TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOYUNLARDA ERKEN GEBELİK TEŞHİSİNDE SIĞIR GEBELİK İLİŞKİLİ GLİKOPROTEİN KİTLERİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Veteriner Hekim Yasemin KAPLAN BİLMEZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU

DİYARBAKIR-2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOYUNLARDA ERKEN GEBELİK TEŞHİSİNDE SIĞIR GEBELİK İLİŞKİLİ GLİKOPROTEİN KİTLERİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Veteriner Hekim Yasemin KAPLAN BİLMEZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU

DİYARBAKIR-2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Yasemin KAPLAN BİLMEZ'in hazırladığı "**Koyunlarda Erken Gebelik Teşhisinde Sığır Gebelik İlişkili Glikoprotein Kitlerinin Kullanılabilirliğinin Araştırılması**" başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak **kabul edilmiştir.**

Danışman Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU

Jüri Üyeleri			İmza
Jüri Başkanı	Prof. Dr.	Servet BADEMKIRAN	
Üye	Prof. Dr.	Nihat ÖZYURTLU	
Üye	Doç. Dr.	İbrahim KÜÇÜKASLAN	
Üye	Doç. Dr.	Mehmet KÖSE	
Üye	Dr.Öğr.Üyesi	Birten EMRE	

Tarih: 22./06/2018

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22./06/2018 tarih ve 11 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

22./06/2018

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAN

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

22/06/2018.

Yasemin KAPLAN BİLMEZ

İmza

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde kıymetli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam değerli vaktini esirgemeyerek sabır ve ilgiyle bana yardımcı olabilmek için elinden gelenin çok daha fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda çekinmeden yanına gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen, danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren çok değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr. Nihat ÖZYURTLU'ya,

Tez çalışmalarım sırasında kan örneklerinin alındığı Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne, laboratuvar çalışmalarında bana destek veren ve her türlü yardımı yapan Doç.Dr. Mehmet KÖSE ve Dr. Öğr.Üyesi Duygu Neval SAYIN İPEK'e,

Yüksek lisans eğitimi süresince hem teorik hem pratik bilgilerinden yararlandığım Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Servet BADEMKIRAN, Doç. Dr. Mehmet Osman ATLI ve Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN'a,

TEŞEKKÜR ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖN SAYFALAR	**Sayfa No**
Dış Kapak	
İç Kapak	
Onay Sayfası	
Beyan	I
Teşekkür Sayfası	II
İçindekiler	III
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi	V
Şekiller Listesi	VI
Resimler Listesi	VII
Tablolar Listesi	VIII
TEZ METNİ	
1. ÖZET SAYFASI	
1.1. Türkçe Özet	1
1.2. İngilizce Özet	2
2. GİRİŞ ve AMAÇ	3
3. GENEL BİLGİLER	5
3.1. Koyunlarda Üreme Fizyolojisi	5
3.2. Koyunlarda Gebelik ve Gebelik Fizyolojisi	6
3.2.1. Gebeliğin maternal kabulü	7
3.2.2. İmplantasyon	9
3.2.3. Plasentasyon	10
3.3. Koyunlarda Gebeliğin Endokronolojisi	11
3.4. Koyunlarda Gebelik Tanı Yöntemleri	11
3.4.1. Radyografi	12
3.4.2. Abdominal ve rekto-abdominal palpasyon	12
3.4.3. Servikal mukus kaynatma testi	13
3.4.4. İmmunolojik testler	13
3.4.5. Vajinal smear ve vajinal biyopsi	13
3.4.6. Kaudal uterus arterinin palpasyonu	14

3.4.7. Ultrasonografi 14
3.4.8. Hormon testleri 15
3.4.8.1. Progesteron analizi 15
3.4.8.2. Östrojen hormon düzeyi 16
3.4.8.3. Plasental laktojen (PL) veya koryonik somatotropin 16
3.4.9. Gebelik protein testleri 17
3.4.9.1. Gebelik spesifik protein B (PSPB) 17
3.4.9.2. Gebelik ile ilişkili glikoproteinler 17
4. GEREÇ ve YÖNTEM 20
4.1. Çalışmada Kullanılan Hayvan Materyali ve Yapılan İşlemler 20
4.2. Laboratuvar Çalışması 21
4.3. Üretici Firma Hesaplama Kriterine Göre Sonuçların Değerlendirilmesi 23
4.4. İstatistik Analizi 23
5. BULGULAR 24
6. TARTIŞMA 27
7. SONUÇ 33
8. KAYNAKLAR 34
9. ÖZGEÇMİŞ 41
10. ORJİNALLİK RAPORU 42

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

°C	**:**	Santigrat Derece
B-Mode	**:**	Brightness Mode
CL	**:**	Korpus Luteum
dk	:	Dakika
EIA	**:**	Enzim İmmunoassay
ELISA	**:**	Enzym Linked İmmunosorbent Assay
FSH	**:**	Follikül uayrıcı hormon
GnRH	**:**	Gonadotropin salıverici hormon
IFN-tau	**:**	İnterferon-tau
iPdG	**:**	İmmunoreaktif Pregnendiol-3-Glucuronide
kDA	**:**	Kilo Dalton
LH	**:**	Lüteinleştirici hormon
MHz	**:**	Megahertz
ml	**:**	Mililitre
µl	**:**	Mikrolitre
Na-EDTA	**:**	Sodyum-EDTA
ng/ml	**:**	Nanogram/Mililitre
OD	**:**	Optik Yoğunluk
oTP-1	**:**	Koyun trofolastik protein-1
oPSPB	**:**	Koyun Gebelik Spesifik Protein B
PAGs	**:**	Gebelik ile İlişkili Glikoproteinler
$PGF_2\alpha$	**:**	Prostoglandin F2 Alfa
PSPB	**:**	Gebelik Spesifik Protein B
PL	**:**	Plasental Laktojen
RIA	**:**	Radio İmmuno assay
StAR	**:**	Steriodogenic acute regulatory
USG	**:**	Ultrasonografi

ŞEKİLLER LİSTESİ **Sayfa No:**

Şekil 1. Koyun ve ineklerde IFN-tau tarafından luteolizisin önlenmesi 9
Şekil 2. Plasentadaki çift çekirdekli dev hücreler ve bunların göçü 18
Şekil 3. Örneklere bakılan günlere ilişkin belirlenen plazma ortalama PAGs-OD değerleri 24

RESİMLER LİSTESİ **Sayfa No:**

Resim 1. ELISA cihazı (okuyucu ve yıkayıcı) 21
Resim 2. ELISA kiti laboratuvar çalışma aşamaları 23

TABLOLAR LİSTESİ **Sayfa No:**

Tablo 1. ELISA yöntemi ile yapılan işlemler (sıralı numaraya göre) 22

Tablo 2. Günlere göre ortalama plazma PAGs-OD değerleri ve yüzdeleri 25

Koyunlarda Erken Gebelik Teşhisinde Sığır Gebelik İlişkili Glikoprotein Kitlerinin Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Yasemin KAPLAN BİLMEZ
Danışmanı: Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU
Anabilim Dalı: Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı (Veteriner), Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır, 2018

1.1. TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Gebelik ilişkili glikoproteinler (PAGs) ruminantlarda gebelik sırasında çift çekirdekli trofoblastik hücrelerden sentezlenir ve maternal kan dolaşımına geçerler. Bu çalışmada, koyunlarda erken gebelik teşhisinde ticari sığır gebelik test kitinin kullanılabilirliği araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla, 13 baş gebe Konya Merinosu koyundan çiftleşme sonrası 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerde kan örnekleri alındı. Koyunların gebeliği doğumlar ile teyit edildi. Elde edilen plazma örneklerinde PAGs değerleri ticari (Bovine Pregnancy Associated Glycoproteins) ELISA kiti ile ölçüldü. Üretici firmanın talimatına göre, PAGs'ın plazma seviyesi 0,3'ün üzerindeyse gebelik için pozitif kabul edildi.

Bulgular: Pozitif PAGs değerlerinin oranı gebeliğin 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerde sırasıyla %7,69, %30,77, %69,23, %61,54, %76,92, %92,31, %100 ve %100 olarak tespit edildi. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, sığır PAGs testinin duyarlılığı gebeliğin ilerlemesiyle artmaktadır.

Sonuç: Elde edilen sonuçlara göre, gebelik pozitif için 0,3 değeri esas alındığında gebeliğin erken döneminde koyunlar için hala bir hata payı olmasına rağmen koyunlarda gebelik teşhisinin özellikle gebeliğin 35. gününden sonra sığır PAGs kiti kullanılarak yapılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Koyun, gebelik teşhisi, PAGs, inek PAGs kit

Investigation of the Usability of Bovine Pregnancy-Associated Glycoproteins Kits for Early Pregnancy Diagnosis in Ewes

Student's Surname and Name: KAPLAN BİLMEZ Yasemin
Adviser of Thesis: Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU
Department: Department of Obstetrics and Gynecology, Institutes of Health Sciences (Veterinary), Master Thesis, Diyarbakır, 2018

1.2. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Aim: Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) are synthesized by bi-nucleate cells of trophoblastic during pregnancy in ruminants, and they are secreted into maternal blood circulation. In this study, it was aimed to test the usability of bovine commercial PAGs ELISA kit for detecting early pregnancy in ewes.

Material and Method: For this purpose, the blood samples were taken on days 28, 35, 42, 49, 56, 63 and 70 after mating from 13 pregnant Konya Merino sheep. Pregnancy was confirmed by the birth. The plasma PAGs concentrations were measured by commercial ELISA (Bovine Pregnancy Associated Glycoproteins) kit. According to manufacturer's instruction, plasma level of PAGs had been accepted positive for pregnancy, if it was above than 0.3 value.

Results: Percentages of positive value of PAGs for on days 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 and 70 were recorded as 7.69%, 30.77%, 69.23%, 61.54%, 76.92%, 92.31%, 100% and100%, respectively. When considering these results, the sensitivity of the bovine PAG test is increasing during progression of pregnancy in ewes.

Conclusion: According to the obtained results, it was concluded that pregnancy diagnosis in sheep could be done using cattle PAG kit after 35th day of pregnancy, even though there is still a margin of error for sheep in the early period of pregnancy when the value of 0.3 for pregnancy positive is taken as basis.

Key Words: Sheep, pregnancy diagnosis, PAGs, bovine PAGs kit

2. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyamızda değişik nedenlere bağlı olarak gelişen birçok sorun görülmektedir. Artan nüfus ve açlık, ekilebilir alanların azalması, kirlilik, endüstrileşmenin getirdiği avantajların yanında oluşturduğu olumsuz etkiler, doğa dengesinin değişimi, biyoçeşitliliğin azalması ve daha birçok sorun bunlar arasında gösterilebilir. Bu sorunların başında gelen artan nüfus hızı ve buna orantısal olarak artış gösteren besin ihtiyacının önümüzdeki 30-40 yıl içinde yaklaşık iki katı olacağı tahmin edilmektedir (1). Dünyada, açlık ve yetersiz beslenmenin önüne geçebilecek temel beslenme kaynaklarının başında hayvancılık sektörü gelmektedir. Bu sektörün öneminin gittikçe artması doğal olarak daha verimli üretim yollarına başvurmayı zorunlu kılmaktadır.

Üretimi arttırmanın yollarından biri de reprodüktif verimliliği daha yukarılara çekmektir. Bu amaçla sürü devamlılığı ve döl verimi kayıplarını önlemek için hayvancılık alanında yapılacak yeni uygulamalar hem üreticilere hem de ekonomiye katkı sunacaktır.

