

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEKSÜEL SIKLUSUN FARKLI DÖNEMLERİNDEKİ
KÖPEKLERDE KAN PROGESTERON ve 17 β -ÖSTRADIOL
SEVİYELERİNİN RIA ve ECLIA YÖNTEMLERİYLE
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Burhan Yücel

**DOĞUM ve JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet UÇAR

Tez No:2013-001

2013-AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

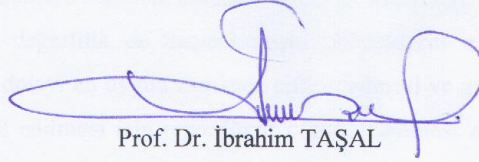
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/01/2013



Prof. Dr. İbrahim TAŞAL

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

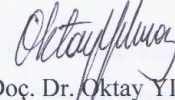
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Mehmet UÇAR

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye

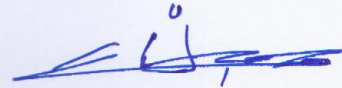


Yrd. Doç. Dr. Oktay YILMAZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Raportör

Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Burhan YÜCEL'in 'Seksüel Siklusun Farklı Dönemlerindeki Köpeklerde Kan Progesteron ve 17 β -Östradiol Seviyelerinin RIA ve ECLIA Yöntemleriyle Araştırılması' başlıklı tezi 18.01./2013 günü saat 10.00...da Lisansüstü Eğitim-Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Kağan ÜÇOK

Enstitü Müdürü

Önsöz

Köpekler insanlarla sürekli olarak birlikte bulunabilen ve ciddi sevgi bağlarıyla tutundukları ve yaşantılarında çok önemli bir yere sahip olan dostlardır. Çeşitli mekanlarda barınabilen köpekler daha çok insanların hayatlarını kolaylaştırmak amacıyla faydalandıkları, bakıp besledikleri, ev ve/veya işyeri gibi yerlerden barındırdıkları bir hayvan olmaktan daha ziyade toplum açısından da kabul edilen dost ve sadık olan hayvanlardır.

Birçok özellikte kullanım alanlarının sıklığı, köpeklere ihtiyacı ortaya çıkartırken ekonomik bir değerlilik de kazandırmıştır. Köpeklerin monoöstrik özelliğe sahip olduklarından dolayı en uygun zamanda çiftleştirilmesi ve gebeliği sonrasında sağlıklı yavruların elde edilmesi için reproduktif olarak izlenmesi zorunludur. Bu amaçla da güvenilir sonuçlar veren vaginal sitoloji, ovaryumların ultrasonografik muayeneleri yanı sıra kan progesteron ve 17 β -östradiol ölçümlerinden de klinik ortamda yararlanmayı sağlamak gerekmektedir.

Bu çalışmada, kan progesteron ve 17 β -östradiol ölçümlerinde katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Tabip Yarbay Orhan YÜCEL'e, ovariohisterektomi operasyonlarında, kan örneklerinin toplanmasında ve vaginal stolojik değerlendirmeler ile tezimin yazım aşamasında katkılarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Oktay YILMAZ'a ve istatistiksel değerlendirmeleri yapan Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
Önsöz	II
İçindekiler	III
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	V
Şekiller Dizini	VI
Çizelgeler Dizini	VII
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Köpeklerde seksüel siklus özellikleri ve östrüs siklusu	1
1.1.1. Proöstrüs	2
1.1.2. Östrüs	3
1.1.3. Diöstrüs	4
1.1.4. Anöstrüs	5
1.2. Vaginal Sitoloji	6
1.2.1. Östrüs siklusu evrelerinin vaginal sitolojik değerlendirilmesi	7
1.3. Hormonlar	10
1.3.1. Peptid ve polipeptid yapısında olanlar	10
1.3.2. Protein yapısında olanlar	11
1.3.3. Aminoasit türevi hormonlar (amin hormonlar)	11
1.3.4. Glikoprotein yapısında olanlar	12
1.3.5. Steroid yapıda olanlar	12
1.3.5.1. Steroid hormon tipleri ve fonksiyonları	13
1.3.5.2. Steroid yapısı ve steroid analizi	14
1.3.5.3. Steroid analizinde kullanılan yöntemler	16
1.3.5.3.1. Radioimmunoassay (RIA)	17
1.3.5.3.2. Luminesens metotları	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. Gereç	22
2.2. Yöntem	22
2.2.1. Vaginal Sitoloji	23

