



Kısırlarda Erken Gebelik Tespiti

Mehmet Osman ATLI^{1✉}, Mehmet KÖSE¹, Ercan KURAR², Aydın GÜZELOĞLU²,

Ahmet SEMACAN³

1. Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.
2. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Konya.
3. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Konya.

Özet: At yetiştiriciliğinde kısa olan üreme sezonunun iyi değerlendirilip, sezon boşa geçirilmeden kısırlarda gebeliğin oluşturulması öncelikli hedefler arasında yer almaktadır. Sınırlı üreme sezonuna sahip kısırların ülkemizin de içinde bulunduğu coğrafyada ilkbahar aylarında başlayan ovaryum aktiviteleri sonbahara kadar devam etmektedir. Bu süreç içinde reproduktif herhangi bir sorunu olmayan kısırlarda düzenli östrus siklusu sayısı oldukça azdır. Dolayısıyla gebeliğin mümkün olan en kısa zamanda tespitinin kritik önemi bulunmaktadır. Bu amaçla farklı tanı yöntemleri kullanılmasına rağmen, gebeliğin mümkün olan en kısa zamanda teşhisine olanak sağlayacak etkin ve pratik bir yöntem halen ihtiyaç duyulmaktadır. Bu derleme kapsamında öncelikle kısırların erken gebelik fizyolojisi hakkında kısaca bilgi verilecektir. Mevcut gebelik tanı yöntemleri (östrusların izlenmesi, rektal palpasyon, ultrasonografi, progesteron, östrojen, eCG, erken gebelik faktörünün ölçümü ve gebeliğe bağlı gen ekspresyonları ile gebelik tespiti) avantajları ve dezavantajları açısından tartışılacaktır. Ayrıca, gebeliğin maternal kabul mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması amacıyla yapılan güncel çalışmalar ve gebeliğin tanısında alternatif yaklaşımlar hakkında bilgi verilecektir.

Anahtar kelimeler: Erken gebelik tespiti, Kısırak.

Early Detection of Pregnancy in Mares

Abstract: It is important in horse breeding that mares need to get pregnant at end of short breeding season. Mares have a short breeding season characterized with ovarian activity and it lasts from spring to autumn in our country. During the season number of regular estrous cycles is very few even if the mares are sound reproductively. Therefore, pregnancy diagnosis as early as possible after breeding remains critically important. Even though clinical methods and laboratory analysis are commonly used, there is still a need for an economical, dependable and practical method for diagnosing pregnancy in early period of pregnancy. In this review, a brief information about physiology of early pregnancy in mares will be given. Furthermore, current pregnancy diagnosis methods (estrus detection, rectal palpation, ultrasonography, measurements of progesterone, estrogen, eCG and early pregnancy factor and gene expressions due to the pregnancy) will be discussed in detail including their advantages and disadvantages. Also, current conceptions about molecular mechanism of maternal recognition of pregnancy in mare will be evaluated and alternative pregnancy diagnosis methods will be discussed.

Key words: Early pregnancy detection, Mare.

GİRİŞ

Sportif ve hobi amaçlı at yetiştiriciliği Türkiye’de her geçen gün artmaktadır. At yetiştiriciliğinin ekonomik sınırlar içerisinde devam ettirilebilmesi için bu hayvanlardan yılda bir yavru alınması hedeflenmektedir. Kısraklar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olup, yıl içinde sınırlı sayıda düzenli östrus göstermektedirler. Dolayısıyla gebeliğin aşımı takiben kısa bir sürede güvenilir ve uygulanabilir bir teşhis yöntemi ile belirlenmesinin kritik önemi bulunmaktadır. Bununla birlikte özellikle ikiz gebeliklerin kısraklar için istenmeyen bir durum olmasından dolayı erken gebelik teşhisinin önemi daha da artmaktadır. Sunulan bu derleme kapsamında kısaca kısrakların erken gebelik fizyolojisi hakkında bilgiler verilecek, ayrıca günümüzde uygulanan veya geliştirilmeye çalışılan gebelik teşhis yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları sunulmaya çalışılacaktır.

Kısraklarda Erken Gebelik

Kısrakların büyük bir kısmı (%90) mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olup, Türkiye sınırları içinde seksüel aktivitelerini ilkbahar-sonbahar ayları arasında göstermektedirler (Şenünver ve ark., 1995). Kısraklarda ırka göre değişmekle birlikte bir üreme sezonunda düzenli ve ovulasyonla sonuçlanan östrus siklusu sayısı sınırlı olup 3-6 adet arasında değişmektedir. (Hyland 1990; England 2005). Kısraklarda östrus siklusu folliküler faz ve luteal faz olarak iki döneme ayrılır. Aşım sezonu içerisinde siklik aktivitenin düzenli olarak gözleendiği ve 4-6 gün süren östrus döneminde (folliküler faz) kısrak çiftleşmek için aygırı kabul etmektedir. Ovulasyonun şekillendiği bu dönemde, genital kanalda spermatozoonların taşınmasını kolaylaştırıcı mekanizmalar şekillenmektedir. Ovulasyon sonrası kısırağın aygırı red ettiği, genital kanalın embriyo için hazırlandığı diöstrus dönemi (luteal faz) 15-17 gün sürmektedir (Daels ve Hughes, 1993; Allen ve Antczak, 2000). Eğer uygun bir doğal aşım veya suni

tohumlama protokolü uygulanmış (ovulasyondan en az 12 saat önce tohumlanmış kısraklarda) ise gebelik şekillenebilir.

