moleküler yapısında çok fazla endoplazmik retikulum, çok sayıda küçük mitokondri, iyi gelişmiş büyük golgi cisimciği ve hücre hacminin %50'sinden fazlasını oluşturan büyük membran bağlı molekülleri içerir. Sığır, koyun, keçi ve geyiklerdeki çift çekirdekli hücreler benzer özelliklerdedir. Ruminantların çift çekirdekli hücrelerinin büyük çoğunluğu iki çekirdek içerirken tek çekirdek veya 3 çekirdek içeren formları da gözlenmiştir. Bu tek veya 3 çekirdekli hücreler çekirdek sayısından dışında tamamen çift çekirdekli hücrelere benzemektedir. Tek çekirdekli hücreler genellikle karyokinez tamamlanmadan önce mitozun engellenmesi sonucunda lobular bir çekirdeğe sahiptir. Üç çekirdekli hücreler trofoblast hücrelerin üç kutuplu asitokinetik mitozu ile oluşur (Ali 1999, Igwebuike 2006).

Çift çekirdekli hücreler trofoektoderimde uniform şekilde dağılmamıştır. Dağılım küçük kümeler şeklindedir. Ruminant plasentasının çift çekirdekli hücre bulunan plasentomal ve interplasentomal bölgeleri anatomik olarak benzer olmasına rağmen çift çekirdekli hücrelerin antijen içerme özellikleri yönünden bölgesel farklılıklar bulunmaktadır. Gelişim sırasında her iki bölgedeki çift çekirdekli hücreler iki çekirdeğe, çok sayıda endoplazmik retikulum sisternasına ve tipik büyük granül üreten aşırı sayıda golgi cisimciğine sahiptirler (Igwebuike 2006).

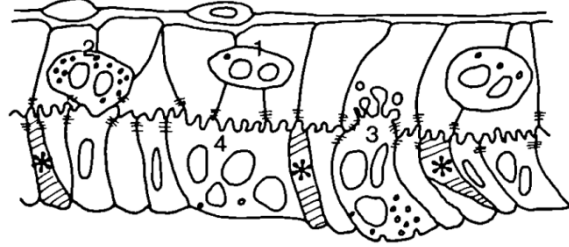


Şekil 2.5. Çift çekirdekli hücre (b), Karunkul epitel (Ce) ve maternal/fötal mikrovillus birleşimi (J). (Martins ve ark 2004).

2. 17. 1. Konseptüsün implantasyonundaki rolü.

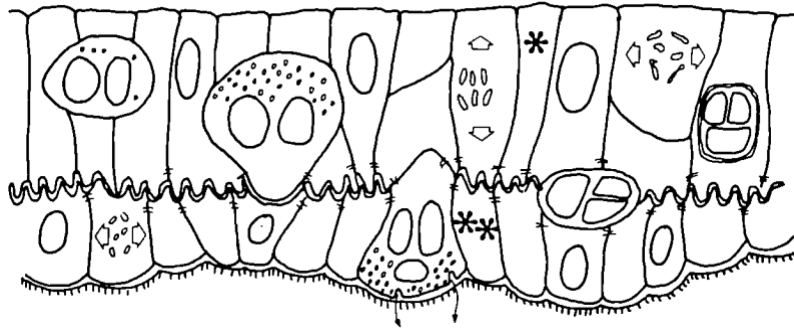
İmplantasyon, konseptüsün endometriyuma yapışması ve plasental yapıların oluşması ile sonuçlanan bir süreçtir. Ruminantlarda implantasyon sürecinin 3 aşamasının olduğu bildirilmiştir. Bu aşamalar; 1. Konseptüsün sadece uzadığı uzun bir yapışma öncesi dönem, 2. Maternal epitel hücreleri ile fötüs trofoblast hücreleri arasında temasın sağlandığı karşılaşma dönemi ve 3. Plasedada epiteliokorial ortaya çıkmasını sağlayan yapışma dönemi. Çift çekirdekli trofoblast hücrelerin implantasyondaki görevleri ruminantlar arasında yoğun olarak çalışılmıştır (Igwebuike 2006). İmmature çift çekirdekli hücreler ile tek çekirdekli hücreler arasında intra-epitallial pozisyonda kalırlar. Bu hücreler olgunlaştığında ve sitoplazmalarında büyük membrana bağlı granüller toplandığında hücreler maternal endometriyumdaki

koryonik mikrovillar bağlantı yerine doğru hareket ederler (Şekil 5) (Ali 1999, Igwebuike 2006).



Şekil 2.6. Çift çekirdekli hücre göçü (Peter 2013)

Bu göç esnasında çift çekirdekli hücreler bağlantıları bozmadan birbirine bağlı tek çekirdekli hücrelerin bağlantılardan geçme yeteneğine sahiptir (Şekil 6). Bu geçme çift çekirdekli hücrelerin apikal uçlarından sitoplazmik uzantılarını oluşturmasıyla gerçekleştirilir. Bu hücrelerin yaklaşık %15-20'sinin gebeliğin her hangi bir zamanında göç ettiği ve bu orandaki göçün gebelik süresince devam ettiği belirlenmiştir. Bu hücrelerin fetö-maternal aralığa yaptığı bu göçün nedeni çift çekirdekli hücrelerin maternal uterus epitelindeki kolumnar hücrelerle birleşerek üç çekirdekli melez hücre oluşturmasıdır (Şekil 7) (Ali 1999, Igwebuike 2006).



Şekil 2.7. Çift çekirdekli hücre göçü ve üç çekirdekli hücre oluşumu (Peter 2013).

Üç çekirdekli hücrelerin çok çekirdekli sinistial plak oluşturmak üzere artması çift çekirdekli hücrelerin devamlı göç etmesi ve üç çekirdekli hücrelerle birleşmesiyle oluşur (Igwebuike 2006). Çift çekirdekli hücrelerin göçü ve maternal uterus epiteli ile birleşmesi sonrası sinistial plak oluşturma yeteneği sonucunda ruminant plasentasının

synepiteliochorial sınıflandırılmasını sağlar. Farklı ruminant türlerinde sinsisial plakların geleceği farklıdır. Sığırlarda bu plaklar implantasyon aşamasında bulunur fakat sonra tek çekirdekli uterus epitel hücrelerin aşırı gelişmesi neticesinde yer değiştirir. Sığırlarda plasentomlarda çift çekirdekli hücrelerin daha sonraki göçü yapısal bariyer veya yapısal görevi olmayan geçici üç çekirdekli hücre oluşmasıyla sonuçlanır. Çift çekirdekli hücre göçü ve sinsisial plak oluşumu plasentanın interplasentomal bölgesinde de gerçekleşir. Ancak oluşan plaklar özellikle uterus bezi ağzında uterus epitel hücreleri ile hızlı şekilde yer değiştirir. Bu sinsisial plakların özel bir yapısal fonksiyonu tanımlanmamasına rağmen bu plaklar yerini aldıkları uterus epiteline göre daha kısa oldukları için bunların fetus ile maternal kan damarları arasındaki diffüzyon mesafesini azalttığı düşünülmektedir (Ali 1999, Igwebuike 2006).

2. 17. 2. Çift çekirdekli hücrelerin endokrin görevleri

Çift çekirdekli hücrelerin göç etmesi ve maternal endometrial epitel hücrelerle birleşmesi maternal parça içinde çift çekirdekli granüllerinin oluşmasında önemlidir (Peter 2013). Maternal üç çekirdekli hücrelerde ve sinsisial plaklarda çift çekirdekli hücre granüllerinin varlığı gösterilmiştir (Ali 1999, Igwebuike 2006). Bu nedenle sinsisial plaklar ile maternal üç çekirdekli hücrelerin çift çekirdekli hücre içeriğini maternal kan dolaşımına dağıtılmasında rol oynadığı kabul edilmiştir. Bu granüllerin plasental laktojen granülleri içerdiği görülmüştür. Plasental laktojen endometrial glanduler epitellerinden uterus sütünün sentezinin başlamasını düzenler. Aynı zamanda plasental laktojen ruminantlarda endometrial bez morfogenezisinde ve gebelik esnasındaki farklılaşmasında görev alarak fetal gelişim ve büyümeyi destekler (Igwebuike 2006). Çift çekirdekli hücrelerde plasental laktojenlere ilave olarak prolaktin ilişkili protein-1, gebelikle ilişkili glikoproteinler, östradiol ve progesteron üretildiği de düşünülmektedir. Bu hormonlar; fetal beslenme ve uterus içi canlılığın devamında gerekli olan karunkular ve uterus bez morfogenezisini, farklılaşmasını ve fonksiyonlarının kontrol edilmesinde önemli faktörlerdir (Igwebuike 2006).

Gebelikle ilişkili glikoproteinler iki yeni protein olarak ilk olarak 1982 yılında sığır embriyonik zarlarında belirlenmiştir. Trofoblast çift çekirdekli hücrelerin

sayısındaki artış hücrelerin maturasyonu ile birlikte tam granulleşme oluşmuş çiftçekirdekli hücrelerin trofoektodermin apikal bağlanma yerlerine göç etmesinden kaynaklanır. Göç etme çift çekirdekli hücrelerin uterus epitelial hücreleriyle birleşmesi ile eş zamanlı meydana gelir. İneklerde implantasyon zamanında uterus epiteli ile çift çekirdekli hücreler arasında uterus epitelinde kısmi kayıpla sonuçlanan geçici sinsitium şekillenir. Bu sığır sinsitiumu gebeliğin devamında geri kalan günlerde bölünmeleri devam eden uterus epitel hücrelerinin yer değiştirmesi ile ortadan kaldırılır (Igwebuike 2006).

Göç eden çift çekirdekli hücreler geçici üç çekirdekli hücre oluşturmak için orjinal uterus epitel hücreleri ile birleşirler. Bu hücreler orjinal çift çekirdekli hücrelerdeki granüller eksostoz ile salınınca ölür. Eksostozdan sonra üç çekirdekli hücreler trofoektoderm tarafından yeniden absorbe edilir (Ali 1999, Igwebuike 2006).

Çift çekirdekli hücreler gebelik esnasında önemli endokrinolojik görevlere sahiptir. Bu hücreler plasental laktojen ve gebelikle ilişkili glikoproteinlere ilave olarak progesteron ve B-pregnanediol gibi bazı temel ürünlerin kaynağıdır. Çift çekirdekli hücrelerin granüllerindeki ürünler yukarıda tanımlandığı yol ile maternal doku ve maternal kan dolaşımına ulaşır (Ali 1999, Igwebuike 2006).

İlk güvenilir gebelikle spesifik hormon ölçümü plasenta kaynaklı proteinlerin ölçülmesi ile geliştirildi. Bunlardan ilki PSPB dir. Gebeliğe spesifik protein B sığırlarda gebeliğin 17-19 günleri civarında tek çekirdekli trofoblast hücrelerden şekillenen plasental dev hücreler tarafından üretilir (Spencer ve ark 2007). Bu molekülün konsantrasyonu 24. günde plazmada ölçüm güvenliği oluşturacak düzeye çıkar ve 28. günde ruminantlarda gebelik teşhisi amacıyla ölçümü yapılabilecek bir faktör olarak değerlendirilebilir duruma gelir. Molekül; büyük bir gen ailesi tarafından kodlanan gebelikle ilişkili glikoprotein ailesinin bir üyesidir.

1991 yılında Zoli ve ark tarafından 1982 yılında kullanılan yöntemle gebelikle ilişkili görünen asidik yapılı glikoproteinler izole etmiştir. Daha sonra bu glikoprotein grubu gebelikle ilişkili glikoproteinler (PAG) olarak isimlendirilmiştir. PAG'ler pepsin, katepsin D ve diğer enzimler gibi aspartat proteaz ailesine aittir. PAG sisteminin enzimatik aktivitesi katalitik merkezindeki mutasyonlar sonucunda inaktif olur. Farklı hayvan türlerindeki plasental dokularda farklı PAG'ler belirlenmiştir (Ali 1999, Igwebuike 2006).

Günümüze kadar; sığır (bPAG: Zoli ve ark 1991), koyun (ovPAG: Zoli ve ark1990), kısırak (Green ve ark 1999), domuz (pPAG: Szafranska ve ark 1995, Szafranska ve ark 2001a, Szafranska ve ark 2001b, Szafranska ve ark 2002), deve (Majewska ve ark 2009, Majewska ve ark 2011) ve keçi (caPAG) (Garbayo ve ark 2000) de PAG belirlenmiştir.

Araştırmalar sonucunda sığır plasental dokularında tohumlama sonrası 18 gün kadar erken günlerde 22 PAG DNA'sı belirlenmiştir. Bu PAG'ler iki ana gruba ayrılmıştır. Biri eski olan trofoblast hem tek hem de çift çekirdekli hücrelerce sekresyonu yapılır ve PAG-II olarak gösterilir. Diğer PAG-I olarak gösterilen ve yeni keşfedilen sadece çift çekirdekli hücrelerden salınan gruptur (Touzard ve ark 2013).

