



## Gebe Konya Merinosu Koyunlarında Erken Gebelikte Gebelik İlişkili Glikoproteinlerin Plazma Profilinin Belirlenmesi\*

Yasemin KAPLAN<sup>1a</sup>, Nihat ÖZYURLU<sup>2b</sup>, Mehmet KÖSE<sup>2c✉</sup>, Mehmet Osman ATLI<sup>2d</sup>,  
İbrahim KÜÇÜKASLAN<sup>2e</sup>, Mesut KIRBAŞ<sup>3f</sup>

1. GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü ve Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, TÜRKİYE.
  2. Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE.
  3. Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Konya, TÜRKİYE.
- ORCID: 0000-0002-3071-4130<sup>a</sup>, 0000-0001-8115-2222<sup>b</sup>, 0000-0003-0070-8458<sup>c</sup>, 0000-0001-9853-5334<sup>d</sup>, 0000-0002-3458-4409<sup>e</sup>, 0000-0003-3487-0541<sup>f</sup>

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
10.07.2019	19.11.2019	25.12.2019

**Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:**

**Kaplan Y, Özyurtlu N, Köse M, Atıllı MO, Küçükaslan İ, Kırbas M:** Gebe Konya Merinosu Koyunlarında Erken Gebelikte Gebelik İlişkili Glikoproteinlerin Plazma Profilinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 14(3): 307-314, 2019. DOI: 10.17094/ataunivbd.588666.

**Öz:** Bu çalışmada, sığır ELISA-PAG (gebelik ilişkili glikoprotein) kitinin Konya Merinosu koyunlarda; 1) gebeliğin teşhisi ve 2) PAG'lerin erken gebelik plazma profilinin belirlenmesindeki kullanılabilirliği değerlendirildi. Bu amaçlar için, kan örnekleri gebeliğin 21-70. günleri arasında haftalık olarak alındı. Kit üreticisinin talimatına göre, PAG'lerin plazma seviyeleri belirlendi ve değer 0.3 OD'nin (optimal yoğunluk) üzerinde ise gebelik tanısı pozitif olarak kabul edildi. Gebeliğin 21 ve 70. günleri arasında PAG'lerin profilinde lineer benzeri bir artış olduğu belirlendi. PAG'lerin pozitif değer oranları 28, 35 ve 42. günlerde sırasıyla %30.8, %69.2 ve %66.7 olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre, ticari sığır ELISA-PAG kitinin Konya Merinosu koyunlarda erken gebeliğin tespitinde ve fetoplazental yapının sağlığının izlenmesinde güvenilir olduğu belirlendi. Ancak, plazma örneklerinde gebelik tanısı için pozitif değer 0.3 OD kabul edilirse erken gebelikte yüksek bir hata payı ortaya çıkmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Erken gebelik, Konya merinosu, Koyun, PAGs.

## Detection of Plasma Profile of Pregnancy Associated Glycoproteins During Early Pregnancy in Pregnant *Konya Merino* Sheep

**Abstract:** In this study, the usability of bovine ELISA-PAGs (Pregnancy Associated Glycoproteins) kit was evaluated for 1) the diagnosis of pregnancy and 2) the determination of early pregnancy plasma profile of PAGs in Konya Merino ewes. For these purposes, the blood samples were taken from 21 to 70 days of pregnancy by weekly. According to the manufacturer's instruction, the plasma level of PAGs was determined and accepted as the positive for pregnancy, if it was above than 0.3 OD (optimal density). An approximately linear increase in plasma profile of PAGs was determined for the period from 21 to 70 days of pregnancy. Percentages of the positive value of PAGs for on days 28, 35 and 42 were recorded as 30.8%, 69.2%, and 66.7%, respectively. According to these results, it can be concluded that the commercial bovine ELISA-PAGs kit is good for detecting early pregnancy and monitoring fetoplacental unit well-being in Konya Merino ewes. However, there is still a high margin of error for ewes if considering 0.3 OD for the positive.