Diğer evcil hayvanlar ile kıyaslandığında, kısrakların gebelik sürecindeki bazı olaylar farklı özellikler taşımaktadır. Örneğin; sadece fertilize olan oosit hücre (zigot) uterus içerisine taşınmakta, fertilize olmayan oositler oviduktlar içerisinde tutularak birkaç ay içinde tamamen dejenere olmaktadır. Embriyonun ovidukt içerisindeki transferi domuz (48 saat) ve ruminantlar (72 saat) ile kıyaslandığında daha uzun sürede (144–152 saat) olmaktadır. Kısraklarda gebeliğin maternal olarak tanınmasında rol oynayan molekül veya moleküller günümüzde halen karakterize edilememiştir. Bununla beraber gebeliğin maternal kabulü için embriyonun uterus içerisinde kornular ve korpus arasında hareket etmesi (migrasyon) zorunludur ve bu dönemde embriyo oldukça hareketlidir. Kısrak embriyosu diğer evcil hayvan türleri ile kıyaslandığında daha uzun süre varlığını sürdüren bir sarı kese yapısına sahiptir. Kısrak embriyosunun etrafı; gebeliğin 6,5. gününden 22. güne kadar glikokaliks yapısında bir kapsül ile çevrelenmiştir. (McDowell ve ark., 1988; Oriol ve ark., 1993; Battut ve ark., 1997; Ginther, 1998; Allen, 2000; Allen, 2001; Allen, 2005; Allen ve Wilsher, 2009).

Fertilizasyondan sonra, fetal hayatın başlangıcına kadar, embriyo uterus içerisine girdiği 6. günden itibaren mobilizasyon, fiksasyon ve orientasyon dönemleri geçirmektedir (Ginther, 1998). Daha sonra embriyo 40. günde uterusu implante olmaya başlar. Bu dönem içinde trofoblast hücrelerinin bir kısmı farklılaşarak kısraklarda gebeliğin devamını sağlamaktan sorumlu progesteronu salgılatan sekonder korpus luteumları şekillendirecek olan eCG (equine chorionic gonadotropin) hormonunu salgılayacak olan endometrial kapları şekillendirir (Allen, 2001).

Kısraklarda Gebelik Teşhisinde Kullanılan Yöntemler

Kısraklarda üreme performansının iyileştirilmesinde erken dönemde yapılan gebelik muayenesinin önemli rolü bulunmaktadır. Yapılan bu muayenede esas amaç gebeliğin erken tanısından ziyade gebe olmayan kısrakların mümkün olan en erken dönemde belirlenmesi olup bu sayede gebe olmadığı belirlenen kısrakların ilk östrus periyodunda tekrar doğal aşım veya suni tohumlamaya tabi tutulmaları mümkün olabilmektedir (Gordon, 1997). Kısrakların erken dönemde gebelik durumlarını belirlemek amacıyla östrusun dış belirtileri, rektal palpasyon ve ultrasonografik muayene gibi klinik muayene yöntemleri yanısıra çeşitli hormonların (progesteron, östrojen, Equine Chorionic Gonadotropin) seviye ölçümleri, erken gebelik faktörü ile gebeliğe bağlı genlerin ekspresyonunun tespiti gibi laboratuvar yöntemlerinden de yararlanılmaktadır.

Klinik Yöntemler

Östrusun Gözlenmesi: Özellikle çalışan personelin ve hayvan sahiplerinin sıklıkla başvurdukları bir gebelik teşhis yöntemidir. Genellikle bir önceki östrusta çiftleştirilen kısırağın tahmini olarak bir sonraki östrus göstereceği günlerde (yaklaşık 21. gün) aygıra gösterilerek veya östrus belirtileri izlenerek uygulanmaktadır. Kısraklarda östrus siklus süresinin aşım sezonu aylarına göre 17-24 gün arasında değişmesi, diöstrus ovulasyonları nedeniyle siklus süresinin uzayabilmesi, embriyonik ölüm, dış bozukluğu, paraziter hastalıklar, beslenme bozukluğu, ilk defa aşımaya alınan damızlıkların veya tay kızgınlığında aşım yaptırılacak olan kısrakların sinirli ya da ürkek olması gibi nedenlerden dolayı bazı kısraklarda davranış anöstrusu (suböstrus) meydana gelebilmektedir. Dolayısıyla, kısrakta beklenen zamanda östrusun dış belirtileri gözlenemeyebilir. Bunların yanısıra siklusta ve gebeliğin ilk 35-40. gününe kadar olan dönemde her

10-12 günde bir gerçekleşen Folikül Stimulating Hormon (FSH) dalgalanmasının etkisiyle bazı kısraklarda gebe olduğu halde östrus belirtilerinin görülmesinden dolayı kısrakların gözlenmesi ya da aygırla kontrol edilmesi tek başına gebelik hakkında fikir verebilecek güvenilirlikte bir yöntem değildir (Roberts, 1986; England, 2005).