Hayvancılık sektörü içinde önemli bir yeri olan koyun yetiştiriciliğinde karlılığı sağlayabilmek için her yıl en az bir defa yavru elde edilmesi hedeflendiğinden bu hayvanların her yıl gebe kalması istenmektedir. Modern koyun yetiştiriciliğinde verimin arttırılması için, üremelerinin programlı bir şekilde kontrol edilmesi gereklidir (2). Bu kontroller çerçevesinde önemli olan hususlardan biri de gebelik kontrolleridir. Döl verimi kayıplarının önüne geçmenin yollarından biri de gebelik teşhisinin zamanında ve doğru bir şekilde yapılması olacaktır. Koyun yetiştiriciliğinde gebelik tanısının erken dönemde yapılması ekonomik açıdan büyük öneme sahiptir. Gebeliğin erken tanısıyla gebelere verilecek rasyonların belirlenmesi dolayısıyla yavruların doğum ağırlığının da normal olması sağlanmış olacaktır. Ayrıca erken gebelik tanısında gebe hayvanların kesimi de önlenmiş olur. Sürüde gebe olmadığı tespit edilen hayvanlar yeniden çiftleştirilebildiği gibi yapağı verimi için beslenmeye alınabilir veya sürüden çıkarılarak ekonomik açıdan fayda sağlanabilir (3, 4). Koyunlarda gebelik teşhisi için kullanılabilecek farklı yöntemler (ultrasonografi, gebelik ilişkili glikoprotein, radyografi, abdominal palpasyon, vaginal biyopsi, servikal mukus kaynatma testi, vaginal smear, serum progesteron analizi vb.) olmasına rağmen erken gebelik teşhisi

klinik şartlarda transrektal ultrasonografi (USG) yöntemi ile yapılabilmektedir (4, 5). Ultrasonografi ile erken dönemde gebeliğin teşhisi için klinisyen veteriner hekimlerin hem deneyimli olmaları hem de bu ekipmanı kliniklerinde bulundurmaları gerekmektedir. Bu yönteme alternatif olarak son yıllarda erken gebelik teşhisinde kullanılabilecek farklı yöntemlere yönelimler olmaktadır. Bu yeni yöntemlerden biri de koyunlarda gebelik ile ilişkili glikoproteinlerin tespitidir (6). Gebelik ile ilişkili glikoproteinler, gebelik dönemine özgü moleküller olup, bu molekülleri tespit edebilen sahada kullanılabilir ticari kitlerinin de geliştirilmesi ile ruminantlarda erken gebelik teşhisi yapılabilmektedirler (3). Erken gebelik teşhisinin yapılması ile gebe kalmayan hayvanlar erken tespit edilip kuzulama verimliliğinin daha üst seviyelere çıkarılması sağlanmış olacaktır.

Sunulan tez çalışması ile koyunlarda gebeliğin 3. haftasından itibaren plasentasyonun tamamlanması aşamasına kadar (21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günler) gebelik spesifik protein ailesine ait olan PAGs seviyesi, Enzym Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile daha ekonomik ve ulaşılabilirliği kolay olan ticari inek PAGs kiti kullanılarak araştırılmıştır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Koyunlarda Üreme Fizyolojisi

Koyunlar, mevsime bağlı üreme özelliği gösteren hayvanlardır. Mevsimden ayrı olarak bulundukları bölge, iklim şartları ve beslenme koşulları da üreme faaliyetleri üzerine etkili olmaktadır. Gün ışığındaki değişim seksüel aktivitelerine etki etmekte olup, gün ışığı miktarında karanlık zaman periyodunun artmaya başlamasından itibaren üreme mevsimine geçişler görülmektedir (7, 8). Öte yandan koyunlarda üreme faaliyetleri tropikal ve subtropikal bölgelerde ya tamamıyla mevsim dışı veya kısa aralıklar şeklinde olmaktadır. Tropikal bölge ırkları yıl boyu östrus gösterebilirken, İngiliz ırkları bunlardan farklı olarak uzun bir anöstrus periyoduna sahiptir. Birçok koyun ırkında üreme mevsimi kuzey yarım kürede yaz ayları boyunca veya erken sonbahar döneminde başlamakta olup üreme sezonunun süresi koyun ırkı ve diğer faktörlere bağlı olarak kış aylarına doğru son bulur. Koyunlarda üreme faaliyetlerini temel olarak düzenleyen unsur fotoperiyod mekanizmasıdır. Ancak, değişik birçok faktör de (sıcaklık, beslenme, koku yaş ve sosyal etkileşim) üreme mevsimi üzerine etkili olmaktadır (2, 9, 10, 11).

Koyunlarda üreme mevsiminde östrus siklusu ortalama 17 gün sürer ve üreme mevsiminin bitimine kadar gebe kalmadığı sürece tekrar eder. Üreme sezonu sonunda gebelik şekillenmemiş ise seksüel aktivite son bulur. Anöstrustan üreme mevsimine geçiş yavaş olmakta ve ilk korpus luteum (CL) formasyonundan sonra erken regrese (5-6 gün) olduğundan bu dönemde sikluslar kısa olmaktadır (2, 9, 11). Üreme mevsiminde yaklaşık olarak 16-17 gün süren siklus uzunluğu proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus evrelerini kapsar. Siklus, ovulatör follikülün büyüdüğü ve ovulasyonun gerçekleştiği 2-3 günlük süreci kapsayan folliküler faz ile bir veya birden fazla CL bulunduğu luteal fazdan oluşmaktadır (2, 11).

Mevsimsel üreyen hayvanlarda gün ışığı süresinin üreme fizyolojisi üzerine etkisi önemlidir. Gün ışığı süresindeki değişimler hem dişilerde hem de erkeklerde seksüel aktivite üzerine etki etmektedir. Mevsimsel poliöstrik olan koyunlarda seksüel siklus hipotalamus, hipofiz, ovaryumlar ve uterus tarafından salınan hormonlar ile kontrol edilir (10, 11). Günlerin kısalması ile retinaya gelen ışık

miktarı azalır ve epifizden salınan melatonin miktarı artar. Epifiz bezi, superior sempatik ganglionlardan uyarılar alan postganglionik sempatik sinirler ile innerve edilir. Retinada fotoreseptörler tarafından algılanan ışık ve karanlık, monosinaptik retinohipotalamik yolla hipotalamustaki suprakiazmatik nukleuslara iletilir. Hipotalamusta eminensiya medianın uyarımı, buradaki nörosekretorik hücrelerden gonadotropin salıverici hormon (GnRH) salınımına sebep olur. Hipotalamo-hipofizyal portal dolaşım ile hipofize gelen GnRH, burada gonadotropinlerin salınımını uyarır. Artan follikül uyarıcı hormon (FSH) seviyesi ile birden fazla follikül büyür ve antral follikül seviyesine erişir. Gelişen follikül etrafında bulunan teka ve granuloza hücrelerinden salınan östradiol, folliküler sıvıda birikir. Artan östradiol etkisi ile östrus davranışları gözlemlenirken, östradiol granuloza hücrelerinde luteinleştirici hormon (LH) reseptörlerinin sentezine sebep olur. Östradiolün maksimum seviyeye ulaşması negatif ve pozitif geri bildirim mekanizmalarına neden olur. Negatif geri bildirim ile FSH bazal seviyeye inerken, pozitif geri bildirim ile LH miktarında artış gerçekleşir. LH etkisi ile follikül maksimum olgunluğuna erişir ve LH pikinden yaklaşık 14 saat sonra ovulasyon kendiliğinden oluşur (2, 11, 12). Ovulasyon yerinde bulunan hücreler lüteinleşmeye başlayarak CL şekillenmeye başlar ve progesteron salgılar. Siklusun 12-14. günlerinde uterusta canlı bir embriyo yok ise uterustan salgılanan Prostaglandin F2 Alfa (PGF2α), CL'un regresyonunu sağlar (5).

3.2. Koyunlarda Gebelik ve Gebelik Fizyolojisi

Koyunlarda gebelik süresi ortalama 150 gün olup blastogenezis, embriyonal ve fetal dönem olmak üzere üç dönemi içermektedir. Blastogenezis, fertilizasyondan gebeliğin maternal kabulüne kadar olan dönem; embriyonal dönem, metamorfozis evresi (farklılaşma) ve organogenezisi kapsayan dönem; fetal dönem ise embriyonal dönemin sonundan doğuma kadar olan süreci kapsamaktadır (13).

Blastogenezis dönemi; erkek ve dişi pronükleuslarının birleşmesi ile oluşan zigot birbirini takip eden mitotik bölünmeler geçirir. Koyunlarda 24 saatte 2, 1-3 günde 4, 3-5 günlerde ise 8 hücreli hale gelir. Birbirini takip eden bu bölünmeler ile embriyo

büyür ve 8-16 hücre aşamasında uterusa ulaşarak blastosist haline gelir. Bu aşamadan sonra 7-8. günlerde embriyoda sarkma (hatching) şekillenir (5, 13).

Embriyonal dönem; metamorfoz veya farklılaşma ve organogenezis evresi olarak da tanımlanan bu dönem, blastogenezis döneminin (koyunda 12-17. gün) sonundan gebeliğin yaklaşık olarak 32-34. gününe kadar olan evreyi kapsar. Bu dönemde embriyonun minyatür bir modeli oluşmaktadır. Embriyonal dönemde farklılaşma ve organogenezis olaylarına ilaveten embriyonik zarların oluşması ve konseptusunda uterus duvarına tutunması hazırlıkları başlar (5, 13).

Fötal dönem; koyunlarda gebeliğin 32-34. gününden doğuma kadar olan süreci kapsayan en uzun dönemdir. Bu dönemde yavrunun büyümesi ve yapısındaki değişimler izlenir. Bu dönemde histiyotrofik beslenmenin yerini hemotropik beslenme alır. Bu dönem boyunca doku, organ ve sistemlerin farklılaşması devam eder. En fazla büyümenin gerçekleştiği bu dönemde fötüs besin ihtiyacını plasenta vasıtası ile maternal dolaşımdan karşılar (5, 13).

3.2.1. Gebeliğin Maternal Kabulü

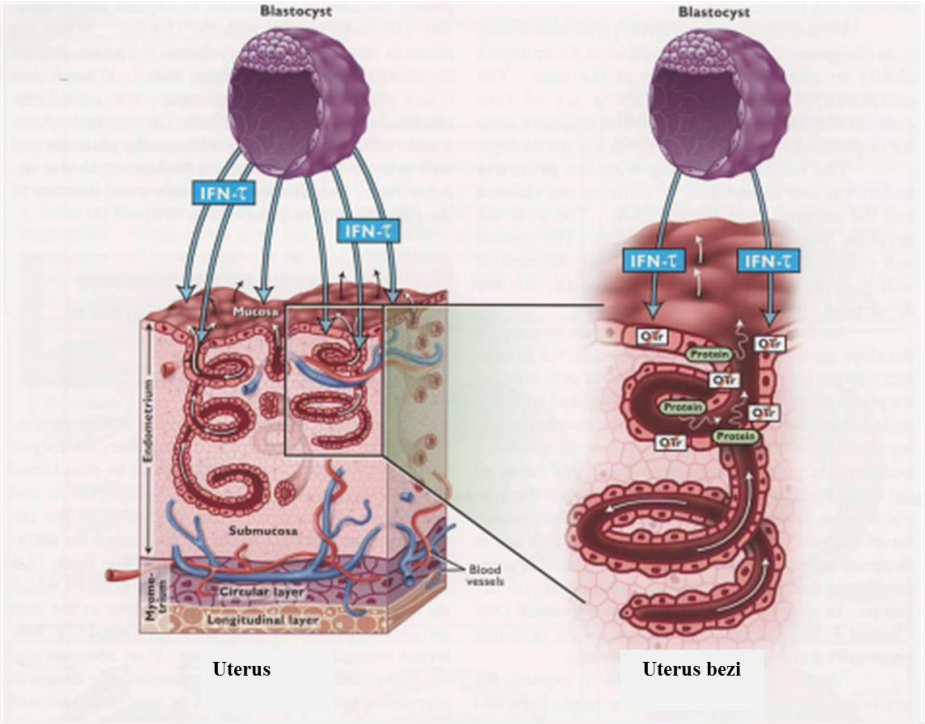
Embriyonun varlığının anne tarafından tanınmasını içeren mekanizmanın bütününe gebeliğin maternal kabulü denir (14). Koyunlarda gebeliğin anne tarafından tanınması, yavru ve anne arasında bağışıklık, kanlanma ve hormonal sistemi kapsayan karmaşık bir olaydır. Bu kompleks döngüde embriyonun varlığının anne tarafından kabulü ile luteolizis durur, progesteron sentez ve salınımını sağlayan korpus luteum devamlılığını sürdürür. Burada esas önemli olan nokta antilüteolizis mekanizmasıdır (13, 15). Koyun ve keçilerde antilüteolizis mekanizması benzerdir. Serbest dolaşan blastosist, spesifik proteinler üretir. Koyunlardaki bu spesifik proteinler ovine trofolastik protein-1 (oTP-1) olarak adlandırılmakta ve aktif interferonlar veya interferon tau (IFN-tau) olarak da bilinmektedir. İnterferon-tau inek ve koyunlarda gebeliğin 12-24. günleri arasında embriyonun blastosist safhasında trofoektodermin tek çekirdekli hücreleri tarafından salgılanır ve gebeliğin anne tarafından tanınmasında rol oynayan bir sitokindir (13, 14-16).

En fazla lökositler, lenfositler, fibroblastlar ve trofoblastlar tarafından üretilen glikoprotein yapısındaki bu moleküler yapının ağırlığı 18-20 bin daltondur. Güçlü antiviral, antiproliferatif ve immünomodülatör etkiye sahip olan IFN-tau lokal etkili olup, uterus venlerinde ve lenf dolaşımında belirlenemez. Ruminatlarda embriyonun blastosist safhasından preimplantasyonun başladığı süre boyunca IFN-tau trofoektodermin tek çekirdekli hücrelerinden salınır (13, 14, 16).