**Keywords:** Early pregnancy, Konya merino, PAGs, Sheep.

✉ Mehmet Köse

Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE.

e-posta: mehmetkose1977@gmail.com

\*Bu çalışma, Yasemin Kaplan'ın Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsündeki "Koyunlarda Erken Gebelik Teşhisinde Sığır Gebelik İlişkili Glikoprotein Kitlerinin Kullanılabilirliğinin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

## GİRİŞ

**P**lasental memelilerde fertilizasyonla şekillenen yeni canlı gebelik sürecinin uzunca bir bölümünde, uterusu placentaya adı verilen ekstra-embriyonik zarların oluşturduğu geçici doku içerisinde tutulur ve dış ortamda yaşayabileceği yetileri kazanır (1). Progresif nitelikteki bu süreçte placentaya, endometriyum ile embriyo/fötüs arasında zamanlaması ve kronolojisi türler arasında değişebilen hücresel ve moleküler düzeyde gerçekleşen kompleks etkileşimlerle oluşur. Bu kompleks yapılaşma plasentaya, türler arasında değişken olmakla birlikte, gebeliğin oluşumu ve devamlılığı için gerekli olan birçok hormon, büyüme faktörü, protein, enzim vb. molekülü sentezleme ve salgılama özelliği kazandırır (2-4).

Ruminantlarda gebeliğin erken dönemlerinden itibaren maternal kan dolaşımında belirlenebilen plasental kaynaklı proteinlerin başında; gebelik ilişkili glikoproteinler (PAGs) gelmektedir. Bu proteinler plasentanın mononükleer ve binükleer trofoblastik hücrelerince sentezlenir ve maternal kan dolaşımında binükleer hücrelerin endometriyuma göçü ve sinsityal plakların oluşturulma zamanlamasıyla uyumlu olarak belirlenebilir (5,6).

Gebelik spesifik protein B olarak da bilinen gebelik ilişkili glikoprotein ailesi aspartik proteinaz familyasına dahil olmakla birlikte, bazı PAG moleküllerinin enzimatik aktivitelerinin olmadığı da iyi bilinmektedir (7). PAG'ler, ruminantlarda değişken derecelerde glikosilasyona sahip, 10'dan fazla yakın ilişkili antijenik protein içeren multijenik bir gen ailesidir. İlk olarak ineklerin periferik kan dolaşımında bazı PAG'lerin moleküllerinin belirlenmesi sonrası koyunlarda yapılan çalışmalarda da sığır PAG'leri ile immünolojik etkileşimi olan PAG moleküllerinin bulunması; bu türde yapılan çalışmaları daha da arttırmış ve koyunlarda farklı PAG'leri kodlayan bir düzineden fazla cDNA tespit edilmiştir (8). PAG'ler, plasental kaynaklı olduğundan ve maternal kan dolaşımında belirlenebildiğinden, ruminantlarda plasental gelişiminin izlenmesi ve erken gebelik tanısı

amacıyla kullanılacak bir belirteç olarak kabul edilmektedir (7). Bununla birlikte bu moleküllerin gebeliğin çok erken döneminden itibaren üretilmeye başlamaları sebebiyle; özellikle erken gebelik fizyolojisinin anlaşılması amacıyla immünolojik bariyer, maternal immun sistemin regülasyonu, embriyonun implantasyonu ve blastogenesisteki fonksiyonları da araştırılmaya devam etmektedir (9).

Periferik kan dolaşımındaki PAG profillerinin koyun ırkları arasında değişken olduğu, bu nedenle her ırka özgü PAG'lerin profilinin belirlenmesinin gebelik tanısı için geçerli bir ölçüm değerinin tespiti açısından önemli olduğu belirtilmektedir (10). Konya Merinosu, diğer adıyla Orta Anadolu Merinosu; ana hattı Akkaraman, baba hattı Alman Et Merinosu olmak üzere geliştirilmiş ve ırk tescil komisyonu tarafından 28.12.2017 tarih ve 26740 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan 2007/52 nolu tebliğ ile tescil edilmiş, beyaz vücutlu, ince kuyruklu ve kuzu verimi 1.4 olan bir koyun ırkıdır (11). G2 ve G3 düzeyindeki Alman Et Merinosu x Akkaraman melezi koyun ve koçların kendi aralarında çiftleştirilmesi ve seleksiyonuyla geliştirilen Konya Merinosu %20 oranında Akkaraman kanı taşımaktadır (12). Bu ırk, Orta Anadolu'nun şartlarına çok iyi uyum sağlamıştır. Yetersiz mera şartlarından çok iyi yararlanabilmektedir ve yüksek yaşama gücü özelliklerine sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle yetiştiriciler tarafından çokça tercih edilen bir ırktır (13). Yerli ırklarımızın büyüme, yaşama gücü, besi performansı, döl verimi vb. özellikleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte yerli ırklarda PAG'ler ve benzeri moleküllerin profillerinin belirlenmesi ileri fizyolojik araştırmalar ve pratik uygulamalar için temel öneme sahiptir (14).