Rektal Palpasyon: Rektal palpasyon yöntemiyle ovaryumların palpasyonu, ovaryumun anatomik özelliği, korpus luteum yapısının palpe edilememesi yanısıra her dönemde büyük folliküllerin var olma durumundan dolayı gebelik teşhisi için her zaman tercih edilmemektedir. Fakat gebeliğin 14-15. gününden itibaren rektal palpasyonla belirlenebilen uterus tonusundaki değişimler gebelikle ilgili bir bulgu olarak kabul edilmektedir (Roberts, 1986; Pycoc, 2007). Uterus tonusunda meydana gelen artışlar bu dönemde embriyonun uterus içerisinde hareketli olmasından kaynaklanmaktadır (Cross ve Ginther, 1988). Ayrıca serviks sıkıca kapalıdır ve rektal muayenede kolaylıkla pelvis tabanında hissedilebilir. Gebeliğin 60. gününe kadar uterus tonusu hala belirgindir ve uterus kornusu içinde embriyoya ait şişkinlik hissedilebilir. (Roberts, 1986; Pycoc, 2007). Tüm bunların yanında rektal palpasyonun bazı dezavantajları vardır. Özellikle postpartum dönemde aşım yaptırılan kısraklarda uterus tonositesi her zaman hissedilememektedir. Kısrakların büyük çoğunluğunun tay kızgınlığında aşım yaptırıldığı dikkate alındığında erken dönemde rektal palpasyonla gebelik tanısının doğruluk oranı oldukça azalmaktadır. İlave olarak rektumda şekillenebilecek yırtığa bağlı oluşan şiddetli ıkmama, sancı ve peritonitisin kısırağın ölümüne neden olması, rektal muayeneyi tecrübesiz hekimlerin başvurmadan kaçındığı bir yöntem haline getirmektedir (Sayegh ve ark., 1996; Foristall ve ark., 1998).

Ultrasonografi: Ultrasonografi, kısraklarda erken dönemde gebelik tanısı amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve transrektal olarak yapılmaktadır. Embriyonik kapsül yapısından dolayı embriyonik kese (2 mm) ovulasyondan sonra 10.

günden itibaren ultrasonografi ile gözlemlenebilmektedir. Embriyonun 17. güne kadar uterus içinde hareketli olmasından dolayı her iki kornuda gebelik için dikkatli bir şekilde araştırılmalıdır. Ovulasyondan 22 gün sonra embriyonik kalp atışları ultrasonografi ile izlenebilir (Kahn, 1994; Kılıçarslan ve ark., 1996). Özellikle ikiz gebeliklerin belirlenip birinin elimine edilebilmesi ve eğer kısarak gebe değilse bir sonra siklus için aşım programının yapılabilmesi için ilk ultrasonografik muayene genelde ovulasyondan sonra 14-16. günler arasında yapılmaktadır. İkinci muayene, erken embriyonik ölümlerin belirlenmesi, embriyonik fiksasyonun uygunluğu ve kalp atımları ile embriyonun canlılığının izlenmesi için 21-22. günler arasında uygulanmaktadır. Geç dönemde oluşan embriyonik ölümlerin tespiti ve endometrial kapların izlenerek gebeliğin gidişatı hakkında bilgi alınması için üçüncü ultrasonografi muayenesi ise 35-40. günler arasında yapılmaktadır (Pycock, 2007). Ultrasonografi ile embriyonik vezikül 9-10. günde (%30) görülebilse de (Kahn, 1992), embriyonun 17. güne kadar hareketli olmasından dolayı ancak 20. günden sonra kesin olarak gözlenebilmektedir. Muayenenin iyi bir deneyim gerektirmesi ve bu dönemdeki embriyonik vezikülün uterus kistleri ile kolaylıkla karıştırılabilmesi erken dönemde ultrasonografi ile gebelik tespitinde dikkat edilmesi gereken hususlardır (Ginther, 1992; Kahn, 1992). Ayrıca erken dönemde ultrasonografi ile gebelik tanısının sadece rektal yolla yapılabilmesi rektal palpasyon kısmında bahsedilen riskleri de öne çıkarmaktadır.

Laboratuvar Yöntemleri

Progesteron Ölçümü: Ovulasyon sonrası gelişen CL'dan üretilen progesteron seviyesi gebeliğin 6-14.günler arasında 8-15 ng/ml seviyesi ile pik düzeye ulaştıktan sonra tedricen azalarak 30-35.günlere kadar 4-6 ng/ml seviyesine iner.Daha sonra eCG'nin etkisiyle sekonder CL'den dolayı tekrar yükselerek 8-25 ng/ml seviyelerine ulaşır ve yaklaşık 150.güne kadar bu seviyelerde kalır (Daels ve Hughes, 1993; Gordon, 1997; Bergfelt ve Adams, 2007).