2. 17. 3. PAG'lerin fizyolojik işlevleri

Sığır PAG'lerin ancak gebelik yaşına paralel olarak seviyesinin artması (Humblot ve ark 1988, Zoli ve ark 1992, Mialon ve ark 1993, 1994), gebelik esnasında immün baskılayıcı etkisi (Robertsve ark 1996), plasentadan büyüme faktörlerinin taşınması için peptit bağlayıcı etkisi (Xie ve ark 1991, Wallace ve ark 1997), plasental steroid yapımındaki görevleri (Weems ve ark 1994), uterus $PGF_{2\alpha}$ ve PGE_2 üretimindeki rolü (Del Vecchio ve ark 1995, 1996), postpartum ovaryum fizyolojisindeki rolü (Kiracofe ve ark 1993, Al-Gubory ve ark 1997) ve granulosit kemotaktik protein-2 hormonunu da içerecek şekilde hormonal üretim (Austin ve ark 1999) görevi bu molekülü reproduktif fizyolojide önemli hale getirmektedir (Shahin 2012).

Çift çekirdekli hücrelerin tarafından üretilen PAG'ler gebelik teşhisinde kullanılmalarının yanında; plasental fonksiyonların belirlenmesi ya da izlenmesi (Wallace ve ark 1997), plasental beslenme bozukluğu, embriyonik mortalite, abort (Ectors ve ark 1996) ve fetal ikizliğin izlenmesinde (Dobson ve ark 1993, Patel ve ark 1995) de kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir.

Gebelikle ilişkili glikoproteinlerin sığır ve diğer ruminantların plasentasındaki yerleşimi ve bazı PAG'lerin proteolitik etkileri, bunların görevlerine yönelik bazı öngörülerin geliştirilmesine yol açmıştır. Örneğin; bPAG2 gibi PAG'lerin plasentanın

föto maternal yüzeyinde yoğunlaştığı bulunmuştur. Bunların trofoblast-uterus epitelial aralığında protein dönüşümü veya yeniden düzenlenmesinde etkili olan veya doku aralığında yerleşmiş latent büyüme faktörleri yada biyoaktif moleküllerin aktivasyonunda görevi olan proteolitik aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (Ali 1999, Pohler ve Green 2015).

Bazı PAG'lerin proteinaz gibi yeteneğinin olmaması bunların uterus-fötal alanda peptit bağlama gibi görevlerinin olabileceğini düşündürmektedir. Gebelikle ilişkili glikoproteinlerin kendi substrat bağlama bölgelerinde peptit bağları ile etkileşimde oldukları belirtilmektedir. Ayrıca PAG'lerin yüzeyindeki karbonhidratlar bulundukları yerlerde lektini bağlarlar (Ali 1999, Shahin 2012, Pohler ve Green 2015).

Enzimatik aktiviteye sahip PAG'ler oldukça düşük pH da substratların proteolizisini gösterirler (Ali 1999).

Proteinazların doku aralığındaki yerleşimleri, buradaki pH azaldığı zaman PAG lerin proteolitik aktivitelerinde artma beklenir ve doğumda kotiledonların karunkul kriptlerinden ayrışmasını kolaylaştırır (Pohler ve Green 2015).

Gebelikle ilişkili glikoproteinler, sığırlarda maternal immünolojik sistemi etkileyebilir. Ayrıca PAG'ler periferik kan lenfositleri ve endometriyal serpin benzeri proteinler ile ilişkilidir (Pohler ve Green 2015). Progesteronun gebelik esnasında immün sistemi baskılayıcı etkisinin ortaya çıkmasında uterus serpin moleküllerinin rol oynadığı bildirilmiştir. Serpin 14 molekülü gebelik esnasındaki maternal bağışıklık sisteminin baskılanması ile bağlantılı bulunmuştur. Ayrıca serpin bulunuşu ile sitokinlerin varlığı arasındada da negatif bir ilişki bulunduğu bildirilmektedir (Serrano-Pérez ve ark 2017). PAG'lerin fetö-maternal bağlantı yerindeki histoinkompatiblenin devamı için lokal immunsupresif özelliklerinin bulunduğu önerilmektedir. Başlıca mikrovilli bağlantı yerlerinde bulunan filogenetik olarak daha eski olan PAG'lerin trofoblastı maternal bağışıklık sisteminden korumak için immünolojik bariyer oluşumuna katıldığı ileri sürülmektedir. Yeni PAG grubunun ise plasentomlardaki villilerde bulunan çift çekirdekli hücrelerle sınırlı olarak maternal immün sistemi düzenlediği önerilmiştir (Ali 1999, Igwebuike 2006).

Sığırlarda ve koyunlarda PAG1/PSPB luteotropik etkili bulunmuştur (Ali 1999). Örneğin sığırlarda PSPB tedavisinden sonra luteal hücrelerde progesteron ve

PGE₂ üretiminde artış gözlenmiştir. Sığır luteal hücrelerinde progesteron üretimindeki bu artış PGE₂'nin luteotropik etkisinden kaynaklanabilir, fakat bu etki her zaman gözlenememiştir (Ali 1999, Pohler ve Green 2015).

Endometrial hücreler PSPB/PAG ile tedavi edildiğinde bu hücrelerden PGF_{2α} ve PGE₂ sekresyonunu uyardığı bulunmuştur. PSPB PGF_{2α} ve PGE₂ sekresyonunu uyarır ve aynı zamanda büyük ve küçük luteal hücre karışımında gebeliğin 17-18 günlerinde progesteron sekresyonunu artırır. Bu iki molekülün benzer şekilde embriyo implantasyonu ile ilişkili olarak adezyon, yangı ve angiogenezis olgularında rol oynayan alfa-chemokin (granulocyte chemotactic protein-2) sekresyonunu artırır (Igwebuike 2006).

Tüm bunlardan, PAG'lerin gebelikte plasental gelişim ve fonksiyonunda çoklu görevi olduğu anlaşılmaktadır. İlave olarak PAG'lerin yazılanlardan çok farklı görevi de olabilir. Yeni araştırmalar PAG'lerin erken plasental adezyon esnasında uterusun yeniden dönüşümünde rol alabileceklerini göstermiştir (Igwebuike 2006). Nitekim; gebe olan ve olmayan düvelerden 18. gün de alınan endometrium eksplantlarında saflaştırılmış PAG uygulamasının doku yenilenmesinde etkili olan matriksmetalloproteinaz gen bulunuşunu arttırdığı gözlenmiştir. Embriyonik ölüm geçiren ineklerde gebeliğin 28. gününde gebeliği devam eden hayvanlara göre dolaşımdaki PAG düzeyinde azalma belirlenmiştir. Bu azalma plasental oluşumu esnasında kritik olan doku yenilenmesi için plasental başarısızlık ve endometrial iletişim yetersizliğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Ali 1999, Pohler ve Green 2015).

2. 17. 4. Sığırlarda gebelik süresince PAG seviyesi

Gebelik süresince PAG düzeyi ilk defa 1992 yılında izlenmiştir. Bu çalışmada PAG konsantrasyonunun gebeliğin 20 gününden 240 gününe kadar arttığı, bu süreden gebeliğin son 10 gününde önemli şekilde azaldığı, en fazla azalmanın son 5 gün ile doğum sonu ilk gün arasında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca postpartum dönem süresince PAG konsantrasyonunun giderek azaldığı ve doğum sonrası 100 günde seviyesi belirlenemez düzeye indiği ortaya konulmuştur. Diğer bir çalışmada; PAG düzeyinin 24-28 günlerde hızlı şekilde yükseldiği gözlenmiştir. PAG miktarının

doğum öncesi bir kaç hafta içinde daha fazla arttığı, gebeliğin son haftasında ise en yüksek düzeye çıktığı belirlenmiştir (Igwebuike 2006, Shahin 2012).

2. 17. 5. Gebelik süresince PAG düzeyini etkileyen faktörler

Gebelik süresince PAG düzeyini etkileyen faktörlerin ortaya konulmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Ali 1999).

Bu çalışmalarda yavru sayısının PAG düzeyine pozitif etki yaptığı ortaya konulmuştur. Yavru cinsiyeti gebeliğin farklı dönemlerinde PAG seviyesini etkilediği bildirilmiştir. Erkek cinsiyette yavru taşıyan Holstein inek ve düvelerde dişi yavru taşıyanlara göre daha yüksek PAG ölçülürken, dişi Holstein yavru taşıyan Hereford ineklerde PAG düzeyi daha yüksek ölçülmüştür (Ali 1999).

İn vitro üretilen embriyolar da PAG konsantrasyonunu etkilediği gözlenmiştir. İn vitro üretilen embriyo ile klonlanmış embriyo arasında önemli PAG düzeyi farklılığı belirlenmiştir. Ayrıca bazı reproduktif hormonların plasental dokudan PAG sekresyonunu etkileyebileceğine dair bulgular tespit edilmiştir. İneklerde gebeliğin ilk döneminde progesteron düzeyi ile PAG düzeyi arasında pozitif ilişki bildiren araştırmacı yanında, progesteronun önemli etkisinin olmadığını bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır. Progesteron gibi estradiol 17-β'nin da bazı etkileri olabileceği öne sürülmektedir. Erken fetal ölümlerde gebeliğin 35 gününde anormal yüksek veya düşük PAG ile karşılaşılabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca yüksek verimli ineklerde süt veriminin yüksek metabolik oran sonucu oluşan hızlı katabolizma sonucunda PAG düzeyini negatif olarak etkilediği bildirilmiştir (Ali 1999).

Gebelik günü ve yavru babasının ırkının da PAG düzeyini gebelik süresince etkilediği bulunmuştur (Ali 1999, Shahin 2012).

Etçi sığırlarda metabolik gereksinimlerin ve değişik faktörlerin serum PAG düzeyini nasıl etkilediği belirlenmiştir. Araştırmacılara göre; beslenme ve enerji dengesi (Randel 1990, Canfield ve Butler 1991, Lucy ve ark 1992), inek canlı ağırlığı, buzağı canlı ağırlığı, buzağı cinsiyeti, doğumdaki kondüsyon derecesi (Richards ve ark 1986), süt verimi ve süt emme durumu (Williams 1990, Williams ve ark 1996), kan

metabolitleri, glikoz, NEFA ve D-3-Hydroxybutyrate (Grimard ve ark 1995) sığır PAG üretimi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir.

2. 17. 6. Gebelik teşhisi ve izlenmesinde PAG kullanımı

Son yıllarda maternal kanda PAG belirlenmesi ruminantlarda gebelik teşhisinde kullanışlı bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Farklı PAG izoformları periferik kanda 4. gün kadar erken dönemde farklı ölçüm yöntemleri ile belirlenebilir (Ali 1999, Shahin 2012).

PAG belirleme gebeliğin izlenmesinde de kullanışlıdır. Gebelik esnasında fetal durumda oluşacak herhangi bir bozulma, fetal ölüm, plasental fonksiyonların ve PAG gibi plasental ürünlerin üretiminin bozulmasıyla sonuçlanacaktır. Fetal ölüm sonucunda PAG konsantrasyonu aynı dönemdeki normal gebe hayvanlardaki PAG düzeyine göre hızlı şekilde azalacaktır (Ali 1999, Shahin 2012).

2. 18. Sütte PAG bulunuşu

Süt; memelilerde yeni doğanların yaşamlarının ilk döneminde besin gereksinimlerini karşılamak için meme bezinden üretilen bir biyolojik sıvıdır. Sütün bileşimi türler arasında ve aynı türün bireyleri arasında farklı olabilir. Bireysel olarak; sağlık, beslenme durumu, laktasyon dönemi, hayvan yaşı, sağım zamanları aralığı da sütün bileşimini etkilemektedir (Gonzalez ve ark 2001, Lopez-Gatius ve ark 2007, Friedrich ve Holtz 2010, Shahin 2012). Meme bezinin sekretorik birimi alveollerdir. Her alveol tek katlı sekretorik epitel hücrelerinin çevrelediği alveoler lumeni oluşturur. Bu epitel katı kandan süte kimyasalların taşınmasında bariyer oluşturduğu düşünülmektedir. Meme epitel hücreleri bazal bölgeden kan kökenli moleküllerin alımını ve kendi ürünlerini apikal bölgelerinden endositoz ve ekzostoza ile salınımını kontrol eder. Bu mekanizmalar meme bezinin fizyolojik durumu ile sıkı şekilde bağlantılıdır. Aynı şekilde meme epitel hücreleri hormonlar, büyüme faktörleri, transferrin ve immunoglobulinler gibi plazma kaynaklı proteinleri başlıca clathrin kaplı veziküller yoluyla oluşturur ve apikal bölgesine taşıyarak salınımını yapar. Ancak kandaki PAG'nin süte taşınma yolu tam olarak bilinmemektedir (Gonzalez ve ark 2001, Lopez-Gatius ve ark 2007, Friedrich ve Holtz 2010, Shahin 2012). PAG

suda çözünebilen bir protein olduğu gibi iki katmanlı lipid yüzey membranını geçebileceği bildirilmektedir. Ayrıca büyüme faktörlerinin sızıntı şeklinde doğum zamanında süte taşınmasını sağlayacak şekilde yöntemi kullanabilecekleri önerilmektedir. Aynı şekilde PAG moleküllerinin de süte geçiş yolunun bu olabileceği düşünülmektedir (Gonzalez ve ark 2001, Lopez-Gatius ve ark 2007, Friedrich ve Holtz 2010, Shahin 2012).