Bu çalışmada, Konya Merinosu koyunlarda gebeliğin 21. gününden itibaren 70. gününe kadar haftalık örneklemelerle sığır ELISA-PAG kiti (IDEXX Bovine Pregnancy test kit, Switzerland AG, Stationsstrasse 12, 3097 Liebefeld-Bern, Switzerland) kullanılarak gebelik ilişkili glikoproteinlerin ekspresyon

profilinin belirlenmesi ve erken gebelik tanısında kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlandı.

#### **MATERYAL ve METOT**

Çalışma; Dicle Üniversitesi Rektörlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 29.11.2017 tarih ve 107860 sayılı kararları doğrultusunda gerçekleştirildi.

#### **Koyunların Seçilmesi ve İdaresi**

Çalışma; Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Küçükbaş Hayvan Yetiştirme Bölümü'nde yetiştirilen *Konya Merinosu* koyunlarda yapıldı. Plazma örnekleri klinik olarak sağlıklı, en az bir doğum yapmış, iyi vücut kondisyonlu (1-5 skalasına göre 2.5-4 skoru olanlar), 2-5 yaş arasındaki koyunlar arasından seçilen 13 baş gebe koyundan elde edildi. Koyunlar gündüzleri yapay merada otlatılırken, geceleri yarı açık kapalı ağıllarda tutuldu. Koyunlara mera otlatmasına ilave olarak günde 300 gr/baş karma yem verildi.

#### **Koyunlarda Östrüs Tespiti ve Çiftleştirilmesi**

Koyunlarda doğal östrüs tespiti sabah ve akşam olmak üzere 45 dakikalık iki periyotta arama koçlarıyla yapıldı. Östrüste olduğu belirlenen koyunlar elde sıfat yöntemiyle aynı ırk damızlık bir koç ile çiftleştirildi. Koyunların çiftleştirilme günü, gebelikleri için 0. gün olarak kabul edildi.

#### **Koyunlarda Gebeliğin Teşhisi ve Plazma Örneklerinin Elde Edilmesi**

Çiftleştirme sonrası 21. günde (kör örnekleme ile) vena jugularisden vakumlu Na-EDTA içeren tüplere ilk kan örnekleri alındı. Daha sonra 28. günde sırt üstü yatırılan koyunlarda transrektal ultrasonografi (7.5 MHz transrektal prob donanımlı B-Mode Real Time ultrason cihazı; Scanner 480 Vet, Esaote Pie Medical, Maastrich, Hollanda) yapılarak embriyonik kalp atımı görülerek gebe oldukları belirlenen koyunlar çalışmaya dahil edildi ve 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerde diğer kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 3000 devir/dakika'da 20 dk santrifüj edildi ve plazma örnekleri eppendorf tüplere

aktarıldı ve PAG'lerin analizine kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Gebeliklerin devamlılığı 35. günde ikinci transrektal ultrasonografiyle teyit edilirken gebelik sürecinin doğum ile tamamlandığı da işletme kayıtlarından tespit edildi. Çalışmaya tek kuzu doğuran koyunlar dahil edildi.

#### **Plazma Örneklerinde PAG Düzeylerinin Belirlenmesi**

Laboratuvar analizleri aşamasında plazma örnekleri derin dondurucudan oda ısısı ortamına analizlerin başlamasından 1 saat önce çıkarılarak sıcaklıklarının ortam sıcaklığına erismeleri sağlandı. Daha sonra mikroplyet üzerinde iki pozitif ve iki negatif kontrol kuyucuğu işaretlendi, sonrasında plazma örnekleri örnekleme desenine kayıt edilerek kuyucuklara dağıtıldı. Plazma örneklerindeki PAG'lerin değeri ELISA tabanlı çalışan ticari bir kit kullanılarak belirlendi. Laboratuvar analizleri üretici firmanın kit prospektüsündeki talimatlara uyularak adım adım gerçekleştirildi. Mikroplyet kuyucuklarında reaksiyonun durdurulmasından sonra kuyucuklardaki renk değişimlerini belirlemek amacıyla numunelerin ve kontrollerin optik dansite yoğunlukları 450 nm ve 650 nm referans dalga boylarında, Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜBTAM) laboratuvarında bulunan spektrofotometri cihazında (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) belirlendi. Tüm numunelerin ve kontrollerin her birinin düzeltilmiş OD (optimal yoğunluk) değerleri; 450 nm'deki OD değerlerinden 650 nm referans dalga boyundaki OD değerinin çıkarılmasıyla belirlendi. Bu aşamadan sonra numunelerin düzeltilmiş OD değerlerinden, negatif kontrollerin düzeltilmiş ortalama OD değerleri çıkarılarak gebelik tanısı için esas OD (S-N) değeri belirlendi. Her bir numune için belirlenmiş bu değerlerin yorumlanmasında; S-N değeri  $\geq 0.30$  ise gebelik pozitif, S-N < 0.30 ise gebelik negatif kabul edildi.

