

ALİ EKBER TEKDAL	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DİYARBAKIR-2023
------------------	------------------------------------	--------------	-----------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOYUNLARDA EMBRİYONAL DÖNEMDE
MALONDİALDEHİT, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE
GLUTATYON PEROKSİDAZ' IN UTERUS EKOTEKSTÜRÜ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Ali Ekber TEKDAL

DOKTORA TEZİ

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN

DİYARBAKIR- 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOYUNLARDA EMBRİYONAL DÖNEMDE
MALONDİALDEHİT, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE
GLUTATYON PEROKSİDAZ' IN UTERUS EKOTEKSTÜRÜ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Ali Ekber TEKDAL

DOKTORA TEZİ

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN

DİYARBAKIR- 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ali Ekber TEKDAL'ın hazırladığı “Koyunlarda embriyonal dönemde malondialdehit, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz'ın uterus ekotekstürü üzerine etkisinin araştırılması” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: / / 2023

Danışman Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Sema GÜRGÖZE
Üye	Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN
Üye	Prof. Dr. Serhan Serhat AY
Üye	Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU
Üye	Doç. Dr. Serdal KURT

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.... / / 2023 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

..... / / 2023

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

....../...../2023

Ali Ekber TEKDAL

TEŞEKKÜR

Tez çalışma konusunun belirlenmesi, çalışma aşamalarının yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında bilgi, birikim ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimi süresince destek ve deneyimlerini eksik etmeyen Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı hocalarım, Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU, Prof. Dr. Servet BADEMKIRAN ve Doç. Dr. Mehmet KÖSE'ye, tez çalışması aşamasında laboratuvar desteği sağlayan Doç. Dr. Aynur ŞİMŞEK ve Doç. Dr. Akın KOÇHAN'a, katkı ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Tahir BAYRIL ve Doç. Dr. M. Ferit ÖZMEN'e, saha uygulamalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Yasemin KAPLAN BİLMEZ, Öğr. Gör. Ömer Faruk KATANALP, Arş. Gör. Elif EKİNCİ, Arş. Gör. Deniz SARİ ve Arş. Gör. Almina GÜNEŞ'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından VETERİNER.21.004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Ön Sayfalar

Beyan	i
Teşekkür	ii
İçindekiler	iii
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi	v
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini	viii

1. ÖZETLER

1.1. Türkçe Özet	1
1.2. İngilizce Özet	3

2. GİRİŞ ve AMAÇ

5

3. GENEL BİLGİLER

7

3.1. Koyunlarda Gebelik ve Embriyonik Gelişim	7
3.2. Oksidatif Stres	12
3.2.1. Oksidatif stresin ovaryum üzerine etkileri	15
3.2.2. Oksidatif stres ve gebelik	17
3.3. Ekotekstür Analizi	23
3.3.1. Temel kavramlar ve ekotekstür parametreleri	24
3.3.1.1. İnceleme alanı	24
3.3.1.2. Piksel	25
3.3.1.3. Histogram	25
3.3.1.4. Ortalama gradient	25
3.3.1.5. Homojenite (HOM)	27
3.3.1.6. Kontrast (CON)	27
3.3.1.7. Entropi (ENT)	28
3.3.1.8. Korelasyon	28
3.3.1.9. Ortalama gri değer	29
3.3.1.10. B-mod görüntülerin bilgisayar destekli ekotekstür analiz yöntemleri	29
3.3.1.10.1. ImageJ programı içerisinde yer alan GLCM eklentisi	30
3.3.2. Ekotekstür analizlerinin doğum ve jinekolojide uygulanması	30

	Sayfa No
4. GEREÇ ve YÖNTEM	32
4.1. Hayvan Materyalinin Sağlandığı Yer ve Bakım Besleme Koşulları	32
4.2. Hayvan materyali ve çalışma düzeni	32
4.2.1. Koyunların senkronizasyonu	32
4.2.2. Kan örneklerinin alınması	33
4.2.3. Progesteron ve oksidatif stres parametrelerinin ölçümü	33
4.2.4. Ultrasonografik muayeneler ve görüntülerin elde edilmesi	35
4.2.5. Ekotekstür analizlerinin yapılması	37
4.2.6. İstatistiksel değerlendirme	40
5. BULGULAR	41
6. TARTIŞMA	48
7. SONUÇ ve ÖNERİLER	59
8. KAYNAKLAR	60
9. ÖZGEÇMİŞ	81
10. EKLER	82
10.1.EK-1. Etik Kurul İzin Belgesi	82
10.2.EK-2. Makale Şartını Sağladığına Dair Yayın	83
11. ORJİNALLİK RAPORU	84

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ATP	:	Adenozin trifosfat
B-Mode	:	Brightness mod
Bmp	:	Bitmapped
BNC	:	Çift çekirdekli sinsityotrofoblast
C°	:	Santigrat derece
CAT	:	Katalaz
CON	:	Kontrast
COX-2	:	Siklooksijenaz-2
CSH1	:	Koryonik somatomammotropin hormon1
Cu	:	Bakır
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
ELISA	:	Enzym linked immunosorbent assay
ENT	:	Entropi
Fe	:	Demir
GLCM	:	Gri düzey eş oluşturma matrisleri
GPx	:	Glutasyon peroksidaz
GSH	:	Glutasyon
GSR	:	Glutasyon redüktaz
GST	:	Glutasyon S-Transferaz
H₂O	:	Su
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HOM	:	Homojenite
KL	:	Korpus luteum
L	:	Litre
Max	:	Maksimum
MDA	:	Malondialdehit
Mg	:	Miligram
MGL	:	Ortalama gri değeri

MHC-I	:	Major histocompatibility complex-I
MHz	:	Megahertz
Min	:	Minimum
ml	:	Mililitre
MNC	:	Tek çekirdekli sitotrofoblast
MnSOD	:	Mangan süperoksit dismutaz
mRNA	:	Mesajcı ribonükleik asit
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
ng/ml	:	Nanogram/ Mililitre
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
O₂	:	Oksijen
O₂⁻	:	Süperoksit anyon
OH⁻	:	Hidroksil
ONOO⁻	:	Peroksinitrit
P4	:	Progesteron
PGF₂α	:	Prostaglandin F ₂ α
PMSG	:	Gebe kısrak serum gonadotropini
PO₂	:	Oksijen basıncı
POO⁻	:	Peroksil
RO⁻	:	Alkoksil
ROI	:	Region of Interest
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SOD	:	Süperoksit dismutaz
StdDev	:	Standart sapma
TAC	:	Total antioksidan kapasite
TAS	:	Total antioksidan seviyesi
TBA	:	Tiyobarbitürik asit
TNF-α	:	Tümör nekrozis faktör- α
TOS	:	Total oksidan seviyesi
USG	:	Ultrasonografi
XO	:	Ksantin oksidaz

ZnSOD : Çinko süperoksit dismutaz



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Koyunlarda blastosistin implantasyon aşamaları	9
Şekil 2. Region of Interest (ROI) alanı seçilmesine bir örnek	24
Şekil 3. Gradient'in hesaplanmasının grafik tarzında gösterilmesi	26
Şekil 4. Çalışmada elde edilen 24 günlük gebeliklerin ultrasonografik görüntüsü	36
Şekil 5. Çalışmada elde edilen 28 günlük gebeliklerin ultrasonografik görüntüsü	36
Şekil 6. Çalışmada elde edilen 32 günlük gebeliklerin ultrasonografik görüntüsü	37
Şekil 7. ImageJ programı arayüzü	38
Şekil 8. İnceleme alanlarının (ROI) seçimi	38
Şekil 9. Histogram analiz grafiği	39
Şekil 10. GLCM tekstür analizinde incelenen parametreler	39

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. ImageJ programında kullanılacak görüntülerin gri seviye aralığı	25
Tablo 2. Çalışılan biyokimyasal parametrelerin analiz yöntemleri	33
Tablo 3. Uygulama günlerinde elde edilen progesteron değerleri	41
Tablo 4. Uygulama günlerinde elde edilen malondialdehit değerleri	42
Tablo 5. Uygulama günlerinde elde edilen süperoksit dismutaz değerleri	42
Tablo 6. Uygulama günlerinde elde edilen glutatyon peroksidaz değerleri	43
Tablo 7. Uygulama günlerinde elde edilen entropi değerleri	44
Tablo 8. Uygulama günlerinde elde edilen homojenite değerleri	44
Tablo 9. Uygulama günlerinde elde edilen kontrast değerleri	45
Tablo 10. Uygulama günlerinde elde edilen ortalama gri değerler	46
Tablo 11. Grup I'de ölçülen parametreler arası korelasyonlar	47
Tablo 12. Grup II'de ölçülen parametreler arası korelasyonlar	47

1. ÖZETLER

Koyunlarda embriyonal dönemde malondialdehit, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz'ın uterus ekotekstürü üzerine etkisinin araştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Ali Ekber TEKDAL

Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN

Anabilim Dalı: Veteriner Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

1.1. Türkçe Özet

Amaç: Sunulan çalışma, koyunlarda embriyonal dönemde, oksidatif stresin embriyonik gelişim üzerine etkilerinin ve uterus ekotekstürü ile ilişkisinin araştırılması amacıyla yapıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 32 Zom koyunu kullanıldı. Tohumlamalar sonrası 0., 8., 12., 16., 20., 24., 28. ve 32. günlerde serum progesteron (P4), malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) seviyelerinin belirlenmesi amacıyla kan alındı. Aynı günlerde ekotekstür analizleri için uterusun ultrasonografik görüntüleri alındı. Hayvanlar Grup I (n=16): gebe ve Grup II (n=16): gebe değil olarak iki gruba ayrıldı.

Bulgular: Gruplar arasında entropi (ENT) değerleri karşılaştırıldığında GI'de 28. ve 32. günlerdeki değerler GII'ye göre yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). Homojenite (HOM), SOD ve GPx değerlerinin gruplar arasındaki değişimi incelendiğinde herhangi bir fark bulunmamıştır. Kontrast (CON) değerleri incelendiğinde tohumlama gününde GI'deki değerlerin GII'ye göre düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Ortalama gri değer (MGL) incelendiğinde, tohumlama günü ve embriyonik dönemin sonunda GI değerleri GII'ye göre yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). GI'de, GPx ve MDA değerleri ekotekstür parametreleri ile güçlü korelasyonlar gösterirken, GII'de ise GPx, MDA ve SOD değerleri ile ekotekstür parametreleri arasında önemli bir korelasyon saptanmamıştır. Grup I'de CON ve GPx arasında negatif yönlü güçlü bir korelasyon ($r=-0,750$; $P=0,032$) saptanmıştır. Ekotekstür ve oksidatif stres

parametreleri arasında en güçlü korelasyon, GI’de ENT ve MDA değerleri arasında tespit edilmiştir ($r=-0,829$; $P=0,011$).

Sonuç: Elde edilen sonuçlara göre, gebe koyunlarda embriyonal dönemde MDA ve GPx’in ekotekstür parametreleri ile güçlü korelasyonlar gösterdiği ortaya çıkmıştır. Gebe koyunlarda ekotekstür analizleriyle oksidatif stresin tespit edilebileceği ve böylece embriyonal dönemin takibinde yardımcı bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Szckler: Oksidatif stres, ekotekstür, gebelik, koyun



Investigation of the effect of malondialdehyde, superoxide dismutase and glutathione peroxidase on uterine echotexture during the embryonic period in sheep

Student's Surname and Name: TEKDAL Ali Ekber

Adviser of Thesis: Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN

Department: Veterinary Department of Obstetrics and Gynecology

1.2. Abstract

Aim: The present study was carried out to observe the effects of oxidative stress on embryonic development in the embryonal period of pregnancy in sheep and to investigate its relationship with uterine echotexture.

Material and Method: Thirty two Zom sheep were used in the study. Determination of serum progesterone (P4), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) levels on days 0, 8, 12, 16, 20, 24, 28 and 32 after insemination blood was taken for the purpose. On the same days, ultrasonographic images of the uterus were taken for echotexture analysis. Animals were divided into two groups as Group I (n=16): pregnant and Group II (n=16): non pregnant.

Results: When the entropy (ENT) values between the groups were compared, the GI values on the 28th and 32nd days were higher than the GII ($P<0.05$). When the variation of HOM, SOD and GPx values between the groups was examined, no difference was found. When contrast (CON) values were examined, it was determined that the values in GI on the day of insemination (Day 0) were lower than GII ($P<0.05$). When mean gray level (MGL) values were examined, GI values were found to be higher than GII on the day of insemination and at the end of the embryonic period ($P<0.05$). While in GI, GP_x and MDA values showed strong correlations with echotexture parameters, no significant correlation was found between GP_x, MDA and SOD values and echotexture parameters in GII. A strong negative correlation ($r=-0.750$; $P=0.032$) was found between CON and GP_x in Group I. The strongest correlation between echotexture parameters and oxidative stress parameters was found between ENT and MDA values in GI ($r=-0.829$; $P=0.011$).

Conclusion: According to the results obtained, it was revealed that MDA and GPx showed strong correlations with echotexture parameters in the embryonal period in pregnant sheep. It is thought that oxidative stress can be detected by echotexture analyses in pregnant sheep and thus can be used as an auxiliary method in the follow-up of the embryonal period.

Key Words: Oxidative stres, echotexture, pregnancy, sheep



2. GİRİŞ ve AMAÇ

Küçükbaş hayvancılık hem kültürün bir parçası hem de bir üretim sektörü olarak geçmişten günümüze ülkemizde geleneksel yöntemlerle yapılmaktadır. Bu üretim sektörü temel olarak beslenme ve giyim ihtiyaçlarının karşılanması gibi görevleri üstlenmiş olsa da günümüzde beslenmede hayvansal kaynaklı protein kaynağı, hayvancılık sektöründeki iş gücünün değerlendirilmesi ve sanayide kullanılacak hammadde temini açısından önemli bir alt sektör olarak değerlendirilmektedir. Küçükbaş hayvan yetitiriciliği, kırsal bölgelerdeki en önemli gelir kaynaklarından biridir. Bu nedenle küçükbaş hayvanların sağlıklı bir şekilde üremesi çok önemli olup, gebelik döneminde serbest radikallerin aşırı üretimi sonucu meydana gelen oksidatif stres, gebeliğin tüm süreçlerinde olumsuz bir etki ortaya çıkarmaktadır.

Gebelik süresince tüm dokular özellikle de plasenta ve fetüs yüksek düzeyde oksijene ihtiyaç duyar. Reaktif oksijen türleri, anne ve fetüs tarafından üretilerek hücrel bölünme, farklılaşma ve olgunlaşmada etkili rol oynarlar. Oksidatif stres ve oksidan bileşikler, ROS üretiminin antioksidan savunmayı aştığı durumlarda ortaya çıkar. Eğer aşırı ROS üretimi antioksidanlar gibi etmenlerle dengelenmezse, hücrel yapılarda bozulma ve buna bağlı olarak da anne ve fetüste zararlı etkiler oluşabilmektedir. Reaktif oksijen türleri konsantrasyonu; embriyo gelişimi, implantasyon, uterus enfeksiyonlarına karşı fetal savunma, steroidogenezis, gebeliğin sağlıklı ilerlemesi ve doğum için gereklidir. Aşırı ROS üretimi; plasental dejenerasyon, fetal büyümede gecikme, erken doğum, feto-maternal geçişlerde değişimler ve gebeliğin sonlanmasına neden olabilir (1). Gebelik, başlıca Süperoksit(O_2^-) olmak üzere, reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretildiği ve plasental mitokondriyal aktivitenin artışıyla birlikte oksidatif stresin de arttığı bir durumdur (2).

Reaktif oksijen türlerinin fizyolojik seviyeleri ve onların antioksidanlar tarafından kontrol altında tutulması oldukça önemlidir. Fizyolojik şartlarda ROS ürünlerinin reproduktif açıdan bakıldığında çeşitli faydaları vardır. Örneğin; folikülogenezisde, oosit maturasyonunda, korpus luteum (KL) ve uterus

fonksiyonlarında, embriyogenezisde, embriyonik implantasyon ve fetöplasental gelişimde çeşitli sinyal iletim mekanizmalarında düzenleyici rol oynarlar (3).

Tanısal ultrasonografi alanındaki gelişmeler; görüntüleme alanındaki teknolojik ilerlemeyle paralel seyretmektedir. Ultrasonografik B-mod resimlerdeki organa ait anatomik ve yerel detaylar insan gözü ile tanımlanamayacak ve çözümlenemeyecek kadar zordur ve bu “ultrasonografik tekstür” olarak tanımlanmaktadır. Ultrasonografik görüntülerde değerlendirilen bölgeler için piksellerin yapısı ve dağılımının incelenmesi ile ekotekstür analizleri gerçekleştirilir. Ekran üzerinde görüntü oluşturan ve ekranın çözünürlüğüne göre değişen en küçük ekran elementi piksel olarak adlandırılır ve ekotekstür analizinde incelenen bölgedeki piksellerin yapı ve dağılımları değerlendirilmektedir. Ekotekstür, incelenen alandaki piksellerin rengi, kontrastı ve homojenitesine bağlı olarak tanımlanmaktadır. B-mod ultrasonografik görüntüde, tanımlanan tekstürün nicel olarak değerlendirilmesi amacıyla bilgisayar destekli görüntü analiz yöntemleri geliştirilmiştir (4).

Ekotekstür analizlerinde kullanılan gri değer aralığı 0-255 arasındaki sayısal değerlerdir. Bu değerlerden 0 tam siyah kabul edilirken, 255 ise tam beyaz olarak kabul edilir. Dokunun histolojik yapısına bağlı olarak bu değer değişkenlik gösterir (5). Bu analiz için B-mod ultrasonografik görüntülerde önce dokunun ultrasonografik görüntüsü üzerinde 4 (dört) adet alan (ROI: Region of Interest) belirlenir. Ardından belirlenen ROI alanlarında ekotekstür parametreleri olan ortalama gri değer, kontrast, homojenite vb. incelenir. Bu değerlerin elde edilmesinde matematiksel formüller kullanılmaktadır (6).

Canlı hayvanlarda reproduktif durumun tanımlanmasını kolaylaştırmak amacıyla yukarıda tanımlanan ekotekstür analizleri Veteriner Doğum ve Jinekoloji alanında uzun yıllardır yapılmaktadır. Örneğin; KL’un fonksiyonunun belirlenmesi (7, 8), subklinik endometritis tanısı (9) vb. çalışmalarda bu analizlerden faydalanılmıştır.

Sunulan tez çalışmasının amacı; gebelik sürecinde oksidatif stresin belirteçlerinden olan malondialdehit, süperoksit dizmutaz ve glutatyon peroksidazın embriyonik gelişim sürecindeki değişimini gözlemlemek ve uterus ekotekstürü ile ilişkilerini ortaya çıkarmaktır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Koyunlarda Gebelik ve Embriyonik Gelişim

Koyunlarda gebelik üç ana dönem altında incelenmektedir. Bunlardan ilki fertilizasyon sonrası gebeliğin anne tarafından tanındığı 12-17. günlere kadar olan dönemi kapsayan blastogenezis dönemi, ikincisi kabul sonrası farklılaşma ve organ gelişimini içeren 32-34. güne kadar olan embriyonal dönem ve üçüncüsü embriyonik dönem sonundan doğuma (150. gün) kadar geçen süreyi içeren fetal dönemdir (10).

Oosit ve spermatozoonun, oviduktun ampulla bölgesinde birleşerek zigotu oluşturmaya fertilizasyon denir. Fertilizasyonun son aşamasında singami denilen dişi ve erkek pronükleuslarının birleşmesi şekillenir. Singamiyi takiben embriyogenezis aşaması başlar. Embriyonal dönem organizmanın gelişimi ve yaşamını sürdürmesi için en kritik dönemdir. Bu dönemde embriyo oksidatif hasara ve teratojenlere karşı oldukça duyarlıdır. Koyunlarda embriyonal dönem, blastogenezis aşamasından gebeliğin 34. gününe kadar olan süreçtir. Bu dönem; embriyonun uterus duvarına tutunması ve ekstra embriyonik membranların oluşması ile organ ve dokuların oluşumuna kadarki geçen süreç şeklinde de ifade edilebilmektedir. Singami sonrasında zigot, mitotik bölünmelere uğrar. İlk olarak iki blastomerli embriyo halini alır. Koyunlarda 24 saatte iki hücreli, 1-3 günde dört hücreli ve 3-5 günde sekiz hücreli ve ardından onaltı hücreli (morula) bir şekil alır. Blastomerler sıkı bir zar olan zona pelusida içerisinde bölünmeler geçirdiğinden dolayı hacimce artış oluşmamaktadır. Hücrelerin sayısı artarken hacimleri azalmaktadır. Embriyo, 8-16 hücreli aşamada iken uterusu ulaşır ve sonrasında blastosist aşamasına geçer. Blastosistin merkezinde zamanla bir boşluk meydana gelir ve blastosel olarak adlandırılır. Bu aşamada zona pelusida yırtılır, bu olaya hatching denir ve gebeliğin 7-8. gününe denk gelir ve 11-16. günler arasında embriyo uzayarak iğ şeklini alır (10).

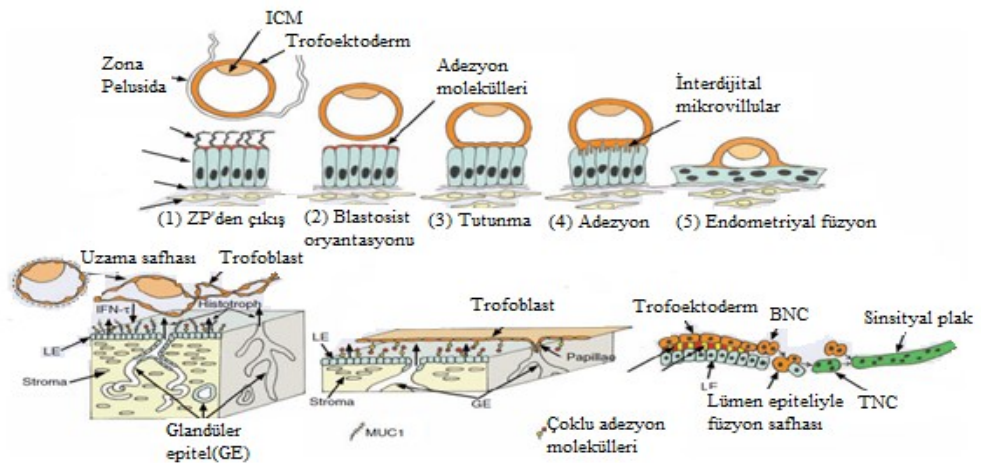
Zona pelusidadan çıkış; blastosistin büyümesi, uterus veya embriyodan kaynaklı proteaz salgıları aracılığıyla enzimatik erime ve hatching sırasındaki yırtılma ile başlar. Koyun embriyoları, fertilizasyon sonrasında 3-4. günlerde uterusu girer.

1-10. günler arasında küre formunda iken, 12-14. günlerde uzama gerçekleşir ve filamentöz forma dönüşür. 12. günde 12 cm uzunlukta iken 14. güne kadar 25 cm uzunluğa ulaşır. Blastosistin uzaması, interferon tau'nun üretilmesi ve implantasyon için gereklidir (11,12). Çiftleşme sonrası 14. günde filamentöz konseptus uterus lümeninde hareketsiz hale gelir. Uzayan blastosist endometriyal epitelle yakın temasını sürdürür. Koyun konseptuslarında (embriyo/fetüs ve ilişkili ekstra embriyonal keseler) 13-15. günler arasında bu ilk karşılaşma ve temas safhasında trofoektodermi kaplayan apikal yüzey mikro villuslarında bir azalma oluşur (13).

Ekstra embriyonik keselerin endometriyuma bağlanmasına implantasyon denir. Bu bağlanma olayı, embriyonik trofoblast ve maternal endometriyum epiteli arasında hatched blastosist aşamasında oluşur. İmplantasyonun gerçekleşebilmesi için trofoektoderm ile uterusun luminal epitelinin etkileşime girmesi gerekmektedir. Bu süreçte endometriyumda sitokin, adezyon molekülleri ve endometriyumdan sentezlenen çeşitli proteinlerin miktarlarında değişimler gerçekleşir. Bu değişikliklere bağlı olarak embriyo çevresindeki ekstra embriyonik zarlar aracılığıyla uterus mukozasına bağlanır (14,15,16). Yüzeysel implantasyon ve plasantasyon gebeliğin 15-16. günlerinde başlar ve 50-60. günlere kadar tamamlanır (17,18). Blastosistin implantasyonu ve uterusu tutunması beş aşamalı bir seyir izler. İlk olarak embriyo zona pelusidadan dışarı çıkar (hatching). İkinci aşamada blastosist ile endometriyum arasında bir karşılaşma olur ve uygun tutunma pozisyonuna geçilir. Üçüncü aşamada trofoektoderm endometriyum üzerine geniş bir şekilde temas eder. Dördüncü aşamada iki yapı birbirine tam olarak yapışır ve karşılıklı uzantılarla sabitlenerek hareketsizleşirler ve beşinci safhada ise endometriyal füzyonla implantasyon tamamlanır (19,20,21). Ruminantlarda 15-18. günlerde trofoblast hücreleri uterus bezlerinin yüzeysel kanallarına papillar tarzda tutunur (22,23). Kısa süreli var olan ve 20. günden sonra kaybolan bu mikro villuslar ve papillar uzantılar, uterus bezlerinden histotrof besin maddelerini absorbe etmeyi sağlayarak embriyonun implantasyon öncesi yaşamını sürdürmesini sağlamaktadır (22). Onaltıncı günde trofoblast endometriyal lümen epiteline sıkıca bağlanmaya başlar ve 22. günden sonra bu bağlanma tamamlanır. İmplantasyon süresince endometriyal epitelle hücresel temas kuran mononükleer trofoektoderm bölgelerinde interferon tau'nun üretimi durur (13).