Gebeliğin şekillenmemiş olduğu östrüs siklusunda bu evrenin sonlarına doğru gelişmekte olan folliküllerde östrojen seviyesinde artış olur, östrojenin artışı ile uterus endometriyumunda bulunan oksitosin reseptör sayısı da artar. Buna ilaveten, ovaryumda gelişmekte olan folliküllerden salınan östradiolün etkisi ile hipotalamustaki oksitosin salınım merkezi uyarılarak nörohipofizden sık aralıklar ile oksitosin salınımı başlatılır. Hem oksitosin hem de oksitosin reseptör sayısındaki bu artış PGF2α salınımının daha fazla ve sık olmasına neden olur. Artan PGF2α, CL'un luteolizisine (fonksiyonel ve yapısal regresyon) neden olarak plazma progesteron düzeyinin bazal seviyelere dönmesini sağlar ve siklik durum devam eder. PGF2α, CL'a giden kan akışını azaltarak luteal dokunun beslenebilmesini ve steriodogenik akut regulator (StAR) protein aktivitesini engeller. Progesteron sentezinde önemli bir yeri olan StAR, kolesterolü mitokondriye taşıyan proteindir ve PGF2α bu mekanizmayı engelleyerek progesteron sentezinin de önüne geçmiş olur (13-17).

Gebeliğin şekillendiği durumlarda ise IFN-tau endometriyal östradiol reseptörlerini baskı altında tutar ve oksitosin reseptörlerinin sentezini önler. Oksitosin reseptörlerinin sentezinin engellenmesi ile PGF2α salınımının önüne geçilir ve CL'un luteolizisi engellenir (13, 14, 18). Buna ilaveten, IFN-tau lüteotropik bir etkiye sahip olup CL tarafından üretilen progesteron sentezinde de artışa neden olmaktadır (Şekil-1) (16-18). Antiluteolitik etkiye sahip olan IFN-tau, konseptusun gelişimine ve implantasyon aşamasında uterusta gerekli olan birtakım faktörlerin ekspresyonunda da düzenleyici bir etkiye sahiptir (19).

Gebeliğin maternal kabulündeki diğer bir görüş ise IFN-tau'nun 9-ketoredüktaz enzimini uyararak PGF2α'nın, Prostaglandin E2'ye dönüşümünü sağlamasıdır. Prostaglandin E2, ovaryum damarlarında vazodilatasyona ve sonuçta luteal dokunun kanlanmasına neden olarak luteotropik etki oluşturmaktadır (13, 18).



Koyun ve inekte blastositteki trofoblast hücrelerince üretilen IFN-tau, uterusdaki oksitosin reseptörlerini bloke ederek PGF2alfa sentezinin inhibe edilmesini sağlar. Buna ilaveten, konseptusun beslenmesi için uterus lumenine verilecek protein üretimine sebep olur.

Şekil 1. Koyun ve ineklerde IFN-tau tarafından luteolizisin önlenmesi (17).

3.2.2. İmplantasyon

İmplantasyondan önce embriyo uterusa tutunmadan, uterus bezlerinden üretilen ve konseptusun gelişiminde etkili olan sekresyonlar ile beslenmektedir. İmplantasyonun şekillenmediği bu dönemdeki beslenmeye histiyotrof beslenme denir. Daha sonra yavru keselerinin gelişimi ile birlikte embriyonun vücut yapısı gelişir. Bu gelişimin devam etmesi ile ekstraembriyonik keselerin endometriyuma bağlantısı sağlanır. Uterusa ulaşan embriyo bu aşamada endometriyumla yavru zarları aracılığı ile bağlantı kurmaya başlar (13, 14). İmplantasyon sürecinde embriyo trofoektoderm hücreleri aracılığıyla oluşturulan ekstra embriyonik keseler vasıtası ile endometriyuma tutunmaya başlar. Embriyonik trofoblast ve maternal endometriyum epiteli arasında sürekli temas sağlanır. Koyun ve keçilerde gebeliğin yaklaşık 12. gününde başlayan implantasyon, hatched blastosist aşamasında gerçekleşir, yavaş gelişir ve gebeliğin yaklaşık 22. gününde tamamlanır (13, 20, 21). İmplantasyon, uterus luminal epitelyumu ve konseptus trofoektoderminin plazma

membranın karşılıklı ilişkisi ile başlayıp plasentanın oluşması ile sonuçlanan olaylar zinciridir. Bu olaylar, blastosistin embriyoya tutunması, oryantasyon ve zona pellusidanın ortadan kalkmasını içerir. Ruminantlarda üç aşamalı olarak da ifade edilmektedir. İlk aşamada konseptus uzar, ikinci aşama; embriyonal zarların trofoblast tabakası ve uterus endometriyum epiteli arasındaki karşılaşma aşamasıdır. Son olarak üçüncü aşamada ise epitelyokoryal plasentanın hücresel yapılarında artış gerçekleşir (13, 21, 22). Bütün memelilerde zona pellusidanın yırtılması ile başlayan implantasyonun gerçekleşmesi için öncelikle tek çekirdekli trofoblast hücrelerinin endometriyuma yapışması gerekmektedir. Bu iki tabakanın yapışmasını takiben çok çekirdekli büyük hücrelerin görüldüğü sinsitya formasyonu şekillenir (13, 21).

3.2.3. Plasentasyon

Yavrunun koryon ve annenin uterus endometriyumu arasında yavrunun gelişimini, korunmasını ve yavru için gerekli olan birtakım hormonal ve moleküler işlevleri yerine getiren ekstra embriyonal dokuya plasenta denir. Plasenta gebeliğe özgü bir yapıdır. Amniyon, allontois ve koryon tabakalarından oluşan plasenta gebelik süresince fötusun beslenmesi ve gelişimi için hayati öneme sahip olup dolaşım, boşaltım ve solunum gibi görevleri yerine getirir. Buna ilaveten, gebelik süresi boyunca hormonal üretim ve immünolojik bariyer gibi görevleri vardır. Plasenta implantasyon ile birlikte şekillenmeye başlar ve gebelik süresince salgıladığı östrojen, progesteron, plasental laktojen, IFN-tau ve plasental büyüme hormonlarının etkisi ile endometriyal bezlerin uzunluğuna ve genişliğine büyümesini sağlar (13, 22). Koyun ve keçilerde implantasyon ile birlikte başlayan plasentasyon, gebeliğin yaklaşık 50-60. günleri arasında tamamlanır (5, 13, 23).

Koyunlarda plasenta histolojik olarak sindesmokoryalis olup, jinekolojik yönden yüzeysel epitel kaynaşmasından dolayı intermedier tip plasenta olarak adlandırılmaktadır. Kotiledon, koryon üzerindeki villusların belli noktalarda kümelenmesi ile şekillenen yapılardır. Sayıları 80-100 adet civarındadır. Yavru tarafından gelen kotiledonlar, anne tarafında bulunan karunkulalar ile birleşerek plasentomları oluştururlar. Anne tarafında bulunan karunkulalar implantasyon alanlarının olduğu yerler olup implantasyon evresinde emdometriyumda derin

kriptler oluştururlar. Kotiledonar villiler bu kriptlere dallanarak girer ve gelişirler. Gebeliğin ilerlemesi ile karunkular kriptler derinlemesine gelişerek plasental kanlanmanın artışını ve dolayısı ile büyüyen yavruya da gerekli olan daha fazla miktarda kan akışının olmasını sağlamaktadır (5, 13, 22).

3.3. Koyunlarda Gebeliğin Endokrinolojisi

Koyunlarda gebelik boyunca fertilizasyon, yavrunun anne tarafından kabulü, yavrunun gelişimi ve sağlıklı bir biçimde doğumuna kadar uterus ve embriyo üzerine etkili olan bir takım hormonal mekanizmalar bulunmaktadır. Bu süreçte esas önemli olan hormonlar progesteron ve östrojendir. Buna ilaveten prostaglandinler, kortizol, relaksin, plasental laktojen ve prolaktin gibi hormonlarda belirli dönemlerde önemli fonksiyonlar göstermektedirler (5, 13).

Koyunlarda gebeliğin devamını sağlayan hormon progesterondur. Gebeliğin şekillenmesinden doğuma kadar olan süreçte etkin olan progesteron, doğumun başlaması ile etkinliğini östrojene bırakır. Keçilerde progesteron kaynağı lüteal yapı iken koyunlarda gebeliğin ilk 60-90 günü lüteal yapıdan daha sonraki kısımda ise plasental kaynaklı progesteron devreye girer (13, 18, 24).

Koyunlarda gebeliğin ilk yarısında yavaşça artan progesteron 50. günde 2-3 ng/ml'ye ulaşır ve gebeliğin ilk üç ayından sonra hızlıca artarak yaklaşık olarak 125. gün civarında pik yaparak 12-20 ng/ml'ye erişir. Doğumun başlamasından birkaç gün önce de bu seviye 1 ng/ml'ye kadar düşer.

Gebelik süresince östrojen 70. gün civarında artar (0,1-0,7 ng/ml) ve doğumdan iki gün önce pik (15-50 ng/ml) yapar (7, 13, 18).

Plasental laktojen gebeliğin 50. günü civarında belirlenebilir, 120-130. günlerde maksimum seviyesine ulaşarak varlığını sürdürür. Plasental laktojen, fötal gelişim ve memelerin büyümesinde rol oynar (13, 25).

3.4. Koyunlarda Gebelik Tanı Yöntemleri

Gebeliğin erken tanısı koyunculuk sektöründe önemli bir yere sahiptir. Gebe olmayan hayvanlar daha fazla beslenmez ve sürüden çıkarılmaları daha ekonomik

olabilir. Sürü içerisinde gebe ve gebe olmayan koyunların ayırt edilmesi, üreme problemlerinin azaltılmasına yardımcı olur. Gebe olanlarda yavru sayısının tespiti ile uygun beslenme şartları sağlanarak gebelik toksemisi önlenir. Doğum öncesi beslenme maliyeti, uygun doğum ağırlığı, yaşayabilen kuzular ve güç doğum riskleri de minimize edilir. Buna ilaveten gebeliğin aşamasının doğru tespit edilmesi ile kuruya çıkacak dişilerin daha iyi gözlemlenmesini sağlar (3, 26).

Koyunlarda gebelik tanısı amacı ile birçok yöntemden faydalanılmaktadır. Bu yöntemlerin özellikle saha şartlarına uygun, pratik ve ekonomik olması tercih sebebidir. Gebelik teşhisinde birçok değişik yöntem bulunmasına rağmen bunların bazıları erken sonuç vermediğinden, bazıları anne ve yavruya zararlı etkileri olduğundan ve bazılarının da duyarlılığı düşük kaldığından bu yöntemlere pek başvurulmamaktadır. Bu yüzden, daha çok real-time USG ile hem pratik hem de saha şartlarına uygun ve güvenilir gebelik teşhisleri yapılabilmektedir. Buna ilaveten, son yıllarda saha şartlarında gebelik teşhisi için pratik kitlerden de faydalanılmaktadır (5, 13, 26). Gebelik teşhisinde kullanılan yöntemlerden bazıları aşağıda sıralanmıştır.

3.4.1. Radyografi

Koyunlarda gebeliğin 65-70. gününden itibaren yavrunun iskelet sistemi belirginleştiğinden dolayı radyografi ile gebelik teşhisi % 100'e yakın ve yavru sayısı da % 90 oranında tespit edilebilir. Bu yöntem doğruluğu ve hızlı bir yöntem oluşu gibi avantajlarına rağmen donanım maliyeti, büyük sürülerde çıkarabileceği iş yükü (bir günde en fazla 400-600 koyun muayene edilebilir) ve uygulayıcı ile anne ve yavruya potansiyel zararlarından dolayı kullanım alanı kısıtlıdır (3, 13, 18, 26, 27).

3.4.2. Abdominal ve rekto-abdominal palpasyon

Abdominal palpasyon ile gebeliğin 90-130. günlerinde, %80-90 oranında gebelik teşhisi yapılabilmektedir. Abdominal palpasyonda karın duvarı her iki tarafından el ile kavranarak muayene edilir. Koyunlara muayeneden 12 saat önce yem ve su verilmemesi muayenelerini kolaylaştırır ancak, yağlı hayvanlarda yine de palpasyon zor olmaktadır. Bu yöntem gebeliğin çok geç dönemlerinde yapılabilmesinden dolayı kullanılabilirliği açısından pek önemi yoktur (5, 13, 27).