#### **İstatistiksel Analiz**

Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile belirlendi. Gruplar arası ve grup

içi ölçümlerin homojenliği test edildi. Çalışmada örnekleme günlerine (gebelik günlerine) ilişkin ortalama OD değerleri en küçük kareler ortalaması±standart hata şeklinde hesaplandı ve istatistiki analizinde tekrarlı ölçümler varyans analizi kullanıldı. Günler arasındaki farklılıkların kontrolü ise bonferroni düzeltilmiş “p” değerleri kullanılarak wilcoxon pairwise testi ile yapıldı. İstatistiksel önemlilik seviyesinde P<0.05 esas alındı.

## BULGULAR

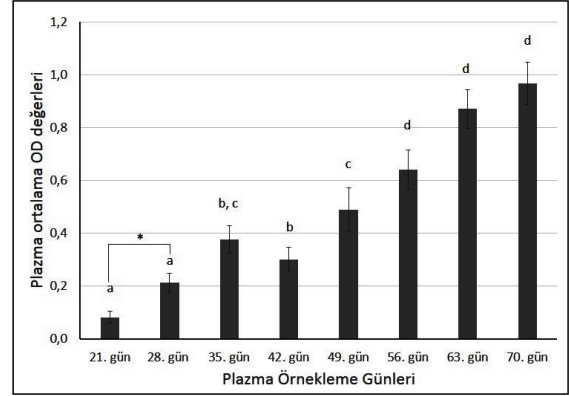
*Konya Merinosu* koyunlarda plazma ortalama PAG’lerin OD değerlerinin; gebeliğin 21-70. günleri arasında doğrusal olarak arttığı belirlendi. Gebeliğin 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 ve 70. günlerinde koyunların plazmalarında belirlenen ortalama PAGs-OD değerleri Tablo 1’de verildi, bu değerlerin sütun grafiği ise Şekil 1’de gösterildi.

**Tablo 1.** Örnekleme günlerinde ortalama plazma PAG’lerin OD değerleri ve PAG’lerin pozitif değerlerinin yüzdeleri.

**Table 1.** Mean plasma OD values of PAGs and percentages of the positive value of PAGs on sampling days.

Örnekleme günü	n	Plazma PAG OD değeri (X±Sx)	≥0.03 OD oranı (Sensivite)
21	13	0.08±0.02 <sup>a</sup>	7.69 (1/13)
28	13	0.21±0.04 <sup>a</sup>	30.77 (4/13)
35	13	0.38±0.05 <sup>bc</sup>	69.23 (9/13)
42	13	0.30±0.05 <sup>b</sup>	61.54 (8/13)
49	13	0.49±0.08 <sup>c</sup>	76.92 (10/13)
56	13	0.64±0.07 <sup>d</sup>	92.31 (12/13)
63	13	0.87±0.07 <sup>d</sup>	100.0 (13/13)
70	13	0.97±0.08 <sup>d</sup>	100.0 (13/13)

Tabloda farklı harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark anlamlıdır. a, b, c, d: P<0.05. OD: Optimal yoğunluk; PAGs: Gebelik ilişkili glikoproteinler.



**Şekil 1.** Örnekleme günlerinde ortalama plazma PAG’lerin OD değerleri.

**Figure 1.** Mean plasma OD values of PAGs on sampling days.

Gebeliğin 21 ve 28. günlerindeki PAG’lerin ortalama OD değerleri arasındaki istatistiksel önem farklılığının 0.07 düzeyinde olduğu tespit edildi.

