

KISRAKLARDA BİR GnRH ANALOĞU OLAN DESLORELİN ACETATE İLE OVULASYONUN UYARILMASI

M. Ragıp KILIÇARSLAN*

Induction of ovulation with the GnRH analogue, deslorelin acetate in mares

Summary: In this study, the effect of deslorelin implant on the induction of ovulation, ovulation time, mating number per mare and pregnancy rate were investigated in the mares have more than 30 mm in diameter ovarian follicle.

Forty thoroughbred mares 5-12 years old from TÜK İzmit Stud and private studs were used as material. Forty mares with more than 30 mm ovarian follicle don't have any reproductive problem by ultrasonography and rectal palpation were divided into two groups. 2.2 mg deslorelin acetate (Ovuplant-Fort Dodge Animal Health) implant were administered subcutaneously to 20 normally cycling mares in oestrus with a dominant ovarian follicle more than 30 mm in diameter. Also 0.5 cc placebo were administered subcutaneously to 20 control mares. (0. hour) All mares were mated naturally every other day from the administration till ovulation. Ovulations were monitored every 24 hours by ultrasonography. The pregnancy diagnosis were made by ultrasonographic examinations on 20-22 days after ovulations.

The ovulation time was 57.6 ± 17.6 hours after administration, the mating number per mare was 1.6 ± 0.68 and the pregnancy rate was 70% in deslorelin treated mares. These parameters in the control group were 79.2 ± 21.4 , 2.3 ± 0.47 and 65% respectively. The ovulation time after administration was decreased in deslorelin treated mares ($p < 0.01$) and also the mating number per mare was decreased in deslorelin treated mares ($p < 0.001$).

Pregnancy rates were similar in the both groups. The ovulation rates in 48 hours after administrations were 75% in treated mares and 30% in the control mares and this difference was statistically significant ($p < 0.01$).

No local reactions or systemic side effects were determined in the deslorelin treated mares.

These results indicated that deslorelin treatment could be used successfully in the mares with dominant ovarian follicle (>30 mm) to induction of ovulation within 48 hours after administration and reduction of mating number per mare.

Key Words: Induction, ovulation, GnRH analogae, deslorelin, mare.

* I.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Avcılar / İstanbul

Özet: Bu çalışmada doğal olarak östrus gösteren ve follikül çapı 30 mm'yi geçen kısırlıklarda 2.2 mg deslorelin implant uygulamasının ovulasyonu uyarılması; ovulasyon zamanı, kısırak başına düşen aşım sayısı ve gebelik oranı üzerine etkisi araştırılmıştır.

Çalışma materyalini TKK İzmit Pansiyon-Hara ve özel at çiftliklerinde bulunan 3-12 yaşlı 40 adet safkan İngiliz kısırak oluşturmuştur. Rektal ve ultrasonografik muayene ile reprodüktif açıdan problemi olmayan 30 mm'den büyük folliküle sahip 40 kısırak, 20 çalışma ve 20 kontrol olarak iki gruba ayrılmıştır. Doğal olarak östrus gösteren, ultrasonografi ile follikül çapı 30 mm'yi geçen 20 kısırağa 2.2 mg deslorelin acetate (Ovuplant-Fort Dodge Animal Health) subkutan olarak uygulanmıştır. Kontrol grubundaki 20 kısırağa ise subkutan 0.5 cc placebo verilmiştir. (0.1 saat). Kısıraklar uygulamayı takiben ovulasyonu gerçekleşinceye kadar gün aşırı doğal olarak çözülmüşlerdir. Çalışma ve kontrol grubundaki kısıraklara 24 saat aralıklarla ultrasonografik muayene yapılarak ovulasyonlar tespit edilmiştir. Gebelik muayeneleri ovulasyondan sonraki 20-22. günlerde ultrasonografik muayene ile yapılmıştır. Deslorelin implant uygulanan kısırlıklarda ortalama ovulasyon zamanı 37.6 ± 17.6 saat, ortalama aşım sayısı 1.6 ± 0.68 ve gebelik oranı %70, kontrol grubunda ise bu oranlar sırasıyla 79.2 ± 21.4 saat, 2.3 ± 0.47 ve %65 olarak tespit edilmiştir. Deslorelin implant uygulanan gruptaki kısırlıklarda ovulasyon zamanı ortalaması, kontrol grubuna göre belirgin bir azalma göstermiştir ($p < 0.01$). Aynı grupta kısırak başına düşen ortalama aşım sayısı da kontrol grubuna göre belirgin olarak azalmıştır ($p < 0.001$). Her iki grupta elde edilen gebelik oranları benzer bulunmuştur. Deslorelin implant uygulanan kısırakların, uygulamadan sonraki 48 saat içinde %75'inde, kontrol grubundaki kısıraklara ise %30'unda ovulasyon çekilenmiştir ve aradaki fark istatistikî açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). (Tablo 1). Deslorelin implant uygulanan kısırlıklarda lokal reaksiyon ve sistemik yan etki saptanmamıştır.