Süt; damar delme stresi oluşturmaması, özel yetenek gerektirmemesi, örnek almanın kolay olması ve kolay saklanması nedeni ile hormon ve diğer yapıların düzeyinin belirlenmesi amacıyla dikkat çeken bir materyal olmuştur (Gajewski ve ark 2008, Friedrich ve Holtz 2010, Leblanc 2013, Lawson ve ark 2014). Sütte PAG düzeyi ilk defa 1996 ve 1999 yılında postpartum dönemdeki ineklerde araştırılmıştır. Araştırmacılar (Tainturier ve ark 1996) bu ilk çalışmalarda süt örneğinde PAG analizi ile erken gebelik tespiti yapılabileceğini vurgulamışlardır. Sığırlar yanında keçilerde de süt örneklerinde PAG belirlenebileceği bildirilmiştir (Gonzalez ve ark 2001, Lopez-Gatius ve ark 2007, Friedrich ve Holtz 2010, Shahin 2012).

Bu ilk çalışmalardan sonra maliyeti düşük ve hızlı sonuç veren hızlı testler geliştirilerek süt örneklerinde PAG analizleri gerçekleştirilmiştir. Sütte PAG analizi yapılmakta olmasına rağmen PAG moleküllerinin maternal dolaşımdan süte taşınma mekanizmaları tam olarak açıklanmamıştır (Lopez-Gatius ve ark 2007, Shahin 2012).

Meme bezinin sekretorik dokusu olan alveoller alveol lumenini tamamen çevreleyen tek katmanlı sekretorik epite hücrelerince çevrelenmiştir. Bu tek katmanlı hücresel yapı kan kökenli yapıların süte geçişine karşı bariyer oluşturur. Maternal kan dolaşımındaki serbest veya bağlı PAG molekülünün vücuttaki biyolojik sıvılara taşınma yolu bilinmemektedir. Araştırmacılara göre PAG suda çözünebilen bir molekül olduğu için alveollerdeki yüzey membranındaki iki katmanlı lipid yapıdan karşıya geçebilir. Meme bezindeki gevşek bağlantı özelliği büyüme faktörlerinin süte geçişine izin verebilir. Benzer bir mekanizma PAG molekülünün meme sekresyonuna geçişi için de önerilmektedir (Gonzalez ve ark 2001, Shahin 2012).

Süt PAG testi tohumlama sonrası 32 günde gebelik tespiti için güvenilir, doğru teşhis sağlar ve iyi yönetim uygulamaları ile bu test çiftlik şartları altında tohumlama sonrası 21 günde östrüs göstermeme şeklinde kesin olmayan gebelik tespiti için

doğrulanmasında geçerlidir. Ayrıca bu test gebeliğin devamının izlenmesinde ve gebelik kayıplarının tespitinde de geçerlidir (Gonzalez ve ark 2001, Lopez-Gatius ve ark 2007, Friedrich ve Holtz 2010, Shahin 2012).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3. 1. Materyal

Çalışma; Aydın ilinde, entansif bakım ve besleme şartları ve modern sürü yönetim sistemi uygulanan ve 3.000 baş sağmal inek barındırılan özel bir damızlık süt ineği işletmesinde gerçekleştirildi. Bu inekler arasından yaşları 3-7 arasında değişen, gönüllü bekleme süresi (doğum sonrası 60 gün) tamamladıktan sonra doğal östrüslerinde işletme teknik personeline suni tohumlama yapılan ve tohumlama sonrası 18-24 günlerde östrüsleri geri dönmeyen 229 baş inek materyal olarak kullanıldı.

Çalışma uygulamaları 1 Aralık 2015 tarihinde başlatılıp 30 Haziran 2016 tarihinde tamamlandı.

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Östrüs tespiti ve tohumlamalar

Materyali teşkil eden ineklere, gönüllü bekleme süresinden sonra, sürü yönetim programı verileri (aktivitemetre, süt veriminde azalma) ve gözlem yöntemiyle kombine edilen bulgulara dayandırılarak belirlenen ilk doğal östrüslerinde, deneyimli teknisyenler tarafından suni tohumlama uygulandı.

3. 2. 2. Bakım Şartları

Günde 3 defa sağım uygulanan hayvanlara 2 defa yem sunuldu ve su adlibitum sağlandı. Hayvanlar serbest gezinme alanına sahip serbest duraklı yapıya sahip ortamda barındırıldı.

3. 2. 3. Beslenme Şartları

İşletmede hayvanlar gereksinimlerine göre hesaplanmış yem hammaddelerinden hazırlanmış toplam karışım rasyon (TMR) şeklinde yemlendiler.

3. 2. 4. Numunelerinin Alınması

Suni tohumlama uygulanan ve tohumlamalarını izleyen 18-24 gün içinde östrüsleri geriye dönmeyen ineklerden, tohumlama sonrası 29. günde aynı anda kan ve süt örnekleri alındı.

Kan örneği kuyruk venasından vakumlu, antikoagulantsız tüplere 10 ml miktarında alındı ve 2 saat içerisinde laboratuvara taşınarak 2.000 devir/dk'lık santrifüjde serumları çıkarıldı. Elde edilen serum örnekleri analiz zamanına kadar derin dondurucuda bekletildi. Analiz zamanında örnekler sığır gebelik testi protokolüne göre hazırlandı ve işlem uygulandı.

Süt örnekleri, kan örneği alınmadan hemen önce sağlıklı meme lobunun herhangi birisinden birkaç çekim ön süt yere sağıldıktan sonra yaklaşık 20 ml miktarında tüpe alındı ve 2 saat içerisinde laboratuvara taşındı.

3. 2. 5. Ultrason Muayenelerinin Gerçekleştirilmesi

Çalışmada ultrasonografik muayene referans test olarak kabul edildi. Ultrasonografik muayene kan ve süt örneklerinin alındığı aynı gün (29. gün) yapıldı. Şüpheli durumlarda ilk muayeneyi izleyen ilk bir hafta içinde (tohumlama sonrası 35. güne kadar) ikinci kez uygulanıp sonuç kesinleştirildi. Muayenede 7.5 MHz frekansta, transrektal linear prob içeren Hasvet-SHENZEN WELL. WED-3000V cihaz kullanıldı.

Ultrasonik muayeneden önce rektumda bulunan dışkı tamamen boşaltıldı. Bu esnada rektal palpasyonda genital organların konumları ve ovaryumlardan biri üzerinde CL bulunup bulunmadığı tespit edilmeye çalışıldı. Bilahere rektumda bulunan el laterale (gluteal kaslara doğru) yönlendirilip bilek seviyesinde geri çekildikten sonra tarama yüzeyine ultrasonik jel sürülmüş ultrason probu avuç içerisinde itilip kavrandıktan sonra bastırılarak rektum duvarına sıkıca temas etmesi sağlandı. Prob tarama yüzeyi yine bastırılarak ventrale yönlendirilip yavaş bir şekilde kraniyele doğru ilerletildi. Önce akustik pencere olarak kullanılan sidik kesesi görüntülendi. Bilahere cervix izlendi.

Ultrasonik muayenede öncelikle rektal muayenede CL bulunan ovaryum görüntülenip CL'un kalitesi (büyüklüğü>22 mm, luteal doku yoğunluğu, kompakt olup olmadığı) belirlendi. Aynı şekilde diğer ovaryum da değerlendirildi. Böylece ultrasonik gebelik teşhisi amacıyla kornu uterilerin taranmasında zaman kazanmak açısından öncelikle CL'un bulunduğu kornu uteri tarandı. Kornu uterilerin taranmasında aşağıda belirtilen bulgulardan en az 3 tanesi gözlemlendiğinde hayvan gebe olarak kabul edildi. Bunlar; yavru suları, yavru zarları, göbek kordonu, embriyo, embriyoda kalp atımı ve uterusda bölmeli yapılar idi. Ovaryumlardan birisinde kaliteli CL bulunmayan (yeterli büyüklükte olmayan) hayvanlarda her bir kornu uteri, bifurkasyo bölgesinden başlanarak longitudinal ve transversal kesitlerde muhtemel gebelik bulguları yönünden detaylı olarak tarandı. Yukarıda belirtilen bulgular gözlenemeyen hayvanlar gebe değil olarak kabul edildi.

3. 2. 6. PAG Tayini

Kan ve süt örneklerinde PAG düzeyi ticari ELISA kitleri (DG29 Agrilab-TR ve IDEXX Milk Pregnancy Test-DİAGEN AŞ TR) kullanılarak, üretici firmanın bildirdiği kullanım talimatı doğrultusunda, hayvanın gebelik durumunu bilmeyen, deneyimli teknik personel tarafından gerçekleştirildi.

Kan örneklerinde PAG tayini

Deneyde kullanılan aletler

Santrifüj

ELISA okuyucu

ELISA plate yıkayıcı

İnkübatör

Otomatik pipet

Pipet ucu

Sarf malzemeleri

Distile su

Kullanılan tampon ve solüsyonlar

Modular plates coated with antibodies (12 x 8 strips/plate)

Solution 1 / Concentrated wash solution (100X)

Solution 2 / Assay buffer

Solution 3 / Standard A to F (0 to 3500 pg/mL)

Solution 4 / Detector

Solution 5 / Substrate

Solution 6 / Stop

Testin yapılışı

Test sığır kanında gebelik işareti olan protein bulunup bulunmadığını belirlemektedir. Analiz tohumlama sonrası 29. günde alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda yapıldı. Test solüsyonu, standart sıvısı ile kan örnekleri antikorla kaplanmış kuyucuklara konularak 1 saat 37 derecede inkübe edildi. İlk inkübasyon sonrasında plate yıkandı ve antikor belirleyen sıvı eklenerek 1 saat inkübasyona bırakıldı. İkinci inkübasyon sonrasında plate yıkandı, substrat ilave edilerek oda sıcaklığında reaksiyon için 30 dakika beklendi. Reaksiyon durdurularak ELISA okuyucusunda 450 nm ışık altında okundu.

Sonuçların yorumlanması

Analiz sonucunda okunan değer (pg/ml);

>1.000 olduğunda pozitif/gebe,

300-1.000 olduğunda şüpheli ve

<300 olduğunda negatif/gebe değil olarak kabul edildi.

Süt örneklerinde PAG tayini

Süt örneklerinin sağlıklı memelerden alınmasına dikkat edildi. Analiz öncesinde süt örneklerinde bozulma oluşup oluşmadığı kontrol edildi.

Süt PAG analiz testi sığır sütünde gebelik işaretçisi olan gebelikle ilişkili glikoprotein bulunup bulunmadığını belirleyen kitler ile gerçekleştirildi. Pleyt yüzeyi PAG'ye karşı oluşan antikorla kaplanmıştır. Test edilecek süt örneği antikorla kaplı kuyucuklarda inkübe edildikten sonra antikorla bağlanan PAG miktarı belirlenir.

Deneyde kullanılan aletler

Pipet
Pipet ucu
Graduated cylinder
ELISA okuyucu
ELISA yıkayıcı
İnkübatör
Distile su
Plate çalkalayıcı
Anti-PAG antikor kaplı plate

Sarf malzemeleri

Distile su

Kullanılan tampon ve solüsyonlar

Pozitif kontrol solüsyonu
Negatif kontrol solüsyonu
Konjugat
TMB solüsyonu
Stop solüsyonu
Yıkama solüsyonu
Dedektör solüsyonu

Testin yapılışı

Tüm solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi. Kullanım öncesinde solüsyonlar hafifçe sallandı. Pozitif ve negatif kontrol sıvıları kuyucuklara ilave edildi. Süt örnekleri kuyucuklara konuldu. Daha sonra 2 saat 37 derecede inkübasyona bırakıldı. Buharlaşmanın önüne geçmek için plate sıkı şekilde kaplandı. Yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkandı. Yıkama esnasında plate'in kurummasının önüne geçildi. Son yıkamadan sonra yıkama solüsyonu tamamen uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara dedektör sıvısı

ilave edildi. 30 dakika 18-26 derecede inkübe edildi. Yıkama sonrasında tüm kuyucuklara konjugat ileve edildi. 30 dakika 18-26 derecede inkübe edildi. Yıkama sonrasında tüm kuyucuklara TMB solüsyonu ileve edildi. Yirmi dakika 18-26 derecede inkübe edildi. Yıkama sonrasında tüm kuyucuklara stop solüsyonu ileve edildi. Örnekler 450nm de okunarak kayıt edildi.

Sonuçların yorumlanması

Okuyucudan elde edilen değer;

<0.100 ise boş veya gebe değil,

0.100-0.250 ise şüpheli ve

>0.250 ise gebe olarak kabul edildi.

3. 3. İstatistik analiz

Erken gebelik teşhis yöntemlerinde, geçerliliği daha önceden saptanan ve oldukça yüksek olan ultrasonografi sonucu referans değer olarak kullanıldı. Kan ve süt PAG testinin geçerlilik ve güvenilirlik araştırması; duyarlılık, özgüllük pozitif ve negatifleri belirleme ve doğruluk oranları ile belirlendi. Kan ve süt PAG sonuçları arasındaki uyum Kappa testi ile değerlendirildi.