Çalışmada ilk örneklemenin yapıldığı 21. güne göre, ortalama PAG’lerin OD değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli düzeydeki ilk farklılık 35. günde oldu (P<0.05). Gebeliğin 35 ve 42. günlerindeki ortalama PAG’lerin OD değerleri arasında istatistiksel düzeyde farklılık oluşmazken (P>0.05), 49. gündeki ortalama PAG’lerin OD değeri 42. gündeki ortalama PAG’lerin OD değerine, 56. gündeki ortalama PAG’lerin OD değeri ise 49. gündeki ortalama PAG’lerin OD değerine göre önemli düzeyde artış gösterdi (P<0.05). Gebeliğin 56, 63 ve 70. günlerindeki ortalama PAG’lerin OD değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel düzeyde önemli bulunmadı (P>0.05). Ancak, gebeliğin 35. gününden sonraki her PAG’lerin OD ortalama değeri ise gebeliğin 21 ve 28. günlerindeki PAG’lerin OD değerlerinden önemli düzeyde farklı bulundu (P<0.05).

Plazma örnekleme günlerinde, S-N değeri ≥0.30 olan koyunların oranı Tablo 1’de verildi. Plazma ortalama PAG’lerin OD değeri 21 ve 28. günlerde 0.3 değerinden düşük tespit edildi. Gebeliğin 35. gününde plazma ortalama PAG-OD değeri 0.38 belirlendi ve bundan sonraki örnekleme günlerinde plazma ortalama PAG-OD ≥0.30 oldu. S-N değeri ≥0.30 olan koyunların oranı da ortalama PAG’lerin OD

değerlerine paralel olarak artarak devam etti ve 28, 35 ve 42. günde S-N değeri  $\geq 0.3$  olan koyun oranı sırasıyla; %30.77, %69.23 ve %61.54 oldu, 63. günde %100'e ulaştı.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Ruminantlarda PAG'lerin periferik kan dolaşımındaki profilinin tür ve ırk düzeyinde değişebileceği, bu moleküllerin profilinin belirlenmesinin gebelik fizyolojisi ve patolojilerine ilişkin temel bilgiler sağlayabileceği belirtilmektedir (15). Bu çalışmada da, *Konya Merinosu* koyunlarda gebeliğin maternal kabulü sürecinin hemen sonrasında başlayarak plasentasyonun tamamlanmasına kadar olan gebelik döneminde PAG'lerin plazma profili haftalık ölçümlerle belirlendi.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; *Konya Merinosu* koyunlarda gebeliğin 21. gününden başlayarak 70. gününe kadar 7 gün aralıklarla yapılan örneklemelerle plazma PAG'lerin konsantrasyonunun doğrusal olarak arttığı görüldü. Koyunlarda embriyo, gebeliğin başlangıcında histiyotrofik, sonrasında bu beslenme yoluna ek olarak, oluşan kotiledon, sindesmokoryal, intermedial özelliklerdeki plasentanın oluşumuyla esas beslenme yolu olan hemotrofik yolla beslenir (2,16). Koyunlarda plasentanın oluşumuna kadar olan gebelik süreci; hızla büyüyen ve gelişen embriyo/fötüsün ihtiyaçlarını karşılamak üzere özellikle hemotrofik beslemeye geçiş hızlandırmak amacıyla plasental dokuda hızlı büyüme, plasental transportun artarak geliştiği ve yoğun bir yapılanma şeklinde dinamik değişikliklerin olduğu süreçtir (17-19). Embriyonun zona pellusidadan çıkmasını takiben, PAG'leri sentezleyen ve granüller içerisinde salgılayan mononükleer ve binükleer trofoblastik hücrelerin sayısında ve hacimlerindeki artışla başlayan plasentasyon süreci, mikrovillusların kan damarlarından zengin karunkulalar içerisine doğru yaptığı derin ve dallanmış girintilerle oluşturduğu, feto-maternal kan değişiminin gerçekleştiği plasentomların oluşumuyla tamamlanmaktadır (2). Progresif özellikteki bu süreçte mikrovilluslar

