



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ  
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**RIA YÖNTEMİYLE KANDA ovPAG ÖLÇÜMÜNE DAYALI  
KOYUNLARDA ERKEN GEBELİK TEŞHİSİ**

**AHMET YAVUZ**

**(DOKTORA TEZİ)**

**BURSA-2019**





T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**RIA YÖNTEMİYLE KANDA ovPAG ÖLÇÜMÜNE DAYALI  
KOYUNLARDA ERKEN GEBELİK TEŞHİSİ**

**Ahmet YAVUZ**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMANLAR:**

- 1. Prof. Dr. R. Gözde ÖZALP**
- 2. Dr. Olimpia BARBATO**

**Proje No- DDP(V)-2017/5**

**BURSA-2019**

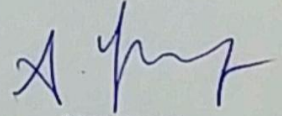
T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETİK BEYANI**

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak sunduğum “ RIA Yöntemiyle Kanda ovPAG Ölçümüne Dayalı Koyunlarda Erken Gebelik Teşhisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Ahmet YAVUZ**

**Tarih ve İmza**



09/11/2019

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ahmet YAVUZ tarafından hazırlanan "RIA Yöntemiyle Kanda ovPAG Ölçümüne Dayalı Koyunlarda Erken Gebelik Teşhisi" konulu Doktora tezi 11/11/2019 günü, 11:00 – 13:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy-çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>
Tez Danışmanı	PROF. DR. R. GÖZDE ÖZALP
Üye	PROF. DR. GÜNEŞ ERDOĞAN
Üye	PROF. DR. KUTLAY GÜRBULAK
Üye	DOÇ. DR. GÜLNAZ MECİTOĞLU
Üye	DR. ÖĞR. ÜYESİ DUYGU UDUM

İmza

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve  
..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı  
kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER  
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

09.11.2019

**Adı Soyadı:** Ahmet YAVUZ

**Anabilim Dalı:** Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

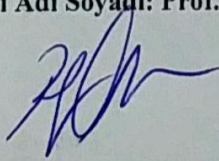
**Tez Konusu:** RIA Yöntemiyle Kanda ovPAG Ölçümüne Dayalı Koyunlarda Erken Gebelik Teşhisi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**DANIŞMAN ONAYI**

**Unvanı Adı Soyadı:** Prof. Dr. R. Güzde ÖZALP

**İmza:**



## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b>	II
<b>KABUL ONAY</b>	III
<b>TEZ KONTROL BEYAN FORMU</b>	IV
<b>İÇİNDEKİLER</b>	V
<b>TÜRKÇE ÖZET</b>	VI
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b>	VIII
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. Koyunlarda Östrus Siklusu	2
2.1.1. Koyunlarda Östrus Siklusu Boyunca Hormonal Değişiklikler	3
2.1.2. Koyunlarda Östrus ve Ovulasyon Yönetimi	5
2.2. Gebelik Teşhisinin Tarihi	7
2.3. Koyunlarda Gebelik Teşhisi Yöntemleri	15
2.3.1. Gebelik Teşhisinde RIA Yönteminin Kullanılması	17
2.3.2. Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Kullanılması ile Gebelik Teşhisi	17
2.4. Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Tanımı ve Önemi	19
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	22
3.1. Koyunların Seçimi	22
3.2. Koyunların Östrus Senkronizasyonu ve Çiftleştirilmesi	22
3.3. Örneklerin Toplanması	22
3.3.1. Kan Örneklerinin Toplanması, İşlenmesi ve Transferi	22
3.3.2. Uterus Dokusu Örneklerinin Toplanması, İşlenmesi ve Transferi	23
3.4. Kan Serumunda RIA Yöntemiyle Gebelikle İlişkili Glikoprotein Konsantrasyonunun Ölçümü	34
3.5. Uterus Dokusunda Real-Time PCR Yöntemiyle Gebelikle İlişkili Glikoprotein Konsantrasyonunun Ölçümü	37
3.5.1. Parafin Dokudan RNA İzolasyonu	37
3.5.2. RNA'nın cDNA'ya Yazdırılması	39
3.5.3. Pre-Amplifikasyon ve Real-Time PCR	39
3.6. İstatistiksel Yöntemler	41
<b>4. BULGULAR</b>	42
4.1. RIA Ölçümü Bulguları	42
4.2. Real-Time PCR Bulguları	44
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	48
<b>6. KAYNAKLAR</b>	52
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	70
<b>8. EKLER</b>	75
<b>9. TEŞEKKÜR</b>	76
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>	77

## TÜRKÇE ÖZET

Koyunlar ülkemizin coğrafi konumundan dolayı mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır. Koyunlarda, çiftleşme sezonu içinde gebe kalmadıkları sürece 17-20 günde bir ovulasyon şekillenir. İdeal bir sürü yönetiminde, çiftleştirilmiş ya da tohumlanmış koyunların gebelikleri 17 gün içinde tespit edilerek, gebe kalmamış olanların bir sonraki östrus siklusunda gebe bırakılması önemlidir. Bu yüzden gebelik teşhisinin çiftleşmeden sonraki 17 gün içinde yapılması üretim planlaması açısından büyük önem arz etmektedir. Bu sebeple, koyunlarda, kanda gebelik ilişkili glikoprotein (Pregnancy Associated Glycoprotein, PAG) konsantrasyonlarının radyoimmunoassay (RIA) yöntemiyle ölçülerek gebelik teşhisinin mümkün olan en kısa sürede yapılması amaçlanmıştır.

Bu tezde PAG konsantrasyonları, serum örneklerinden RIA yöntemi ile doku örneklerinden real-time PCR yöntemi ile ölçüldü. Materyal olarak Türkiye' de Bursa ili Nilüfer ilçesine bağlı Görükle mahallesinde bulunan bir (40° 23' N, 28° 85' E) özel koyun çiftliğinden, T.C. Gıda Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Bursa İl Tarım ve Orman Müdürlüğü kayıtları esas alınarak 2-4 yaş aralığındaki multipar özellikte olan ve en son 4 ay önce doğum yapmış koyunlar kullanıldı. Kan örnekleri için 20 koyun (Gebe:10, Gebe olmayan:10, n=20), doku örnekleri içinde 12 adet koyun (n=12) kullanıldı. Örneklerin toplanması için gerekli olan koyunların östrus senkronizasyonuna 2017 yılı mayıs ayında başlandı.

Koyunlarda erken dönemde gebelik teşhisi için 6 farklı RIA yöntemi test edildi. Bu amaçla koyunlar çiftleştirildikten sonra 0., 10., 15., 16., 17., 18., 19. ve 20. günlerde kan örnekleri alınarak kan serumunda ovPAG konsantrasyonu RIA-497, RIA-706, RIA-780, RIA-860, RIA-srPool ve RIA-wbPool yöntemleriyle ölçüldü. Koyunlarda gebelik teşhisi için RIA-860 ve RIA-wbPool yöntemleri ilk defa bu tez çalışmasında test edildi. Ayrıca uterus dokusunda ovPAG ekspresyonunu ortaya koymak için real-time PCR ölçümü yapıldı. Doku örnekleri çiftleştirmeyi takiben 0., 14., 20. ve 30. günlerde toplandı. Ortalama PAG konsantrasyonları, RIA-780'de 17. günden, RIA-706'da 18 günden, RIA-srPool ve RIA-wbPool'da 19. günden itibaren arttığı görüldü

(P <0.001). Real-time PCR'da ölçülen PAG1 ekspresyonunun, upregüle veya downregüle olmadığı tespit edildi.

Periferal kan serumu örneklerinde 17. günden itibaren ovPAG konsantrasyonunun ölçülebilir olması, RIA yönteminin hem güvenilir hem de erken dönemde gebelik teşhisi yapabildiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Koyun, Gebelikle İlişkili Glikoprotein, Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG), Radyoimmunoassay (RIA), Real-time PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Polymerase Chain Reaction)



## İNGİLİZCE ÖZET

Sheep are seasonal polyestric animals due to the geographical location of our country. Ovulation occurs in every 17-20 days unless they become pregnant during the mating season in sheep. In an ideal herd management, it is important to identify pregnancies of sheep within 17 days after mating, and to make them ready to mate or inseminate before next oestrus cycle. Therefore, it is of great importance for production planning that pregnancy diagnosis is made within 17 days after mating. For this reason, it is aimed to make pregnancy diagnosis as soon as possible by measuring the Pregnancy-associated Glycoprotein (PAG) concentrations in sheep by radioimmunoassay (RIA) method.

In this thesis, PAG concentrations were measured by RIA method from serum samples and real-time PCR method from tissue samples. As the materials, multiparous sheep who was 2-4 year old and had given birth 4 months ago were used. They were bought from a private farm located in Gorukle (40° 23 'N, 28° 85' E) in Bursa in Turkey. Sheep were selected based on the records of the Bursa Provincial Directorate of Agriculture and Forestry of the Ministry of Food related Agriculture and Forestry. Twenty sheep (pregnant: 10, non-pregnant: 10, n = 20) and 12 sheep (n = 12) were used for serum and tissue samples respectively. The oestrus synchronization of the ewes required for the collection of samples was begun in May 2017.

Six different RIA methods were tested for early pregnancy diagnosis in sheep. Blood samples were taken on days 0, 10, 15, 16, 17, 18, 19 and 20 post-mating and ovPAG concentrations in blood serum were measured by using RIA-497, RIA-706, RIA-780, RIA- 860, RIA-srPool and RIA-wbPool methods for early pregnancy diagnosis. In this thesis, RIA-860 and RIA-wbPool methods were tested for pregnancy diagnosis in sheep, for the first time. In addition, real-time PCR was performed to determine ovPAG expression in uterine tissue samples. The tissue samples were collected from sheep on days 0, 14, 20 and 30 post-mating. The mean PAG concentrations were determined being increased from day 17, 18, 19 and 19 in RIA-780, RIA-706, RIA-srPool and RIA-wbPool, respectively (P <0.001). PAG1 gene expression was not upregulated or downregulated according to real-time PCR results.

The fact that ovPAG concentration can be measured in serum samples from day 17 post coitum has shown that the RIA method is both reliable and able to diagnose early pregnancy.

**Keywords:** Sheep, Pregnancy Associated Glycoprotein, Radioimmunoassay, Real-time PCR

## 1. GİRİŞ

Koyun yetiştiriciliği dünyada olduğu gibi, son on yılda Türkiye’de de giderek artmaktadır. Yetiştiricilikte sürdürülebilir kârlılık, girdiler optimize edilirken, üretimin de en üst seviyeye çıkartılmasıyla sağlanabilir. Bu durum, etkin sürü yönetimi ve isabetli planlamalarla, sürünün sahip olduğu dinamiklerinin kısa sürede açığa çıkartılmasına bağlıdır. Kârlı yetiştiricilikte önemle üzerinde durulması gereken nokta ise, tüm koyunların mümkün olan en kısa sürede gebe bırakılması ve gebe kalmayanların tespit edilip, tekrar üretime destek verir hale getirilmesi veya sürüden çıkartılması kritik bir anlam ifade etmektedir.

Koyunlar ülkemizin coğrafi konumundan dolayı mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır. Bilimsel olarak geliştirilmiş senkronizasyon metotları kullanılsa da, çiftleşme mevsimi dışında hayvanların gebe kalma şansları düşüktür. Dolayısıyla koyun üretimi yılın sadece belirli dönemlerinde elverişli olmakta, diğer zamanlarda ise üretim oranı azalmaktadır. Koyunlarda, çiftleşme sezonu içinde gebe kalmadıkları sürece 17-20 günde bir ovulasyon şekillendiği gözönünde bulundurulduğunda, ideal bir sürü yönetimi için, çiftleştirilmiş ya da tohumlanmış koyunların gebelikleri 17 gün içinde tespit edilerek, gebe kalmamış olanların bir sonraki östrus siklusunda gebe bırakılması önemlidir. Bu yüzden gebelik teşhisinin çiftleşmeden sonraki 17 gün içinde yapılması üretim planlaması açısından büyük önem arz etmektedir.

Bu tezin amacı, koyunlarda, kanda gebelik ile ilişkili glikoprotein (*Pregnancy Associated Glycoprotein*, PAG) konsantrasyonlarının radyoimmunoassay (RIA) yöntemiyle ölçülerek gebelik teşhisinin mümkün olan en kısa sürede yapılmasını sağlamaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Gebeliğin tanısı ve patolojik olgulardan ayırt edilebilmesi, gebelik süresince ve doğum sonrasında hem anne hem de yavru açısından önem arz etmektedir. Geçmişten günümüze gebelik süreci insanoğlunun hep merak konusu olmuştur. Gebelik tanısı, bu alanda önemli buluşlar yapılanaya kadar beşeri ve veteriner hekimler açısından büyük zorlukları içeren bir problem olarak tarihteki yerini almıştır.

### 2.1 Koyunlarda Östrus Siklusu

Mevsime bağlı üreme, sıcaklık ve yiyecek varlığı gibi mevsimsel değişiklikler ile başa çıkmak için vahşi hayvanlar tarafından kullanılan adaptif bir fizyolojik süreçtir. Hayvancılıktaki endüstriyelleşme, bu adaptasyonun sığır ve domuzlarda neredeyse tamamen kaybına yol açmıştır, ancak ılıman enlemlerde yaşayan koyun, keçi ve at ırklarının çoğunda bu özellik korunmuştur. Bu enlemlerde, fotoperiyod üreme mevsimlerinin başlangıcını ve süresini belirleyen ana çevresel faktördür. Üreme mevsiminin zamanlaması, gebelik süresinin uzunluğuna bağlıdır ve doğum ilkbaharda gerçekleşir. Bu nedenle koyun ve keçiler (5 aylık gebelik dönemi) sonbahar ve kış aylarında gebe kalıp ilkbaharda ürediğinden kısa gün üreyenleri (short-day breeder), atlar (11 aylık gebelik dönemi) ise doğumun ilkbaharda olması için yine ilkbaharın uzun günlerinde gebe kaldıklarından, uzun-gün üreyenleri (long-day breeder) olarak nitelendirilirler (Ortavant ve ark., 1985).

Fotoperiyodik bilgi, hem sinir hem de humoral basamakları içeren karmaşık bir yolla entegre edilir. Fotoperiyod, retina tarafından algılanan mesajın suprakiazmatik çekirdeği ve süperior servikal gangliyonları içeren çok iletimli sinir yoluyla, melatonin salgılanmasının ritmini modüle ettiği pineal bezine iletilen ilk yöntemdir (Karsch ve ark., 1984). Melatonin sadece gece serbest bırakılır ve bu nedenle, sekresyonun süresi uzun ve kısa günler arasında değişmektedir. Melatonin salgılanma süresi, hipotalamo-hipofiziyal-gonadal aksisin aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar (Karsch ark., 1988).

Coğrafik olarak 35° güney ve 35° kuzey enlemleri arasındaki bölgelerde bulunan koyunların, mevsime bağımlı olmadan, yılın her dönemi reproduktif açıdan aktif oldukları bildirilmiştir. Otuzbeş dereceden büyük enlemlerde, mevsime bağlı poliöstrus oluşur (Hafez, 1952; Goot, 1969; Dýrmundsson, 1978; Robinson, 1981).

Genel olarak, enlem ne kadar yüksek olursa, foto bağımlılığı da o kadar yüksek ve üreme aktivitesi süresi o kadar kısıtlıdır (Poulton, 1987). Tropik ırklar yıl boyunca reproduktif olarak aktifken, İngiliz ırkları uzun anöstrus dönemi ile belirgin mevsimsellik göstermektedir. Avustralya merinosu ve Akdeniz ırkları gibi ara enlemlerden gelen ırklar, kısa süreli anöstrus gösterirler; bu sırada bir miktar koyunda kendiliğinden ovulasyon şekillenebilmektedir (Avustralya Merinosunda % 5) (Martin ve ark., 1986). Çiftleşme mevsimi yaz aylarında veya sonbaharın başında pek çok koyun ırkında başlar (Chemineau ve ark., 1992) ve uzunluğu büyük ölçüde ırklar arasında değişkenlik gösterir, ancak genel olarak kış aylarında sona ermektedir (Hafez, 1952).

Koyunlardaki mevsime bağlı üreme, davranışsal, endokrin ve ovulasyon seviyelerindeki değişiklikler ile karakterizedir. Yıl içerisinde farklı özellikler ile karakterize 2 ayrı dönem ele alınır. Bunlar, gebelik gelişmezse düzenli aralıklarla (ortalama 17 gün) göze çarpan davranış ve ovulasyon ile karakterize edilen çiftleşme dönemi ve cinsel aktivitenin sona ermesi ile karakterize anöstrus dönemidir. Anöstrus döneminden çiftleşme dönemine geçiş, kısa döngülerle birlikte aşamalı olarak gerçekleşir, çünkü ilk CL genellikle, oluşumundan 5-6 gün sonra regrese olmaktadır. Hem ovulasyon aktivitesi, hem de östrus davranışı mevsimsel değişkenlik içinde paralellik gösterir, ancak bazen üreme mevsimi başlarında ve sonlarında, ovulasyon östrus davranışı olmaksızın gerçekleşebilmektedir. Östrus davranışlarının sergilenmesi yalnızca ilk östrus siklusunun sona ermesinden sonra ortaya çıkar. Çiftleşme mevsimin başlangıcı ya da sonu ile ilgili olmayan sessiz ovulasyonlar, bazı ırklarda da ortaya çıkabilir (Land ve ark. 1973; Ortavant ve ark., 1988). Endokrin seviyede, anöstrus dönemi boyunca, folikül büyümesi ve gerilemesinin meydana geldiği ve östrus devresinin luteal fazında bulunanlar kadar büyük foliküllerin oluşabileceği bildirilmiştir (Hutchinson ve Robertson, 1966; Matton ve ark., 1977; Webb ve Gauld, 1985).

### **2.1.1 Koyunlarda Östrus Siklusu Boyunca Hormonal Değişiklikler**

Östrus döngüsü hipotalamusta GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) üretimi ve salınmasıyla başlar. Hipofiz bezinde üretilen FSH (*Follicle Stimulating Hormone*), LH (*Luteinising Hormone*), oksitosin ve prolaktin, ovaryumlarda antral

foliküllerden üretilen östrojen ve inhibin, CL' dan üretilen progesteron ve oksitosin son olarakta uterus endometriyumundan salgılanan  $PGF_{2\alpha}$  (*Prostaglandin f2-alpha*), östrus siklusunun düzenlenmesinde rol oynayan hormonlardır (Scaramuzzi ve ark., 1993). Ovaryumlarda folikül gelişimi ve maturasyonu, steroidogenezis, ovulasyon ve CL formasyonu birincil olarak hipofiz bezinden salgılanan gonadotropinler tarafından sağlanır. Gonadotropik hormonların salgılanması ve biyoyararlanımı birkaç iç ve dış faktörün birbiriyle etkileşimine dayanmaktadır (Rawlings ve Bartlewski, 2006). Söz konusu iç faktörler, lokal olarak üretilen aminoasit ve peptid / protein hormonlarını, ovaryum steroidlerini ve inhibin, aktivin ve follistatin gibi foliküler hormonlarını, nörotransmitterleri, nöromodülatörleri ve uterus salgılarını içerir. Fotoperiyodik sinyaller, erkek feromonları, beslenme ve stres gibi dış etkenlerin de hipotalamo-hipofiziyal-ovaryan aksisin fonksiyonunu etkilediği bilinmektedir.

GnRH'nın ve ardından LH ve FSH'nın preovülatör salınımı, ovulasyondan yaklaşık 14 saat önce en üst seviyeye ulaşmaktadır (Baird, 1978; Rawlings ve ark., 1984). FSH etkisi altında ovaryumlarda foliküler gelişim devam etmektedir. Foliküler dinamik şekillenirken FSH piklerine bağlı olarak foliküler dalgalar oluşmaktadır. Gelişen foliküllerde bulunan teka interna ve granuloza hücreleri tarafından östradiol üretilmeye başlanır. Gonadotropin piki, östrus döngüsünün final evresinde azalmış progesteron ve artmış östradiol salgılanması ile uyarılıp ve sürdürülmektedir. GnRH tarafından üretilen ritmik LH salgılanması, gonadotropinlerin preovülatör dalgalanmasının öncesinde, sırasında ve sonrasında geçen süre de dahil olmak üzere, koyunların tüm reproduktif durumlarında hakimdir. LH sekresyonu sıklığı ve miktarındaki artış, preovülatör LH pikinin habercisi olarak nitelendirilmiştir (Rawlings ve Cook, 1993). Uyum içinde hareket eden progesteron ve östradiol, LH salınımının sıklığını ve miktarını modüle etmektedir. LH'nın pulsatil salınımının, luteal progesteronun dolaşımdaki seviyeleri ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir (Bartlewski ve ark., 2000; Duggavathi ve ark., 2005; Barrett ve ark., 2007). Kan serumundaki östradiol konsantrasyonunun ortalama 10 pg/ml'den 20 pg/ml'ye artışı, koyunlarda davranışsal değişikliklere sebep olarak östrus belirtilerinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Ayrıca granuloza hücreleri üzerinde LH reseptörlerinin sentezini de uyarmaktadır. Östradiol maksimum seviyeye ulaştığında granuloza hücrelerinden inhibin salgılanması uyarılır. İnhibin hormonu hipofiz bezi üzerinde

negatif geri bildirim etkisi göstererek FSH salgılanmasının azalmasına ve LH salgılanmasının artmasına sebep olur. Mevsimsel anöstrus boyunca foliküller steroid üretir ve steroidlerin luteinize edici hormonun salgılanması üzerine olumlu ve olumsuz geri bildirim etkilerinin çoğu üreme mevsiminde olduğu gibi devam eder (Gordon, 1997). LH, epizodik olarak, ancak üreme mevsimine göre daha düşük bir frekansta salınmaya devam eder. Başlangıçta 8–12 saatte bir salınırken orta luteal fazda her 3–4 saatte bir salınır. Preovülatör LH dalgalanmasından hemen önce her 1-2 saatte bir salınmaya başlar ve preovülatör LH dalgalanması sırasında ise her 20 dakikada bir salınımı gerçekleşir. Bu evrede kan serumunda LH konsantrasyonu 80 ng/ml düzeyine ulaşır ve ovulasyon şekillenir (Yuthasastrakosol ve ark., 1977; Karsch ve ark., 1984; Martin, 1984; I'Anson ve Legan, 1988; Thiéry ve Martin, 1991). Anöstrus sırasında saptanamayan seviyelerde kalan plazma progesteron konsantrasyonunda da önemli bir fark vardır (Roche ve ark., 1970; Karsch ve ark., 1984; I'Anson ve Legan, 1988). Ovulasyon meydana geldikten sonra folikülü oluşturan teka ve granuloza hücreleri LH'nın etkisiyle luteinleşmeyi hızlandırarak, korpus hemorajikumun ve korpus luteumun oluşmasını sağlarlar. CL'den progesteron hormonu üretilir ve progesteron hipotalamus ve hipofiz bezlerini baskılamaktadır. Aynı zamanda gebelik şekillenmediyse CL'de üretilen oksitosin endometriyumda bulunan oksitosin reseptörlerine bağlanarak, endometriyumdan PGF<sub>2α</sub> salgılanmasına sebep olur (Sheldrick ve Flint, 1985). PGF<sub>2α</sub> salgılanması ovulasyondan sonra yaklaşık olarak 12. günde başlar ve 14. günde maksimum seviyeye ulaşır. PGF<sub>2α</sub> uterus veni ile ovaryum arteri arasında geçiş yaparak sistemik dolaşıma katılmadan CL'ye ulaşır ve luteolizis sürecini başlatır. PGF<sub>2α</sub> etkisiyle lize olan CL' dan dolayı progesteron konsantrasyonu bazal seviyelere inerek hipotalamus ve hipofiz bezi üzerindeki baskının ortadan kalkmasına sebep olur. Hipotalamustan GnRH salınımı tekrar başlayarak yeni bir siklus başlatılmış olur (Sheldrick ve Flint, 1985; Knickerboker ve ark., 1988; Silvia, 1999).