Rekto-abdominal palpasyonda kayganlaştırılmış bir cam çubuk (1,5x50 cm) sırt üstü yatırılmış koyunun rektumdan yavaşça geçirilerek bir miktar ilerletilir. Diğer serbest olan el abdomenin arka kısmına yerleştirilerek cam çubuk manipüle edilir. Gebeliğin erken aşamalarında bu yöntem ile teşhis düşüktür ama gebeliğin ilerleyişi ile birlikte, çiftleşmeden 85-109 gün sonra %97-100 oranına kadar doğruluğu artmaktadır. Bu yöntem basit, ucuz ve hızlı olmasına rağmen çoğul gebelik teşhis oranı düşüktür. Ayrıca rektuma zarar verebilir ve abortlara neden olabilir (3, 26, 27).

3.4.3. Servikal mukus kaynatma testi

Servikal mukusun yapısı gebelik ve siklusun dönemlerine göre farklılık göstermektedir. Gebelik döneminde servikal mukusun yapısında bulunan glikoproteinler ve karbonhidrat yapısındaki moleküllerin değişimini esas alan gebelik teşhis yöntemidir. Bu yöntem; serviksin önünden alınan mukus örneğinin kaynayan suda 2-3 dakika bekletilip mukusun dağılıp dağılmama özelliğine bakılarak gebe veya gebe değil teşhisi konulması esasına dayalıdır. Kaynayan suda servikal mukus dağılmamış ise gebelik pozitif, servikal mukus küçük parçalar halinde dağılmış ise gebelik negatif olarak değerlendirilir. Koyunlarda bu testin doğruluk oranı %80 olarak bildirilmiştir (4).

3.4.4. İmmunolojik testler

Bu yöntemde kan serumunda rozet inihibisyon testi ile erken gebelik faktörü tespit edilmeye çalışılmaktadır. Bu test ile gebelik erken dönemde teşhis edilebilir ancak pratikteki zorlukları açısından uygulanması sınırlıdır (5, 13).

3.4.5. Vajinal smear ve vaginal biyopsi

Koyunlarda gebelik ve siklus dönemlerine göre vajina epiteli histolojik olarak değişimler göstermektedir. Gebeliğin erken döneminde (15-18. günler) vajinal smearde birçok farklı hücre izlenir. Erken dönemdeki bu yapısal hücre değişikliği östrus siklusundaki bulgularla benzerdir. Bu hücre tipleri küçük ve büyük yassı hücre tipleri ile bir miktar keratinize hücreleri içerir. Vajinal smearde keratinize poligonal hücreler gebe koyunlarda gebe olmayanlara göre daha azdır (13, 28).

Gebeliğin 40. gününden sonra vaginal biyopsi tekniğiyle yaklaşık olarak %93-97 oranında gebelik teşhisinin yapılabildiği bildirilmiştir. Gebe koyunlarda vaginal epitel 5 katmandan oluşup bu katmandaki hücreler kübik ve prizma şeklindedir. Gebe olmayanlarda ise vajina epiteli 10 tabakadan daha fazla olup bu katmandaki hücreler düz ve poligonal yapıdadır (5, 13, 27).

3.4.6. Kaudal uterus arterinin palpasyonu

Arterin pulzasyonu ile gebeliği teşhis etmeye dayalı bir yöntemdir. Bu yöntem koyunlarda gebeliğin 50-60. gününden itibaren uygulanabilir. Gebelik ilerledikçe arteria uterina kaudalis sert ve kalın bir hal alır ve vajinaya yerleştirilen parmak ile arterin pulzasyonu kolayca fark edilebilir (3, 13).

3.4.7. Ultrasonografi

Ultrasonografi (USG) yüksek ses dalgaları kullanılarak iç organların ve dokuların muayenesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Değişik tipte ultrasonografik görüntüleme şekilleri olmasına rağmen en sık kullanılan gerçek zamanlı B-mod USG'dir. Gerçek zamanlı USG ile hem yavrunun kalp atımı hem de hareketleri görülebilir. Ultrason cihazında değişik tipte problar (linear, sektör ve konveks gibi) olup frekans aralığı (3,5, 5,0 ve 7,5 MHz) da değişkenlik göstermektedir (29).

Küçük ruminantlarda gebelik tanısı, yavru sayısının belirlenmesi ve yavruların canlı olup olmadığının tespiti amacıyla USG muayenesi sıklıkla kullanılmaktadır. Ultrasonografi ile koyunlarda gebelik teşhisi hızlı, güvenli ve pratik bir yöntemdir. Ultrasonografik muayene hem transrektal hem de transabdominal yolla yapılabilir. Gebeliğin yaklaşık 30-35. gününe kadar transrektal ultrasonografi ile 30. günden sonra transabdominal yöntem ile gebelik teşhisi yapılabilmektedir. Gebeliğin 34-120. günleri arasında açlık çukurunun altından memelerin yan tarafındaki tüysüz alandan abdominal yöntem ile iyi sonuçlar alınabilmektedir. Erken dönemlerde (22. günden itibaren) USG ile teşhis yapılabilmesine rağmen erken embriyonik ölümler, uterusta sıvı birikiminin vereceği anekoik görüntüler, kan damarları ve bazı patolojik durumlar sebebi ile yanlış sonuçlar elde edilebilir. Bu yüzden 30-35. günden sonra teşhis yapılması daha iyi sonuçların elde edilmesini sağlar (5, 13, 30, 31).

Embriyonik kese çiftleşmeden sonra ilk kez 19-20. gün civarında görülebilir. Yirmi beşinci günden itibaren embriyonik kesenin idrar kesesinin kraniyalinde lokalize olan anekoik bir yapıda olduğu belirlenir. Yavrunun kalp atımları 18-23. günlerde izlenebilirken plasentomlar gebeliğin 26-35. günlerinde görülebilir (26, 32). Gebeliğin ilk 2 ayı boyunca gebe olmayan koyunların teşhisi için 7,5 MHz transrektal ultrasonografinin güvenilirliği düşüktür. Embriyonik veya fötal kayıplardan dolayı yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir. Gebeliğin 25. gününden önce 5 MHz'lik transrektal USG ile gebelik tespiti düşüktür (%12). Daha sonraki günlerde ise bu duyarlılık artmakta, 25-50. günlerde ırka, yaşa ve yapılan muayene tekniğine göre % 65-87 arasında olmaktadır. Transabdominal yolla ilk olarak gebeliğin 25-30. gününde değerlendirme yapılabilir. Bu tekniğin duyarlılığı gebeliğin 29-30. gününden sonra daha yüksektir ve gebeliğin 46. gününde gebeliğin 106. gününe kadar % 100 doğruluk oranına yaklaşır (26, 30).

Doppler USG cihazı ile yavrunun kalp atımları, fötal ve uterustaki damarların kan akışkanlığı tespit edilir. Bu yöntem ile koyunlarda gebeliğin yaklaşık 41-60. günlerinden itibaren gebelerde %82, gebe olmayanlarda ise %91 oranı ile gebelik teşhis sonucuna varılabildiği bildirilmektedir. Bazı araştırmacılar ise bu oranı daha düşük (%68 ve %84) bulmuşlardır. Gebeliğin 111. gününden itibaren ise %100 doğruluk oranı ile gebelik teşhis edilebilmektedir (3, 13, 26).

3.4.8. Hormon testleri

Koyunlarda gebelik teşhisi amacıyla progesteron, östron sülfat ve plasental laktojen gibi hormonal yöntemler kullanılabilmektedir.

3.4.8.1. Progesteron analizi

Kan progesteron tespiti fonksiyonel CL varlığı açısından güvenilir bir yöntemdir. Koyunlarda plazma progesteron konsantrasyonu çiftleşmeden sonra 18. günden itibaren enzim immunoassay (EIA) ve radio immunoassay (RIA) yöntemi ile gebelikler tespit edilebilir. Erken embriyonik ölümler, uterus ve ovaryum patolojileri nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar alınabilir. Gebeliğin 17-18. günlerinde gebe

koyunlarda %85-100, gebe olmayanlarda ise %100 oranında doğru tanı konulabilir (3, 13, 26).

Gebeliğin 60. gününden doğuma kadar olan süreçte dışkıdan immunoreaktif Pregnendiol-3-Glucuronide (iPdG) gibi progesteron metabolitine EIA yöntemi ile bakılarak %100 doğruluk ile gebelik teşhisinin yapıldığı bildirilmiştir. Progesteron değeri yavru sayısı 2 ve 3 olan koyunlarda tek yavru olanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Çiftleşme sonrası gebeliğin yaklaşık 100. gün civarında yavru sayısı ve progesteron düzeyi arasında %74-88 oranında bir doğruluk tespit edilmiştir. Buna karşın, başka araştırıcılar çoğul gebelik teşhisini %25 doğruluk oranı ile tespit edebilmişlerdir (26, 33).

Koyunlarda plazma progesteron seviyesinden ayrı olarak süt progesteron analizine de bakılarak gebelik teşhisi yapılabilmektedir. Çiftleşmeden sonra 22-26. günlerde gebelerde süt progesteron seviyesi 10 ng/ml'nin üzerine çıkmaktadır. Sütte bulunan bazı proteinlerden dolayı gebe olan hayvanlardaki doğruluk oranı düşük çıkabilmektedir (13).

3.4.8.2. Östrojen hormon düzeyi

Gebe koyunlarda fötoplasental yapının oluşması ile periferal plazmada östron sülfat seviyesi artmaktadır. Gebeliğin 70. günü civarında 0,1- 0,7 ng/ml arasında tespit edilebilir, sonra doğumdan 2 gün öncesine kadar artış gösterir (15-50 ng/ml). Gebeliğin 85. gününde gebe ve gebe olmayan koyunlar arasında östron sülfat açısından önemli bir fark vardır. Ancak, hayvanlar arasında hormon seviyesi değişkenlik gösterdiğinden 0,1 ng/ml seviyesi baz alındığında gebe olmayanlar %44, gebe olanlar %87,9 oranında doğru olarak belirlenebilmektedir (3, 26).

3.4.8.3. Plasental laktojen (PL) veya koryonik somatotropin

Plasental laktojen veya diğer adı ile koryonik somatotropin olarak bilinen bu hormon meme gelişimi ve laktasyondan sorumlu olup gebeliğin 55. gününden itibaren artış gösterir. Koyunlarda PL, RIA yöntemiyle gebelerde %97, gebe olmayanlarda %100 doğruluk oranı ile gebeliğin 64. gününde belirlenebilmektedir (3, 13, 26).

3.4.9. Gebelik protein testleri

3.4.9.1. Gebelik spesifik protein B (PSPB)

Gebelik spesifik protein B ilk olarak inek plasentasında belirlenmiştir. Fötal trofoektodermin binüklear hücrelerince sentezlenir ve fizyolojik olarak gebelik boyunca CL'un devamlılığını sağlamaktadır ve prostaglandin E_2 (PGE_2) salınımını uyarmaktır. Radio immunoassay yöntemiyle sığır PSPB ile gebeler %100 oranında tespit edilebilmesine rağmen gebe olmayanlar gebeliğin 26-106. günlerinde %83 doğruluk oranı vermektedir. Koyun PSPB konsantrasyonu sığır PSPB antikorları ile tanımlanamayan çapraz reaksiyona girmesinden dolayı sayısal değeri belirlenemez. Ancak, koyunlara özgü olarak RIA yöntemi ile oPSPB ölçümü yapılabildiği bildirilmiştir. Belirlenen oPSPB 30. güne kadar sürekli artış göstermiş, doğumdan 20 gün önce ise konsantrasyonu sabit kalmıştır. Kuzulamadan sonra hızlıca düşmüş ve en son postpartum 3. hafta civarında belirlenebilmiştir. Gebeliğin 50-100. günleri arasında PSPB konsantrasyonu ve plasental ağırlık arasında doğru bir orantı vardır. Buna ilaveten gebeliğin son dönemlerinde abort yapan koyunlarda fötüs büyüklüğü ve PSPB konsantrasyonu arasında gebeliğin 120. gününe kadar ilişki kurulabilir (3, 13, 26).