İmplantasyon tüm türlerde karşılıklı olarak blastosistik trofoblast ile uterus epitelinin apikal plazma membranlarının birbirine tutunmasıyla gerçekleşmektedir. İmplantasyon sırasında ve endometriyal epitel invazyon sonrasında blastosistin embriyonik kutbundaki trofoblast hücreleri çoğalarak çift katmanlı bir dizi oluştururlar. İç tabakadaki hücreler tek çekirdekli (MNC) olup sitotrofoblast olarak adlandırılırlar, bu hücrelerin çoğalması ve sonrasında kaynaşması ile sinsityal dış tabaka olan çift çekirdekli (BNC) sinsityotrofoblast oluşur ve bu tabaka maternal doku ile direkt temas halindedir (24).

Koyun konseptuslarında BNC ilk olarak 14. günde görünür ve BNC'yi oluşturan olay; MNC'de meydana gelen sitoplazma ayrılması olmaksızın gerçekleşen çekirdek bölünmesidir. 16-20. günler arasında endometriyal luminal epitelyum sinsityal plaklara dönüşür. Devam eden hücresel füzyonlar sonrası 24. güne kadar karunkülleri kaplayan çok hücreli sinsityal plaklar oluşur. Bu bölgede trofoektoderm ile endometriyumun bazal laminası arasında 25. gün civarında tam birleşme meydana gelecek ve daha sonrasında bu bölge plasantasyonun gerçekleştiği yer olacaktır (Şekil 1). Çift çekirdekli sinsityotrofoblastların iki temel işlevi vardır. Bunlar; başarılı bir implantasyon için fetomaternal sinsityaları oluşturmak ve steroid hormonlar (CSH1/ Plasental Laktojen, P4) ile proteinlerin (PAGs) sentezlenmesini ve salgılanmasını sağlamaktadır. Plasental laktojen, prolaktin reseptörlerine bağlanarak gebelik süresince uterus bezlerinin büyüme ve farklılaşma fonksiyonlarını düzenler (12).



Şekil 1. Koyunlarda blastosistin implantasyon aşamaları (20)

Desidual hücreler; hormonal etkiler ve mekanik uyarımlar sonucunda endometriyumda stromal hücrelerin bölünmesi ve büyümesi ile oluşmaktadır (25). İmplantasyon süresince desidual makrofajlar gelişen embriyonun invazyonu için kritik öneme sahip olan apoptozisin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptirler (26).

Normal plasental trofoblast apoptozis, oksidatif stres ve hipoksi tarafından başlatılabilir. Koyun ve insanlarda bu durum erken embriyonik ve plasental gelişim, büyüme ve en azından implantasyon öncesi anjiyogenezin düzenlenmesi yoluyla kısmen de olsa gereklidir (27). Desidual makrofajlar tümör nekroz faktör- α (TNF- α), ve O_2^- yoluyla intrauterin enfeksiyonlara karşı fetüsü korumaktadır (28).

Gebelik esnasında uterusu oluşturan fizyolojik değişiklikler; endometriyal proliferasyon, hiperemi, vaskülarizasyon, genişleme ve miyometriyal kontraksiyonların durdurulmasıdır. Zigotun, uterusu implantasyonuna zemin hazırlamak için P4 etkisiyle endometriyal proliferasyon oluşmakta ve embriyo için gerekli olan besin maddelerinin iletilmesi için hiperemi şekillenmektedir.

Plasenta, anne ile yavru arasında hormonal ve metabolik ilişkiyi sağlamakta olup koryon ile uterus mukozasının kaynaşması sonucunda oluşan ekstra embriyonik bir dokudur. Anne ile yavru arasında bir bariyer görevi görür. Plasenta çok sayıda peptit ve steroid hormon salgılayan otokrin, parakrin ve endokrin bir organdır. Plasenta tarafından salgılanan hormonlar konseptus gelişimi ve fizyolojik olarak annenin yeni duruma adaptasyonuna destek olur (29). Koyunlarda plasentadan salınan hormonların en önemlileri P4, östrojen ve plasental laktojendir. Yüksek düzeyde salgılanan P4 koyunlarda gebeliğin 55-70. günleri arasında KL'un uzaklaştırılmasına rağmen gebeliğin devamı için yeterli olmaktadır (30). Ruminantlarda villi koryalisler belirli noktalarda topluluk halinde yerleşim göstermektedirler ve kotiledon olarak tanımlanmaktadır. Çift çekirdekli trofoblastik hücreler ile uterus epitel hücrelerinin kaynaşması sonucunda fetomaternal sinsityum şekillenmesi nedeniyle ruminant plasenta sindesmokoryal plasenta olarak tanımlanır (31).

Ruminantlarda koryon ile uterus mukozası arasındaki ilişki yüzeyseldir ve desidua şekillenmez. Ancak koyun ve keçilerde, uterus epitelinde yer yer erimeler şekillenerek koryon villusları ile uterus bağdokusu karşı karşıya gelmektedir ve bu

özelliği nedeniyle desiduata ve adesiduata tipi plasentalar arasında yer alan intermedia tip plasentadan söz edilebilir. Bu tip plasenta sindesmo-koryal plasenta olarak tanımlanmaktadır (32). Bu plasentasyon şeklinde, aminoasitler ve glikoz gibi mikrobeyinler ile gazların, konseptus-maternal değişimini sağlayan plasentomları oluşturmak için endometriyal karunkulalar ile plasental kotiledonların gelişimi ve füzyon şeklinde birleşmesi söz konusudur (19). Ruminantların endometriyumunda, hem glandüler özellikte olan inter karunküler alanlar hem de aglandüler özellikteki karunküler alanlar vardır. Koyunlarda çapları 10-50 mm arasında olan 80–100 adet plasentom bulunur. Plasentomların azami sayısı türe spesifiktir (30). Koyun plasentomlarında diğer ruminantlardan farklı olarak fetömaternal alanlarda büyük granüler lenfositler de bulunmaktadır (33). Plasenta dıştan içe doğru koryon, allantois ve amniyon'dur. Bu zarların dışında embriyonik bir kalıntı olan yol sac kesesi de vardır. Bu kese, gebeliğin ilerlemesiyle birlikte zamanla kendiliğinden kaybolur (10).

Major Histocompatibility Complex I (MHC-I) antijenleri fare, insan ve ruminatlarda sinsisyotrophoblast hücreleri tarafından eksprese edilmezler (34). Koyunlarda ise bu antijen hem trofoblastik hem de fetömaternal sinsityal hücreler tarafından salgılanmazlar. İnterplasentomal endometriyum hücreleri ve karunküler stromal hücreler ise MHC-I salgırlar (35). Plasental taşınma ruminantlarda diğer türlere benzemekle birlikte büyük moleküllü immünoglobulinlerin anneden yavruya geçişi olmadığı için yeni doğan genç ruminantlar antikor sirkülasyonu olmaksızın doğmaktadırlar (32).

Plasenta oluşumunu takiben artan damarlaşma ile fetüs ve anne arasındaki değişimler karunkula-kotiledon düzeyinde olmaktadır. Büyük ruminantlarda endometriyumda mukoza kabarcığı tarzında olan karunkulalar gebeliğin 5. ayından sonra palpasyonla hissedilebilir. Gebe olmayan kornuda da kotiledoner hipertrofi gözlenebilir. Ancak gebe kornudaki kadar büyüklüğe ulaşmaz. Plasenta, koryonun villi koryalisleri ile bu karunkulalara bağlanır. Küçük vezikül tarzındaki amniyon ve allantois keseleri, gebeliğin ilerlemesiyle yapılarında 10-20 litre kadar sıvı bulunduran keseler haline gelirler. Uterus bu tür değişimlere incelmeye ve genişleme şeklinde adapte olur (10).

Uterusta gebeliğin şekillendiği kornuda, gebelikle ilişkili değişiklikler daha erken başlamaktadır. Uterusun kan akışı koyunlarda aşım sonrası 11. günden 30. güne doğru yaklaşık 4 ila 6 kat artış göstermektedir. Kan akımındaki bu artış; konseptusun karunkuler damarlaşma üzerine etki etmesi kaynaklı şekillenmektedir. Mikrovasküler yoğunluktaki bu artışın, gebe kornuda daha erken dönemde gerçekleştiği belirlenmiştir. Erken gebelik döneminde endometriyumdan salınan anjigenik faktörlere bağlı olarak uterus lümeninde bu faktörlerin miktarı artmakta, blastosist kaynaklı östrojen üretimi de artmaktadır. Salınan bu östrojenler anjionik faktörlerin üretimini düzenleyerek kan akışının ve uterus büyümesinin kontrolünde görev alır (36).

3.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, vücutta prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki fizyolojik dengenin prooksidanlar lehine bozulması durumudur. Prooksidanların kaynağı serbest radikallerdir. Serbest radikaller en az bir eksik elektrona sahip reaktif ajanlardır. Bu radikaller hücrede herhangi bir aerobik süreçte oluşabilirler. Hücrelerle temas ederek serbest elektrondan kurtulmak için hücreleri kullanırlar ve onlardan elektron alarak dengeye ulaşırken hücrelere zarar verirler. Reaktif oksijen türlerinin DNA hasarına, membran yapısı ve fonksiyonunu bozan lipid peroksidasyonuna ve protein hasarına sebep oldukları rapor edilmiştir. Reaktif oksijen türlerine karşı iki tip savunma sistemi vardır. Bunlar endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlardır. Endojen antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GSR) ve katalaz (CAT)'dır. Nonenzimatik antioksidanlar ise; glutatyon, ürik asit, selenyum, melatonin, koenzim Q10, bilirubin ve seruloplazmin'dir. Eksojen antioksidanlar, vitamin antioksidanlar (A,B9,C,E vitaminleri) ve ilaç olarak kullanılan antioksidanlar (barbituratlar, demir şelatörleri, ksantin oksidaz inhibitörleri vb.) olarak ikiye ayrılır (37). Serbest radikallere karşı GPx ile E vitamini birbirlerini tamamlayıcı etkilere sahiptir. En fazla antioksidan etkinliği olan ise α - tokoferol'dür (38). Biyolojik membranlardaki lipoproteinler α - tokoferol tarafından oksidasyondan korunur. Güçlü indirgeyici aktivitesi nedeniyle C vitamini en güçlü suda eriyen antioksidandır. Lipid peroksidasyonun

engellenmesinde C vitamini, E vitamini miktarının azalmasını önler ve yeniden kazanılmasını sağlar (39,40).

Prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki denge, prooksidanlar lehine bozulduğunda "Oksidatif stres" denilen aşırı ROS birikimi ortaya çıkar. Buna bağlı olarak DNA, lipid, protein ve enzim hasarları oluşur. Fizyolojik durumlarda ROS üretimi dengeli olmakta ve ROS ürünleri organizmada hormon sinyali, ovaryum steroidogenezi, ovülasyon, KL oluşumu, lüteolizis ve germ hücre fonksiyonunda önemli bir mediyatör görevi görmektedirler. Reaktif oksijen türleri periyodik olarak ovaryumda şekillenir. Foliküler ve lüteal fazlar boyunca steroid sentezine katkı sağlarlar. Bu özellikleriyle gebeliğin sürdürülmesi ve doğumun gerçekleşmesi açısından da önemlidirler (41,42). Reaktif oksijen türleri ürünlerinin fizyolojik seviyeleri ve onların antioksidanlar tarafından kontrol altında tutulması, reproduktif açıdan bakıldığında; folikülogeneziste, oosit maturasyonunda, KL ve uterus fonksiyonlarında, embriyogenezi, embriyonik implantasyon ve fetöplasental gelişimde çeşitli sinyal iletim mekanizmalarında düzenleyici rol oynamalarından dolayı oldukça önemlidir (3). Reaktif oksijen türlerinin kaynakları; mitokondride elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, çekirdek zarı elektron transport sistemi ve hücre zarıdır (27). Bunun yanı sıra fizyolojik ROS seviyeleri doğal apoptozis mekanizmasında rol oynarlar. Apoptozis, embriyonun implantasyonu süresince uterus endometriyumunun homeostazisinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynamakla birlikte, erken embriyonik gelişim süresince fizyolojik hücre ölümünü sağlar. Mitokondri, ROS üretimi yoluyla apoptozis sinyaline katkı yapar (43,44). Reaktif oksijen türleri, apoptozisin başlaması ve artışı özel metabolik yolla ve hücresel bileşenlerin transdüksiyon sinyali yoluyla yapar (45). Sitokrom C apoptozom denilen bir kompleks ile birlikte çalışır ve mitokondriden stoplazma içerisine salgılanır. Sitokrom C, hücresel ATP (Adenozin trifosfat) sentezinin ve oksidatif fosforilasyonun oluşumunda kritik rol alan mitokondrinin zarları arasında yer alan bir elektron taşıma proteindir (46).

Oksijen varlığı altında hücreler, ROS ürünlerine karşı bir savunma sistemine sahiptirler. Reaktif oksijen türlerinin üretimi aşırı olduğunda veya vücut aşırı ROS'u elimine edemediğinde oksidatif stres artar, ROS birikir ve bu durum hücre ve

dokulara hasar verir. Biyolojik olarak en önemli ROS türlerinden bazıları; süperoksit anyon (O_2^-), hidroksil radikali ($OH^\cdot$), peroksil ($POO^\cdot$) ve alkoksil ($RO^\cdot$)'dir (47). Süperoksit anyon, dismutasyonla hidrojen peroksit (H_2O_2)'in oluşumunda görev alır. Hidrojen peroksit stabildir, su (H_2O) ve oksijen (O_2)'e ayrılır ve hücre zarından geçebilmektedir. Demir (Fe) varlığında H_2O ve O_2 etkileşime girerek $OH^\cdot$ açığa çıkarılır ve oksidatif hasardan sorumlu olan da bu $OH^\cdot$ türüdür (48).

Nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit ($ONOO^\cdot$) önemli hücrel radikallerdir. L-Arginin'den NO sentaz enzimiyle NO üretilir. Nitrik oksit çoğu hücrel olayların bir düzenleyicisi olarak hareket eder (50). Örneğin; apoptozisde rol alır. Nitrik oksit ve O_2^- ürünlerinin miktarı fazla arttığında $ONOO^\cdot$ miktarı artarak oksidatif hasarlara neden olmaktadır (50,51,52).

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyon sürecinin son ürünüdür ve genellikle oksidatif stresin biyomarkeri olarak ifade edilir. Hidrojen atomlarının yağ asidi zincirlerinden koparılması sonucunda yağ asidi zincirinin lipid radikali özelliği kazanması ile birlikte lipid peroksidasyonu başlar. Moleküler oksijenle reaksiyona giren lipid radikali sonucu lipid peroksit radikalleri oluşur ve membran yapısına katılan yağ asitlerinin etkilenmesine neden olarak yeni radikallerin oluşmasını sağlar. Açığa çıkan hidrojen ise bağlanarak lipidperoksitlerine (LOOH) dönüşerek zincirleme bir reaksiyon başlar. Lipid peroksitlerin yıkımlanmasına bağlı olarak biyolojik aktif olan MDA, acrolein, 4-hidroksinonenal gibi ürünler açığa çıkar. Bunlar ya hücrede metabolize olur ya da hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayar (53,54). Malondialdehit, araşidonik asidin ve daha büyük çoklu doymamış yağ asitlerinin enzimatik veya enzimatik olmayan yolla ayrışması sonucu oluşan son üründür (55). Malondialdehit; hücre zarında deformasyon, yüzey bileşenlerinin agregasyonu, iyon transportu ve enzim aktivitesi gibi zar özelliklerinde değişikliklere neden olmaktadır (56). Malondialdehit'in tespitinde Tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonuna dayalı bir yöntem kullanılır (57). Bu testin prensibi, yoğun renkli bir kromojen floresan renk absorbanı elde etmek için TBA'nın MDA'ya reaktivitesine dayanır (55). Malondialdehit dışında oksidatif stresin diğer bir indikatörü ise; maternal kanda proanjiyojenik ve antianjiyojenik mRNA üretiminin fetal hücredeki seviyelerinin tespitidir. Yine bilindiği üzere gebelik süresince bazı trofoblast hücreler

ve diğer plasental kaynaklı hücre atıkları, plasentada bir patolojik durumu işaret edebilirler (58).

Serbest radikaller karşısında vücuttaki ilk savunmayı SOD enzimi yapar. Süperoksit dismutaz, organizma için esansiyeldir ve görevi peroksinitrit oluşumunu engelleyerek süperoksit radikalini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürüp oksidanların zararlı etkilerini ortadan kaldırır (59,60). Hücre farklılaşmasında, tümorogenezisde ve pulmoner toksisite ile uyarılan hipoksida rol oynayan Cu-Zn-SOD (SOD-1), Mn-SOD (SOD-2) ve Cu-SOD (SOD-3) olarak isimlendirilen üç farklı SOD izoformu bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz-3 özellikle damar duvarlarında yüksek oranda bulunurken plazma, lenf ve sinoviyal sıvıda da bulunmaktadır. Damarların düz kas hücreleri tarafından yüksek oranda SOD-3 sentezlenmektedir (55).

Lipid peroksidasyona karşı korumada GPx ve CAT en etkili antioksidan enzimlerdir. Glutatyon peroksidaz aracılığıyla hidrojen peroksit indirgenerek zararlı etkisi ortadan kaldırılır. Katalaz ise GPx ile birlikte, SOD aracılığıyla meydana gelen hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürür. Her iki enzimde organizmada hücrel korunmada önemli roller aldığından dolayı, oksidatif stresin meydana geldiği durumlarda GPx ve CAT aktivitelerinde değişimler meydana gelmektedir (59,60). Glutatyon; sistein, glutamik asit ve glisin aminoasitlerinden oluşan en önemli çözünebilir antioksidandır. Hem doğrudan hem de GPx ile birlikte (enzimatik olarak) serbest radikallerin bertaraf edilmesini sağlar (39,61). Glutatyon peroksidaz enzimi çoğu zaman selenyuma bağlı olarak aktivite gösterir. Asıl önemli rolü ise hücreyi oksidatif strese karşı korumaktır (55).

3.2.1. Oksidatif stresin ovaryum üzerine etkileri

Reaktif oksijen türleri foliküler sıvıda bulunmaktadır. Folikülogenezise ve steroidogenezise sinyal iletimi ve hücre içi mesaj iletiminde katkı sağlamaktadırlar. Granüloza hücrelerinin hipoksisi foliküler anjiyogenezi uyarır. Foliküldeki anjiyogenezin bozulması ise foliküler atreziye katkı yapar (62). Tüm foliküllerde SOD vardır. Kumulus hücrelerinde ve foliküler sıvıda varlığının nedeni, enzimatik antioksidan özelliğiyle oosit'i ROS'un zararlı etkilerinden korumaktır (63).

Süperoksit anyon ve ilişkili metabolitler ovülasyon için ön koşul olan foliküler duvarın yıkımı için önemli bir rol oynamaktadırlar. Çünkü preovülatör graaf foliküllerinde lipid peroksidasyonu artmaktadır (64).

Kistik ovaryumlu sığırlarda yapılan bir çalışmada, hasta hayvanların folikül sıvılarında sağlıklılara göre daha az ROS bulunmuştur. Folikül sıvısındaki bu az ROS miktarından dolayı hücre duvarında şekillenen apoptozis aksamakta ve ovülasyon gerçekleşmemektedir (65). Reaktif oksijen türlerinin aşırı olduğu durumlarda, folikül ve çevresinde oositin dejenarasyonunu artırarak veya miyotik bölünmeleri sınırlandırarak oositin gelişimini inhibe edebilmektedirler. Ovaryumdaki folikül hücreleri kendilerini oksidatif hasardan korumak için enzimatik (MnSOD, ZnSOD vb.) ve enzimatik olmayan antioksidanları (A, C, E vitaminleri vb.) kullanırlar (43).

Steroidojenik hücreler potansiyel ROS kaynaklarıdır. Çünkü bu bileşenler normal metabolizma ürünleridir. Öte yandan ROS, P4 sentezini etkilerken, P4'de ROS üretimini etkilemektedir. Progesteron, SOD aktivitesi ve ROS arasında karşılıklı ilişki vardır. Ovaryumda, antioksidan savunmalarda ki artış KL'un aktivitesini korumak için ortaya çıkmaktadır (66). Örneğin; köpeklerde luteal fazdaki ROS düzeyleri foliküler fazla karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur (67). Reaktif oksijen türleri KL'da regresyon fazında artarak COX-2'yi ve ardından da PGF₂ α 'yı uyarır. Prostaglandin F₂ α ise apoptozisi uyarır. Bu durum, luteolizis sürecinde ROS'un apoptotik hücre ölümünü uyardığını göstermektedir. Prostaglandin F₂ α sadece lokal hücreler yoluyla değil aynı zamanda fagositik lökositler yoluyla O₂⁻ üretimini uyarmaktadır (68).

Korpus luteum'un oluşumu sürecinde antioksidanlar artar ve ROS aktivitesi azalırken, luteolizis sürecinde bunun tersi gerçekleşir. Eğer sıklık KL, gebelik KL'una dönüşürse siklusun 12-16. günlerinde SOD ve CAT aktivitesi yüksek gözlenir. Bu yüksek SOD seviyeleri özellikle lokal üretilen radikallere karşı koruyucu bir etkiyi işaret eder. Luteal fazda C vitamini seviyeleri siklusun 14. gününe kadar artar ve ardından luteolizisin başlamasına yakın zamanda azalmaya

başlar. Bunun nedeni C vitamininin kollajen yapımında yer alması ve yapısal luteolizis sırasında bu kollajen yapının bozulmasından kaynaklanmaktadır (69).

3.2.2. Oksidatif stres ve gebelik

Preimplantasyon dönemde uterus, implantasyona hazırlık için hem fiziksel hem de kimyasal değişikliklere uğrar. Uterus bezlerinin salgıları implantasyona kadar besin ve hormonlarla konseptusun hayatta kalmasını sağlar (70). Bütün memelilerde endometriyal uterus bezleri, histotrof olarak adlandırılan içerisinde değişik enzimler, sitokinler, lenfokinler, büyüme faktörleri, hormonlar, transport proteinler vb. içeren kompleks bir sıvı salgılarlar (71). Histotrof beslenmede, uterus bezleri tarafından üretilen proteinler ve diğer besleyici moleküller embriyonun canlılığını devam ettirmesini sağlar. Embriyo, bu histotrof sıvının içinde yüzer. Besin maddelerinin taşınması, trofoektoderm tarafından pinositoz yoluyla gerçekleşir. Endometriyal bezlerin azalması veya histotrof besin üretimindeki yetersizlikler koyunlarda 14. günden sonra gebeliğin sonlanmasına ve tekrar östrüs göstermelerine neden olmaktadır (72).

Embriyonik ve ekstraembriyonik hücreler, oksidatif fosforilasyonun enzimatik aktiviteleri ve embriyonik mitokondrinin artan solunum kapasitesinin yan ürünü olarak oluşan ROS türlerine maruz kalırlar. Embriyo, organogenezis periyodu boyunca yüksek metaller, ilaçlar ve pestisitler gibi çevresel teratojenlere duyarlı olduğundan dolayı bu etkenlerin etkisiyle değişikliklere uğrayabilmektedir. Abortusun meydana gelmesi, implantasyon sonrasında konseptus ve endometriyum arasında hücrel ve biyokimyasal etkileşimler süresince artan oksidatif stresten kaynaklanmaktadır (73).

Gamet hücreleri ROS hasarına oldukça duyarlı olup antioksidan korumaya ihtiyaç duyarlar. Oosit ve embriyo ROS hasarına karşı SOD, CAT ve GPx gibi enzimatik sistemlerden oluşan savunma sistemlerine sahiptir. Ayrıca enzimatik olmayan düzeyde ise GSH, vitaminler ile ROS'u detoksifiye ederler (74). İmplantasyon sonrası dönem, gelişen konseptusun ROS'a bağlı oksidatif strese yüksek düzeyde duyarlılığından dolayı gebeliğin kritik bir safhasıdır. Oksidatif fosforilasyon hayati bir metabolik yoldur. Çünkü gelişen konseptusun yüksek enerji

ihtiyacını karşılamak için besinlerin oksidasyonu ile gerekli olan ATP bu yolla üretilmektedir. İmplantasyon öncesi embriyonik oksijensiz solunumdan implantasyon sonrası oksijenli solunuma geçiş, uteroplasental kan akımı ve konseptusun damarlanması yoluyla uyarılmaktadır (75,76).

Gebelik, başlıca O_2^- olmak üzere ROS ürünlerinin üretildiği ve plasental mitokondriyal aktivitenin artışıyla oksidatif stresin arttığı bir durumdur. Süperoksit anyon daha çok karaciğerde NADPH oksidaz tarafından üretilmektedir. Ayrıca diğer ROS ürünlerinin (NO, CO vb.) üretildiği enzimatik yollarla da üretilmektedir. Reaktif oksijen türlerinden NO ve CO plasentada vazoaaktif etkilere sahip olup ayrıca sinyal üretiminde de rol oynamaktadırlar. Gebeliğin ilk trimestirinde intervillöz aralığa kan akışının sağlanması, oksidatif stres artışıyla olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin faydalı yönleri, bakterileri yok etmesi ve plasentada sinyal iletimine katkıda bulunmalarıdır (2, 77-79).

Plasenta, büyük antioksidan sistemler olan Cu/Zn-SOD, CAT, GSH, GP_x, Thiol/Disülfid Oksiredüktaz, GST (Glutasyon S-Transferaz) ve vitaminlere (C vitamini, E vitamini vb.) sahiptir (80). Oksidatif stres ve oksidan bileşikler, ROS üretiminin antioksidan savunmayı aştığı durumlarda ortaya çıkar. Eğer aşırı ROS üretimi antioksidanlar gibi etmenlerle dengelenmezse, plasental dejenarasyon, fetal büyümede gecikme, erken doğum, ardından feto-maternal geçişlerde değişimlere ve gebeliğin sonlanmasına neden olabilir (1).

Endometriyumun stromal hücreleri normal metabolizmanın yan ürünü olarak ROS üretirler. Embriyo ve germ hücreleri ROS'un potansiyel zararlı etkilerine karşı savunmasızdır. Reaktif oksijen türlerinin üretimindeki bu artış embriyoya iki hücreli safhada gelişimini sınırlayarak zarar verir (81). Embriyonik implantasyondan önce endometriyum, steroid hormonların ardışık artış ve azalışlarının farklılıklarına ve gelişimine yüksek derecede hazırlıklı olmalıdır (82).