### **2.1.2 Koyunlarda Östrus ve Ovulasyon Yönetimi**

Koyun yetiştiriciliğinde üretimin en üst seviyeye ulaştırılması için, sürü yönetiminin etkin yapılabilmesi gereklidir. Geleneksel koyun yetiştiriciliğinin aksine planlı üretim yapmanın bir takım avantajları vardır. Üretimdeki planlamaların başında, koyunlarda östrus kontrolü ve ovulasyon indüksiyonu gelmektedir. Östrus kontrolü

sayesinde, koyunlar istenilen zamanda gebe bırakılabilmekte ve pazar ihtiyacına yönelik kuzu yetiştirilebilmektedir. Ayrıca işletme yönetimi açısından barınak planlaması, beslenme planlaması ve personel planlaması daha elverişli yapılabilmektedir. Östrus ve ovulasyon indüksiyonunun sürü bazında yapılmasına östrus senkronizasyonu da denmektedir. Östrus senkronizasyonu için bilimsel olarak bazı yöntemler geliştirilmiştir.

Östrus senkronizasyonunda kullanılan yöntemler arasında flushing uygulaması + koç katımı ve koyunların kontrollü süre ışığa ve karanlığa maruz bırakılmaları gibi uygulamalar yapılmaktadır. Özellikle üreme sezonu içerisinde oldukça ekonomik yöntemler olup, ülkemizde geleneksel aile tipi işletmelerde sıkça başvurulan yöntemlerdir (Wildeus, 2000).

Profesyonel işletmelerde daha çok medikal uygulamalar tercih edilmektedir. Medikal uygulamalar kapsamında ülkemizde en çok tercih edilen yöntemler vaginal sünger ve CIDR (*Controlled Internal Drug Release*) uygulamalarıdır. Bu tip uygulamalar ile koyunların diöstrus dönemleri taklit edilmeye çalışılmaktadır. En önemli avantajları ise mevsimden bağımsız olarak, her dönem uygulanabiliyor olmasıdır. Bu ürünler genellikle progesteron, flugeston asetat (FGA) veya medroksiprogesteron asetat (MAP) etken maddelerini içerirler. Uygulama, koyunlarda 12-14 gün sürmektedir. Bazı çalışmalarda 5-7 günlük kısa süreli uygulamalardan da başarılı sonuçların elde edildiği bildirilmiştir (Viñoles ve ark., 2001). Vaginal aparatlar 5-7 gün veya 12 gün sonra vaginadan uzaklaştırılır ve ovulasyonun indüklenme olasılığını artırmak için PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) uygulanır. Aparatların çıkarılıp enjeksiyonun yapılmasından yaklaşık olarak 24-48 saat içinde östrus belirtileri ortaya çıkmaktadır. PMSG enjeksiyonunda uygulanan dozlar mevsime göre değişiklik gösterir. Genellikle üreme mevsimi içerisinde 300-400 IU hormon uygulaması yapılırken, üreme mevsimi dışında kalan anöstrus döneminde uygulanan doz 600 - 720 IU' ye kadar çıkarılabilmektedir (Wildeus, 2000). Progesteron kaynakları ortamdaki uzaklaştırılınca hipotalamus ve dolayısıyla hipofiz bezi üzerinde baskı kalkarak gonadotropinlerin salınımı başlar ve genellikle 60-72 saat içinde ovulasyon şekillendiği bildirilmiştir (Gordon, 1997).



## 2.2 Gebelik Teşhisinin Tarihi

Eski Mısır medeniyetinde, günümüzden 3000-4000 yıl öncesine ait papirüslerden elde edilen bilgilere göre, o dönemlerde de gebelik teşhisi için birtakım yöntemler geliştirilmiştir. O dönemlerde bir kadının gebeliğini tespit edebilmek için, arpa veya buğday tohumu ile toprağı karıştırarak bir kap hazırlandığı ve kadının idrarının belirli aralıklarla bu kaba dökülmesiyle tohumların filizlenmesinin takip edildiğı bildirilmiştir. Toprakta tohumlar filizlendiğı takdirde, kadının gebe kabul edildiğı belirtilmiştir (Finkler, 1930; Bayon, 1939). Bu hipotez, 1963 yılında bilim insanlarının identifikasyon testlerinde % 70 oranında doğruluk göstermiştir. Neuburger, aynı döneme ait başka bir uygulamaya dikkat çekmiştir ve Brugsch papirüsünden alıntıladığına göre; "bir kadının gebeliğinin anlaşılabilmesi için, karpuz suyu ile erkek çocuk doğurmuş bir kadının sütü karıştırılarak gebelik teşhisi yapılacak kadına içmesi için verilmiştir. Eğer kadın kusarsa gebe olduğu, eğer sadece şişkinliğı varsa, bir daha asla gebe olamayacağı düşünülürmüş" (Finkler, 1930).

Uygar ülkeler ve kabileler gebelikle ilgili teşhis yöntemlerinde batıl inançlarından öteye gidememişlerdir. On dokuzuncu yüzyılda, hamile kadınların idrarında kristal veya bakteri içerme olasılığı teorisi tanıtılmıştır, ancak güvenilir bir teorik arka plan oluşturulamamıştır. Bu konuda literatüre geçen ilk çalışmalar 19. yüzyılda Hodge, Hollick ve Beach tarafından yapılmıştır (Joder, 1932).

Hodge, gebe kadınların idrarında kazeöz karakterde bir birikim olduğuna dikkat çekmiştir ve bunu kiyestin (*kyestine*) olarak adlandırmıştır. Çalışmasında, gebe kadından alınan idrar örneğı, hava ile teması engellenmeden cam bir kabın içerisine konularak birkaç saat bekletilmiştir. Beklemenin sonunda cam kenarlarında ve tabanında bulutumsu pullar şeklinde birikimlerin olduğu saptanmıştır ve idrarın renginin daha berraklaştığı tespit edilmiştir. Ancak bu karakteristik bir şey olarak görülmemiştir. İkinci veya üçüncü günde bulanık hale gelen idrarın yüzeyinde az çok mükemmel şekilde oluşan bir pelet ortaya çıkmıştır. Peletin üçüncü günden itibaren ayrılmaya ve çökelmeye başladığı, beş ya da altıncı gün neredeyse tamamen ortadan kaybolduğı bildirilmiştir. Hodge, bu durumun gebeliğın ikinci ayndan önce nadiren görüldüğünü, genellikle gebeliğın üçüncü ve yedinci ayları arasında en yoğun formda oluştuğunu ve son aylarda görülmediğini aktarmıştır. Ayrıca Hodge, bu durumun gebe

olmayan kadınlarda da nadiren bulunduğunu ve Kane, Hodge'un tespitlerinin aynılarını belirli patolojik koşullarda gözlemlediğine dikkat çekmiştir. Ancak patolojik durumlarda oluşan bu peletlerin genellikle beşinci veya altıncı güne kadar oluşmadığını ve bu nedenle gebelik teşhisinde pelet oluşum süresinin göz önünde bulundurulması gerektiğini savunmuştur (Hodge, 1864).

Gerçek kiyestin, saf jelatin veya albüminden farklı bir 'jelatin albümin' maddesi olarak kabul edilmiştir. Kiyestin, tüm gebe kadınların yaklaşık % 80'inin ve emziren kadınların yaklaşık yarısının idrarında bulunduğu ortaya konulmuştur. Hodge buradan "eğer gözlemler dikkatli bir şekilde yapılırsa, idrarda kiyestin bulunması, gebeliğin pozitif belirtilerinden biri olarak kabul edilebilir, fakat güvenilmemelidir, sadece bizim teşhisimizi oluşturmamıza yardımcı olacaktır" sonucunu çıkarmıştır (Joder, 1932).

Hodge'in görüşü, Hollick'in hipotezi ile çok uyumludur, ancak ilk aydan sonra gebe kadınların idrarında her zaman kiyestin bulunacağını ve bu işaretin çok değerli olduğunu söylemiştir (Hollick, 1848).

Bununla birlikte Beach'de idrarın bol, daha soluk ve berrak olmasına dikkat çekerek gebeliğin pozitif teşhisini yapmadan önce, "bizim düşüncemiz semptomların bir tanesinde değil, güvenilir semptomların birlikteliği veya toplanması üzerine kurulmuştur" görüşünü ortaya atmıştır. Bu semptom grubunda idrarda bulunan tuhaf değişiklikler listelenmiştir (Beach, 1850).

Kiyestin testinin ardından birçok yeni fikir öne sürülmüştür. Londra'da Lever, Edinburgh'da Simpson ve Cohen 1841-1842 yılları arasında birçok gebe kadının idrarında albümin keşfetmiştir (Hodge, 1864). Aynı zamanda birçok olguda, idrarda albümin bulunması ile baş, göz, yüz, göğüs, sırt ağrıları gibi çeşitli nevrotik bozukluklar arasında bir tesadüf olduğunu ve sık sık, kısmi veya tam körlük, kulak çınlaması, vertigo, koma ve günümüzde preeklamsi, eklamsi veya tamamen nefritik bozukluklar olarak bilinen konvülsiyonlarda ortaya çıktığını bildirmişlerdir (Joder, 1932).

Blot, gebelik şekillendikten sonra idrarda her zaman şeker bulunabileceğini ileri sürmüştür (Hodge'dan alıntı); diğerleri ise oksalik asidin varlığını ve bazen de üre

miktarının azaldığını belirtmişlerdir. Ancak, gebelik sırasında idrarda albüminin varlığı veya yokluğu üzerinde yoğunlaşmıştır. Sağlıklı ve gebe olmayan kadınlarda idrarda albümin bulunmazken, gebe olan kadınlarda sıklıkla tespit edilmiştir. Cozeaux'un, idrarda albümin bulunmasının gebeliğin fizyolojik durumu olduğunu ve miktarının aşırı artması durumunda yavaş yavaş patolojik hale geldiğini ve bazı durumlarda granüler nefritle birlikte olabileceğini öne sürmüştür. Bununla birlikte Blot vakalarının sadece % 20'sinde bu durumla karşılaştığını rapor etmiştir (Hodge, 1864).

Yaklaşık 1914 yıllarında Abderhalden gebelik için özel bir testle öne çıkmıştır (James Oliver, 1914) ve büyük beğeni toplamıştır. Ancak o zamana kadar olan tüm diğer gebelik testleri gibi, bu da bir süre sonra terk edilmiştir. Abderhalden'in ortaya koyduğu test, Wells 'in "hayvan vücudu, yabancı proteinleri yok etmek için özel araçlar sağlayarak yabancı proteinlerin varlığına proteoliz yoluyla tepki gösterir (Wells, 1920)" fikrine dayanmaktadır. Gebelikte, teorik olarak plasentanın koryonik hücreleri maternal dolaşıma katılır. Yabancı proteinin varlığı koruyucu enzimlerin oluşumuna neden olur ve bu da, *in vitro* olarak uygun şekilde hazırlanmış plasental proteinleri sindirmek için, bunları içeren serumun yeteneği ile tespit edilmiştir. Bütün fikir, tepkilerin özgünlüğüne dayanmaktadır. Her biri, sadece kana karışan ve koruyucu enzimin gelişmesine neden olan maddeyi azaltacaktır. Wells, testin kesinlikle spesifik olmayan ve daha geniş kullanımla kanıtlanmış olan paradoksal sonuçlara işaret etmiştir. Test çok hassastır, özgüllüğü kanıtlanmamıştır ve bu nedenle jinekoloji için pratik bir değeri yoktur (Joder, 1932).

Fahraen'in kırmızı kan presipitasyon (çökelme) testinde, kırmızı kan hücreleri, gebe olan insanların dilüe edilmiş kan örneğinde 2 saatte çökelme gerçekleşirken, gebe olmayan insanların kan örneğinde bu süre 6 saate uzadığı tespit edilmiştir. Widal sindirim hemoklasisi testinde ise, hızla içilen 200 ml sütün gebe kadınlarda lökopeniye neden olduğu bildirilmiştir (De Lee, 1924).

On dokuzuncu yüzyılın sonunda, bazı organlar tarafından salgılanan kimyasal haberciler ortaya çıkarılmıştır ve Ernest Starling onları hormon olarak adlandırmıştır (Modlin ve Kidd, 2001).

Gebelik teşhisi ile ilgili ortaya atılmış diğer iki test ise Mazer-Hoffman testi ve Siddall testleridir (Mazer ve Hoffman, 1931). İlk test, kadın seks hormonunun idrarda tespitine dayanmaktadır. İkinci test ise, ön hipofiz hormonunun etkisiyle salgılandığı düşünülen ve gebe kadın kanında bulunan dişi cinsiyet hormonunun, olgun olmayan farelerin genital organlarında meydana getirdiği değişikliklerin gözlenmesine bağlıdır. Günde 1 ml kan serumu, pubertasa ulaşmamış fareye enjekte edilmiş ve beş gün sonra, toplam fare ağırlığı, ovaryumlarla birlikte uterus ağırlığına bölünmüştür ve çıkan oran 400 veya daha az ise kadının gebe olduğu kabul edilmiştir. Bu iki testin ciddi savunucuları olmasına rağmen, ne uluslararası düzeyde kabul görmüştür ne de Aschheim-Zondek testinin gösterdiği doğru tanı yüzdesine ulaşabilmiştir (Joder, 1932).

Gebelik teşhisi açısından, hipofizin ön lobu ile ovaryumlar arasındaki ilişkinin keşfedilmesi, en önemli gelişimlerden biri olarak kabul edilmiştir. Froelich, 1901'de hipofiz bezinin gelişimi ve cinsel olgunluk arasında bir ilişki olduğunu öne sürmüştür (Mathieu ve McKenzie, 1931). Erdheim ve Stumme, gebelik sırasında hipofiz bezinin ön lobunda histolojik değişikliklerin gerçekleştiğine işaret etmişlerdir (Kaplan, 1929).

Smith ve Engle (1927) ile Long ve Evans (1921), hipofiz bezinin ön lobunun fare ve sıçanlara enjekte edilmesinden sonra, ovaryumlarda belirgin değişikliklerin olduğunu göstermişlerdir. Aschheim ve Zondek, 1925'te hipofiz ön lobu hormonunun gebelikte idrarla atıldığını (Parvey, 1930) ve bu idrarın östrus belirtilerini ortaya çıkardığını gösteren bir dizi çalışma başlatmışlardır. Pubertasa ulaşmamış farelerden, bir gruba hipofiz bezinin ön lobu oral yolla verilmiş, diğer gruba da deri altı implantı yapılmıştır. Bu uygulamalar farelerin ovaryumlarında, ileri düzeyde morfolojik değişikliklere ve 100 saat sonra menstrüasyona sebep olmuştur. Ayrıca bu çalışmalarda gebelik sırasında ön hipofiz hormonu üretiminin çarpıcı derecede yüksek olduğunu ve idrarla atıldığını keşfetmişlerdir. Finkler, Aschheim-Zondek ve diğerlerine göre ön hipofiz hormonunun gebe kadınlardaki konsantrasyonu, gebe olmayanlara göre birkaç bin kat fazla bulunmuştur (Aschheim ve Zondek, 1928; Finkler, 1930). Aschheim ve Zondek, gebe insandan alınan idrarın, pubertasa ulaşmamış farelere enjekte edildiğinde, hipofiz nakli gibi ovaryumlarda da aynı değişiklikleri oluşturduğunu keşfetmişlerdir. Bu keşif, Aschheim ve Zondek' in önerdiği gebelik teşhisinin temelini oluşturmuştur.

Aschheim ve Zondek yaptıkları bir dizi çalışmaların sonunda bir takım çarpıcı sonuçlar ortaya koymuşlardır. Bu sonuçları aşağıdaki şekilde yorumlamışlardır (Mathieu ve McKenzie, 1931);

- Anterior hipofiz bezi hormonu, cinsel işlevin "motoru" dur.
- Anterior lob hormonu primerdir, ovaryum hormonu ikincildir.
- Anterior lob hormonu folikülleri harekete geçirir, foliküler olgunlaşmayı durdurur ve foliküler hücrelerde sekonder ovaryum hormonunu harekete geçirir.
- Bu hormonlar daha sonra uterus ve vagina üzerinde belirli şekilde yön verir.

Aschheim ve Zondek öncelikle idrarda ovaryum hormonunun varlığını göstererek gebelik teşhisini yapmaya çalışmışlardır. Gebeliğin 10. haftasına kadar, küçük miktarlardaki idrarda ovaryum hormonunu gösteremedikleri için bu çalışmayı bırakmışlardır. Ayrıca, hormonun gebe olmayan kadınlarda, miksödem, hipertroidizm ve menstrüasyonun şekillenmemesi gibi menopozda oluşan ovaryumun fonksiyonel rahatsızlıklarında, zaman zaman büyük miktarlarda atıldığını bulmuşlardır.

Hipofiz hormonunun ovaryumlar üzerindeki etkisi, folikülin hormonunun (ovaryum hormonu) tersi yönde olduğu bulunmuştur. Long ve Evans (1921) ile Allen (1922), folikülinin, ovaryumların yapısını değiştirmeden, uterus bezleri ve vaginada değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Aschheim ve Zondek daha sonra anterior hipofiz hormonunun iki bileşenini, Prolan A ve Prolan B olarak adlandırmışlardır. Aschheim ve Zondek'e göre Prolan A, folikül olgunlaşmasına neden olan hormondur. Prolan B, *corpora lutea* ve *blood point* (Korpus hemorajikum) oluşumuna neden olan hormondur. Prolan B hormonu sadece gebelikte idrarda bulunurken, menopoz, amenore, genital tümörler, endokrinopati ve pelvik inflamasyon gibi durumlarda, idrarda prolan A hormonu bulunabilir (Finkel, 1931). Yirminci yüzyılın başlarında, reproduksiyon araştırmaları yoğunluk kazanmıştır ve Fraenkel, gebelik sırasında, insan koryonik gonadotropini (*human chorionic gonadotropin*, hCG) tarafından desteklenen korpus luteumun (*corpus luteum*, CL) oluştuğunu bildirmiştir (Simmer, 1971). HCG'nin hipofiz bezi tarafından değil, plasenta tarafından üretildiği tespit edilmiştir (Jones et al., 1938).

Gebe kadınların kanında, hem hipofiz hem de ovaryum hormonlarında belirgin bir artış görülmüştür. Gebelik başlangıcıyla ovaryum hormonunun birkaç hafta boyunca kademeli arttığı bildirilmiştir. Bunun tersine, hipofiz hormonunun keskin bir şekilde yükseldiği, konsepsiyondan birkaç gün sonra yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir. Bu seviye, gebeliğin yaklaşık sekizinci ayına kadar devam ettiği ve sonrasında kademeli olarak azaldığı, doğumdan sekiz gün sonra normal seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir (Aschheim ve Zondek, 1928; Parvey, 1930; Fanz ve Gault, 1930).

Cole ve Hart, Aschheim-Zondek gebelik testinin sonuçlarına dayanarak, hayvanlar için de benzer bir test yöntemini geliştirmek için araştırmalara başlamışlardır. Gebe ve gebe olmayan atlardan alınan kan serumlarını, pubertasa ulaşmış fakat östrus belirtisi henüz göstermemiş olan farelere, 5 ml ve 10 ml dozlarda iki günde bir kez olacak şekilde, 6 kez enjekte ettikten sonra fareleri ötenazi ederek ovaryum aktivitelerini incelemişlerdir. Gebe atlardan alınan kan serumları farelerin ovaryumlarındaki aktiviteyi baskılayarak, ovaryumları stabil tuttuğunu keşfetmişlerdir. Gebe olmayan at serumu enjekte edilen farelerde ise, herhangi bir baskılanmanın olmadığı ve ovaryum aktiviteleri olması gerektiği gibi devam ettiği ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda atlar içinde gebelik teşhisinin de yapılabileceği bildirilmiştir (Cole ve Hart, 1930).

Friedmann ve Lapham 1931'lerde, gebelik hormonuna hızlı tepki veren tavşanların kullanıldığı bir test geliştirmişlerdir. İşlemler, reproduktif açıdan olgun ancak gebe olmayan dişi tavşanlarda anestezi altında yapılmıştır. Ovaryumlar uzun, yuvarlak ve sarımsı beyaz renklidir. Üst yüzeyde camsı görünüme sahip foliküller bulunmaktadır. Gebe olabileceğinden şüphelenilen kadının idrarı, tavşanın kulağında bulunan toplardamar içine enjekte edilir. Kırk sekiz saat sonra karın yeniden açılır ve ovaryumlar dikkatli bir şekilde incelenir: kanamalı foliküller veya dokunulduğunda kanaması olan sarı cisimler (korpora lutea) gebeliği gösterir (Friedman ve Lapham, 1931).

Zondek-Sulman-Black test olarak adlandırılmış gebelik testi, 1945 yılında Bernhard Zondek ve arkadaşları tarafından oluşturulmuştur. Bu testte gebe olduğundan şüphelenilen kadının idrarı, cinsel açıdan olgunlaşmamış üç sıçana art

arda iki kez enjekte edilmiştir; 24 saat sonra hayvanlardan biri diseke edilmiştir. Sonuç pozitifse, sıçanın ovaryumları büyümüş ve çilek kırmızısı renkte, sonuç negatifse, ovaryumlar küçük ve soluk renkte olduğu belirtilmiştir. Diğer iki sıçan incelenmemiş, kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu testle, sadece altı saat sonra ilk sıçanı öldürerek daha hızlı sonuç elde edilmesi hedeflenmiştir. Sonuç pozitifse diğer iki hayvanın yaşamasına izin verilir; eğer negatifse, 18 saat sonra diğer iki sıçan da öldürülerek ovaryumları incelendiği bildirilmiştir (Zondek ve ark., 1945).