aracılığıyla endometriyum ve koryon arasındaki temas yüzeyindeki artışla birlikte karunkulalardaki kan akımı da artmaktadır. Plasentasyondaki bu gelişmelerle, PAG'lerin sentezlendiği mononükleer ve binükleer hücrelerin hipertrofisi ve sayısındaki artış; PAG'lerin daha fazla salgılanması ve maternal kan dolaşımına plasental ürünlerin transportunu kolaylaştırdığından gebelik ilerledikçe maternal kan plazmasında PAG moleküllerinin konsantrasyonlarındaki doğrusal artışın açıklanmasına dayanak oluşturmaktadır. Bununla birlikte; bu çalışmada elde edilen sonuçlar, daha önce *Konya Merinosu* koyunlarda PAG'lerin plazma profilini gösteren Uçar ve ark.'nın (20) bildirişleriyle ve bu çalışmada kullanılan PAG-ELISA ticari kitini kullanarak koyunlarda gebeliğin 30-120. günleri arasında PAG'lerin profilini gösteren Robert ve ark.'nın (10) bildirişleriyle uyumludur.

Çiftlik hayvanlarında gebelik sürecinin izlenmesinde kullanılacak biyomarkırların; non-invaziv veya çok az invaziv yolla elde edilecek örneklerle, besleme, ilaç ve çevresel faktörlerden etkilenmeden, kısa sürede yapılan analizlerle, konseptusun yaşını ve canlılığını ifade edebilme özelliğinde olması gerekmektedir (21). Sunulan bu çalışmada gebelik yaşı ilerledikçe plazma PAG'lerin konsantrasyonunun doğrusal artması hem plasenta gelişiminin hem de yavru gelişiminin indirekt izlenmesinde iyi bir indikatör olduğunu işaret etmektedir. Zira yavrunun gelişiminin, plasentanın ağırlığının, gebelik sıvılarının ve plasentomların büyüklüğünün gebelik yaşıyla uyumlu olarak arttığı koyun, keçi ve ineklerde daha önce yapılan postmortem veya ultrasonografik çalışmalarla gösterilmiştir (17,22-28).

Bu çalışmada kullanılan ölçüm kiti, sığırlarda erken gebelik tanısı için geliştirilmiş bir kit olmakla birlikte PAG'lerin evrim süresince çok iyi korunması ve sığır ve koyunlar arasında PAG'leri kodlayan genlerin homologları arasındaki %70'in üzerindeki benzerlik, türler arasında çapraz reaksiyonların oluşumuna imkan sağladığından inekler için geliştirilmiş bu kitin koyunlarda da kullanımına imkan

sağlamaktadır (9,10). Sunulan bu çalışmada gebeliğin 35. gününde plazma ortalama PAG-OD değeri  $0.38 \pm 0.05$  ölçüldü. Bu değer, ELISA-PAG kitinin prospektüsünde pozitif gebelik tanısı için kabul edilen  $\geq 0.300$  değerinden büyüktür. Ancak 35. günde plazma PAG-OD değeri  $\geq 0.300$  değerinden yüksek olan koyun oranı, kit prospektüsünde 35. günde koyun serumu için belirtilen sensitivite değerinden (%100) oldukça düşüktür. Steckeler ve ark. (29), 35 ve 43. günlerde yapılan ultrasonografi sonuçlarına göre gebe koyunlarda plazma örneklerindeki PAG'lere ilişkin sensitivite değerinin 42. günde %100 ulaştığını, ancak 49. günde %63.6 oranına gerilediğini, tekrar %100 oranına ise; bizim çalışmamızda olduğu gibi, 63. günde ulaştığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise gebeliğin 49. gününde  $\geq 0.300$  değerinden yüksek plazma PAG-OD değeri belirlenen koyun oranı, Steckeler ve ark.'nın (29) bildirdiği orandan biraz yüksek, %76.92 oldu. Genel olarak, bizim çalışmamızın sonuçları, Steckeler ve ark.'nın (29) sonuçlarıyla uyumludur ve plazma PAG-OD profilleri benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte 35. günde plazma ortalama PAG'lerin OD değerinin  $0.38 \pm 0.05$  ölçülmesi, pozitif gebelik tanısı için kabul edilen  $\geq 0.300$  değerinden daha büyük değerlere sahip olan koyunların olduğunu göstermektedir. Hem bu bulgu hem de koyunların tamamında bireysel plazma PAG'lerin OD değerinin  $\geq 0.300$  üzerine çıkışının; ilk örnekleme gününün plasentasyonun tamamlandığı 60. günden sonra 63. gün olarak belirlenmesi; pozitif gebelik tanısı için alt sınır kabul edilen değerin  $\geq 0.300$ 'ün üzerine çıkmasında koyunlar arasında bireysel farklılıkların çok önemli etkisinin olduğuna işaret etmektedir. Bu bulguya benzer bir sonuç da monoklonal ELISA-PAG kiti kullanarak aynı ırk koyunlarda çalışan Uçar ve ark. (20) tarafından bildirilmiştir.