Korpus luteum ve plasenta, steroidlerin aktivitesi ve genişleyen kan dolaşımından dolayı ROS türlerine oldukça fazla maruz kalırlar. Korpus luteumun ROS'a bağlı luteal regresyondan kurtulması; uterus ve embriyonun gebelik boyunca ROS ürünlerine bağlı oksidatif stresten korunması, gebeliğin oluşumu ve sağlıklı

sürdürülmesi açısından anahtar rol oynayan bir olaydır (2,83). Antioksidan enzimlerin, KL'un hormon üretiminin sürdürülmesi ve lüteolizisten korunmasında etkili olduğu belirtilmiştir. Erken gebelik boyunca sığır KL'unda SOD2, SOD3 ve CAT yüksek seviyelerdedir. Bu yüksek SOD seviyeleri özellikle lokal üretilen radikallere karşı koruyucu bir etkiyi işaret eder (84). Rat KL'unda SOD1 ve SOD2 aktivitelerindeki değişiklikler gebelik ve yalancı gebelik boyunca serum P4 düzeylerindeki değişikliklere benzer etkilere sahiptir (85). Koyunlarda gebelik süresince ve östrüs siklusu boyunca KL ile SOD1, SOD2, GP_x, GSR ve GST aktivitelerindeki değişiklikler muhtemelen lüteal hücrelerde üretilen ROS'a bağlı olabilir ve lüteal steroidogenezin sürdürülmesi ve apoptozisin inhibisyonuna da dahil olabilir (83,86,87).

Enzimatik olmayan antioksidanlar KL'un yapısında ve fonksiyonunda önemli rol oynarlar. Sığır ve domuzlarda, östrüs siklusu ve gebelik KL'u yüksek miktarda β -karoten ve C vitaminine sahiptir. Retinol, retinoik asit ve β -karoten domuz lüteal hücrelerinde, ROS'a bağlı oksidatif hasara karşı kolesterol yan zincirini korumak suretiyle P4 sentezinde rol oynarlar. Gebelik süresince lüteal C vitamini miktarı KL tam olgunlaştığında en üst seviyeye ulaşır ve bu düzeyde kalır (88-91).

Gebelik ilerledikçe oksijen basıncı (PO₂) azalır. Çoğunlukla periferik hücreleri kapsayan çevrede oluşan bir azalma ROS üretiminde de bir azalmaya neden olur. Üstelik yeni oluşan hücreler daha düzenli bir PO₂'na maruz kalmaktadırlar. Mitokondride O₂⁻ nötralizasyonunu sağlayan Mn-SOD, bu yeni hücrelerde tetiklenir. Bu durum ROS'a bağlı etkilere karşı bir bağışıklığa sebep olur (92). Koyunlarda, implantasyondan yaklaşık 7 gün önce blastosist zona pellusidasını kaybeder (93). Bunu NADPH oksidaz aktivasyonu ve hücrel temasın artmasıyla ilişkili olarak ROS üretiminde bir artış takip eder (94).

Koyunlarda gebeliğin 35-55. günleri arasında GP_x ve GSH'da bir artma, MnSOD seviyelerinde ise geçici bir azalma meydana gelir (95). Glutasyon peroksidaz mitokondriyal matrixte ve stoplazmada salgılanır. Reaktif oksijen türlerinden özellikle H₂O₂'ye karşı fetoplental savunmada rol oynar. Koyunlarda gebeliğin ilk ayında plasentomlar derin bağlantılar kurar. Apoptozis, düzenleyici

genler olan pro-apoptotik (BAX) ve anti-apoptotik (MCL1) tarafından gerçekleştirilir. Pro-apoptotik genlerin üretimi ROS tarafından artırılırken, MCL1 geni GP_X tarafından uyarılır. Bu nedenle apoptozis olayı BAX/MCL1 oranındaki bir azalmayla engellenebilir. Bunun dışında ayrıca A, C ve E vitaminlerinin eksikliğinde de ROS miktarı artar. Bu vitaminler ROS'un etkilerini doğrudan engellerler (96).

İkiz gebeliklerde daha yüksek O₂ ihtiyacı ve daha yoğun lipid peroksidasyonu olduğundan dolayı, gebelik sürecinde ROS'un olumsuz etkileri muhtemelen daha çok oluşacaktır (97). Gebelik toksemili koyunlarda kan keton cisimcikleri normalin 10 katı kadar artar (98,99). Bu keton cisimciklerinden özellikle Asetoasetat, HO⁻ ve O₂⁻ antioksidanların üretimini uyarır. Yine bu hayvanlarda kan kortizol düzeyi yüksek olup buna bağlı olarak da peroksidasyon ve oksidatif stres oranı artmaktadır (100).

Koyunlarda doğum aslında yangısal bir süreç olarak kabul edilir. Çünkü uterus ve serviks özellikle monosit ve lenfositler olmak üzere yangı hücreleriyle kaplanır. Lökosit göçü, sitokin üretiminde artışı tetikler (101). Oluşan bu sitokinler, doğum için önemli olan servikste olgunlaşma ve miyometriyal kasılmaların oluşumunu güçlü bir şekilde uyarır. Yapılan çalışmalarda doğumdan önceki ve sonraki 36. saatler arasında doğumla ilişkili lökosit göçünden kaynaklı bir ROS artışı olduğu görülmüştür. Yine doğumdan önceki 48 saat ve doğumdan sonraki 24. saatler arasında artan östrojen miktarından dolayı da ROS artmaktadır (102). Reaktif oksijen türleri doğrudan ve dolaylı olarak PG'lerin salgılanmasına neden olarak, doğumda çok önemli rol oynarlar (103). Sığırlarda aşırı yoğun bir ROS üretimi özellikle gebeliğin 90-120. günlerine kadar olur ve konseptustan NO salgılanır (104). Bu aynı zamanda gebe koyunlarda gebeliğin 140. gününe kadar ve ayrıca miyometriyumda da gözlenir (105).

İn vitro çalışmalar göstermiştir ki, embriyonik hücre içi PO₂, hücre dışı bölgeden 5-10 kat daha düşüktür. Bu yüzden hücre içi ROS üretiminin, hücre dışı bir ortamdan daha düşük olması beklenir (106). Reaktif oksijen türleri, gebeliğin ilk fazında fertilize ovumun implantasyonunu artırmak için gereklidir. Bu dönemde ROS üretimindeki dengesizlik embriyo rezorpsiyonuna neden olabilmektedir (27).

Gebelik boyunca fetal büyüme, plasental ve maternal metabolizmayla alakalı olarak oksidatif strese karşı anneler daha eğilimli olurlar. Placenta, maternal dolaşımdan O_2 alır ve materno-fetal oksijen katmanları arasında pozisyonlanır. Bunun sonucunda artan ROS üretiminde başlıca O_2^- ve buna bağlı olarak da oksidatif stresin gelişme ihtimali artar (57). Placenta aynı zamanda NO, CO ve $HNOO^-$ gibi diğer ROS ürünlerini de üretir ve trofoblast proliferasyonu belirgin şekilde etkiler. Placentada ROS miktarı arttığında sitotrofoblastlar ve villöz stromal hücrelerin yeni antioksidanlar sentezleme yetenekleri vardır (107). Ancak yeni antioksidanların üretilme kapasitesi ROS ürünlerine karşı yeterli olmazsa DNA'da hasar, protein hasarı ve lipid peroksidasyonu meydana gelir. Protein hasarı, endoplazmik retikulumda anormal katlanma veya enzim-reseptör fonksiyonunun kaybı şeklindeyken, DNA hasarı, iplik kırılması veya karşı bağlarda kromatin ipliklerinde katlanma veya transkripsiyon şeklindedir. Lipid peroksidasyonu ise hücre membranının geçirgenliğinin kaybı veya bozulması şeklinde ortaya çıkmaktadır (108).

Koyun plasentasında artan antioksidan enzim aktivitelerinin, erken plasental gelişim boyunca özellikle en erken safhada koruyucu bir mekanizma şeklinde oksidatif hasara karşı fetüsü ve plasental dokuyu koruduğu kabul edilir (57). Örneğin; insanlarda embriyo gebeliğin 5. haftasında serbest radikallere karşı iyi bir savunmaya sahiptir. Bunu yüksek düzeydeki antioksidanlar ile sağlar (109). Placenta oksidatif hasara karşı, anneden fetüse antioksidanların karşı geçişi, anne ve fetüs arasında ROS ürünlerinin normal düzeyine izin verecek şekilde geniş bir bariyer oluşturur (13,110,111). Koyunda placenta, gebelikte erken P4 üretiminde predominant bir rol üstlenir. Bu yüzden yeterli plasental gelişim ve fonksiyonlar, gebeliğin başarılı bir şekilde oluşması ve fetüse besin ve oksijenin yeterli miktarda sağlanması için bir ön koşuldur (112). Oksidatif stres gebeliğin erken dönemlerinde artar. Çünkü placentadaki yüksek metabolik faaliyetler ROS üretiminde artışa neden olur. Plasental antioksidan sistemlerdeki yetersizlikler, erken gebelik kayıplarında anahtar bir faktör olarak görülmektedir (113,114). İnsanlarda düşük olgularında gri skala görüntüleme ile tespit edilebilen erken ve yaygın bir intervillöz kan akışı başlangıcı vardır. Bu anormal kan akışı şekli, erken plasental doku üzerindeki oksidatif stres artırabilir ve ardından placenta gelişimini bozabilir. Bu durum

trofoblastların oksidatif hasarının, erken gebelik kaybında anahtar rol oynadığını göstermektedir (115).

Yapılan çalışmalarda, yüksek oksijen seviyelerinde sitotrofoblastlar ve stromal hücrelerde hasar olmaksızın, bu hücrelerde mitokondride azalma, yüzey mikro villüslerinde azalma ve vakuolizasyon meydana gelmektedir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda, gebeliğin erken dönemlerinde sinsityotrofoblastların düşük seviyede antioksidan ürettiği tespit edilmiştir. Ancak sitotrofoblastlar ve villöz stromal hücrelerin daha yüksek seviyelerde antioksidan ürettikleri tespit edilmiştir (107,116). Sinsityotrofoblastlar az miktardaki ROS artışlarına adapte olabilirler. Eğer bu adaptasyon yetersiz olursa, antioksidan kapasite artışı yetersiz kalır ve sinsityotrofoblastların mitokondriyal yapısı hasar görür. Bu durum kronik oksidatif stresin bir sonucu olabilir. Bu olay sonucunda da erken gebelik döneminde sinsityotrofoblastların hasarı sonucu gebelik sonlanabilir (117).

Plasental iskemide ROS ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur. Plasentasyon başlarken intervillöz aralıktaki yüksek oksijen basıncı normal iken, bazen bu durum plasental oksidatif stresle sonuçlanabilmektedir. Bu oksidatif stres artışını kompanze etmek için plasenta yüksek oksijenli ortama adapte oldukça antioksidan aktivitede bir artış gözlenir. Trofoblastlarda keskin bir oksidatif stres artışı vardır. Bu artışlar normal gebeliklerde GP_x ve CAT'ın plasental artışıyla çakışarak kompanze edilir (118).

Oksidatif strese karşı, antioksidanların yanı sıra melatonin'ininde olumlu etkileri vardır. Memelilerde, melatoninin iki adet reseptörü vardır. Bunlar Melatonin 1 (MT1) ve Melatonin 2 (MT2) reseptörleridir (119). Koyunlarda MT1 ve MT2 reseptörleri; oositlerde, kümülüs hücrelerinde ve granüloza hücrelerinde eksprese edilir (120). Genç keçi foliküllerinin folikül sıvısında melatonin bulunur (121).

Koyunlar üzerinde yapılan bir çalışmada; melatoninin ekzojen veya endojen olarak sağlanıp sağlanmadığına bağlı olarak embriyo kalitesi üzerindeki yararlı etkilerinin, iki yol ile gösterebileceği varsayılmıştır. Bunlardan ilki; ROS'un neden olduğu oksidatif stresin azaltılması yoluyla oosit ve embriyoların hasarını azaltması. İkincisi ise; ovülasyondan maternal kabule kadar ki süreçte döllenme sürecine dahil

olan mekanizmalar üzerindeki etkileridir. İlk mekanizma şeklinde melatonin; folikül içinde aşırı miktarda ROS üretildiğinde özellikle ovülasyon sürecinde koruyucu etkisiyle folikül gelişimini ve oosit yeterliliğini düzenler. İn vitro matürasyon (IVM) ve in vitro fertilizasyon (IVF) prosedürlerinde oositler ve embriyolar ROS'tan etkilenebildiğinde de benzer bir koruyucu etki sağlar. Antioksidanlardan SOD, GP_x, CAT ve GR (Glutasyon redüktaz) dahil olmak üzere birçok antioksidan enzimi uyarırken, nitrik oksit sentaz (NOS), ksantin oksidaz (XO) ve lipoksijenaz (LOX) gibi pro-oksidan enzimleri ise inhibe eder ve muhtemelen oksidatif hasara karşı direnç sağlayan hücresel zararını da stabilize eder. İkinci mekanizma şeklinde ise melatonin; foliküllerin büyüme modelini ve KL'un steroidojenik kapasitesini etkiler. Kendi reseptörlerini aktive ederek kümülüs hücrelerini IVM sırasında DNA hasarına karşı korur. Uterus tarafından PGF₂ α salgılanmasını engeller. Embriyo gelişimi ve implantasyonda yer alan bazı genlerin ekspresyonunu düzenler ve DNA metilasyonu ile ilişkili genleri ve sinyal yollarını düzenleyerek blastosist kalitesini etkiler (122).

3.3. Ekotekstür Analizi

Transrektal ultrasonografi küçük ruminantlarda 1990'lı yıllardan itibaren reproduktif alanda kullanılmaktadır (123-127), koyunlarda antral foliküler döngüyü incelemek amacıyla (128-130) ve ekzojen olarak uygulanan bazı hormonların ovaryum üzerine etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır (131,132). Ancak bu çalışmalar ovaryumdaki daha çok anatomik değişiklikleri incelemeye olanak veremekteydi. Bu alanda bilgisayar destekli ultrasonografik görüntü analizlerinin kullanılmaya başlanmasıyla, jinekolojik araştırmalarda invaziv olmayan işlemlerle araştırmalar yapmak mümkün hale gelmiştir. Günümüzde bu metot, geliştirilmeye elverişli bir çalışma alanı olarak ileriye dönük umut vaat etmektedir (133,134).

Ultrasonografik görüntüleme, dokuların yüksek frekanslı ses dalgalarını yansıtma yeteneğine dayanır ve doku yoğunluğuna bağlı olarak farklılık gösterir. Görüntüyü pikseller oluşturur ve bu pikseldeki gri renk skalası 0-255 değerleri arasındadır. İnsan gözü ancak 18-20 farklı gri renk tonunu ayırt edebilmektedir. Ancak bilgisayar algoritmaları 255 farklı tonu algıladığından dolayı daha objektif ve doğru analiz yapabilmektedir (135). Bu sayı aralığında, "0" tam siyah rengi ifade

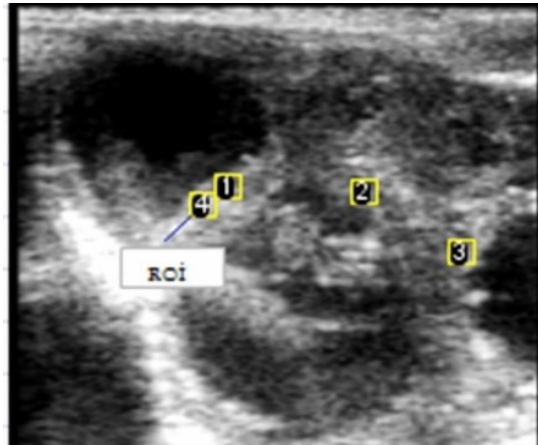
ederken, “255” tam beyaz rengi ifade eder (5,135,136). Bu nedenle son yıllarda bilgisayar destekli B-mod ultrasonografik görüntü analizleri reproduktif tanı ve araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (137-141).

Ultrasonografik görünüm, dokunun hücresel yapısına bağlı olarak çeşitlilik gösterir, buna ekotekstür denir. Ultrasonografik yöntemle elde edilen B-mod görüntüler, çeşitli bilgisayar destekli analiz programları aracılığıyla değerlendirilebilir. Bu programlardan biri ImageJ (Image J 1.42q; NIH, USA) programıdır. ImageJ programı, birçok görüntü formatı (png, bmp, jpeg) yoluyla hücrelerin sayımı, hücre boyut ölçümü ve tümöral yapıların diğer dokulardan ayrımı gibi birçok işlem yapılabilir (142,143).

3.3.1. Temel kavramlar ve ekotekstür parametreleri

3.3.1.1.İnceleme alanı

Ekotekstür analizleri yapılırken analizi yapılacak olan ultrasonografik bir görüntüde analizi yapılacak dokunun tamamı aynı resim karesine sığmaz ve artefakt oluşması oldukça muhtemeldir. Bu nedenle analizi yapılacak olan dokuyu temsil edecek region of interest (ROI) seçilir (Şekil 2). Analizler, bu ROI bölgeleri üzerinden gerçekleştirilir (144).



Şekil 2. Region of Interest (ROI) alanı seçilmesine bir örnek

3.3.1.2. Piksel

Piksel, dijital bir resmi oluşturan en küçük birim olup kordinat ve renk değerleriyle ilgili bilgileri içermektedir. Çözünürlük olarak tanımlanan piksel sayısı bazen tek bir sayı (3 megapiksel) bazen de iki sayının çarpımı (480x640,1024x1280) şeklinde ifade edilir. Piksellerden oluşan resim bitmapped (bmp) image olarak tanımlanmaktadır. Kullanılan diğer formatlar (tiff, gif, jpeg vb.) ise bmp'nin sıkıştırılmış versiyonlarıdır (145-147). Toplam piksel sayısı ImageJ programında “count” ve “area” olarak tanımlanmaktadır. Seçim alanını piksel kare veya kalibre edilmiş kare birim cinsinden (örneğin; mm², µm²) belirtir (142).

3.3.1.3. Histogram

Histogram, incelenen alandaki renk değerlerinin çizgi grafiği olarak tanımlanmaktadır. Griliğin piksellerdeki en küçük ve en yüksek değerini göstermektedir. Bu değerler, ImageJ programında değişmektedir. Düşük ve asgari değerde olan pikseller siyah, yüksek ve azami değerde olanlar ise beyaz olarak görüntülenirler. Ultrasonografik görüntüler 8-bit formatında açılırken (Tablo 1), 3D görüntüler 10-16 bit formda açılır (142).

Tablo 1. Imagej programında kullanılacak görüntülerin gri seviye aralığı (142)

<i>Görüntü piksel değeri</i>	<i>Gri seviye aralığı</i>
<i>8-bit</i>	<i>0-255 gri seviye</i>
<i>10-bit</i>	<i>0-1023 gri seviye</i>
<i>12-bit</i>	<i>0-4095 gri seviye</i>
<i>15-bit</i>	<i>0-32767 gri seviye</i>
<i>16-bit</i>	<i>0-65535 gri seviye</i>
<i>RGB colour</i>	<i>Kırmızı, yeşil ve mavi renklerini içeren renkli görüntüler.</i>

3.3.1.4. Ortalama gradient

İncelenen tekstürde yapısal özelliklere ilişkin bilgi veren ortalama gradient değerleri özellikle mikro yapıya ilişkin bilgi vermektedir. Bu parametre incelenen bölümde

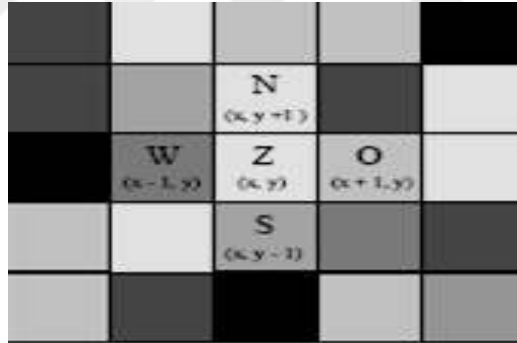
piksellerin düzenini açıklamak için gri değerlerin farklılıklarını ortaya koymakta (148-150) ve komşu pikseller arasındaki gri değer farklılıklarını tanımlanmaktadır (149). Gradientin hesaplanmasında bir başlangıç merkez noktası (Z) hesaplanır. Bu nokta referans alınarak komşu pikseller bulunur ve bunlar için gri değer farklılığı hesaplanır (Şekil 3).

Z noktasındaki gradient değerinin formülü şöyledir;

$$Gr_{Z(x,y)} = \sqrt{(N - S)^2 + (W - O)^2} = \sqrt{(i_{x,y+1} - i_{x,y-1})^2 + (i_{x-1,y} - i_{x+1,y})^2}$$

I_{xy} , Z(x, y) bölgesindeki piksel kontrastını ortaya koymaktadır.

İki yüz elli altı değişik gri değerde (0-255) en yüksek değer $\sqrt{2} \times 255 = 360,62$ olarak elde edilir. Resmin tam anlamıyla homojen olduğu durumlarda ortalama gradient değeri sıfır olur. Bu hesaplama Z merkez olarak tüm resim noktalarında yinelenildiğinde “ortalama gradient değeri” elde edilir (149,151).



Şekil 3. Gradient hesaplanmasının grafik tarzında gösterilmesi (149)

Ortalama gradient değerinin formülü şöyledir;

$$GrMean = \frac{1}{N} * \sum_{(X,Y) \in ROI} G(x,y)$$

GrMean: Ortalama gradient değeri

N: Bir ROI alanındaki piksellerin sayısı (bir gradient için hesaplanan)

G(x, y): Bölümdeki gradient (x, y)

x, y = Sıra ve bölüm indeksi

3.3.1.5. Homojenite (HOM)

Homojenite ultrasonografik görüntüde belirlenen ROI'ler de bir örnekliliğin ne düzeyde olduğunu ortaya koyar (152,153). Farklı gri değer kombinasyonları sıklık ve sayısına bağlı olarak değeri 0 ve 1 arasında değişmektedir. Gri değer kombinasyonları az ve ortalama olarak eşit dağılım gösteriyorsa homojenite değeri yüksektir. Resim tamamen homojen olduğu durumlarda değeri 1 (bir)'dir. Gri değer kombinasyonları fazla ve düzensiz dağılım gösteriyorsa homojenite değeri düşmekte ve 0 (sıfır)'a yaklaşmaktadır (148).

Homojenitenin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmaktadır.

$$HOM = \sum_{(i,j)} p(i,j)^2$$

i, j = Sıra ve bölüm indeksi

$P(i,j)$ = Matriste bölümdeki değer (i,j)

ImageJ yazılımında uniformite ya da enerji anlamına gelen “Angular Second Moment”; GLCM ölçümü yapılan karelerin toplamıdır ve görüntü homojenliği ile ilgili bilgi vermektedir. Bu değer görüntünün homojen veya ölçüm yapılan piksellerin çok benzer olduğu durumlarda yüksektir (142).

$$\text{Angular Second Moment} = \sum_{i=0}^{Ng-1} \sum_{j=0}^{Ng-1} P i^2 j$$

3.3.1.6. Kontrast (CON)

Kontrast, bir ultrasonografik görüntünün makro yapısıyla ilgili olarak en fazla bilgiyi içermektedir. İncelenen alandaki farklı gri değer derecelerinin yoğunluk değişimlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (153).

Kontrast için kullanılacak formül şöyledir;

$$CON = \sum_{(i,j) \in ROI} (i,j)^2 * p(i,j)$$

i,j = Sıra ve bölüm indeksi

$p(i,j)$ = Matriste bölümdeki değer (i,j)

3.3.1.7. Entropi (ENT)

Entropi, görüntü sıkıştırma için gereken görüntünün bilgi miktarını gösterir. İletilen bir sinyaldeki bilgi veya mesaj kaybını ve ayrıca görüntü bilgisini ölçer (142, 154). Entropi bir düzensizlik ölçüsü olup, ROI içerisinde yer alan tekstürün homojenite derecesine bağlı olarak ters orantılı olarak değişen bir değerdir (144). Matriks değerleri arasındaki üniformiteyi gösteren bir ölçüdür (152).

Entropi için kullanılacak formül şöyledir;

$$ENT = \sum_{i=0}^{Ng-1} \sum_{j=0}^{Ng-1} -P_{ij} * \log P_{ij}$$

ImageJ yazılımı içerisinde “Contrast” ve “Entropy” olarak geçen değerler görüntü heterojenliği hakkında bilgi içermekte ve gri değer değişimindeki dengesizliği ölçmektedir. Doku yoğunluğunun fazla olduğu görüntülerde kontrast yüksek bulunurken, entropinin yüksek olması ise istatistiksel olarak dokunun daha düzensiz olduğunu göstermektedir (142).

3.3.1.8. Korelasyon

Korelasyon, seçilen ROI’lerde komşu piksellerde gri değerler arasındaki lineer durumu belirten bir ölçüdür (155). Genellikle deformasyon, yer değişikliği, gerinim ve optik akışı ölçmek için kullanılmakla birlikte birçok mühendislik alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (154).

Korelasyon için kullanılacak formül şöyledir;

$$\text{Korelasyon} = \frac{\sum_{i=0}^{Ng-1} \sum_{j=0}^{Ng-1} (i,j)p(i,j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y}$$

ImageJ programında “Correlation” olarak geçen değer görüntüdeki inceleme alanlarının komşu gri seviyeleri arasındaki doğrusal bağımlılık hakkında bilgi vermektedir (142).

3.3.1.9. Ortalama gri değer

ImageJ resim içerisinde seçilen inceleme alanlarındaki tüm piksellerin gri değerlerinin toplamının piksel sayısına bölünmesiyle elde edilen değerdir ve program içerisinde “Mean gray value” olarak belirtilmektedir (142).

Gri değer 0=siyah ile 255=beyaz arasında değişen ve bir görüntüyü oluşturan piksellerin açıklık veya koyuluğunu ifade eder ve değeri değişmektedir. Görüntü histogramlarında piksellerin resimde nasıl yer aldıkları göz önünde bulundurulmaktadır. İnceleme yapılan ROI’e ilişkin genel bir bilgi vermektedir ve yalnızca ultrasonografik B mod görüntünün tüm kontrastına ilişkin bilgi ulaştırmaktadır (149,156,157).