Sıçan ve tavşanlardan sonra, 1940'ların başlarında kurbağalar eczanelerde 'gebelik testi' olarak kullanılmaya başlanmıştır. Gebelik şüphesi olan kadından, sabahın erken saatlerinde idrar örneği alınarak, olgun dişi kurbağaya enjekte edilmiştir. Kurbağa 18 saat içinde yumurtlarsa, gebelik pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu testlerde kullanılmak üzere çok sayıda Afrika Pençe kurbağası (*Xenopus laevis*) Güney Afrika'dan Avrupa, Avustralya, Asya ve Kuzey Amerika'ya ithal edilmiştir. Kimyasal gebelik testlerinin bulunmasıyla, kurbağa kullanımı son bulmuştur (Hogben, 1946).

Güney Amerikalı doktor Carlos Galli Mainini, erkek kurbağanın dorsal lenf yumrusuna, gebelik şüpheli kadından alınan, az miktarda idrarı enjekte ederek 'Hogben testi'ni geliştirmiştir. Bu uygulama gebelik testi sürecini önemli ölçüde hızlandırmıştır. Eğer gebelik varsa, kadın idrarında bulunan gebelik hormonu, kurbağanın 3 saat içerisinde sperm üretmesine neden olduğu ve bunun mikroskopta kolayca görülebildiği bildirilmiştir. Bu test, kurbağalar için acı verici olmamakla birlikte, 2 hafta beklendikten sonra başka bir test için tekrar kullanım imkânı sunmaktadır (Galli Mainini, 1947).

Kiel Üniversitesi'nden Dr. G. Hasenbein 1951'de, toprak solucanlarını kullanarak gebelik testi yayımlamıştır. Solucanların, toprağın ne kuru ne de çok ıslak olmadığı bildirilen serin mahzenlerde tutulduğu ve her üç ayda bir değiştirilerek testin güvenilirliği stabil tutulmaya çalışıldığı bildirilmiştir. Mevcut semen üretim durumunu belirlemek için, seminal vezikül çıkarıldıktan sonra, gebeliği test edilecek kadının idrarı, solucana enjekte edilmiştir. Güvenilir bir sonuç elde etmek için, her test serisi için beş solucan kullanılmıştır. İdrar enjekte edildikten iki saat sonra, solucanlar %30 alkol solüsyonunda öldürülmüş, bir tahtada gerilmiş ve parçalara ayrılmıştır. Daha

önce çıkarılan seminal vezikülden kuru bir smear örneği alınmış ve örneklerin öncesi ve sonrası karşılaştırılmıştır. Sonuç sadece önceki örneğin sperm üretmediği solucanlarda belirleyici olmuştur. Sperm veya sperm öncüleri enjeksiyondan iki saat sonra ortaya çıkarsa, idrar numunesi sağlayıcısının gebe olduğu, smear öncesi ve sonrası aynı olduğunda, kadının gebe olmadığı anlamına geldiği bildirilmiştir (Hasenbein, 1951).

Gebelik hormonu hCG'nin varlığını tespit etmek için, kullanılan biyolojik gebelik testleri, çok güvenilir olmasına rağmen, yavaş ve zahmetlidir. hCG tabanlı immunolojik test teknolojisi geliştirmek için bioassay kullanımı, bazı hastanelerin Güney Afrika'dan ithal edilen Afrika pençe kurbağalarını serbest bırakmasına yol açmıştır. Vredenburg ve arkadaşlarına göre, Güney Afrika'dan ithal edilen bir kurbağada ölümcül bir mantar *Batrachochytrium dendrobatidis* Amerika Birleşik Devletleri'ndeki yerli kurbağaları enfekte ederek ekolojik felakete yol açtığı bildirilmiştir ve bu olgunun sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde değil, aynı zamanda dünya çapında da büyük amfibilerin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (Vredenburg ve ark., 2013).

Lazzaro Spallanzani tarafından 1794 yılında ultrason çalışmaları başlatılmıştır (Kane ve ark., 2004). Ultrason çalışmalarındaki ilerlemeler neticesinde, ultrason cihazı ilk kez doğum ve jinekoloji alanında abdominal muayene amaçlı, 1958 yılında Donald ve arkadaşları tarafından kullanılmaya başlanmıştır (Campbell, 2013).

Antijen / antikor reaksiyonu temelli immunolojik testlerin bulunması, teşhis testleri açısından önemli hale gelmiştir. Hemagglütinasyon inhibisyon testi, 1960'lı yılların başında gebelik teşhisi için ilk immunoassay olarak ortaya konmuştur (Wide ve Gemzell, 1960) ve ardından lateks kullanılarak lateks aglütinasyon inhibisyon testi yapılmıştır (Hill ve ark., 1962).

İlk defa 1957 yılında (Berson ve Yalow, 1957) metodolojisi tanımlanan RIA yöntemi reproduktif endokrinoloji alanında da kullanılmaya başlanmıştır (Midgley, 1966). Bu tarihlerde, tanısal testler için altın standart olarak adlandırılan RIA'ların kullanımı, gebelik testlerinin güvenilirliğini arttırmaya başlamıştır. RIA teknolojisindeki ilerlemelerle birlikte, 1974 yılında Saxena tarafından geliştirilen radyo reseptör testi (*radio receptor test*, RRA), hCG testinin hassasiyetini 5 IU / L'ye



düşürerek, 6-8 gün içinde gebeliğin belirlenmesini mümkün kılmıştır. Analiz süresi de 1 saate kadar azalmıştır (Saxena ve ark., 1974). Shimizu ve arkadaşları 1982 yılında,  $\beta$ -hCG poliklonal antikorları yerine monoklonal antikorları kullanarak test sonuçlarının güvenilirliğini arttırmada önemli ilerleme kaydetmiştir (Shimizu ve ark., 1982).

Enzim bazlı immunoassay teknikleri, RIA'ların yerine geçmiştir (Van Weemen ve Schuurs, 1971). Daha kararlı enzim immunolojik test teknikleri, 1980'lerde tamamlanarak, daha doğru ve hassas analizlerle teknolojik ilerlemeler sağlanmıştır (Wada ve ark., 1982).

Gebelik teşhisinde kolay uygulanabilirliği artırmak ve hata olasılığını azaltmak için *dipstick* teknolojisini kullanan kitler, 1990'larda pazara sunulmuştur. Yirmi birinci yüzyıl başlarında, gebelik teşhisi için, reaksiyon sonuçları dijital olarak Clearblue teknolojisinden gelen bir optik sensör tarafından okunacak şekilde test ederek (gebe veya gebe değil), normal kullanıcıların hatalarını önemli ölçüde azaltma fırsatı sunmuştur (Scolaro ve ark., 2008). Gebelik haftası sayısını gösteren test kiti, 2013 yılında piyasaya çıkartılmıştır ve gebelik tanı kitinin kullanılabilirliği daha da artırılmıştır (Gnoth ve Johnson, 2014).

Günümüzde gebelik test kitleri ile akıllı telefon teknolojileri bir araya getirilmiştir. Bluetooth kanalıyla test kiti ile üretici firmaların telefon uygulamaları arasında bilgi transferi sağlanarak, hem menstrual döngünün takibi yapılmakta, hem de gebelik testinin sonucu kayıt altına alınmaktadır.

### **2.3 Koyunlarda Gebelik Tayini Yöntemleri**

Gebelik teşhisi için geçmişten günümüze çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler ultrasonografik ve radyografik görüntüleme, palpasyon, vaginal biyopsi, rosette inhibisyon testi, çeşitli hormonların tespiti ve PAG ölçümüdür.

Ultrasonografi ile görüntüleme teknikleri arasında; A-mod ultrasonografi (Watt ve ark., 1984), Doppler ultrasonografi (Trapp ve Slyter, 1983) ve real-time B-mod ultrasonografi (Bretzlaff ve ark., 1993; Haibel, 1990) vardır. Saha şartlarında gebelik teşhisi için, ultrasonografi görüntüleme tekniklerinin kullanımı oldukça yaygındır. Fakat bu tekniğin kullanımındaki başarı oranı kullanılan cihazın kalitesi ve

uygulayıcının deneyimine bağlıdır. Real-time B-mod transabdominal ultrasonografi (3 veya 3,5 MHz), koyunların gebelik teşhisi için bilimsel çalışmalarda kullanılmış bir yöntemdir (White ve ark., 1984). Bu yöntemde gebelik teşhisinin doğruluk derecesinin muayene zamanı, fetüs sayısı ve yaşı, fetüsün canlılığına bağlı olarak önemli derecede farklılıkları olduğu belirlenmiştir.

Radyografi ile görüntüleme tekniğinde (Wenham ve Robinson, 1972), fetal iskelet yapısı gebeliğin 65. gününden sonra radyo-opak görüntü vermektedir. Bu teknik ile gebeliğe bağlı olarak uterusun büyümesi 65. günden önce de tespit edilebilmektedir ancak hidrometra, piyometra gibi uterus patolojilerinin şekillendiği durumların ayırt edilmesi mümkün olmamaktadır. Fazla sayıda koyuna sahip sürülerde radyografi ile görüntüleme tekniği pratik olmamakla birlikte, ultrason cihazının olmadığı yerlerde bireysel muayeneler için kullanılmaktadır.

Palpasyon dendiğinde, rektal abdominal palpasyon (Hulet, 1972), abdominal palpasyon ve ballotement tekniği (Pratt ve Hopkins, 1975) ve laparotomi yöntemiyle uterusun palpasyonu (Lamond, 1963) anlaşılmaktadır. Gebeliğin 60 ile 90. günleri arasında yapılan palpasyonun düşük spesifite ve hassasiyete sahip olduğu rapor edilmiştir (Trapp ve Slyter, 1983). Palpasyon basit, ucuz ve hızlı olmasına rağmen düşük seviyede doğruluğa sahip olması ve uygulamadan doğabilecek rektal yaralanma (Tyrrell ve Plant, 1979) ve abort risklerinden dolayı (Turner ve Hindson, 1975) elverişli bir teknik değildir.

Vaginal biyopsi ile gebelik teşhisi, gebeliğin 40. gününden sonra %97 doğrulukla sonuç vermektedir (Richardson, 1972). Bu yöntemle fetüs sayısı hakkında herhangi bir bilgi elde edilmemektedir. Bu teşhis yöntemi yüksek oranda doğru sonuç vermesine rağmen, saha şartlarında uygulanabilirliği pratik ve ekonomik değildir (Ishwar, 1995).

Rosette inhibisyon testi, gebe koyunların kan serumlarında erken gebelik faktörünün tespitine dayanan bir yöntemdir (Morton ve ark., 1979). Bu yöntem ile çiftleşmeden sonra 24 saat içerisinde gebelik teşhisi yapılabilmektedir fakat oldukça karmaşık bir prosedüre sahip olması pratikteki kullanımını elverişsiz kılmaktadır.

Gebelik teşhisi için farklı hormon ölçümüne dayanan yöntemler, kanda veya sütte progesteron konsantrasyonu ölçümü (Robertson ve Sarda, 1971), kanda östron sülfat ölçümü (Tsang, 1978) ve ovine koryonik somatomotropin (ovCS) veya ovine plasental laktojen (ovPL) ölçümünden (Chan ve ark., 1978) oluşmaktadır.

### **2.3.1 Gebelik Teşhisinde RIA Yönteminin Kullanılması**

Post-ovulasyon 18. gününde kanda progesteron konsantrasyonu, *enzyme immunoassay* (EIA) (Amezcuca-Moreno, 1988; Susmel ve Piasentier, 1992) ve RIA (Zarkawi, 1997) yöntemleriyle ölçülerek gebelik teşhisi yapılmıştır. Kan, süt ve idrar örneklerinde ölçüm yapılabilmesi için, hassas RIA yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla, antiserum olarak, tek türden elde edilmiş, aynı moleküler ağırlığa sahip PAG'lar kullanılarak homolog RIA yöntemleri ile farklı türlerden veya farklı moleküler ağırlıktaki PAG'lar kullanılarak heterolog RIA yöntemleri ortaya konmuştur. Östron sülfat koyunlarda plasentadan salgılanmaktadır. Gebeliğin 70. gününden sonra kan plazmasında östron sülfat varlığının tespit edilmesine dayalı gebelik teşhisinin yapılabildiği bildirilmiştir (Tsang, 1978). Bu yöntemler hidrometra, piyometra, erken embriyonik ölüm ve kalıcı CL gibi patolojik durumlarda yanlış pozitif sonuç verebilmektedir. Gebelik teşhisi için kanda ovine plasental laktojenlerin RIA metoduyla ölçümü Chan ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Chan ve ark., 1978). Bu yöntemle gebeliğin 64. gününde gebelik teşhisi %97 oranıyla, gebe olmayanların teşhisi ise %100 oranla ortaya konmuştur (Robertson ve ark., 1980).

### **2.3.2 Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Kullanılması ile Gebelik Teşhisi**

Son dönemde koyunların gebelik teşhisinde, gebelikle ilişkili proteinlerden faydalanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla gebeliğe spesifik protein B (ovPSPB) (Ruder ve ark., 1988) ve gebelikle ilişkili glikoproteinlerin (ovPAGs) (Ranilla ve ark., 1994) ölçümü kullanılmıştır. Kan plazmasında ovPSPB konsantrasyonunun ölçümü için RIA metodu Willard ve arkadaşları tarafından 1987 yılında geliştirilmiştir (Willard ve ark., 1987). Kanda ovPSPB konsantrasyonu gebeliğin 19. gününde (Willard ve ark., 1987; Willard ve ark., 1995) ve 21. gününde (Wallace ve ark., 1997) ölçülmüştür. Willard ve arkadaşları tarafından 1995 yılında yayımlanmış çalışmada, gebeliğin 60. gününden 129. gününe kadar ovPSPB konsantrasyonu ölçümü sırasıyla, %71 ve %81 doğruluk

oranında yapılabilmektedir (Willard ve ark., 1995). OvPSPB konsantrasyonunun fetüs cinsiyeti ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Wallace ve ark., 1997).

Koyunlarda ovPAGs gebeliğin 3. haftasında tespit edilmiştir (Ranilla ve ark., 1994). Çalışmada ovPAGs konsantrasyonunun, gebeliğin 3. haftasından doğuma kadar giderek arttığı gözlenmiştir. Kanda ovPAGs konsantrasyonu ölçümü için homolog RIA yöntemi El Amiri ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (El Amiri ve ark., 2003; El Amiri ve ark., 2004).

Gebe koyunlardan toplanan kan örneklerinin plazmalarında ovPAGs konsantrasyonu heterolog RIA yöntemiyle gebeliğin 18. gününde tespit edilmiştir (Barbato ve ark., 2009). Bu çalışmada iki farklı RIA metodu kullanılmıştır. Bunlar RIA-706 (Perényi ve ark., 2002) ve RIA-srPOOL olarak adlandırılmıştır. RIA-srPOOL yönteminde keçilerden elde edilmiş farklı moleküler ağırlıklara sahip iki ayrı PAG ile koyunlardan elde edilmiş farklı moleküler ağırlıklara sahip üç farklı PAG karıştırılarak antiserum olarak kullanılmıştır (Barbato ve ark., 2009). Gebeliğin 18. gününde ovPAG konsantrasyonu ölçümüne dayalı RIA-706 metoduyla gebelik teşhisi 43 hayvandan 26'sında (%60,5), RIA-srPOOL metoduyla 43 hayvandan 41'ine (%95,3) yapılabilmektedir. Gebelik teşhisi için her iki RIA metodunun da gebeliğin 24. gününden itibaren %100 güvenilirlikle kullanılacağı bildirilmiştir (Barbato ve ark., 2009).

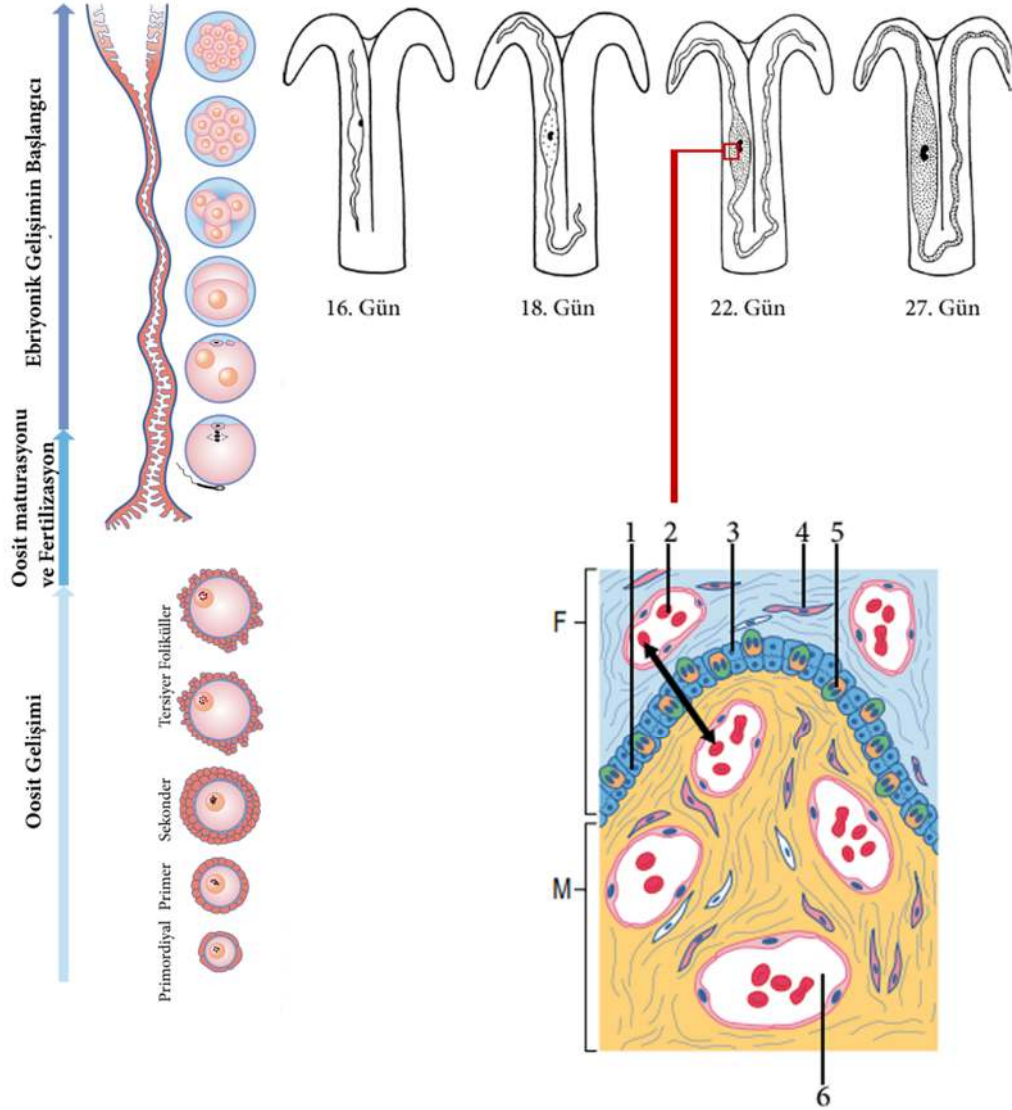
El Amiri ve arkadaşları 4 farklı RIA metoduyla kan ve süt örneklerinden ovPAG konsantrasyonu ölçtüklerini bildirmişlerdir (El Amiri ve ark., 2015). Bu çalışmada tracer olarak RIA-1 ve RIA-3'te, koyunlardan elde edilmiş PAG'lar, RIA-2 ve RIA-4'te sığırlardan elde edilmiş PAG'lar kullanılmıştır. Tüm RIA metodlarında antiserum olarak, koyunlardan elde edilmiş farklı moleküler ağırlıklara sahip PAG'lar kullanılmıştır. Kanda PAG konsantrasyonu gebeliğin 20. gününde 4 RIA metoduyla da tespit edilmiştir. Sütte ise PAG konsantrasyonu gebeliğin 28. gününde RIA-2, RIA-3 ve RIA-4 metodlarıyla tespit edilmiştir. Bu yöntemlerle kanda ve sütte gebelik teşhisi hassasiyetin %100 olduğu El Amiri ve arkadaşları tarafından paylaşılmıştır (El Amiri ve ark., 2015).

## 2.4 Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Tanımı ve Önemi

Gebelikle ilişkili glikoproteinler, sadece gebelik döneminde üretilen moleküllerdir. PAG'ların, plasentomlardan purifikasyonu ve maternal kandan tespiti, üç farklı çalışma grubu tarafından, identifikasyon çalışmaları ile sağlanmıştır. PAG'lar, embriyonik gelişim esnasında meydana gelen bir takım değişiklikler sonucunda, erken gebelik döneminden itibaren plasentomda bulunan binükleik trofoblastik hücreler tarafından üretilir. Gebeliğin farklı dönemlerinde farklı moleküler ağırlıklarda üretilen bu glikoproteinler, periferal kanda da tespit edilebilmektedir (**Şekil 1<sup>1</sup>**) (Butler ve ark., 1982; Sasser ve ark., 1986; Zoli ve ark., 1991; Zoli ve ark., 1992; Mialon ve ark., 1993; Mialon ve ark., 1994).

---

<sup>1</sup>Şekiller Essential of Domestic Animals Embryology @ Saunders Elsevier kitabından alınarak modifiye edilmiştir.



**Şekil 1.** Sinepiteliyokoriyal Plasental Bariyeri Oluşumu: **F:** Fötal komponent; **M:** Maternal komponent; **1:** Endometriyal epitelyum; **2:** Fötal damarlar; **3:** Trofoblast; **4:** Mezenşim; **5:** Binükleik Hücreler; **6:** Maternal damarlar

PAG'lar aspartik proteinaz ailesine ait protein grubudur. (Zoli ve ark., 1991; Beckers ve ark., 1994; Xie ve ark., 1994) Ruminantlarda, PAG gen ailesi oldukça geniş ve karmaşıktır. Sığır, koyun, keçi, bizon, manda ve geyik plasentalarından düzinelerce farklı cDNA'lar ve çok sayıda varyant klonlanmıştır (Szafranska ve ark., 1995; Xie, ve ark., 1997; Garbayo ve ark., 1998; Garbayo ve ark., 2000; Green ve ark., 2000; El Amiri ve ark., 2004; Brandt ve ark., 2007; Barbato ve ark., 2008; Kiewisz ve ark., 2009; Telugu ve ark., 2009; Nguyen ve ark., 2012; Barbato ve ark., 2013; Bériot ve ark., 2014). Ruminantlarda PAG gen ailesi evrimsel olarak farklı iki gruptan oluşur

(Green ve ark., 2000; Hughes ve ark., 2000; Hughes ve ark., 2003). Her grubun oluştuğu zamana dayanarak, filogenetik açıdan PAG'lar antik grup - PAG-2 (87 milyon yıl önce ortaya çıktığı speküle edilmiştir) ve modern grup - PAG-1 (52 milyon yıl önce ortaya çıktığı speküle edilmiştir) olarak tanımlanmıştır (Green ve ark., 2000; Telugu ve ark., 2009; Hughes ve ark., 2000; Wooding ve ark., 2005). Bovine PAG-2, bovine PAG-1 ile birlikte, trofektoderimde bir arada bulunur (Green ve ark., 2000; Wooding ve ark., 2005; Garbayo ve ark., 2008; Wallace ve ark., 2015) ve işlevleri tam olarak anlaşılmamıştır (Garbayo ve ark., 2008; Sousa ve ark., 2002). PAG-1, hem interkotiledoner hem de kotiledon korionun binükleik hücrelerinde üretilirken, PAG-2 molekülleri hem mononükleik hem de binükleik trofoblastik hücreler tarafından üretilir (Touzard ve ark., 2013). PAG'ların çoğu modern gruba aittir ve bunlar sadece ruminantlarda gözlenmiştir (Telugu ve ark., 2009; Wallace ve ark., 2015). Bu glikoproteinlerin işlevleri henüz tam olarak anlaşılmamasına rağmen, gebelik teşhisinde ve plasental/föetal prognozun bir belirteci olarak plazma PAG-I konsantrasyonları kullanılmaktadır (Garbayo ve ark., 1998; Wallace ve ark., 2015; Zoli ve ark., 1992; Szenci ve ark., 1998; Barbato ve ark., 2009; El Amiri ve ark., 2015).