3. BULGULAR

3. 1. Genel Bulguları

Tohumlama sonrası 29. günde ultrason, kan ve süt PAG testleri ile gebelik muayenesi gerçekleştirilen 229 baş inekten her 3 yöntemle elde edilen gebelik bulguları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Tohumlama sonrası 29. günde ultrason, kan ve süt PAG testleri ile tespit edilen gebelik bulguları

	Ultrason	Kan PAG	Süt PAG
Gebe	104	99	103
Gebe değil	125	104	100
Yanlış pozitif	0	0	0
Yanlış negatif	0	7	9
Pozitif şüpheli	0	5	1
Negatif şüpheli	0	14	16
TOPLAM	229	229	229

Çalışmada referans yöntem olarak kabul edilen ultrason muayenesinde, araştırmaya dahil edilen 229 baş inekten 104 ineğin gebe, 125 ineğin ise gebe olmadığı tespit edilmiştir.

3. 2. Kan PAGs testi bulguları

Bu 229 hayvanın kan PAG analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde; 104 ineğin gebe olmadığı, 106 ineğin gebe olduğu ve 19 ineğin ise şüpheli gebe olduğu gözlenmiştir.

Kan PAGs analizinde ultrasonda gebe olmadığı belirlenen 125 baş inekten 7 başına gebe, 14 başına ise şüpheli teşhisi konuldu. Kan PAG analizinde 7 baş inek yanlış negatif belirlenmiştir. Yani bu hayvanlar gebe olmadıkları halde gebe teşhisi konulmuştur.

Ultrasonda gebe teşhisi konulan 104 baş inekten hiç birisine boş teşhisi konulmazken, 5 başına ise şüpheli teşhisi konulduğu gözlemlendi. Kan PAGs analizi sonuçları ile yanlış pozitif teşhisi konulmamıştır.

Çizelge 3. 2. Tohumlama sonrası 29. günde yapılan kan PAGs düzeyine göre gebe, gebe olmayan ve şüpheli inek sayıları

	Kan PAGs ELISA testi sonuçları			Gerçek Durum (Ultrason)
	Gebe	Boş	Şüpheli	
Gebe	99	0	5	104
Boş	7	104	14	125
Toplam	106	104	19	229

$PG = 0.886$, $PA = 0.458$, $Kappa = 0.790$; İki durum arasındaki uyum = İYİ

Kan PAGs analizi ile 5 inek şüpheli gebe (pozitif şüpheli), 14 inek şüpheli gebe değil (negatif şüpheli) teşhisi konulmuştur.

Şüphelilerin de değerlendirilmesi ile iki durum arasındaki uyum iyi olarak bulunmuştur ($Kappa=0.790$). Kan PAGs-ELISA testinin genel gücü veya geçerliliği=gerçek pozitif+gerçek negatif/ gerçek pozitif+gerçek negatif+yanlış pozitif+yanlış negatif=99+104/99+104+0+7= **%96.66** olarak bulunmuştur.

3. 3. Süt PAGs testi bulguları

Aynı 229 baş ineğin süt PAG analizinde 112 ineğin gebe, 100 ineğin gebe değil ve 17 ineğin ise şüpheli olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 3.3. Tohumlama sonrası 29. günde uygulanan Süt PAG düzeyine göre gebe, gebe değil ve şüpheli inek sayıları

	Süt PAGs-ELISA testi sonuçları			Gerçek Durum (Ultrason)
	Gebe	Boş	Şüpheli	
Gebe	103	0	1	104
Boş	9	100	16	125
Toplam	112	100	17	229

$PG = 0.886$, $PA = 0.460$, $Kappa = 0.790$; İki durum arasındaki uyum = İYİ

Ultrasonda gebe değil teşhisi konulan 125 baş inekten 9 başına süt PAG ile gebe, 16 başına ise şüpheli teşhisi konulmuştur. Benzer şekilde ultrason ile gebe teşhisi konulan 104 baş inekten hiç birisine gebe değil denilmezken 1 başına ise şüpheli teşhisi konulmuştur. Süt PAG analizi ile 9 baş ineğe yanlış negatif teşhisi konulurken, hiç yanlış pozitif teşhis yapılmamıştır.

Süt PAG analizi ile 1 inek şüpheli gebe (pozitif şüpheli), 16 inek şüpheli gebe değil (negatif şüpheli) teşhisi konulmuştur.

Şüphelilerin de değerlendirilmesi ile iki durum arasındaki uyum iyi olarak bulunmuştur (Kappa=0.790). Süt PAG ELISA testinin genel gücü veya geçerliliği=gerçek pozitif+gerçek negatif/ gerçek pozitif+gerçek negatif+yanlış pozitif+yanlış negatif=103+100/103+100+0+9= **%95.75** olarak bulunmuştur.

Kan ve süt PAG-ELISA testlerinin duyarlılık, özgüllük, gebe olan ve olmayanları gösterme değeri, doğruluk ve uyumluluk oranları aşağıdaki tabloda (çizelge 3.4) gösterildiği şekilde bulunmuştur.

Çizelge 3.4. Kan ve süt PAGs-ELISA testlerinin duyarlılık, özgüllük, gebe olan ve olmayanları gösterme değeri, doğruluk ve uyumluluk oranları.

	Duyarlılık oranı %	Özgüllük oranı %	Gebe olanları gösterme değeri %	Gebe olmayanları gösterme değeri %	Doğruluk oranı %	Kappa
Kan PAG	93.4	100	100	93.7	96.7	0,935 ^k
Süt PAG	92	100	100	91.7	95.8	0,919 ^k

^k Kappa değeri >0.8: uyumluluk mükemmel

Kan ve süt PAGs-ELISA testinde doğruluk oranlarının sırasıyla %96.7 ve %95.8 olduğu bulundu ve her iki test de uyumluluğun mükemmel olduğu gözlemlendi (^k >0.8). Yanlış pozitif oranları kan PAGs-ELISA testinde %6,6, süt PAGs-ELISA testinde %8,03 olarak bulundu. Kan ve süt-PAGs-ELISA testlerinin genel gücü ve geçerliliği sırasıyla %96.66 ve %95.75 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak kan PAGs-ELISA testinin yanı sıra süt PAGs-ELISA testinin de ineklerde erken gebelik teşhisinde güvenilir bir test olduğu kanısına varılmıştır.

4. TARTIŞMA

Damızlık sütçü işletmelerde infertilite büyük önem taşıdığı için bu sorunun çözümüne yönelik bilimsel çalışmaların sadece bilimsel değil aynı zamanda ekonomik sonuçlarının da önemli olduğu açıktır. Bu nedenle sunulan araştırma sonuçlarının hem bilimsel birikime, hem de ekonomik alana katkı potansiyeli bulunmaktadır. Çünkü infertilitenin olumsuz etkilerinin önlenmesinde hayvanın gebelik durumunun bilinmesinin önemi kabul edilen bir gerçektir. Bu nedenle sütçü işletmeler düşük maliyetli, yüksek doğrulukta sonuç veren ve saha şartlarında kolay uygulanan bir yöntemle hayvanlarının gebe olup olmadıklarını mümkün olan en erken dönemde belirlemelidir (Balhara ve ark 2013). Doğum gebe kalma aralığının uygun olması için doğum sonrası bakım idare şartlarına odaklanılmalıdır. İneklerin doğum sonrası erken gebe kalması daha fazla buzağı ve süt elde edilmesini sağlar fakat erken gebe kalma daha yüksek embrionik ölüm nedeni ile tohumlama sayısında artışı beraberinde getirir. Bu nedenle gebeliğin erkenden ve yüksek doğrulukla belirlenmesi uygun doğum gebe kalma aralığını oluşturmada anahtar rol oynar (Szenci ve ark 1998).

Gebelikle ilişkili glikoproteinlerin erken gebelik teşhisinde bir biomarker olabileceğinin belirlenmesi sonucu bilim adamları ve teknoloji firmaları çok sayıda çalışma ile PAG analiz kitinin geliştirmesine odaklanmıştır (Green ve ark 2005). Erken gebelik teşhisinde kullanılma potansiyeli olan ve son yıllarda araştırmacıların dikkatini yoğun şekilde çekmiş olan PAG analizinin etkinliğinin değerlendirilmesinin amaçlandığı araştırmada, geçerliliği daha önceden saptanan ve oldukça yüksek olan ultrasonografik muayene referans test yöntemi olarak kabul edilmiştir.

Günlük ultrason muayeneleri ile erken gebelik gözlenebilir. Ancak ultrason muayenesinin günlük uygulanması pratik bulunmamakta, zaman alıcı görülmekte ve hayvan refahını olumsuz etkileyerek iatrojenik gebelik kayıpları oluşturabileceği değerlendirilmektedir. Bu nedenle ineklerde kimyasal yöntemlerle yapılacak analizlerin kullanılabileceği düşünülmektedir. Gebelik teşhisinde kullanılan kimyasal yöntemlerde, tohumlama sonrası özel bir zamanda reproduktif hormonların olup olmadığı veya miktar ölçümleri yapılmaktadır. Kimyasal testlerden bir diğer yaklaşım ise canlı bir embriyonun varlığını gösteren yavruya özel yapıların anne kanında

varlığının araştırılmasıdır. Kimyasal yöntemlerle gebelik teşhisi konusunda ilk akla gelen ve en çok araştırılan progesteron analizi olmuştur. Son yıllarda sadece gebe uterustan sentezlendiği tespit edilen PAG'ler de dikkati çekmektedir. Ancak; PAG analizinin progesteron ile gebelik teşhisine göre avantajı bulunmaktadır. Bunlardan birisi PAG tohumlama sonrası uygun günlerden sonra her zaman bakılabilirken, progesteron analiz zamanı tohumlama sonra 19-23. günlerde sınırlı olmasıdır. İkincisi ise progesteron ile pozitif sonucun güvenilirliği en iyi bulgulara %80 düzeyinde bulunurken (Sasser ve Ruder 1987) PAG ile pozitif sonuçların güvenilirliği %95-100 düzeyinde belirlenmesidir. (Sasser ve ark 1986, Zoli ve ark 1992).

İneklerde ultrasonografi ile RUTİN gebelik muayenesi için tohumlama sonrası 28. gün önerilmektedir (Dinç 2008). Yapılan yoğun araştırmalarla bu gündeki gebelik teşhisi için ultrasonografinin geçerli bir yöntem olduğu geniş kabul görmüştür. Uterusta canlı bir embriyonun tespit edilmesinin yanı sıra ultrasonografi gebelik kaybını, embriyonik ölümleri ve embriyonik dejenerasyonu hızlı şekilde tespit edebilmektedir (Moharrami ve ark 2013). Ayrıca gebe olmayan hayvan hakkında ilave bilgiler sağlamaktadır. Diğer taraftan ovaryumlar üzerindeki mevcut fonksiyonel yapılara göre senkronizasyon veya resenronizasyon protokollerinin belirlenmesi, yönlendirilmesi ve hızla uygulanmasına izin vermektedir (Dinç 2008).

Ekonomik bakış açısıyla değerlendirildiğinde erken gebe değil testinin (gebe hayvanın doğru teşhisi) duyarlılığı özgüllüğünden (gebe olmayanın doğru belirlenmesi) daha önemli bulunmuştur. Kimyasal testlerle erken gebe olmayanın teşhisinden potansiyel ekonomik fayda elde etmek için test tohumlama sonrası 31 günde gerçekleştirilirse duyarlılığın %96'dan, 24 gün sonra gerçekleştirilirse %94'ten daha yüksek olması gerektiği bildirilmektedir (Fricke ve Giordano 2011, Giordano ve ark 2013). Kan PAG düzeyinin ELISA yöntemi ile belirlendiği testlerde duyarlılığın %93.9 ile %100 arasında, özgüllüğün ise %66.7 ile %95.5 arasında değiştiği bildirilmektedir (Kaya ve ark 2016). Araştırmacı ineklerde %95.9 duyarlılık ve %94.7 özgüllük bulduğu çalışmasında sonuçların literatür bildirimleri ile uyumlu olduğunu düşünmektedir. Sunulan çalışmada da kan PAG ELISA testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %93.7 olarak bulunmuştur. Duyarlılık ve özgüllük toplamının >170 olduğu testlerin klinik olarak yararlı olduğu söylenir. Sunulan çalışmada kan PAG-ELISA testinde bu oranların toplamı 193.7 olarak bulunduğu için testin tanısal

gücünün oldukça yüksek olduğu kanısına varılmıştır. Tohumlama sonrası plazma PAG düzeyi değerlendirilerek yapılan gebelik teşhisinin duyarlılık ve özgüllüğünün kabul edilebilir (>%96) seviyede olduğu düşünülmektedir (Fricke ve Giordano 2011). Ancak, duyarlılık ve özgüllük sıklıkla testin yararının abartılmasına yol açabilir. Bu durumda testin pozitifleri ve negatifleri belirleme gücünün de ortaya konulması ile daha kesin bir klinik yargıya varılabilir.