Ortalama gri değerin formülü şöyledir;

$$\mu g = \frac{1}{N} * \sum_{(x,y)} G_{xy}$$

μg : Ortalama gri değer (0–256 arasında değişir)

N: Bir ROI alanının büyüklüğü (piksel olarak)

G_{xy} : Bölümdeki gradient (x,y)

x,y = Sıra ve sütün indeksi

3.3.1.10. B-mod resimlerin bilgisayar destekli ekotekstür analiz yöntemleri

Dijitalize ultrasonografik görüntüler değerlendirilmek üzere “off-line” grafik yazılımı yardımıyla aktarılır ve uygun bir format altında (rneğin; “tiff”, JPEG, BMP) depolanır. Erken gebelik döneminde yapılacak ekotekstür incelemelerinde “JPEG” formatında ekrana aktarılmış olan ultrasonografik görüntüler, grafik yazılımı yardımıyla “BMP” formatında depolanır çünkü BMP dosyası diğer görüntü dosyalarına göre dijital görüntülerin farklı ekran ve aygıtlardan bağımsız olarak yüksek znrlk ve yüksek veri içeren bir dosya formatıdır (158), bu da incelenecek dokular için daha hassas ölçüm yapılmasına imkan sağlar. Analiz edilecek alanlar (ROI) belirlenir. Bu alanlar seçilirken incelenecek dokunun çevresindeki dokular, boşluklar vb. ROI alanına dahil edilmemelidir. Örneğin; endometriyal doku üzerinde çalışıldığında, ROI alanları endometriyumun tüm enine

kesiti veya uzunluğuna kesitlerinden seçilebilirken; myometriyum, uterus lümeni veya artefaktlar değerlendirmeye alınmamalıdır. ROI alanı kenar uzunlukları tüm görüntülerde eşit uzunlukta ve en az 100 (10×10) piksel olacak şekilde ROI bölgelerinin seçilip ardından görüntü analizleri yapılmaktadır (159).

3.3.1.10.1. ImageJ programı içerisinde yer alan GLCM eklentisi

Tekstür analizlerinde doku özellikleri, istatistiksel olarak birbirine göre belirli uzaklıktaki piksellerin yoğunluk kombinasyonlarındaki dağılımın hesaplanması ile yapılır. Ekotekstür analizi, her konumdaki piksel sayısına göre birinci, ikinci ve daha yüksek dereceli istatistiklere göre sınıflandırılmaktadır. Gri düzey eş oluşum matrisleri (GLCM) yöntemi, doku özelliklerini ikinci dereceden istatistiksel olarak değerlendirmenin bir yoludur. Üçüncü ve yüksek dereceli istatistiksel hesaplamada dokular için üç veya daha fazla piksel arasındaki ilişkileri göz önünde bulundurulmaktadır. Ancak, teorik olarak mümkün olmasına rağmen hesaplama süresinin uzun olması ve yorumlama zorluğu nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Kullanılan bu GLCM, satır ve sütun sayısının görüntüdeki gri düzeylerinin (G) sayısına eşit olduğu bir matristir (154).

3.3.2. Ekotekstür analizlerinin doğum ve jinekolojide uygulanması

Ekotekstür analizleri, beşeri hekimlik alanında karaciğer dokusundaki şüpheli kitlelerin benign veya malign olduğunu saptamak için (160), tiroit nodüllerindeki ekojenite yapısına göre malignant olup olmadığının anlaşılması (161), gebelik sırasında plasentada oluşan yıkımlanmaların tanınması (162,163) parotid bezinin baş ve boyun bölgesi kanserinde radyoterapinin takibi (164), meme tümörlerinin sağlıklı dokulardan ayrılması (152,156) gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, önerilen yöntemin tiroit nodüllerini doğru ve etkili bir şekilde sınıflandırabildiğini göstermektedir (165). Veteriner hekimliği alanında ise özellikle doğum ve jinekoloji alanında bilgisayar destekli ekotekstür analizleri uygulanmaktadır.

Preimplantasyon dönemde uterus, implantasyona hazırlık için hem fiziksel hem de kimyasal değişikliklere uğrar. Uterus bezlerinin salgıları implantasyona kadar

besin ve hormonlarla konseptusun hayatta kalmasını sağlar (70). Gebelikteki morfolojik değişiklikler ultrasonografi yoluyla görüntülenebilmektedir. Evcil hayvanlar ve çiftlik hayvanlarında yapılan bilimsel çalışmalar, ultrasonografik görüntü özellikleri, histomorfolojik özellikler ve ovaryumdaki antral foliküllerinin fonksiyonel durumu arasında korelasyonlar olduğunu göstermiştir (141,166,167). Sığır antral foliküllerinin ekotekstürel özellikleri, foliküler duvarın hücresel ve vasküler bileşimi ve bunların salgılama aktivitesi (yani, estradiol-17b ve P4'ün foliküler sıvı içeriği) ile ilgilidir (167).

Östrüs siklusu boyunca uterus ekotekstürü üzerine çeşitli araştırmalar rapor edilmiştir. Örneğin; kısıraklarda endometriyumdaki sıklusa bağlı değişiklikler ekotekstür analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir (150,168-170). İneklerde de sıklustaki değişiklikler KL'dan elde edilen ortalama gri değer verileriyle ortaya konabilmiştir (135,155).

Real-time ultrasonografi ile endometritisin varlığı ve şiddeti hakkında, kornu uterilerin ve serviksin ölçümü, uterus lümenindeki sıvı varlığı ve miktarının belirlenmesi, uterus duvarındaki yangısal değişikliklerin tespiti yapılarak fikir yürütülebilir (6).

Bu araştırmaların yanısıra ineklerde; östrüs siklusunda ovaryum ve endometriyumdaki değişikliklerin takibi (134,135,140), erken gebelik döneminde lüteal kan akışı ekotekstür özellikleri (141), suni tohumlama sonrası erken dönemde gebelik teşhisi (171), postpartum histolojik uterus involüsyonunun değerlendirilmesi (172), köpeklerde; meme tümörlerinin benign veya malign olarak sınıflandırılması (178), abortus sonrası uterusun ekotekstürel özellikleri (144), gebelikte fetal akciğer ve karaciğer farklılaşmasının belirlenmesi (162), hormon analizleri yerine kullanılması (173), keçilerde östrüs ve gebelik dönemlerindeki endometriyal ekotekstür değişimlerinin incelenmesi (174), domuzlarda uterus ekojenitesinin incelenmesi (166), boğalarda; libido tespiti (175), koçlarda pubertasa erişimin takibi (176) ve sperma kalitesinin araştırılması (177) amacıyla da ultrasonografi ve görüntü analizleri kullanılmıştır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Hayvan Materyalinin Sağlandığı Yer ve Bakım Besleme Koşulları

Çalışma, Diyarbakır ili Sur ilçesi sınırlarında bulunan, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Uygulama ve Araştırma Çiftliği'nde Temmuz-Eylül 2021 tarihleri arasında yürütüldü. Bölge, sert karasal bir iklim özelliğine sahip olup yaz ayları çok sıcak geçmektedir. Çalışma öncesinde tüm hayvanların rutin antiparaziter tedavileri ve aşılamaları yapıldı. Koyunlar sabah erken saatlerde merada otlatılırken, geceleri ise ağılda tutuldu. Mera otlatmasına ek olarak günde 300 gr/baş karma yem ve ad libitum olarak su verildi.

4.2. Hayvan materyali ve çalışma düzeni

Çalışmada, çiftlikte barındırılan Zom ırkı koyunlar hayvan materyali olarak seçilmiştir. Çalışmaya klinik ve reproduktif olarak sağlıklı, vücut kondüsyonu iyi olan ve en az bir doğum yapmış koyunlar dahil edildi. Çiftlik kayıtları incelendikten, klinik ve reproduktif muayeleri yapıldıktan sonra çalışmaya dahil edilme şartlarına uygun olduğu belirlenen 35 koyunla çalışmaya başlandı. Bir örnekliğin ve gebeliğin sağlanması için çalışmaya dahil edilen koyunlar senkronizasyon programına dahil edildiler. Senkronizasyon sonrasında, tohumlama öncesi yapılan muayenelerde koyunlardan bir tanesi servikal hemoraji, iki tanesi ise akut prulent vajinitis sebebiyle çalışmadan çıkarıldı ve bu nedenle çalışma 32 adet hayvan ile tamamlandı. Koyunlar, gebelik durumlarına göre; Grup I (n=16) gebe olan hayvanlardan ve Grup II (n=16) gebe olmayan hayvanlardan oluşturuldu.

4.2.1. Koyunların senkronizasyonu

Koyunlara uygulamaların başladığı üreme mevsimine göre senkronizasyon amacıyla 9 gün süreyle intravajinal sünger (60 mg medroksiprogesteron asetat, Esponjavel®, Hipra, İspanya) uygulandı. Süngerlerin çıkarılması sırasında tüm koyunlara aynı anda 400 IU PMSG (Gebe kısarak serum gonadotropini, Oviser®, Hipra, İspanya) ve 1 ml PGF_{2α} (Gestavet Prost®, 1 ml'de 75 µg Cloprostenol, Hipra, İspanya) kas içi uygulandı. İntravajinal süngerlerin uzaklaştırılması ve PMSG uygulamasını takiben

16. saatte fertilitesi bilinen koçlardan elektroejokulasyon yöntemi ile elde edilen 200×10^6 motil spermatozoon içeren taze sperma kullanılarak tüm hayvanlar aynı deneyimli veteriner hekim tarafından intraservikal olarak tohumlandı. Tohumlama günü 0. gün olarak kabul edildi. Çalışma sürecinde kontrolsüz çiftleşmelerin önüne geçebilmek için koçlar hem senkronizasyonlar süresince hem de tohumlar sonrasında 1 hafta süreyle sürüden ayrıldı.

4.2.2. Kan örneklerinin alınması

Tohumlama sonrası 0., 8., 12., 16., 20., 24., 28. ve 32. günlerde serum P4, MDA, SOD ve GP_X seviyelerinin belirlenmesi amacıyla vena jugularis'ten vakumlu jelli tüplere (BD Vacutainer®, BD, Türkiye) kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 3000 devir/dk'da 10 dakika süreyle santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve çıkarılan serumlar laboratuvar analizleri yapılncaya kadar derin dondurucu içerisinde (-18 °C) saklandı.

4.2.3. Progesteron ve oksidatif stres parametrelerinin ölçümü

Embriyonal dönemde yapılan ultrasonografik muayenelere ek olarak aynı muayene günlerinde koyunlardan alınan kanların serumları çıkarıldıktan sonra elde edilen serum örneklerinden P4, MDA, SOD ve GP_X değerlerinin belirlenmesi, hazır ticari enzim bağlantılı immünosorbent test (ELISA) kitleri ile kit kullanım kılavuzunda belirtilen prosedürler doğrultusunda tekniğine uygun olarak yapıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışılan biyokimyasal parametrelerin analiz yöntemleri

<i>KİT ADI</i>	<i>MARKA</i>	<i>CAT NO</i>	<i>YÖNTEM</i>	<i>KULLANILAN CİHAZ</i>
Progesteron	BT-lab	E0015Sh	ELISA	Microplate reader: BIO-TEK EL X 800- Aotu strip washer: BIO TEK EL X 50
Malondialdehit	Otto Scientific	Otto101	Kolorimetrik	REL BIOCHEM-REL ASSAY
Süperoksit Dismutaz	BT-lab	E0119Sh	ELISA	Microplate reader: BIO-TEK EL X 800- Aotu strip washer: BIO TEK EL X 50
Glutasyon Peroksidaz	BT-lab	E0132Sh	ELISA	Microplate reader: BIO-TEK EL X 800- Aotu strip washer: BIO TEK EL X 50

Progesteron analiz sonuçları, koyun P4 kiti (Sheep Progesterone Receptor, PGR ELISA Kit, BT Lab, Çin) ile değerlendirildi ve sonuçları ng/ml birimi olarak belirtildi. Bu kit, ELISA test kitidir. Önceden kaplanmış plakaya numune eklenir ve daha sonra biyotinlenmiş antijen eklenir. Numunelerdeki antijenler, yakalama antikoruyla bağlanmak ve inkübe etmek için biyotinlenmiş antijenle rekabet eder. Bağlanmamış antijen, bir yıkama ile uzaklaştırılır. Daha sonra bir avidin-HRP eklenir ve sonra inkübe edilir. Bağlanmamış avidin-HRP, yıkama ile uzaklaştırılır. Daha sonra TMB substrate eklenir ve renk oluşur. Asidik stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulur ve renk 450 nm'de ölçülebilen sarıya döner. Oluşan rengin yoğunluğu, numunedeki P4 konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Malondialdehit analizinde MDA seviyesi, 90-100 C°'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona dayalı bir yöntemle belirlendi. Ölçümler kolorimetrik yöntemle (Relassay, Rel Biochem-Rel Assay) yapıldı ve sonuçları µmol/L birimiyle ifade edildi. Tiyobarbitürik asit test reaksiyonunda, MDA veya MDA benzeri maddeler ve TBA, 532 nm'de maksimum absorpsiyon ile pembe bir pigment üretimi ile reaksiyona girer. Reaksiyon, pH 2-3'te 90 C°'de 15 dakika boyunca gerçekleştirildi. Numune, proteinin çökmesi için iki hacim soğuk %10 (a/h) trikloroasetik asit ile karıştırıldı. Çökelti santrifüjleme ile topak haline getirildi ve süpernatantan bir kısım eşit hacimde %0,67 (a/h) TBA ile 10 dakika kaynar su banyosunda reaksiyona sokuldu. Soğutulduktan sonra absorbans 532 nm'de okundu.

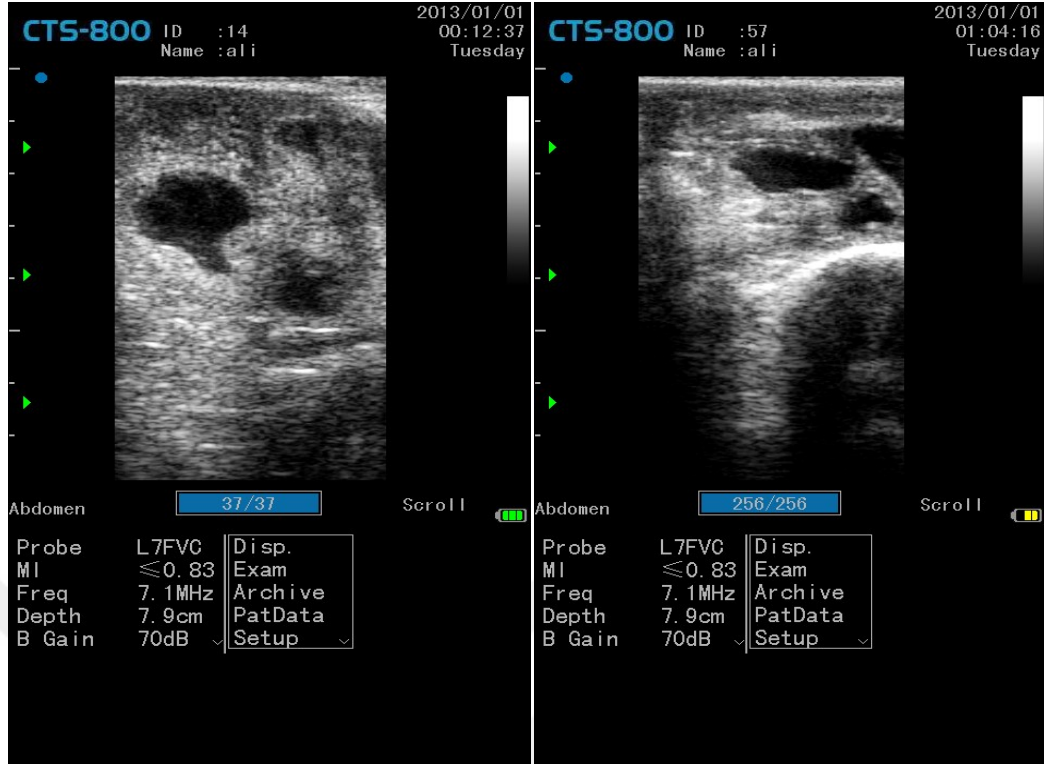
Glutasyon peroksidaz analizi için ELISA kiti kullanılmıştır. Plaka, koyun GP_X-1 antikoru ile önceden kaplanmıştır. Test sırasında numunede bulunan koyun GP_X-1 eklenir ve kuyucuklarda kaplanmış bu antikora bağlanır. Ardından biyotinlenmiş koyun GP_X-1 antikoru eklenir ve numunedeki koyun GP_X-1'e bağlanır. Sonraki adımda eklenen Streptavidin-HRP, biyotinlenmiş GP_X-1 antikoruyla bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırılır. Yıkama sonrasında substrat solüsyonu eklenir ve koyun GP_X-1 miktarıyla orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır ve 450 nm'de absorbans ölçülür.

Süperoksit dismutaz analizi için ELISA kiti kullanılmıştır. Plaka, koyun SOD antikoru ile önceden kaplanmışır. Test sırasında numunede bulunan koyun SOD'u eklenir ve kuyucuklarda kaplanmış antikorlara bağlanır. Ardından biyotinlenmiş koyun SOD antikoru eklenir ve numunedeki koyun SOD'ına bağlanır. Sonraki adımda eklenen Streptavidin-HRP, biyotinlenmiş SOD antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırılır. Yıkama sonrasında substrat solüsyonu eklenir ve koyun SOD miktarı ile orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır ve 450 nm'de absorbans ölçülür.

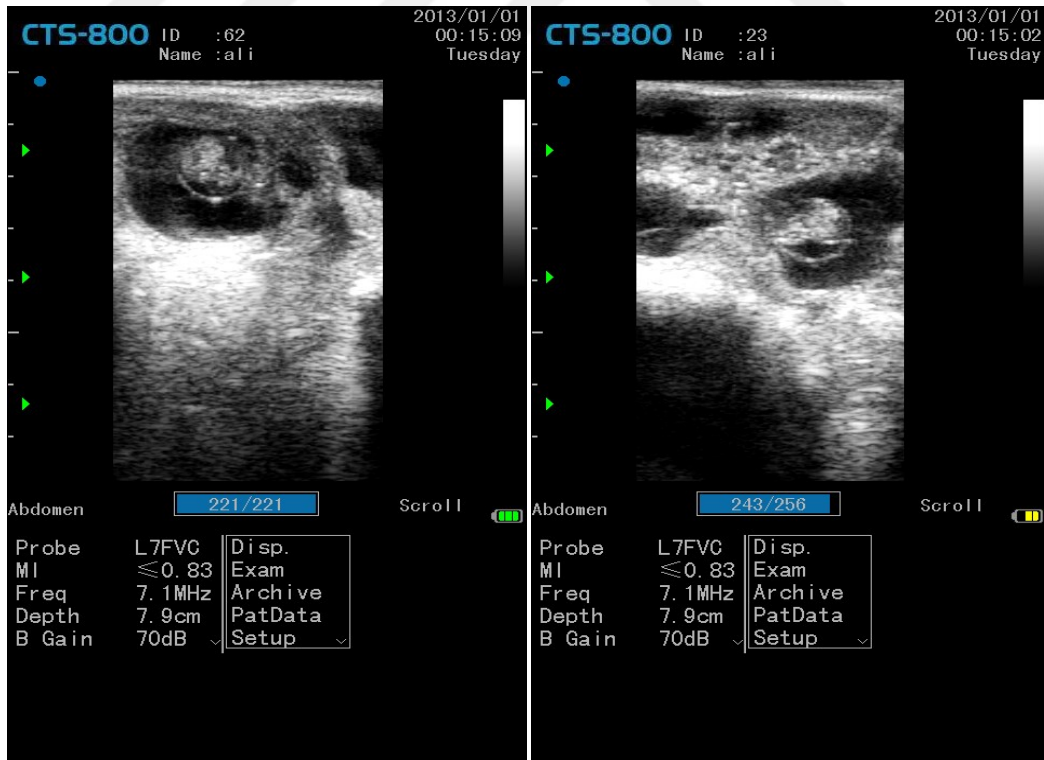
4.2.4. Ultrasonografik muayeneler ve görüntülerin elde edilmesi

Ultrasonografi ile uterus görüntülerinin alınması ve gebelik muayeneleri kan örneklerinin toplandığı 0., 8., 12., 16., 20., 24., 28. ve 32. günlerde, örneklemelerin hemen ardından gerçekleştirildi. İlk örnekleme (0. gün) suni tohumlama yapıldıktan sonra gerçekleştirildi. Ultrasonografik muayeneler transrektal olarak yapıldı. Muayene öncesi koyun sırtüstü pozisyona getirilerek arka bacaklar bir yardımcı tarafından geriye doğru uzatılarak tutuldu. Ardından lateks bir eldiven giyilerek kayganlaştırılan orta ve işaret parmak ile rektumdaki dışkılar boşaltıldı. Ultrasonografi probu, rektal muayene çubuğuna yerleştirildikten sonra, ultrasonografi jeli ile kayganlaştırılarak dikkatli bir şekilde rektuma girildi ve kraniale doğru 15-20 cm ilerletildi. Vezika üriyaryanın görülmesinin ardından prob, 90°-180° saat yönünde veya tersi yönde çevrilerek kornu uterilerin ultrasonografi görüntüleri alındı.

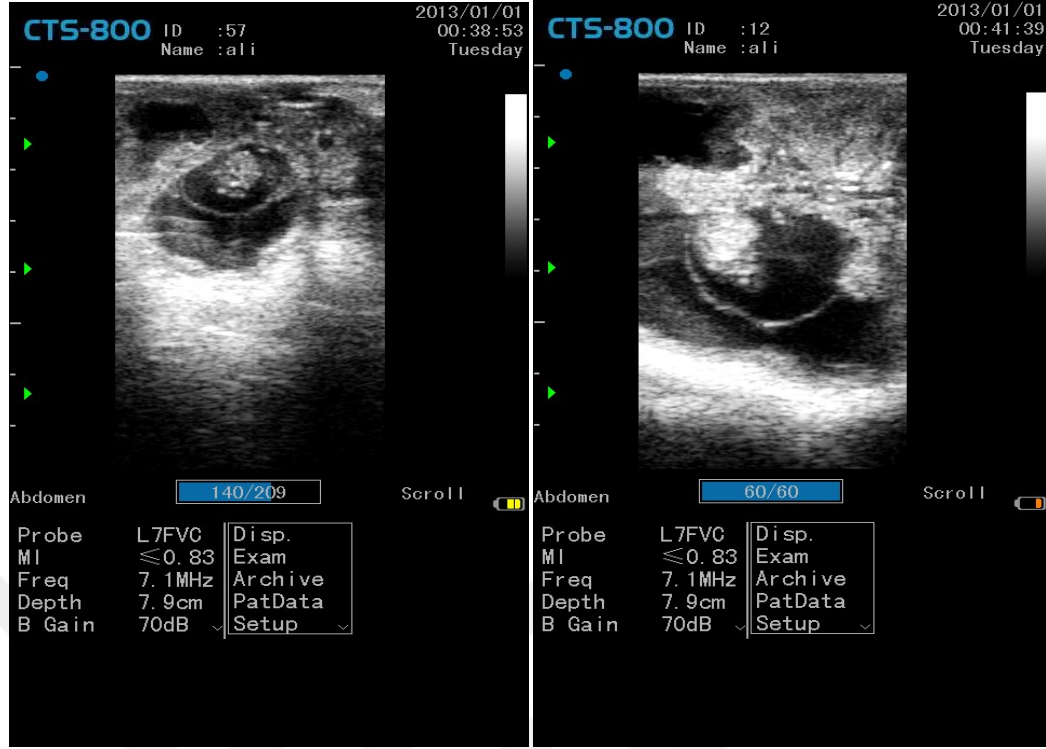
Ultrasonografik muayeneler 5-7,5 MHz prob donanımına sahip taşınabilir ultrasonografi cihazı (Lineer rektal prob, Hasvet 838® model, Hasvet, Türkiye) ile gerçekleştirildi ve uterus kesitlerine ait (Şekil 4,5,6) görüntüler BMP formatında kaydedilerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Bu görüntüler muayene günleri ve hayvanın küpe numarasını içerecek şekilde bilgisayara kaydedildi. Muayeneler sırasında ultrasonografi cihazına ait görüntü ayarlarının (parlaklık, karşıtlık, kazanç gibi), prob frekansının, inceleme derinliğinin ve koyunların pozisyonlarının bir örnek olmasına dikkat edildi.