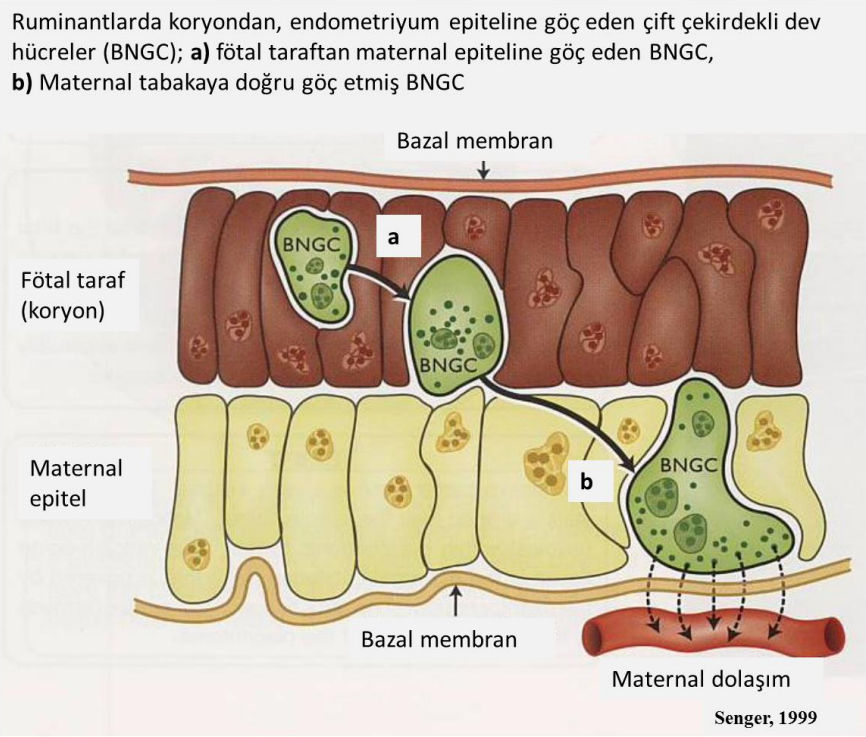
3.4.9.2. Gebelik ile ilişkili glikoproteinler

Gebelik döneminin hemen başlarından itibaren ruminantların plasentasında bulunan çift çekirdekli dev hücreler, fötal koryondan maternal tabakaya doğru göç ederler (Şekil-2). Gebelikle ilişkili glikoproteinler trofoblast kökenli bu çift çekirdekli hücreler tarafından sentezlenir. Aspartik proteinaz yapısında bir molekül olan bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 43-67 kDa arasındadır. Churra ve Merinos gibi koyunlarda gebeliğin 3. haftasında, birçok koyun ırklarında ise 4. haftadan sonra belirlenebilir. Koyun gebelik ile ilişkili glikoprotein (oPAG) seviyesi gebeliğin 3. haftasından 9. haftasına kadar yavaşça artış gösterir. Koyun ırkları arasında 9-17. haftalarda oPAG seviyesi değişken olsa da oPAG seviyesi 17. haftadan kuzulamaya kadar tekrar artar. Kuzulamadan sonra hızla azalarak postpartum 4. haftada bazal seviyesine düşer. Koyun PAG seviyesi fötüs sayısı ve fötal cinsiyet tarafından etkilenebilir. İkiz gebeliği bulunan koyunlardaki oPAG konsantrasyonun tek yavru

olan koyunlarınkine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (gebeliğin 12. haftasından gebeliğin sonuna kadar). Ancak, bu farklılık gebeliğin 21. haftasında önemli olarak tespit edilmiştir. Buna ilaveten erkek yavrusu olan koyunlarda oPAG seviyesi dişi yavrusu bulunan koyunlara göre gebeliğin 19, 20 ve 21. haftalarında daha yüksek belirlenmiştir (3, 26).

Gebelikle ilişkili glikoprotein tespiti için önceleri RIA testi yapılırken, sonraları ELISA testleri kullanılmaya başlandı. ELISA testi ile örnekler daha kolay işlenebilmekte, RIA yöntemine kıyasla radyoaktif riski olmadığından saha ve laboratuvar şartlarında uygulanabilirliği daha avantajlıdır (13, 34).

Ruminantlar arasında gebelik ile ilişkili protein yapılarında farklılıklar fazla değildir. Koyun ve ineklerdeki PAGs yaklaşık %70'i benzerdir. Bu yüzden koyun PAGs'nın tespiti amacıyla inek PAGs kitleri kullanılabilir (35).



Şekil 2. Plasentadaki çift çekirdekli dev hücreler ve bunların göçü (16).

Bu tez çalışmasında ELISA tabanlı bir ticari sığır PAGs kiti ile koyunlarda gebeliğin erken dönemde tespit edilip edilemeyeceği araştırıldı. Son zamanlarda

yapılan çalışmalarda (35) sığır PAGs kitlerinin gebelik teşhisi amacıyla ile diğer bir ruminant olan koyunlarda da kullanılabileceği bildirilmiştir (36). Bu durum koyun PAGs molekülleri ile inek PAGs moleküllerinin yapısal olarak yüksek oranda benzer olmasından kaynaklanmaktadır. Bunun gebeliğin değişik günlerinde koyunlarda kullanılabilirliğinin teyit edilmesi bölgemiz açısından ekonomik katkısına ilaveten bilimsel olarak da inek PAG kitlerinin bu amaçla kullanılabileceği bu çalışma ile ortaya konacaktır. Gebeliklerin daha pratik ve daha ekonomik bir yöntemle erken dönemde teşhis edilmesi sürü idaresi açısından önemlilik arz etmektedir. Ayrıca erken gebelik tanısında gebe hayvanların kesiminin de önüne geçilip, gebe olmayan hayvanların yeniden çiftleştirilmeleri sağlanır, gebe kalamayan hayvanlar da beslenmeye alınabilir veya sürüden çıkarılarak ekonomik açıdan fayda sağlanabilir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan gebe koyun kan plazma numune örnekleri önceden alınmış olup Anabilim dalımız araştırma laboratuvarında (-20 °C) muhafaza edildi. Laboratuvar çalışması aşamasında örnekler çözdürülerek analizleri yapıldı.

4.1. Çalışmada Kullanılan Hayvan Materyali ve Yapılan İşlemler

Çalışmanın hayvan materyalini sağlıklı ve daha önce doğum yapmış, 2-5 yaş arasında olan Konya Merinosu koyunlar oluşturdu. Gündüzleri merada otlatılıp akşamları kapalı ağılda tutulan koyunlara çiftleşme mevsiminin başlaması ile günlük 300 gr ilaveten karma yem verildi. Östrus tespitleri (arama koçunun aşımı esnasında hareketsiz durması ve çiftleşmeyi ret etmemesi) arama koçu ile yapılan koyunlar elde sıfat yöntemi ile damızlık koçlar ile çiftleştirildiler. Sunulan tez çalışmasındaki hayvanlar arama koçları ile östrus tespiti yapılıp çiftleştirilen koyunlar içinden belirlendi. Çiftleştirilen bu koyunlar içinden gebelikleri tespit edilen ve gebelikleri aynı zamanda doğumları ile teyit edilen 13 koyun çalışmaya dahil edildi. Hayvanlardan 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerde kan plazma örnekleri için vena jugularisden kan alındı. Kör örnekleme ile alınan kan örnekleri vakumlu Na-EDTA tüplerine alındıktan sonra 20 dk. süresince 3000 devir/dakika'da santrifüj edildi. Çıkan plazma kısmı çalışılıncaya kadar derin dondurucuda (-20 ˚C) saklandı. Kit çalışması esnasında negatif kontrol ve pozitif kontrol örneklemeleri de yapıldı. Doğumları ile teyitleri yapılan 13 hayvanın belirlenen günlerdeki kan numunelerine ELISA ile bakıldı.

Koyunların gebelik tespitleri transrektal USG yöntemi ile yapıldı. Çiftleşme günü 0. gün olarak kabul edilmesinden sonraki 28. günde gebeliklere transrektal USG ile bakıldı. Erken gebelik kayıplarına ve gebeliklerin devam edip etmediğinin belirlenmesi amacı ile gebeliklere 35. günde transrektal USG yöntemiyle tekrar bakıldı. Bunlara ilaveten kuzulama zamanlarında da doğuran koyunlar belirlenerek kayıtları tutulup daha önceki gebelik muayeneleri ile karşılaştırıldı. Çalışmada gebelik tespiti için 7,5 MHz transrektal prob donanımlı B-Mode Real Time ultrason cihazı (Scanner 480 Vet, Esaote Pie Medical, Maastrich, Hollanda) kullanıldı.

4.2. Laboratuvar Çalışması

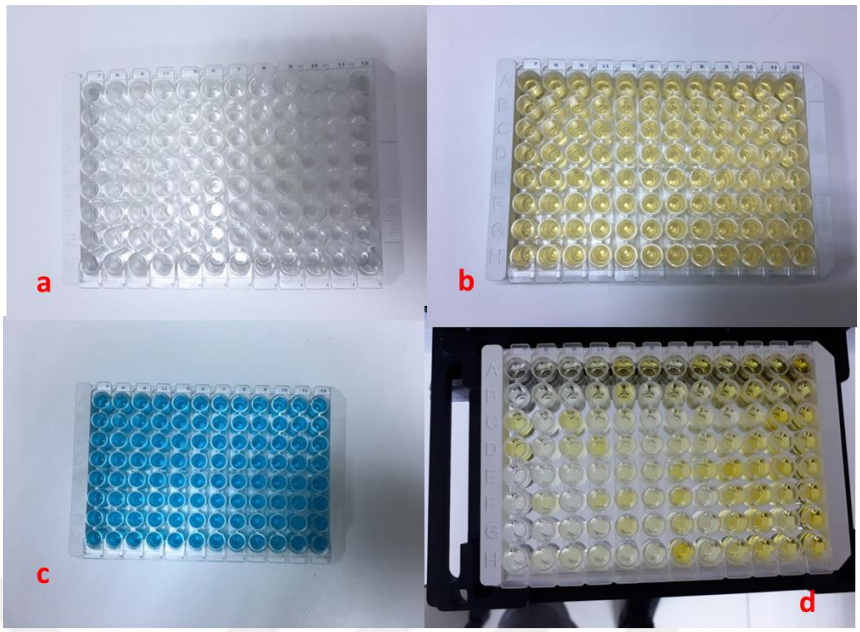
Bu çalışmada, koyun plazmasındaki PAGs değerinin ölçümü için Idexx firması tarafından üretilen (IDEXX Bovine Pregnancy test kit, Switzerland AG, Stationsstrasse 12, 3097 Liebefeld-Bern, Switzerland) sığır gebelik ile ilişkili glikoprotein PAGs ELISA kiti kullanıldı. Yapılan ELISA analizinde izlenen prosedür Tablo-1 de görülmektedir. Bu kit içeriğinde; anti-PAG antikorları ile kaplı kuyucuklar, pozitif ve negatif kontrol solüsyonları, konjugat, sulandırıcı örneği, TMB substrat, reaksiyonu durdurucu solüsyon, yıkama solüsyonu ve detektör solüsyonu bulunmaktaydı. Analiz yapılmadan önce 2-8 ˚C arasında saklanan tüm reagentlar 24 ^{o}C'ye getirildi ve nazikçe karıştırıldı. Laboratuvar çalışması Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜBTAM) laboratuvarında bulunan ELISA okuyucusu ve yıkayıcısı (Thermo Multiscan Go) (Resim-1) ile yapıldı. Çalışmanın laboratuvar aşamaları aşağıdaki Tablo-1'de sırası ile belirtilmektedir. Kullanılan kit plakası ve örneklere dair aşamalardan bazı görüntüler Resim-2'de görülmektedir.