Gebelik teşhisi için farklı metotlar geliştirilmiştir. Gebelik teşhisinin pratik olarak en doğru ve en erken zamanda yapılabilmesi, RIA metoduyla ovPAG tespiti ile mümkün olabilmektedir. Bu tezde Karacabey merinosu ırkı koyunlarda RIA metoduyla kanda ovPAG ölçümüne dayalı erken gebelik teşhisi, güncel literatürlerde belirtilen zamandan daha önce yapılabilirliği ispatlanmaya çalışılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Koyunların Seçimi

Bu çalışmada, materyal olarak Türkiye' de Bursa ili Nilüfer ilçesine bağlı Görükle mahallesinde bulunan (40° 23' N, 28° 85' E) bir özel koyun çiftliğinden, T.C. Gıda Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Bursa İl Tarım ve Orman Müdürlüğü kayıtları esas alınarak 2-4 yaş aralığındaki multipar özellikte olan ve en son 4 ay önce doğum yapmış Karacabey merinosu ırkı koyunlar kullanıldı. Real-time B-mod transrektal ultrasonografik muayene yöntemiyle (Agroscan L modeli, 3.5, 5, 8 MHz) gebe olmadıkları teyit edilen 32 adet koyun çalışmaya dâhil edildi. Bu çalışma, 8 hafta örnek toplanması, 3 hafta RIA ölçümleri ve 2 hafta real-time PCR ölçümleri olmak üzere toplamda 13 haftada tamamlanmıştır.

#### 3.2 Koyunların Östrus Senkronizasyonu ve Çiftleştirilmesi

Senkronizasyon uygulamasına 2017 yılı mayıs ayında başlanmıştır. Gebe olmadıkları tespit edilen 32 adet koyuna, 20 mg flugestone acetate içeren Chronogest CR sünger (MSD, Animal Health) intravaginal sünger uygulaması yapıldı. Sünger uygulamasının yapıldığı gün 0. gün kabul edilerek 14 gün sonra süngerler çıkartılıp, her koyuna 3 ml (720 IU) PMSG hormonu (PMSG-Intervet 25 ml flakon, MSD, Animal Health) gluteal kaslardan intramuskuler olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan 36 saat sonra 4 adet koyun ile 1 adet koç bir bölmeye kapatılarak 24 saat aynı ortamda bırakıldı. Bu süre zarfında çiftleşmeleri izlendi ve çiftleşme zamanı kayıt altına alındıktan sonra çiftleşmiş olan koyun, koçun olmadığı sürüye dahil edildi. Geriye kalan koyunlar, PMSG enjeksiyonundan 60 saat sonra koçların yanından ayrılıp koçların olmadığı sürüye dahil edildi. Otuz iki adet koyundan 22 tanesi bu yöntemle çiftleştirildi. On adet koyun ise senkronizasyonu yapılmış fakat çiftleştirilmeden kontrol grubu olarak çalışmaya alındı.

#### 3.3 Örneklerin Toplanması

##### 3.3.1 Kan Örneklerinin Toplanması, İşlenmesi ve Transferi

Kan örnekleri 20 adet koyundan toplandı. Östrus senkronizasyonu yapılmış fakat çiftleştirilmeyen 10 adet koyun kontrol grubu olarak (KG; n=10); çiftleştirilen



22 adet koyundan seçilmiş 10 adet koyun da çalışma grubu olarak (ÇG; n=10) değerlendirildi. Geriye kalan 12 adet koyun da uterus dokusu örnekleri için kullanıldı.

Kan örneklerini toplamak amacıyla 10 ml'lik kırmızı kapaklı vakumlu tüpler ile 18G pembe renkli enjektör ucu kullanıldı. Koyunların çiftleştiği gün 0. gün kabul edilerek 0,10, 15, 16, 17, 18, 19 ve 20. günlerde kan örnekleri toplandı. Alınan her kan örneği, +4 °C sıcaklıkta 12 saat bekletildikten sonra, 4000 rpm devirde 3 dakika santrifüj (Elektro-Mag M4812) edilerek serumları ayrıştırılıp, 2 ml hacimde ependorf tüplerine aktarılarak -80 °C'de saklanmıştır. Kan örnekleri, her iki gruptaki 20 koyundan toplanmıştır. Çalışma grubu olarak belirlenen ve aşım yaptırılmış 10 koyunun gebelik tayini, çiftleşmeden sonraki 30. ve 40. günlerde real-time B-mod transrektal ultrason muayenesi ile teyit edildi.

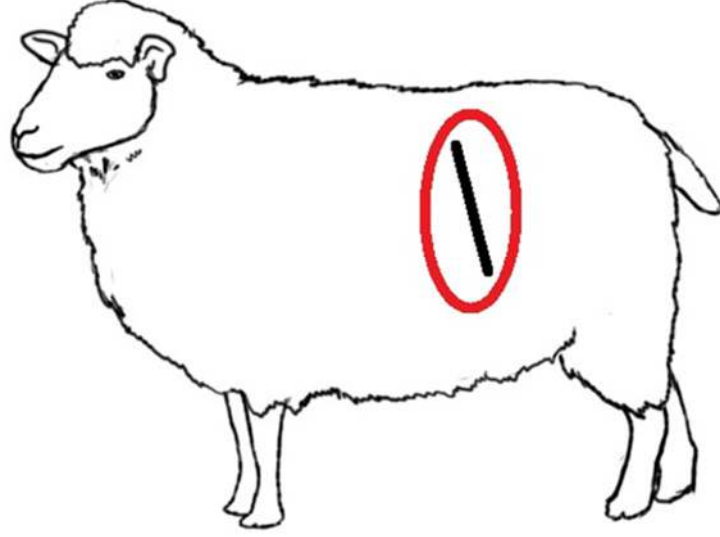
Bütün kan örnekleri, kuru buz (-78,5 °C) eşliğinde ısı yalıtımı özelliği bulunan strafor kutu içerisinde Perugia Üniversitesi-İtalya Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı laboratuvarına RIA ölçümlerini gerçekleştirebilmek için 18 saat içinde transfer edildi.

### **3.3.2 Uterus Dokusu Örneklerinin Toplanması, İşlenmesi ve Transferi**

Uterus doku örnekleri toplanması için belirlenen 12 adet koyundan her grupta 3 adet koyun olacak şekilde (n=3) 4 grup oluşturuldu. Koyunların çiftleştiği gün 0. gün kabul edilerek 1. gruptan 0. gün, 2. gruptan 14. gün, 3. gruptan 20. gün ve 4. gruptan 30. günde uterus örnekleri toplandı. Doku örneklerinin elde edilmesi için ovaryohistektomi operasyonu yapıldı (Oral ve Kuru, 2016). Bu uygulamalar, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim dalına ait büyük hayvan operasyon salonunda gerçekleştirildi.

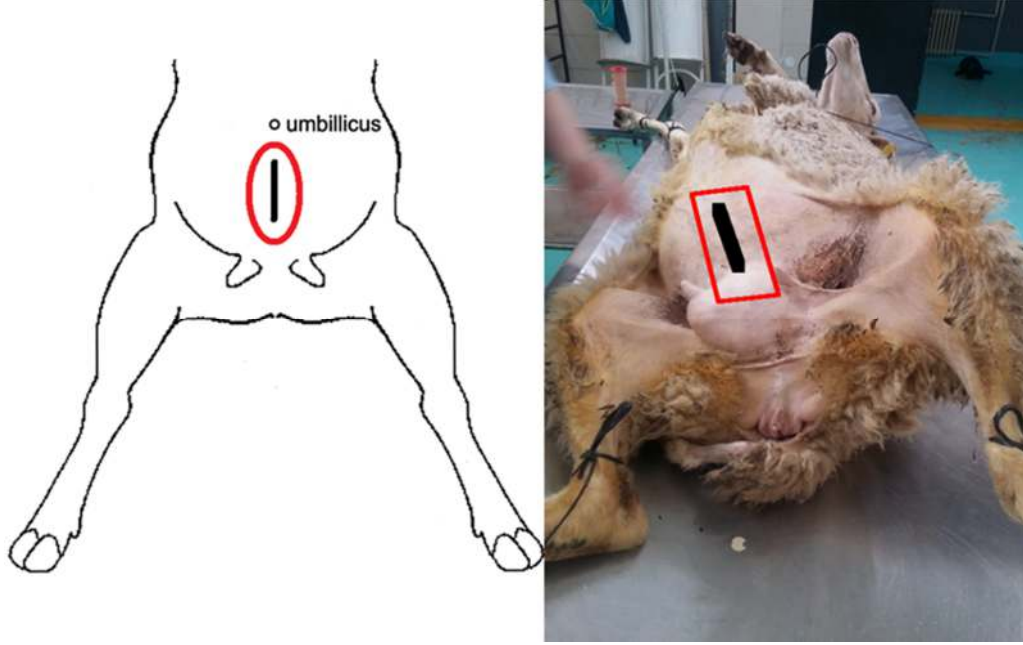
Uterus dokusu örnekleri toplanırken 1. gruptaki 3 adet koyunda 3 farklı operasyon bölgesi denendi. 1 gruptaki hayvanların operasyonları çiftleşmeden hemen sonra yapıldığı için henüz implantasyona dair bir oluşumun başlamamış olmasından dolayı operasyon bölgesini belirlemek adına elverişli olduklarına karar verildi. İşlem esnasında, implantasyon bölgelerine en az zarar verecek operasyon bölgesinin tespitinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Birinci gruptaki birinci koyuna sol fossa paralumbalis bölgesinden ensizyon hattı belirlenerek (**Şekil 2**) ovaryohisterektomi operasyonu yapıldı ve bu bölge uterusu uzak olduğu için yapılacak manipülasyonların implantasyon bölgesine hasar verebileceği düşüncesiyle uygun olmadığına karar verildi.



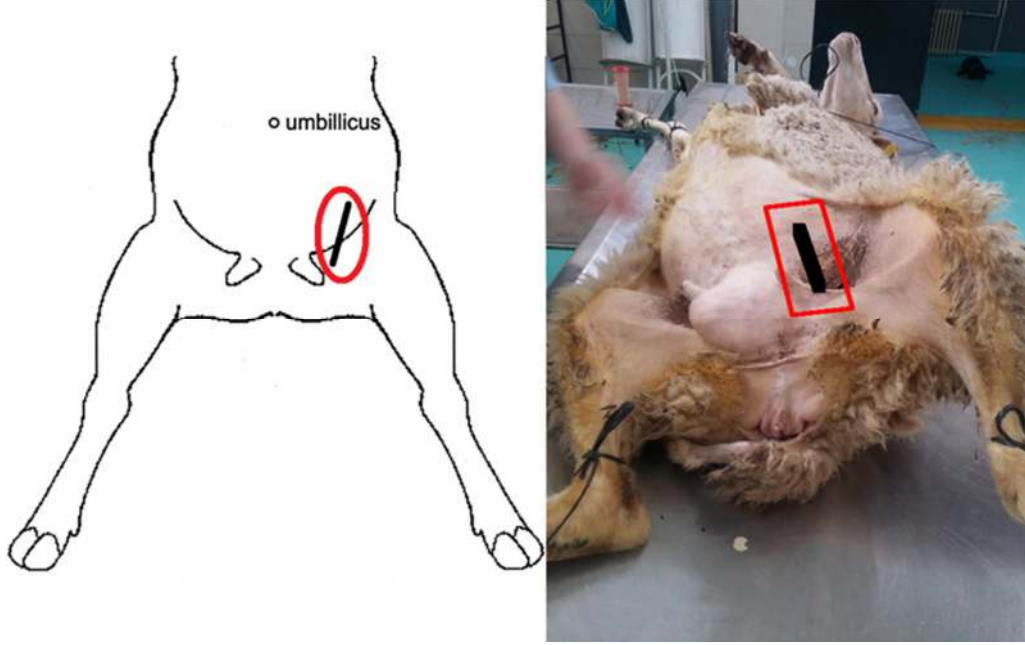
**Şekil 2.** Ensizyon bölgesi - Sol Fossa Paralumbalis

Ovaryohistektomi operasyonu için 1. gruptaki 2. koyuna ensizyon hattı linea alba (Şekil 3) belirlenerek median laparotomi uygulandı (Oral ve Kuru, 2016). Operasyon süreci ilk uygulamaya göre daha kolay olduğu ve manipülasyonların uterusu daha az zarar verdiği düşünülmüştür.



Şekil 3. Ensizyon bölgesi - Linea Alba

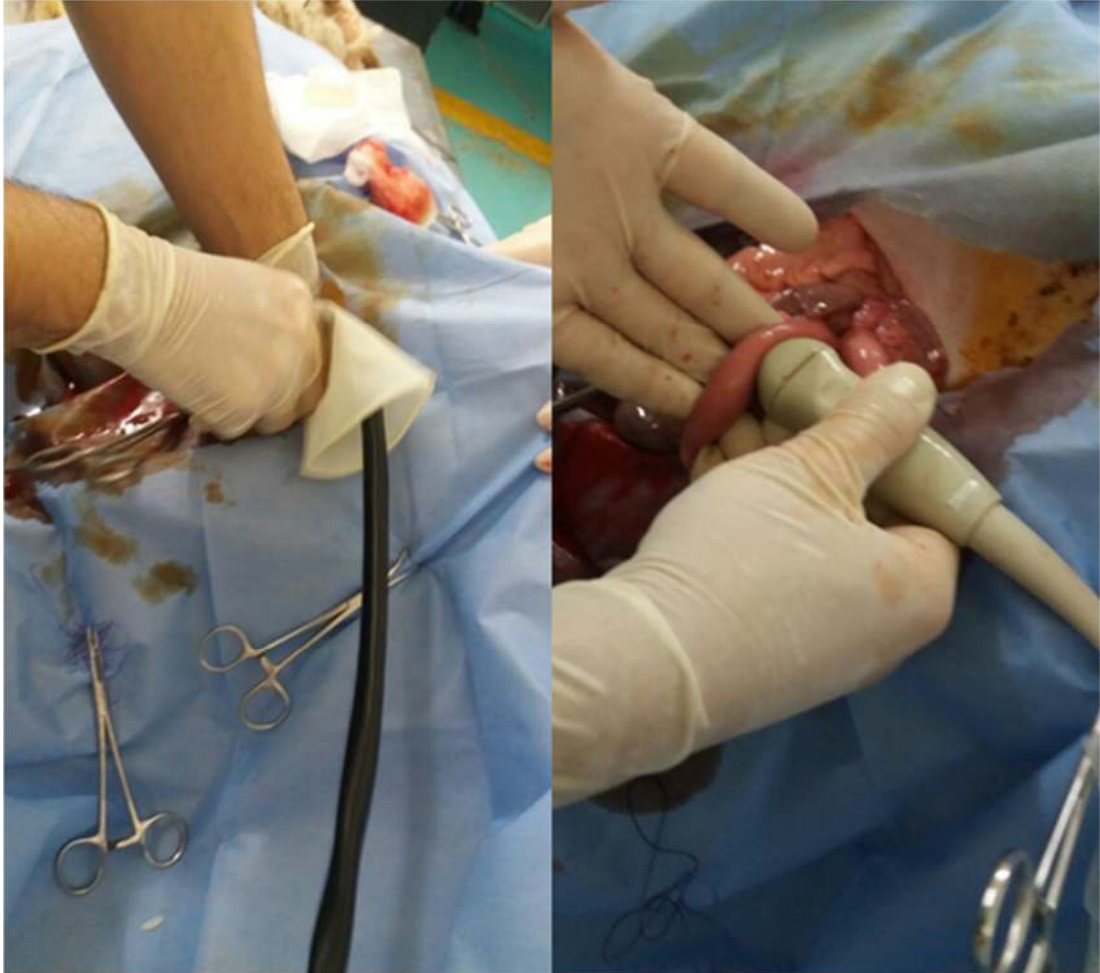
Ovaryohistektomi operasyonu için 1. gruptaki 3. koyuna ensizyon hattı inguinal bölgede seçilmiştir (**Şekil 4**). En elverişli manipülasyonun ve en az hasara neden olduğu düşünülerek, 2., 3. ve 4. gruptaki koyunların ovaryohistektomi operasyonları bu bölgeden yapılmaya devam edildi..



**Şekil 4.** Ensizyon bölgesi - İnguinal bölge

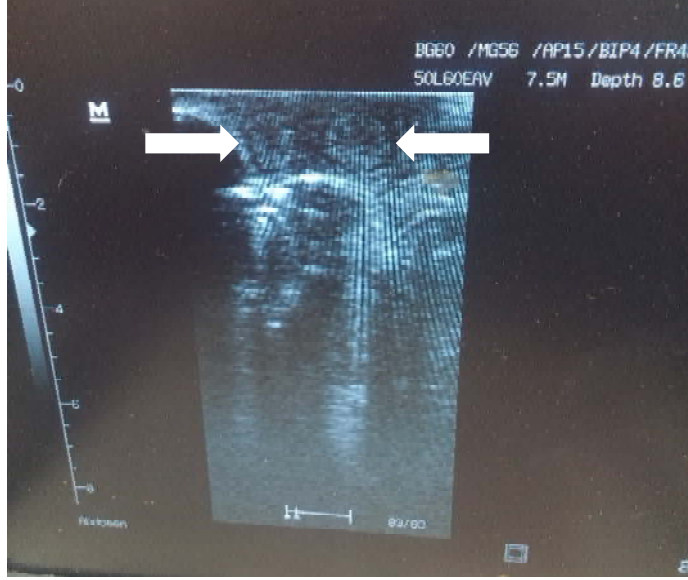
Uterus örneklerinin toplanması aşamasında, gebelik teşhisinin hassasiyetinden dolayı, iki adet ultrason cihazı; Mindray marka DP10Vet ve DP20Vet modelleri tercih edildi. DP10Vet modelinde lineer prob (7,5 MHz), DP20Vet modelinde ise konveks prob (8 MHz) kullanıldı.

Ovaryohistektomi operasyonu esnasında doku örneği alınmadan önce laparatomik ultrasonografi yöntemi ile uterus muayenesi yapılarak koyunların gebeliği teyit edildi (**Şekil 5**). Muayene esnasında **şekil 5**'te de görüldüğü gibi asepsi kuralına uyularak, prob steril operasyon eldiveni içerisinde kullanıldı. Uterus ensizyon hattından dışarıya çıkarıldıktan sonra yapılan ultrasonografi muayenesinde ise, kullanılan prob %90 oranında sulandırılmış bezalkonyum klörür ile dezenfekte edildikten sonra ultrason muayenesi gerçekleştirildi.



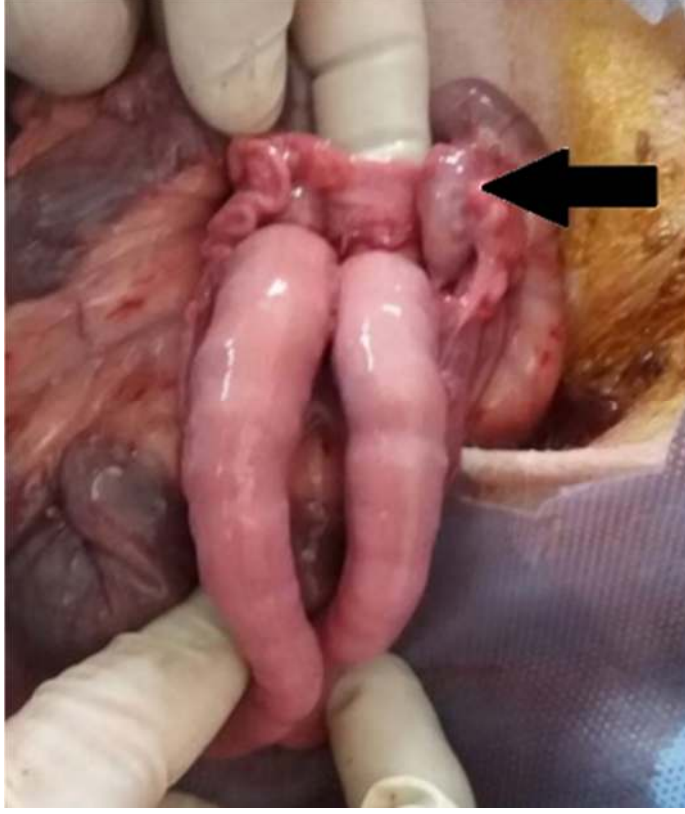
**Şekil 5.** Uterus dokusunun laparatomik ultrasonografi muayenesi

Birinci gruba ait koyunda, laparatomik ultrasonografi muayenesinde elde edilen ultrason görüntüsü **Şekil 6**' da gösterilmiştir. Oklar arasında belirtilen kornu uterileri gebe olmayan uterusu göstermektedir (**Şekil 6**).