Sonuç olarak follikül çapı 30 mm'yi geçen kısırlıklarda 48 saat içerisinde ovulasyonu uyararak ve kısırak başına düşen aşım sayısını azaltarak amacıyla deslorelin implant başıyla kullanılabilir. Özellikle bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Uyarılma, ovulasyon, GnRH analogu, deslorelin, kısırak.

Giriş

Kısa süren üreme mevsimine sahip olan kısırlıklarda östrus ve ovulasyon zamanları bireylere göre büyük farklılıklar göstermektedir (11, 12, 13). Mevsime bağlı polioestririk hayvanlar olarak kabul edilen kısırlıklarda, üreme mevsimi artan gün ışığı tarafından başlatılmakta ve birkaç hafta sonra ovaryum faaliyetleri düzene girmektedir (4, 19). Geçiş dönemlerinde östruslar belirsiz olmakta ve gerçekleşmeyen veya zamanında meydana gelmeyen ovulasyonlar sıklıkla görülmektedir (13, 22). Diğer türlerde olduğu gibi kısırlıklarda da reprodüktif siklusu kontrol eden temel hormon hipotalamus'daki sinir uçlarından salgılanan GnRH hormonudur (6, 8). Gün ışığı yeterli olduğunda hipotalamus GnRH salgılamak üzere uyarılmakta, GnRH'da anterior hipofiz gonadotropin'leri olan FSH ve LH salgılanmasını sağlamaktadır (4, 8). GnRH ve bunun uyarımı ile salgılanan FSH ve LH ritmik şekilde salınım göstermektedir. Kısırlıklarda anöstrus dönemi, üreme mevsimine geçiş dönemi, üreme mevsimi ve östrus siklusu devrelerinde, GnRH salınımı ile uyarılan anterior hipofiz gonadotropin'lerinin salınım sıklığı, frekansı ve oluşturdukları etkiler yada GnRH salınımına verilen cevaplar farklı olmaktadır. GnRH uyarımı, günde bir kez gonadotropin salınımı için yeterli ise kısırak anöstrus'ta kalmakta; günde 2-4 kez gonadotropin salınımı için yeterli ise FSH salınımı üstün hale geçmekte ve folliküller gelişim uyarılmakta veya 2 saat yada daha az aralıklar ile gonadotropin salınımı için yeterli ise LH salınımı üstün hale geçmekte ve ovulasyonu uyarmaktadır (6, 7, 8). Birçok çevresel uyarım yanında, ovaryum hormonları da GnRH uyarımına bağlı anteri-

or hipofiz'in cevabı üzerine önemli oranda ayarlayıcı etki yapmaktadır (7). Hormon üretimini sınırlayan faktörlerin olmaması durumunda hipotalamus'taki sinir uçlarından spontan olarak saatte bir GnRH salgılanmaktadır. Diöstrus sırasında bu temel salınım sıklığı, endojen opioit ve progesteron'un baskılayıcı etkisi nedeniyle günde 1-3'e düşmektedir. Östrus sırasında ise östradiol uyarımına bağlı olarak GnRH salınım sıklığı 20-30 dakikada bir olmakta ve ovulasyon uyarılmaktadır (7, 8).