Günümüzde saha şartlarında koyunlarda gebelik tanısı amacıyla en yaygın kullanılan teknik transabdominal ultrasonografi tekniğidir. Transrektal ultrasonografiyle gebelik daha erken dönemde belirlenebilmesine karşın, oluşturduğu çeşitli komplikasyonlar ve daha fazla iş gücü ve zaman

gerekliliği, 3-5 gün daha gecikmeli gebelik tanısı yapılabilen transabdominal ultrasonografi seçeneğini ön plana çıkarmaktadır (24). Ancak, transabdominal uygulama için en ideal günlerin 40-75. günler arası olduğu ifade edilmektedir (30). Bu nedenlerden dolayı her ne kadar bu çalışmada plazma örnekleriyle koyunlarda gebelik tanısı gecikmiş gibi görünse de; örneklerin toplanması, saklanması ve ölçümler için çok donanımlı alet-cihaz gerektirmemesi, örneklerin analize kadar sonuçlar etkilenmeden saklanabilmesi gibi önemli avantajlar, sığır ELISA-PAG kitini koyunlarda gebelik tanısı için ultrasonografiye alternatif yapmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen önemli sonuçlardan birkaçı; plazma ortalama PAG-OD değerinin 42. günde 35. gündeki değere göre önemli düzeyde olmamakla birlikte hafif bir düşüş göstermesi, 49. gündeki plazma ortalama PAG-OD değerinin 42. gündeki değere göre önemli düzeyde artış göstererek binominal bir ekspresyon profili oluşturmasıdır. Benzer bir bulgu Steckeler ve ark. (29) tarafından bizim çalışmamızda olduğu gibi haftalık örnekleme yapılan güncel bir çalışmada elde edilmiştir. Steckeler ve ark. (29) çalışmalarında plazma örneklerinden yapılan görsel PAG-ELISA testinde; gebe koyunların oranında 49. günde bir düşme olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte daha önce ineklerde de PAG'lerin ekspresyonlarında binominal ekspresyon olduğu gösterilmiştir (31). Bizim çalışmamızda da 42. gündeki plazma PAG-OD değerindeki düşüşün plasenta fonksiyonundaki hızlı değişimler, bu evrede plasental büyümenin hızlı olması ve artmış plasental taşınım ve yeniden yapılanma gibi gebeliğin dinamik değişimlerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmekle birlikte ilave çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak; Konya Merinosu koyunlarda plazma PAG'lerin profilinin gebelik yaşıyla uyumlu olarak artış gösterdiği kanısına varıldı. Ancak, sığır ELISA-PAG kitiyle koyunlarda plazma örnekleriyle plasentasyonun tamamlanma süreciyle çok yüksek güvenilirlikle gebelik tanısı yapılabileceği kanısına varıldı.

**Çıkar Çatışması**

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

**Teşekkür**

Yazarlar, bu çalışmada kullanılan plazma örneklerinin toplanmasında gösterdikleri gayretlerinden dolayı Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü yönetimi ve çalışanlarına teşekkür eder.