Şekil 4. Çalışmada elde edilen 24 günlük gebeliklerin ultrasonografik görüntüsü



Şekil 5. Çalışmada elde edilen 28 günlük gebeliklerin ultrasonografik görüntüsü

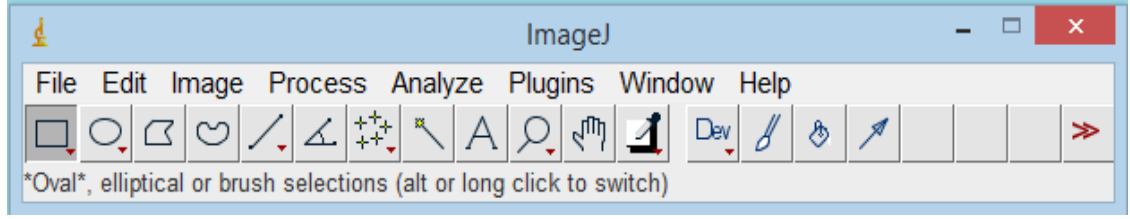


Şekil 6. Çalışmada elde edilen 32 günlük gebeliklerin ultrasonografik görüntüsü

4.2.5. Ekotekstür analizlerinin yapılması

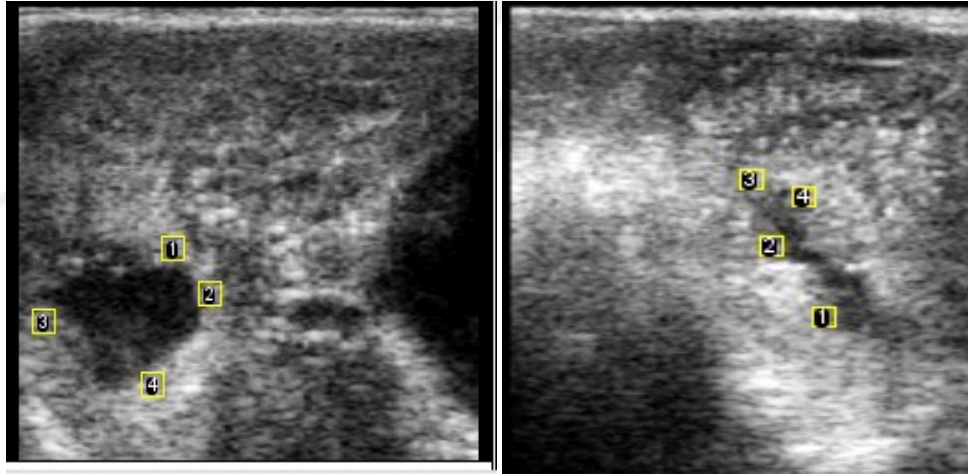
Ekotekstür parametrelerinin hesaplanması amacıyla bu alanda kabul görmüş olan medikal görüntü işleme ve analiz yazılımlarından ImageJ yazılımı (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) kullanıldı (Şekil 7). Ekotekstür parametrelerinden; MGL, CON, ENT ve HOM değerleri hesaplanarak değerlendirildi. Ekotekstür analizlerinin güvenilirliğini sağlamak adına cihazın görüntü ayarları bir örnek olacak şekilde kayıtlar gerçekleştirildi. Gebeliklerin doğrulanması ve gebe olmayanların belirlenmesi amacıyla suni tohumlama sonrası 45. günde transrektal ve transabdominal ultrasonografi ile gebelik kontrolleri yapıldı. Çalışmada ekotekstür analizleri için toplam 1024 görüntü ve 4096 ROI incelenmiştir.

Elde edilen ultrasonografik görüntüler “BMP” formatında kaydedilip daha sonra incelenmek üzere bilgisayara aktarıldı. ImageJ® yazılımı açıldıktan sonra ultrasonografik görüntüler “ImageJ>File>Open” yolu ile veya görüntünün uygulama üzerine sürüklenmesi ile yazılım içerisinde açılması sağlandı.



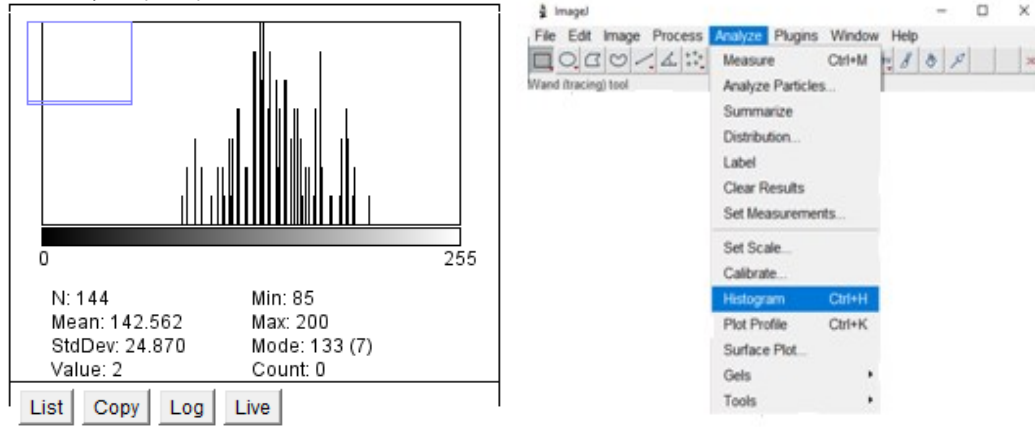
Şekil 7. ImageJ programı arayüzü

Program içerisinde “Analyze>Tools>ROI Manager” açıldı ve inceleme alanları oluşturmak için her görüntüde 4 (dört) adet ROI alanı uterusun endometriyum tabakasından seçilerek ROI Manager içinde “Add” kısmına basarak eklendi. Ultrasonografik görüntülerde ROI seçimi sadece endometriyum tabakasını alacak şekilde, embriyo veya uterusun diğer katlarını kapsamayacak şekilde ve artefakt olmayan bölümlerden seçilmesine dikkat edildi (Şekil 8). Seçilen ROI’ler 12x12 (w x h) olan 144 piksel sayısına (“count”) sahipti.



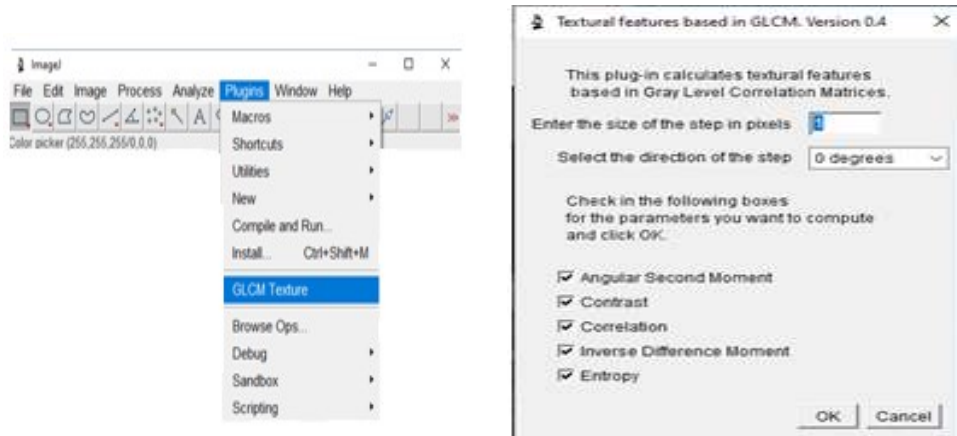
Şekil 8. İnceleme alanlarının (ROI) seçimi

İnceleme alanları belirlendikten sonra her bir ROI alanı için ayrı ayrı “ImageJ>Analyze>Histogram” yolu ile ve burada değerlendirilen piksel sayısı (“Count”), ortalama gri değer (“Mean”), histogram içerisinde bulunan gri değerlerin standart sapması (“StdDev”), en küçük gri değer (“Min”), en büyük gri değer (“Max”) ve gri değerlerin ortanca değeri/en çok tekrar edilen değer (“Mode”) gibi histogram değerleri program içerisinde bulundu (Şekil 9).



Şekil 9. Histogram analiz grafiği

Yine ImageJ programı içerisinde daha ileri kontrast ve homojenite tetkikleri için “GLCM texture plugins” eklentisi indirildi. Bu eklenti sadece 8-bit olan görüntülerde çalıştığı için incelenecek resimlerin 8 bit değişimi “ImageJ>Image>Type” ile gerçekleştirildi. Bu değişiklik gri beyaz olan ultrasonografik görüntülerde gözlenmemektedir. Bu değişen resim üzerindeki analizler yazılım içerisinde yer alan içerisinde “ImageJ>Plugins>GLCM Texture” yolu ile yapıldı. Tekstür analizinin içerisinde görüntü homojenitesi (“Angular Second Moment”), kontrast (“Contrast”), komşularına göre gri değer (“Correlation”), bölgesel homojenite (“Inverse Difference Moment”), entropi (“Entropy”) gibi değerler saptandı (Şekil 10).



Şekil 10. GLCM tekstür analizinde incelenen parametreler

Elde edilen tüm veriler gruplara ayrılarak koyun küpe numaralarına ve günlere göre ayrılacak şekilde MS Excel® yazılımına aktarıldı.

4.2.6. İstatistiksel değerlendirme

Kontrol günlerinde gruplar arasındaki P4, oksidatif stres parametreleri ve ekotekstür değerlerindeki farklılıkların değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi, incelenen parametreler için grupların zaman içinde değişimi olup olmadığını ayrı ayrı gözlemlemek için tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testi yapılmış Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. Progesteron, oksidatif stres parametreleri ve ekotekstür değerlerindeki günlere bağlı değişikliklerin arasındaki ilişki düzeyinin belirlenmesi için Pearson Korelasyon testi uygulanmıştır.



5. BULGULAR

Muayene günlerinde elde edilen P4 düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki değerlerde önemli düzeyde bir farklılık görülmemiştir ($P>0,05$). Progesteron düzeylerinin zamana bağlı değişimi incelendiğinde her iki grupta da 8. günde bir düşüş meydana geldiği ve sonrasında ise 16. günde en yüksek değerlerine ulaşarak 32. güne kadar kademeli olarak azaldığı belirlenmiştir. Grup I'de 8., 28. ve 32. günlerde elde edilen P4 düzeyi 20. güne oranla önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($P<0,05$). Benzer şekilde GII'deki 20. gün P4 değerleri 8. ve 32. günlere göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($P<0,05$) (Tablo 3).

Tablo 3. Uygulama günlerinde elde edilen progesteron değerleri

Gün	GI (ng/ml; x $\pm$ SE)	GII (ng/ml; x $\pm$ SE)	P değeri
0	2,31 $\pm$ 0,39	1,96 $\pm$ 0,41	ns
8	1,72 $\pm$ 0,23 ^b	1,78 $\pm$ 0,25 ^{bc}	ns
12	2,36 $\pm$ 0,40	2,17 $\pm$ 0,42	ns
16	3,3 $\pm$ 0,46 ^{ac}	3,35 $\pm$ 0,49 ^a	ns
20	3,10 $\pm$ 0,29 ^a	2,59 $\pm$ 0,31 ^{ac}	ns
24	2,46 $\pm$ 0,33	2,37 $\pm$ 0,35	ns
28	1,99 $\pm$ 0,27 ^{bc}	2,15 $\pm$ 0,28	ns
32	1,90 $\pm$ 0,25 ^{bc}	1,71 $\pm$ 0,26 ^{bd}	ns
P değeri	<0,05	<0,05	

* Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c}) muayene günleri elde edilen değerler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. ns: $P>0,05$

Muayene günlerindeki MDA verileri gruplar arasında karşılaştırıldığında, 8. günde önemli düzeyde farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Sekizinci gün dışında diğer tüm muayene günlerinde gruplar arasında herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0,05$). Zamana bağlı MDA değerlerinin değişimi incelendiğinde 16. günde GI ve GII'de sırasıyla 35,77 $\pm$ 5,81 ve 33,78 $\pm$ 5,63 değerleriyle en yüksek seviyesine ulaşmış ve 24. güne kadar azalarak ilerlemiştir. Ancak 28. ve 32. günlerde değerlerde dramatik bir düşüş gerçekleşmiş ve diğer günlerden önemli düzeyde farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$) (Tablo 4).

Tablo 4. Uygulama günlerinde elde edilen malondialdehit değerleri

Gün	GI (nmol/L; x ± SE)	GII (nmol/L; x ± SE)	P değeri
0	26,58 ± 4,00 ^{ac}	26,74 ± 3,87 ^{ac}	ns
8	32,49 ± 3,76 ^a	21,37 ± 3,64 ^{bc}	<0,05
12	35,77 ± 5,81 ^a	33,78 ± 5,63 ^{ac}	ns
16	39,87 ± 4,02 ^a	42,21 ± 3,89 ^a	ns
20	38,16 ± 4,26 ^a	37,90 ± 4,12 ^{ac}	ns
24	29,34 ± 4,74 ^{ac}	31,64 ± 4,59 ^{ac}	ns
28	5,44 ± 2,21 ^b	8,37 ± 2,14 ^b	ns
32	10,65 ± 2,64 ^{bc}	6,09 ± 2,56 ^b	ns
P değeri	<0,05	<0,05	

*Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c})muayene günleri elde edilen değerler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. ns: P>0,05

Muayene günlerindeki SOD değerleri, gruplar arasında karşılaştırıldığında, tüm muayene günlerinde gruplar arasında önemli düzeyde bir farklılık tespit edilmemiştir (P>0,05). Grup içi değerler karşılaştırıldığında ise; her iki grupta da 8. günde önemli düzeyde bir azalma meydana gelmiştir (P<0,05). En yüksek değerler ise her iki grupta da 0. günde elde edilmiştir. Takip eden muayene günlerinde 16. güne kadar 8. güne göre önemli düzeyde artışlar şekillenmiş (P<0,05), 20. gün sonrasında giderek düşerek 12. gündeki seviyelerine gerilemiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Uygulama günlerinde elde edilen süperoksit dismutaz değerleri

Gün	GI (ng/ml; x ± SE)	GII (ng/ml; x ± SE)	P değeri
0	24,95 ± 4,49 ^a	27,35 ± 4,49 ^a	ns
8	2,02 ± 0,55 ^b	2,68 ± 0,55 ^b	ns
12	6,97 ± 1,62 ^{bc}	3,93 ± 1,62 ^{bcd}	ns
16	21,48 ± 5,62 ^{ac}	23,54 ± 5,62 ^{ad}	ns
20	20,51 ± 6,00	24,28 ± 6,00 ^{ad}	ns
24	17,01 ± 5,46	19,40 ± 5,46	ns
28	8,12 ± 1,85 ^c	7,13 ± 1,85 ^{bc}	ns
32	6,94 ± 1,63 ^{bc}	5,27 ± 1,63 ^{bc}	ns
P değeri	<0,05	<0,05	

*Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c})muayene günleri elde edilen değerler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. ns: P>0,05

Glutasyon peroksidaz verileri gruplar arasında karşılaştırıldığında, tüm muayene günlerinde gruplar arasında elde edilen değerler bakımından bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0,05$). Grup içi değerler karşılaştırıldığında ise her iki grupta da 28. gündeki değerlerde diğer günlere göre önemli düzeyde azalmalar tespit edilmiştir ($P<0,05$). En yüksek değerler ise her iki grupta da 0. günde elde edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Uygulama günlerinde elde edilen glutasyon peroksidaz değerleri

Gün	GI (nU/ml; $\bar{x} \pm SE$)	GII (nU/ml; $\bar{x} \pm SE$)	P değeri
0	1152,22 $\pm$ 203,90 ^a	1297,67 $\pm$ 203,90 ^a	ns
8	973,82 $\pm$ 219,02 ^a	1057,12 $\pm$ 219,02 ^a	ns
12	858,40 $\pm$ 231,53	1139,58 $\pm$ 231,53 ^a	ns
16	736,62 $\pm$ 134,49 ^a	828,95 $\pm$ 134,49 ^a	ns
20	893,88 $\pm$ 236,36	1103,77 $\pm$ 236,36 ^a	ns
24	702,68 $\pm$ 231,51	942,96 $\pm$ 231,51 ^a	ns
28	272,51 $\pm$ 68,52 ^b	254,42 $\pm$ 68,52 ^b	ns
32	241,29 $\pm$ 51,14 ^b	181,41 $\pm$ 51,14 ^b	ns
P değeri	<0,05	<0,05	

*Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c})muayene günleri elde edilen değerler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. ns: $P>0,05$

Gruplar arasında ENT değerleri karşılaştırıldığında GI’de 28. ve 32. günlerde elde edilen sırasıyla 5,312 $\pm$ 0,05 ve 5,314 $\pm$ 0,05 değerleri GII’de aynı günlerde elde edilen 5,288 $\pm$ 0,005 ve 5,292 $\pm$ 0,005 değerlerine göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). Diğer muayene günlerinde ise önemli bir farklılık saptanmamıştır. ENT değerlerinin zamana bağlı değişimi incelendiğinde gebe hayvanların bulunduğu GI’de 8. günde elde edilen değerler embriyonik gelişim sürecinin sonuna doğru 24., 28. ve 32. günlerde elde edilen değerlere göre önemli düzeyde düşük bulunurken ($P<0,05$), GII’de muayene günleri arasında ENT değerleri bakımından önemli bir değişiklik belirlenmemiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Uygulama günlerinde elde edilen entropi değerleri

Gün	GI (x ± SE)	GII (x ± SE)	P değeri
0	5,297 ± 0,005 ^{acc}	5,299 ± 0,006	ns
8	5,269 ± 0,006 ^b	5,280 ± 0,006	ns
12	5,284 ± 0,005 ^{bc}	5,289 ± 0,006	ns
16	5,280 ± 0,005 ^{bc}	5,281 ± 0,006	ns
20	5,289 ± 0,005	5,291 ± 0,005	ns
24	5,301 ± 0,005 ^{acc}	5,293 ± 0,005	ns
28	5,312 ± 0,005 ^{ac}	5,288 ± 0,005	<0,05
32	5,314 ± 0,005 ^{ad}	5,292 ± 0,005	<0,05
P değeri	<0,05	ns	

*Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c})muayene günleri elde edilen değerler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. ns: P>0,05

Homojenite değerlerinin gruplar arasındaki ve zamana bağlı değişimi incelendiğinde herhangi bir fark bulunmamıştır (P>0,05), ancak GI'de 20. günden sonra belirgin bir düşüş gözlenmiş ve 32. güne kadar aynı seviyede seyretmiştir. GII değerleri ise dalgalı bir seyir göstermesine karşın 28. ve 32. günlerde GI'de elde edilen değer seviyelerine gerilemiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Uygulama günlerinde elde edilen homojenite değerleri

Gün	GI (x ± SE)	GII (x ± SE)	P değeri
0	0,161 ± 0,002	0,159 ± 0,002	ns
8	0,162 ± 0,003	0,163 ± 0,003	ns
12	0,160 ± 0,002	0,156 ± 0,002	ns
16	0,161 ± 0,002	0,163 ± 0,002	ns
20	0,164 ± 0,002	0,161 ± 0,002	ns
24	0,157 ± 0,002	0,161 ± 0,002	ns
28	0,157 ± 0,002	0,157 ± 0,002	ns
32	0,157 ± 0,002	0,158 ± 0,002	ns
P değeri	ns	ns	

*Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c})muayene günleri elde edilen değerler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. ns: P>0,05

Her iki grubunda CON değerleri incelendiğinde tohumlama günü olan 0. günde GI’de elde edilen değerlerin, GII’ye göre önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Zamana bağlı değişimler incelendiğinde ise GI 8. gündeki değerler diğer tüm muayene günlerine göre önemli düzeyde düşük olarak tespit edilmiştir ($P<0,05$). Benzer şekilde GI’de 0. gündeki değerler 24., 28. ve 32. gün değerlerine göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($P<0,05$). Buna karşın GII’de 16. gün değerleri 20. ve 32. gün değerlerine göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($P<0,05$) (Tablo 9).

Tablo 9. Uygulama günlerinde elde edilen kontrast değerleri

Gün	GI ($\bar{x} \pm SE$)	GII ($\bar{x} \pm SE$)	P değeri
0	101,71 $\pm$ 1,44 ^b	106,78 $\pm$ 1,43	<0,05
8	96,04 $\pm$ 1,71 ^c	102,68 $\pm$ 1,70	ns
12	105,32 $\pm$ 1,50 ^{ab}	109,28 $\pm$ 1,49 ^a	ns
16	105,31 $\pm$ 1,30 ^{ab}	102,76 $\pm$ 1,29 ^b	ns
20	106,74 $\pm$ 1,37 ^{ab}	109,12 $\pm$ 1,36 ^a	ns
24	108,34 $\pm$ 1,32 ^a	108,65 $\pm$ 1,31 ^a	ns
28	109,88 $\pm$ 1,34 ^a	108,07 $\pm$ 1,32	ns
32	109,68 $\pm$ 1,30 ^a	109,08 $\pm$ 1,29 ^a	ns
P değeri	<0,05	<0,05	

*Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c})muayene günleri elde edilen değerler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. ns: $P>0,05$

Tohumlama günü elde edilen MGL değerleri incelendiğinde GI’deki değerler GII’ye göre önemli düzeyde yüksek ($P<0,05$) iken 8. günde bu değerler GI’de GII’ye göre önemli düzeyde düşük olarak tespit edilmiştir ($P<0,05$). Ancak embriyonik dönemin sonunda 32. günde GI değerleri yeniden GII’ye göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). Zamana bağlı değişimler incelendiğinde ise her iki grup için de 8. günde önemli düzeyde düşün ($P<0,05$) MGL değerlerinin giderek artarak 32. günde en yüksek değerlerine ulaştığı tespit edilmiştir ($P<0,05$) (Tablo 10).

Tablo 10. Uygulama günlerinde elde edilen ortalama gri değerler

Gün	GI ($\bar{x} \pm SE$)	GII ($\bar{x} \pm SE$)	P değeri
0	141,11 $\pm$ 1,93 ^b	133,71 $\pm$ 1,88 ^b	<0,05
8	118,06 $\pm$ 1,68 ^d	124,27 $\pm$ 1,64 ^c	<0,05
12	124,81 $\pm$ 1,48 ^c	135,21 $\pm$ 1,44 ^{bd}	<0,05
16	124,91 $\pm$ 1,41 ^{cd}	123,11 $\pm$ 1,37 ^c	ns
20	121,39 $\pm$ 1,50 ^{cd}	133,37 $\pm$ 1,46 ^b	<0,05
24	149,83 $\pm$ 1,44 ^e	141,15 $\pm$ 1,40 ^{ad}	<0,05
28	140,77 $\pm$ 1,27 ^b	141,10 $\pm$ 1,23 ^a	<0,05
32	152,87 $\pm$ 1,61 ^{ac}	143,06 $\pm$ 1,57 ^a	<0,05
P değeri	<0,05	<0,05	

*Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c})muayene günleri elde edilen değerler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. ns: P>0,05

Her iki grupta da ekotekstür parametreleri P4, GP_X, MDA ve SOD değerleri arasındaki korelasyonlar incelendiğinde çeşitli parametreler arasında güçlü korelasyonlar olduğu saptanmıştır. GI’de GP_X ve MDA değerleri ekotekstür parametreleri ile güçlü korelasyon gösterirken, MGL değerleri P4, GP_X, MDA ve SOD değerleri ile önemli bir korelasyon göstermemiştir. Ayrıca GI’de SOD değerleri P4 değerleri ile güçlü bir pozitif korelasyon ($r=0,747$; $P=0,033$) gösterirken diğer parametrelerle önemli bir korelasyon saptanmamıştır (Tablo 11). GII’de ise özellikle araştırması yapılan GP_X, MDA ve SOD değerleri ile ekotekstür parametreleri arasında herhangi bir önemli korelasyon saptanmamıştır (Tablo 12).

Grup I’de CON ve GP_X arasında negatif yönlü güçlü bir korelasyon ($r=-0,750$; $P=0,032$) saptanmıştır. Değerlerin birbirleri üzerine açıkladıkları varyans ise %56,25 yani CON değerlerindeki değişimin %56,25’inin GP_X kaynaklı olabileceği tespit edilmiştir. Ekotekstür parametreleri ile incelenen oksidatif stres ile ilgili parametrelerle en güçlü korelasyon GI’de ENT ve MDA ($r=-0,829$; $P=0,011$) değerleri ile ENT ve MGL ($r= 0,883$) değerleri arasında tespit edilmiştir. Buna göre ENT ile MDA arasında negatif, ENT ve MGL arasında ise pozitif yönlü güçlü bir korelasyon bulunmaktadır. ENT ve MGL’nin birbirleri üzerlerine açıkladıkları

varyans ise %77,96 olup ENT değişimlerin %77,96'sı MDA değerlerindeki değişime bağlı olarak şekillenmektedir.

Tablo 11. Grup I'de ölçülen parametreler arası korelasyonlar

		CON	ENT	HOM	MGL	P4	GP _x	MDA	SOD
CON	<i>r</i>	1	0,796*	-0,610	0,605	0,209	-0,750*	-0,476	0,118
	<i>P</i>		0,018	0,108	0,112	0,620	0,032	0,233	0,780
ENT	<i>r</i>		1	-0,747*	0,883**	-0,259	-0,711*	-0,829*	0,039
	<i>P</i>			0,033	0,004	0,536	0,048	0,011	0,927
HOM	<i>r</i>			1	-0,833*	0,460	0,752*	0,744*	0,318
	<i>P</i>				0,010	0,251	0,031	0,034	0,443
MGL	<i>r</i>				1	-0,333	-0,554	-0,702	0,073
	<i>P</i>					0,420	0,155	0,052	0,863
P4	<i>r</i>					1	0,268	0,651	0,747*
	<i>P</i>						0,521	0,081	0,033
GP_x	<i>r</i>						1	0,764*	0,416
	<i>P</i>							0,027	0,305
MDA	<i>r</i>							1	0,380
	<i>P</i>								0,352
SOD	<i>r</i>								1
	<i>P</i>								

*Korelasyon $P < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır. ** Korelasyon $P < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 12. Grup II'de ölçülen parametreler arası korelasyonlar

		CON	ENT	HOM	MGL	P4	GP _x	MDA	SOD
CON	<i>r</i>	1	0,707*	-0,733*	0,867**	-0,300	-0,195	-0,220	-0,061
	<i>P</i>		0,050	0,039	0,005	0,471	0,643	0,601	0,886
ENT	<i>r</i>		1	-0,495	0,662	-0,338	0,124	-0,132	0,398
	<i>P</i>			0,212	0,074	0,413	0,770	0,756	0,328
HOM	<i>r</i>			1	-0,702	0,445	0,314	0,459	0,391
	<i>P</i>				0,052	0,269	0,448	0,252	0,338
MGL	<i>r</i>				1	-0,446	-0,519	-0,566	-0,193
	<i>P</i>					0,268	0,188	0,144	0,646
P4	<i>r</i>					1	0,160	0,744*	0,581
	<i>P</i>						0,704	0,034	0,131
GP_x	<i>r</i>						1	0,746*	0,449
	<i>P</i>							0,034	0,264
MDA	<i>r</i>							1	0,609
	<i>P</i>								0,109
SOD	<i>r</i>								1
	<i>P</i>								

*Korelasyon $P < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır. ** Korelasyon $P < 0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

6. TARTIŞMA

Oksidatif stres hem fizyolojik hem de patolojik olarak vücutta çeşitli etkilere sahiptir. Bu etkilerin ortaya çıkarılması amacıyla insan ve hayvanlar üzerinde birçok araştırma yapılmıştır ve oksidan-antioksidan dengesinin çeşitli durumlar karşısında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Örneğin; sağlıklı ineklerde östrüs siklusu süresince oksidan ve antioksidanlar arasında dinamik bir denge olduğu ve oksidanların arttığı durumlarda antioksidanlarda da bir artış meydana geldiği ve oksidatif hasarı engellediği ortaya çıkmıştır (179). Çetin ve ark. (180)'nın 10 ve 24 saat süreyle taşınan koyunlarda oksidatif stres parametrelerini değerlendirilmiş MDA, NO, SOD ve GP_X aktivitelerinin önemli düzeyde yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bu artışlar oksidan-antioksidan dengesinin sağlanmasına yönelik artışlardır. Bu durum hayvanların uzun süreli bir yerden bir yere taşınmasının oksijen kaynaklı serbest radikalleri ve birçok reaktif oksijen türlerini arttırdığını göstermiştir.