Gebe kısırlarda progesteron hormonunun bu seyri nedeniyle gebeliğin teşhisi amacıyla kullanılabilir. Gebe kısırlarda ovulasyon sonrası 18-20. günlerde progesteron düzeyi >1 ng/ml'dir (Nett ve ark., 1976; Gunther ve ark., 1980; McKinnon, 1993; England, 2005; Bergfelt ve Adams, 2007). Ancak uzayan diöstrüs, erken embriyonik ölüm, örneklemenin hatalı zamanda yapıldığı veya kısa östrüs siklusu oluşan kısırlarda progesteron düzeyi yüksek olacağından sonuçların yanlış pozitif olarak yorumlanabileceği unutulmamalıdır. Nadir olarak bazı gebe kısırlar kısa süreli olarak düşük progesteron düzeyine sahip olabilirler (Roberts, 1986; England, 2005).

Östrojen Ölçümü: Östrojenler erken dönemde (gebeliğin 12. gününde) embriyo tarafından üretilmeye başlanır. Ancak üretilen östrojen miktarı çok düşük olduğundan kan plazmasında ölçülebilecek düzeye ulaşamaz ve lokal bir üretim olarak kalır. Östrojen miktarı bakımından gebe ve gebe olmayan kısırlarda 30. güne kadar fark olmadığı, 35-40. günlerde ise gebelerde 2-3 kat arttığı bildirilmiştir. Bu günlerde oluşan artışın eCG'nin salınımı sonrası gelişen sekonder luteal yapıların oluşumu ile yakın ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Daels ve ark., 1990; Daels ve ark., 1991; Daels ve ark., 1998; McKinnon ve Pycock, 2007). İdrar veya plazmada östrojen seviyesinin ölçümüyle güvenilir gebelik teşhisi ancak 60. günden sonra yapılabileceği belirtilmektedir. İleri dönem gebeliklerin izlenmesinde kullanılacak olan fetal ovarium kaynaklı östrojen ise 210. günde pik seviyeye ulaşmaktadır (Nett ve ark., 1975, Gordon, 1997). Bu nedenle erken gebelik teşhisi için östrojenin hiçbir klinik önemi yoktur.

Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Ölçümü: Uterus endometriyumuna gömülü haldeki fetal trophoblast hücrelerinden üretilen eCG veya diğer adıyla PMSG hormonu, gebeliğin 35-40. günlerinde plazmada ölçülebilir düzeye ulaşan, 60-65.günlerde pik seviyeye çıkan, 80-120. günlere kadar üretilen ve 150. güne kadar azalan bir gonadotropindir (McKinnon, 1993; Gordon, 1997; Allen, 2000). Doğru

gebelik teşhisi için en uygun eCG ölçüm zamanının gebeliğin 50. gününden sonraki dönemler olduğu belirtilmektedir (Collins ve Buckley, 1993; Aslan ve ark., 1997)..Endometriyal kapların şekillendiği 35.günden itibaren 120-150.güne kadarki dönemde abortus şekillense bile endometriyal kaplar hala fonksiyonel olacağından bu dönemde yapılan testlerde yanlış pozitif sonuçların elde edilebileceği belirtilmektedir (Mitchell, 1971; Gordon, 1997; England, 2005). Bazı durumlarda ise endometriyal kapların immunolojik retlerinin çok erken oluşması nedeniyle gebelik devam etmesine rağmen üretilen eCG düzeyinin çok düşük veya ölçülemeyecek düzeyde olabileceği bildirilmektedir (Fay ve Douglas, 1982). Ayrıca, katır ve bardo gebeliklerinde endometrial kaplar şekillenmediğinden eCG ölçümü yapılamaz (England, 2005).

Erken Gebelik Faktörü (EGF) Ölçümü: Kısıraklarda ve bazı hayvan türlerinde gebeliğin erken döneminde özellikle maternal kabul ve luteal fonksiyonların sürekliliğini sağlamaya yönelik uyarıcıların embriyo tarafından üretildiği belirlenmiştir. Bu uyarıcıların immunolojik testlerle belirlenmesine dayalı gebelik teşhis yöntemleri bulunmaktadır. Kısıraklarda erken gebelik faktörü (EGF) adı verilen ve immun sistemi baskılayıcı özelliği olan bir glikoprotein, fertilizasyonu takiben 2. günde serumda tespit edilebilmektedir (Takagi ve ark., 1998; Ohnuma ve ark., 2000). Ancak bu proteinin varlığının tespiti Rosette Inhibition Test (RIT) adı verilen oldukça kompleks bir yöntemle yapılabilmektedir. RIT testi için, gebelik testi yapılacak kısıraklardan serum toplanması, diğer sağlıklı bir attan lenfosit izolasyonu ve bu lenfositlere karşı tavşanlardan anti-serum elde edilmesi, koyun, insan veya ratlardan eritrosit izole edilmesi gerekmektedir. Dolayısı ile bu test pratik olarak kabul edilmemektedir (Takagi ve ark., 1998).