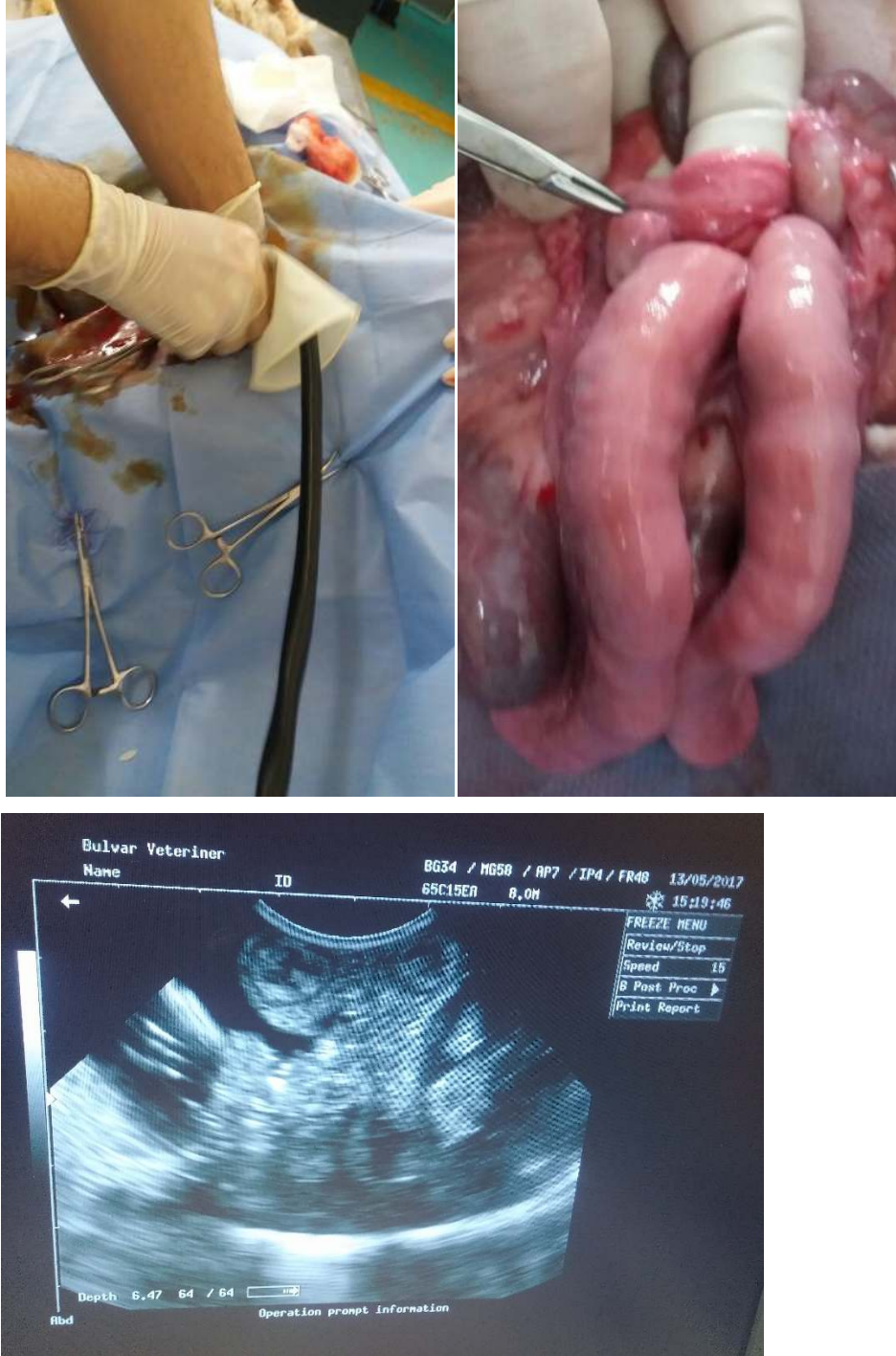
**Şekil 6.** Çiftleşmeden sonraki 0. günde uterusun laparatomik ultrasonografisi (oklar: kornu uteri)

Laparatomik ultrasonografi yöntemiyle uterus muayenesinden sonra genital organlar abdomen dışına çıkartılarak uterus ve ovaryumların morfolojik muayeneleri gözle yapıldıktan sonra (**Şekil 7**) ovaryohistektomi operasyonu gerçekleştirildi.



**Şekil 7.** Çiftleşmeden sonraki 0. günde uterus ve ovaryumların morfolojik muayenesi (ok: sol ovaryum)

İkinci gruba ait koyunlardan doku örnekleri post-inseminasyon 14. günde alındı. Ultrasonografi muayenesinden elde edilen görüntüler değerlendirilirken ovaryumlar üzerinde CL olup olmaması da dikkat edildi (Şekil 8).



Şekil 8. Post-inseminasyon 14. günde laparatomik ultrasonografi muayenesi ve uterusun morfolojik görüntüsü



Üçüncü gruba ait koyunların uterus dokuları post-inseminasyon 20. günde alındı. Operasyon öncesinde gebeliklerinin teyidi için transrektal ultrasonografik muayene yapılarak, gebelikleri doğrulanan koyunlardan doku örnekleri toplandı (Şekil 9). Post-inseminasyon 20. gündeki embriyolarda Şekil 10' da görülmektedir.



Şekil 9. Post-inseminasyon 20. günde uterusun transrektal ultrasonografisi

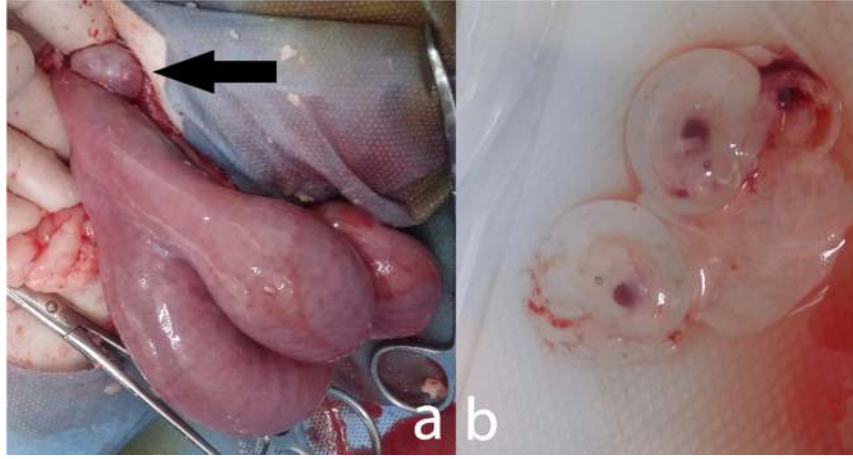


Şekil 10. Post-inseminasyon 20. günde oluşan embriyolar

Dördüncü gruba ait koyunların doku örnekleri post-inseminasyon 30. günde alındı. Operasyon öncesinde transrektal ultrasonografik muayene yapılarak gebelikleri doğrulanan koyunlardan doku örnekleri toplandı (**Şekil 11**). Post-inseminasyon 30. gündeki uterus görüntüsü ve sol ovaryum üzerinde bulunan CL ile oluşan embriyolar **Şekil 12**' de görülmektedir.



**Şekil 11.** Post-inseminasyon 30. günde uterusun laparatomik ultrasonografisi



**Şekil 12.** Post-inseminasyon 30. günde (a) Uterusun laparatomik görüntüsü, Siyah ok: Korpus Luteum, CL; (b) Oluşan embriyolar

Uterus doku örnekleri 1 x PBS Buffer (Phosphate Buffered Saline) içerisine alınarak 250 ml beher glas ile laboratuvara sevk edildi.

1 x PBS Buffer Hazırlanışı:

800 ml distile su içerisine;

- 8 g Sodyum Klorür (NaCl: Merck®)
- 0,2 g Potasyum Klorür (KCl: Merck®)
- 1,44 g Disodyum Hidrojen Fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Merck®)
- 0,24 g Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Merck®) eklendi.

Elde edilen solüsyonun üzerine distile su eklenerek solüsyonun toplam hacmi 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan solüsyona 2M HCl veya 4N NaOH ekleyerek pH değeri 7,4 olacak şekilde ayarlandı (Mettler Toledo, SevenEasy S20).

Uterus örnekleri 1x1x1 cm olacak şekilde trimlendikten sonra 2'şer numune olacak şekilde falkon tüpleri içerisinde hazırlanan paraformaldehit solüsyonu içerisinde 24 saat +4 °C'de fiksasyona bırakıldı.

Paraformaldehit (PFA) Hazırlanışı:

950 ml distile su içerisine;

- 40 g Paraformaldehit (Merck®)
- 50 ml 20xPBS
- 500 µl 1,25 m NaOH

Elde edilen karışım kimyasalların çözünüp homojen hale gelene kadar 55-60 °C sıcaklıkta karıştırıldı. Hazırlanan solüsyona 2M HCl veya 4N NaOH ekleyerek pH değeri 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Bu solüsyon 50 ml hacimli plastik falcon tüplere doldurularak doku fiksasyonu için kullanıldı.

Fiksasyon sonrasında tüm doku örnekleri 1xPBS ile muamele edilerek +4 °C sıcaklıkta 24 saat süresince yıkamaya bırakıldı. Takibinde sırasıyla, %30, %50, %70'lik dereceli alkol serisinin her birinde +4 °C sıcaklıkta 24 saat bekletildi. Doku örnekleri histolojik kasetlere yerleştirildikten sonra 1'er saat oda sıcaklığında sırasıyla %80, %90, absolut alkol-1, absolut alkol-2, ksilol-1 ve ksilol-2 serisinden geçirildi.

Tüm kasetler likit parafinde 2 saat bekletildikten sonra parafine gömülerek bloklandı. Tüm bloklar çalışma zamanına kadar -20 °C de depolandı..

Kullanılan solüsyonlar sırasıyla;

- %30 Etil Alkol (700 ml Distile Su + 300 ml absolute  $\geq 99,8$  % (SIGMA-ALDRICH®)
- %50 Etil Alkol (500 ml Distile su + 500 ml absolute  $\geq$  % 99,8 SIGMA-ALDRICH®)
- %70 Etil Alkol (300 ml Distile Su + 700 ml absolute  $\geq$  % 99,8 SIGMA-ALDRICH®)
- %80 Etil Alkol (200 ml Distile Su + 800 ml absolute  $\geq$  % 99,8 SIGMA-ALDRICH®)
- %90 Etil Alkol (100 ml Distile Su + 900 ml absolute  $\geq$  % 99,8 SIGMA-ALDRICH®)
- %100 Etil Alkol (absolute  $\geq$  % 99,8 SIGMA-ALDRICH®)
- %100 Ksilol (SIGMA-ALDRICH®)
- Parafin Granül

### 3.4 Kan Serumunda RIA Yöntemiyle Gebelikle İlişkili Glikoprotein Konsantrasyonunun Ölçümü

RIA ölçümleri İtalya'da bulunan Perugia Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalında yapılmıştır. Toplanan kan serum örneklerinden ovPAG konsantrasyonu 6 farklı RIA yöntemiyle ölçüldü.

Bütün RIA ölçümlerinde standart ve tracer olarak boPAG<sub>67kDa</sub> kullanılmıştır (Zoli ve ark., 1991; Zoli ve ark., 1992). Ölçümlerde oluşan standart eğri, 0.2 - 25 ng/ml arasında ölçeklendirildi. Radyoaktif iyodinasyonda (Na- <sup>125</sup>I; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, İsveç), kloramin T yöntemine göre uygulandı (Greenwood ve ark., 1963).

Bütün RIA ölçümlerinde kullanılan antiserumlar ve konsantrasyonları **Tablo 1**'de gösterilmiştir. RIA-497 ve RIA-860 ölçüm yöntemlerinde homolog antiserumlar tercih edilirken diğer yöntemlerde heterolog antiserumlar kullanıldı. RIA-srPool ölçüm yönteminde küçük ruminantların başlıca antiserumlarından 4 tanesi ile bir

havuz oluşturulurken RIA-wbPool ölçüm yönteminde de mandalardan elde edilmiş 3 farklı antiserum ile bir antiserum havuzu oluşturuldu.

**Tablo 1.** Uygulanan RIA yöntemleri ile bu yöntemlerde kullanılan antikorlar ve dilüsyonları

RIA	Anti-Serum	Birincil Antikor	Dilüsyon
RIA-497	AS#497	anti-boPAG <sub>67</sub>	1/75000
RIA-706	AS#706	anti-caPAG <sub>55+62</sub>	1/75000
RIA-780	AS#780	anti-ovPAG <sub>57+59</sub>	1/50000
RIA-860	AS#860	anti-wbPAG <sub>73</sub>	1/380000
RIA-srPool	AS#706	anti-caPAG <sub>55+62</sub>	1/30000
	AS#708	anti-caPAG <sub>55+59</sub>	1/30000
	AS#780	anti-ovPAG <sub>57+59</sub>	1/30000
	AS#809	anti-ovPAG <sub>55</sub>	1/30000
RIA-wbPool	AS#858	anti-wbPAG <sub>76_D</sub>	1/160000
	AS#859	anti-wbPAG <sub>65_E</sub>	1/160000
	AS#860	anti-wbPAG <sub>58</sub>	1/160000

PAG konsantrasyonlarının ölçümü Perényi ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda göre yapıldı (Perényi ve ark., 2002). Bu yöntemde göre, total aktiviteyi ölçmek için 2 tüp (TA), standardizasyonu yapmak için 2 tüp (*Non specific bound tube* -NSB), standart eğri ölçümü için 9 farklı gruba ait 2'şer tüp (C<sub>0</sub> – C<sub>8</sub>) ve her bir örnek için 2'şer tane test tüpleri kullanıldı. **Tablo 2'** de belirtildiği gibi, ilgili tüplere sırasıyla TRIS-BSA Buffer (*bovine serum albumin*, BSA), serum örnekleri, standart olarak boPAG<sub>67kDa</sub>, serum-free PAG ve birincil antikorlar eklendikten sonra vorteks yardımıyla tüplerdeki karışımlar homojen hale getirildi. Tüplerin üzerleri parafin bant ile kapatılarak çeker ocak altında ve oda sıcaklığında 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra her tüpe 100 µl radyoaktif iyot ile işaretlenmiş I<sup>125</sup>-PAG (yaklaşık 25000 cpm) ilave edilerek vorteks ile karışım homojenize edildikten sonra, oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakıldı. Serbest ve bağlanmış fraksiyonların ayrıştırılması için her tüpe 100 µl ikincil antikorlu polietilen glikol (PEG) solüsyonu ilave edildi. Bu karışımda oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra tüplere 2'şer ml TRIS-BSA buffer ilave edildi. Onbeş dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, üstte kalan süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Son yıkama işlemi içinde tüplere 3'er ml TRIS-BSA buffer ilave edilerek 3000 rpm'de 10 dakika

santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırılarak tüplerde sadece radyoaktif PAG içeren pelet kısım bırakıldı. Peletlerde bulunan radyoaktivite ölçümüne dayalı PAG konsantrasyonlarının ölçümü için bütün tüpler gamma counter cihazına (Cobra II AutoGamma; Packard, Milan, Italy) yüklendi. Bütün uygulamalar aynı kişi tarafından yapıldı.

**Tablo 2.** RIA ölçüm yönteminde uygulanan protokol

#	Solüsyonlar	TA (x2tüp)	NSB (x2tüp)	C <sub>0</sub> (x2tüp)	C <sub>1</sub> (x2tüp)	C <sub>2</sub> (x2tüp)	C <sub>3</sub> (x2tüp)	C <sub>4</sub> (x2tüp)	C <sub>5</sub> (x2tüp)	C <sub>6</sub> (x2tüp)	C <sub>7</sub> (x2tüp)	C <sub>8</sub> (x2tüp)	Örnekler (x2tüp)
1.	TRIS-BSA	-	300µl	200µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	200 µl
2.	Serum Örnekleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100 µl
3.	Standart	-	-	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	-
4.	Serum Free PAG	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	-
5.	Birincil Antikorlar	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
6.	Oda Sıcaklığında 24 saat İnkübasyon												
7.	Radyoaktif PAG- <sup>125</sup> I	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
8.	Oda Sıcaklığında 4 saat İnkübasyon												
9.	PEG sol.	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
10.	Oda Sıcaklığında 30 dakika İnkübasyon												
11.	TRIS-BSA ile yıkama	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
12.	3000 rpm 15 dakika santrifüj												
13.	TRIS-BSA ile yıkama	-	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
14.	3000 rpm 10 dakika santrifüj												
15.	Süpernatantın uzaklaştırılması ve Gamma Counter' da okuma												

#### TRIS-BSA Buffer Hazırlanışı:

4 litre distile su içerisine;

- 8 g Magnezyum Klorit 6-Hidrat (MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O: SIGMA-ALDRICH®)
- 12 g TRIS Hidroksimetil Amino Metan (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>: SIGMA-ALDRICH®)
- 0,8 g Sodyum Azit (NaN<sub>3</sub>: SIGMA-ALDRICH®) eklenerek manyetik karıştırıcıda homojenize olana kadar karıştırıldı.

Elde edilen karışımın pH değeri 7.5 olacak şekilde ayarlanarak 1000 ml TRIS içerisine 1 g BSA ilave edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

İkincil Antikorlu PEG Hazırlanışı:

- İkincil Antikor
  - 0.17% v:v normal tavşan serumu
  - 0.83% v:v koyun anti-tavşan antiserumu
- 0,25 g Mikrokristalin Selüloz
- 2 g BSA (Bovine Serum Albumin)
- 20 g polietilen glikol 6000 (SIGMA-ALDRICH®)
- TRIS Hidroksimetil Amino Metan (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>: SIGMA-ALDRICH®)  
Bu karışıma renklendirici olarak birkaç damla metilen mavisi ilave edilerek manyetik karıştırıcıda homojenize olana kadar karıştırıldı.

### **3.5 Uterus Dokusunda Real-Time PCR Yöntemiyle Gebelikle İlişkili Glikoprotein Konsantrasyonunun Ölçümü**

#### **3.5.1 Parafin Dokudan RNA İzolasyonu**

Parafinde bloklanmış uterus örneklerinden 10 µm'lik kesitler alınıp doku çevresindeki fazla parafin elle uzaklaştırılarak, 2 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. Parafinin dokudan uzaklaştırılabilmesi için, kesitler üzerine 1 ml ksilen eklenerek 1 dakika boyunca vortekslendi. Ependorf tüpler 50 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Dipte oluşan pelete zarar vermeden ksilen dikkatlice uzaklaştırıldı. Kalan ksilenin uzaklaştırılması için de 100% etanol ile yıkama işlemi yapıldı. Bu amaçla 1 ml etanol tüplere eklenerek 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra, etanol pelete zarar vermeden ortamdan uzaklaştırıldı. Etanol ile yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildikten sonra, tüpler ağızları açık bir şekilde termobloklarda 30°C'de 10 dakika bekletilerek etanolün dokulardan tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Her tüpe 300 µl parçalama solüsyonu (Digestion Buffer) ve 10 µl Proteinase K solüsyonu eklenerek vortekste homojenize edildi. Önce 55 °C'de 15 dakika sonra 80 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Her bir tüpe, guanidin tuzu içeren solüsyondan (Buffer RL), 300 µl ilave edilerek vortekslendi. Son olarak da 600 µl 100% etanol ilave edilerek tekrar vorteks ile homojenizasyon sağlandı. Toplama tüplerine

yerleştirilen kolonlara 600 µl'lik lizat yüklenerek, 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Takibinde, DNAaz enzimi ile muamele edilerek, örneklerde bulunan DNA elimine edildi. Onbeş mikrolitre DNAase-I ile 100 µl Enzim inkübasyon solüsyonu örneklerin üzerine eklendi. Vortekslemeden hafifçe karıştırıldıktan sonra, üzerine 400 µl yıkama solüsyonu eklenerek 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra 14000 rpm'de 1 dakika daha santrifüj edildi. Bütün örneklere 15µl DNAase-I ile 100 µl Enzim inkübasyon buffer tekrar ilave edilerek 14000 rpm'de 2 dakika daha santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 30°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

Kolon yıkaması için ise, yıkama solüsyonundan 400 µl eklenerek 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı. Kolonun kuruması için 14000 rpm'de 2 dakika ilave santrifüj uygulandı.

Kolonlar elüsyon tüplerine aktarılıp, 50 µl nükleik asit yıkama solüsyonu (Elüsyon buffer) eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Elüsyon tüpleri önce 2000 rpm'de 2 dakika, sonra 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra total RNA izolasyonu tamamlandı. Elde edilen total RNA'nın spektrofotometre ile (Thermo Scientific Nanodrop 2000) saflığı ve konsantrasyonu ölçüldü. RNA ölçüm sonuçları **Tablo 3**'te verilmiştir.

**Tablo 3.** RNA Ölçüm Sonuçları

Örnek	Tarih	Nükleik Asit Konsantrasyonu	A260	A280	260/280	260/230
1A	14.11.17	73.9 ng/µl	1.847	0.912	2.03	1.62
2A	14.11.17	99 ng/µl	2.476	1.257	1.97	1.73
3A	14.11.17	61.6 ng/µl	1.54	0.783	1.97	1.39
4A	14.11.17	63.6 ng/µl	1.59	0.797	1.99	1.5
5A	14.11.17	61.3 ng/µl	1.532	0.781	1.96	1.42
6A	14.11.17	59.5 ng/µl	1.488	0.763	1.95	1.42
7A	16.11.17	120.4 ng/µl	3.01	1.629	1.85	1.2
8A	16.11.17	108.9 ng/µl	2.723	1.375	1.98	1.59
9A	16.11.17	106 ng/µl	2.65	1.407	1.88	1.19
10A	16.11.17	294.3 ng/µl	7.358	3.701	1.99	1.94
11A	16.11.17	142.9 ng/µl	3.573	1.829	1.95	1.53
12A	16.11.17	163.2 ng/µl	4.079	2.097	1.95	1.56
13A	16.11.17	101.3 ng/µl	2.532	1.285	1.97	1.57
13C	17.11.17	151.5 ng/µl	3.786	1.913	1.98	1.63



### 3.5.2 RNA'nın cDNA'ya Yazdırılması

Tek iplikçikli RNA'dan (single-stranded RNA), çift iplikçikli DNA (double-stranded DNA) oluşturulması için, nükleik asit konsantrasyonu belirlendikten sonra, cDNA'ya yazdırılan RNA'nın her örnekte 100ng/20µl'lik eşit konsantrasyonda olabilmesi için, RNA örnekleri otoklavlanmış distile su ile sulandırıldı. Tüm örnekler, ölçülen RNA konsantrasyonuna göre, toplamda 15 µl olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırma miktarları **Tablo 4**'te verilmiştir.

**Tablo 4.** RNA Konsantrasyonuna Göre Sulandırma Miktarları

Örnek	RNA konsantrasyonu (ng/µL)	cDNA'da RNA miktarı (100 ng/20µl)	H <sub>2</sub> O - 15 µL
1A	73.9	1.4	13.6
2A	99	1.0	14.0
3A	61.6	1.6	13.4
4A	63.6	1.6	13.4
5A	61.3	1.6	13.4
6A	59.5	1.7	13.3
7A	99	1.0	14.0
8A	99	1.0	14.0
9A	99	1.0	14.0
10A	99	1.0	14.0
11A	99	1.0	14.0
12A	99	1.0	14.0
13A	101.3	1.0	14.0
13C	99	1.0	14.0

Onbeş mikrolitreye tamamlanan sulandırılmış RNA üzerine, her bir örnek için 4µl 5XReaksiyon karışımı ve 1µl reverse transkriptaz enzimi eklenerek (Biorad iCycler - Norgen Biotek Corp., FFPE RNA Purification Kit Cat.# 25300) PCR cihazında 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 30 dakika, 85°C'de 5 dakika reaksiyonlarından sonra cDNA yazımı 4°C'de tamamlandı.

### 3.5.3 Pre-Amplifikasyon ve Real-Time PCR

Preamplifikasyon aşaması, hedef PCR ürününü ve real-time PCR'ın hassasiyetini artırmak için uygulandı. Bu amaçla, elde edilen cDNA'lar 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra, her bir örnek için 5µl cDNA, 10 µl PCR reaksiyon karışımı,

4µl H<sub>2</sub>O, 1µl primer karışımı (reverse+forward primer) ile 15µl'lik son hacime ulaşıldı. Uygulanan termal program; 95°C'de 3 dakika ve 95°C'de 15 saniye, 58°C'de 4 dakikalık 12 amplifikasyon siklusu olarak uygulandı.