**KAYNAKLAR**

1. Abbot P., Rokas A., 2017. Mammalian pregnancy. *Current Biol*, 27, 127-128.
2. Chavatte-Palmer P., Tarrade A., 2016. Placentation in different mammalian species. *Ann Endocrinol*, 77, 67-74.
3. Carter AM., Mess AM., 2017. The evolution of fetal membranes and placentation in carnivores and ungulates (Ferungulata). *Anim Reprod*, 14, 124-135.
4. Roberts RM., Green JA., Schulz LC., 2016. The Evolution of the Placenta. *Reproduction*, 152, 179-189.
5. Sammin D., Markey B., Bassett H., Buxton D., 2009. The ovine placenta and placentitis- A review. *Vet Microbiol*, 135, 90-97.
6. Igwebuike UM., 2009. A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Anim Reprod Sci*, 112, 1-7.
7. 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*, 46, 481-502.
8. Sousa NM., Ayad A., Beckers JF., Gajewski Z., 2006. Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants. *J Physiol Pharmacol*, 57, 153-171.
9. 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.
10. 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.
11. Resmi Gazete, 2017. 28.12.2017 tarih ve 26740 sayılı gazete, 2007/52 nolu tebliğ, Ek-34, Orta Anadolu Merinosu.
12. Kaymakçı M., Taşkın T., 2008. Türkiye koyunculığında melezleme çalışmaları. *Hayvansal Üretim*, 49, 43-51.
13. TAGEM, 2009. Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları. 1. baskı, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Aralık 2009, Ankara.
14. Sousa NM., Garbayo JM., Figueiredo JR., Sulon J., Goncalves PB., Beckers JF., 1999. Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and postpartum in native goats from the north-east of Brazil. *Small Rumin Res*, 32, 137-147.
15. El Amiri B., Karen A., Sulon J., Melo de Sousa N., Alvarez-Oxiley A., Cognie Y., Szenci O., Beckers JF., 2007. Measurement of ovine pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during early pregnancy in Lacaune sheep. *Reprod Dom Anim*, 42, 257-262.
16. Spencer TE., Bazer FW., 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol and Endocrinol*, 2, 1-15.
17. Wallace JM., Da Silva P., Aitken RP., Cruickshank MA., 1997. Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescent sheep. *J Endocrinol*, 155, 359-368.
18. Johnson GA., Burghardt RC., Bazer FW., 2014. Osteopontin: a leading candidate adhesion molecule for implantation in pigs and sheep. *J Anim Sci Biotechnol*, 5, 1-15.
19. Imakawa K., Bai R., Fujiwara H., Kusama K., 2016. Conceptus implantation and placentation: molecules related to epithelial-mesenchymal transition, lymphocyte homing, endogenous retroviruses, and exosomes. *Reprod Med Biol*, 15, 1-11.

20. Uçar U., Köse M., Atlı MO., 2018. Konya Merinosu koyunlarda gebelik ilişkili glikoproteinlerin gebelikteki plazma profili ve erken gebelik tanısında kullanılabilirliği. Dicle Üniv Vet Fak Derg, 11, 77-82.
21. Balhara AK., Gupta M., Singh S., Mohanty AK., Singh I., 2013. Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. Scientific World J, 5, 1-10.
22. Bazer FW., Spencer TE., Thatcher WW., 2012. Growth and development of the ovine conceptus. J Anim Sci, 90, 159-170.
23. Ehrhardt RA., Bell AW., 1995. Growth and metabolism of the ovine placenta during mid-gestation. Placenta, 16, 727-741.
24. Jones AK., Reed SA., 2017. Benefits of ultrasound scanning during gestation in the small ruminant. Small Rum Res, 149, 163-171.
25. Patel OV., Sulon J., Beckers JF., Takahashi T., Hirako M., Sasaki N., Domeki I., 1997. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. Eur J Endocrinol, 137, 423-428.
26. Erdoğan G., 2012. Ultrasonic assessment during pregnancy in goats-A Review. Reprod Dom Anim, 47, 157-163.
27. Gonzalez de Bulnes A., Santiago Moreno J., Lopez Sebastian A., 1998. Estimation of foetal development in Manchega dairy ewes by transrectal ultrasonographic measurements. Small Rumin Res, 27, 243-250.
28. Gürler H., Kaymaz M., 2011. Akkaraman ırkı koyunlarda transrektal ve transabdominal muayene tekniği kullanılarak embriyonik ve fetal yaşın belirlenmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 58, 99-104.
29. Steckeler P., Weber F., Zerbe H., Rieger A., Voigt K., 2019. Evaluation of a bovine visual pregnancy test for the detection of pregnancy-associated glycoproteins in sheep. Reprod Dom Anim, 54, 280-288.
30. Erdem H., Sarıbay MK., 2019. Gebelik ve tanı yöntemleri "Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji", Editörler: Mustafa Kaymaz, Murat Fındık, Ali Rişvanlı, Afşin Köker, 3. Baskı, 441-452, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti, Malatya.
31. Thompson IM., Tao S., Branen J., Ealy AD., Dahl GE., 2013. Environmental regulation of pregnancy-associated glycoprotein B concentrations during late pregnancy in dairy cattle. J Anim Sci, 91, 168-173.