Son yıllarda tohumlama sonrası 3-30. günlerde kan serumunda EGF glikoproteinine karşı üretilmiş antikörlerin belirlenmesine yönelik pratik bir test kiti (Concepto-Diagnostics Corporation) geliştirilmiştir.

Üretici firma belirtilen kit ile gebelik teşhisinin %95'in üzerinde doğrulukla yapılabildiğini ifade etmektedir. Ancak, yapılan bilimsel çalışmalarda bu testin kısıraklar ve sığırlar için çok yüksek doğrulukla güvenilir olmadığı, erken ve doğru gebelik tespiti yönünden klasik gebelik yöntemlerine özellikle ultrasonografik muayeneye alternatif olamayacağı ortaya konulmuştur (Cordoba ve ark., 2001; Gandy ve ark., 2001; Metcalf ve ark., 2004; Horteloup ve ark., 2005; Parker ve ark., 2005).

Gebeliğe Bağlı Genlerin Ekspresyonu ile Gebelik Tayini: Fertilizasyon sonrası gebeliğin oluşması ve devam edebilmesi için çeşitli faktörlerin koordineli bir şekilde çalıştığı günümüzde yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Weber ve ark., 1991; Atlı ve ark., 2010; Klein ve ark., 2010; Atlı ve ark., 2011). Embriyo, paternal gen allellerini taşımasından dolayı allojenik yapıda olup, annenin immün sistemi tarafından potansiyel yabancı bir organizma olarak kabul edilmektedir. Embriyonun gelişimine devam edebilmesi için varlığını çeşitli sinyaller ile bildirmesi ve annenin immün sistemi tarafından kabul edilmesi gerekmektedir (Allen ve Antczak, 2000; Allen, 2005). Ayrıca fiziksel olarak embriyonun oviduktan uterusu taşıyabilmesi için PGE₂ salgılaması ve uterus içinde ise endometrial PGF sekresyonunu durdurması gerekmektedir (McDowell ve ark., 1988; Weber ve ark., 1991; Ginther, 1998; Allen, 2001). Bu faktörlerin özellikle kanda yaptığı değişikliklerin izlenmesi ile gebelik tespit edilebileceği düşünülmüştür.

İmmunolojik olarak embriyonun paternal Major Histocompatibility Complex (MHC) ekspresyonunun başladığı erken gebelik döneminde (7.gün), sığır kan lenfositlerinde adreno kortikotropik hormon (ACTH) salgılamaktadır (Dixit ve Parvizi, 2000; Dixit ve Parvizi, 2001). Hücre içi mikroorganizmalara karşı hücrel immünite etkin olarak kullanılmasına rağmen, gebelikte humoral bağışıklık tercih edilmektedir (Wilder, 1998). İmmün sistemde gözlenen bu radikal değişime Th-1 sitokinlerden, Th-2 sitokinlere geçişin neden olduğu belirtilmektedir

(Wegmann ve ark., 1993; Reinhard ve ark., 1998). Th-1 sitokinlerinin baskın olması embriyo gelişimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Hill ve Choi, 2000). Gebelik süresince sığır lenfositlerinden salgılanan nitrik oksit (NO), Th-1 lenfositlerden Th-2 lenfositlere geçişi sağlayarak immün sistemi baskılamaktadır (Dixit ve Parvizi, 2001; Roozendaal ve ark., 1999).

Ruminant embriyolarında salgılanan interferon-tau'nun (IFN-tau) immün sistemi baskılayıcı etkiye sahip olması nedeniyle maternal kabulde en önemli etken olarak kabul edilmektedir. İn vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında ortama GM-CSF katılması, koyun embriyolarında daha erken ve fazla miktarda IFN-tau'nun üretilmesine neden olmaktadır (Rooke ve ark., 2005). Sığır embriyosundan salgılanan IFN-tau'nun etkisi ile uterus dışındaki dokularda özellikle periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH) IFN-tau'nun ISGs genlerinin (IFN-tau stimulated genes) ekspresyonlarını etkilediği tespit edilmiştir. Örneğin, ISG'lerden 2-5 oligoadenylate synthetase 1 (OAS1), myxovirus resistance gene-1 (Mx-1), Mx-2 ve interferon-stimulated gene 15 kDa protein (ISG15) ekspresyonunun erken gebelik dönemlerinde sığır ve koyun PKMH'de önemli oranda arttığı gözlenmiştir (Gifford ve ark., 2007; Oliveira ve ark., 2008; Green ve ark., 2010). Pratik olarak toplanabilen PKMH'lerinde ISGs ekspresyon seviyelerinin özellikle düvelerde gebeliğin 18. gününden sonra teşhiste kullanılabilceği bildirilmektedir (Green ve ark., 2010).