Ovulasyon zamanının önceden bilinmesi veya kontrolü gebelik şansının artırılması, aygırdan maksimum düzeyde yararlanılması ve kısırak başına düşen aşım sayısının azaltılması gibi avantajlar sağlamaktadır (10, 11, 14, 16).

Kısırlarda ovulasyonun uyarılmasında, yaygın olarak hCG kullanılmaktadır ancak birden fazla uygulamalarda antikor oluşumuna bağlı etki azalması, çekilemesi ve kaynağının kısıtlı olması nedeniyle maliyetinin yüksek olması, alternatif olarak GnRH kullanımında gündeme getirmiştir (2, 3, 5, 19, 21). Kısırlarda preovulator LH pikinin uzun sürmesi nedeniyle GnRH'nin tek enjeksiyonunun, ovulasyonu sağlayamayacağı (1, 6), sürekli GnRH salınımının uyarılmasının da kontraseptif etki yapacağı ileri sürülmesine rağmen, GnRH analoglarının yüksek dozda kullanılmadığı sürece bu olumsuz durumun gerçekleşmediği bildirilmektedir (8). Üreme mevsimine geçiş döneminde, anöstrusta folliküller gelişimin veya preovulatorik dönemde ovulasyonun GnRH ile uyarılmasında tekrarlanan dozların gerekmesi nedeniyle, kısa bir dönem için sürekli ve kontrollü GnRH salınımını sağlayan subkutan implantların kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (9, 15, 16, 17, 18). Çapı 30 mm veya daha büyük folliküle sahip östrustaki kısraklara, 2.2 mg deslorelin acetate içeren subkutan implant uygulamasının, tedaviden sonraki 48 saat içinde, kısrakların %80'ninden fazlasında ovulasyonu gerçekleştireceği ve ovulasyon zamanını en az 30 saat kısaltacağı ileri sürülmektedir (9, 16, 17, 18, 20).

Çalışmada üreme mevsiminde doğal olarak östrus gösteren ve follikül çapı 30 mm'yi geçen kısraklarda, GnRH implantı uygulaması ile ovulasyonun uyarılması ve bu uygulamanın ovulasyon zamanı, aşım sayısı ve gebelik oranı üzerine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma T.J.K. İzmir Pansiyon Hara ve İstanbul çevresindeki özel at çiftliklerinde bulunan, 5-12 yaşlı, 40 adet safkan İngiliz kısırak üzerinde yürütülmüştür. Çalışma öncesi rektal ve ultrasonografik muayene yapılarak, reproduktif açıdan problemi olmayan kısraklar materyal olarak kullanılmış, kısraklar 20 çalışma ve 20 kontrol olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Üreme mevsiminde doğal olarak östrus gösteren, ultrasonografi ile çapı 30 mm'den büyük folliküle sahip olduğu belirlenen 20 adet kısrağın boyun bölgesine, 2.2 mg deslorelin acetate içeren implant (Ovuplant - Fort Dodge Animal Health) subkutan olarak uygulanmıştır. Doğal olarak östrus gösteren ve çapı 30 mm'den büyük folliküle sahip kontrol grubundaki 20 adet kısrağa ise subkutan 0.5 cc placebo verilmiştir. Kısraklar uygulamayı takiben ovulasyon gerçekleşinceye kadar gün aşırı doğal olarak çiftleştirilmişlerdir. Çalışma ve kontrol grubundaki kısraklara 24 saat aralıklarla ilt-

rasonografik muayene yapılarak ovulasyonlar tespit edilmiştir. Gebelik muayeneleri ovulasyondan sonraki 20-22. günlerde ultrasonografik muayene ile yapılmıştır.

Çalışma sonunda doğal olarak östrus gösteren ve follikül çapı 30 mm'yi geçen kısırlarda uygulanan deslorelin implantın, ovulasyon zamanı, kısırak başına düşen aşım sayısı ve gebelik oranı üzerine etkisi, kontrol grubundaki kısırların verileriyle karşılaştırılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde Student's t-testi kullanılmıştır.

Bulgular

Doğal olarak östrus gösteren ve follikül çapı 30 mm'yi geçen kısırlarda, ovulasyonu uyarmak amacıyla 2.2 mg deslorelin acetate içeren subkutan implant uygulanan 20 kısırta ortalama ovulasyon zamanı 57.6 ± 17.6 saat, ortalama aşım sayısı 1.6 ± 0.68 ve gebelik oranı %70 olarak tespit edildi. Kontrol grubuna oluşturan 20 kısırta ise ortalama ovulasyon zamanı 79.2 ± 21.4 saat, ortalama aşım sayısı 2.3 ± 0.47 ve gebelik oranı %65 olarak gerçekleşti. Deslorelin implant uygulanan gruptaki kısırlarda ovulasyon zamanı ortalaması, kontrol grubuna göre belirgin bir azalma gösterdi ($p < 0.01$). Aynı grupta kısırak başına düşen ortalama aşım sayısında da, kontrol grubuna göre belirgin olarak azalma meydana geldi ($p < 0.001$). Her iki grupta elde edilen gebelik oranları benzer bulundu (Tablo 1).

Deslorelin implant uygulanan gruptaki kısırların %75'inde, tedaviden sonraki 48 saat içerisinde ovulasyon şekillenirken, kontrol grubundaki kısırların %30'unda ovulasyon gerçekleşti ve aradaki fark istatistikî açıdan önemli bulundu ($p < 0.01$). (Tablo 1).

Deslorelin implant uygulanan bölgede lokal reaksiyon ve sistemik yan etki tespit edilmemiştir.

Tablo 1. Çalışma ve kontrol grubundaki kısırlarda ovulasyon zamanı, aşım sayısı ve gebelik oranları

	n	48 saat içinde ovulasyon görülme oranı (%)	Ortalama ovulasyon zamanı (saat)	Ortalama aşım sayısı	Gebelik oranı (%)
GnRH implantı	20	75 ^a	57.6 ± 17.6^a	1.6 ± 0.68^c	70 ^a
Kontrol	20	30 ^b	79.2 ± 21.4^b	2.3 ± 0.47^d	65 ^a

^{a,b}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

^{c,d}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir ($p < 0.001$).

Tartışma ve Sonuç

Kısırklarda ovulasyonun uyarılmasında hCG ve GnRH analogları yaygın olarak kullanılmaktadır (6, 10, 11, 15, 16, 20, 21). Ovulasyon zamanının kontrol altına alınmasında hCG'nin birden fazla kez uygulanmasının, antiikor oluşumuna bağlı etki azalmasına neden olması, kaynağının kısıtlı olması, bu konuda GnRH analogları kullanımı ile ilgili çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur (6, 7, 9, 16, 17, 18). Kısırklarda pre-ovulator LH pikinin uzun sürmesi nedeniyle GnRH analoglarının tek doz uygulanmasının, ovulasyonu istenen düzeyde sağlayamayacağı (1, 5, 6, 10), bu dönemde 48 saat süreyle saatte bir 10 µg gonadorelin enjeksiyonu yada ortalama 3.8 buserelin enjeksiyonunun gerektiği ileri sürülmektedir (5, 6, 8). Bu nedenle GnRH'ni kontrollü ve kısa bir süre için sürekli salınımını sağlayan yeni analogları üretilmiştir (6). McKinnon ve ark. (16), ovulasyonu uyararak için tek uygulama gerektiren 1.3 mg, 1.6 mg ve 2.2 mg dozlarında deslorelin içeren subkutan implantlar ile östrus gösteren ve çapı 30 mm'den büyük folliküle sahip kısırklarda yaptıkları çalışmada en iyi sonucun 2.2 mg'lık doz ile alındığını ileri sürmüşlerdir.

Meinert ve ark. (17), östrus gösteren ve ortalama çapı 40 ± 2 mm folliküle sahip kısıraklara 2.2 mg deslorelin subkutan implant uyguladıklarını, tedavi grubunda 48 saat içerisinde ovulasyon oranının %93, kontrol grubunda ise %7 olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar yaptıkları ikinci çalışmada 1. gruba 3000 IU hCG, 2. gruba 5000 IU hCG, 3. gruba 2.2 mg deslorelin implant ve kontrol grubuna placebo verdiklerini, tedavi uygulanan 3 grupta 48 saat içerisinde ovulasyon oranının %100, kontrol grubunda %25 olduğunu, Jochle (9), çapı 30 mm'den büyük folliküle sahip östrustaki kısırakların 2.2 mg deslorelin implant uygulanan grubunda 48 saat içinde gerçekleşen ovulasyon oranının %80'den fazla olduğunu saptamışlardır. Meyers ve ark. (18), yaptıkları benzer çalışmada bu oranın, tedavi grubunda %86.1, kontrol grubunda %37.7 olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada çapı 30 mm'den büyük folliküle sahip östrustaki kısıraklara 2.2 mg deslorelin implant uygulanmış ve 48 saat içerisinde ovulasyon oranı tedavi grubunda %75, kontrol grubunda ise %30 olarak tespit edilmiş ve aradaki fark istatistikî açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Bu sonuçlar Meinert ve ark.'nın (17), elde ettiği sonuçlardan daha düşük, Jochle (9) ve Meyers ve ark.'nın (18) sonuçlarına benzerdir.

Kaşıkçı ve ark. (10), çapı 35 mm ve daha büyük folliküle sahip doğal siklustaki kısıraklara tek doz 0.042 mg buserelin acetate uyguladıklarını, ortalama ovulasyon zamanının tedavi grubunda 64.4 ± 5.5 saat, kontrol grubunda ise 75.6 ± 8.3 saat olduğunu bildirirken, Meyers ve ark. (18) 2.2 mg deslorelin implant uyguladıkları, çapı 30 mm'den büyük folliküle sahip östrustaki kısırklarda ortalama ovulasyon zamanını 54.1 saat, kontrol grubunda ise 88.8 saat olduğunu açıklamışlardır. Çalışmada ise 2.2 mg deslorelin implant uygulanan çapı 30 mm'den büyük folliküle sahip östrustaki kısırklarda bu oranlar 57.6 ± 17.6 saat, kontrol grubunda 79.2 ± 21.4 saat olarak tespit edilmiş ve aradaki fark istatistikî açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Çalışmada ortalama ovulasyon zamanına ilgili elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların (10, 18) bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Çalışmada kısrağ başına düşen ortalama aşım sayısı tedavi grubunda 1.6 ± 0.68 , kontrol grubunda 2.3 ± 0.47 olarak tespit edilmiş olup aradaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). Deslorelin uygulaması ile kısrağ başına düşen ortalama aşım sayısı diğer araştırmalara (10, 18) uyumlu olarak azalmıştır.

Çalışmada gebelik oranları tedavi grubunda %70, kontrol grubunda %65 olmuş. Her iki grup arasında belirgin bir fark bulunmamış ve bu sonuçlar diğer araştırmacıların (18) bulgularıyla benzerlik göstermiştir.

Sonuç olarak; follikül çapı 30 mm'yi geçen östrustaki kısrağlara, bir GnRH analogu olan 2.2 mg deslorelin implant uygulamasının, tedaviyi takip eden 48 saat içerisinde ovulasyonun uyarılması ve kısrağ başına düşen aşım sayısının azaltılmasında etkili olduğu ve klinik uygulamalarda başarıyla kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Alaçam, E. (1999): Hormonların Klinik Kullanımı. Ed: E. Alaçam. In: "Evcil Hayvanlarda Doğum ve Infertilite". Medisan Yayınevi, Ankara. p. 43-47.
2. Allen, W. (1988): Artificial Control of Cyclical Activity, Fertility and Obstetrics in the Horse. Blackwell Scientific Publications, Oxford-England p. 22-24.
3. Allen, W. (1991): Endocrine Control of the Oestrus Cycle and Puberty, Fertility and Obstetrics in the Horse. Blackwell Scientific Publications, Oxford-England p. 7-8.
4. Arthur, G. H., Noakes, D. E., Pearson, H. (1986): Anovulation and Delayed Ovulation. Veterinary and Obstetrics (Therigenology) Bailliere Tindall, London p. 380.
5. Harrison, L. A., Squires, E. L., McKinnon, A. O. (1991): Comparison of hCG, Buserelin and Luprostiol for induction of ovulation in cycling mares. Equine Vet. Sci., 11 (3): 163-166.
6. Irvine, C.H.G. (1993): GnRH Clinical Application. Ed: Angus McKinnon and James L. Voss. In: "Equine Reproduction". Lea and Febiger, Philadelphia. p. 329-332.
7. Irvine, C. H. G., Alexander, S. L. (1993): GnRH. Ed: Angus McKinnon and James L. Voss. In: "Equine Reproduction". Lea and Febiger, Philadelphia. P.37-42.
8. Irvine, C. H. G., Alexander, S. L. (1998): Managing the mare for optimal fertility. J. Equine Sci., 9 (3): 83-87.
9. Jochle, W. (1995): Control of ovulation in the mare with Ovuplant (short-term release of the GnRH analog deslorelin acetate). Overview of investigations from 1990 to 1994. Tierarztl. Prax., 23 (4): 381-393.
10. Kaşıkçı, G., Şenünver, A., Horoz, H. (1999): Kısrağlarda ovulasyonun hCG ve GnRH ile uyarılması. İ.Ü. Vet. Fak. Derg., 25 (1): 65-78.
11. Kılıçarslan, M. R., Horoz, H., Şenünver, A., Konuk, S. C., Tek, Ç., Carioğlu, B. (1996): Effect of GnRH and hCG on ovulation and pregnancy in mares. The Vet. Rec., 3 (3) 119-120.
12. Kılıçarslan, M. R., Horoz, H., Şenünver, A., Konuk, S. C., Tek, Ç., Ekici, H. (2000): Kısrağlarda ultrasonografi ile ovulasyon zamanının saptanması. Netaj Bülten, 7, 21-24.
13. Leidl, W. (1993): Atlarda dövl verim sorunları. 29-30 Nisan-Mayıs Türk-Alman Günleri, s:32. Tebliğ.

14. McDonald, L. E. (1980): Reproductive Patterns of Horses, Veterinary Endocrinology and Reproduction, Lea and Febiger, London, p 403.
15. McKinnon, A. O., Nobellus, A. M., Vasey, J. R., Tarrida, S., Trigg, T. E. (1992): Predictable ovulation in mares during the cyclic season with GnRH analogue implants. Australian Equine Veterinarian J., 10 (2): 77-78.
16. McKinnon, A. O., Nobellus, A. M., Figueroa, S. T., Skidmore, J., Vasey, J. R., Trigg, T. E. (1993): Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue, deslorelin. Equine Vet. J., 25 (4): 321-323.
17. Meinert, C., Silva, J. E., Kroetz, J., Klug, B., Trigg, T. E., Hoppen, H. O., Jochle, W. (1993): Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin. Equine Vet. J., 25 (1): 65-68.
18. Meyers, P. J., Bowman, T., Blodgett, G., Conboy, H. S., Gimenez, T., Reid, M. P., Taylor, B. C., Thayer, L., Jochle, W., Trigg, T. E. (1997): Use of the GnRH analogue, deslorelin acetate, in a slow-release implant to accelerate ovulation in oestrous mares. Vet. Rec., 140 (10): 249-252.
19. Özkoca, A. (1993): Kısırlarda Hormon Tedavisi, Atlarda Reprodüksiyon ve Infertilite; TJK Basımevi, İstanbul, s. 90-93.
20. Squires, E. L., Moren, D. M., Farlin, M. E., Jasko, D. J., Keefe, T. J., Meyers, P. A., Figueiredo, E., McCue, P. M., Jochle, W. (1994): Effect of dose of GnRH analogue on ovulation in mares. Theriogenology, 41: 757-769.
21. Tekeli, T. (1999): Kısırlıkta Infertilite Sorunu. (Ed. E. Alaçam) in: "Evel Hayvanlarda Doğum ve Infertilite", Medisan Yayımevi, Ankara, p 291-310
22. Yurdaydın, N. (1991): Kısırlarda gebelik saptama yöntemleri. TIGEM, 6 (36): 24-26.