Resim 1. ELISA cihazı (okuyucu ve yıkayıcı)

Tablo.1 ELISA yöntemi ile yapılan işlemler (sıralı numaraya göre)

	Yapılan işlem
1	Kuyucuklar örnekleme pozisyonuna hazırlandı
2	Örnek sulandırıcı, kontrol ve bakılacak örnek kuyucuklarına 25 µl (mikrolitre) dağıtıldı
3	Negatif ve pozitif kontrol solüsyonları kuyucuklara bırakıldı (100 µl)
4	Örnekler uygun kuyucuklara dağıtıldı (100 µl)
5	Kuyucukları içeren plaka nazikçe karıştırıldı
6	Kuyucukların üzeri sıkıca kapatıldı ve 37 ^{o}C'de 60 dk. bekletildi
7	Kuyucuklar ELISA yıkama cihazı ile boşaltıldı ve yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı
8	Her kuyucuğa 100 µl detektör solüsyonu bırakıldı
9	Kuyucuklar üzeri sıkıca kapatıldı ve 24 ^{o}C'de 30 dk. bekletildi
10	Yedinci adım tekrar edildi
11	Her kuyucuğa 100 µl konjugat bırakıldı
12	Kuyucuklar üzeri sıkıca kapatıldı ve 24 ^{o}C'de 30 dk. bekletildi
13	Yedinci adım tekrar edildi
14	Her kuyucuğa 100 µl TMB subsrat bırakıldı
15	Kuyucuklar 15 dk. boyunca 24 ^{o}C'de bekletildi
16	Her kuyucuğa reaksiyonu durdurması için 100 µl durdurucu solüsyonu bırakıldı
17	Ölçümler ve kayıtlar 450 nm dalga boyundaki ELISA okuyucusunda yapıldı
18	Sonuçlar firmanın belirlediği optimal yoğunluk (OD) hesaplamasına göre yapıldı



Resim 2. ELISA kiti laboratuvar çalışma aşamaları

4.3. Üretici Firma Hesaplama Kriterine Göre Sonuçların Değerlendirilmesi

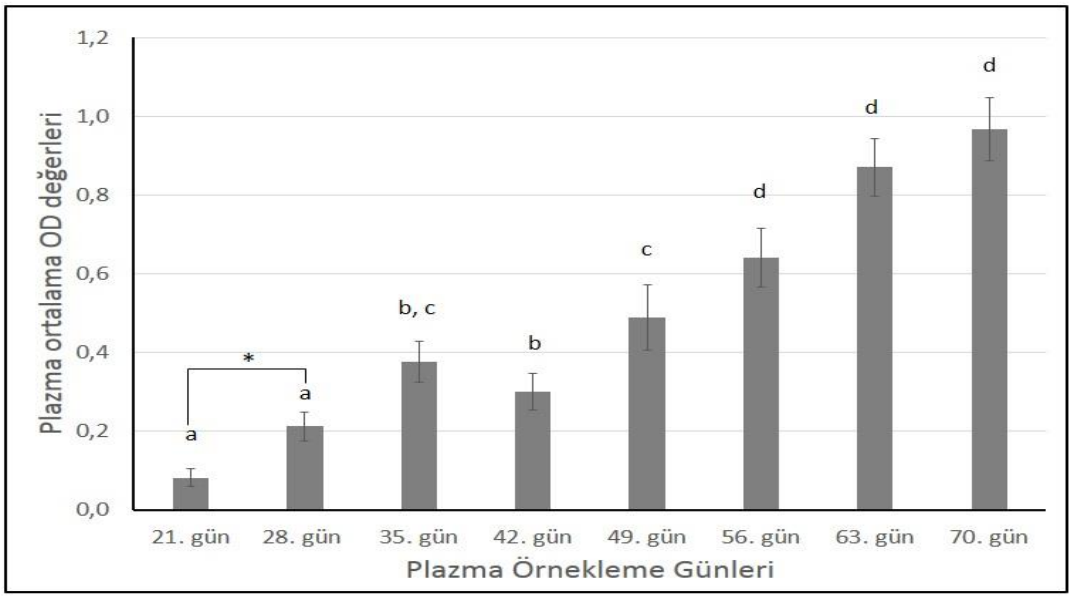
Sonuçlar hesaplanmadan önce standart ve örnekler için tekrarlanmış ölçümlerin ortalama değerleri alındı. Hesaplamada her numunenin optimal yoğunluğundan (OD), negatif kontrolün OD değeri çıkarılarak belirlendi. Hayvanlardan alınan plazma örneklerinin sonuçları firmanın belirlediği hesaplama yöntemi dikkate alınarak ≥0,3 değeri olanlar için pozitif yani gebe, bu değerin altı ise negatif yani gebe değil olarak kabul edildi.

4.4. İstatistik Analizi

Çalışmada elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile belirlendi. Gruplar arası ve grup içi ölçümlerin homojenliği test edildi. Ölçüm yapılan günlere ilişkin ortalama OD değerlerinin istatistiki analizinde tekrarlı ölçümler Varyans analizi kullanıldı. Günler arasındaki farklılıkların kontrolünde ise Bonferroni düzeltilmiş p değerleri kullanılarak Wilcoxon Pairwise testi ile değerlendirildi. İstatistiksel önemlilik seviyesinde $p<0,05$ esas alındı.

5. BULGULAR

Çalışmada kullanılan Konya Merinosu koyunların gebeliklerinin 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerinde plazmalarında belirlenen ortalama PAGs-OD değerlerine ilişkin veriler grafik şeklinde aşağıda belirtilmektedir (Şekil 3). Şekilde belirtilen grafikte gebelik günü ilerledikçe plazmadaki PAGs düzeyine ilişkin OD değerlerinde artış olduğu görülmektedir. Gebeliğin 21 ve 28. günlerindeki ortalama PAGs-OD değerleri arasında $p<0,05$ düzeyine göre önemli farklılık oluşmamakla birlikte iki gün arasındaki istatistiksel önem farklılığının 0,07 düzeyinde olduğu tespit edildi.



Şekil 3. Örneklere bakılan günlere ilişkin belirlenen plazma ortalama PAGs-OD değerleri

Çalışmada ilk örneklemenin yapıldığı 21. güne göre plazma PAGs-OD değerleri arasındaki istatistiksel açıdan önemli düzeydeki ilk farklılık 35. günde oldu ($p<0,05$). Gebeliğin 35 ve 42. günlerindeki plazma PAGs-OD değerleri arasında istatistiksel düzeyde farklılık oluşmazken ($p>0,05$), 49. gündeki plazma PAGs-OD değeri 42. gündeki plazma PAGs-OD değerine, 56. gündeki plazma PAGs-OD değeri ise 49. gündeki plazma PAGs-OD değerine göre önemli düzeyde artış gösterdi ($p<0,05$). Gebeliğin 56, 63 ve 70. günlerindeki ortalama PAGs-OD değerleri arasındaki

farklılıklar bu günler açısından kendileri arasında istatistiksel düzeyde önemli bulunmadı ($p>0,05$). Ancak, gebeliğin 35. gününden sonraki her PAGs-OD ortalama değeri ise gebeliğin 21 ve 28. günlerine göre farklı bulundu ($p<0,05$).

Bu çalışmada plazma örneklerinin alındığı günlere ilişkin belirlenen ortalama OD değerleri ve aynı günlerde plazma OD değeri ≥0,3 olan koyun oranları Tablo 2'de verildi. Tabloda görüldüğü gibi plazma ortalama PAGs-OD değerleri 21 ve 28. günlerde 0,3 OD değerinin altında seyretmektedir. Gebeliğin 35. gününde plazma PAG-OD değeri 0,38'e yükselmekte ve bu hayvanların %69,23'ü kritik değerin üzerine çıkmaktadır. Plazma PAGs-OD değeri 42. günde her ne kadar 35. güne göre hafif azalsa da istatistiki açıdan herhangi bir önem teşkil etmemektedir ($p<0,05$). Gebeliğin sonraki aşamalarında ise (49, 56, 63 ve 70. günler) PAGs-OD değerinin sürekli arttığı görülmektedir. Gebeliğin 35. gününden itibaren koyunların büyük çoğunluğunda PAGs-OD değeri 0,3'ün üzerine çıkmasına rağmen koyunların tamamında (n=13, %100) gebelik yaşının 63. gününden itibaren bu değer 0,3'ün üzerinde olmuştur.

Tablo 2. Günlere göre ortalama plazma PAGs-OD değerleri ve yüzdeleri

Örnekleme günü	**n**	**Plazma PAG OD değeri (X±Sx)**	**≥0,03 OD oranı (%)**
21	13	$0,08\pm0,02^{a}$	7,69 (1/13)
28	13	$0,21\pm0,04^{a}$	30,77 (4/13)
35	13	$0,38\pm0,05^{bc}$	69,23 (9/13)
42	13	$0,30\pm0,05^{b}$	61,54 (8/13)
49	13	$0,49\pm0,08^{c}$	76,92 (10/13)
56	13	$0,64\pm0,07^{d}$	92,31 (12/13)
63	13	$0,87\pm0,07^{d}$	100,0 (13/13)
70	13	$0,97\pm0,08^{d}$	100,0 (13/13)

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak önemli bulundu ($p<0,05$)

Bu çalışmada gebelik tanısı için pozitif kabul edilen ≥0,3 plazma PAGs-OD değerine sahip olan koyunların oranında gebelik yaşı ilerledikçe özellikle gebeliğin 35. gününden itibaren belirgin bir artışın olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

6. TARTIŞMA

Koyunlarda gebelik teşhisi için kullanılabilecek birçok klinik ve laboratuvar yöntemleri mevcuttur. Gerek teknolojik iyileşmeler gerekse koyunlarda gebelik fizyolojisinin günümüzde çok daha iyi anlaşılması ile gebelik teşhisi için güvenilirlikleri yüksek yeni yöntemler gün geçtikçe ortaya çıkmaktadır. Koyunlarda gebelik teşhisi özellikle gebeliğin erken dönemlerinde yapılabildiği takdirde önemli olmaktadır. Gebeliğin erken dönemleri güvenilir bir biçimde teşhis edilerek koyun yetiştiricilerine ve hayvancılığa birçok avantajlar sağlanmış olacaktır. Klinik yöntemlerden USG ile gebelikler yüksek oranlarda doğru teşhis edilmesine rağmen büyük sürülerde uygulama zorlukları ve zaman alması açısından daha kolay uygulanabilir yöntemler geliştirilmesi amacıyla çalışmalar sürdürülmektedir.

Ultrasonografiye alternatif gebelik teşhisi yöntemlerine bakıldığında son zamanlarda kanda gebelik ile ilişkili proteinler veya genlere bakılan birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda özellikle sığır ve koyunlar için gebeliğe ilişkin glikoproteinlerin tespit edilmesi gen ekspresyon çalışmalarına göre çok daha pratik olması ve daha az laboratuvar işlemi gerektirmesi yönünden saha şartlarında daha pratik olduğu kanısına varılmış ve araştırıcıların halen bu konuda önemli çalışmalar yaptıkları görülmektedir (6, 37-39).

Gebelik ile ilişkili glikoproteinlerden bir kısmı ruminantlarda molekül yapı bakımından benzerlikler göstermektedir. Bu yüzden sığır PAGs kiti ile koyunların PAGs değerine de bakılan çalışmalar yapılmıştır (36, 40). Sığır PAGs kitinin bazı yerlerde elde edilebilirliği ve koyun kitine göre daha ekonomik olması gibi sebeplerden dolayı bazı araştırıcılar koyunlarda PAGs ölçümü için çalışmalarında sığır PAGs kitlerini kullanmışlardır (36). Sunulan tez çalışması kapsamında koyunlarda gebeliğin değişik dönemlerine göre sığır PAGs ELISA kitinin kullanılabilirliği incelenmiştir.

Koyunlarda gebeliğin belirlenmesinde klinik yöntemler ve hormonal analizlerden ayrı olarak son yıllardaki çalışmalar; kan veya sütte bakılabilen bazı spesifik proteinler ile IFN-tau'nun belirlenmesine yönelik araştırmalar seviyesinde

olmuştur. Gebeliğin devamında da rolü olan IFN-tau kandaki lökositlerde uyardığı genlerin ekspresyonu yoluyla tespit edilmektedir (21, 41). Bu gibi yöntemlerin bazı zorlukları ve zaman almasından dolayı pratikte uygulanmaları bu aşamada zordur. Gebelik teşhisinde başvurulan abdominal ve rekto-abdominal palpasyon ile gebeliğin belirlenmesi, gebeliğin geç dönemlerinde ancak yapılabilmektedir. Ultrasonografi ile gebelik teşhisi yüksek doğruluk oranları ile belirlenebilmesine rağmen hem kalabalık sürülerde uygulanmasının zaman ve işgücü açısından zorlukları hem de deneyimli bir hekim gerektirmesi gibi dezavantajları olmaktadır (13, 37). Bu yüzden gebelik teşhisinde bu gibi klinik yöntemlere alternatif olarak PAGs düzeylerine daha kolay yöntemler ile bakılabilmektedir (36, 40, 42, 43). Gebeliğin PAGs tespiti için her ne kadar laboratuvar donanımına ihtiyaç duyulsa da bu yönteme uygun kitler ile gebelik tanısı daha kısa sürmektedir. Ayrıca son zamanlarda görsel bakı kitleri ile klinik/saha şartlarında da kolaylıkla gebelik tanısı yapılabilmektedir (34).

Sunulan bu tez çalışmasında inekler için geliştirilen gebelik ile ilişkili glikoproteinleri ölçen bir ticari kitle (koyun kitine göre daha ekonomik olan sığır PAGs kiti ile) koyunlarda erken gebeliğin tespiti amaçlandı.