Ancak, kısrağın embriyosu tarafından IFN-tau salgılanmamaktadır. Dolayısıyla, PKMH'de ISGs ekspresyonları değişiklik göstermediğinden gebelik teşhisinde belirleyici markır olarak kullanılamayacağı bildirilmiştir (Hicks ve ark., 2003). Erken gebelikte embriyo tarafından salgılanan diğer faktörlerin (PGF₂, PGE₂ ve östrojen) annenin immün sistemini etkilediği bilinmektedir. Bu durum at lenfositlerinde bazı genlerin ekspresyon profillerinin erken gebelik teşhisinde kullanılabilceği fikrini gündeme getirmiştir. Fertilizasyon sonrası at embriyosu tarafından

üretilen prostaglandin E₂ (PGE₂), Th-1 sitokinlerini (IL-2, IFN- γ , TNF- α) baskılamakta, ancak Th-2 sitokinlerinin (IL-4, IL-5, IL-10) üretimini uyarmaktadır (Meyer ve ark., 2003; Trebble ve ark., 2003; Walker ve Rotondo, 2004). Özellikle, kan dokusunda (PKMH) meydana gelen immünojik değişikliklerin moleküler düzeyde tespitinin, alternatif gebelik tespit yöntemlerinin geliştirilmesine alt yapı oluşturması beklenmektedir. Örneğin, erken gebelik döneminde bazı aday genlerin PKMH'de ekspresyonları transkripsiyon seviyesinde araştırılmıştır (Kurar ve ark., 2011). Kısrağın PKMH'den izole edilen total RNA örneklerinde prostaglandin E synthase (PGES), IL-5 ve nitric oxide synthase (iNOS) gen ekspresyonları tespit edilememiştir. Ancak ACTH'ı kapsayan polisistronik proopiomelanocortin (POMC), IL-4 ve IL-10 gen ekspresyonları gebe ve siklik kısrağlarda tespit edilmiştir. Ancak, yalnız IL-10 ekspresyonu gebe kısrağlarda sikliklere göre 0. ve 4. günlerde önemli derecede (P< 0.05) düşük bulunmuştur. Benzer şekilde, doğal bağışıklığın önemli bir parçası olan Toll-like reseptör (TLR) genlerinin (1-10) ekspresyonları at PKMH'de tespit edilmiştir. Ancak gebe ile gebe olmayan kısrağların TLR (1-10) genlerinin ekspresyonları arasında önemli bir fark bulunamamıştır (Kurar ve ark., 2012). Diğer aday genlerin atların erken gebelik döneminde ekspresyon seviyelerinin araştırılması gebelik immünolojisinin anlaşılmasına ve gebelik tespitinde kullanılabilcek markır gen ve faktörlerin tespitine olanak sağlayacaktır. Bu amaçla özellikle mikroarray teknolojisi ile transkriptom analizlerinin kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

SONUÇ

Sonuç olarak kısrağlar için saha şartlarında gebelik tespiti amacıyla ultrasonografiden yaygın olarak yararlanılmakla birlikte günümüzde özellikle moleküler biyoloji tekniklerin ilerlemesi ve erken gebelikteki fizyolojik olayların anlaşılmasına yönelik çalışmaların artışı ile laboratuvar teknikleri kullanılarak erken gebeliğin tespit edilmesine yönelik çalışmaların sayısı artmaya başlamıştır. Bunlarla