Maternal kanda PAG tohumlama sonrası 22-24 günlerde belirlenmeye başlar. PAG düzeyi gebelik günleri ilerledikçe artar. Bu nedenle analizin duyarlılığının artmasıyla, yanlış negatif oranında azalma oluşması beklenir (Kaya ve ark 2016).

Sunulan araştırmada kan PAG düzeyinin gebelik teşhisindeki etkinliğinin ortaya konulması amacıyla yapılan araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi sonrasında yanlış negatif bulgu konulmamıştır. Araştırmada referans test olan ultrasonla gebe teşhisi konulan 104 baş inekten hiç birisine kan PAG düzeyine göre gebe değil (yanlış negatif teşhis) değerlendirilmesi yapılmamıştır.

Sunulan bu araştırmada yanlış negatif sonuçla karşılaşılmasa da gebe olan ineklere gebe değil teşhisi konulan araştırmalar bulunmaktadır. Araştırmacılara göre, (Piechotta ve ark 2011, Karen ve ark 2015) kan PAG düzeyinin yanlış negatif teşhise yöneltmesinin nedeni örneklemenin yapıldığı hayvanın bireysel özelliğine bağlı olarak düşük PAG üretimi olabilir. Bireysel olarak düşük PAG ölçülen hayvanlarda molekülün düzeyindeki artışta gecikme olabileceği bildirilmektedir (Piechotta ve ark 2011).

Ayrıca; ineklerde gebelik süreci içinde farklı zamanlarda değişik glikoproteinlerin üretiminin söz konusu olabileceği ve bunların gebeliğin dönemlerine göre görev alabileceği bildirilmiştir (Green ve ark 2000, Mercadante ve ark 2013). Gebeliğin değişik dönemlerinde maternal dolaşımda hangi PAG molekülünün yoğun olduğu tam olarak ortaya konulmadığı için analizlerde hangi PAG molekülünün ölçüldüğü de kesin bilinmemektedir (Wallace ve ark 2015). Bu noktada belirli bir PAG analizi için üretilmiş olan antikorların farklı glikoproteinlerin baskın olduğu dönemde örnekleme yapılması ile çelişkili sonuçlarla karşılaşılabilmesi, yanlış negatif değerlendirmeler yapılabileceği düşünülmektedir (Karen ve ark 2015). İneklerde çok çeşitli ve çok sayıda PAG moleküllerinden yarılanma sürelerinin değişik olması

beklenebilir. Bu nedenle analizlerde hedeflenen PAG molekülünün yarılanma süresi uzun ise sonuçlarda yanlışların oluşması kaçınılmaz olacaktır. Bu nedenle kısa yarılanma süresine sahip PAG moleküllerinin ölçülmesine yönelik testlerin geliştirilmesi gerektiği bildirilmektedir (Green ve ark 2005).

Yanlış negatif bulgunun bir diğer nedeni olarak örneklemenin tohumlama sonrası erken dönemde yapılması ileri sürülmektedir. Nitekim Moharrami ve ark (2013) tohumlama sonrası 24. günde 3 adet hayvanda yanlış negatif teşhis koymuş olmalarına rağmen 45. günde yapılan ölçümde yanlış negatif değerlendirme yapılmadığı bildirilmektedir. Romano ve Larson (2010) tarafından tohumlama ile kan örneği aralığı arttıkça testin duyarlılığı ve negatif tahmin değerinde iyileşme olduğu bildirilmektedir. Ancak, araştırmacılara ve test üretici firmalara göre uygun olan en erken örnek alma zamanı olarak önerilen günler geç embriyonik döneme denk gelen günlerdir. Bu dönem fizyolojik olarak ineklerde allantochorionik villilerin endometriyumdaki kriptlere tutunduğu ve plasentomların oluşup gelişmeye başladığı, trofoblast hücrelerinin endometriyuma doğru göç ettikleri, çift çekirdekli hücrelerin şekillendiği ve gebelikle ilişkili glikoprotein üretiminin başladığı süreç olarak bilinmektedir. Bu fizyolojik sürece denk düşen günlerde alınan kan örneklerinde tespit edilebilir bir PAG düzeyinin olmamasının trofoblast tutunmasının düzgün olmamasından, trofoblast hücrelerinin anormal yapıda olması veya PAG sentezleyen gen bulunuşu bozukluğundan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.

Nitekim sığırlarda tohumlama sonrası 30. günden önce gerçekleştirilen analizlerde değişken PAG düzeylerinin belirlendiğini bildiren araştırmalar bulunmaktadır (Romano ve Larson 2010). Araştırmacılar (Romano ve Larson 2010) tohumlama sonrası 30. günde ve 35. günde aldıkları iki örnek arasında testin spesifitesi ve doğru tahmin oranında %4.9 dan %6.1'e düzenli bir artış tespit etmişlerdir.

Ricci ve ark (2015) ile Mercadante ve ark (2016) ile Fricke ve Giordano (2011), primipar hayvanlarda kan PAG düzeyinin daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılara göre primipar ineklerde kan PAG düzeyi ELISA ile yapılabilecek eşik düzeyin üstünde ölçülmüştür. Bu nedenle bu tür özellikteki (PAG düzeyi çok yüksek olan) gebe olan hayvanlara yanlışlıkla gebe değil teşhisi konulabilir. Kaya ve ark (2016) tarafından düvelerin kan PAG düzeylerinin ineklerden

daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılara göre bunun nedeni, laktasyondaki ineklerde süt verimi olabilir. Sağılan ineklerde plazmadaki PAG molekülleri süte geçtiği için plazma düzeylerinde bir azalma olabileceği ileri sürülmektedir (Kaya ve ark 2016).

Bazı hayvanlarda normalin üstünde yüksek PAG düzeyinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak, fetal stresten kaynaklanabileceği ileri sürülürken genetik farklılıkların da rol oynayabileceği düşünülmektedir (Fernandez-Arias ve ark 1999).

Yanlış negatif tanı önemli teknik ve ekonomik etkilere sahiptir. Uygulamada gebe olan ineklere yanlışlıkla gebe değil teşhisi konulması, dişilere gebeliği sona erdirecek olan PGF₂ α enjeksiyonu ile sonuçlanabilir. Bu şekilde ineklerin tekrar gebe kalması için en az 1-2 siklus zamanı geçmesi gerekecektir. Bu tür hayvanlarda açık günlerde uzama ve erken sürüden uzaklaştırma sonuçları görülebilecektir (Fricke ve Giordano 2011).

Sunulan çalışmada referans yöntem olan ultrasonografi ile gebe olmadığı belirlenen 125 baş inekten 7 başına (%5.6) kan PAG analizi yöntemiyle gebe (yanlış pozitif sonuç) değerlendirmesi yapılmıştır. Kan PAG analiz ELISA kiti üreten firmaların bildirimlerinden tüm ticari kitlerin doğru pozitif oranlarının %98-99 olduğu görülmektedir. Bu kitlerin %1 ile %5 arasında yanlış pozitif okuma yapması beklenmektedir. Romano ve Larson (2010) tarafından %5 oranında şüpheli teşhis bildirilmektedir. Araştırmada okunan yanlış pozitif oranı kit üreticilerinin beklentileri ile uyumlu bulunmuştur.

Diğer taraftan, ineklerde kan PAG ile gerçekleştirilen analizlerin sonucunda gebe olmayan hayvanlara yanlış gebe teşhisinin konulmasının bir kaç nedene bağlı olabileceği bildirilmiştir.

Öncelikle; kanda PAG moleküllerinin doğum sonrasında tespit edilebilir düzeyin altına inmesinin uzun sürdüğü belirlenmiştir. Araştırmacılara göre gebeliğin sona ermesinden sonra kanda PAG bir süre daha tespit edilmektedir. Bu süre doğum sonrası yaklaşık 70-100 gün olarak bildirilmektedir (Szenci ve ark 1998). Bu nedenle kan PAG ile gebelik teşhisinin molekülün kanda tespit edilebilir düzeyin altına inmeden kullanılmaması gerektiği tavsiye edilmektedir. İneklerde doğum sonrası bu dönemlerde yapılacak analizlerde bazı ineklere gebe olmadığı halde gebe teşhisi

konulabileceği (kalıntı PAG moleküllerinden dolayı) bildirilmektedir. Nitekim araştırmacılar (Szenci ve ark 1998) 138 inekten 62 başına (%44,9) gebe olmadıkları halde gebe teşhisi konulduğunu bildirmektedirler.

Kan PAG analizi ile yanlış pozitif değerlendirme yapmanın bir diğer nedeni olarak analiz için kan örneği alınmasından sonra embriyonik ölümün oluşması da kabul edilmektedir. Nitekim ineklerde tohumlama sonrası 28 ile 45. günleri arasında yaklaşık %13 oranında gebelik kaybı oluşabileceği bildirilmektedir (Santos ve ark 2004). Giordano ve ark (2012) gebe hayvanlara $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu ile gebeliği sonlandırdıktan sonra PAG seviyesini izledikleri çalışmada ortalama 9.5 gün sonra gebe hayvanların PAG düzeyi gebe olmayan hayvanlarla benzer bulduklarını bildirmektedirler. Aslında embriyonik veya fetal ölüm hem yanlış negatif hem de yanlış pozitif teşhis değerlendirmesine yol açabilmektedir (Engelke ve ark 2015). Araştırmacılara göre uterustaki yavrunun ölümünden sonra PAG düzeyi hemen tespit edilebilir düzeyin altına düşmemektedir. Yavru ölümünden sonra kanda varlığını devam ettirmektedir. İneklerde kan PAG düzeyinin embriyonik ölüm sonrasında bir süre tespit edilmesinin nedeni olarak molekülün yarılanma süresinin uzun olması ileri sürülmektedir. Nitekim araştırmacılara göre gebeliğin ilk ayında PAG için yarılanma süresinin 7-9,5 gün olduğu bildirilmektedir (yarılanma süresi). Bu nedenle yavrunun öldüğü ancak kanda PAG bulunduğu dönemde alınan kan örneklerinde hayvan gerçekte gebe olmadığı halde gebe kabul edilebilmektedir. Embriyonik ölüm riskinin yüksek olduğu dönemlerde erken gebelik teşhisinin yapıldığı zaman yanlış sonuç veya şüpheli durum söz konusu olduğunda 3-7 gün sonra tekrar örnekleme yapılması tavsiye edilmektedir (Piechotta ve ark 2011).

Kan PAG ölçümüyle yanlış pozitif teşhis konulmasının bir diğer nedeni de hayvanın verim düzeyi ve iklim şartlarının olabileceği gösterilmiştir. Nitekim; yüksek verimli ineklerde daha yüksek oranda yanlış pozitif oranla karşılaşıldığı belirlenmiştir. Bu durum özellikle sıcak hava şartlarında meydana gelmiştir. Bu sonucun sıcak hava şartlarında yüksek verimli ineklerde embriyonik ölüm oranının yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Lamb ve ark 2015).

Pohler ve ark (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada tohumlamayı izleyen 31. günden sonra eğer PAG düzeyi 1.4 ng/ml'den düşük olursa %95 güvenle geç embriyonik ölüm tanısı konulabileceği bildirilmektedir.

Ayrıca yüksek verimli ineklerde süt veriminin yüksek metabolik oran sonucu oluşan hızlı katabolizma sonucunda PAG düzeyini negatif olarak etkilediği bildirilmiştir. Yüksek verimli inekler tohumlama sonrası erken dönemde karaciğer katabolizmasının artması sonucunda düşük progesteron düzeyine sahip olabilirler. Düşük progesteron seviyesinde embriyo gelişimi yavaşlayacağı için bu durumu PAG üretiminde bir düşmanın izleyebileceği ileri sürülmektedir (Ali 1999).

Yanlış pozitif teşhisi konulan inekler gebe olmadığı halde gebe teşhisi konulduğu için tedavi edilmeyecekler ve bu durum ekonomik kayıp oluşturacaktır. Bu hayvanların gebe olmadıkları ancak daha sonra tekrar yapılacak analizlerden sonra veya hayvanın östrüs göstermesi sonrasında bunun tespit edilmesi ile ortaya konacak ve tedavi edilebilecektir (Fricke ve Giordano 2011). Aksi durumda hayvan kuruya çıkartılıncaya kadar veya beklenen doğuma kadar yanlış teşhisle tutulacağı için durum daha kötü olabilir. Bu tür olgular hayvanların erken sürede sürüden uzaklaştırılması ile sonuçlanabileceği bildirilmektedir. Bu tür vakaların önüne geçilmesi için, erken gebelik teşhisi uygulanan sürülerde gebeliğin 60, 90, 120. günlerinden birisinde veya grup değiştirme döneminde gebeliklerin devam ettiği rektal veya ultrasonik yöntemle doğrulanmalıdır. Fricke ve ark (2015), tohumlama sonrası 74. günde gebeliklerin tekrar doğrulanmasını önermektedir.