**Tablo 5.** Real-Time PCR İçin Hazırlanan Plate Şablonu

0. Gün			14. Gün			20. Gün			30. Gün		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1A	1A	1A	4A	4A	4A	8A	8A	8A	11A	11A	11A
1A	1A	1A	4A	4A	4A	8A	8A	8A	11A	11A	11A
2A	2A	2A	5A	5A	5A	9A	9A	9A	12A	12A	12A
2A	2A	2A	5A	5A	5A	9A	9A	9A	12A	12A	12A
3A	3A	3A	6A	6A	6A	10A	10A	10A	13A	13A	13A
3A	3A	3A	6A	6A	6A	10A	10A	10A	13A	13A	13A
			7A	7A	7A				13C	13C	13C
			7A	7A	7A				13C	13C	13C

Real-time PCR plate şablonu **Tablo 5**'te gösterilip, her bir örnekten üçlü çalışma programı hazırlandı. Hem hedef gen (PAG-1), hem de housekeeping gen (*glucose-6-phosphate dehydrogenase*, G6PD) için hazırlanan plate şablonlarına göre, örnek başına 10µl PCR solüsyonu (iTaQ Universal Probes Supermix Biorad), 8µl su ve 1µl primer hazırlandı. Ondokuz mikrolitrelik final hacmine, preamplifikasyon ürünü DNA 1µl eklenerek Real-Time PCR cihazında (Biorad iCycler IQ Real-Time PCR); 95°C'de 30 saniye ve 95°C'de 5 saniye, 60°C'de 30 saniyelik 40 amplifikasyon siklusu olacak şekilde termal program uygulandı. Analiz sonunda pozitif ve kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve  $2^{\Delta\Delta Ct}$  verilerine göre hesaplandı ve değerlendirildi. Kullanılan primerler ve özellikleri aşağıda verilmiştir.

Gen Adı	Amplikon Uzunluğu	Seçilen Sekans
G6PD	73	NM_001093780.1
PAG1	57	XM-004011761.2 XM_012183909.1 XM_012183910.1

### 3.6 İstatistiksel Yöntemler

RIA yöntemiyle PAG konsantrasyonlarının ölçümüne dayalı gebelik teşhisinde ölçümün eşik değeri olarak 1.0 ng/ml baz alındı. Bu değer altındaki değerler gebelik negatif, üstündeki değerler de gebelik pozitif olarak kabul edildi. Bu değerler üzerinden RIA sonuçlarının kategorizasyonu için gebeliğin doğru teşhisi (a); gebeliğin yanlış teşhisi (b); gebe olmayanların doğru teşhisi (c), ve gebe olmayanların yanlış teşhisi (d) kodlamaları kullanılarak duyarlılık ( $100 \times a/a + d$ ), özgüllük ( $100 \times c/c + b$ ), doğruluk [ $(a + c) / (a + b + c + d)$ ], pozitif öngörme değeri ( $100 \times a/a + b$ ), negatif öngörme değeri ( $100 \times c/c + d$ ) formülleri ile hesaplandı (Szenci ve ark., 1998).

İstatistik analizleri için IBM SPSS 21.0 programı kullanıldı ve anlamlı farklılıkların yorumlanmasında p değeri 0.05 olarak hesaplamalara dâhil edildi. Veriler, general linear model for repeated measurement yöntemi ile analiz edildi. Real-time PCR için elde edilen veriler one-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri ile analiz edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 RIA Ölçümü Bulguları

RIA-497, RIA-706, RIA-780, RIA-860, RIA-srPool ve RIA-wbPool yöntemlerinde minimum tespit limitleri sırasıyla 0.10, 0.26, 0.18, 0.16 ve 0.10 ng/ml olarak hesaplandı.

PAG konsantrasyonlarının ortalaması, zamandan ( $P < 0.001$ ) ve RIA yöntemlerinden ( $P < 0.001$ ) etkilenmiştir. Gebe grubunun ortalama PAG konsantrasyonları, RIA-780’de ( $P < 0.001$ ) 17. günden, RIA-706’da ( $P < 0.001$ ) 18 günden, RIA-srPool 19. günden ve RIA-wbPool’da ( $P < 0.001$ ) 20. günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaya başladığı tespit edildi ( $P < 0.001$ ). Gebe olan grubun RIA-497 ve RIA-860’da ölçülen PAG konsantrasyonları ile gebe olmayan grubun her RIA sistemindeki PAG konsantrasyonları sıfır veya sıfıra yakın olarak ölçüldü (**Tablo 6**).

**Tablo 6.** Gebe (P, n:10) ve gebe olmayan (NP, n:10) koyunların farklı günlerdeki PAG konsantrasyonlarının 6 farklı RIA yönteminde karşılaştırılması (Marjinal ortalama  $\pm$  Standart hata)

PAG Konsantrasyonu (ng/mL)		RIA Yöntemleri					
Gün	Grup	RIA-497	RIA-706	RIA-780	RIA-860	RIA-srPool	RIA-wbPool
0. gün	P	0.06 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.05	0.02 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.05	0.02 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.05
10. gün	P	0.07 $\pm$ 0.05	0.02 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.05	0.05 $\pm$ 0.05
15. gün	P	0.07 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.05	0.03 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.05	0.05 $\pm$ 0.05
16. gün	P	0.08 $\pm$ 0.19	0.02 $\pm$ 0.19	0.55 $\pm$ 0.19	0.16 $\pm$ 0.19	0.01 $\pm$ 0.19	0.19 $\pm$ 0.19
17. gün	P	0.12 $\pm$ 0.30	0.64 $\pm$ 0.30	1.28 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.32 $\pm$ 0.30	0.17 $\pm$ 0.30	0.33 $\pm$ 0.30
18. gün	P	0.18 $\pm$ 0.59	1.76 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>	4.28 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.59	0.77 $\pm$ 0.59	0.46 $\pm$ 0.59
19. gün	P	0.20 $\pm$ 0.56	3.05 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>	7.53 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>	0.79 $\pm$ 0.56	1.58 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>	0.86 $\pm$ 0.56
20. gün	P	0.22 $\pm$ 0.47	4.14 $\pm$ 0.47 <sup>d</sup>	10.44 $\pm$ 0.47 <sup>d</sup>	0.76 $\pm$ 0.47	2.56 $\pm$ 0.47 <sup>d</sup>	1.11 $\pm$ 0.47 <sup>d</sup>
0. gün	NP	0.09 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.05	0.02 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.05
10. gün	NP	0.05 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.05
15. gün	NP	0.03 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.06
16. gün	NP	0.03 $\pm$ 0.10	0.17 $\pm$ 0.10	0.13 $\pm$ 0.10	0.14 $\pm$ 0.10	0.19 $\pm$ 0.10	0.15 $\pm$ 0.10
17. gün	NP	0.04 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.06	0.10 $\pm$ 0.06	0.01 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.06
18. gün	NP	0.08 $\pm$ 0.06	0.01 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.06	0.06 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.06
19. gün	NP	0.06 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.06
20. gün	NP	0.04 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.04	0.01 $\pm$ 0.04	0.01 $\pm$ 0.04

<sup>a-d</sup>Aynı günde farklı üstbilgileri olan değerler sütunlar arasında farklılık gösterir (İkili karşılaştırma, Bonferroni correction;  $P < 0.001$ ).

İkili karşılaştırmaların sonuçlarına göre; RIA-780 ile 17. günden sonra (ortalama:  $1.28 \pm 0.30$ ;  $P < 0.001$ ), RIA-706 ile 18. günden (ortalama:  $1.76 \pm 0.59$ ;  $P < 0.001$ ), RIA-srPool 19. günden sonra (ortalama:  $2.56 \pm 0.47$ ,  $P < 0.001$ ) ve RIA-wbPool 20. günden sonra (ortalama:  $1.11 \pm 0.47$ ,  $P < 0.001$ ) gebe ve gebe olmayan gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olduğu ortaya kondu ( $P < 0.001$ ). RIA-497 ve RIA-860 yöntemleri ile yapılan ölçümlerde gruplar arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edildi **Tablo 6** ( $P < 0.001$ ).

Altı RIA sisteminin özellikleri **Tablo 7** 'te gösterilmiştir. Duyarlılık, RIA-497'de bütün günler için, RIA-860 ve RIA-srPool'da 17. gün için hesaplanamadı. Çünkü bu günlerde “gebeliği doğru teşhisi” (a) ve “gebe olmayanların yanlış teşhisi” (d) değerleri sıfır olarak hesaplandı ve matematiksel kurallara göre herhangi bir sayının sıfıra bölünmesi mümkün değildir (Cajori, 1929).

**Tablo 7.** Gebelik teşhisi için 6 RIA sisteminin duyarlılık, özgüllük, doğruluk, pozitif öngörme değeri (PPV) ve negatif öngörme değeri (NPV) çiftleşme sonrası 17, 18, 19 ve 20. günde karşılaştırılması (HD: Hesaplanamayan Değer)

	Günler	RIA Yöntemleri					
		RIA-497	RIA-706	RIA-780	RIA-860	RIA-srPool	RIA-wbPool
Duyarlılık	17.gün	HD*	100	100	HD*	HD*	100
	18.gün	HD*	100	100	100	100	100
	19.gün	HD*	100	100	100	100	100
	20.gün	HD*	100	100	100	100	100
Özgüllük	17.gün	50	59	63	50	50	56
	18.gün	50	67	77	56	59	59
	19.gün	50	100	100	63	71	63
	20.gün	50	100	100	63	100	71
Doğruluk	17.gün	50	65	70	50	50	60
	18.gün	55	75	85	60	65	65
	19.gün	50	100	100	70	80	70
	20.gün	50	100	100	70	100	80
PPV	17.gün	0	30	40	0	0	20
	18.gün	10	50	70	20	30	30
	19.gün	0	100	100	40	60	40
	20.gün	0	100	100	40	100	60
NPV	17.gün	100	100	100	100	100	100
	18.gün	100	100	100	100	100	100
	19.gün	100	100	100	100	100	100
	20.gün	100	100	100	100	100	100

\* Bu değerler, hesaplama yapılan formüldeki ( $100 \times a/(a+d)$ ) bölen kısmının sıfır çıkması sebebiyle hesaplanamamıştır.

## 4.2 Real-Time PCR Bulguları

Her bir primer için erime eğrisi analizi gen-spesifik piklerin belirlenmesi ile yapıldı. Sonuçlar E-metot ile değerlendirilmiş ve hedef genlerin Cp (*crossing point*) değerleri ise G6PD ile standardize edildi. Gruplar karşılaştırıldı ve eğri değişim değerleri hesaplandı. Eğri değişim değeri  $>2$  ise gen ekspresyonunun arttığı, eğri değişim değeri  $<2$  ise gen ekspresyonunun azaldığı ya da değişmediği yönünde yorumlandı.

PAG1 ekspresyonunu gösteren, real-time PCR sonuçlarının ham verileri **Tablo 8**' de verilmiştir.

**Tablo 8.** PAG1 ekspresyonunu Real-Time PCR Sonuçları

Örnekler	Değerler			Ortalama
1A - 0.gün	27.7	27.6	27.7	27.67
2A - 0.gün	30.6	30.8	30.6	30.67
3A - 0.gün	27.7	27.1	27.4	27.40
4A - 14.gün	28.9	29	28.7	28.87
5A - 14.gün	28.8	28.9	28.8	28.83
6A - 14.gün	28.7	28.6	28.4	28.57
7A - 14.gün	28.8	27.8	28.7	28.43
8A - 20.gün	28.7	28.8	28.7	28.73
9A - 20.gün	28.1	28.3	28.1	28.17
10A - 20.gün	27	26.9	26.9	26.93
11A - 30.gün	28.6	28.5	28.5	28.53
12A - 30.gün	30	29.7	29.9	29.87
13A - 30.gün	30	29.2	29.5	29.57
13C - 30. gün Embriyo ve amnion kesesi	26.5	26.1	26.6	26.40

G6PD ekspresyonunu gösteren, real-time PCR sonuçlarının ham verileri **Tablo 9'** da verilmiştir.

**Tablo 9.** G6PD Sonuçları

Örnekler	Değerler		
	1A - 0.gün	24.9	24.7
2A - 0.gün	27	27	27.2
3A - 0.gün	25	24.9	24.8
4A - 14.gün	25.6	26.1	26.6
5A - 14.gün	28	28.1	27.9
6A - 14.gün	24.8	25.3	24.7
7A - 14.gün	24.9	25	24.8
8A - 20.gün	26.9	27	27.2
9A - 20.gün	26.7	26.8	27.1
10A - 20.gün	24.7	25	24.1
11A - 30.gün	24.8	24.8	24.9
12A - 30.gün	25.6	25.5	25.2
13A - 30.gün	25.6	25.6	23.8
13C - 30. gün Embriyo ve amnion kesesi	25	24.8	25

Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen  $\Delta Ct$  değerine göre 20.gün ve 30.gün gebelikleri arasında istatistiksel olarak fark belirlendi.  $\Delta Ct$  verileri **Tablo 10'** da gösterilmektedir.

**Tablo 10.**  $\Delta Ct$  Sonuçları

Örnekler	$\Delta Ct$		
1A - 0.gün	3.10		
2A - 0.gün	3.60	3.07	0.55
3A - 0.gün	2.50		
4A - 14.gün	2.77		
5A - 14.gün	0.83	2.69	1.30
6A - 14.gün	3.63		
7A - 14.gün	3.53		
8A - 20.gün	1.70		
9A - 20.gün	1.30	1.78	0.52
10A - 20.gün	2.33		
11A - 30.gün	3.70		
12A - 30.gün	4.43	4.23	0.47
13A - 30.gün	4.57		
13C - 30. gün Embriyo ve amnion kesesi	1.47		



Ancak  $2^{\Delta\Delta Ct}$  hesaplamalarına yani genlerin relatif ekspresyon değerleri hesaplandığında gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görüldü ( $P < 0.0001$ ).  $2^{\Delta\Delta Ct}$  verileri **Tablo 11**' de verilmiştir.

**Tablo 11.**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Sonuçları

Örnekler	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$		
1A - 0.gün				
2A - 0.gün				
3A - 0.gün				
4A - 14.gün	-0.30	1.23		
5A - 14.gün	-2.23	4.70	1.83	1.93
6A - 14.gün	0.57	0.68		
7A - 14.gün	0.47	0.72		
8A - 20.gün	-1.37	2.58		
9A - 20.gün	-1.77	3.40	2.55	0.87
10A - 20.gün	-0.73	1.66		
11A - 30.gün	0.63	0.64		
12A - 30.gün	1.37	0.39	0.46	0.16
13A - 30.gün	1.50	0.35		
13C - 30. gün Embriyo ve amnion kesesi	1.60	3.03		

Bu veriler grup bazında incelendiğinde, 20.gün gebelik grubuna ait üç örneğin ikisinde gen ekspresyonunun arttığı ve 30.gün gebelik grubunda ise gen ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı dikkati çekmektedir. İstatistiksel olarak bir fark tespit edilememesine rağmen 20.gün gebeliklerinde PAG1 ekspresyonunun sayıca arttığı görülmektedir ( $P < 0.0001$ ). Elde edilen sonuçlar  $\Delta Ct$  hesaplamasındaki verilerle benzerlik göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Koyunlarda erken gebelik teşhisi, işletmelerde yönetimin etkin yapılabilmesi için çok önemlidir. Karlılığın artırılabilir ve sürdürülebilir olmasında kilit rol oynayan erken gebelik teşhisi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. RIA ile PAG ölçümleri, duyarlılık, özgüllük, doğruluk, pozitif ve negatif öngörme değerleri gibi özelliklerinden dolayı, diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha avantajlıdır (González ve ark., 2004; Karen ve ark., 2006; Savela ve ark., 2009).

Bu amaçla çalışmada, koyunlarda erken gebelik teşhisi için değişik antiserumlardan oluşan 6 farklı RIA yöntemi karşılaştırılmıştır. Bu yöntemlerden RIA-860 ve RIA-wbPool Barbato ve arkadaşları tarafından ilk defa mandalarda gebelik teşhisi için kullanılmıştır (Barbato ve ark., 2017). Çalışmanın sonuçlarından yola çıkılarak, bu iki RIA yöntemi, koyunlarda erken gebelik teşhisi için ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiştir.

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*), erken gebelik teşhisi için sıklıkla tercih edilen yöntemdir. PAG konsantrasyonu ölçümüne dayalı gebelik teşhisinde elde edilen sonuçlar, koyunlarda en erken 30. gün (Silva Chaves ve ark., 2017; Lamglait ve Rambaud, 2017), keçilerde ise 21 gündür (Shahin ve ark., 2013). Barbary ırkı koyunlarda, ELISA ile kanda PAG'ın en erken, gebeliğin 32. gününde tespit edilebildiğini belirtilmiştir (Lamglait ve Rambaud, 2017). Yapılan bu çalışma özellikleri bakımından, %100 duyarlılık, %95,8 özgüllük, %92,7 pozitif öngörme değeri, % 100 negatif öngörme değerlerine sahiptir. Çalışmamızda ise, RIA-780 yöntemiyle gebeliğin 17. gününde %30 duyarlılık, %59 özgüllük; RIA-497 ve RIA-860 hariç, diğer 4 RIA yönteminde, gebeliğin 18. gününden itibaren yüksek duyarlılık ve özgüllük ile gebelik tanısı yapılmıştır. RIA ve ELISA yöntemleri karşılaştırıldığında en erken gebelik teşhisinin RIA yöntemiyle yapılabildiği ve gebeliğin 19. gününden itibaren RIA-780 yöntemi ile %100 duyarlılık, %95,8 özgüllük, % 92,7 pozitif öngörme ve %100 negatif öngörme değerinde sonuçlara sahiptir. Koyunlarda gebelik tanısı için ELISA yöntemlerinde kullanılan boPAG antiserumu, çalışmamızda RIA-497 yönteminde kullanılmış fakat örneklerin alındığı süre zarfında gebelik tanısı yapılamamıştır. Ancak boPAG antiserumu kullanılarak koyunlarda gebelik tanısı sadece 1 çalışmada çiftleşmeden sonraki 26. günde (Ruder

ve ark., 1988) yapılabilmektedir. Bu bakımdan RIA yönteminin ELISA yöntemine göre daha erken ve daha yüksek güvenilirlikte sonuçlar vereceği düşünülebilir. Ayrıca antiserum olarak ovPAG kullanılan ELISA yöntemine ilişkin bir çalışma henüz bildirilmemiştir.

Zoli ve ark. (1990) tarafından ilk kez izole edilen ovPAG, gebeliğin 3. haftasından itibaren 4 ng/ml düzeyinde olduğu bildirilmiştir (Ranilla ve ark., 1994). Diğer bir çalışmada ise, RIA-780 yönteminde ovPAG<sub>57+59kDa</sub> antiserumunu kullanarak yaptıkları ölçümde, ovPAG konsantrasyonunu gebeliğin 25. gününde 6 ng/ml'den yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Vandaele ve ark., 2005). Standart ve tracer olarak yarı saflaştırılmış ovPAG kullanılan bir çalışmada, antiserum olarak ovPAG<sub>57+59kDa</sub> tercih edilmiştir. Bu şekilde yapılan RIA yönteminde kan örneğinden gebeliğin 18. gününde, süt örneğinden gebeliğin 25. gününde gebelik teşhisinin yapılabildiği bildirilmiştir (El Amiri ve ark., 2007; El Amiri ve ark., 2015). Çalışmamızda ise standart ve tracer olarak boPAG<sub>67</sub>, antiserum olarak da ovPAG<sub>57+59</sub> kullanılarak RIA780 yöntemiyle gebelik teşhisi yapılmıştır. Gebeliğin 17. gününde %70, 18. gününde %85 ve 19. gününden itibaren de %100 doğrulukta gebelik teşhisi yapılmıştır. Sonuçlardaki benzerlikten dolayı antiserum olarak ovPAG<sub>57+59</sub> kullanılmasının koyunlarda erken gebelik teşhisi için en elverişli yöntem olduğu görülmüştür.

Koyunlarda gebelik tanısı için RIA kullanımında farklı heterolog anti-caprine PAG antiserumları değerlendirilmiştir (Barbato ve ark., 2009; González ve ark., 1999; Karen ve ark., 2003a; Karen ve ark., 2003b; Ledezma-Torres ve ark., 2006). Anti-caprinePAG antiserumları kullanılarak yapılmış RIA çalışmalarında gebelik teşhisi en erken gebeliğin 22. gününde (Karen ve ark., 2003a), 24. gününde (Karen ve ark., 2003b), 3. haftasında (Ledezma-Torres ve ark., 2006) yapılırken, Barbato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, gebeliğin 18. gününde %60,5 doğrulukta, gebeliğin 24. gününde ise %100 doğrulukta (Barbato ve ark., 2009) tespit edilebildiği bildirilmiştir. Çalışmamızda ise RIA-706 yöntemiyle gebelik teşhisi gebeliğin 17. gününde %65, 18. gününde %75 ve diğer günlerde %100 doğrulukta tespit edildiği ortaya konmuştur. Bu sonuçlara göre RIA-706 yönteminde heterolog anti-caPAG<sub>55+62kDa</sub> antiserumu kullanılmasının daha yüksek hassasiyet sağladığı düşünülmektedir.

Mandalardan PAG izolasyonu ve saflaştırılması ilk olarak Barbato ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Elde edilen wbPAG antiserumları mandaların gebelik teşhisi için kullanılmıştır (Barbato ve ark., 2008; Barbato ve ark., 2013; Barbato ve ark., 2017). Çalışmamızda ise mandalardan elde edilmiş wbPAG antiserumları koyunlarda gebelik teşhisi için ilk defa kullanılmıştır. RIA-860 ve RIA-wbPool yöntemlerinde homolog ve heterolog wbPAG antiserumlar kullanılmıştır. Koyunlarda gebelik teşhisi için RIA-wbPool yönteminin RIA-860 yönteminden daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuca göre koyunlarda gebelik teşhisi için RIA-wbPool yönteminin RIA-860 yöntemine göre daha elverişli olduğu düşünülmektedir.

RIA-srPool yöntemi ilk olarak Barbato ve arkadaşları tarafından koyunlarda gebelik teşhisi için kullanılmıştır. Gebeliğin 18. gününden itibaren %95,3 duyarlılıkta gebelik teşhisinin yapılabildiği bildirilmiştir (Barbato ve ark., 2009). Çalışmamızda kullanılan srPool antiserumlarının da benzer sonuç vermiş olması, gebelik teşhisi için oldukça elverişli bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir.