Oksidan-antioksidan arasındaki denge, laktasyonun dönemine göre de değişkenlik gösterebilmektedir. Nitekim gebe olmayan Saanen keçilerinde oksidatif stresin erken ve geç laktasyon dönemindeki seviyeleri incelendiğinde, geç laktasyon dönemindeki keçilerde total antioksidan kapasitesi (TAS) düzeylerinin erken laktasyon dönemine göre daha yüksek olduğu ve MDA düzeylerinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir. Muhtemel sebepler olarak ise postpartum stres ve kolostrum üretimi nedeniyle antioksidanların strese harcanması gösterilmiştir (181). Yine keçiler üzerinde yapılan başka bir çalışmada postpartum 0. günden itibaren SOD ve MDA seviyelerinde kademeli yükselmeler bulunmuş ve postpartum 6-7. günlerde en üst seviyelere ulaşmıştır. Glutasyon peroksidaz düzeyleri ise 21. güne kadar kademeli olarak artmıştır. Malondialdehit ve SOD miktarlarının artmasının olası nedeni olarak özellikle postpartum ilk hafta yetersiz gıda alımına bağlı yağ mobilizasyonu sonucu oluşan lipid peroksitler ve ROS gösterilmiştir (182).

Östrüs siklusu takip edildiğinde foliküler fazdaki ROS düzeyi ile lüteal fazdaki ROS düzeyleri karşılaştırıldığında lüteal fazda daha az düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni KL'un antioksidanlar tarafından korunmasıdır (65). Lüteolizis döneminde ise tam tersi olarak ROS düzeyi daha yüksek olup PGF_{2α}'yı

uyarıcı etki göstermektedir (68). Farklı bir çalışmada, koyunlarda gebelik süresince KL'daki antioksidan enzimlerin düzeyi incelendiğinde; SOD ve GP_x miktarları gebeliğin 15-40. günleri arasında önemli oranda artmıştır (87). Sunulan tez çalışmasında elde ettiğimiz verilerde ise SOD miktarı 16. güne kadar artarken sonrasında önemli düzeyde azalmış, GP_x düzeyleri yine benzer şekilde azalma eğiliminde olup, 28. günden sonra önemli düzeyde düşüş göstermiştir. Bazı etkenlerin ise vücutta oksidatif stres oluşturma olasılığı düşük bulunmuştur. Nitekim; koyun ve keçilerde beslenmenin vücutta oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada gebe koyun ve keçilerin MDA değerinde gözlenen artış ve SOD aktivitelerinde gözlenen azalma nedeniyle gebe olmayan gruplara göre gebelik sırasında daha fazla oksidatif stres riskine maruz kaldıkları kaydedilmiştir. Beslenme faktörü oksidatif streslerden biri olmasına rağmen gebelik faktörünün, hayvanların karşılaştığı en fazla oksidatif stresi oluşturduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda, diyetin beslenme seviyesindeki değişikliklerin, gebelik faktörü ile karşılaştırıldığında hayvanlar üzerinde çok az etkiye sahip olduğu görülmüştür (183). Başka bir çalışmada ise açlık durumunda antioksidan düzeyleri incelendiğinde; üç günlük açlık sonunda gebe olmayan koyunlarda; 1. gün SOD miktarında, 3. günde ise MDA oranında önemli oranda artış tespit edilmiş, CAT düzeyi 2. günde önemli oranda artış göstermiştir. Glutatyon peroksidaz miktarında ise önemli bir değişiklik gözlenmemiştir ve çalışma sonucunda eritrositlerin serbest radikaller karşısında savunulmasında etkili olan enzimin SOD yerine daha çok CAT olduğu tespit edilmiştir (184).

Reaktif oksijen türlerinin antioksidan enzimler tarafından kontrolü, redoks dengesinin, hücre fonksiyonlarının ve gelişen organizmaların hayatta kalması ile ilişkili sinyal yollarının korunmasında temel unsurlardan biridir. Gebeliğin oluşumu, embriyonik trofoektoderm ve endometriyum arasındaki hücreler arası iletişimi kuran sinyal moleküllerinin (ROS ürünleri vb.) bir ağı tarafından desteklenir. Bu nedenle, trofoektoderm ve endometriyumda antioksidan enzimler ve bu enzimlerin aktivitelerinin iyi anlaşılması gerek preimplantasyon gerekse de konseptus gelişimi açısından oldukça önem arz etmektedir (185-188). İmplantasyondan önce antioksidan enzim düzeyleri, tutunmanın gerçekleşmesi ve embriyo gelişimi açısından önemlidir. Gelişmekte olan konseptusun uterus içerisinde

ROS'un neden olduğu oksidatif hasardan korunması; aşırı ROS üretimini ve yüksek oranda reaktif ve toksik serbest radikallerin yayılmasını önleyen antioksidan sistemler tarafından sağlanabilir. Reaktif oksijen türlerinin antioksidanlar tarafından kontrol altında tutulması; proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis dahil hücreyel sinyal yollarının gelişiminde ve oksidatif stres açısından önemli olup embriyonik gelişimi değiştirebilirler (188-191). İmplantasyondan önce ve sonra embriyo ROS üretir ve salgılar. Artan ROS embriyonik gelişimin iki hücreli gelişim aşamasında durmasına neden olan blastosistteki apoptozisi uyarır (1). Farelerde implantasyondan gebeliğin 5. gününe kadar uterusda O_2^- seviyesi vasküler permeabilite artışından kaynaklı olarak yüksek seviyede tespit edilmiştir (43,81,192). Gebe farelerin NADPH'a bağlı O_2^- üretimi preimplantasyon dönemine göre gebelik sırasında artmaktadır (193,194). Bu dönemdeki embriyo ve uterustaki bu yüksek miktardaki ROS varlığı plasental hücre membranının zayıflatılması ve fertilize olmuş oositin implantasyonunu sağlayarak plasental besin maddelerinin ve makrofajların geçişi için önemli olan küçük kapılar ağların oluşumu ve membran geçirgenliğinin artması bakımından önemlidir (27).

Gebelik; yeterli fõtal gelişim ve büyümeyi sağlamak için gerekli olan yüksek enerji ihtiyaçlarının karşılanması gereken fizyolojik bir olaydır. Bu nedenle anne ve fõtus bu süreçte oksidatif strese maruz kalacaklardır (2,57). Yüzeysel implantasyonun başladığı 15-16. günler ile 18. gün arasında trofoblast hücreleri uterus bezlerine yüzeysel tarzda tutunarak embriyonun beslenmesinde rol oynar. Yapılan bir araştırmada, bu dönemde karunküler ve interkarunküler bölgelerin var olan oksidatif strese SOD aktivitesindeki artışla karşılık verdiği, buna karşılık MDA seviyelerinde ise herhangi bir farklılık oluşmadığı gözlenmiştir (195). Koyunlarda yapılan bir çalışmada ise; MDA konsantrasyonu gebe olmayan hayvanlarla karşılaştırıldığında erken, orta ve ileri gebe hayvanlarda pozitif yönde önemli ölçüde artarken SOD, CAT ve TAC konsantrasyonlarında tam tersine azalma gözlenmiştir. Malondialdehit düzeyindeki artışın sebebi olarak lipid peroksidasyonu artışı ve buna bağlı oluşan ROS ürünleri gösterilmektedir (196).

Gebe koyunlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada da MDA konsantrasyonu gebeliğin 21. gününde önemli düzeyde artmış ve 120. güne kadar daha az önemli

derecede artmaya devam etmiştir. Bu artışın olası sebebi olarak ovaryumlardaki yoğun steroidogenezis ve siklik aktiviteler gösterilmiştir (96). Abdel-Ghani ve ark. (222), keçilerde yaptıkları çalışmada gebelik döneminde serum MDA konsantrasyonunu yüksek bildirirken, Aköz ve ark. (223) keçilerde gebelik döneminde serum MDA konsantrasyonunu düşük bulmuşlardır. Gür ve ark. (97)'nin koyunlarda yaptıkları çalışmada ikiz yavru doğuran koyunlardaki MDA seviyesinin tek yavru doğuran ve gebe olmayanlarda önemli düzeyde yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Gürgöze ve Gökalp'in keçilerde yaptıkları çalışmada serum MDA düzeyleri arasında fark olmadığını bildirmişlerdir (224).

Sunulan tez çalışmasında elde edilen verilere göre ise; hem gebe hem de gebe olmayan grupta embriyonal dönem içinde suni tohumlamadan itibaren MDA miktarı düzenli bir şekilde artarak 16. günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Fakat 28. ve 32. günlerde değerlerde dramatik bir düşüş gerçekleşmiş ve diğer muayene günlerinden önemli düzeyde bir farklılık tespit edilmiştir. Benzer şekilde Aydın ve Köse (221)'de koyunlarda MDA düzeyinin, gebelik öncesi değerlere göre gebelik süresince ve doğumdan sonra önemli derecede azaldığını belirtmişlerdir. Süperoksit dismutaz değerleri ise tohumlama gününde yüksek tespit edilmiş bu değerlerin Jozwik ve ark. (64) tarafından bildirilen foliküler duvarın yırtıldığı ovülasyon dönemindeki O_2^- ve ilişkili metabolitlerin varlığına bağlı olarak şekillenmiş olabileceği değerlendirilmiştir. İlerleyen süreçte 8. günde düşen SOD seviyeleri 16. güne kadar artarken sonraki günlerde önemli düzeyde tekrar düşüş göstermiştir. Süperoksit dismutaz ve MDA arasında pozitif yönde zayıf korelasyon tespit edilmiştir. SOD ve MDA düzeylerinin embriyonal dönemdeki değişimlerinin paralellik göstermesi, MDA düzeyinin azalmasında SOD enziminin etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

Karadaş ve ark. (197)'nin yaptıkları tez çalışmasında, gebelik öncesi ve gebeliğin 1-3. Haftalarında birbirine yakın olan MDA düzeylerinin, gebeliğin 5-6. Ve 7-8. Haftalarında istatistiki önemde olmamakla birlikte düşme eğilimi gösterdiğini doğumdan sonraki 3-4. Haftalarda ise MDA düzeyinde önemli bir yükselmenin olduğunu belirlemiştir. Gebelik öncesi ve gebeliğin 1-3. Haftaları arasında SOD aktivitesi yönünden önemli düzeyde bir fark saptanmamıştır. Gebeliğin başlamasıyla

(1-3. Haftalar) SOD aktivitesinde hafif bir azalma görülmüş; en düşük değerler ise gebeliğin 5-6. ve 7-8. haftalarında saptanmıştır. Ayrıca SOD ve MDA arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Çalışma sonucunda gebelik döneminde hem serbest radikallerin hem de buna paralel olarak antioksidanların da arttığı tespit edilmiştir.

Erişir ve ark. (95)'nın yaptıkları bir çalışmada MDA konsantrasyonu, gebeliğin 2. ve 3. ayında diğer aylara göre ve gebe olmayanlara göre daha düşük bulunmuştur. GP_x seviyesi ise gebelik süresince önemli oranda artmıştır. En yüksek GP_x seviyeleri ise gebeliğin 2. ve 3. aylarında olmuştur. Malondialdehit düzeylerinde beklenen artışın gerçekleşmemesinin nedeni olarak bu aylarda görülen yüksek GP_x aktivitesi gösterilmiştir. Sunulan tez çalışmasında da bu veriyi destekler nitelikte gebeliğin ilk ayı sonunda MDA miktarında önemli düzeyde azalma görülmüştür. Ancak farklı olarak sunulan tez çalışmasında sadece 8. günde gebe ve gebe olmayan hayvanlar arasında önemli fark bulunurken, diğer muayene günlerinde benzer veriler elde edilmiştir. Glutasyon peroksidaz verileri karşılaştırıldığında ise bu çalışmadan farklı olarak MDA ile eş zamanlı önemli düzeyde azalma tespit edilmiştir. Malondialdehit ve GP_x arasında pozitif ve orta düzeyde bir korelasyon tespit edilmiştir.

Gerek oksidan gerekse de antioksidan düzeyleri gebelik süresince sabit kalmayıp sürekli dinamik bir değişim süreci geçirmektedir. Nitekim yapılan bir çalışmada, hamile kadınlarda MDA, CAT ve SOD düzeylerinde azalma, NO seviyeleri ve GP_x aktivitesinde ise artış tespit edilmiştir. Glutasyon peroksidaz hariç, hem peroksidasyon hem de antioksidan koruma gebelik süresince azalmıştır. Geç gebelikte artan GP_x aktivitesi, GP_x'in MDA düzeylerinin düşürülmesinde önemli rol oynadığını ve gebeliğin üçüncü trimesterinde oksidan ve antioksidan sistemler arasında dengeyi sağladığını göstermiştir (198). Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların yetersizliğinin olduğu durumlarda bu değerlerde de farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Nitekim gebe Tuj koyunlarında A vitamini ve β -karotenin enzimatik bir antioksidan olan GP_x aktivitesine etkisi araştırıldığında, A vitamininin etkisi yok iken β -karotenin destekleyici etkisi görülmüştür (199).

Koyunlarda oksidatif stresin gebeliğin farklı dönemlerinde incelendiği bir çalışmada, gebelik ilerledikçe TAS miktarı azalırken TOS seviyesi artmıştır. Total

oksidan seviyesinin azalmasının olası nedenleri olarak vitamin ve mineral eksikliği, ROS'un aşırı üretimi ve lipid peroksidasyonun uyarılması öngörülmüştür. Total oksidan seviyesi özellikle gebeliğin orta ve ileri safhalarında önemli artışlar göstermiştir. Çalışma sonuçlarına göre MDA miktarı gebe olmayanlara göre gebelerde daha yüksek gözlenmiş ve bu artış özellikle ileri gebelik döneminde daha fazla görülmüştür. Süperoksit dismutaz düzeyi, gebe olmayanlara göre gebelerde önemli derecede azalmıştır (183,197).

Süperoksit dismutaz ve P4 ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, erken gebelik döneminde, SOD aktivitesinin serum P4 düzeyine paralel olduğu bildirilmiş ve bu nedenle SOD aktivitesinin erken embriyonik gelişim için çok önemli olduğu rapor edilmiştir (84,200). Sunulan tez çalışmasında da benzer nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Her iki grupta da SOD ve P4 seviyelerinde aynı yönde ve eş zamanlı dalgalanmalar tespit edilmiş olup pozitif ve orta düzeyde bir korelasyon olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada ise; koyunlarda gebelik süresince leptin ve P4 düzeyi araştırıldığında, P4 düzeyinin gebeliğin 40. gününden itibaren yükselme gösterdiği, gebeliğin ortalarına doğru daha da arttığı ve özellikle gebeliğin son dönemlerinde pik düzeylere ulaştığı belirtilmiştir (201). Benzer P4 değerleri başka araştırmalarda da ortaya çıkmıştır (202,203).

Sunulan tez çalışmasında ise; hem gebe hem de olmayan koyunlarda P4 değerleri 20. günden 32. güne kadar önemli düzeyde azalma eğiliminde olmuştur. Bu farklılığın olası nedeni olarak, koyunlarda östrojen ve P4 salgılanmasındaki geçici değişiklikler gösterilebilir. Nitekim, P4 reseptörleri gebe koyunlarda endometriyumun luminal epitelyum hücrelerinde 11-13. günlerden sonra kesilmektedir (19). Koyunlarda siklus sırasında P4 seviyeleri 13. günde 1,8 ng/ml'ye ulaştıktan sonra 15. gün civarında ikinci bir pik yapmaktadır. Gebe koyunlarda P4 seviyeleri ise benzer bir seyirle 20. gün civarında 4 ng/ml civarlarına ulaşır ve 20. günden 100. güne kadar düzenli olarak yükselerek 15-20 ng/ml seviyelerine ulaşır (219,220).

Sunulan tez çalışmasında P4 düzeyinin her iki grupta da 16. günde en yüksek düzeye ulaştığı belirlendi. Ancak daha önce gerçekleştirilen bazı çalışmalarda ise

siklusun yaklaşık 10-14. günleri arasında (204,205) P4'un en yüksek düzeyi olan 3-4 ng/ml'ye ulaştığı bildirilmektedir. Koyunlarda sıcaklık stresinde P4 düzeyinin, östrüs ve ovülasyonun etkilenmemesine karşın, özellikle yüksek sıcaklıklarda ($37 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$) KL'un fonksiyonunun etkilenmesi nedeniyle düşebileceği belirtilmektedir. Progesteron seviyesinde yaşanan bu düşüşün nedeni olarak KL'un prematüre regresyonu olduğu düşünülmektedir (206). Sunulan tez çalışmasında elde edilen nispeten düşük P4 düzeylerinin çalışmada tohumlamaların ve embriyonik gelişim döneminin içinde yer aldığı Temmuz ve Ağustos aylarında bildirilen yoğun sıcaklık stresine (207) bağlı lüteal fonksiyonların etkilenmesi sonucu olabileceği değerlendirilmiştir.

Günümüzde küçükbaş hayvanlarda farklı gebelik dönemlerinde uterustaki ekotekstürel değişiklikler ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (174,182,204). Bu tez çalışmasında, fizyolojik sürece uygun devam eden erken gebelik döneminde, oksidatif stresin yanı sıra eş zamanlı olarak bu dönemdeki endometriyal görüntü analizleri de değerlendirilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda hem gebe ve gebe olmayanlar arasında hem de gebeliğin farklı dönemlerinde uterusun ekotekstür parametrelerinde bazen benzer bazen ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin; yapılan bir çalışmada gri değerler, gebe ve gebe olmayan inekler arasında 9. ve 11. günlerde endometriyum verileri bakımından önemli düzeyde farklı olarak bulunurken endometriyumun homojenitesi bakımından ise 3. ve 7. günler arasında farklılığın önemli olduğu ortaya konmuştur (137). Siklustaki hayvanlar ile gebe hayvanlar arasındaki farklılık endometriyumun homojenitesinin verileriyle de ortaya konabilmiştir. Keçilerde (174) ve inekte (171,208) çiftleşme veya suni tohumlama sonrasında uterus dokusunun MGL değerlerinde bir artış olduğu gösterilmiş ve bunun inflamasyonla ilişkili olduğu varsayılmıştır (9,171). Yapılan tez çalışmasında ise; MGL 16. gün dışında embriyonal dönem boyunca gebe ve gebe olmayan gruplar arasında önemli düzeyde farklı bulunurken, homojenite değerleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Nitekim farklı bir çalışmada da; koyunda siklus günlerinde ve gebeliği izlenen hayvanların gebeliğin ilk 17 gününde elde edilen uterus görüntülerindeki MGL değerleri arasında önemli fark belirlenmiş olup, östrüsten sonra hayvanlarda MGL

değerleri siklik hayvanlarda, hem tüm günlerde hem de ortalama olarak gebelik şekillenen hayvanlardan daha yüksek bulunmuştur (204). Ancak, sunulan tez çalışmasında farklı olarak gebe grubun MGL değerleri daha yüksek bulunmuş ve her iki grupta da artış eğiliminde olmuştur. Bu farklılığın olası sebebi olarak hormonal ve vasküler etkiler olabileceği öngörülmüştür. Bu sonuçlarımızı destekler nitelikte başka bir çalışmada da gri değerlerin değişimi, gebe ve gebe olmayan hayvanlarda karşılaştırıldığında ortalama gri değer bakımından önemli ölçüde bir farklılık olduğu gözlenmiştir. Östrojen ve progesteron hormonları endometriyal ödeme neden olarak dokuya daha hipoekojenik bir özellik kazandırır ve buna bağlı olarak da ortalama gri değerde azalma meydana gelebilir (139). Bu tez çalışmasında 16-20. günler arasındaki gri değer kaybının ardından yeniden artış olmasının nedeninin hormonal değişimlere bağlı vezikül artışı ve intraluminal protein düzeylerindeki artış kaynaklı olabileceği öngörülmüştür. Nitekim, birçok hayvanda bu MGL dalgalanmaları gözlenmiştir (209-211). Benzer şekilde, Schmauder ve ark. (140) inekte yaptıkları bir araştırmada östrüs siklusunun gününe bağlı olarak MGL değerlerinde önemli farklılıklar tespit etmişlerdir. Koyunlarda da aynı durum söz konusudur. Yani uterus, siklusun farklı dönemlerinde kandaki değişimlere bağlı olarak farklı histolojik özellikler göstermektedir (36). Kanda meydana gelen bu değişikliklere bağlı olarak uterusun ultrasonografik görüntülerinde de değişiklik meydana getirebileceği düşünülebilir. Nitekim; ovülasyon öncesi ve sonrasındaki ekotekstür parametreleri arasında önemli farklar olduğu, ovülasyondan sonra ekotekstürde artış (208) veya azalmalar (212) meydana geldiği farklı yayınlarda ileri sürülmüştür.

Östrüs siklusu süresince endometriyumdaki ödemde değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Ödem gelişimi sırasında hücre içi boşlukta sıvı artışı şekillenmekte ve sıvının hipoekoik özelliğinden dolayı, endometriyumun ekojenitesinde bir azalma meydana gelmektedir (213). Ginther (214)'in çalışmasında da bu histomorfolojik durumun ekotekstür analizleri sonucunda ovülasyon sonrası yüksek ortalama gri değer ve düşük homojenite değerleri elde edilmiştir.

Saanen keçileri üzerinde yapılan bir çalışmada homojenite değeri çiftleşme zamanında en yüksek değere, çiftleşmeden 30 gün sonra ise en düşük değere ulaşmıştır. Homojenite değeri, senkronize edilen keçilerde, doğal çiftleşen keçilere

göre daha yüksek bir değere ulaşmıştır (174). Yapılan tez çalışmasında da bu sonucu destekler nitelikte, embriyonal dönem boyunca HOM değeri azalma eğiliminde olmuştur. Yine sığırdaki yapılan bir çalışmada, MGL ve HOM değerleri incelendiğinde ovülasyon gününde ve siklusun 1-3 günleri arasında düşük MGL ve yüksek HOM değeri elde edilmiştir. En yüksek HOM değeri siklusun 2. gününde elde edilmiş olup MGL değeri ise siklusun 4-13 günleri arasında artmıştır (140). Mevcut sonuçlar doğrultusunda MGL ve HOM değerleri birbirine paralel sonuçlar ortaya koymuştur.

Siklik ineklerde uterus dokusundaki ortalama gri değer 0-4. günlerde azalmakta, 4-18. günlerde artmakta ve 18-21. günlerde ise azalmaktadır (215). Bu muhtemelen steroid hormonların değişen etkisi ve östrüs siklusu esnasında değişen derecelerde doku ödemi ve proliferasyonu ile ilgilidir. Düvelerde KL ve uterus ekotekstürü üzerine yapılan bir çalışmada; gebe düvelerin uterus kontrast değeri, siklik düvelerden önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur (141). Başka bir çalışmada da östrüs ve metöstrüs dönemlerine göre diöstrüs dönemi süresince, ultrasonografik görüntülerin ekotekstürü daha koyu ve daha homojen olduğu tespit edilmiştir (5). Ancak yapılan tez çalışmasında gebe ve gebe olmayan koyunlarda kontrast değerleri arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir. Bu sonucun olası nedeni olarak, düvelerde daha büyük lüteal hücrelerin olması ve proöstrüs ve metöstrüs dönemlerindeki daha fazla stromal bileşiklerin (vasküler yapı, bağ doku, endometriyum epiteli, sekretuar hücreler vb.) varlığından kaynaklı olabileceği öngörülmüştür.

Erken gebelik döneminde endometriyumun incelendiği bir çalışmada, gebeliğin 11. gününde gri değerlerde belirgin bir düşüş, buna karşılık 11. gün ile 13. gün arasında ise istatistiksel açıdan önemli bir artış saptanmıştır. Homojenitede ise, gebe hayvanlarda 3. ve 9. günler arasında gebe olmayanlara göre değerlerin daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. Bu yükselmenin nedeni olarak 4-5. günlerde uterusu giriş yapan ve endometriyal ödeme neden olan konseptusa bağlı olarak gerçekleştiği belirtilmiştir (137). Sunulan tez çalışmasında da bu sonuca benzer şekilde 8-12. günler arasında gri değerlerde önemli düzeyde artış olmuş ancak homojenite değerlerinde önemli bir farklılık oluşmamıştır. Bu durum, fizyolojik süreçte HOM parametrelerinde önemli bir değişikliğin meydana gelmediği sonucunu

doğurmaktadır. Nitekim, endometritisli ineklerde sağaltım öncesi ve sonrası iyileşme döneminde, homojenite parametrelerinde farklı sonuçlar elde edilmesi (6) ve uterus involüsyonu normal süreçte tamamlanan ve involüsyonu geciken hayvanlarla karşılaştırıldığında homojenite değeri bakımından farklı sonuçlar elde edilmesi (172) bu sonucu desteklemektedir.