birlikte özellikle embriyo transfer çalışmalarının ilerlemesi ile embriyonun yıkanmasından önce (7. günde) kısırlarda gebeliği teşhis edebilecek yöntemlere halen ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Allen WR., 2000. The physiology of early pregnancy in the mare. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, 40, 338-354.
- Allen WR., Antczak DF., 2000. Reproduction and modern breeding technologies in the mare. In "The Genetics of the Horse", Eds., A Bowling, A Ruvinsky, CAB International, NY, USA.
- Allen WR., 2001. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 121-131.
- Allen WR., 2005. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. *Anim. Reprod.*, 2, 209-223.
- Allen WR., Wilsher S., 2009. A review of implantation and early placentation in the mare. *Placenta*, 30, 1005-1015.
- Aslan S., Findik M., Izgür H., Çelebi M., Çelebi M., 1997. Pregnancy diagnosis by using PMSG-Latex Test in mares. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.*, 21, 195-199.
- Atli MO., Kurar E., Kayis SA., Aslan S., Semacan A., Celik S., Guzeloglu A., 2010. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.*, 122, 124-132.
- Atli MO., Guzeloglu A., Dinç DA., 2011. Expression of wingless type (WNT) genes and their antagonists at mRNA levels in equine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.*, 125, 94-102.
- Battut I., Colchen S., Fieni F., Tainturier D., Bruyas JF., 1997. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine Vet. J., Suppl.*, 25, 60-62.
- Bergfelt DR., Adams GP., 2007. Ovulation and corpus luteum development. In "Current Therapy in Equine Reproduction", Eds., JC Samper, JF Pycock, AO McKinnon, W.B. Saunders Elsevier, USA.
- Collins AM., Buckley TC., 1993. Comparison of methods for early pregnancy detection. *J. Equi. Vet. Sci.*, 13, 627-630.
- Cordoba MC., Sartori R., Fricke PM., 2001. Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 84, 1884-1889.
- Cross DT., Ginther OJ., 1988. Uterine contractions in nonpregnant and early pregnant mares and jennies as determined by ultrasonography. *J. Anim. Sci.*, 66, 250-254.
- Daels PF., Shideler S., Lasley BL., Hughes JP., Stabenfeldt GH., 1990. Source of oestrogen in early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil.*, 90, 55-61
- Daels PF., DeMoraes JJ., Stabenfeldt GH., Hughes JP., Lasley BL., 1991. The corpus luteum: source of oestrogen during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil.*, 44, 501-508.
- Daels PF., Hughes JP., 1993. The normal estrous cycle. In "Equine Reproduction", Eds., AO McKinnon, JL Voss JL, 1st edition, Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- Daels PF., Albrecht BA., Mohammed HO., 1998. Equine chorionic gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares. *Biol. Reprod.*, 59, 1062-1068.
- Dixit VD., Parvizi N., 2000. Lymphocytic secretion of adrenocorticotrophic hormone throughout pregnancy in cows and its possible physiological role. *Reprod. Domes. Anim.*, 3-4, 171.
- Dixit VD., Parvizi N., 2001. Pregnancy stimulates secretion of adrenocorticotropin and nitric oxide from peripheral bovine lymphocytes. *Biol. Reprod.*, 64, 242-248.
- England GCW., 2005. Fertility and Obstetrics in the Horse. 3rd edition., Blackwell Publishing, Indian.
- Fay JE., Douglas RH., 1982. The use of radioreceptor assay for the detection of pregnancy in the mare. *Theriogenology*, 18, 431-444.
- Foristall KM., Roser JF., Liu IKM., Lasley B., Munro CJ., Carneiro GF., 1998. Development of a Tandem Hormone Assay for the detection of pregnancy in the Miniature Mare. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, 44, 52-53.

- Gandy B., Tucker W., Ryan P., Williams A., Tucker A., Moore A., Godfrey R., Willard S., 2001. Evaluation of the early conception factor (ECF) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 56, 637-647.
- Gifford CA., Racicot K., Clark DS., Austin KJ., Hansen TR., Lucy MC., Davies CJ., Ott TL., 2007. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 90, 274-280.
- Ginther OJ., 1992. Reproductive biology of the mare. In "Basic and Applied Aspect", Ed., OJ Ginther, USA Equieservices, Cross Plains, WI, USA.
- Ginther OJ., 1998. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, 73-104.
- Gordon I. Controlled Reproduction in Horses, Deer and Camelids. CAB International, UK. 99-118.
- Green JC., Okamura CS., Pooch SE., Lucy MC., 2010. Measurement of interferon-tau (IFN- τ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20 d after insemination in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 121, 24-33.
- Gunther JD., Foley CW., Gaverick HA., Plotka ED., 1980. Comparison of milk and blood plasma progesterone concentrations in cycling and pregnant mares. *J. Anim. Sci.*, 51, 1131-1138.
- Hicks BA., Etter SJ., Carnahan KG., Joyce MM., Assiri AA., Carling SJ., Kodali K., Johnson GA., Hansen TR., Mirando MA., Woods GL., Vanderwall DK., Ott TL., 2003. Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts, and mares. *J. Anim. Sci.*, 81, 1552-1561.
- Hill JA., Choi BC., 2000. Immunodystrophism: evidence for a novel alloimmune hypothesis for recurrent pregnancy loss involving Th1-type immunity to trophoblast. *Semin. Reprod. Med.*, 18, 401-405.
- Horteloup MP., Threlfall WR., Funk JA., 2005. The early conception factor (ECFTM) lateral flow assay for non-pregnancy determination in the mare. *Theriogenology*, 64, 1061-1071.
- Hyland JH., 1990. Reproductive endocrinology: it's role in fertility and infertility in the horse. *Br. Vet. J.*, 146, 1-16.
- Kahn W., 1992. Ultrasonography as a diagnostic tool in female animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 1-10.
- Kahn W., 1994. *Veterinary Reproductive Ultrasonography*. 1st edition., Mosby-Wolfe, London, England.
- Kılıçarslan MR., Soylu MK., Şenünver A., Kırşan İ., Carioğlu B., 1996. The use of ultrasonografik techniques for the diagnosis of early pregnancy in mares. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 2, 147-150.
- Klein C., Scoggin KE., Ealy AD., Troedsson MH., 2010. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.*, 83, 102-113.
- Kurar E., Atli MO., Güzeloğlu A., Semacan A., 2011. POMC, INOS, PGES, IL-4, IL-5 and IL-10 gene expression in peripheral blood mononuclear cells of cyclic and pregnant mares. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 17, 319-323.
- Kurar E., Atli MO., Guzeloglu A., Kayis SA., Semacan A., 2012. Expression of Toll-like receptors (TLRs) in the equine peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) during the early pregnancy and estrous cycle. *Euroasian Vet. J.*, Article in press.
- McDowell KJ., Sharp DC., Grubaugh W., Thatcher WW., Wilcox CJ., 1988. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol. Reprod.*, 39, 340-348.
- McKinnon AO., 1993. Diagnosis of Pregnancy. In "Equine Reproduction", Eds., AO McKinnon, JL Voss, Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- McKinnon AO., Pycocock JF., 2007. Maintenance of pregnancy. In "Current Therapy in Equine Reproduction", Eds., JC Samper, JF Pycocock, AO McKinnon, W.B. Saunders Elsevier, USA.
- Metcalf ES., McCue P., Jasko DJ., Roor JB., 2004. Evaluation of a test for equine early conception factor. 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver, Colorado, USA.
- Meyer F., Ramanujam KS., Gobert AP., James SP., Wilson KT., 2003. Cutting edge: cyclooxygenase-2 activation

- suppresses Th1 polarization in response to *Helicobacter pylori*. *J. Immunol.*, 171, 3913-3917.
- Mitchell D., 1971. Early fetal death and a serum gonadotrophin test for pregnancy in the mares. *Can. Vet. J.*, 12, 41-44.
- Nett TM., Holtan DW., Estergreen VL., 1975. Oestrogens, LH, PMSG, and prolactin in serum of pregnant mares. *J. Reprod. Fertil.*, 23, 457-462.
- Nett TM., Pickett EW., Seidel GE., Voss JL., 1976. Levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle and early pregnancy in mares. *Biol. Reprod.*, 14, 412-415.
- Ohnuma K., Yokoo M., Ito K., Nambo Y., Miyake YI., Komatsu M., Takahashi J., 2000. Study of early pregnancy factor (EPF) in equine (*Equus caballus*). *Am. J. Reprod. Immunol.*, 43, 174-1799.
- Oliveira JF., Henkes LE., Ashley RL., Purcell SH., Smirnova NP., Rao Veeramachaneni DN., Anthony RV., Hansen TR., 2008. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- τ release from the uterine vein. *Endocrinology*, 149, 1252-1259.
- Oriol JG., Sharom FJ., Betteridge KJ., 1993. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. *J. Reprod. Fert.*, 99, 653-664.
- Parker E., Tibary A., Vanderwall DK., 2005. Evaluation of a new early pregnancy test in mares. *J. Equi. Vet. Sci.*, 25, 66-69.
- Pycock JF., 2007. Pregnancy diagnosis in the mare. "Current Therapy in Equine Reproduction", Eds., JC Samper, JF Pycock, AO McKinnon, Saunders Elsevier, USA.
- Reinhard G., Noll A., Schlebusch H., Mallmann P., Ruecker AV., 1998. Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 933-938.
- Roberts SJ., 1986. Gestation and pregnancy diagnosis in the mare. In "Current Therapy in Theriogenology", Ed., DA Marrow, WB. 1st edition Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Rooke J., Ewen M., McEvoy T., Entrican G., Ashworth C., 2005. Effect of inclusion of serum and granulocyte-macrophage colony stimulating factor on secretion of interferon-tau during the in vitro culture of ovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 17, 513-521.
- Roosendaal R., Vellenga E., Postma DS., De Monchy JG., Kauffman HF., 1999. Nitric oxide selectively decreases interferon-gamma expression by activated human T lymphocytes via a cGMP-independent mechanism. *Immunology*, 98, 393-399.
- Sayegh AI., Adams SB., Peter AT., Wilson DG., 1996. Equine rectal tears: causes and management. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 18, 1131-1139.
- Şenünver A., Horoz H., Kılıçarslan MR., Konuk SC., Tek Ç., Alkan S., 1995. Kısırlarda östrus ve ovulasyonun PGF2a ile uyarılması. *Bültendif*, 5, 11-14.
- Takagi M., Nishimura K., Oguri N., Ohnumo K., Ito K., Takahashi J., Yasuda Y., Miyazawa K., Sato K., 1998. Measurement of early pregnancy factor activity for monitoring the viability of the equine embryo. *Theriogenology*, 50, 255-262.
- Trebbel TM., Wootton SA., Miles EA., Mullee M., Arden NK., Ballinger AB., Stroud MA., Burdge GC., Calder PC., 2003. Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 376-382.
- Walker W., Rotondo D., 2004. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. *Immunology*, 111, 298-305.
- Weber JA., Freeman DA., Vanderwall DK., Woods GL., 1991. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biol. Reprod.*, 45, 540-543.
- Wegmann TG., Lin H., Guilbert L., Mosmann TR., 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon. *Immunol. Today*, 14, 353-356.
- Wilder RL., 1998. Hormones, pregnancy and autoimmune diseases. *Ann NY. Acad. Sci.*, 840, 45-50.