Bu amaçla çalışmaya dahil edilen toplam 13 baş gebe koyunun (gebelikleri doğumları ile teyit edildi) gebeliklerinin 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerinde kan plazma örnekleri toplandı ve uygun koşullarda (-20 ˚C) saklandı. Sığır ticari PAGs ELISA kiti ile plazmalara bakıldı. Laboratuvar çalışması aşamasında testin güvenilirliği açısından pozitif ve negatif kontrol örnekleri de plazma örnekleri ile eş zamanlı çalışıldı. Üretici firma verilerine göre mikrotiter plaka formatı anti-PAGs antikorlarının olduğu plaka şeklinde biçimlendirilmiştir. Test örneklerinin kaplı olan plaka kuyucuklarında inkübasyonu ile PAGs molekülleri, PAGs'a duyarlı antikor ve substratlar ile bağlanır. Bağlanamayan konjugatlar yıkanarak uzaklaştırılır ve renk değişimini sağlayan TMB subsratı kuyucuklara ilave edilerek oluşan renk değişiklikleri kolometrik olarak spektrofotometrede ELISA okuyucusu ile ölçülür. Bu tez çalışmasında da plazma PAGs değerlerinin ölçümü yukarıda bahsedilen yönteme göre yapıldı. Koyun plazma örneklerinde 21. günden itibaren PAGs değerleri üretici firma hesaplama yöntemine göre belirlendi. Gebeliğin 21. gününde 0,08, gebeliğin 28. gününde 0,21 olan ortalama PAGs değerinin 35. günden itibaren

0,38 seviyesine ulaştığı görüldü. Ancak, 35. günde bulunan ortalama değer gebeliğin 42. gününe gelindiğinde hafif bir azalma eğilimine girse de bu azalma istatistiki açısından önemli bulunmadı. Gebeliğin 42. gününden itibaren ortalama PAGs-OD değeri 35. gündeki değerin üzerine çıkmaya başlayarak; 49. günde 0,49, 56. günde 0,64, 63. günde 0,87 ve 70. günde 0,97 seviyesine ulaştı. Buradan da açıkça görüldüğü gibi ortalama PAGs değeri gebelik yaşı ilerledikçe sürekli artış göstermektedir. Gebeliğin 35. gününden 42. gününe gelindiğinde azalma gösteren ortalama PAGs değerindeki bu azalma koyunların bireysel döllenme günü farklılığı ve plasentasyonun tamamlandığı bu günlerde bazı PAGs'ların azalmasından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. Buna benzer bir çalışmada da Steckeler ve ark., (44) gebeliğin erken döneminde 11 koyunda PAGs değerlerine bakmışlar. Tüm koyunların gebeliğin 42. gününde PAGs ölçümüne göre % 100 oranında gebe olduklarını bildirmişlerdir. Ancak sürpriz bir biçimde bu araştırmacılar da PAGs değerinin 49. günde azaldığını, sonraki günlerde ise tekrar artış gösterdiğini ifade etmişlerdir. Gebeliğin erken dönemlerde teşhisi için yapılan bazı çalışmalarda PSPB'nin inek ve koyunlarda önce arttığı sonra azaldığını ve tekrar arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (42, 45). Gebelik ile ilişkili glikoproteinler için bu bifazik durumun bazı araştırıcılar (46, 47) tarafından görülmediği ifade edilse de, yapılan tez çalışmasında bifazik durumun Steckeler ve ark., (44)'nın yaptığı çalışmaya benzer biçimde artış, azalış ve tekrar artış gösterdiği belirlendi.

Sunulan tez çalışmasında plazmadan PAGs seviyesinin belirlenmesi için ELISA yöntemi kullanıldı. Plazmadan PAGs'ın belirlenmesi dışında tam kan, serum ve sütte de PAGs seviyelerine bakılabilmektedir (6, 40, 44, 46). ELISA yönteminden ayrı bazı araştırmacılar PAGs düzeylerine RIA yöntemi ile bakmışlardır (6, 39, 48). Gebelik teşhisinde RIA ile PAGs ekpresyonunun gebeliğin 18-20. günlerden itibaren yüksek doğrulukla belirlenebildiği bildirilmiştir (6, 39, 49). Gebeliğin erken dönemde teşhisi için RIA testi ile PAG'ın gebeliğin 22. gününde yüksek doğrulukla teşhis edilebileceğini ifade etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında PAGs değerinin ELISA yöntemi ile bulunan sonuçları RIA yöntemi ile karşılaştırıldığında gebelik yaşı teşhisinin RIA yöntemi ile hem daha erken dönemlerde hem de daha yüksek doğruluk oranı ile belirlendiği görülmektedir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi gebeliğin erken dönemde PAGs değerine bakılarak gebelik teşhisinde RIA yöntemi,

ELISA'ya göre daha erken ve doğru sonuçlar verebilmektedir. Ancak, RIA yönteminin radyoaktif madde riski ve daha donanımlı bir laboratuvar imkanı gerektirmesi gibi bazı dezavantajlarının olduğu unutulmamalıdır (13, 34).

Gebeliğin erken dönemde teşhisi için koyunlara özgü koyun PAGs kiti ile Uçar'ın (46) yapmış olduğu çalışmada PAGs değeri 21, 25 ve 28. günlerde yükselme eğilimi göstermiştir. Gebeliğin 35. gününde bulunan PAGs değerinin 18. gündeki değer ile kıyaslandığında önemli bir farklılığın olduğu tespit etmiştir. Diğer bir çalışmada da PAGs'ın 30-120. günler arasında artış gösterdiği bildirilmektedir (47).

Sunulan tez çalışması, koyun kiti ile yapılan çalışmalardan farklı olarak sığır PAGs kiti kullanılarak yapıldı. Çalışmada PAGs değerleri 21. günden 35. güne kadar artış gösterdi (0,08 den 0,021'e), 35. günden 42. güne gelinirken hafif bir azalış gösterip sonraki örnekleme günlerinde (49, 56, 63 ve 70. günler) hep artma eğilimi ile seyretti. Koyunların büyük kısmında optimal değere göre gebeliğin pozitif olarak değerlendirilmesi, gebeliğin 35. gününden itibaren görülmektedir (%69,23). Gebeliğin ilerlemesi ile 63. günde bu doğruluk oranının %100'e çıktığı tespit edildi. Elde edilen sonuçlar sığır PAGs kitinin koyunlarda PAGs ölçümü için kullanılabileceğini göstermektedir. Bunun sebebi ise ruminant olan sığır ve koyunların plasentasındaki trofoblast hücrelerinden salınan PAGs moleküllerinin benzer moleküler yapıda olmasından kaynaklıdır. Buna ilaveten bu görüşü destekleyen diğer bir bulgu ise sığır ve koyunlarda PAG-1 kodlayan cDNA, nükleotidlerde %86 oranında benzerlik göstermesidir (36).

Yapılan tez çalışmasına benzer olarak koyunlardaki PAGs tespiti için sığır PAGs ELISA kitinin kullanıldığı başka çalışmalarda bulunmaktadır (36, 40, 44). Rovani ve ark., (36)'nın yaptığı çalışmada gebeliğin çiftleşmeden sonra 33-35. gününden sonra PAGs OD değeri üzerinde tespit edildiği bildirilmiştir. Sunulan tez çalışmasında da gebelik pozitif değerleri 35. günden itibaren yukarıdaki araştırmacıların çalışmalarına benzer biçimde olup, gebeliğin ilerleyen aşamalarında bu doğruluk oranında artış olmaktadır. Gebelik ile ilişkili glikoprotein molekülleri plasentada çift çekirdekli trofoblastik hücrelerden salgılandığından maternal plazmada bu moleküllerin belirlenmesiyle gebelik tanısı yapılabileceği gibi fötoplasental yapıların ve yavrunun gelişiminin izlenmesinin de mümkün olabileceği belirtilmektedir. Embriyo,

zonasından çıktıktan sonra trofoektoderm hücrelerince oluşturulmaya başlayan plasenta gebelik yaşı ilerledikçe büyüyüp gelişmekte ve fonksiyonları çeşitlenerek iyileşmektedir (16, 50). Koyunlarda plasenta gebeliğin 40. gününden itibaren hızla büyüyerek 75-80. günlerde en büyük hacmine ulaşmakta, plasentom sayısı da benzer şekilde 40. günden 60. güne kadar önemli bir artış gösterdiği ve sonrasında değişmediği bildirilmiştir (51). Sunulan çalışmada koyunların tamamında PAGs-OD değerlerinin gebelik için pozitif kabul edilen düzeye 56-63. günler arasında yani koyunlarda plasentasyonunun tamamlandığı günlerde ulaştığı görüldü. Benzer bulgular Yavuz (52) tarafından yapılan çalışmada da elde edilmiştir. Yavuz (52) tarafından yapılan çalışmada 8 gebe koyunun plazma PAGs-OD değerlerinin 49. günde 5 baş (%62,5), 70. günde ise 8 koyunun tamamında (%100) ≥0,3 değerinin üzerine çıktığını bildirmiştir. Steckeler ve ark., (44) da gebeliğin erken döneminde 11 koyunda 42. günde gebeliklerin pozitif olarak belirlendiğini ifade etmişlerdir. Sunulan çalışmada plazma PAGs-OD değerlerindeki artış gecikmesinin yüksek ihtimalle plasentasyon aşamasında oluşan plasental gelişme bozukluklarının sonucu olduğu düşünülmektedir. Zira 42. günden sonra plazma PAGs-OD değerleri gebelik için pozitif kabul edilen ≥0,3 değerinin üzerine çıkan koyunların plazma PAGs-OD profilleri incelendiğinde, plazma PAGs-OD değerlerinin ≥0,3 değerinin üzerine bir önceki örnekte elde edilen değerden yaklaşık iki kat fazla artış oluşturarak çıktığı belirlendi. Belirtilen koyunlarda plazma PAGs-OD değerinin ≥0,3 üzerine çıkmasındaki gecikmenin diğer sebeplerinin; çiftleşme dönemindeki fertilizasyon zamanı, gebeliğin kritik dönemlerindeki embriyo kayıpları, ırk, parite vb olabileceği düşünüldü.

Koyunlarda gebelik teşhisinde yararlanılan en güvenilir yöntemlerden biri USG muayenesidir. Ultrasonografi ile gebelik teşhisi transrektal veya transabdominal yolla yapılabilir. Transrektal USG ile gebeliğin yaklaşık 30-35. gününden sonra transabdominal yöntem ile yaklaşık 50. gün civarında gebelikler yüksek oranda belirlenebilir (26, 31). Sığır PAGs kiti kullanılarak yapılan bu çalışmada 35. günde gebelik teşhisi yapılabilmekte olup doğruluk oranları transrektal kadar yüksek olmamasına rağmen transrektal uygulamanın saha şartlarındaki zorlukları, hayvana verdiği eziyet ve hekim deneyimi gibi dezavantajları göz önüne alındığında PAGs

düzeyine bakılarak gebelik teşhisinin yapılmasının ciddi bir alternatif olacağı düşünülmektedir.

Gebelik teşhisinde kullanılan PAGs kitinde birden fazla gebelik ile ilişkili glikoproteine bakılarak sonuç elde edilmeye çalışılmaktadır. Bu glikoproteinler yüksek oranlarda hem sığır hem de koyunlarda benzer olduğundan gebelik teşhisinde koyunlar için sığır kiti kullanılabilmekte olup, ilerleyen dönemlerde bu kitlerdeki moleküllerin daha spesifik çalışır hale gelmesi ile güvenilirliklerinin de artacağı zamanla ortaya çıkacağı düşünülmektedir.

7. SONUÇ

Çalışmada elde edilen bulgulara bakıldığında gebeliğin belli günlerinde incelenen plazma örnekleri sonucundan da anlaşılacağı üzere özellikle 35. günden itibaren PAGs değerleri pozitif gebe (%69,23) diyebilme sınırlarının üzerine çıktığı, gebeliğin ilerlemesi ile tüm hayvanlarda da %100 pozitif sonuca (63. günden itibaren) ulaştığı görülmüştür. Bu sonuçlara bakıldığında gebeliğin erken dönemi için 35 günlük gebelik yaşı gebelik teşhisi için kriter olarak alınabilir. Ancak, gebe olmayan koyunların PAGs seviyeleri de dikkate alınarak ilerleyen günlerinde tekrar PAGs açısından veya USG yönünden incelenmeleri gerektiği kanısına varıldı.

Sunulan tez çalışmanın asıl amacı olan sığır PAGs kiti ile koyun PAGs değerlerine bakılarak gebelik teşhisinin yapılabilirliğinin araştırılmasıydı. Yukarıda elde edilen sonuçlardan anlaşıldığı üzere koyunlarda gebelik ile ilişkili glikoproteinlere, sığır PAGs kiti kullanılarak bakıldığında gebelik teşhisinin yapılabildiği görüldüğünden sığır PAGs kitinin gebelik teşhisi amacı ile koyunlarda gebelik ile ilişkili glikoproteinlerin belirlenebilmesinde kullanılabileceği sonucuna ulaşıldı.

8. KAYNAKLAR

1) Özyurtlu N. Dünya Hayvancılık Sorunlarına Genel Bir Bakış, Alınmıştır: Editör; Özgen, N., Günümüz Dünya Sorunları (Disiplinlerarası bir yaklaşım), 1.baskı Norrsken Ltd. Şti., 2012, s: 187-204.

2) Özyurtlu, N. Koyunlarda Follikül Dinamiği. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Semineri, 2001, Ankara, (Danışman: Prof.Dr. Hakkı İZGÜR).

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

4) Kaçar C, Özyurtlu N, Macun HC, Zonturlu A, Aslan S, Saban E. Akkaraman ırkı koyunlarda ve Ankara keçilerinde servikal mukus kaynatma testi ile gebelik tanısı. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2004; 51(3): 199-204.

5) Alaçam E, Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. 7. Baskı, Ankara: Medisan Yayınları; 2010.

6) El-Amiri B, Sousa NM, Oxiley AA, Hadarbach D, Beckers, JF. Pregnancy-associated glikoprotein (PAG) concentration in plasma and milk samples for early pregnancy diagnosis in Lacaune dairy sheep, Research in Veterinary Science, 2015; 99: 30-36.

7) Lindsay DR., Reproduction in sheep and goat. In: Reproduction in domestic animals, Ed; Perry T.Cupps, 4th edition, Academic Press Inc., San Diego, California.1991, p: 491-516.

8) Wildeus S. Current concepts in synchronization of estrus: sheep and goats. Proc Am Soc Anim Sci. 1999; 39: 1–14.

9) Rosa HDJ, Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep. Small Ruminant esearch. 2003; 48; 155-171.

10) Jainudeen MR, Hafez ESE. Sheep and Goats. In:Reproduction in Farm Animals, Ed.: E.S.E. Hafez: 6th edition, Lea&Febiger, Philadelphia. 1993; p: 330-342.

11) Canooğlu E, Sarıbay MK. Üreme kanalının morfolojisi ve üreme fizyolojisi, In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. 2. Baskı. Malatya: Medipres; 2015; p:467-490.

12) Baştan A. Akkaraman Irkı Koyunlarda Melatonin ve Progestagen Uygulamalarının Reprodüktif Performans Üzerine Etkileri. Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi, 1995, Ankara.

13) Erdem H, Sarıbay MK, Gebelik ve Tanı Yöntemleri. In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. 2. Baskı. Malatya: Medipres; 2015, p:507-522.

14) Vural R, Güzeloğlu A, Küplülü Ş. Gebelik ve Fizyolojisi, In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. 2. Baskı. Malatya: Medipres; 2015; p:107-132.

15) Güzeloğlu A. İneklerde gebeliğin maternal kabulü sürecinde anti-luteolizisin moleküler mekanizması. Vet Bil Derg 2006; 22:83-88.

16) Senger PL. Pathways to Pregnancy and Parturition. 1st Edition. Ephrata: The Mack Printing Group Science Press; 1999.

17) Senger PL. Pathways to Pregnancy and Parturition. 2nd Edition. Printed in the United States America by: Cadmus Professional Communication, Pullman, 2003.

18) Gordon I. Controlled Reproduction in Sheep and Goats. 1st Edition. Cambridge: CAB International, 1997.

19) Gray CA, Abbey CA, Beremand PD, Choi Y, Farmer JL, Adelson DL, Spencer TE. Identification of endometriyal genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus. Biology of reproduction 2006; 74(2):383-394.

20) Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Guoyao W. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. Reproductive Biology 2008; 8 (3):179-207.

21) Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation mechanisms: insights from the sheep. Reproduction 2004; 128:657-668.

22) Igwebuike UM. A review of uterine structural moification that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. Anim Reprod Sci. 2009; 112: 1-7.

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

24) Flint APF, Burton RD, Heap RB. Sources of progesterone during gestation in Barbary sheep (Ammotragus lervia). J Endocrinol. 1983; 98: 283-288.

25) Gootwine E. Placental hormones and fetal placental development, Anim Reprod Sci. 2004; 82-83: 551-566.

26) Karen A, Kovacs P, Beckers JF, Szenci O. Review article pregnancy diagnosis in sheep: Review of the most practical methods. Acta Vet Brno 2001; 70:115-126.

27) Lone SA, Gupta SK, Kumar N, Shinde KP, Ganaie BA, Rather HA, Kumar S. Recent Technologies for Pregnancy in sheep and goat: An overwiev, International Journal of Science, Environment and Technology, vol 5, no 3, 2016; 1208-1216.

28) Doğaneli MZ, Tanyolaç A, Alaçam, E. Koyunlarda gebeliğin çeşitli evrelerinde vaginal smear ve vaginal biyopsi yöntemleri ile çalışmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1979; 26: 177-183.

29) Keskin A, Macun HC. Genital organların muayenesi, In: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. 2. Baskı. Malatya: Medipres; 2015, p:45-80.

30) Taşal İ, Ataman MB, Dinç DA, Ergin A, Erdem H. Koyunlarda gebelik teşhisi amacıyla A ve B-mode real-time ultrason tekniklerinin karşılaştırılması. Vet Bil Derg 1995; 41-45.

31) Kaşıkçı G, Turna Ö. Koyun ve keçilerde reprodüktif ultrasonografi. Türkiye Klinikleri Dergisi. 2017; 3(2): 123-128.

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

33) Sandabe UK, Chauhan FS, Chaudhri SUR, Wiziri MA. Studies on predicting number of foetus(es) in small ruminants. Pakistan Vet. J. 1994; 14: 97-100.

34) Kaya MS, Bademkıran S, Köse M, Uçar EH, Mutlu H, Atlı MO. Sığırlarda Gebelikle ilişkili glikoproteinlerin tespitinde kullanılan iki test kitinin karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2017; 12 (1): 45-53.

35) Karen A, Beckers JF, Sulon J, Melode SN, Szabados K, Reczigel J, Szenci O. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. Theriogenology 2004; 59:1941-1948.

36) Rovani MT, Cezar AS, Rigo ML, Gasperin BG, Nobrega Junior JE, Torres FD, Gonçavles PBD, Ferreira R. Evaluation of a bovine pregnancy-associated glycoprotein enzym-linked immunosorbent assay kit for serological diagnosis of pregnancy in sheep. Ciencia Rural, Santa Maria, Online, 2015.

37) Lucy M, Green J, Poock S. Pregnancy determination in cattle: A review of available alternatives. Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle, Staunton VA, 15-16 October 2013; pages: 165-176. http://www.appliedreprostrategies.com/2013/pdf/proceedings/12-dee-whittier.pdf, Son Erişim Tarihi: 22.05.2018.

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

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

40) Lamglait B, Rambaud T. Diagnosis of pregnancy in Barbary sheep (Ammotragus Lervia) using a bovine assay for pregnancy-associated glycoproteins. J Zoo Wildl Med. 2017; Abstract

41) Bazer FW, Guoyao W, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless H. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. Molecular Human Reproduction 2010; 16 (3):135–52.

42) Ranilla MJ, Sulon J, Carro MD, Mantecon AR, Beckers JF. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep. Thriogenology 1994; 42:537-45.

43) Ranilla MJ, Sulon J, Mantecon AR, Beckers J-F, Carro MF. Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. Small Rum Res 1997; 24:125–31.

44) Steckeler P, Weber F, Kirsch S, Rieger A, Zerbe H, Voigt K, Evaluation of a rapid visual pregnancy test for detection of pregnancy-associated-glikoproteins (PAGs) in sheep-preliminary results. Reprod Dom Anim, 2018; 53 (Suppl 1): 3-45.

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

46) Uçar, U. Koyunlarda Gebelik ile İlişkili Glikoproteinler (PAGs) ile gebelik teşhisi, Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2017, Diyarbakır, (Danışman: Doç.Dr. M.Osman ATLI).

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

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

49) Karen A, Beckers JF, Sulon J, de Sousa NM, Szabados K, Reczigel J, Szecni O. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glykoprotein tests. Theriogenology, 2003; 59: 1941-1948.

50) Wallace RM, Pohler KG, Smith MF, Green JA. Placental PAGs: gene origins, expression pattern, and use as markers of pregnancy. Reproduction, 2015; 149: 115-126.

51) Ehrhardt RA, Bell AW. Growht and Metabolism of the Ovine Placenta During Mid-gestation. Placenta, 1995; 16: 727-741.

52) Yavuz O. Koyunlarda PAGs (Pregnancy-Associated Glycoproteins) ile gebelik teşhisi. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Bitirme Tezi, 2014, Diyarbakır, (Danışman: Doç.Dr. M.Osman ATLI).

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	YASEMİN	**Soyadı**	KAPLAN BİLMEZ
Doğum Yeri	SURUÇ	**Doğum Tarihi**	13.09.1987
Uyruğu	T.C.	**Tel**	05427739763
E-posta	jasmin-2127@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans		
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011
Lise	Gaziantep Bayraktar Lisesi	2005

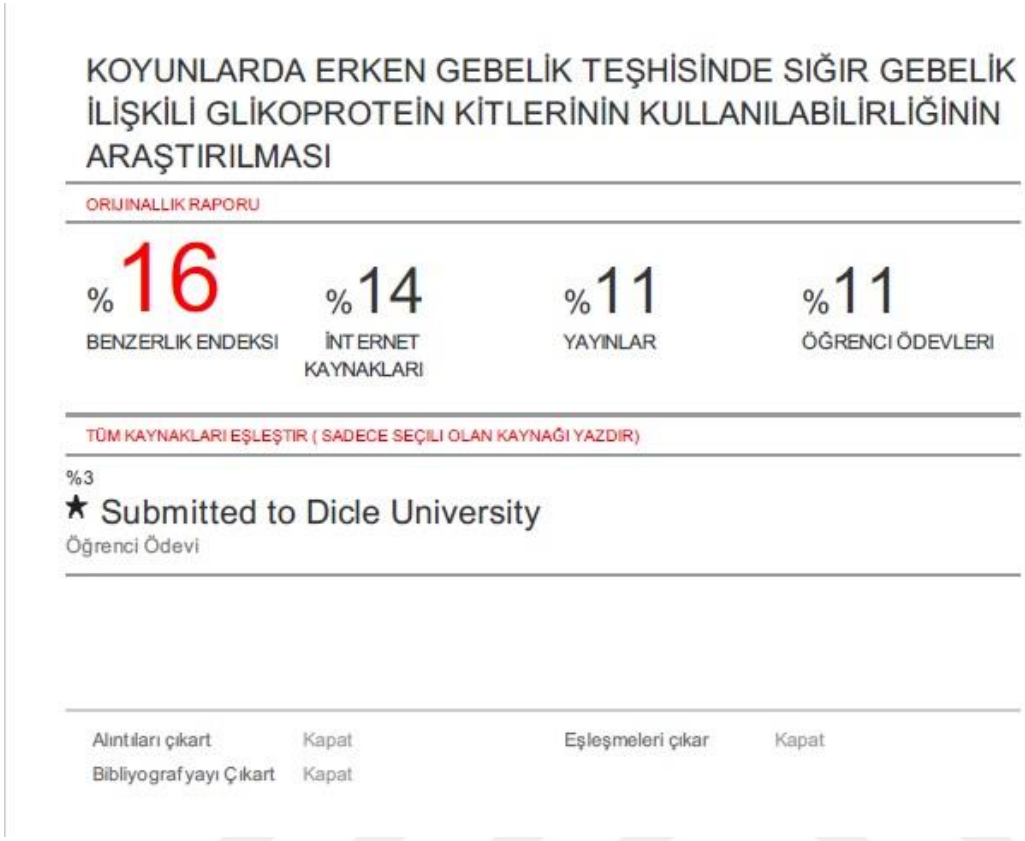
İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
Veteriner Hekim	Çınar Gıda, Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü	2011-2016
Veteriner Hekim	Yenişehir Gıda, Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü	2016-Halen

Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS/ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	53,75							

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	70,67746	71,36788	65,59206
(Diğer) Puanı			

10. ORJİNALLİK RAPORU



KOYUNLARDA ERKEN GEBELİK TEŞHİSİNDE SIĞIR GEBELİK İLİŞKİLİ GLİKOPROTEİN KİTLERİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%16	%14	%11	%11
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

TÜM KAYNAKLARI EŞLEŞTIR (SADECE SEÇILI OLAN KAYNAĞI YAZDIR)

%3

★ Submitted to Dicle University

Öğrenci Ödevi

Alıntıları çıkart	Kapat	Eşleşmeleri çıkar	Kapat
Bibliyografyayı Çıkart	Kapat		