Köpeklerde ovaryum ekotekstürü ile serum P4 düzeyi arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik bir çalışmada, serum P4 düzeyi foliküler evrede MGL ile pozitif korelasyon göstermiştir ve ovaryum ekotekstürü ile östrüs dönemleri arasında sayısal olarak sunulabilen bir ilişki olduğu belirtilmiştir (216). Sığırdaki endometriyum ve cervix uterinin ekotekstür incelemelerinde benzer şekilde MGL ve CON değeri ile P4 arasında pozitif, HOM ve P4 arasında ise negatif korelasyon tespit edilmiştir (137,217). Kısırakta yapılan çalışmalarda da aynı yönde sonuçlar tespit edilmiştir (210). Ancak sunulan tez çalışmasında P4 ve MGL arasında negatif yönlü ve önemli olmayan bir korelasyon saptanmıştır. Bu farklı sonucun olası nedenleri olarak hormon değeriindeki farklılıklar ve uterus dokusunun anatomik ve histolojik farklılıkları öngörülmüştür. Koyun ve inekte endometriyum, östrüs siklusu boyunca KL'dan salınan P4'a bağılı olarak yapısal ve fonksiyonel değışikliklere maruz kalmaktadır. Özellikle P4 düzeyinin çok düşük olduğu siklusun 18. gününde hem karunküler hem de interkarunküler bölgede SOD artışının şekillenmekte olduğu ve ikisi arasında bir ilişki olabileceğı bildirilmiştir (195). Ancak, bu tez çalışmasında elde edilen veriler, erken gebelik döneminden embriyonik dönem sonuna kadar P4 ile GPx arasında herhangi bir korelasyon olmadığını göstermektedir.

Keçi üzerinde postpartum dönemde yapılan bir çalışma sonucunda, endometriyumun ortalama gri değeri ile SOD, GPx ve MDA seviyeleri arasında anlamlı korelasyonlar olduğu görülmüş ve antioksidan biyobelirteçlerdeki önemli artışlar nedeniyle doğum sonrası keçilerde özellikle ilk hafta boyunca oksidatif stresin varlığını işaret edebileceğı belirtilmiştir (182). Bu tez çalışmasında ise; gebe olmayan grupta ekotekstür parametreleri ile SOD, GPx ve MDA parametreleri arasında önemli bir korelasyon görülmezken, gebe olan grupta GPx ve MDA parametreleri ile ekotekstür parametreleri arasında güçlü bir korelasyon tespit

edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda embriyonal dönemde de oksidatif stresin varlığını işaret eden bulgular elde edilmiştir.

Entropi değerleri üzerine yapılan çalışmalarda (144,178,218) gerek gebelik dönemleri arasında (218), gerek benign ve malign tümörler karşılaştırıldığında (178) gerekse de abort sonrası uterus ekotekstürü incelendiğinde (144) herhangi bir farklılık elde edilmemiştir. Sunulan tez çalışmasında ise her ne kadar embriyonal dönemin 28. gününe kadar önemli bir değişiklik olmasa da 28-32. günler arasında gebe ve gebe olmayan gruplar arasında önemli düzeyde bir farklılık elde edilmiştir. Belirtilen günlerde HOM ve CON değerleri önemli düzeyde farklılık göstermezken, bölgesel heterojeniteyi ifade eden ENT değerlerinin farklılık göstermesi gebe hayvanlarda ayırıcı bir parametre olabileceğini düşündürmüştür.

Yapılan çalışmalarda, CON değerlerinin endometritisli ineklerde (9), suni tohumlama sonrası 16-21. günlerde gebe ineklerde (171) ve keçilerde de gebeliğin ilerleyen döneminde (174) arttığı gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında da bu sonuçlara benzer şekilde, her iki grupta da embriyonal dönem süresince CON değerlerinde özellikle 8. günden sonraki süreçte artışlar gözlenmiştir.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirildiğinde oksidatif stres belirteçleri yönünden gruplar arasında önemli bir farklılığın bulunmadığı, hatching'in gerçekleştiği 8. günde lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA değerlerinde gebe koyunlarda yüksek değerlerin elde edildiği tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak olmasa da embriyonik dönemin sonu olan 32. günde elde edilen MDA, SOD ve GPx değerlerinin gebelerde gebe olmayanlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Ekotekstür değerleri yönünden yapılan değerlendirmede ENT değerlerinin gebe hayvanlarda 28. ve 32. günlerde önemli düzeyde yüksek olduğu, CON ve MGL değerlerinin gebelerde hatching günü olan 8. günde önemli derecede düşük seyrettiği tespit edilmiştir. Suni tohumlama gününde (0. gün) MGL değerleri gebe koyunlarda gebe olmayanlardan daha yüksek belirlenmiştir. Bu değer azalarak 8. günde gebe olmayanlara göre önemli oranda düşük düzeyine gerilemiş ancak daha sonra artarak embriyonik dönemin sonunda yeniden yüksek değerlerine ulaşmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, gebe koyunlarda embriyonal dönemde MDA ve GPx'in ekotekstür parametreleri ile güçlü korelasyonlar gösterdiği ortaya çıkmıştır. Özellikle MDA ve GPx ile ENT arasında negatif yönlü güçlü bir korelasyon, HOM ile pozitif yönlü güçlü bir korelasyon tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, gebe koyunlarda ekotekstür analizleriyle oksidatif stresin tespit edilebileceği ve böylece embriyonal dönemin takibinde yardımcı bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca oksidatif stres, P4 üretimi ve dolayısıyla uterus ve ekotekstür parametreleri üzerine muhtemel etkisi olan sıcak stresinin etkilerini ortadan kaldırabilmek için daha optimal şartların, daha kaliteli yem/rasyona daha kolay ulaşabildiği üreme mevsimine geçiş döneminde çalışmalar yapılarak elde edilen verilerin bu çalışma verileri ile karşılaştırılması önerilmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Mutinati M, Piccinno M, Roncetti M, Campanile D, Rizzo A, Sciorsci RL. Oxidative stress during pregnancy in the sheep. *Reprod Dom Anim.* 2013; 48: 353–7.
2. Myatt L, Cui X. Oxidative stres in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122: 369–82.
3. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10: 1375–403.
4. Huber S, Medl M, Vesely M, Czembirek H, Zuna I, Delorme S. Ultrasonographic tissue characterization in monitoring tumor responset one adjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *J of Ultrasound in Med.* 2000; 19(10): 677-86.
5. Pierson RA, Adams GP. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bed fellows. *Theriogenology.* 1995; 43: 105–12.
6. Küçükaslan İ, Kaya D, Emre B, Bollwein H, Özyurtlu N, Mülazımoğlu SB ve ark. Evaluation of endometrial echotexture and cervical cytology in cows during and after treatment of endometritis. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 2014; 42(06): 343-50.
7. Siqueira LGB, Torres CAA, Amorim LS, Eliza DS, Camargo LSA, Fernandes CAC et al. Inter relationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 2009; 115: 18–28.
8. Scully S, Evans ACO, Carter F, Duffy P, Lonergan P, Crowe MA. Ultrasound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers. *Theriogenology.* 2015; 83(3): 449-58.
9. Polat B, Cengiz M, Cannazik O, Colak A, Oruc E, Altun S, ve ark. Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis. *Anim Reprod Sci.* 2015; 155: 50–5.

10. Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Medipres Yayınevi. Ankara. 2015, s: 107-120, 507-12.
11. Guillomot M, Michel C, Gaye P, Charlier N, Trojan J and Martal J. Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. Biol. Cell. 1990; 68: 205–11.
12. Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW and Spencer TE. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. Reproduction. 2002; 124: 289–300.
13. Guillomot M, Flechon JE, Leroy F. Blastocyst development and implantation. Reprod in Mammals and Man. 1993; 387–411.
14. Hassa O, Aşti RN. Embriyoloji. Yorum Matbaa Sanayi. 1997, 71.
15. Sarani SA, Ghaffari-Novin M, Warren MA, Dockery P, Cooke ID. Morphological evidence for the ‘implantation window’ in human luminal endometrium. Hum Reprod. 1999; 14: 3101-6.
16. Susan JK. Molecular interactions at the maternal- embryonic interface during the early phase of implantation. Sem Reprod Med. 2000; 18 (3): 237-53.
17. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. Front Biosci (Schol Ed). 2011; 3: 745–67.
18. Satterfield MC, Bazer F, Spencer TE. Progesterone regulation of pre-implantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. Biol Reprod. 2006; 75: 289–96.
19. Bazer FW. Uterine biology in pigs and sheep. J of Anim Sci and Biotech. 2012; 3: 23.
20. Spencer TE, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. Reprod Fertility and Dev. 2007a; 19: 65-78.
21. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC: Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. Soc Reprod Fertil Suppl. 2007b; 64: 379–96.

22. Spencer TE, Gray A, Johnson GA, Taylor KM, Gertler A, Gootwine E et al. Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. *Biol of Reprod.* 1999b; 61: 1409–18.
23. Afonso S, Romagnano L and Babiarz B. The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development.* 1997; 124: 3415–25.
24. Demir R. İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi. Palme Yayıncılık. Ankara. 1995, 179.
25. Welsh AO, Enders AE. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. *Am J Anat.* 1985; 172: 1-29.
26. Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2004; 51: 275– 82.
27. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygenspecies, oxidative stres and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42: 1634-50.
28. Singh U, Nicholson G, Urban BC, Sargent IL, Kishore U, Bernal AL. Immunological properties of human decidual macrophages a possible role in intra uterine immunity. *Reproduction.* 2005; 129: 631–7.
29. Gootwine E. Placental hormones and fetal placental development. *Anim Reprod Sci.* 2004; (82–83): 551–66.
30. Sammin D, Markey B, Bassett H, Buxton D. The ovine placenta and placentitis – A review. *Vet Microbiol.* 2009; 135: 90–7.
31. Wooding FBP. Current Topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta.* 1992; 13: 101–13.
32. Senger PL. *Pathways to Pregnancy and Parturition.* 1st Edition, Ephrata: The Mack Printing Group Science Press, 1999; 149-65.
33. Lee CS, Meeusen E, Gogolin-Ewens KJ, Brandon MR. Quantitative and qualitative changes in the intraepithelial lymphocyte population in the uterus of the non-pregnant and pregnant sheep. *Am J Reprod Immunol.* 1992; 28: 90–6.

34. Entrican G. Immune regulation during pregnancy and host– pathogen interactions in infectious abortion. *J Comp Pathol.* 2002; 126: 79–94.
35. Karaca T, Yörük M. Ruminant plasentalarının yapı ve fonksiyonu. *YYU Vet Fak Derg.* 2010; 21(3): 191–4.
36. Reynold LP, Redmer DA. Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* 1992; 47: 698-708.
37. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *MAE Vet Fak Derg.* 2016; 1(1): 65-76
38. Vinson J, Hsu C, Possanza C, Drack A, Pane D, Davis R et al. Lipid peroxidation and diabetic complications: effect of antioxidant vitamins C and E. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 366: 430-2.
39. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stres phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30(6): 620-50.
40. Değer Y, Ertekin A, Değer S, Mert H. Lipid peroxidation and antioxidant potential of sheep liver infected naturally with Distomatosis. *Turk Parazitol Derg.* 2008; 32 (1): 23-6.
41. Gonzalez-Fernandez R, Gaytan F, Martinez- Galisteo E, Porras P, Padilla CA, Sanchez Criado JE et al. Expression of glutaredoxin (thioltransferase) in the rat ovary during the oestrous cycle and postnatal development. *J Mol Endocrinol.* 2005; 34: 625–35.
42. Laloraya M, Pradeep KG, Laloraja MM. Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of rattus norvegicus and induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutoprin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 157: 146–53.
43. Pierce GB, Parchment RE, Lewellyn AL. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation.* 1991; 46: 181–6.
44. Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *EurAsia J Biochem.* 1998; 252(1) 1–15.
45. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000; 5: 415–8.
46. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie.* 2002; 84: 203–14.

47. Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, Sciorsci RL. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod Dom Anim.* 2012; 47: 344–52.
48. Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. *Free Radical in Biol and Med.* 1989; 86–123.
49. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109–42.
50. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 288(2): 481-7.
51. Inoue S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett.* 1995; 371(1): 86–8.
52. Marla SS, Lee J, Groves JT. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipids membranes. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94(26): 14243–8.
53. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 176-186.
54. Ayala A, Munoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 26(9): 1159-64.
55. Aslankoç R, Demirci D, İnan U, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü – süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx). *SDÜ Tıp Fak Derg,* 2019; 26(3): 362-9.
56. Cighetti G, Duca L, Bortone L, Sala S, Nava I, Fiorelli G, et al. Oxidative status and malondialdehyde in β -thalassaemia patients. *EurAsian J of Clin Invest.* 2002; 32: 55-60.
57. Al-Gubory KH, Garrel C, Fowler PA. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stres in sheep placentomes. *J Endocrinol.* 2010; 205: 107–16.
58. Johansen M, Redman CV, Wilkins T, Sargent IL. Trophoblast deportation in human pregnancy its relevance for pre-eclampsia, Placenta. 1999; 20: 531-9.
59. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed, Oxford University Pres, Newyork; 1999, p: 246-351.

60. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 1993; 23 (1): 21-48.
61. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44–84.
62. Tropea A, Miceli F, Minici F, Tiberi F, Orlando M, Gangale MF et al. Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis and release by human luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 2303–9.
63. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta.* 1995; 236: 173– 80.
64. Jozwik M, Wolczynski S, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5: 409–13.
65. Rizzo A, Minoia G, Trisolini C, Mutinati M, Spedicato M, Jirillo F et al. Reactive Oxygen Species (ROS): involvement in bovine follicular cysts etiopathogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009a; 31: 631– 5.
66. Sugino N. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Anim Sci J.* 2006; 77: 556–65.
67. Rizzo A, Roscino MT, Minoia G, Trisolini C, Spedicato M, Mutinati M et al. Serum levels of reactive oxygen species (ROS) in the bitch. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009b; 31: 310–3.
68. Tanaka M, Miyazaki T, Taniguchi S, Kasai K, Minigishi K, Miyakoshi K et al. Participation of reactive oxygen species in PgF2a-induced apoptosis in rat luteal cells. *J Reprod Fertil.* 2000; 120: 239–45.
69. Endo T, Aten RF, Leykin HR, Behrman HR. Hydrogen peroxide evokes antisteroidogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76: 337–42.
70. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007; 19: 65–78.

71. Spencer TE, Bazer FW. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci.* 2004; 82: 4–13.
72. Igwebuike UM. A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Anim Reprod Sci.* 2009; 112: 1-7.
73. Jenkins C, Wilson R, Roberts J, Miller H, McKillop JH, Walker JJ. Antioxidants: their role in pregnancy and miscarriage. *Antioxid Redox Signal.* 2000; 2: 623–8.
74. Donnay I, Knoop B. Peroxiredoxins in gametogenesis and embryo development. *Subcell Biochem.* 2007; 44: 345–55.
75. Brown GC. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J.* 1992; 284: 1–13.
76. Alcolea MP, Colom B, Llado I, Garcia-Palmer FJ, Gianotti M. Mitochondrial differentiation and oxidative phosphorylation system capacity in rat embryo during placentation period. *Reproduction.* 2007; 134: 147–54.
77. Myatt L. Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta.* 2010; 31: 66–9.
78. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition.* 1996; 12: 274–7.
79. O'Donovan DJ, Fernandes CJ. Free radicals and disease in premature infants. *Antioxid Redox Signal.* 2004; 6: 169–76.
80. Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Kossenjans W, Greer IA, Lyall F. Differential localization of superoxide dismutase isoforms in placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45: 1433–8.
81. Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development.* 1990; 109: 501–7.
82. Ryan KJ. Theoretical basis for endocrine control of gestation: a comparative approach. In: Pecile A, Finczi C (eds.), *Feto-Placental Unit*. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation; 1969: 120–31.

83. Al-Gubory KH, Ceballos-Picot I, Nicole A, Bolifraud P, Germain G, Michaud M, et al. Changes in activities of superoxide dismutase, nitric oxide synthase, glutathione-dependent enzymes and the incidence of apoptosis in sheep corpus luteum during the estrous cycle. *Biochem Biophys Acta*. 2005; 1725 (3): 348–57.
84. Rueda BR, Tilly KI, Hansen TR, Hoyer PB, Tilly JL. Expression of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the bovine corpus luteum: evidence supporting a role for oxidative stress in luteolysis. *Endocrine*. 1995; 3: 227–32.
85. Sugino N, Nakamura Y, Takeda O, Ishimatsu M, Kato H. Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J Reprod Fertil*. 1993; 97: 347–51.
86. Al-Gubory KH, Huet JC, Pernollet JC, Martal J, Locatelli A. Corpus luteum derived copper, zinc dismutase serves as a luteinizing hormone-release inhibiting factor in sheep. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 199 (1-2): 1–9.
87. Al-Gubory KH, Bolifraud P, Germain G, Nicole A, Ceballos-Picot I. Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Reproduction*. 2004; 128 (6): 767–74.
88. Chew BP, Holpuch DM, O’Fallon JV. Vitamin A and beta-carotene in bovine and porcine plasma, liver, corpora lutea and follicular fluid. *J Dairy Sci*. 1984; 67: 1316–22.
89. Petroff BK, Dabrowski K, Ciereszko RE, Ottobre JS. Total ascorbate and dehydroascorbate concentrations in porcine ovarian stroma, follicles and corpora lutea throughout the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*. 1997; 47: 1265–73.
90. Talavera F, Chew BP. Comparative role of retinol, retinoic acid and beta-carotene on progesterone secretion by pig corpus luteum in vitro. *J Reprod Fertil*. 1988; 82(2): 611–5.
91. Young FM, Luderer WB, Rodgers RJ. The antioxidant beta-carotene prevents covalent cross-linking between cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and its electron donor, adrenodoxin, in bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1995; 109: 113–8.

92. Aurousseau B, Durand D, Gruffat D. Contrôle des phénomènes oxydatifs pendant la gestation chez les monogastriques et les ruminants. *Inra Prod Anim.* 2004; 17: 339–54.
93. Guillomot M, Flechon JE, Leroy E. Développement et implantation du blastocyste. In: Thibaut C, Levasseur MC (eds), *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Edition Marketing. 1991; 379–402.
94. Aurousseau B, Durand D, Gruffat D. Gestation linked radical oxygen species fluxes and vitamins and trace mineral deficiencies in the ruminant. *Reprod Nutr Dev.* 2006; 46: 601–20.
95. Erişir M, Benzer F, Kandemir FM. Changes in the rate of lipid peroxidation in plasma and selected blood antioxidants before and during pregnancy in ewes. *Acta Vet Brno.* 2009; 78: 237–42.
96. Mohebbi-Fani M, Mirzaei A, Nazifi S, Shabbooei Z. Changes of vitamins A, E, and C and lipid peroxidation status of breeding and pregnant sheep during dry seasons on medium-to-low quality forages. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44: 259–65.
97. Gür S, Türk G, Demirci E, Yüce A, Sönmez M, Özer S, Aksu EH. Effect of pregnancy and foetal number on diameter of corpus luteum, maternal progesterone concentration and oxidant/antioxidant balance in ewes. *Reprod Dom Anim.* 2011; 46: 289–95.
98. Lebovitz HE. Diabetic ketoacidosis. *Lancet.* 1995; 345: 767–72.
99. Al-Qudah KM. Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40: 60–5.
100. Ford EJ, Evans J, Robenson I. Cortisol in pregnancy toxemia of sheep. *Br Vet J.* 1990; 146: 539–42.
101. Owiny JR, Gilbert RO, Wahl CH, Nathanielsz PW. Leukocytic invasion of the ovine cervix at parturition. *J Soc Gynecol Invest.* 1995; 2: 593–6.
102. Engelen E, Groot MW, Breeveld-Dwarkasing VNA, Everts ME, Weyden GC, Taverne MAM et al. Cervical ripening and parturition in cows are driven by a cascade of pro-inflammatory cytokines. *Reprod Dom Anim.* 2009; 44: 834–41.
103. Jenkin G, Young IR. Mechanism responsible for parturition; the use of experimental models. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82–83: 567–81.

- 104.** Dixit VD, Parvizi N. Pregnancy stimulates secretion of adrenocorticotropin and nitric oxide from peripheral bovine lymphocytes. *Biol Reprod.* 2001; 64: 242–8.
- 105.** Massman GA, Zhang J, Figueroa JP. Functional and molecular characterization of nitric oxide synthase in the endometrium and myometrium of pregnant sheep during the last third of gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 181: 116–25.
- 106.** Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1992; 13: 47–53.
- 107.** Watson AL, Skepper JN, Jauniaux E, Burton GJ. Changes in concentration, localization and activity of catalase within the human placenta during early gestation. *Placenta.* 1998; 19: 27-34.
- 108.** Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6: 84-96.
- 109.** Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus – a review. *Placenta.* 2003; 24: 86–93.
- 110.** Lista G, Castoldi F, Compagnoni G, Maggioni C, Corne'lissen G, Halberg F. Neonatal and maternal concentrations of hydroxyl radical and total antioxidant system: protective role of placenta against fetal oxidative stress. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010; 31: 319–24.
- 111.** Romero R, Espinoza J, Kusanovic J, Gotsch F, Hassan S, Erez O et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG.* 2006; 113: 17–42.
- 112.** Al-Gubory KH, Solari A, Mirman B. Effects of luteectomy on the maintenance of pregnancy, circulating progesterone concentrations and lambing performance in sheep. *Reprod Fertil Dev.* 1999; 11: 317–22.
- 113.** Biri A, Kavutcu M, Bozkurt N, Devrim E, Nurlu N, Durak I. Investigation of free radical scavenging enzyme activities and lipid peroxidation in human placental tissues with miscarriage. *J Soc Gynecol Investig.* 2006; 13: 384–8.
- 114.** Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol.* 2006; 572: 25–30.

115. Jauniaux E, Greenwold N, Hempstock J, Burton GJ. Comparison of ultrasonographic and Doppler mapping of the intervillous circulation in normal and abnormal early pregnancies. *Fertil Steril.* 2003; 79: 100–6.
116. Watson AL, Palmer ME, Jauniaux E, Burton GJ. Variations in expression of copper/zinc superoxide dismutase in villous trophoblast of the human placenta with gestational age. *Placenta.* 1997; 18: 295-9.
117. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 2000; 157: 2111-22.
118. Mirthe HS, Sanne JG, Sicco AS, Harry van Goor, Hillebrands JL. Oxidative stress in placental pathology. *Placenta.* 2018; 69: 153-61.
119. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 2005; 27: 101–10.
120. Tian X, Wang F, Zhang L, He C, Ji P, Wang J, et al. Beneficial effects of melatonin on the in vitro maturation of sheep oocytes and its relation to melatonin receptors. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 834–49.
121. Soto-Heras S, Roura M, Catala MG, Mene´ndez-Blanco I, Izquierdo D, Fouladi-Nashta AA, et al. Beneficial effects of melatonin on in vitro embryo production from juvenile goat oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 2018; 30: 253–61.
122. Abecia JA, Forcada F, Va´zquez MI, Teresa MB, Jose A. CP Rosaura, et al. Role of melatonin on embryo viability in sheep. *Reprod, Fertil and Dev.* 2019; 31: 82–92.
123. Schrick FN, Surface RA, Prichard JY, Dailey RA, Townsend EC, Inskeep EK. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol Reprod.* 1993; 49: 1133–40.
124. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology.* 1995; 43: 689–703.
125. Ravindra JP, Rawlings NC, Evans ACO, Adams GP. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* 1994; 101: 501–9.

126. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil*. 1998; 113: 275–85.
127. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology*. 1999; 52: 115–30.
128. Ginther OJ, Kot K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*. 1994; 42: 987–1001.
129. Gibbons JR, Kot K, Thomas DL, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogenology*. 1999; 52: 1005–20.
130. Duggavathi R, Bartlewski PM, Barrett DMW, Rawlings NC. The temporal relationship between the pattern of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid-to late luteal phase of sheep. *Theriogenology*. 2005; 64: 393–407.
131. Rubianes E, Ungerfeld R, Vinales C, Rivero A, Adams GP. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*. 1997; 47: 1479–88.
132. Liu X, Dai Q, Hart EJ, Duggavathi R, Barrett DMW, Rawlings NC, et al. Ovarian and endocrine responses to prostaglandin F2a (PgF2a) given at the expected time of endogenous FSH peak at mid-luteal phase in ewes. *Theriogenology*. 2006; 66: 811–21.
133. Adams GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*. 1999; 54: 17–32.
134. Singh J, Pierson RA, Adams GP. Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles and endocrine and functional correlates. *J Reprod Fertil*. 1998; 112: 12–29.
135. Singh J, Pierson RA, Adams GP. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *J Reprod Fertil*. 1997; 109: 35–44.
136. Griffin PG, Ginther OJ. Research application of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J Anim Sci*. 1992; 70: 953–72.

137. Bertmann J. Untersuchungen über den uterinen Blutfluss und die endometriale Echostruktur während der Frühgravidität des Rindes unter Berücksichtigung der Stickstoffmonoxid-Synthasem RNA-Expression. Doktora tezi: Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München. 2005.
138. Singh J, Adams GP, Pierso, RA. Promise of new imaging. Technologies for assessing ovarian function. Anim Reprod Sci. 2003; 78: 371–99.
139. Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. J Am Vet Med Assoc. 1987; 190: 995–1001.
140. Schmauder S, Weber F, Kiossis E, Bollwein H. Cyclic changes in endometrial echotexture of cows using a computer-assisted program for the analysis of first and second order grey level statistics of B-mode ultrasound images. Anim Reprod Sci. 2008; 106: 153–61.
141. Scully S, Evans ACO, Carter F, Duffy P, Lonergan P, Crowe MA. Ultrasound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers. Theriogenology. 2015; 83: 449–58.
142. Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide IJ 1.46r. <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>. Erişim tarihi; 09/04/2020.
143. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ, biophotonics international. 2004; 11(7): 36–42.
144. Bal Y. Gebeliği sonlandırılan köpeklerde uterusun eko yapısının BSPRO200 yazılımı ile dijital formatta değerlendirilmesi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011, Ankara (Danışman: Prof. Dr. Erol ALAÇAM).
145. Rangayyan RM. Histogram. M. R. Biomedical Image Analysis. 2005; 78-84.
146. Foley JD, Van Dam, JFA, Hughes JF, Feiner SK. “Spatial-partitioning representations; surface detail. in: computer graphics principles and practice. 1990; 2: 52-60.
147. Lu MC, Wang WY, Chu CY. Image-based distance and area measuring systems. IEEE Sensors J. 2006; 6: 495-503.
148. Rath U, Schlaps B, Limberg B, Zuna I, Lorenz A, Van Kaick G et al. Diagnostic accuracy of computerized B-scan texture analysis and conventional ultrasonography in diffuse parenchymal and malignant liver disease. J Clin Ultrasound. 1985; 13: 87-99.