Kan PAG analizinde toplam 19 baş hayvana (%8,29) şüpheli teşhisi konularak gebelik durumları ile ilgili kesin bir kanaate ulaşılamamıştır. Romano ve Larson (2010) yaptıkları çalışmada %8,5 düzeyinde şüpheli sonuç bildirmektedirler. Sunulan çalışmada analiz sonucu 19 baş şüpheli inekten 5 tanesine şüpheli gebe (**pozitif şüpheli**), 14 başına ise şüpheli gebe değil (**negatif şüpheli**) teşhisi konulmuştur. Günümüzde kullanılan PAG ELISA testlerinin gebeliği veya gebe kalmamayı kesin olarak göstermediği, şüpheli sonuçlarla karşılaşılabileceği bildirilmiştir (Romano ve Larson 2010). Şüpheli bulgular, reproduktif yönetimin şeklini, gebelik teşhisini ve re-senkronizasyon düşüncelerini etkileyecektir. Şüpheli sonuçlar yeniden örnek toplama ve analiz yapılması yanında farklı bir yöntemle gebelik teşhisini gerektirir. Kan PAG

analizi gerçekleştirilirken okunan değer 300-1.000 pg/ml aralığında olduğunda sonucun şüpheli kabul edilmesi istenmekte ve analizin tekrarlanması tavsiye edilmektedir. Sunulan çalışmada araştırmanın düzeni ve mantığı gereği şüpheli sonuçların okunduğu hayvanlarda yeniden kan alınarak analiz yapılmamıştır. Ancak negatif şüphelilerde OD ortalaması 0.56 ± 0.11 olarak bulunmuş ve tüm bu şüpheli hayvanlarda değerin belirtilen sınırlar içinde olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan negatif olduğu halde PAG ile şüpheli denilen tüm bu hayvanların referans test olarak kullanılan ultrasonik muayenede de negatif çıkması ikinci muayene yapılmasını gerektirmediği gibi negatif şüphelilerde embriyonik ölüm olma ihtimalini güçlendirmiştir.

Bu sebeple negatiflerde şüpheli sonuçların embriyonik ölümlerden kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Embriyonik ölüm geçiren ineklerde gebeliğin 28. gününde, gebeliği devam eden hayvanlara göre dolaşımdaki PAG düzeyinde azalma belirlenmiştir (Prvanović ve ark 2009). Şöyle ki PAGs'ların yarılanma ömrünün 2.7-7 gün olduğu (Semambo et al 1992; Szenci et al 2002), muayene gününde belirtilen yarılanma ömürleri sınırları içine denk gelen (muayene gününden 2.7-7 gün önce) sürede şekillenen embriyonik ölümlerde PAG düzeyinin hala negatif eşik değerler üzerinde olması sebebiyle sonuç şüpheli olarak değerlendirilir. Yukarıda belirtilen ELISA OD değerlerine bakıldığında bu durum daha iyi anlaşılmaktadır.

Maternal dolaşımdaki PAG düzeyinin şüpheli bulgu kabul edilen aralıkta olmasının nedeni molekülün sentezi, kan dolaşımına salınması sürecinde meydana gelen bir düzensizlikten kaynaklanabileceği de düşünülmüştür.

Şüpheli teşhisi 5 baş inekte pozitif şüpheli şeklinde konulmuştur. Yani bu hayvanlarda gerçek durum gebe olmasına rağmen PAG molekül düzeyi bunu kesin gösterecek düzeyde ölçülememiştir. Kan dolaşımında PAG molekülünün düşük düzeyde olması analiz için örneklerin tohumlama sonrası erken alınmış olmasına veya hayvanda bireysel yavru gelişim gecikmesinin olabileceğini akla getirmektedir.

Analiz sonucuna göre 14 baş inek gerçek durumları gebe olmamalarına rağmen bu kesin ortaya konulamamış ve negatif şüpheli kabul edilmişlerdir. Bu hayvanlarda gebelik ve dolayısıyla gebelikle ilişkili glikoprotein sentezleyecek plasental yapılar olmamasına rağmen kanda PAG ölçülmüş olması ölçümde çapraz reaksiyon verecek

proteinlerin ölçülmüş olabileceğini de akla getirmektedir. Benzer şekilde Kaya ve ark (2016) çapraz reaksiyon sonuçlarının okunabileceğini bildirmektedir. Bazı çelişkili PAG sonuçlarının dolaşımdaki proteinlerle oluşan çapraz reaksiyon sonucunda oluşabileceği düşünülmektedir. Green ve ark (2005) 43 hayvanda gerçekleştirdikleri çalışmada 5 hayvanın tohumlama sonrası 15. günde alınan kan örneklerinde PAG bulunduğunu gözlemişlerdir. Plasental bağlanmanın gerçekleşmediği bu dönemde belirlenenin aslında PAG olamayacağı, yabancı proteinlerle çapraz reaksiyonun oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Aynı düşünce Zoli ve ark (1992) tarafından da bildirilmektedir. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada gebe olmayan ineklerde ve boğa kanlarında PAG benzeri immunreaksiyon gözlemlediklerini ileri sürmektedirler.

Analiz sonuçlarının kesin bir bulgu ortaya koyamamasının nedeni PAG düzeyinin şüpheli bulgu sınırları aralığında olması bu hayvanlarda gebeliğin devamı ile ilgili bir sorun oluşabileceğini de akla getirmektedir. Nitekim yapılan araştırmalarla gebeliği devam etmeyen hayvanlarda devam edenlere göre farklı PAG seviyesi gözlenmiştir. Maternal dolaşımdaki PAG konsantrasyonu ile gebelik kaybı riski ilişkisini ortaya konulmasına yönelik çok sayıda çalışma yapıldığı bildirilmektedir (Wynands 2015). Bu çalışmalara göre gelecekte gebeliği devam etmeyecek ineklerde gebeliği devam edecek ineklere göre daha düşük PAG konsantrasyonu ölçülmüştür. Düvelerde ultrasonografi ile 30. gün kalp atımı tespit edilen embriyolarda PAG düzeyine göre yaşama oranları <2 ng/ml olanlarda oldukça düşük bulunmuştur (Reese ve ark, 2016). Gebeliğin 31. gününde 1.4-1.8 ng/ml'nin altında olan ineklerde gebeliğin 60. gününde embriyonik mortalite oluşma ihtimali %95 oranında gerçekleşmiştir (Pohler ve ark 2016). Yüksek abort oluşturma potansiyeli olan *Neospora Caninum* ile enfekte bir sürüde gebeliğin 120. gününde yapılan analizler sonrasında düşük PAG düzeyine sahip ineklerde abort daha yüksek oranda gerçekleşmiştir (Garcia-Isperto ve ark 2013). Pohler ve ark (2013), fetal ölüm oluşan ineklerin tohumlama sonrası 28. günde fetal ölüm oluşmayan ineklerden daha düşük PAG düzeyine sahip olduklarını belirlemişlerdir. Benzeri şekilde Thompson ve ark (2010)'da tohumlama sonrası 30. günde daha yüksek PAG düzeyine sahip hayvanlarda tohumlama sonrası 32-60. günler arasında embriyonik ölüm oluşan hayvanlara göre daha yüksek PAG belirlediklerini bildirmektedirler.

Sadece düşük PAG konsantrasyonunun ileriki zamanlarda gebelik kayıpları ile ilgili bu sonuçlara karşılık yüksek PAG düzeyinin de ileri zamanda oluşabilecek gebelik kayıplarını gösterebileceği düşünülmektedir. Lopez-Gatius ve ark (2007)'na göre başarılı gebelik devamı için orta seviyede bir PAG konsantrasyonu gerekmektedir. Araştırmacılar, 98 inekten 18 başında fetal ölüm buldukları araştırma sonuçlarına göre bu fetal ölümleri hem düşük hem de yüksek PAG ile ilişkilendirmişlerdir. Araştırmacılara göre özellikle gebeliğin 28 ile 35. günleri arasındaki düşük veya yüksek PAG seviyesi fetal veya plasental anormalliklerden kaynaklanmaktadır.

Süt PAG analizi ile gebelik teşhisinin sonuçlarının süt numunesine güven oluşmasına yol açtığı bildirilmiştir. LeBlanc (2013) gebeliği kesinleşmiş, 8 işletmede 683 hayvanın kullanıldığı bir çalışmada duyarlılığın %99.2, özgüllük değerinin ise %95.5 olduğunu, Lawson ve ark (2014) ise bu değerleri tohumlama sonrası 33 ve 52. günlerinde test ettiği 112 inekte %100 ve %97.9 olarak bulunduğunu bildirmiştir. Araştırmacılara göre bu oranlar süt PAG sonuçlarına güven oluşturmakta ve saha taramalarında ineklerde gebelik teşhisinde geçerli yöntem yapmaktadır. Sunulan çalışmada süt PAG düzeyinin gebeliği belirlemedeki duyarlılık derecesi (sensitivite) araştırmacılarla benzer şekilde %92 olarak tespit edilmiştir (gerçek pozitif oranı). Aynı şekilde süt PAG analizinin gebe olmayanları ortaya koymada %100 oranında bir özgüllüğe (spesifite) sahip olduğu görülmüştür (gerçek negatif oranı). Sunulan çalışmada süt PAG ELISA testinin doğruluk oranı ise %95.8 olarak bulunmuştur. Daha önce belirtildiği gibi, duyarlılık ve özgüllük toplamının >170 olduğu testlerin klinik olarak yararlı olduğu söylenir. Sunulan çalışmada süt PAG-ELISA testinde bu oranların toplamı 192 olarak bulunduğu için testin tanısallık gücünün oldukça yüksek olduğu kanısına varılmıştır.

Duyarlılık ve özgüllüğün testin yararının abartılmasına yol açabileceği düşünülerek gebe olan ve olmayanları da gösterme değerlerine bakıldığında; süt PAG ELISA testinin gebe dediği hayvanların gebe çıkma değeri %100, gebe değil dediğinde gebe olmama değeri ise %91.7 olarak belirlenmiştir. Süt PAG ELISA testinin geçerliliği ise %95.75 olarak hesaplanmıştır. Sunulan çalışmada ortaya konulan bu sonuçlar süt PAG analiz yönteminin ekonomik kazanç sınırları üstünde performans gösterdiği kanısına varılmıştır.

Sunulan araştırmada süt PAG analizinde referans yöntemle belirlenen gebe ineklerin (104 baş) hiç birisine gebe değil (yanlış negatif) teşhisi konulmamıştır. Kan PAG analizinde olduğu gibi süt PAG analizinde de gebe hayvanların hiç birisi boş kabul edilmediği için gebeliği sona erdirecek girişimlerin yapılması tehlikesi söz konusu olmamıştır. Süt analiz sonuçlarına göre araştırmanın gerçekleştiği sürüde örnekler doğum sonrası kalıntı moleküllerin bulunduğu dönemde alınmadığı ve örneklemeden sonra embriyonik ölüm meydana gelmediği anlaşılmaktadır.

Ancak yine kan PAG analizinde olduğu gibi süt analizinde de referans yönteme göre gebe olmayan hayvan grubundan gebe teşhisi (**yanlış pozitif teşhis**) konulanlar olduğu grlmştır. Ultrasonla gebe olmadığı belirlenen ineklerde 9 başına (%8.3/7.2) gebe denilmiştir. Gebe olmayan hayvanlara gebe denilmesi işletme açısından ekonomik kayıp oluşturma potansiyeli bulunmaktadır. Bu tür hayvanların gebe olmadığı belirlenme zamanına kadar durum dzeltilemeyecektir. Bu tür hayvanlarda açık günler süresi uzayacak ve bu nedenle erken sürüden uzaklaştırma yapılması gerekebilecektir.

Süt PAG seviyesine göre yapılan değerlendirmede okunan değer 300-1.000 pg/ml aralığında olduğunda sonucun şüpheli kabul edilmiştir. Bu kabule göre 17 baş ineğe ait okunan değer şüpheli olduğu grlmştır. Bu 17 hayvandan 1 tanesi pozitif (gebe) şüpheli, geri kalan 16 baş ise negatif (gebe değil) olarak değerlendirilmiştir.

Kan ve süt analizlerinin sonuçları değerlendirildiğinde her iki yöntemin şüpheli bulma sayıları (kan PAG analizinde 19 baş (%8.49), süt PAG analizinde 17 baş (%7.42) hayvan) benzer olduğu grlmştır. Süt PAG testinde de negatif şüphelilerin yüksek oranda bulunmasının (16 hayvan-%12.8), kan PAG analizinde tartışılan sebeplerden dolayı embriyonik ölümlerden kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Araştırcılara göre şüpheli bulgu ihtimali gebeliğin 45 ile 75. günlerinde olan hayvanlarda yapılan analizlerde daha yüksek olabileceği bildirilmektedir (Wynands 2015). şüpheli bulgu yapılan hayvanlarda yeniden analiz yapılması ve bir hekim tarafından farklı bir yöntemle muayene edilmesi tavsiye edilmektedir. Plazma veya sütteki PAG düzeyinin düşük olması ELISA testinde daha fazla gebe değil veya şüpheli bulma ile sonuçlanabileceği, gebeliğin ilerlemesi ve PAG konsantrasyonunun artmasıyla bu durumun tersine döneceği bildirilmiştir (Fricke ve Giordano 2011). Bu

noktadan hareketle PAG analizi için kullanılacak kan ve süt örneğinin etkinliğinin benzer olduğu ortaya konulmuştur.