Koyunlarda gebelik teşhisi için RIA-497 yöntemi kullanılmış ve gebelik teşhisi en erken gebeliğin 26. gününde tespit edilebildiği bildirilmiştir (Ruder ve ark., 1988). Çalışmamızda ise gebeliğin 20. gününe kadar kan örnekleri alınmış olup, bu örneklerden gebelik teşhisi yapılamamıştır. Bu nedenle, koyunlarda gebelik teşhisi için RIA-497 yönteminin kullanılması, gebeliğin 26. gününden önce uygun olmadığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, RIA780, RIA706, RIA-srPool ve RIA-wbPool yöntemlerinin koyunlarda gebelik teşhisi için tercih edilebileceği ortaya çıkmıştır. Koyunlarda erken gebelik teşhisinde sonuçlar açısından daha fazla özgüllük ve doğruluk için daha çeşitli küçük ruminant antiserumlarının kullanıldığı RIA yöntemlerinin geliştirilmesinin gerekliliği düşünülmektedir. Gebelik dönemlerine göre farklı PAG transkriptlerinin protein üretiminden sorumlu olduğu belirtildiğinden, sadece erken gebelik döneminde üretilen PAG proteinleri kullanılarak erken gebelik teşhisi yapılmasının uygun olabileceği tarafımızca speküle edilmektedir.

Doku örneklerinden izole edilmiş total RNA konsantrasyonunun real-time PCR ile ölçümlerinin sonucunda günler arasında istatistiksel açıdan anlamlı

farklılıkların görülmediği ortaya çıkmıştır. Ancak gruplar ve relatif ekspresyon değerleri bireysel olarak incelendiğinde, 20.günde artan PAG ekspresyonu dikkati çekmektedir. Bu sonuçlar, 17.günde anlamlı derecede bulunan PAG değerlerini desteklemektedir. Ancak PAG ekspresyonunun 30.günde değişikliğinin tespit edilememesi, yapılan araştırmalarda farklı dönemlerde farklı PAG ekspresyonlarından kaynaklı olabileceğini akla getirmektedir (Xie ve ark., 1997; Klisch ve ark., 2005; Wallace ve ark., 2015).

PAG1 kotiledon koryonunda ve interkotiledoner bölgede bulunan binükleik hücrelerden salgılandığı belirtilmiştir (Touzard ve ark., 2013). Aşım sonrası 0. günde alınan doku örneklerinde, PAG1 ekspresyonunun belirlenmiş olması, PAG1 ekspresyonu için mRNA üretiminin gerçekleştiği, fakat PAG1 proteininin translasyonu aşamasında farklı bir kontrol mekanizması olabileceğini düşündürmektedir. Protein translasyonu mekanizmasının kontrolünde microRNA'ların rol oynadığı bilinmektedir (Pillai ve ark., 2007). PAG1 glikoproteini translasyonu kontrolünde microRNA rol oynayıp oynamadığının ortaya konması ve protein translasyonu mekanizmasının ortaya çıkarılması için doku örneklerinden western blot çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Koyunlarda gebelik tanısı amaçlı biyoteknolojik araçlardan yararlanım gün geçtikçe artmaktadır. RIA gibi çok hassas ölçümlere dayalı teknikler, sahada pratik olmamasına karşın uygun laboratuvar imkânları dâhilinde ülkemiz adına çok elverişli yöntemler haline gelebilir. RIA uygulamalarını daha da hassaslaştırmak için real-time PCR yöntemleri yardımıyla izolasyon ve identifikasyon çalışmalarından faydalanılabilir. Bu amaçla, gebeliğin hangi evrelerinde gebelik teşhisi yapılmak isteniyorsa o döneme ait PAG molekülleri izole ve identifiye edilerek RIA sistemlerinde antiserum olarak kullanılabilmesi, RIA sisteminin hassasiyetini artırabileceği düşünülmektedir. İzolasyon ve identifikasyon çalışmaları ile gebelik zamanından kaynaklı hassasiyet değişimi gibi, tür ve ırk kaynaklı hassasiyet değişimleri de ortadan kaldırılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Allen E (1922) The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy* 30(3): 297-371. DOI:10.1002/aja.1000300303
- Amezcu-Moreno MD (1988) Pregnancy diagnosis in ewes by means of the determination of blood progesterone concentration on day 18 after insemination using enzyme immunoassay. *Veterinary Mexico* 19: 386.
- Aschheim S, Zondek B (1928) The diagnosis of pregnancy from the urine by demonstration of the hormone of the pituitary. *Klinische Wochenschrift* 7(1): 8-9. DOI:10.1007/BF01711682
- Baird DT (1978) Pulsatile secretion of lh and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biology of Reproduction* 18(3): 359-364. DOI:10.1095/biolreprod18.3.359
- Barbato O, Guelfi G, Barile VI et al (2017) Using real-time PCR to identify pregnancy-associated glycoprotein 2 (PAG-2) in water buffalo (*Bubalus bubalis*) blood in early pregnancy. *Theriogenology* 89: 106-113. DOI:10.1016/j.theriogenology.2016.09.038
- Barbato O, Sousa NM, Barile VL et al (2013) Purification of pregnancy-associated glycoproteins from late-pregnancy *Bubalus bubalis* placentas and development of a radioimmunoassay for pregnancy diagnosis in water buffalo females. *BMC Veterinary Research* 9(89): 1-13. DOI:10.1186/1746-6148-9-89
- Barbato O, Sousa NM, Debenedetti A et al (2009) Validation of a new pregnancy associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. *Theriogenology* 72(7): 993-1000. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.06.020
- Barbato O, Sousa NM, Klisch K et al (2008) Isolation of new pregnancy-associated glycoproteins from water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta by Vicia villosa affinity chromatography. *Research and Veterinary Science* 85(3): 457-466. DOI:10.1016/j.rvsc.2008.01.004

- Barrett DM, Duggavathi R, Davies KL et al (2007) Differential effects of various estradiol-17beta treatments on follicle-stimulating hormone peaks, luteinizing hormone pulses, basal gonadotropin concentrations, and antral follicle and luteal development in cyclic ewes. *Biology of Reproduction* 77(2): 252-262. DOI:10.1095/biolreprod.106.058842
- Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC (2000) An ultrasound-aided study of temporal relationships between the patterns of LH/FSH secretion, development of ovulatory-sized antral follicles and formation of corpora lutea in ewes. *Theriogenology* 54(2): 229-245. DOI:10.1016/S0093-691X(00)00344-7
- Bartlewski P, Baby T, Giffin J (2011) Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science* 124(3-4): 259-268. DOI:10.1016/j.anireprosci.2011.02.024
- Bayon HP (1939) Ancient pregnancy tests in the light of contemporary knowledge. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 32(11): 1527-1538. DOI:10.1177/003591573903201159
- Beach W (1850). *An improved system of midwifery: adapted to the reformed practice of medicine. To which is annexed, a compendium of the treatment of female and infantile diseases, with remarks on physiological and moral elevation.* Chicago: Baker & Scribner.
- Beckers JF, Roberts RM, Zoli AP et al (1994) Molecules of the family of aspartic proteinases in the placenta of ruminants: hormones or proteins? *Bulletin et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique* 149(8): 355-367. <http://hdl.handle.net/2268/6836>
- Bériot M, Tchimbou AF, Barbato O et al (2014) Identification of pregnancy-associated glycoproteins and alpha-fetoprotein in fallow deer (*Dama dama*) placenta. *Acta Veterinaria Scandinavica* 56(4): 1-12. DOI:10.1186/1751-0147-56-4
- Berson SA, Yalow RS (1957) Ethanol fractionation of plasma and electrophoretic identification of insulin-binding antibody. *The Journal of Clinical Investigation* 36(5): 642-647. DOI:10.1172/JCI103464

- Brandt GA, Parks TE, Killian G et al (2007) A cloning and expression analysis of pregnancy-associated glycoproteins expressed in trophoblast of the white-tail deer placenta. *Molecular Reproduction and Development* 74(11): 1355-1362. DOI:10.1002/mrd.20669
- Bretzlaff KN, Edwards J, Forrest D et al (1993) Ultrasonographic determination of pregnancy in small ruminants. *Veterinary Medicine* 88: 12-24.
- Butler JE, Hamilton WC, Sasser RG et al (1982) Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biology of Reproduction* 26(5): 925-933. DOI:10.1095/biolreprod26.5.925
- Cajori F (1929) Absurdities due to division by zero: an historical note. *National Council of Teachers of Mathematics* 22(6): 366-368. DOI:10.11648/j.pamj.20180703.11
- Campbell S (2013) A short history of sonography in obstetrics and gynaecology. *Facts, Views and Vision Issues in Obstetrics, Gynecology and Reproductive Health* 5(3): 213-229. <http://www.fvvo.be/archive/volume-5/number-3/history/a-short-history-of-sonography-in-obstetrics-and-gynaecology/>
- Chan JS, Robertson HA, Friesen HG (1978) Maternal and fetal concentrations of ovine placental lactogen measured by radioimmunoassay. *Endocrinology* 102(5): 1606-1613. DOI:10.1210/endo-102-5-1606
- Chemineau P, Malpoux B, Delgadillo JA et al (1992) Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science* 30(1-3): 157-184. DOI:10.1016/0378-4320(92)90010-B
- Cole HH, Hart GH (1930) The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *American Journal of Physiology* 93(1): 57-68. DOI:10.1152/ajplegacy.1930.93.1.57
- De Lee JB (1924) *Principles and Practice of Obstetrics*. Philadelphia: Wiley Blackwell Saunders



- Duggavathi R, Bartlewski PM, Barrett DM et al (2005) The temporal relationship between patterns of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid- to late-luteal phase of sheep. *Theriogenology* 64(2): 393-407. DOI:10.1016/j.theriogenology.2004.12.006
- Dýrmundsson ØR (1978) Studies on the breeding season of Icelandic ewes and ewe lambs. *The Journal of Agricultural Science* 90(2): 275-281. DOI:10.1017/S0021859600055350
- El Amiri B, Karen A, Sulon J et al (2007) Measurement of ovine pregnancy-associated glycoprotein (pag) during early pregnancy in lacaune sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 42(3): 257-262. DOI:10.1111/j.1439-0531.2006.00761.x
- El Amiri B, Remy B, Sousa NM et al (2004) Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high levels in the ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reproduction Nutrition Development* 44: 169-181. DOI:10.1051/rnd:2004025
- El Amiri B, Remy B, Sousa NM et al (2003) Isolation and partial characterization of three pregnancy-associated glycoproteins from the ewe placenta. *Molecular Reproduction and Development* 64(2): 199-206. DOI:10.1002/mrd.10246
- El Amiri B, Sousa NM, Alvarez Oxiley A et al (2015) Pregnancy associated glycoprotein (PAG) concentration in plasma and milk for early pregnancy diagnosis in lacaune dairy sheep. *Research in Veterinary Science* 99: 30-36. DOI:10.1016/j.rvsc.2014.12.016
- Fanz JL, Gault ES (1930) Hydatidiform mole as a cause of positive reaction in the Aschheim-Zondek pregnancy test. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 16: 27. DOI:10.5555/uri:pii:S0022214330902454
- Finkel HS (1931) The diagnosis of pregnancy by the Aschheim-Zondek test. *The New England Journal of Medicine* 204(5): 203-209
- Finkler RS (1930) A successful test for pregnancy. *Med. Woman's Jr.* (37): 153-157

- Friedman MH, Lapham ME (1931) A simple, rapid procedure for the laboratory diagnosis of early pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 21(3): 405-410. DOI:10.1016/S0002-9378(16)42174-5
- Galli Mainini C (1947) Pregnancy test using the male toad. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 7(9): 653-658. DOI:10.1210/jcem-7-9-653
- Garbayo JM, Remy B, Alabart JL et al (1998) Isolation and partial characterization of a pregnancy associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biology of Reproduction* 58(1): 109-115. DOI:10.1095/biolreprod58.1.109
- Garbayo JM, Green JA, Manikkam M et al (2000) Caprine pregnancy associated glycoproteins (PAG): Their cloning, expression, and evolutionary relationship to other PAG. *Molecular Reproduction and Development* 57(4): 311-322. DOI:10.1002/1098-2795
- Garbayo JM, Serrano B, Lopez-Gatius F (2008) Identification of novel pregnancy associated glycoproteins (PAG) expressed by the perimplantation conceptus of domestic ruminants. *Animal Reproduction Science* 103(1-2): 120-134. DOI:10.1016/j.anireprosci.2006.12.002
- Gnoth C, Johnson S (2014) Strips of hope: accuracy of home pregnancy tests and new developments. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 74(7): 661-669. DOI:10.1055/s-0034-1368589
- González F, Cabrera F, Batista M et al (2004) A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone, and pregnancy associated glycoprotein assays. *Theriogenology* 62(6): 1108-1115. DOI:10.1016/j.theriogenology.2003.12.009
- González F, Sulon J, Garbayo JM et al (1999) Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy associated glycoprotein concentrations in plasma samples. *Theriogenology* 52(4): 717-725. DOI:10.1016/S0093-691X(99)00165-X
- Goot H (1969) Effect of light on spring breeding of mutton merino ewes. *The Journal of Agricultural Science* 73(2): 177-180. DOI:10.1017/S0021859600014350

- Gordon I (1997) *Controlled Reproduction in Sheep and Goats Vol.2*. Wallingford: Cambridge University Press.
- Green JA, Xie S, Quan X et al (2000) Pregnancy associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biology of Reproduction* 62(6): 1624-1631. DOI:10.1095/biolreprod62.6.1624
- Greenwood F, Hunter W, Glover J (1963) The preparation of 131-I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochemical Journal*: 114-123
- Hafez ES (1952) Studies on the breeding season and reproduction of the ewe Part I. The breeding season in different environments Part II. The breeding season in one locality. *The Journal of Agricultural Science* 42(3): 189-231. DOI:10.1017/S0021859600056896
- Haibel GK (1990) Use of ultrasonography in reproductive management of sheep and goat herds. *The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practise* 6(3): 597-613. DOI:10.1016/S0749-0720(15)30835-5
- Hasenbein G (1951) A pregnancy test on earthworms. *Archives of Gynecology and Obstetrics*: 5-28
- Hill GA, Carle BN, Carlquist JH et al (1962) Latex agglutination reactions between human chorionic gonadotropin and rabbit antibody. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 109(2): 321-325. DOI:10.3181/00379727-109-27190
- Hodge HL (1864) *Principles and Practice of Obstetrics*. Philadelphia: Blanchard and Lea
- Hogben L (1946) The Hogben test. *British Medical Journal* 2: 962-963. DOI:10.1136/bmj.2.4485.962-c
- Hollick F (1848) *The matron's manual of midwifery: and the diseases of women during pregnancy and in child bed*. Chicago: Strong

- Hughes AL, Green JA, Piontkivska H et al (2003) Aspartic proteinase phylogeny and the origin of pregnancy associated glycoproteins. *Molecular Biology and Evolution* 20(11): 1940-1945. DOI:10.1093/molbev/msg217
- Hughes AL, Green JA, Roberts RM et al (2000) Adaptive diversification within a large family of recently duplicated, placentally expressed genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* PNAS 97(7): 3319-3323. DOI:10.1073/pnas.97.7.3319
- Hulet CV (1972) A rectal-abdominal palpation technique for diagnosing pregnancy in the ewe. *Journal of Animal Science* 35(4): 814-819. DOI:10.2527/jas1972.354814x
- Hutchinson, JM, Robertson HA (1966) The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. *Research in Veterinary Science* 7(1): 17-24. DOI:10.1016/S0034-5288(18)34705-2
- l'Anson H, Legan SJ (1988) Changes in LH pulse frequency and serum progesterone concentrations during the transition to breeding season in ewes. *Reproduction* 82(1): 341-351. DOI:10.1530/jrf.0.0820341
- Ishwar K (1995) Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*,17(1): 37-44. DOI:10.1016/0921-4488(95)00644-Z
- James Oliver (1914) The Abderhalden Test for Pregnancy and the Commencement of Gestation. *The Lancet* 183 (4735): 1571.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)53498-9.
- Joder GH (1932) *Aschheim-Zondek Reaction in the early diagnosis of pregnancy.* Nebraska: University of Nebraska Medical Center.
- John SG, Gey GO, Hellman LM (1938) "The Production of a Gonadotrophic Substance (Prolan) by Placental Cells in Tissue Culture". *Science* 88 (2283): 306–307. doi:10.1126/science.88.2283.306.
- Kane D, Grassi W, Sturrock R et al (2004) A brief history of musculoskeletal ultrasound: "From bats and ships to babies and hips". *Rheumatology* 43(7): 931-933. DOI:10.1093/rheumatology/keh004

- Kaplan HE (1929) The Aschheim-Zondek hormone test for pregnancy. *California and Western Medicine* 31(6): 412-413.
- Karen A, Beckers JF, Sulon J et al (2003a) Evaluation of false transrectal ultrasonographic pregnancy diagnoses in sheep by measuring the plasma level of pregnancy associated glycoproteins. *Reproduction Nutrition Development* 43(6): 577-586. DOI:10.1051/rnd:2004005
- Karen A, Beckers JF, Sulon J et al (2003b) Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Theriogenology* 59(9): 1941-1948. DOI:10.1016/S0093-691X(02)01289-X
- Karen A, El Amiri B, Beckers JF et al (2006) Comparison of accuracy of transabdominal ultrasonography, progesterone and pregnancy-associated glycoproteins tests for discrimination between single and multiple pregnancy in sheep. *Theriogenology* 66(2): 314-322. DOI:10.1016/j.theriogenology.2005.11.017
- Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL et al (1984) Neuroendocrine Basis of Seasonal Reproduction. R. O. Greep (Dü.), *Proceedings of the 1983 Laurentian Hormone Conference, In Recent Progress in Hormone Research*. 40: s. 185-232. Mont Tremblant: Academic Press. DOI:10.1016/C2013-0-07526-3
- Karsch FJ, Malpoux B, Wayne NL et al (1988) Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reproduction Nutrition Development* 28(2B): 459-472. DOI:10.1051/rnd:19880311
- Kiewisz K, Sousa NM, Beckers JF et al (2009) Identification of multiple pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) purified from European bison (*Bison bison*) placenta. *Animal Reproduction Science* 112(3-4): 229-250. DOI:10.1016/j.anireprosci.2008.04.021
- Klisch K, Sousa NM, Beckers JF et al (2005) Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and -17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy. *Molecular Reproduction and Development* 71(4): 453-460. DOI:10.1002/mrd.20296

- Knickerboker JJ, Wiltbank MC, Niswender GD (1988) Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Domestic Animal Endocrinology* 5(2): 91-107. DOI:10.1016/0739-7240(88)90011-2
- Lamglait B, Rambaud T (2017) Diagnosis of pregnancy in barnary sheep (*ammotragus lervia*) using a bovine assay for pregnancy-associated glycoproteins. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 48(2): 525-528. DOI:10.1638/2016-0129.1
- Lamond DR (1963) Diagnosis of early pregnancy in the ewe. *Australian Veterinary Journal* 39(5): 192-195. DOI:10.1111/j.1751-0813.1963.tb04272.x
- Land RB, Pelletier J, Thimonier J et al (1973) A quantitative study of genetic differences in the incidence of oestrus, ovulation and plasma luteinizing hormone concentration in the sheep. *Journal of Endocrinology* 58(2): 305-317. DOI:10.1677/joe.0.0580305
- Ledezma-Torres RA, Beckers JF, Holtz W (2006) Assessment of plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in sheep with a heterologous (anti-caPAG55+59) RIA and its potential for diagnosing pregnancy. *Theriogenology* 66(4): 906-912. DOI:10.1016/j.theriogenology.2006.02.031
- Long JA, Evans HM (1921) On the rapid maturation of the ovary by transplants of the youthful gonad to adults. *The Anatomical Record* 21: 60.
- Martin GB (1984) Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biological Review* 59(1): 1-87. DOI:10.1111/j.1469-185X.1984.tb00401.x
- Martin GB, Oldham CM, Cognié Y et al (1986) The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams. *Livestock Production Science* 15(3): 219-247. DOI:10.1016/0301-6226(86)90031-X
- Mathieu A, McKenzie T (1931) The Aschheim-Zondek pregnancy test. *Northwest Medicine* (30): 55-62.
- Matton P, Bhereur J, Dufour JJ (1977) Morphology and resonsiveness of the two largest ovarian follicles in anestrous ewes. *Canadian Journal of Animal Science* 57(3): 459-464. DOI:10.4141/cjas77-058

- Mazer C, Hoffman J (1931) The three hormone tests for early pregnancy: their clinical evaluation: a comparative study. *Journal of American Medical Association (JAMA)* 1(96): 19-23. DOI:10.1001/jama.1931.02720270021005
- Mialon MM, Camous S, Renand G et al (1993) Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 33(3): 269-282. DOI:10.1051/rnd:19930309
- Mialon MM, Renand G, Camous S et al (1994) Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy serum protein (PSP60) in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 34(1): 65-72. DOI:10.1051/rnd:19940107
- Midgley AR (1966) Radioimmunoassay: a method for human chorionic gonadotropin and human luteinizing hormone. *Endocrinology* 79(1): 10-18. DOI:10.1210/endo-79-1-10
- Modlin IM, Kidd M (2001) Ernest starling and the discovery of secretin. *Journal of Clinical Gastroenterology* 32(3): 187-192. [https://journals.lww.com/jcge/Fulltext/2001/03000/Ernest\\_Starling\\_and\\_the\\_Discovery\\_of\\_Secretin.1.aspx](https://journals.lww.com/jcge/Fulltext/2001/03000/Ernest_Starling_and_the_Discovery_of_Secretin.1.aspx)
- Morton H, Nancarrow CD, Scaramuzzi RJ et al (1979) Detection of early pregnancy in sheep by the rosette inhibition test. *The Journal of Society for Reproduction and Fertility* 56: 75-80. DOI:10.1530/jrf.0.0560075
- Nguyen VH, Barbato O, Bui XN et al (2012) Assessment of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentrations in swamp buffalo samples from fetal and maternal origins by using interspecies antisera. *Animal Science Journal* 83(10): 683-689. DOI:10.1111/j.1740-0929.2012.01009.x
- Oral H, Kuru M (2016) Koyun ve Keçilerde Klinik ve Deneysel Reprodüktif Cerrahi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics* 2(1):83-8
- Ortavant R, Bocquier F, Pelletier J et al (1988) Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Australian Journal of Biological Sciences* 41(1): 69-86. DOI:10.1071/BI9880069

- Ortavant R, Pelletier J, Ravault JP et al (1985) Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals. *Oxford Review Reproductive Biology* 7: 305-345. DOI:10.1002/mrd.1120150113
- Parvey B (1930) Early diagnosis of pregnancy. *New England Journal of Medicine* 203: 1121-1129. DOI:10.1056/NEJM193012042032302
- Perényi ZS, Szenci O, Sulon J et al (2002) Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma. *Reproduction in Domestic Animals* 37(2): 100-104. DOI:10.1046/j.1439-0531.2002.00341.x
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology*, Volume 17, Issue 3, 118 - 126
- Poulton AL (1987) Role of melatonin in seasonal breeding in sheep. 38th Annual Meeting of the EAAP Commission on Sheep and Goat Production. Lisbon.
- Pratt MS, Hopkins PS (1975) The diagnosis of pregnancy in sheep by abdominal palpation. *Australian Veterinary Journal* 51(8): 378-380. DOI:10.1111/j.1751-0813.1975.tb15600.x
- Ranilla MJ, Sulon J, Carro MD et al (1994) Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep. *Theriogenology* 42(3): 537-545. DOI:10.1016/0093-691X(94)90691-B
- Rawlings NC, Bartlewski PM (2006) Clinical reproductive physiology of the ewes. RS Youngquist, W. Threlfall, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (s. 642-649). Missouri: Elsevier Health Sciences.
- Rawlings NC, Cook SJ (1993) LH secretion around the time of the preovulatory gonadotrophin surge in the ewe. *Animal Reproduction Science* 30(4): 289-299. DOI:10.1016/0378-4320(93)90079-7