149. Delorme S, Weisser G, Zuna I, Fein M, Lorenz A, Kaick G. Quantitative characterization of color Doppler images: reproducibility accuracy and limitations. Clin Ultrasound. 1995; 23(9) 537-50.
150. Gertsch U. Bildanalytische Untersuchungen zur Bestimmung der Oedematisierung des Uterus bei der Stute. Vet Med Diss Bern. 1997; 23(9): 537-50.
151. Szczypinski P, Kociolek M, Materka A, Strzelecki M. Computer program for image texture analysis in PhD students laboratory. International conference on signals and electronic systems, Lodz, Polen. 2001; 255-62.
152. Garra BS, Krasner BH, Horn SC, Ascher S, Mun SK, Zeman RK. Improving the distinction between benign and malignant breast lesions: the value of sonographic texture analysis. Ultrason imaging. 1993; 15: 267-85.
153. Lefebvre F, Meunier M, Thibault F, Laugier P, Berger G. Computerized ultrasound B-scan characterization of breast nodules. Ultrasound Med Biol. 2000; 26(9): 1421-8.
154. Mohanaiah P, Sathyanarayana P, Guru KL. Image texture feature extraction using GLCM approach. Int J Sci Res Pub. 2013; 3(5): 1-5.
155. Tom JW, Pierson RA, Adams GP. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. Theriogenology. 1998; 49: 1345-52.
156. Bader W, Böhmer S, Otto WR, Degenhardt F, Scheneider J. Texturanalyse: Ein neues Verfahren zur Beurteilung sonographisch darstellbarer Herdbefunde der Mamma. Bildgebung. 1994; 61: 284-90.
157. Raeth U, Schlaps B, Limberg B, Zuna I, Lorenz A, Van Kaick G et al. Accuracy of computerized B-scan texture analysis and conventional ultrasonography in diffuse parenchymal and malignant liver disease. Clin Ultrasound. 1985; 13(2): 87-99.
158. Adobe. <https://www.adobe.com/tr/creativecloud/file-types/image/raster/bmp-file.html>. Erişim tarihi; 30.05.2023.
159. Lee JY, Na DG, Yoon SJ, Gwon HY, Paik W, Kim T et al. Ultrasound malignancy risk stratification of thyroid nodules based on the degree of hypoechogenicity and echotexture. European radiology. 2019; 30(3):1653-63.

160. Yoshida H, Casalino DD, Keserci B, Coskun A, Ozturk O, Savranlar A. Wavelet-packet-based texture analysis for differentiation between benign and malignant liver tumours in ultrasound images. *Physics in Med & Biol*. 2003; 48(22): 3735.
161. Yang X, Tridandapani S, Beitler JJ, Yu DS, Yoshida EJ, Curran WJ, et al. Ultrasound GLCM texture analysis of radiation-induced parotid-gland injury in head-and-neck cancer radiotherapy: An in vivo study of late toxicity. *Med Physics*. 2012; 39(9): 5732–9.
162. Simões APR, Feliciano MAR, Maronezi MC, Uscategui RAR, Bartlewski PM, Almeida VT, et al. Elastographic and echotextural characteristics of foetal lungs and liver during the final 5 days of intra uterine development in dogs. *Anim Reprod Sci*. 2018; 197: 170–6.
163. Morris DT. An Evaluation of the use of texture measurements for the tissue characterisation of ultrasonic images of in vivo human placentae. *Ultrasound in Med & Biol*. 1988; 14: 387-95.
164. Simões LGA, López RVM, Freitas RMC, Willegaignon J, Sapienza MT, Chammas MC, et al. Evaluation of parotid salivary gland echo texture by ultrasound examinations and correlation with whole-body scintigraphy after radioiodine therapy in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J of Ultrasound in Med*. 2020; 39(9): 1811-8.
165. Chang CY, Chen S J, Tsai MF. Application of support-vector-machine-based method for feature selection and classification of thyroid nodules in ultrasound images. *Pattern recognition*. 2010; 43: 3494–506.
166. Kauffold J, von dem Bussche B, Failing K, Wehrend A, Wendt M. Use of B-mode ultrasound and grey-scale analysis to study uterine echogenicity in the pig. *J Reprod Dev*. 2010; 56: 444–8.
167. Singh J, Adams GP. Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles. *Anat Rec*. 2000; 258: 58–70.
168. Bartmann CP, Lorber KC. Perioovulatorischen uterus perfusion des pferdes mittels Dopplersonografie and Gewebetexturanalyse. *Pferdeheilkunde*. 2011; 27(3): 224-30.

169. Schmaduer S. Zyklus- und entzündungsbedingte Veränderungen der endometrialen Echostruktur beim Rind unter Berücksichtigung der Stickstoffmonoxid-Synthase-Expression. 2003. Doktora tezi: Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München.
170. Natalie D, Bragg Wever, Roger A. Pierson and Claire E. Card. Relationship between estradiol 17 and endometrial echotexture during natural and hormonally manipulated estrus in mares. AAEP proceedings. 2002; 48: 41-8.
171. Cannazik O. Holstein ırkı ineklerde suni tohumlama sonrası farklı günlerde endometriyal ekotekstürün değerlendirilmesi. K.Ü. Sağ Bil Ens, Doktora Tezi, 2017, Kars (Danışman: Prof. Dr. Bülent POLAT).
172. Chacher MFA. İneklerde postpartum ekotekstür değişikliklerinin değerlendirilmesi. A.Ü. Sağ Bil Ens. Yüksek Lisans Tezi, 2018, Erzurum (Danışman: Prof. Dr. Armağan ÇOLAK).
173. Vanduzer T, Duggavathi R, Murawski M, Zieba DA, Sroka P, Bartlewski PM. Correlations among antral follicular echotexture, apoptosis and expression of key steroidogenic enzymes in sheep. J of Reprod and Dev. 2014; 60(6): 476-82.
174. Cengiz M, Kanca H, Salar S, Bastan A, Kucukaslan I, Alkan H ve ark. Endometrial echotexture parameters in Turkish Saanen goats (Akkeci) during oestrus and early pregnancy. Anim Reprod Sci. 2014; 146: 27–33.
175. Singh K, Kumar A, Honparkhe M, Kaur S, Malhotra P, Brar PS. Ultrasound based testicular echo-texture in relation to libido of crossbred bulls. Indian Vet J. 2017; 94(07): 14-6.
176. Camela ES, Nociti RP, Santos VJ, Macente, BI, Murawski M, Vicente WR, et al. Changes in testicular size, echotexture, and arterial blood flow associated with the attainment of puberty in Dorper rams raised in a subtropical climate. Reprod in dom anim. 2019; 54(2): 131-7.
177. Ali KM, Ahmad N, Akhtar N, Ali S, Ahmad M, Younis M. Ultrasound imaging of testes and epididymides of normal and infertile breeding bulls. Pakistan Vet J. 2011; 31(4): 345-50.

178. Mülazimoğlu SB, Beceriklisoy HB, Schäfer-Somı, S. B-mode echotexture analysis and color doppler sonography in canine mammary tumors. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2016; 22(6): 961-69.
179. Aydılek N, Varışlı Ö, Selek Ş, Korkmaz Ö, Atılı MO, Taşkın A. The effect of estrous cycle on oxidant and antioxidant parameters in dairy cows. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2014; 20 (5): 703-9.
180. Çetin E, Çetin N, Küçük O. Toklularda karayolu ile taşımının oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisi. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg.* 2011; 6(2): 103-9.
181. Akşit H, Kırıl F, Yılmaz M, Ural M. Saanen keçilerinde erken ve geç laktasyon döneminde oksidatif durum. *Balikesir Saglik Bil Derg.* 2014; 3(2): 74-8.
182. Samir H, Radwan F, Ahmed RM, Mohamed AI, Elfadadny A, Karen, A, et al. Ultrasonography and computer-assisted assessment of postpartum uterine echotexture and its relationship with peripheral oxidative stres biomarkers in goats. *Small Rumin Res.* 2023; 221: 106947.
183. Nawito MF, Amal R, Sosa ASA, Mahmoud KG. Impact of pregnancy and nutrition on oxidant/antioxidant balance in sheep and goats reared in South Sinai. *Veterinary World.* 2016; 9(8): 801-5.
184. Gaal T. Effect of fasting on blood lipid peroxidation parameters of sheep. *Res in Vet Sci.* 1993; 55: 104-7.
185. Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S, Tamura H, Ono M, Nakata M, et al. Change in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Hum Reprod.* 1996; 11: 1073-8.
186. Jain S, Saxena D, Kumar PG, Koide SS, Laloraya M. Effect of estradiol and selected antiestrogens on pro- and antioxidant pathways in mammalian uterus. *Contraception.* 1999; 60: 111-8.
187. Al-Gubory KH, Bolifraud P, Garrel C. Regulation of key antioxidant enzymatic systems in the sheep endometrium by ovarian steroids. *Endocrinology.* 2008; 149: 4428-34.

- 188.** Al-Gubory KH, Garrel C. Antioxidative signalling pathways regulate the level of reactive oxygen species at the endometrial-extraembryonic membranes interface during early pregnancy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44(9):1511-8.
- 189.** Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stres and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod.* 2001; 7: 175–89.
- 190.** Blomberg LA, Long EL, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Dobrinsky JR, Zuelke KA. Serial analysis of gene expression during elongation of the peri-implantation porcine trophoctoderm (conceptus). *Physiol Genomics.* 2005; 20: 188–94.
- 191.** Dennery PA. Effects of oxidative stres on embryonic development. *birth defects res c embryo today.* 2007; 81: 155–62.
- 192.** Gaglioti S, Colepiccolo P, Bevilacqua E. Post-implantation mouse embryos have the capability to generate and release reactive oxygen species. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7(5): 1111–6.
- 193.** Thomas M, Jain S, Kumar GP, Laloraya MA. Programmed oxyradical burst causes hatching of mouse blastocysts. *J Cell Sci.* 1997; 110: 1597–602.
- 194.** Jain S, Saxena D, Kumar GP, Laloraya M. NADPH dependent superoxide generation in the ovary and uterus of mice during estrous cycle and early pregnancy. *Life Sci.* 2000; 66: 1139–46.
- 195.** Al-Gubory KH, Garrel C, Sugino N, Fowler PA. The conceptus induces a switch in protein expression and activities of superoxide dismutase 1 and 2 in the sheep endometrium during early pregnancy. *Small Rum Res.* 2016; 141: 77-83.
- 196.** Tashla T, Cosic M, Kurcubic V, Prodanovic R, Puvaca N. Occurrence of oxidative stres in sheep during different pregnancy periods. *Acta Agriculturae Serbica.* 2021; 26(52): 111-6.
- 197.** Karadaş N. Koyunlarda gebeliğin değişik dönemlerinde kan lipid, malondialdehit, superoksit dismutaz ve nitrik oksit düzeyleri. E. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008, Kayseri (Danışman: Doç. Dr. Fatma UYANIK).

198. Yüksel S, Yiğit AA. Malondialdehyde and nitric oxide levels and catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase levels in maternal blood during different trimesters of pregnancy and in the cord blood of newborns. *Turk J of Med Sci.* 2015; 45(2): 454-9.
199. Kamiloğlu NN, Beytut E, Gürbulak K, Öğün M. Effects of vitamin A and /beta-carotene injection on levels of vitamin E and on glutathione peroxidase activity in pregnant Tuj sheep. *Turk J of Vet Anim Sci.* 2005; 29(4): 1032-8.
200. Hesla JS, Miyazaki T, Dasko LM et al: Superoxide dismutase activity, lipid peroxide production and corpus luteum steroidogenesis during natural luteolysis and regression induced by oestradiol deprivation of the ovary in pseudopregnant rabbits. *J Reprod Fertil.* 1992; 95: 915–24.
201. Uyanık F, Güvenç K, Gültekin M, Gürbulak K. Koyunlarda gebeliğin değişik dönemlerinde leptin ve progesteron düzeyleri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2009; 6(1): 31-6.
202. Alexander B, Coppola G, Mastromonaco GF, John E, Reyes ER, Betts DH, et al. Early pregnancy diagnosis by serum progesterone and ultrasound in sheep carrying somatic cell nuclear transfer-derived pregnancies. *Reprod Dom Anim.* 2008; 43: 207-11.
203. Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics.* Eighth edition. WB. Saunders, Harcourt Publishers Limited, 2001; 102.
204. Akbulut NK. Koyunlarda östrüs siklusunda ve gebeliğin erken döneminde uterustan elde edilen ultrason görüntülerinin işlenmesi. A.K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2019, Afyonkarahisar (Danışman: Prof. Dr. Hacı Ahmet ÇELİK).
205. Pant HC, Hopkinson CRN, Fitzpatrick RJ. Concentration of oestradiol, progesterone, Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating in the jugular venous plasma of ewe during the oestrous cycle. *J Endocr.* 1977; 73: 247-55.
206. Perez RV, Cruzb UM, Reyes LA, Correa-Calderonb A, Baca MAL, Rivera ALL. Heat stres impacts in hair sheep reproduction, Review. *Rev Mex Cienc Pecuarias.* 2020; 11(1): 205-22.

207. Kaplan Bilmez Y. Koyunlarda koç atımı öncesi antioksidan kullanımının oksidatif stres ve bazı fertilité parametreleri üzerine etkisi. D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2022, Diyarbakır (Danışman: Prof. Dr. Nihat ÖZYURTLU).
208. Cengiz M, Çolak A, Hayırlı A, Cannazık O. Optical density changes in ultrasonographic images of the endometrium and corpus luteum in pregnant and cyclic cows. Turk J Vet Anim Sci. 2017; 41: 18-24.
209. Aitken RJ, Burton J, Haxkins J, Kerr-Wilson R, Short RV, Steven DH. Histological and ultrastructural changes in the blastocyst and reproductive tract of the roe deer, *Capreolus capreolus*, during delayed implantation. J Reprod. Fertil. 1973; 34 (3): 481-93.
210. Stroband HW, Taverne N, Langenfeld K, Barends PM. The ultrastructure of the uterine epithelium of the pig during the estrous cycle and early pregnancy. Cell Tissue Res. 1986; 246(1): 81-9.
211. Hermes R. Sonographie der Trächtigkeit beim Europäischen Reh (*Capreolus capreolus*) und Quantifizierung endometrialer Veränderungen während der Diapause mittels computergestützter Graustufen-analyse. Vet Med Diss. 1997.
212. Bonafos LD, Kot K, Ginther OJ. Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. Theriogenology. 1995; 43: 713-21.
213. Ohtani S, Okuda K, Nishimura K, Mohri S. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. Theriogenology. 1993; 39: 1033-42.
214. Ginther OJ. Tubuler genitalia. In: Ultrasonic imaging and animal reproduction. Equiservices Publishing, Cross Plains. 1998; 105-28.
215. Şaki L. İneklerde östrüs siklusu süresince uterus ekojenitesindeki değişikliklerin araştırılması. A.Ü. Sağ Bil Ens, Yüksek Lisans Tezi, 2018, Erzurum (Danışman: Prof. Dr. Bülent POLAT).
216. Erdoğan G, Küçük N, Kanca H, Aksoy M. In vivo and in vitro assessment of ovarian echotexture through computer assisted real time ultrasonography in bitches. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2017; 64: 171-6.
217. KIOSSIS E, Brozos CN, Nikolaıdı N, Souglıs E, Bollwein H. Changes in echostructure values of the cervix during pregnancy in Holstein Friesian cows Reprod in Dom Anim. 2010; 45(1): 24.

218. Zabitler F. Ekotekstür programının (eko yapının) gebelik dönemleri tanısında ultrasonografik yöntemle destek olarak uygulanması. Y.D.Ü. Lisansüstü Eğt Ens, Doktora Tezi, 2022, Lefkoşa (Danışman: Prof. Dr. Selim Aslan).
219. Sarda IR, Robertson HA, Smeaton TC. Sequential changes in plasma progesterone levels in the ewe during the estrous cycle and during pregnancy in intact and ovariectomized sheep. *Can J Anim Sci.* 1973; 53: 25-34.
220. Boscus CM, Samartzi FC, Lymberopoulos AG, Stefanakis A, Belibasaki S. Assessment of progesterone concentration using enzymeimmunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. *Reprod Dom Anim.* 2003; 38: 170–174.
221. Aydın İ, Köse AM. Saanen ırkı keçilerde gebelik sırasında serum oksidatif durum ve biyokimyasal parametre düzeyleri. *EurAsian J Vet Sci.* 2015; 31(4): 197-203.
222. Abdel-Ghani MA, El-Sherry TM, Hayder M, Abou-Khalil NS. Profile of peroxidative injury and antioxidant indicators in singleton, twins and multiple bearing goats throughout pregnancy. *Asian Pacific J of Reprod.* 2016; 5(5):400-5.
223. Aköz M, Aydın İ, Çitil ÖB. The effect of litter size and gender on immunoglobulins and oxidative stress in Damascus goats. *EurAsian J Vet Sci.* 2017; 33(4): 208-13.
224. Gürgöze S, Gökalp E. Şanlıurfa yöresi Ankara Tiftik ve Halep keçisi ırklarına ait bazı biyokimyasal kan parametreleri ile malondialdehit düzeylerinin tespiti. *Harran Univ Vet Fak Derg.* 2018; 7: 19-23.

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

9. ÖZGEÇMİŞ

<i>Adı</i>	<i>Ali Ekber</i>	<i>Soyadı</i>	<i>TEKDAL</i>
<i>Doğum Yeri</i>		<i>Doğum Tarihi</i>	
<i>Uyruğu</i>		<i>Tel</i>	
<i>E-posta</i>			

Eğitim Düzeyi

	<i>Mezun olduğu Kurumun Adı</i>	<i>Mezuniyet Yılı</i>
<i>Doktora/ Uzmanlık</i>		
<i>Tezli Yüksek Lisans</i>		
<i>Tezsiz Yüksek Lisans</i>		
<i>Lisans</i>		
<i>Lise</i>		

İş Deneyimi

<i>Görevi</i>	<i>Kurum</i>	<i>Süre</i>

<i>Yabancı Dil Sınav Notu</i>	

	<i>Sayısal</i>	<i>Eşit Ağırlık</i>	<i>Sözel</i>
<i>ALES Puanı</i>			

10. EKLER

10.1. EK-1. Etik Kurul İzin Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 05/01/2021-1673



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Uygulama Ve Araştırma Merkezi



Sayı : E-35582840-020-
Konu : Olurlar, Onaylar

Sayın Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN

İlgi : 18.12.2020 tarihli 121246 sayılı ve "Etik Kurul İzin Belgesi " konulu yazı

Sayın "Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN"ın danışmanı olduğu ve ekte sunduğu "Koyunlarda embriyonal dönemde malondialdehit, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz'ın uterus ekotekstürü üzerine etkisinin araştırılması" adlı çalışma önerisi kapsamında Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde barındırılan 30 adet (20 adet gebe ve 10 adet gebe olmayan) koyundan progesteron, malondialdehit, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz seviyelerinin belirlenmesi için belirli günlerde kan örnekleri alınacak. Gebeliklerin doğrulanması amacıyla ultrasonografi ile gebelik kontrolü yapılacak bunun dışında herhangi bir uygulama ve deneysel çalışma yapılmayacağından, 15 Şubat 2014 tarihinde resmi gazetede yayımlanan HADMEK yönetmeliği madde 8, k bendi, 1. fıkrasında yer alan " Teşhis ve tedavi amaçlı klinik uygulamalar HADYEK iznine tabi değildir" ibaresine göre, **yerel etik kurul iznine gerek bulunmamaktadır.**

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Beran YOKUŞ
Başkan

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : *BECU66CLC* Pin Kodu : 82522 Belge Takip Adresi : https://ebelge.dicle.edu.tr/en/Vision/Validate_Doc.aspx
Adres:Dicle Üniversitesi Rektörlüğü, 21280-Diyarbakır
Telefon :+90 412 248 84 31 Faks :+90 412 248 82 16
e-Posta :dusam@dicle.edu.tr Elektronik Ağ:http://www.dicle.edu.tr
Kep Adresi: dicleuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Ömer Faruk Katanalp
Unvanı: Öğretim Görevlisi



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır..

10.2. EK-2 Makale Şartını Sağladığına Dair Yayın

MAS JAPS 7(Özel Sayı): 1171–1183, 2022



DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.7456363>

Derleme Makalesi / Review Article

Koyunlarda Gebeliğin Maternal Kabulü ve İmplantasyon Süreci

Ali Ekber TEKDAL^{1*} (Orcid ID: 0000-0003-0802-5483)

¹Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır,

*Sorumlu yazar (Corresponding author): aetkdal@gmail.com

Geliş Tarihi (Received): 05.11.2022

Kabul Tarihi (Accepted): 08.12.2022

Özet

Koyunlarda embriyonal dönem, blastogenezisin sonundan 34. güne kadar olan süredir. Koyun embriyoları, fertilizasyon sonrasında 3-4. günlerde uterusu girer. Erkek ve dişi pronükleuslarının birleşmesiyle oluşan zigot mitotik bölünmelere uğrar. İlk olarak iki blastomerli embriyo halini alır. Çiftleşme sonrası 14. günde filamantöz konseptus uterus lümeninde hareketsiz hale gelir. Uzayan blastosist endometrial epitelle yakın temasını sürdürür. Bütün memelilerde endometrial uterus bezleri, histotrof olarak adlandırılan proteinler ve değişik besin unsurları içeren kompleks bir sıvı salgırlar. Bu salgı ürünü içerisinde; enzimler, büyüme faktörleri, sitokinler, lenfokinler, hormonlar, transport proteinler vb. bulunur. Histiotrof beslenmede, uterus bezleri tarafından üretilen proteinler ve diğer besleyici moleküller embriyonun canlılığını devam ettirmesini sağlar. Embriyo, bu histotrof sıvısının içinde yüzer. Gebe olmayan koyunlarda, siklusun 16-17. günlerinde endometriyumdan Prostaglandin (PGF₂α) salınımı artarak korpus luteumun regresyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle gebeliğin kabulünde endometrial PGF₂α'nın salgılanmasının engellenmesi esastır. Koyunlarda, uterus içerisinde serbest dolaşan blastosist, sipsifik proteinler üretir. Bu protein, ovine trofoblastik protein-1 (oTP-1) olarak adlandırılmakta ve interferon tau olarak bilinmektedir. Blastosistin trofoektoderminde üretilen interferon tau, endometrial östradiol reseptörlerini baskılayarak oksitosin reseptörlerinin sentezini önlemesi ve böylece PGF₂α'nın salgılanmasını engellemesi şeklinde açıklanmaktadır. İnterferon tau, koyunlarda gebeliğin 10-21. günlerinde üretilmekte olup maksimum düzeye 15. günde ulaşmaktadır. Dolaşımdaki progesteron hormonu konsantrasyonu, erken gebelik döneminde blastosistin hayatta kalmasını ve gelişmesini sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Embriyo, küçük ruminant, interferon, endometriyum

Maternal Acceptance of Pregnancy and Implantation Process in Sheep

Abstract

The embryonal period in sheep is the period from the end of blastogenesis to day 34. Sheep embryos, 3-4 days after fertilization enters the uterus. The zygote formed by the union of male and female pronuclei undergoes mitotic divisions. First, it becomes an embryo with two blastomeres. On the 14th day after mating, the filamentous conceptus is immobilized in the uterine lumen. The elongated blastocyst maintains close contact with the endometrial epithelium. In all mammals, the endometrial uterine glands secrete a complex fluid containing proteins called histotrophs and various nutrients. In this secretion product; enzymes, growth factors, cytokines, lymphokines, hormones, transport proteins etc. is found. In histotrophic nutrition, proteins and other nutrient molecules produced by the uterine glands ensure the survival of the embryo. The embryo floats in this histotrophic fluid. In non-pregnant sheep, 16-17 days of the cycle. The release of Prostaglandin (PGF₂α) from the endometrium increases and causes regression of the corpus luteum. Therefore, inhibition of the secretion of endometrial PGF₂α is essential in the acceptance of pregnancy. In sheep, the free-floating blastocyst produces specific proteins in the uterus. This protein is called ovine trophoblastic protein-1 (oTP-1) and is known as interferon tau. Interferon tau produced in the trophoctoderm of the blastocyst is explained as inhibiting the synthesis of oxytocin receptors by suppressing endometrial estradiol receptors and thus inhibiting the secretion of PGF₂α. Interferon tau, 10-21 days of pregnancy in sheep. It is produced on the 15th day and reaches its maximum level on the 15th day. The circulating concentration of progesterone hormone ensures survival and development of the blastocyst during early pregnancy.

Keywords: Embryo, small ruminant, interferon, endometrium

11. ORJİNALLİK RAPORU

20.07.2023 10:32

Turnitin Orjinallik Raporu



Turnitin Orjinallik Raporu

Tez son kontrol Ali Ekber Tekdal tarafından
KOYUNLARDA EMBRİYONAL DÖNEMDE
MALONDİALDEHİT, SÜPEROKSİT
DİSMUTAZ VE GLUTATYON
PEROKSİDAZ' IN UTERUS
EKOTEKSTÜRÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI (tez) den

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%13	İnternet Sources: %13 Yayınlar: %5 Öğrenci Ödevleri: %4

20-Tem-2023 09:24 +03' de işleme
kondu

kaynaklar:

NUMARA: 2133930651
Kelime Sayısı: 21578

1

3% match (05-Eki-2022 tarihli internet)

<http://docs.neu.edu.tr/library/9326367955.pdf>

2

2% match (14-Eki-2022 tarihli internet)

https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/75568/yokAcikBilim_371121.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

3

1% match (16-Eki-2022 tarihli internet)

https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/110544/yokAcikBilim_10323866.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

4

1% match (14-Eki-2022 tarihli internet)

https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/585058/yokAcikBilim_10169591.pdf?isAllowed=y&sequence=-1