Hem primipar hem de multipar gebe hayvanlarda plazma PAG düzeyi süt verimi ile negatif ilişkili bulunmuştur. Süt veriminin artmasıyla hem plazma hem de süt PAG seviyesinde azalma olduğu için bu azalmanın nedeninin artan süte PAG moleküllerinin dilüsyonu olmadığı düşünülmektedir. Bunun bir nedeni süt veriminin artması sonucu yavru tarafından PAG üretiminin azalması olabileceği ileri sürülmektedir. Yüksek verimli hayvanlarda metabolizmanın fazla süt sentezine koşullanması sonucunda erken gebelik döneminde yavru gelişiminin ikinci planda kalarak daha yavaş oluşması nedeni ile PAG düzeyinde düşme gözlenebileceği kabul edilmektedir (Lopez-Gatius ve ark 2007). Yüksek süt verimine sahip ineklerde gelişen embriyonun sağlığı üzerine etkileri konusunda araştırmalara ihtiyaç vardır (Fricke ve ark 2015).

Sonuç olarak, kan ve süt PAG ELISA testlerinin doğru tanı koyabilme yeteneği olarak da tanımlanan her iki testin genel gücü veya geçerlilikleri sırasıyla %96.66 ve %95.75 olarak bulunmuştur. Buna göre süt PAG ELISA testini de kan PAG ELISA testi kadar doğru sonuçlar verdiği ve pratikte kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Süt ineklerde erken gebelik teşhisi amacıyla kan ve süt PAG-ELISA testlerinin her ikisinin de güvenilir yöntemler olduğu gözlenmiştir.
2. Kan veya süt PAG-ELISA düzeyinin belirlenmesi ile erken gebelik teşhisi yapılabilir.
3. Gebelikle ilişkili glikoproteinler (PAGs) gebeliğin 30. gününden önce kullanılabilen biyobelirteçlerdir ve embriyonik mortaliteyi tahmin etmede faydalı olabilir.
4. PAG sonucunda şüpheli çıkan gebe olmayan (negatif) hayvanların bir sonraki tohumlamalarında embriyonik ölümleri önlemeye yönelik tedbirler alınabilir.
5. Süt PAG-ELISA testi daha pratikdir.

6. KAYNAKLAR

- A1-Gubory KH, Camous S, Abdel-Razak I, Soulier C, Martal J, Fevere J, Driancourt MA, 1997. Evidence of the placental factors contributing to the control of ovarian follicular activity in the sheep. *J Reprod Fertil*, 20, 70 (Abstr).
- Adeyinka FD, 2012. The development of the bovine placentome and associated structures during gestation. Thesis of PhD, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Ali M, 1999. Bovine pregnancy-associated glycoprotein in biological fluids. Thesis of PhD . University of Aberdeen, UK.
- Ashrafzadeh A, Karsani SA, Nathan S, 2013. Mammalian sperm fertility related proteins. *Int J Med Sci*, 23, 10, 12, 1649-57.
- Austin KJ, Bany BM, Belden EL, Rempel LA, Cross JC, Hansen TR, 2003. Interferon-stimulated gene-15 (Isg15) expression is up-regulated in the mouse uterus in response to the implanting conceptus. *Endocrinology*, 144, 3107-3113.
- Balhara AK, Gupta M, Singh S, Mohanty AK, Singh I, 2013. Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. *The Scientific World Journal*, 958540.
- Bazer FB, 2013. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4, 23.
- Bekele N, Addis M, Abdela N, Ahmed WM, 2016. Pregnancy diagnosis in cattle for fertility management: A Review. *Global Veterinaria*, 16, 4, 355-364.
- Broadus B, de Vries A, 2005. A comparison of methods for early pregnancy diagnosis. *Proceedings 2nd Florida Dairy Road Show*. February 7-11, Florida
- Canfield RW, Butler WR, 1991. Energy balance, first ovulation and the effects of naloxone on LH secretion in early post - partum dairy cows. *J Anim Sci*, 69, 740-746.
- Carter AM, Enders AC, 2013. The evolution of epitheliochorial placentation. *Annu Rev Anim Biosci*, 1, 443-467.
- Coy P, Aviles M, 2010. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte?. *Biol Rev*, 85, 593-605.
- Dee Whittier W, 2013. Pregnancy determination in cattle: a review of available alternatives. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, Staunton, VA. Oct. 15-16, Staunton, Virginia.
- Del Vecchio RP, Sutherland WD, Sasser RG, 1995. Prostaglandin F2 alpha, progesterone and oxytocin production by cultured bovine luteal cells treated with prostaglandin E2 and pregnancy-specific protein B. *Prostaglandins*, 50, 137-150.
- Del Vecchio RP, Sutherland WD, Sasser RG, 1996. 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*, 107, 131-136.
- Dinç DA, 2008. Ultrason fiziği ve ineklerde reproduktif ultrasonografi. Birinci baskı, Pozitif Matbaacılık, Ankara.
- Dobson H, Rowan TG, Kippax IS, Humblot P, 1993. Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 40, 411-425.
- Duello TM, Byatt JC and Bremel RD, 1986. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology*, 119, 1351-1355.
- Ectors FJ, Schmidt M, Smith LC, Sulon J, Delval A, Remy B, Avery B, Beckers JF, 1996. bPAG Profiles In Recipient Heifers After Transfer Of Ivf And Nuclear Transfer Embryos. *Theriogenology*, 45, 1.

- Engelke J, Feldmann M, Gundling N, Gundelach Y, Egli C, Hoedemaker M, Piechotta M, 2015. Pregnancy diagnosis by detection of pregnancy-associated glycoproteins in milk: evaluation of a commercial available ELISA. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 128, 9-10, 402-8.
- Fatima A, Morris DG, 2013. MicroRNAs in domestic livestock. *Physiol Genomics* 45: 685–696.
- Fernandez-Arias A, Alabart J, Folch J, Beckers J, 1999. Interspecies pregnancy of spanish ibex (*Capra pyrenaica*) fetus in domestic goat (*Capra hircus*) recipients induces abnormally high plasmatic levels of pregnancy-associated glycoprotein. *Theriogenology* 51:1419-1430.
- Fricke PM, Giordano JO, 2011. Use of chemical tests for pregnancy diagnosis in a reproductive management program. *Proc. Dairy Cattle Reprod. Conf.*, Kansas City, MO. Dairy Cattle Reproduction Council, Hartland, WI, 48–56.
- Fricke PM, Ricci A, Carvalho PD and Amundson MC, 2015. Milk vs. blood - which is best for pag pregnancy prediction? Western Dairy Management Conference, March 3-5 Reno, NV
- Fricke PM, Ricci A, Giordano JO and Carvalho PD, 2016. Methods for and implementation of pregnancy diagnosis in dairy cows. *Vet Clin Food Anim*, 32:165-180.
- Friedrich M, Holtz W, 2010. Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. *Reprod Domest Anim*, 45, 142–146.
- Fuller WB, Robert CB, Greg AJ, Thomas ES, Guoyao W, 2008. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology*, 8, 3, 179-211.
- Gadella BM, Carolina L, 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, 81, 74–84.
- Gajewski Z, Melo de Sousa N, Beckers JF, Pawlinski B, Olszewska M, Thun R, Kleczkowski M, 2008. Concentration of bovine pregnancy associated glycoprotein in plasma and milk: its application for pregnancy diagnosis in cows. *J Physiol Pharmacol*, 59, 9, 55-64.
- Garbayo JM, Green JA, Manikkam M, Beckers JF, Kiesling DO, Ealy AD, Roberts RM, 2000. Caprine pregnancy-associated glycoproteins (PAG): their cloning, expression, and evolutionary relationship to other PAG. *Mol Reprod Dev*, 57, 4, 311-322.
- Garcia-Ispuerto I, Almeria S, Serrano B, Sousa N, Beckers J-F, López-Gatius F, 2013. Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoproteins measured using anti-bovine PAG-2 antibodies on day 120 of gestation predict abortion in dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Reprod Domest An* 48, 613-618.
- García-Vázquez FA, Gadea J, Matás C, Holt WV, 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology*, 18, 844–850.
- Gecaj R, Schanzenbach C, Kirchner B, Pfaffl M, Berisha B, 2017. MicroRNA in Bovine Corpus Luteum during Early Pregnancy World Academy of Science, Engineering and Technology, 4, 9.
- Giordano JO, Guenther JN, Lopes G Jr, Fricke PM, 2012. Changes in serum pregnancy-associated glycoprotein, pregnancy-specific protein B, and progesterone concentrations before and after induction of pregnancy loss in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 95, 683-697.
- Giordano JO, Fricke PM, Cabrera VE, 2013 Economics of resynchronization strategies including chemical tests to identify nonpregnant cows. *J Dairy Sci*, 96, 949–961.
- Gonzalez F, Sulon J, Calero P, Batista M, Gracia A, Beckers JF, 2001, Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) detection in milk samples for pregnancy diagnosis in dairy goats. *Theriogenology*, 56, 671–6.
- Green J, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, Roberts RM, 2000. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol Reprod*, 62, 1624-1631.

- Green JA, Parks TE, Avasle MP, Telugu BP, McLain AL, Peterson AJ, McMillan W, Mathialagan N, Hook RR, Xie S, Roberts RM, 2005 The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology*, 63,1481–503.
- Green JA, Xie S, Szafranska B, Gan X, Newman AG, McDowell K, Roberts RM, 1999. Identification of a new aspartic proteinase expressed by the outer chorionic cell layer of the equine placenta. *Biol Reprod*, 60, 1069-1077.
- Grimard B, Humblot P, Ponter AA, Mialot JP, Sauvart D, Thibier M, 1995. Influence of post-partum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J Reprod Fertil*, 104, 173-179.
- Haeger JD, Hambruch N, Pfarrer C, 2016. The bovine placenta in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 86, 1, 306-312.
- Humblot P, Camous S, Martal J, Charlery J, Jeanguyot N, Thibier M, Sasser G, 1988. Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows. *Theriogenology*, 30, 2, 257–267.
- Hytell P., Sinowatz F., Vejlsted M, Betteridge K, 2010. *Essentials of domestic animal embryology*, First published, Saunders, Elsevier, China.
- Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H, 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology*, 14, 816–821.
- Igwebuike UM, 2006. Trophoblast cells of ruminant placentas – a mini review. *Anim Reprod Sci*, 93, 185–198.
- Ioannidis J, Donadeu FX, 2016. Circulating miRNA signatures of early pregnancy in cattle. *BMC Genomics*, 17,184, 1-12.
- Ioannidis J, Donadeu FX, 2017. Changes in circulating microRNA levels can be identified as early as day 8 of pregnancy in cattle. *PLoS ONE*, 12, 4, e0174892
- Işık T, 2015. Kanda serbest halde dolaşan nükleik asitlerin elektroegirme lifler ile serumdan ayrılması, Yüksek lisans tezi, İzmir Teknoloji Enstitüsü.
- Karen A, Sousa NM, Beckers JF, Bajcsy ÁC, Tibold J, Mádl I, Szenci O, 2015. Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*. 159, 31-7.
- Kaya MS, Köse M, Bozkaya F, Mutlu H, Uçar EH, Atılı MO, 2016. Early pregnancy diagnosis using a commercial ELISA test based on pregnancy-associated glycoproteins in Holstein-Friesian heifers and lactating cows, *Türk J Vet Anim Sci*, 40, 694-699.
- King GJ, Atkinson BA, Robertson HA, 1980. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. *J Reprod Fertil*, 59, 95-100.
- Kiracofe GH, Wright JM, Schalles RR, Ruder CA, Parish S, Sasser RG, 1993. Pregnancy specific protein B in serum of postpartum beef cows. *J Anim Sci*, 71, 2199-2205.
- Kölle S, Reese S, Kummer W, 2010. New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging. *Theriogenology*, 73, 786–795.
- Lamb GC, Henry DD, DiLorenzo N, Ciriaco FM, Fontes PLP, Mercadante VRG, Mayo D, 2015. Understanding pregnancy diagnosis in beef cattle. University of Florida, IFAS, Florida Coop. Ext.
- Lawson BC, Shahzad AH, Dolecheck KA, Martel EL, Velek KA, Ray DL, Lawrence JC, Silva WJ, 2014. A pregnancy detection assay using milk samples: Evaluation and considerations. *J Dairy Sci*, 97, 6316–6325.
- Leahy T, Gadella BM, 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, 142(6), 759-78.

- Le Blanc SJ, 2013. Short communication: Field evaluation of a pregnancy confirmation test using milk samples in dairy cows. *J Dairy Sci*, 96, 2345–2348.
- Lemley CO, Camacho LE, Kimberly A, Vonnahme KA, 2015. Maternal recognition and physiology of pregnancy, In: *Bovine reproduction*,. Hopper RM,, John Wiley & Sons Inc. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118833971.ch25> J,,
- Liu M, 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 149.
- Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW, 2007. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 13116–13121.
- Lonergan P, O'Hara L, Forde N, 2013. Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. *Anim Reprod*, 10, 3, 223-227.
- Lonergan P, Fair T, Forde N, Rizos D, 2016. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86, 270–277.
- Lopez-Gatius F, Garbayo JM, Santolaria P, Yaniz J, Ayad A, de Sousa NM, Beckers JF, 2007. 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*, 32, 29–42.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, de la Sota L, Thatcher WW, 1992, Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*, 70, 3615-3626.
- Lucy M, Green J, Poock S, 2011. Pregnancy determination in cattle: A review of available alternatives. In *Proceedings of the Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, Joplin, MO, USA, 31 August–1 September; 367–376.
- Majewska M, Panasiwicz G, Klisch K, Olivera LVM, Mamani JM, Abd-Elnaeim MM, Szafranska B, 2009. Pregnancy-associated glycoprotein family (PAG): transcripts and gene amplicons in Camelids. *Reprod Biol*, 9, 127-150.
- Majewska M, Panasiwicz G, Szafranska B, 2011. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family localized in chorionic cells within the epitheliochorial/diffuse placenta of the alpaca (*Lama pacos*). *Acta Histochem*, 113, 570-577.
- Martins VMV, Marques Junior AP, Vasconcelos AC, Martins E, Santos RL, Lima FPC, 2004. Placental maturation and expulsion in Holstein and Nelore cows. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 56, 2, 157-167.
- Mayer J, Soller JT, Beck J, Purwins V, Wemheuer W, Schütz E, Brenig B, 2013a. Early pregnancy diagnosis in dairy cows using circulating nucleic acids, *Theriogenology*, 79, 173–179.
- Mayer J, Beck J, Soller ST, Wemheuer W, Schütz E, Brenig B, 2013b. Analysis of circulating dna distribution in pregnant and nonpregnant dairy cows, *Biol Reprod*, 88, 2, 29, 1-10.
- Mc Cracken JA, Custer EE, Lamsa JC, 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev*, 79, 263–323.
- Mercadante P, Waters K, Mercadante V, Lamb G, Elzo M, Johnson S, Rae D, Yelich J, Ealy A, 2013, Subspecies differences in early fetal development and plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations in cattle. *J Anim Sci* 91, 3693–3701.
- Mercadante PM, Ribeiro ES, Risco C, Ealy AD, 2016 Associations between pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy outcomes, milk yield, parity, and clinical diseases in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci*, 99, 3031–3040.
- Mialon MM, Camous S, Renand G, Martal J, Ménissier F, 1993. Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 33, 269-282.
- Mialon MM, Renand G, Camous S, Martal J, Ménissier F, 1994. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy serum protein (PSP60) in cattle. *Reprod Nutr Dev*, 34, 1, 65-72.

- Moharrami Y, Khodabandehlo V, Ayubi MR, Mosaferi S, 2013. Accuracy rate of early pregnancy diagnosis in Holstein heifers by transrectal ultrasonography using 7.5MHz linear array transducer, *European Journal of Experimental Biology*, 2013, 3(3), 678-680.
- Myers DA, Reimers TJ, 1988. Purification and endocrine evaluation of bovine binucleate trophoblastic cells. *Journal of tissue culture methods*, 11, 2, 83-88.
- Nandre R, Joshi C, Derashri H, 2012. Pregnancy Proteins: Early indication of pregnancy diagnosis in farm animals. *International Journal of Life Science and pharma research*, 2, 1, 1-8.
- Noakes DE., Parkinson TJ. and England GCW, 2001. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. Eighth Editions, Elsevier Limited, Philadelphia.
- Okuda K, Miyamoto Y, Skarzynski DJ, 2002. Regulation of endometrial prostaglandin F₂ synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, 255–264.
- Patel OV, Domeki I, Sasaki N, Takahashi T, Hirako M, Sasser RG, Humblot P, 1995. Effect of fetal mass, number and stage of gestation on pregnancy-specific protein B concentrations in the bovine. *Theriogenology*, 44, 827–33.
- Peter AT, 2013. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. *Theriogenology*, 80, 693–705.
- Piechotta M, Bollwein J, Friedrich M, Heilkenbrinker T, Passavant C, Branen J, Sasser G, Hoedemaker M, Bollwein H. (2011) Comparison of commercial ELISA blood tests for early pregnancy detection in dairy cows. *J Reprod Dev.*, 57, (1), 72-5.
- Pohler KG, Geary TW, Johnson CL, Atkins JA, Jinks EM, Busch DC, Green JA, MacNeil MD, Smith MF, 2013 Circulating bovine pregnancy associated glycoproteins are associated with late embryonic/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. *J Anim Sci*, 91, 4158-4167.
- Pohler K, Green JA, 2015. A review and update of research on pregnancy associated glycoproteins (PAGs) in cattle. *Clinical Theriogenology*, 7, 3, 211-214.
- Pohler KG, Franco GA, Reese ST, Dantas FG, Ellis MD, Payton RR, 2016. Past, present and future of pregnancy detection methods. *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle – Des Moines, Iowa – September 7-8*, 251.
- Pohler KG, Green JA, Moley LA, Gunewardena S, Hung WT, Payton RR, Hong X, Christenson LK, Geary TW, Smith MF, 2017. Circulating microRNA as candidates for early embryonic viability in cattle. *Mol Reprod Dev.* 2017, 84, 731–743
- Prvanović N, Antun Tomašković A, Grizelj J, Kočila P, Samardžija M, 2009. Monitoring of early pregnancy and early embryonic mortality by ultrasound and determination of pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in cows. *Veterinarski arhiv*, 79, 3, 259-267.
- Purohit G, 2010. Methods of pregnancy diagnosis in domestic animals: The current status. *Reproduction*, 1, WMC001305.
- Randel RD, 1990. Nutrition and post - partum rebreeding in cattle. *J Anim Sci*, 68, 853-862.
- Reese S, Pereira M, Vasconcelos J, Smith M, Green J, Geary T, Peres RFG, Perry GA, Pohler KG, 2016. Markers of pregnancy: How early can we detect pregnancies in cattle using pregnancy-associated glycoproteins (pags) and micromas? *Anim Reprod*, 13, 200-2008.
- Ribeiro ES, Greco LF, Bisinotto RS, Lima FS, Thatcher WW, Santos JE, 2016. Biology of preimplantation conceptus at the onset of elongation in dairy cows. *Biol Reprod*, 94, 4, 97, 1–18.
- Ricci A, Carvalho PD, Amundson MC, Fourdraine RH, Vincenti L, Fricke PM, 2015. 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*, 98, 2502-2514.
- Richards MW, Spitzer JC, Warner MB, 1986. Effect of varying levels of post-partum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J Anim Sci*, 62, 308-311.

- Roberts RM, Xie S, Mathialagan N, 1996. Maternal recognition of pregnancy. *Biol Reprod*, 54, 294-302.
- Romano JE. 2004. Early pregnancy diagnosis and embryo/fetus mortality in cattle. Thesis, University of Texas.
- Romano JE, Larson JE (2010) Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle, *Theriogenology*, 74, 932–939.
- Santos JE, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvao KN, 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci*, 82, 83, 513–35.
- Sasser RG, Ruder CA, Ivani KA, Butler JE, Hamilton WC, 1986 Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation, *Biol Reprod*, 35, 4, 936–942.
- Sasser RG, Ruder CA, 1987. Detection of early pregnancy in domestic ruminants, *J Reprod Fertil. Supplement*, 34, 261–271.
- Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ, 2000. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci*, 60-61, 145–60.
- Senger PL, 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd ed., Current Conceptions Inc, Pullman, WA, USA..
- Serrano-Pérez B, Almería S, Mur-Novales R, López-Helguera I, Garcia-Ispuerto I, Alabart JL, Darwich L, López-Gatius F, 2017. Uterine serpin (SERPINA 14) correlates negatively with cytokine production at the foetal–maternal interface but not in the corpus luteum in pregnant dairy heifers experimentally infected with *Neospora caninum*. *Reprod Dom Anim*, 1–3.
- Shahin M, 2012. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) profiles in cows and goats and attempts to measure PAG in milk. Thesis of PhD at the University Göttingen, Germany.
- Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M, 2007. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev*, 19, 65-78.
- Suarez SS, Pacey AA, 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12, 1, 23–37.
- Szafranska B, Xie S, Green J, Roberts RM, 1995. Porcine pregnancy-associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophectoderm. *Biol Reprod*, 53, 1, 21-28.
- Szafranska B, Miura R, Gosh D, Ezashi T, Xie S, Roberts RM, Green J, 2001a. Gene for porcine pregnancy-associated glycoprotein 2 (pPAG2): its structural organization and analysis of its promoter. *Mol Reprod Dev*, 60, 137-146.
- Szafranska B, Panasiewicz G, Waclawik A, 2001b. Length polymorphism of PCR-amplified genomic fragments of the pregnancy-associated glycoprotein (PAG) gene family in the pig and some other domestic and wild mammals. *J Appl Gen*, 42, 335-349.
- Szafranska B, Panasiewicz G, 2002. The placental expression of the porcine pregnancy-associated glycoprotein (pPAG) gene family examined in situ and in vitro. *Anim Reprod Sci*, 72, 95-113.
- Szenci O, Beckers JF, Humblot P, Sulon J, Sasser G, Taverne MAM, Varga J, Baltusen R, Scheckk G, 1998. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B and bovine pregnancy-associated glycoprotein I tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*, 50, 77-88.
- Tainturier D, Bedel M, Beckers JF, Fieni F, Bruyas JF, 1996. Cinétique de la bPAG (bovine pregnancy associated glycoprotein) dans le plasma et dans le lait au cours des trois semaines suivant le part chez la vache laitière. *Reprod Prod Laitière*, 129–133.(French).
- Thompson IM, Derri RL, Kim IH, Green JA, Santos JE, Thatcher WW, 2010 Effects of resynchronization programs on pregnancy per artificial insemination, progesterone, and pregnancy-associated glycoproteins in plasma of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 93, 4006–4018.

- Touzard E, Reinaud P, Dubois O, Guyader-Joly C, Humblot P, Ponsart C, Charpigny G, 2013. Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. *Reproduction*, 146, 347–362.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS, 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*, 19, 2, 242-8.
- Vural R, Güzeloğlu A, Küplülü Ş, 2015: Gebelik ve fizyolojisi. In "Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji", Ed, Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A, İkinci Baskı, Medipres, Malatya.
- Wallace JM, Aitken RP, Cheyne MA, Humblot P, 1997. Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in relation to nutritional regimen, placental mass and pregnancy outcome in growing adolescent ewes carrying singleton fetuses. *J Reprod Fertil*, 109, 53-58.
- Wallace R, Pohler MKG, Smith MF, Green JA, 2015 Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. *Reproduction*, 149, R115-R126.
- Wango EO, Wooding FBP, Heap RB, 1990. The role of trophoblast binucleate cells in implantation in the goat-a quantitative study. *Placenta*, 11, 5, 381-94.
- Weems YS, Sasser RG, Vincet DL, Nusser KD, Tanaka Y, Miller-Patrick K, Ledgerwood KS, Weems CW, 1994. Effects of prostaglandin F2a on secretion of pregnancy-specific protein B (PSPB) and placental weights in intact or ovariectomized 90 to 100 day pregnant ewes. *Prostaglandins*, 48, 377-387.
- Williams GL, 1990. Suckling as a regulator of post - partum rebreeding in cattle: A review. *J Anim Sci*, 68, 831-852.
- Williams GL, Gazal OS, Guzman-Vega GA, Stanko RL, 1996. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Anim Reprod Sci*, 42, 289-297.
- Wooding FBP, 1992. Current Topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production, *Placenta*, 13, 101–113.
- Wooding FBP, Flint APF, 1994. Placentation. In Marshall's Physiology of Reproduction, 4th edn, Lamming GE. Chapman and Hall, London, pp 230–466.
- Wooding FBP, Roberts RM, Green JA, 2005. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta*, 26, 807-827.
- Wynands E, 2015. Assessment of a Test for Pregnancy-Associated Glycoproteins in Milk from Dairy Cows, Thesis of PhD, The University of Guelph.
- Xie SC, Low BG, Nagel RJ, Kramer KK, Anthony RV, Zoli AP, Beckers JF, Roberts RM, 1991. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc Natl Acad Sci*, 88, 10247–51.
- Youngquist RS, 2006. Pregnancy diagnosis. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle* August 30 and 31, St. Joseph, Missouri.
- Zoli AP, Beckers JF, Wouters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F, 1991. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol Reprod*, 45, 1-10.
- Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, Ortiz WB, Beckers JF, 1992. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol Reprod*, 46, 1, 83-92.
- Zoli AP, Beckers JF, Ectors F, 1990. Isolation of an ovine pregnancy-specific protein. *Theriogenology*, 33 (suppl 1), 366.

7. ÖZGEÇMİŞ

01.10.1972' de Aksaray'da doğdu. İlk ve ortaokulu Aksaray'da okudu. Liseyi Konya Gazi lisesinde okudu. 1992'de Selçuk Üniversitesi Veteriner fakültesinde başladığı lisans öğrenimini 1997 yılında tamamladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim dalında Doktora öğrenimine 1997'de başladı. Halen Balıkesir Büyükşehir Belediyesinde Veteriner Hekim olarak çalışmalarını sürdürmektedir.