- Rawlings NC, Jeffcoate IA, Rieger DL (1984) The influence of oestradiol 17- $\beta$  and progesterone on peripheral serum concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovariectomized ewe. *Theriogenology* 22(5): 473-488. DOI:10.1016/0093-691X(84)90047-5
- Richardson C (1972) Diagnosis of pregnancy in the ewe by vaginal biopsy. *The British Veterinary Journal* 128(6): 316-330.
- Robertson HA, Sarda IR (1971) A very early pregnancy test for mammals: Its application to the cow, ewe and sow. *Journal of Endocrinology* 49(3): 407-419. DOI:10.1677/joe.0.0490407
- Robertson HA, Chan JS, Friesen HG (1980) The use of a pregnancy-specific antigen, chorionic somatomamotrophin, as an indicator of pregnancy in sheep. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility* 58: 279-281. DOI:10.1530/jrf.0.0580279
- Robinson JJ (1981) Photoperiodic and nutritional influences on the reproductive performance of ewes in accelerated lambing systems. 32nd Annual Meeting of the European Association for Animal Production. III-2. Zagreb: Wageningen Academic Publishers.
- Roche JF, Foster DL, Karsch FJ et al (1970) Levels of luteinizing hormone in sera and pituitaries of ewes during the estrous cycle and anestrus. *Endocrinology* 86(3): 568-572. DOI:10.1210/endo-86-3-568
- Ruder CA, Stellflug JN, Dahmen JJ et al (1988) Detection of pregnancy in sheep by radioimmunoassay of sera for pregnancy-specific protein B. *Theriogenology* 29(4): 905-912. DOI:10.1016/0093-691X(88)90227-0
- Sasser RG, Ruder CA, Ivani KA et al (1986) Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biology of Reproduction* 35(4): 936-942. DOI:10.1095/biolreprod35.4.936

- Savela H, Vahtiala S, Lindeberg H et al (2009) Comparison of accuracy of ultrasonography, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein tests for pregnancy diagnosis in semidomesticated reindeer. *Theriogenology* 72(9): 1229-1236. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.07.018
- Saxena BB, Hasan S, Haour F et al (1974) Radioreceptor assay of human chorionic gonadotropin: detection of early pregnancy. *Science* 184(4138): 793-795. DOI:10.1126/science.184.4138.793
- Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT et al (1993) A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction Fertility and Development* 5(5): 459-478. DOI:10.1071/rd9930459
- Scolaro KL, Lloyd KB, Helms KL (2008) Devices for home evaluation of women's health concerns. *American Journal of Health-System Pharmacy* 65(4): 299-314. DOI:10.2146/ajhp060565
- Shahin M, Friedrich M, Gauly M et al (2013) Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pattern and pregnancy detection in Boer goats using an ELISA with different antisera. *Small Ruminant Research* 113(1): 141-144. DOI:10.1016/j.smallrumres.2013.01.016
- Sheldrick EL, Flint AP (1985) Endocrine control of uterine oxytocin receptors in the ewe. *Journal of Endocrinology* 106(2): 249-258. DOI:10.1677/joe.0.1060249
- Shimizu SY, Present WA, Sevier ED et al (1982) Chorionadotropin measured by use of monoclonal antibodies in a two-site immunoradiometric assay. *Clinical Chemistry* 28(3): 546-547. <http://clinchem.aaccjnls.org/content/28/3/546.abstract>
- Silva Chaves CM, Dias da Costa RL, Roncato Duarte KM et al (2017) Visual ELISA for detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in ewe serum. *Theriogenology* 97: 78-82. DOI:10.1016/j.theriogenology.2017.04.026.
- Silvia WJ (1999) The role of uterine and ovarian hormones in luteolysis: a comparison among species. *Reproduction in Domestic Animals* 34(3-4): 317-328. DOI:10.1111/j.1439-0531.1999.tb01259.x

- Simmer HH (1971) The first experiments to demonstrate an endocrine function of the corpus luteum on the occasion of the 100. birthday of Ludwig Fraenkel (1870-1951). *Sudhoffs Archiv* 55(4): 392-417. <https://www.jstor.org/stable/20775930>
- Smith PH, Engle ET (1927) Experimental evidence regarding the rôle of the anterior pituitary in the development and regulation of the genital system. *American Journal of Anatomy* 40(2): 159-214. DOI:10.1002/aja.1000400202
- Sousa NM, Remy B, El Amiri B et al (2002) Characterization of pregnancy-associated glycoproteins extracted from zebu (*Bos indicus*) placentas removed at different gestational period. *Reproduction Nutrition Development* 42(3): 227-241. DOI:10.1051/rnd:2002021
- Susmel P, Piasentier E (1992) Assessment of pregnancy in Bergamasca ewes by analysis of plasma progesterone. *Small Ruminant Research* 8(4): 325-332. DOI:10.1016/0921-4488(92)90213-N
- Szafranska B, Xie S, Green J et al (1995) Porcine pregnancy-associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophectoderm. *Biology of Reproduction* 53(1): 21-28. DOI:10.1095/biolreprod53.1.21
- Szenci O, Beckers JF, Humblot P et al (1998) Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology* 50(1): 77-88. DOI:10.1016/S0093-691X(98)00115-0
- Telugu BV, Walker AM, Green JA (2009) Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family – analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes. *BMC Genomics* 10(1): 185. DOI:10.1186/1471-2164-10-185
- Thièry JC, Martin GB (1991) Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep. *Reproduction Fertility and Development* 3(2): 137-173. DOI:10.1071/RD9910137

- Touzard E, Reinaud P, Dubois O et al (2013) Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. *Reproduction* 146(4): 347-362. DOI:10.1530/REP-13-0143
- Trapp MJ, Slyter AL (1983) Pregnancy diagnosis in the ewe. *Journal of Animal Science* 57(1): 1-5. DOI:10.2527/jas1983.5711
- Tsang CPW (1978) Plasma levels of estrone sulfate, free estrogens and progesterone in the pregnant ewe throughout gestation. *Theriogenology* 10(1): 97-110. DOI:10.1016/0093-691X(78)90084-5
- Turner CB, Hindson JC (1975) An assessment of a method of manual pregnancy diagnosis in the ewe. *The Veterinary Records* 96(3): 56-58. DOI:10.1136/vr.96.3.56
- Tyrrell RN, Plant JW (1979) Rectal damage in ewes following pregnancy diagnosis by rectal-abdominal palpation. *Journal of Animal Science* 48(2): 348-350. DOI:10.2527/jas1979.482348x
- Van Weemen BK, Schuurs AW (1971) Immunoassay using antigen - enzyme conjugates. *Federation of European Biochemical Societies - FEBS Letters* 15(3): 232-236. DOI:10.1016/0014-5793(71)80319-8
- Vandaele L, Verberckmoes S, El Amiri B et al (2005) Use of a homologous radioimmunoassay (RIA) to evaluate the effect of maternal and foetal parameters on pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentrations in sheep. *Theriogenology* 63(7): 1914-1924. DOI:10.1016/j.theriogenology.2004.08.009
- Viñoles C, Forsberg M, Banchero G et al (2001) Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55(4): 993-1004. DOI:10.1016/S0093-691X(01)00460-5
- Vredenburg VT, Felt SA, Morgan EC et al (2013) Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Xenopus* Collected in Africa (1871–2000) and in California (2001–2010) *PLOS ONE* 8(5): e63791. DOI:10.1371/journal.pone.0063791

- Wada HG, Danisch RJ, Baxter SR et al (1982) Enzyme immunoassay of the glycoprotein tropic hormones--choriogonadotropin, lutropin, thyrotropin--with solid-phase monoclonal antibody for the alpha-subunit and enzyme-coupled monoclonal antibody specific for the beta-subunit. *Clinical Chemistry* 28(9): 1862-1866. <http://clinchem.aaccjnl.org/content/28/9/1862.abstract>
- Wallace JM, Aitken RP, Cheyne MA et al (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. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility* 109: 53-58. DOI:10.1530/jrf.0.1090053
- Wallace RM, Pohler KJ, Smith MF et al (2015) Placental PAGs: Gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. *Reproduction* 149(3): R115-R126. DOI:10.1530/REP-14-0485
- Watt BR, Anderson GA, Campbell IP (1984) A comparison of six methods used for detection pregnancy in sheep. *Australian Veterinary Journal* 61(12): 377-382. DOI:10.1111/j.1751-0813.1984.tb07167.x
- Webb R, Gauld IK (1985) Genetics and physiology of follicle recruitment and maturation during seasonal anoestrus. R. Webb, I. K. Gauld, F. Ellendorff, F. Elsaesser (Dü), *Endocrine Causes of Seasonal and Lactational Anestrus in Farm Animals* (Cilt 31, s. 19-28). Dordrecht: Springer Netherlands. DOI:10.1007/978-94-009-5026-9\_4
- Wells HG (1920) *Chemical Pathology*. Philadelphia: Wiley Blackwell Saunders.
- Wenham G, Robinson JJ (1972) Radiographic pregnancy diagnosis in sheep. *The Journal of Agricultural Science* 78(2): 233-238. DOI:10.1017/S0021859600069057
- White IR, Russel AJ, Fowler DG (1984) Real-time ultrasonic scanning in the diagnosis of pregnancy and the determination of fetal numbers in sheep. *Veterinary Record* 115(7): 140-143. DOI:10.1136/vr.115.7.140
- Wide L, Gemzell CA (1960) An immunological pregnancy test. *Acta Endocrinologica* 35(2): 261-267. DOI:10.1530/acta.0.XXXV0261

- Wildeus S (2000) Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Journal of Animal Science* 77(suppl\_E): 1-14. DOI:10.2527/jas2000.00218812007700ES0040x
- Willard JM, Ruder CA, Sasser RG et al (1987) Ovine pregnancy-specific protein B concentration in the sera of early pregnant and peripartum ewes. *Journal of Animal Science* 65: 514.
- Willard JM, White DR, Wesson CA et al (1995) Detection of fetal twins in sheep using a radioimmunoassay for pregnancy-specific protein B. *Journal of Animal Science* 73(4): 960-966. DOI:10.2527/1995.734960x
- Wooding, F. B., Roberts, R. M., & Green, J. A. (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(10), 807-827. DOI:10.1016/j.placenta.2004.10.014
- Xie S, Green J, Bao B et al (1997) Multiple pregnancy-associated glycoproteins are secreted by day 100 ovine placental tissue. *Biology of Reproduction* 57(6): 1384-1393. DOI:10.1095/biolreprod57.6.1384
- Xie S, Low BG, Nagel RJ et al (1994) A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoderm. *Biology of Reproduction* 51(6): 1145-1153. DOI:10.1095/biolreprod51.6.1145
- Yuthasastrakosol P, Palmer WM, Howland BE (1977) Release of lh in anoestrous and cyclic ewes. *Reproduction* 50(2): 319-321. DOI:10.1530/jrf.0.0500319
- Zarkawi M (1997) Monitoring the reproductive performance in Awasi Ewes using progesterone radioimmunoassay. *Small Ruminant Research* 26(3): 291-294. DOI:10.1016/S0921-4488(97)00011-4
- Zoli AP, Beckers JF, Ectors F (1990) Isolation of an ovine pregnancy specific protein. *Theriogenology* 33(1): 366. DOI:10.1016/0093-691X(90)90790-Z
- Zoli AP, Beckers JF, Wouters-Ballman P et al (1991) Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biology of Reproduction* 45(1): 1-10. DOI:10.1095/biolreprod45.1.1

Zoli A, Guilbault L, Delahaut P et al (1992) Radioimmunoassay of a bovine pregnancy associated glycoprotein in serum: its application in pregnancy diagnosis. *Biology of Reproduction* 46: 83-92. DOI:10.1095/biolreprod46.1.83

Zondek B, Sulman F, Black R (1945) The hyperemia effect of gonadotropins on the ovary and its use in a rapid pregnancy test. *Journal of American Medical Association* 128(13): 939-944. DOI:10.1001/jama.1945.02860300029006

## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Degree Celcius - Santigrad Derece	Sıcaklık Birimi
%	Yüzde Oranı Simgesi	
µl	Mikro Litre	Hacim Birimi
µm	Mikro Metre	Uzunluk Birimi
2 <sup>ΔΔ</sup> Ct	İki Delta Delta Cycle Threshold	
ANOVA	Analysis of Variance	Varyans Analizi
anti-boPAG <sub>67kDa</sub>	Anti Bovine Pregnancy Associated Glycoprotein - 67 Kilo Dalton	
anti-caPAG <sub>55+59kDa</sub>	Anti Caprine Pregnancy Associated Glycoprotein 55 ve 59 Kilo Dalton	
anti-caPAG <sub>55+62kDa</sub>	Anti Caprine Pregnancy Associated Glycoprotein 55 ve 62 Kilo Dalton	
anti-caprinePAG	Anti Caprine Pregnancy Associated Glycoprotein	
anti-ovPAG <sub>55kDa</sub>	Anti Ovine Pregnancy Associated Glycoprotein 55 Kilo Dalton	
anti-ovPAG <sub>57+59kDa</sub>	Anti Ovine Pregnancy Associated Glycoprotein 57 ve 59 Kilo Dalton	
anti-wbPAG <sub>58kDa</sub>	Anti Water Buffalo Pregnancy Associated Glycoprotein 58 Kilo Dalton	
anti-wbPAG <sub>65_E-kDa</sub>	Anti Water Buffalo Pregnancy Associated Glycoprotein 65 Kilo Dalton	
anti-wbPAG <sub>73kDa</sub>	Anti Water Buffalo Pregnancy Associated Glycoprotein 73 Kilo Dalton	
anti-wbPAG <sub>76_D-kDa</sub>	Anti Water Buffalo Pregnancy Associated Glycoprotein 76 Kilo Dalton	
As#497	497 Numaralı Anti Serum	
AS#706	706 Numaralı Anti Serum	
AS#708	708 Numaralı Anti Serum	
AS#780	780 Numaralı Anti Serum	
AS#809	809 Numaralı Anti Serum	
AS#858	858 Numaralı Anti Serum	
AS#859	859 Numaralı Anti Serum	
AS#860	860 Numaralı Anti Serum	



boPAG	Bovine Pregnancy Associated Glycoprotein	
boPAG <sub>67kDa</sub>	Bovine Pregnancy Associated Glycoprotein - 67 Kilo Dalton	
BSA	Bovine Serum Albumin	
caPAG	Caprine Pregnancy Associated Glycoprotein	
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid	
CIDR	Controlled Internal Drug Release	
CL	Corpus Luteum	
cm	Centimeter	Uzunluk Birimi
Cp	Crossing Point	
cpm	Counts per Minute	
Ct	Cycle Threshold	
DNA	Deoxyribonucleic Acid	
DNAase-I	Deoxyribonuclease - I	
DNAaz	Deoksiribonükleaz	
Dr	Doktor	
E	East	
EIA	Enzyme Immunoassay	
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded	
FGA	Flugeston Asetat	
FSH	Folicle Stimulating Hormone	
g	Gram	Ağırlık Birimi
G	Gauge	Kanül Kalınlık Ölçüsü
G6PD	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	Housekeeping Gen
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone	
H <sub>2</sub> O	Dihidrojen Monooksit	

hCG	Human Chrionic Gonadotropin	
HCl	Hidroklorik Asit	
HD	Hesaplanamayan Değer	
I <sup>125</sup> -PAG	Radioactive Iodine Pregnancy Associated Glycoprotein	
IBM SPSS	International Bussiness Machine Statistical Package for the Social Sciences	
IU	International Unit	
IU/L	International Unit per Liter	
KCl	Potasyum Klorür	
kDa	Kilo Dalton	Atomik Kütle Birimi
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum Dihidrojen Fosfat	
LH	Luteinising Hormone	
M	Mol - Avogadro sayısı kadar atom ya da molekül içeren madde birimi	Konsantrasyon Birimi
MAP	Medroksiprogesteron Asetat	
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	Magnezyum Klorit 6-Hidrat	
MHz	Mega Hertz	Ses Frekans Birimi
ml	Mili Litre	Hacim Birimi
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	
N	Normal - bir çözelti hacminin bir ml'sinde yer alan çözünen özellikteki maddenin eşdeğer gram sayısıdır.	Konsantrasyon Birimi
N	North	
Na- <sup>125</sup> I	Radyoaktif Sodyum İyodit	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum Hidrojen Fosfat	
NaCl	Sodyum Klorür	
NaN <sub>3</sub>	Sodyum Azit	
NaOH	Sodyum Hidroksil	
NaPO <sub>4</sub>	Sodyum Fosfat	

ng	Nano Gram	Ağırlık Birimi
ng/μl	Nano Gram per Mikroliter	
ng/ml	Nano Gram per Mililiter	
NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	TRIS Hidroksimetil Amino Metan	
NP	Non Pregnant	
NPV	Negative Predictive Value	
NSB	Non specific bound tube	
ovCS	Ovine Corionic Somatomammotropin	
ovPAG	Ovine Pregnancy Associated Glycoprotein	
ovPAG <sub>57+59kDa</sub>	Ovine Pregnancy Associated Glycoprotein 57 ve 59 Kilo Dalton	
ovPL	Ovine Placental Lactogen	
ovPSPB	Ovine Pregnancy Sppecific Protein B	
P	Pregnant	
PAG	Pregnancy Associated Glycoprotein	
PAG-1	Pregnancy Associated Glycoprotein - 1	
PAG-2	Pregnancy Associated Glycoprotein - 2	
PBS	Phosphate Buffered Saline	
PCR	Polymerase Chain Reaction	
PEG	Polietilen Glikol	
PFA	Paraformaldehit	
pg	Piko Gram	Ağırlık Birimi
pg/ml	Piko Gram per Mililiter	
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F2 alfa	
pH	Power of Hydrogen	Asitlik Değeri
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin	Gebe Kısırak Serum Gonadotropini
PPV	Positive Predictive Value	

Real-Time PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RIA	Radioimmunoassay
RIA-1	Radioimmunoassay - 1
RIA-2	Radioimmunoassay - 2
RIA-3	Radioimmunoassay - 3
RIA-4	Radioimmunoassay - 497
RIA-497	Radioimmunoassay - 497
RIA-706	Radioimmunoassay - 706
RIA-780	Radioimmunoassay - 780
RIA-860	Radioimmunoassay - 860
RIA-srPool	Radioimmunoassay Small Ruminant Pool
RIA-wbPool	Radioimmunoassay Water Buffalo Pool
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Round per Minute
RRA	Radio Receptor Assay
serum-free PAG	Serum Free Pregnancy Associated Glycoprotein
T.C.	Türkiye Cumhuriyeti
TA	Total Aktivite
TRIS - NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	Hidroksimetil Amino Metan
wbPAG	Water Buffalo Pregnancy Associated Glycoprotein
β-hCG	Beta Human Chrionic Gonadotropin
ΔCt	Delta Cycle Threshold
ΔΔCt	Delta Delta Cycle Threshold

## **8. EKLER**

EK1 – 2017 – 3/03 karar numaralı ve 21.02.2017 tarihli U.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayı

EK2 - DDP(V)-2017/5 numaralı proje için U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Kararı (Oturum tarihi: 14.02.2018; Oturum sayısı: 2018-1)

## 9. TEŞEKKÜR

Öğrenimim sürecinde büyük bir titizlik ve sabırla, başta tez çalışmam olmak üzere her konuda hem bilimsel hem de manevi desteği ve katkılarından dolayı değerli hocam, tez danışmanım sayın Prof. Dr. R. Gözde Özalp'e, RIA çalışmalarım boyunca deneyimlerini bana sunan ikinci danışmanım sayın Dr. Olimpia Barbato' ya, Real-Time PCR çalışmalarımındaki katkı ve yardımlarından dolayı Dr. Gabriella Guelfi ve asistanı Dr. Anna Beatrice Casano'ya, tez çalışmam boyunca tez izleme komitemde bulunarak akademik tecrübeleriyle benden yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Gülnaz Yılmazbaş-Mecitoğlu'na, hem tez izleme komitemde bulunarak bana yol gösteren hem de istatistik çalışmalarımda benimle bilgilerini paylaşan sayın Dr. Öğretim Üyesi Duygu Udum'a, istatistik çalışmalarımda bana teknik destek sağlamış olan sayın Dr. Laura Menchetti'ye ve ayrıca bilimsel desteklerinden dolayı sayın Prof. Dr. Ali Rişvanlı'ya ve son olarak ta DDP(V)-2017/5 numaralı doktora projem için finans desteği sağlamış olan Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkürlerimi arz ederim.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

Burdur 1985 doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Burdur'da tamamladım. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne 2004 yılında girmeye hak kazandım. Yüksek lisans öğrenimimi 2010 yılı eylül ayında tamamlayıp, 2015 yılı şubat ayında U. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner-Doğum ve Jinekoloji doktora programına başladım. Doktora öğrenimim sürecinde 2 adet yurt dışı bilimsel makalede yer aldım. Biri U. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen (Doktora tezi projesi), diğeri TÜBİTAK tarafından desteklenen (COST projesi) iki araştırma projesinde görev aldım.

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

---

Sayı: B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/ 17

21.02.2017

Konu: Araştırma Projeniz

Sayın Doç. Dr. R. Gözde ÖZALP

Yürütücüsü olduğunuz "*RIA yöntemiyle Kanda ovPAG Ölçümüne Dayalı Koyunlarda Erken Gebelik Teşhisi*" isimli çalışmanız Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 21.02.2017 tarihli toplantısında görüşülmüş olup kurul kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

  
Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK  
HADYEK Başkanı



## ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

## BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYON TOPLANTISI

OTURUM TARİHİOTURUM SAYISI

14 Şubat 2018

2018 - 1

**KARAR 24-** Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen yürütücülüğünü Doç.Dr.Gözde ÖZALP'in yaptığı Veteriner Fakültesi'nin DDP(V)-2017/5 numaralı "RIA Yöntemiyle Kanda Gebelikle İlişkili Glikoprotein (Ovine Pregnancy Associated Glycoproteins, ovPAG) Ölçümüne Dayalı Koyunlarda Erken Gebelik Teşhisi" konulu Doktora Destek Projesinin tamamlandığına dair hazırlanan rapor ile ilgili Doç.Dr.Gözde ÖZALP'in 23.01.2018 tarihli yazısı ve eki bilgiye sunuldu.

Görüşmeler sonunda; Doktora Destek Projesinin tamamlanmış olmasından dolayı kapatılmasının uygunluğuna oy birliği ile karar verildi.



Prof.Dr.AŞI HÖCKENBERGER  
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörü