



Konya Merinosu Koyunlarda Gebelik İlişkili Glikoproteinlerin Gebelikteki Plazma Profili ve Erken Gebelik Tanısında Kullanılabilirliği

Uğur UÇAR¹, Mehmet KÖSE^{1*}, Mehmet Osman ATLI¹

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Sur, Diyarbakır, Türkiye

Geliş Tarihi/Received
02.11.2018

Kabul Tarihi/Accepted
23.12.2018

Yayın Tarihi/Published
31.12.2018

Öz

Gebelik ile ilişkili glikoproteinler (PAGs) koyunları da kapsayan ruminantlarda gebelikte trofoblastik hücrelerden üretilmektedir. Sunulan bu çalışmada Konya Merinosu koyunlarda erken gebelik ve tüm gebelik boyunca kan plazmasındaki PAGs konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlandı. Toplam 16 baş gebe koyun kullanıldı. Çalışmanın birinci aşamasında (gebelik boyunca PAGs profilinin izlenmesi) 8 baş koyundan gebeliğin 0, 55, 85, 113 ve 145. günlerinde kan plazması toplandı. İkinci aşamada (erken gebelikteki PAGs profilinin belirlenmesi) ise gebeliğin 18, 21, 25, 28 ve 35. günlerinde kan plazma örnekleri toplandı. Elde edilen plazma örneklerinde PAGs değerleri ticari (Sheep Pregnancy Associated Glycoproteins) ELISA kiti ile ölçüldü. Sonuçlar değerlendirildiğinde gebeliğin 0. gününde plazmada bazal seviyede PAGs olduğu tespit edilmiştir (14,99±1,63 ng/ml). Birinci aşamadaki veriler; gebeliğin 0. günü ile kıyaslandığında; gebeliğin 55, 85, 113 ve 145. günlerindeki değerleri arasında istatistikî olarak önemli bir fark tespit edilmiştir (p<0,05). İkinci aşamada ise gebeliğin 35. gününde plazma PAGs değerinin 18. gün ile kıyaslandığında önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (p<0,05). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Konya Merinosu koyunlarda gebelik boyunca plazma PAGs düzeyinin sürekli artan bir profil çizdiği görülmektedir. Yine bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan PAGs kiti ile Konya Merinosu koyunlarda en erken 35. günde gebelik teşhisi yapılabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Gebelik, Gebelik Teşhisi, Gebelik ile İlişkili Glikoproteinler, Koyun.

Plasma Profile of Pregnancy Related Glycoproteins during Pregnancy in Konya Merino Sheep and Its Application for Early Pregnancy Diagnosis.

Abstract

Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) are produced by embryonic trophoblastic cells during pregnancy in ruminants, including ewes. The present study aimed to determine the PAGs concentration in blood plasma during early pregnancy and throughout pregnancy in Konya Merino ewes. For this purpose; sixteen pregnant sheep were used. For the first section of the study (PAGs profile monitoring during pregnancy), blood plasma samples were collected on days of 0, 55, 85, 113 and 145 during pregnancy in ewes (n=8). For the second section (determination of PAGs profile in early pregnancy), blood plasma samples were collected on days of 18, 21, 25, 28 and 35 during the early pregnancy in ewes (n=8). The plasma PAGs concentrations were measured by commercial ELISA kit. There was a basal PAGs concentration on the 0th day of pregnancy (14,99 ± 1,63). In the first section of the study, there was also a statistically significant difference on plasma PAGs concentration on days of 55, 85, 113, 145 in pregnancy, compared to the day (p <0, 05). In the second section, it was determined that the plasma PAGs concentration significantly increased on the 35th day of pregnancy compared to the 18th day (p <0, 05). According to these results, the plasma PAGs concentrations are elevated during pregnancy in Konya Merino ewes. Moreover, it could be concluded that PAGs kit used for the present study could diagnose pregnancy as early as at 35 days after mating in Konya Merino ewes.

Key Words: Ewes, Pregnancy, Pregnancy Diagnosis, Pregnancy-associated Glycoproteins.

GİRİŞ

Memeli türlerinde gebelik; fertilizasyonla başlayıp doğumla tamamlanan, türün en küçük minyatürü olan embriyonun maternal uterus ortamında büyüyüp gelişerek dış ortamda yaşama kabiliyetini kazandığı süreçtir. Bu sürecin sağlıklı işleyişinde, gebeliğin maternal kabulü, embriyonun uterus endometriyumuna implantasyonu ve yavrunun maternal kan akımıyla doğrudan bağlantısını gerçekleştiren plasenta-nın oluşumu çok önemlidir (1, 2, 3).

Koyunlarda implantasyon ve plasentasyon süreçlerinin birbirinden ayrı süreçler olmadığı, plasenta'nın implantasyonun başlangıcıyla şekillenmeye başladığı belirtilmektedir (4). Plasenta, yavruyu şekillendirecek olan inner cell mass hücrelerinden fonksiyonları ve görevleri açısından farklılaşan trofoblastik hücrelerce oluşturulmaktadır (4, 5). Yapılan histolojik çalışmalarda koyun plasentasında yapıları ve fonksiyonları farklı olan, mononükleer ve binükleer trofoblastik hücre olarak adlandırılan iki hücre türü olduğu ortaya ko-

yalıdır. Mononükleer hücreler gebeliğin maternal kabulu ve embriyonun beslenmesinde önemli fonksiyonları olan ve trofoblastik hücrelerin yaklaşık %80'ini oluşturan hücrelerdir. Binükleer hücrelerin ise genel olarak asitokinetik bölünmelerle mononükleer hücrelerden şekillendikleri ve trofoblastik hücrelerin yaklaşık %20'sini oluşturdukları belirtilmektedir. Bu hücreler, olgunlaşmaları ve sitoplazmalarında membrana bağlı granüllerin şekillenmesiyle uterus endometriyumuna doğru göç etmeye başlarlar. Endometriyuma geçiş yapan hücreler karunkular ve interkarunkular alanlarda birleşerek, çok çekirdekli dev hücreleri veya dev hücre plakları (sinsityal plaklar) oluştururlar (5, 6). Binükleer hücrelerin göç etmek suretiyle maternal epityal dokuya invazyonları ve plasentomların şekillenmesiyle fetal doku, maternal dokuyla doğrudan temas eder hale gelmektedir. Bu yapılanma ile endokrin ve parakrin yönden çokça fonksiyonel olan plasentanın çeşitli sekretlerinin maternal dolaşıma geçişi kolaylaşmaktadır (6, 7).

Gebelik ilişkili glikoproteinler (PAGs); memeliler sınıfındaki Cetartiodactyla takımındaki türlerin plasentasında çokça eksprese olan ve aspartik proteinaz familyasında sınıflandırılan, gebelik spesifik protein B veya gebelik spesifik protein olarak da adlandırılan trofoblastik moleküllerdir (8). İlk olarak inek plasentasından ekstrakte edildiği ve maternal kan dolaşımına geçtiği belirlenmiştir. Daha sonraları birçok ruminant türünde de bu moleküllerin maternal kan dolaşımına geçtiği tespit edilmiştir (6, 9). Proteinaz ailesinde sınıflandırılmakla birlikte bazı PAGs'nin enzimatik olarak aktif olmadıkları belirlenmiştir. Bu glikoproteinlerin fonksiyonları tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte immünojen bariyer, maternal immun sistemin regülasyonu, embriyonun implantasyonu ve blastogenesiste fonksiyonel olabilecekleri belirtilmektedir (6). Koyunlarda, implantasyonun tamamlandığı, plasentanın oluşumunun devam ettiği, gebeliğin 3-4. haftalarında maternal plazmada tespit edilebilir düzeyde olduğu belirlenmiştir (10, 11). İnekler de olduğu gibi, koyunların kan örneklerinde PAGs konsantrasyonunun ırk, fetal sayısı, gebeliğin evresi gibi birçok faktörün etkisiyle değişebildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (10, 11, 12, 13, 14). Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte plasental kaynaklı moleküller oldukları için indirekt gebelik tanısında ve gebelik sağlığının izlenmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (10, 15). Son 20-30 yıl içerisinde gebelik ilişkili glikoproteinler üzerine birçok türde, fonksiyonlarını belirlemek amacıyla çok çeşitli çalışmalar yapılmış olmakla birlikte, birçok PAGs molekülünün olması ve ekspresyon profillerinde değişken sonuçların alınması nedeniyle çiftlik hayvanlarında reproduktif fizyolojinin tam olarak anlaşılabilmesi ve yetiştirme kararlarının alınabilmesinde biyokimyasal bir belirteç olarak kullanılabilmesi için yeni çalışmalar yapılması gerektiği açıkça belirtilmektedir (16, 17, 18).

Bu çalışmanın birinci aşamasında gebeliğin 0, 55, 85, 113 ve 145. günlerinde, ikinci aşamasında ise gebeliğin 18, 21, 25, 28 ve 35. günlerinde elde edilen plazma örneklerinde, ELISA tabanlı bir ticari koyun PAGs kiti kullanılarak plazma PAGs profilinin belirlenmesi ve erken gebelik tanısı amacıyla kullanılabilirliği amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Çalışma; daha önceden, Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen Konya Merinosu (Orta Anadolu Merinosu) ırkı 16 baş koyundan alınan kan örneklerinden elde edilen plazma örnekleriyle yapıldı. Plazma örnekleri PAGs'lerin analizi yapıncaya kadar Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Araştırma Laboratuvarında -80 °C'de muhafaza edildi. Analizlerde tek kuzu doğuran koyunlara ait plazma örnekleri kullanıldı.

Hayvan Materyali

Kan örnekleri klinik olarak sağlıklı, 2-5 yaşlı ve en az bir doğum yapmış olan koyunlardan alındı. Koyunlar gündüzleri merada otlatılırken geceleri yarı açık ağıllarda tutuldu. Mera otlatılmasına ilave olarak enstitünün karma yem ünitesinde hazırlanan karma yemden koyun başına 300 gr verildi. İçme suyu ad libitum olarak sağlandı.

Koyunlar üreme sezonu içerisinde doğal östrüste çiftleştirildi. Koyunların östrüste oldukları prepisyum bölgesi bez önlükle kapatılan arama koçları ile tespit edildi. Arama koçu atladığında koyunun hareketsiz durması östrüs tespitinde esas kriter kabul edildi. Östrüsteki koyunlar, daha önceden fertil oldukları bilinen 2-5 yaşlı, aynı ırktan damızlık koçlarla elde sıfat yöntemiyle çiftleştirildi. Çiftleştirme günü, gebeliğin 0. gün olarak kabul edildi ve kayıt edildi.

Plazma Örneklerinin Elde Edilmesi

Kan örnekleri, çalışmanın birinci aşamasında 8 baş koyundan gebeliklerinin 0, 55, 85, 113 ve 145. günlerinde, ikinci aşamasında ise 8 baş koyundan gebeliklerinin 18, 21, 25, 28 ve 35. günlerinde alındı. Kan örnekleri, koyunların vena jugularis damarından Na-EDTA içeren vakumlu kan tüplerine alındı ve bekletilmeden 3000 devir/dakika hızda 20 dakika santrifüj edildi. Plazma örnekleri eppendorf tüplere aktarıldı ve -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Plazma Örneklerinde PAGs Düzeyinin Belirlenmesi

Laboratuvar çalışmaları Dicle Üniversitesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Plazma örnekleri saklandıkları dondurucudan çıkarıldı ve oda sıcaklığında 60 dk bekletilerek sıcaklıklarının oda sıcaklığına ulaşması sağlandı.

Ticari Kitin Analiz İçin Hazırlanması

Plazma örneklerindeki PAGs'lerin düzeyini belirlemek amacıyla solid-faz ELISA tekniği ölçümü esaslı ticari bir kit (Pregnancy-Associated Glycoproteins, ELISA Kit, MyBioSource, Southern California, San Diego, USA) kullanıldı. Kit bileşenleri analize kadar 2-8 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. Analizlere başlamadan önce kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildi (20-25 °C) ve laboratuvar ortamında gün ışığına karşı gerekli tedbirler alındı. Kit bileşenlerinden olan yıkama solüsyonu (100x) 990 ml deiyonize su ile sulandırıldı ve toplam hacmi 1000 ml olan 1x konsantrasyonda olan yıkama solüsyonu elde edildi.

Plazma Örneklerinde PAGs Düzeyinin Belirlenmesi İçin Analiz Edilmesi

Kit pleytinin kuyucuklarına öncelikle iki pozitif kontrol ve iki negatif kontrol amacıyla standart kit solüsyonlarından 100 µl bırakıldı. PAGs düzeyinin belirleneceği plazma örnekleri, her örnek için ayrı pipet ucu kullanılarak kuyucuklara 100 µl ölçüde bırakıldı. Pleytte oluşan örnek deseni kayıt edildi. Bu işlemi takiben kuyucuklara 50 µl konjugat solüsyonu ilave edildi ve plazma örnekleri ve konjugat solüsyonunun iyice karışması sağlandı. Sonrasında pleyt, parafilm ile kaplanarak 37 °C'ye ayarlı inkübatörde 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun tamamlanmasından sonra pleyt kuyucukları daha önceden hazırlanan 1x konsantrasyondaki yıkama solüsyonu kullanılarak otomatik pleyt yıkayıcıda (Flexiwash, Asys Hitech, Eugendorf, Austria) 5 defa yıkandı. Yıkama sonrasında kuyucuklarda kalan damlacıkların tamamen uzaklaştırılması amacıyla pleyt ters çevrilerek kurutma kâğıtlarından oluşturulan tampona sertçe birkaç defa vuruldu. Daha sonra kit bileşenleri örnek A ve örnek B solüsyonlarından her pleyt kuyucuğuna ilave edildi. Pleyt tekrar parafilm ile kaplanarak 37 °C'de 10-15 dk tekrar inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonrasında kuyucuklara çok kanallı otomatik pipetle 50 µl durdurucu solüsyon ilave edildi ve solüsyonun iyice karışması sağlandı. Pleyt bu aşamadan sonra mümkün olan en kısa sürede mikroplak okuyucu cihaza (Biochrom Anthos Zenyth 200rt microplate reader, Cambridge, UK) yerleştirildi ve kuyucuklardaki örneklerin optik yoğunluğu (O.D.) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendi ve kaydedildi.

İstatistiksel Metod ve Analiz

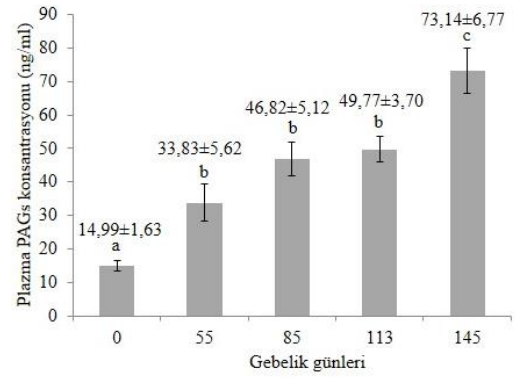
Çalışmanın verileri tekrarlayan ölçümler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak SPSS programı ile analiz edildi. Değerler arasındaki ikili karşılaştırmalarda posthoc tukey testi kullanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği test edildi. Sonuçlar her bir grup için ortalama değer artı/eksi standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel önemlilik kontrolü $p < 0,05$ 'e göre yapıldı.

BULGULAR

Çalışmanın Birinci Aşamasında Elde Edilen Sonuçlar

Birinci aşamada 8 baş koyunun kan plazmasındaki ortalama PAGs konsantrasyonu gebeliğin; 0. gününde $14,99 \pm 1,63$ ng/ml, 55. gününde $33,83 \pm 5,62$ ng/ml, 85. gününde $46,82 \pm 5,12$ ng/ml, 113. gününde $49,77 \pm 3,70$ ng/ml ve 145. gününde $73,14 \pm 6,77$ ng/ml ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Grafik 1'de gösterildi.

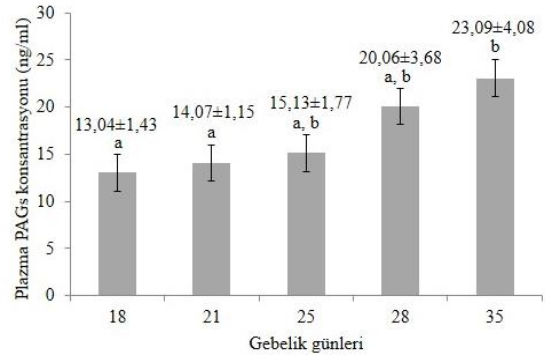
Gebeliğin 0. günü ile kıyaslandığında 55. günündeki ortalama plazma PAGs konsantrasyonunun istatistiki olarak önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Benzer şekilde gebeliğin 85, 113, 145. günlerindeki plazma PAGs konsantrasyonunun 0. gündeki plazma PAGs konsantrasyonundan, 145. gündeki plazma PAGs konsantrasyonunun ise 55, 85 ve 113. günlerdeki konsantrasyondan önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Gebeliğin 55, 85 ve 113. günlerindeki PAGs konsantrasyonları arasındaki farklılığın önemli olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$).



Grafik 1. Gebelik süresince belirlenen plazma PAGs değerleri

Çalışmanın İkinci Aşamasında Elde Edilen Sonuçlar

Plazma PAGs konsantrasyonunun gebeliğin erken dönemindeki profilini belirlemek amacıyla yapılan çalışmanın ikinci aşamasında PAGs konsantrasyonu 18. günde $13,04 \pm 1,43$ ng/ml, 21. günde $14,07 \pm 1,15$ ng/ml, 25. günde $15,13 \pm 1,77$ ng/ml, 28. günde $20,06 \pm 3,68$ ng/ml, 35. günde ise $23,09 \pm 4,08$ ng/ml ölçüldü. Ölçüm sonuçları Grafik 2'de verildi.



Grafik 2. Gebeliğin erken döneminde görülen plazma PAGs değerleri

Gebeliğin 18, 21, 25, 28 ve 35. günlerindeki plazma PAGs konsantrasyonu gebelik gününün artışına paralel olarak arttı. Ancak sadece 35. gündeki plazma PAGs konsantrasyonunun 18 ve 21. günlerdeki PAGs konsantrasyonundan önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Diğer günlerdeki PAGs konsantrasyonları arasındaki farklılıklar önemli düzeyde olmadı ($p > 0,05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Koyunlarda erken gebelik döneminde olayların daha detaylı incelenmesini sağlayan günümüz moleküler yöntemlerinin hızla gelişmesi erken gebelik teşhisi ve gebelik sürecinin izlenebilmesi için bilinen klinik yöntemlerin dışında yeni laboratuvar yöntemlerinin kullanılmasına ve geliştirilmesine imkan vermektedir. Özellikle gebeliğin erken döneminde embriyo ve/veya plasentadan sentezlenen ve maternal kan dolaşımına geçen sekretlerin veya parçalanma ürünlerinin tespiti için kan örneklemesinin minimal invaziv girişimle yapılabilmesi erken gebelik tanısı ve gebelik sağlığının izlenebilmesi için yeni biyomarkırların geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmaların önemini daha da artırmaktadır (19,20).

PAGs, plasentanın trofoblastik hücrelerinden sentezlenen ve annenin kan dolaşımına geçebilen moleküllerdir. Maternal kanda tespit edilebiliyor olması, çevresel şartlara karşı diğer moleküllere göre daha dayanıklı olması ve anti-jen-antikor reaksiyonun ve derecesinin renk değişimine dayalı olarak spektrofotometrik ölçümle belirlenebilmesi ve değişimin komplike matematik hesaplamalara ihtiyaç duyulmadan belirlenebilmesi gibi avantajları, bu moleküllerin reproduktif sürü idaresi açısından alınacak kararlardaki önemini daha da artırmaktadır (21). Sunulan bu çalışmada da Konya Merinosu koyunlarda gebeliğin 35. gününe kadar ve tüm gebelik süresince PAGs'ların plazma ekspresyon profili ve erken gebelik tanısı için kullanılabilirliği belirlenirken daha önceden elde edilen ve derin dondurucuda saklanan plazma örnekleri kullanıldı.

Çalışmanın sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde Konya Merinosu koyunlarda gebelik yaşı ilerledikçe plazma PAGs düzeyinde de artış olduğu görülmektedir. Bu sonuç, genel olarak koyunlarda daha önceden yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumludur (22, 23). Bununla birlikte, bu artışların çalışmanın birinci aşamasında; 55. günde 0. güne göre ve 145. günde önceki örnekleme günlerine göre, ikinci aşamada ise 35. günde 18 ve 21. günlere göre istatistiksel olarak önemli düzeyde gerçekleştiği görüldü. Diğer memelilerde olduğu gibi ruminantlarda da erken gebelik dönemi uterus, embriyo ve fötüs gelişiminde ve morfogenezde çok yoğun ve büyüleyici değişimlerin olduğu dönemdir. Bu dönem gebeliğin maternal kabulünün, fetal membranların endometriyuma tutunmasının ve plasenta oluşumunun başladığı ve tamamlandığı dönemdir. Koyun embriyosu gebeliğin 8. gününde zona pellusidadan kurtulup endometriyumla ilk temasını takiben trofoblastik hücrelerin hem sayıca hem de hacimsel artışıyla hızlı bir şekilde gelişir (1, 2, 3, 4). Embriyonun endometriyumla ilk teması ile başlayan implantasyon, trofoblastik hücrelerin apikal yüzeyindeki mikrovillusların endometriyumdaki uterus bezlerinden yoksun, kan damarlarından zengin karunkulalar içerisine doğru yaptığı derin ve dallanmış girintiler aracılığıyla lokal olarak gerçekleşmektedir ve gebeliğin 22-23. günlerinde tamamlanmaktadır. Bu dönemde mikrovillusların anne ve yavru arasındaki temas yüzeyinde oluşturduğu artışa ilave olarak, kan damarlarından zengin olan karunkulalardaki mikrovasküler kan hacmi de yaklaşık 2 kat artmaktadır (5, 24, 25). İmplantasyonun tamamlanması ve karunkulalardaki kan akımının artışının çalışmanın ikinci aşamasındaki 35. günde plazma PAGs konsantrasyonunun 18 ve 21. günlerdeki konsantrasyondan daha yüksek olmasının nedeni olduğu düşünülmektedir.

Birinci aşamada 55. gündeki PAGs konsantrasyonunun 0. günden yüksek olduğuna benzer bir bulgu Ranilla ve ark (10) tarafından da elde edilmiştir. Sunulan çalışmada 0 ve 55. günler arasında başka kan örnekleme yapılmamış olmakla birlikte bizim çalışmamızda elde edilen bulgu, koyunlarda plasenta oluşumunun 50-60. günlerde tamamlanması (1) ve çalışmanın ikinci aşamasında elde edilen 35. gündeki PAGs konsantrasyonunun 18 ve 21. günlerdeki konsantrasyonlardan yüksek oluşuyla da desteklenmektedir.

Çalışmanın birinci aşamasında gebeliğin 55. gününden itibaren yaklaşık 4 haftalık aralarla yapılan örnekleme PAGs konsantrasyonunun 55, 85 ve 113. günlerdeki örneklerde benzer olduğu, doğum öncesi alınan son örnekte ise belirtilen günlerdekine göre önemli düzeyde arttığı belirlendi. Benzer bulgu daha önce başka koyun ırklarında da yapılan bazı çalışmalarda da elde edilmiştir (10, 12, 15, 23). Gebeliğin son döneminde PAGs düzeyindeki artışın nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte, bazı PAGs'ın fötüsün dış ortamda yaşayabilmesi için özellikle solunum, sindirim ve boşaltım gibi hayati sistemlerinin gelişmesinde, olgunlaşmasında ve işlevselliklerini kazanmasında rollerinin olabileceği belirtilmektedir. Çalışmamızda örnekler geniş zaman aralıklarıyla alınmış olmakla birlikte plasantasyonun tamamlanmasından sonraki süreçte (gebeliğin 145. gününe kadar olan dönemde) kapillar damarların çaplarındaki yaklaşık iki-üç kat artışla karunküler vaskülaritede yaklaşık 2 kat artış olduğu ve plasental fonksiyonların geliştiği bildirilmiştir (25). Bu bildirimlere göre gebelik günü ilerledikçe plasantanın yapısal ve fonksiyonel olarak geliştiği ve bunun, çalışmada elde edilen gebelik günü ilerledikçe plazma PAGs profilinde gebelik yaşıyla paralel artışının nedeni olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca bu çalışmamızda elde edilen PAGs'nin profili, daha önce yapılan çalışmalarda da belirtildiği üzere, PAGs plasental orijinli hücrelerden maternal kan dolaşımına geçtiklerinden plasenta gelişiminin ve sağlığının bir belirteci olabileceğini işaret etmektedir.

İneklerde olduğu gibi, koyunlarda da PAGs'in erken gebelik tanısında kullanılabilirliği ve etkinliği üzerine serum, plazma ve süt örneklemeyle birçok çalışma yapıldı. Bu çalışmaların çoğunluğunda gebeliğin 30. gününe kadar gebelik tanısı yapılabileceği bildirilmiştir (10, 12, 11, 21, 26, 27, 28). Bizim çalışmamızda 35. gündeki plazma PAGs düzeyinin 7 gün önceki plazma örneklerinde elde edilen PAGs düzeyinden önemli düzeyde yüksek olması da belirtilen çalışmalarla sonuçlarımızın uyumunu göstermektedir. Ancak PAGs'in tespitine dayalı gebelik tanısında bu moleküllerin düzeyinin ırk, yavru sayısı, ölçüm tekniği, örnek materyali vb. faktörlerle etkilenebileceği de göz önünde tutulmalıdır.

Sunulan çalışmada ölçümler PAGs moleküllerine karşı monoklonal teknoloji ile üretilen antikorların ELISA pleyletlerine yapılandırılması esasına dayanan ticari kitle yapılmış olmasına rağmen hem birinci çalışmadaki çiftleştirme gününde (0. gün, PAGs konsantrasyonu $14,99 \pm 1,63$ ng/ml) hem de ikinci çalışmadaki çiftleştirme sonrası 18. günde (PAGs konsantrasyonu $13,04 \pm 1,43$ ng/ml) yüksek düzeyde PAGs konsantrasyonu ölçüldü. PAGs'in plasental kaynaklı olması nedeniyle gebe olmayan veya gebeliğin hemen başlangıcında olan dişilerde veya erkeklerde olmayacağı varsayılmaktadır. Ancak daha önce yapılan çalışmalarda boğalarda, tohumlanmamış düvelerde, gebe olmayan koyunlarda, gebeliğin 14. günündeki koyunlarda, koçlarda PAGs moleküllerinin tespit edildiği bildirilmiştir (28, 29, 30). Bu çalışmada monoklonal antikora dayalı bir kit kullanılmış olsa da kitin prospektüsünde belirtildiği gibi, antikorların plazmada bazı proteinlere bağlanarak bazal bir seviye olarak kabul edilen aralıkta renk değişimine neden olduğundan spektrofotometrik olarak ölçümün gerçekleştiği düşünülmektedir.

Bu nedenle gebelik tanısının güvenilir olabilmesi için kullanılan ölçüm metoduna göre bazal bir PAGs düzeyinin belirlenmesi ve örnekleme gününün doğru seçilmesinin önemi daha da artmaktadır.

Sonuç olarak, Konya Merinosu koyunlarda gebelik süresince kan plazmasındaki PAGs'ların konsantrasyonunun artma eğiliminde olduğu plasenta sağlığının izlenmesinde ve erken gebelik tanısında kullanılabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma birinci yazar Uğur Uçar'ın yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır. Bu çalışmanın saha aşamasının yürütülmesinde çok önemli katkıları olan Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü çalışanlarına ve laboratuvar analizlerindeki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Mehmet Salih Kaya'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. (2004). Conceptus Signals for Establishment and Maintenance of Pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 82-83, 537-550.
- Bazer FW, Guoyao W, Spencer TE et al. (2010). Novel Pathways for Implantation and Establishment and Maintenance of Pregnancy in Mammals. *Molecular Human Reproduction.* 16 (3): 135-152.
- Bazer FW, Wu G, Johnson GA, Kim J, Song G. (2011). Uterine Histotroph and Conceptus Development: Select Nutrients and Secreted Phosphoprotein 1 Affect Mechanistic Target of Rapamycin Cell Signaling in Ewes. *Biology of Reproduction.* 85: 1094-1107.
- Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. (2004). Focus on Implantation, Implantation Mechanisms. *Insights from the Sheep Reproduction.* 128: 657-668.
- Igwebuike UM. (2009) A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Animal Reproduction Science.* 112(1-2): 1-7.
- Wallace RM, Pohler KG, Smith MF, Green JA. (2015). Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. *Reproduction.* 149: 115-126.
- Igwebuike UM. (2006). Trophoblast cells of ruminant placentas-A minireview. *Animal Reproduction Science.* 93: 185-198.
- Szafranska B, Panasiewicz G, Majewska M. (2006). Biodiversity of multiple Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) family: gene cloning and chorionic protein purification in domestic and wild eutherians (Placentalia)-a review. *Reprod Nutr Dev.* 5: 481-502.
- Haugejorden G, Waage S, Dahl E et al. (2006). Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring. *Theriogenology.* 66: 1976-1984.
- Ranilla MJ, Sulon J, Carro MD, Mantecon AR, Beckers JF. (1994). Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep. *Theriogenology.* 42: 537-545.
- Karen A, Beckers JF, Sulon J et al. (2003). Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Theriogenology.* 59 (9):1941-8.
- Ranilla MJ, Sulon J, Mantecon AR, Beckers JF, Carro MD. (1997). Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Rumin Res.* 24: 125-131.

- González F, Sulon J, Garbayo JM et al. (1999). Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in plasma samples. *Theriogenology.* 52: 717-725.
- González F, Sulon J, Garbayo JM et al. (2000). Secretory profiles of pregnancy-associated glycoproteins at different stages of pregnancy in the goat. *Reprod Domest Anim.* 35: 79-82.
- Roberts JN, May KJ, Veiga-Lopez A. (2017). Time-dependent changes in pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in commercial crossbred sheep. *Theriogenology.* 89: 271-279.
- Moussafir Z, Allai L, El Khalil K, Essamadi A, El Amiri B. (2018). Could a bovine pregnancy rapid test be an alternative to a commercial pregnancy-associated glycoprotein ELISA test in dairy cattle? *Anim Reprod Sci.* 192: 78-83.
- Reyhaneh H, Holm, Stefan B et al. (2018). Pregnancy-associated glycoproteins in cows with retained fetal membranes. *Theriogenology.* 105: 158-163.
- Reese ST, Pereira MHC, Edwards JL, Vasconcelos JLM, Pohler KG. (2018). Pregnancy diagnosis in cattle using pregnancy associated glycoprotein concentration in circulation at day 24 of gestation. *Theriogenology.* 106: 178-185.
- Lucy M, Green J, Poock S. Pregnancy determination in cattle: A review of available alternatives. *Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle.* Erişim: <http://www.appliedreprostrategies.com/2011/joplin/proceedings/27lucy.pdf>. Erişim Tarihi: 04.09.2014
- Balhara AK, Gupta M, Singh S, Mohanty AK, Singh I. (2013). Early Pregnancy Diagnosis in Bovines: Current Status and Future Directions. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/958540>. Erişim Tarihi: 04.09.2014
- de Miranda E Silva Chaves C, Dias da Costa RL, Roncato Duarte KM et al. (2017). Visual ELISA for detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in ewe serum. *Theriogenology.* 15(97): 78-82.
- Gajewski Z, Melo de Sousa N, Beckers JF et al. (2008). Concentration of bovine pregnancy associated glycoprotein in plasma and milk: its application for pregnancy diagnosis in cows. *J Physiol Pharmacol.* 9:55-64.
- Ledezma-Torres RA, Beckers JF, Holtz W. (2006). Assessment of plasma profile of pregnancy associated glycoprotein (PAG) in sheep with a heterologous (anti-caPAG (55 + 59) RIA and its potential for diagnosing pregnancy. *Theriogenology.* 66: 906-912.
- Lawrence PR, DALE AR. (1992). Growth and Microvascular Development of the Uterus during Early Pregnancy in Ewes. *Biology of Reproduction.* 47: 698-708.
- Bairagi S, Quinn KE, Crane AR et al. (2016). Maternal environment and placental vascularization in small ruminants. *Theriogenology* 86: 288-305.
- El Amiri B, Sousa NM, Alvarez Oxiley A, Hadarbach D, Beckers JF. (2015). Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration in plasma and milk samples for early pregnancy diagnosis in Lacaune dairy sheep. *Res Vet Sci.* 99: 30-36.
- Rovani MT, Cezar AS, Rigo ML et al. (2016). Evaluation of a bovine pregnancy-associated glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay kit for serological diagnosis of pregnancy in sheep. *Ciência Rural.* 46(2): 362-367.
- El Amiri B, Karen A, Sulon J et al. (2007). Measurement of ovine pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during early pregnancy in Lacaune sheep, *Reproduction in Domestic Animals.* 42: 257-262.

29. Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, Ortiz WB, Beckers JF. (1992). Radioimmunoassay of a Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein in Serum: Its Application for Pregnancy Diagnosis. *Biology of Reproduction*. 46: 83-92.
30. Vandaele L, Verberckmoes S, El Amiri B et al. (2005). Use of a homologous radioimmunoassay (RIA) to evaluate the effect of maternal and foetal parameters on pregnancy-associated glycoprotein (PAGs) concentrations in sheep. *Theriogenology*. 63(7): 1914-1924.

Yazışma Adresi:

*Doç. Dr. Mehmet KÖSE

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji

Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

e-posta: mehmetkose1977@gmail.com