2.2.2. Serumda RIA ve ECLIA yöntemlerine göre progesteron ve 17 β -östradiol analizleri	24
2.2.2.1. RIA	24
2.2.2.2. ECLIA	25
2.2.3. İstatistiksel Değerlendirmeler	28
3.BULGULAR	29
3.1. Vaginal Sitoloji	29
3.2. RIA ve ECLIA yöntemlerine göre progesteron ve 17 β -östradiol değerleri	29
4.TARTIŞMA	32
5.SONUÇ	37
6. KAYNAKLAR	38

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

ark.	Arkadařları
FSH	Follikül uyarıcı hormon
kg	Kilogram
LH	Lüteinleştirici hormon
mg/kg	Miligram/kilogram
ng	Nanogram
pg	Pikogram
<	Küçük
>	Büyük
%	Yüzde

Şekiller Dizini

- Şekil 3.1.** RIA ve ECLIA yöntemleri ile aynı örnekte ölçülen progesteron (ng/ml) değerleri 30
- Şekil 3.2.** RIA ve ECLIA yöntemleri ile aynı örnekte ölçülen 17 β -östradiol (pg/ml) değerleri 31

Çizelgeler Dizini

Çizelge 1.1. RIA tekniğinde çalışma prensibi	18
Çizelge 1.2. Farklı luminesens tipleri	20
Çizelge 3.1. Seksüel siklusun farklı dönemlerinde RIA ve ECLIA yöntemleri ile elde edilen ortalama progesteron (ng/ml) ve 17 β -östradiol (pg/ml) değerleri	29

ÖZET**Köpeklerde Kan Progesteron ve 17 β -Östradiol Seviyelerinin RIA ve ECLIA Yöntemleriyle Araştırılması**

Bu çalışmada seksüel siklusun değişik dönemlerindeki köpeklerin serum örneklerinde RIA yöntemiyle ölçülen progesteron ve 17 β -östradiol düzeylerinin ECLIA yöntemiyle karşılaştırılması ve ECLIA yönteminin köpeklerde progesteron ve 17 β -östradiol düzeylerinin belirlenmesindeki doğruluğunun tespit edilmesi amaçlandı. Çeşitli ırklardan, 10-30 kg canlı ağırlığında, 25 adet dişi köpek kullanıldı. Seksüel siklusların tespiti için vaginal sitoloji kullanıldı. RIA ve ECLIA yöntemlerine göre elde edilen serum progesteron ve 17 β -östradiol düzeyleri arasındaki korelasyon karşılaştırıldı.

Köpeklerin (n = 25) % 60'ının anöstrüste (n = 15), % 16'sının proöstrüste (n = 4), % 16'sının östrüste (n = 4) ve % 8'inin (n = 2) diöstrüste oldukları belirlendi. Sunulan çalışmada her bir hayvana ait serum örneğinin RIA ve ECLIA yöntemleri ile belirlenen progesteron (ng/ml) değerlerinin birbirine benzer olduğu ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (p<0.001; r = 0.998). Bununla birlikte her bir hayvana ait serum örneğindeki 17 β -östradiol (pg/ml) değerlerinin de birbirine benzer olduğu ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (p<0.001; r = 0.098)

Sonuç olarak, köpeklerde progesteron ve 17 β -östradiol ölçümlerinde ECLIA yönteminin de RIA yöntemi gibi doğru sonuç veren bir yöntem olduğu, bununla birlikte test süresinin kısa olması nedeniyle daha etkili bir yöntem olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Progesteron, 17 β -östradiol, RIA, ECLIA, köpek

SUMMARY

Investigation of Blood Progesterone and 17 β -Estradiol Levels by RIA and ECLIA Methods

In the present study, it was aimed to compare the serum progesterone and 17 β -estradiol levels detected by RIA and ECLIA and to investigate the accuracy of ECLIA method to measure serum progesterone and 17 β -estradiol levels in 25 bitches. Bitches were weighing between 10-30 kg, at various phases of sexual cycle and from different breeds. The vaginal cytological staining was used to determine the phases of oestrus cycles. The correlation between the levels of progesterone and 17 β -estradiol detected by RIA ve ECLIA was analyzed statistically.

The percentage of animals (n:25) in anoestrus, prooestrus, estrous or dioestrus was 60, 16, 16 and 8%, respectively. In the present study, it was observed that the serum progesterone level detected by RIA and ECLIA was similiar and significant statistically ($p < 0.001$; $r = 0.998$). Moreover, the similarity between the level of 17 β -estradiol detected by RIA and ECLIA was significant stitistically ($p < 0.001$; $r = 0.098$).

In conclusion, it is suggested that ECLIA method has a value for measuring progesterone and 17 β -estradiol in bitches as far as RIA method, however ECLIA is more practical than RIA due to its short testing time.

Keywords: Progesterone, 17 β -estradiol, RIA, ECLIA, bitch

1. GİRİŞ

Köpeklerde seksüel siklus dönemlerinin anlaşılabilmesi için köpeğin davranış özellikleri de dahil olmak üzere vaginal smear, vaginoskopi, kan hormon düzeyleri tayini ve ovaryum ultrasonografisi gibi pek çok farklı yöntem kullanılabilmektedir. Bu yöntemler arasında, sıklıkla progesteron ve östrojen gibi steroid hormon düzeylerinin tespit edilmesi hayvanların seksüel siklusları hakkında güvenilir sonuçlar vermektedir. Ne var ki, hormon analiz işlemlerinin, alt yapı ve ilgili hormona ait ölçüm kitlerinin maliyetlerinin yüksek olması, küçük hayvan pratiğinde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, öncelikle köpeklerde seksüel siklus dönemlerine göre değişen hormonal durumun ve ölçüm tekniklerinin ortaya konulması gerekmektedir.

1.1. Köpeklerde seksüel siklus özellikleri ve östrüs siklusu

Köpekler monoöstrik özelliğe sahip, mevsimsel olmayan siklik aktivite gösteren, ovulasyonu spontan şekillenen hayvanlardır. Küçük ırkların ilk kızgınlıklarının 6-10. aylarda görülürken, büyük ırklarda bu durumun 18-20. aylara kadar uzadığı ifade edilmektedir (Alaçam, 2005).

Köpekler, çiftleşme olsun veya olmasın her çiftleşme döneminde sadece bir östrüs göstermektedirler (Alaçam, 2005). İki östrüs siklusu arasında geçen süre ortalama 7 aydır (Concannon, 1993; Rijnberk, 1996; Alaçam, 2005). Köpekler östrüs siklusunun çeşitli evrelerinde farklı davranış ve hormonal değişiklikler sergilemektedirler.

1.1.1. Proöstrüs

Proöstrüs, genellikle vaginal kanamanın ilk görüldüğü zaman başlayan ve dişinin çiftleşmek için erkeğe izin vermeye başladığı anda sonlanan bir süreç olarak kabul edilmektedir. Feldman ve Nelson (1996), hiçbir klinik bulgunun, kanlı bir vaginal akıntının görüldüğü ilk gün kadar basit ve güvenilir olmadığını ileri sürmektedirler. Endometriumdan diapedezis yoluyla gerçekleşen bu kanlı akıntının görüldüğü ilk gün proöstrüsün başlangıç günü olarak değerlendirilmektedir (Alaçam, 2005). Proöstrüsün başlangıcından ilk çiftleşme anına kadar olan zaman uzunluğu genellikle 6-11 gün kadar olup, ortalama 9 gün kabul edilmektedir (Feldman ve Nelson, 1996; Yılmaz, 1999; Pineda, 1989; Alaçam, 2005).

Proöstrüsteki köpekler, ovaryum üzerinde gelişen folliküller tarafından sentezlenip salınan östrojenin etkisi altında bulunmaktadırlar (Concannon ve ark, 1975; Tsutsui, 1982; England ve Anderton, 1992; Feldman ve Nelson, 1996). Bu nedenle proöstrüs, köpeklerde östrojenin varlığında geçen bir evre olarak değerlendirilmektedir (Feldman ve Nelson, 1996). Aynı araştırmacılar, anöstrüs sırasında sirküle eden östrojen konsantrasyonunun 8-15 pg/ml arasında olduğunu, proöstrüsün klinik bulgularından önce östrojen konsantrasyonunda 15 pg/ml'yi geçen derecelerde bir artış görüldüğünü, erken proöstrüsün genellikle 25 pg/ml'den fazla seviyede östrojen konsantrasyonu ile birlikte seyrettiğini ve geç proöstrüs döneminde bu hormonun 60-70 pg/ml'ye varacak şekilde pik değere ulaştığını ileri sürmektedirler. Bunun yanı sıra kanda östrojen pikinin östrüsten 24-48 saat önce meydana geldiğini (gözlenebilir kızgınlık), östrojen konsantrasyonundaki azalmanın gözlenebilir kızgınlığın başlangıcıyla ilişkili olduğunu ve 5-9 gün sonra ise östrojenin hızla bazal seviyeye geri döndüğünü ifade etmektedirler.

Progesteron hormonu proöstrüsün son 12-48 saatinde bazal seviyede bulunmaktadır ($<0,5$ ng/ml). Östrojen hormon konsantrasyonunun azalmasını takiben progesteron konsantrasyonunun kritik olan $0,5$ ng/ml değerini aşarak yükselmesi, proöstrüsün sonunu ve östrüsün başlangıcını işaret etmektedir (Concannon ve ark, 1975; Tsutsui, 1982; England ve Anderton, 1992; Feldman ve Nelson, 1996). Plazma progesteron konsantrasyonu tipik olarak gözlenebilir kızgınlığın başlangıcından önce veya LH pikinden önce $0,5$ ng/ml'yi aşarak yükselmeye başlamakta ve takip eden 15-25. günlerde artışına devam etmektedir. Progesteron konsantrasyonu proöstrüsün başlangıcında çok düşük olup ($0,2$ ng/ml) sonlarına doğru $0,6$ ng/ml seviyesinde bulunmaktadır. Östrüste yavaş bir artışla devam etmekte, ortalama pik değişiminin 25. günde $22,9 \pm 2,7$ ng/ml'den LH piki sonrası 20-25. günde $47 \pm 3,1$ ng/ml'ye ulaşmaktadır (Tsutsui, 1982; Concannon ve Hansel, 1977; England ve ark, 1989; Mestre ve ark, 1990).

1.1.2. Östrüs

Östrüs, dişinin çiftleşmek için erkeğe izin verdiği zamanı kapsayan evre olarak kabul edilmektedir. Dişinin çiftleşmek için izin verdiği günün (gözlenebilir kızgınlık) östrüsün başlangıcı olarak alındığı, erkeği kabul etmediği zaman sona erdiği ve 2-20 gün (ortalama 9 gün) sürdüğü bildirilmektedir (Feldman ve Nelson, 1996; Alaçam, 2005).

Östrojen konsantrasyonu östrüsün başlangıcından önceki 1-2. günlerde pik seviyeye ulaşmaktadır. Östrojen konsantrasyonundaki azalma, ovulasyondan önceki birkaç günde folliküllerin son olgunlaşmasının bir yansıması olarak izlenmektedir. Feldman ve Nelson (1996), azalan östrojen seviyesiyle birlikte, ovaryan folliküler

hücrelerin luteinize olmaya başladığını ve progesteron salgıladığını ifade etmektedirler. Aynı araştırmacılar, progesteronun LH artışından önceki bazal konsantrasyonun üzerine çıktığını, diğer bir deyişle, progesteron sentezleyen ve salgılayan luteinize hücrelerin korpus luteumun gelişiminden önce fonksiyonel olduklarını belirtmektedirler. Bu hücrelerin gözlenebilir kızgınlıkla birleşen progesteron konsantrasyonunda artışa neden olduğunu, yükselen progesteron düzeyinin östrüs davranışının süresine ve şiddetine etkisi bulunduğunu, pek çok köpekte azalan östradiol konsantrasyonu ile artan progesteron konsantrasyonunun maksimum östrüs davranışları için gerekliliğini ifade etmektedirler.

1.1.3. Diöstrüs

Ovulasyonun östrüs içinde olması ve korpus luteumun da östrüs içinde şekillenmeye başlaması, yani metöstrüsün östrüs içinde başlayıp bitmesi sebebiyle, östrüs sonrası anöstrüse kadar geçen bu dönem diöstrüs olarak adlandırılmaktadır (Alaçam, 2005). Diöstrüs, gözlenebilir kızgınlığın bitmesiyle başlamakta ve bu evrenin başından sonuna kadar korpus luteum tarafından progesteron salınmaktadır (Feldman ve Nelson, 1996). Alaçam (2005), östrüsün bitiminden anöstrüse kadar olan bu dönemin ortalama olarak 65 (55-90) gün sürdüğünü belirtmektedir.

Progesteron konsantrasyonu, ovulasyondan önceki 72-96. saatte plazmada bazal konsantrasyonun (>0.5 ng/ml) üzerine yükselmektedir. Bu durum follikülerdeki luteinize hücrelerden kaynaklanan progesteronun, gözlenebilir kızgınlığın başlangıcından itibaren yükselerek artmasıyla şekillenmektedir. Ovulasyondan sonra, korpus luteumun gelişimi folliküler kavite içerisinde meydana gelmekte ve yükselen plazma progesteron konsantrasyonunun kaynağını teşkil etmektedir. Progesteron konsantrasyonundaki pikin, korpus luteumdan kaynaklandığı ve genellikle ovulasyondan sonraki 20-30 günde elde edildiği bildirilmektedir. Aynı zamanda bu

maksimum sekresyon değerinin yaklaşık olarak diöstrusun başlangıcından sonraki 2-3 haftada meydana geldiği ifade edilmektedir (Johnston, 1980).

Concannon ve ark (1977a), progesteron konsantrasyonunun bazal konsantrasyonun üzerine çıkararak genellikle 15-60 ng/ml aralığına ulaştığını ileri sürmektedirler. Bununla birlikte aynı araştırmacılar istatistiksel olarak, gebe köpeklerin diöstrusun başlangıcından sonra birkaç haftada gebe olmayan köpeklere göre fazla bir progesteron konsantrasyonuna sahip olduğunu bildirmektedirler.

1.1.4. Anöstrüs

Anöstrüs, diöstrüsü izleyen bir evredir. Anöstrüs döneminin gebe hayvanlarda yavru lamayla başladığı, proöstrüs ile son bulduğu, gebe olmayan köpeklerde ise diöstrusun bitimiyle başladığı ve kolaylıkla fark edilemediği belirtilmektedir (6). Siklusun anöstrüs evresinde hipofizin ve ovaryumların hormonal açıdan aktif oldukları bildirilmektedir (Feldman ve Nelson, 1996).

Olson ve ark (1982), kısa ömürlü ve klinik olarak izlenemeyen folliküllerin gelişimi ile östrojen hormon konsantrasyonunun anöstrüsün başından sonuna kadar önemli derecede dalgalanma gösterdiğini ileri sürmektedirler. Aynı zamanda östrojen konsantrasyonunda sadece proöstrüsün başlangıcından önce bir azalma olduğunu bildirmektedirler. Feldman ve Nelson (1996), progesteronun anöstrüs sırasında düşük konsantrasyonlarda bulunduğunu, hipofizer FSH'nın tekrarlanan salınımlarının, anöstrüs boyunca follikül gelişimindeki küçük dalgalanmaları stimüle ettiğini ifade etmektedirler. Aynı araştırmacılar bu folliküllerin östrojen sentezi ve sekresyonu ile sirküle eden östrojen konsantrasyonunda hafif artışa neden olduklarını ve bu olayı da

folliküllerin, kısa süreli fonksiyonel bir periyottan sonra tamamen olgunlaşamayarak regrese olmalarıyla açıklamaktadırlar.

1.2. Vajinal Sitoloji

Köpeklerde uygulanan vajinal sitoloji, östrüs siklusunun, endokrin yapının ve reproduktif patolojik oluşumların değerlendirilmesinde geçerli bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Papanicolaou, 1942; Vannuchi ve ark, 1997; Nascimento ve Lopez, 1999; Erüenal-Maral ve ark, 2000).

Vajinal hücreler, vajinal mukoza yüzeyinden spatül, pamuklu bir svap yardımıyla ya da plastik bir katater kullanılarak vajinal kaviteden aspirasyon yoluyla elde edilmektedir. Örnek alınırken yanlış sonuçlar oluşmaması bakımından svabın vestibulum vagina ile temas etmemesine özen gösterilmesi ve bu işlemin spekulum yardımıyla gerçekleştirilmesi gerektiği bildirilmektedir (Concannon ve Digregorio, 1986). Svap yardımıyla alınan örneğin lam üzerinde yumuşak yuvarlama hareketleriyle ilerletilerek preparatın hazırlanacağı belirtilmektedir (England ve Concannon 2002).

Hazırlanan preparatlar çeşitli yöntemlerle boyanabilmektedir. Papanicolaou boyama ile Romanowsky tip boyalar (Wright, Giemsa, Diff-quick) en fazla kullanılan yöntemlerdir. Bunun yanı sıra kolay hazırlanabilen ve ucuz olan Romanowsky tip boyaların, hücrelerin sitoplazmalarını ve çekirdeklerini iyi boyayabildiği ancak çekirdek detaylarının Papanicolaou yönteminde daha iyi izlenebildiği bildirilmektedir (Cowel ve Tyler, 1989). Papanicolaou boyama yönteminde asidofilik indeks nedeniyle

keratinize süperfisiyel hücrelerin kırmızı, diğer hücrelerin ise mavi gözleneceği yapılan çalışmalarda (Aslan ve ark, 1995; Erüenal-Maral 2000) aktarılmaktadır. Romanowsky tip boyalardan olan Giemsa boyama ile Papanicolaou yönteminin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Birdane, 2001), Papanicolaou yönteminin epitel hücrelerin sitoplazma ve çekirdek ayırımında iyi sonuçlar verdiği, Giemsa boyama yönteminde ise diferensiyel hücre sayımında daha iyi sonuçlar elde edildiği ifade edilmektedir.

1.2.1. Östrüs siklusu evrelerinin vaginal sitolojik değerlendirilmesi

Erken proöstrüsteki köpeklerden yapılan vaginal smear ile anöstrüsteki köpeklerden yapılan smear benzerlik göstermektedir. Tek büyük fark, proöstrüs evresinde hızlı gelişen ve endometriumda şekillenen kanamanın sebep olduğu vulvar kanamadır. Bu nedenle vaginal smear değişen sayıda eritrosit ve ayrıca çok miktarda parabazal ile intermediyer hücreler içermektedir. Nötrofiller genellikle çok olmamasına rağmen yaygındır. Bununla birlikte az ya da çok bakteri bulunabilmektedir. Bu dönemde yapılan smearların zemini, az miktarlarda boya alan visköz, servikal ve vaginal sekresyonların bulunması nedeniyle kirli yapıda bir görünüme sahiptir (Feldman ve Nelson, 1996). Orta proöstrüs evresinde yapılan vaginal sitolojide, devam eden östrojen etkisine ilk kanıt nötrofillerin görülmemesidir. Ayrıca bu dönemden itibaren nötrofiller diöstrüsa kadar görülmemektedirler. Bunun yanı sıra parabazal ve küçük intermediyer hücrelerin sayısı azalır ve öncelikle süperfisiyel-intermediyer hücreler (en az % 40-60) ile büyük intermediyer hücreler, parabazal ve küçük intermediyer hücrelerin yerini alırlar. Eritrositler görülmeyebilir ve smearın zemini temiz ya da çok az kirli olmaktadır (Feldman ve Nelson, 1996). Geç proöstrüste vaginal smearda nötrofil izlenmez, kan hücrelerinin varlığı değişkendir ve zemin temiz durumdadır. Vaginal hücrelerin % 80'inden fazlası piknotik nükleuslu veya anükleer süperfisiyel

hücrelerdir. Nükleer ya da anükleer süperfisiyel hücrelerin miktarı % 60'ın altına düşmemektedir. Vaginal smearda proöstrusun süresindeki değişiklikler geç proöstrüs için tipiktir ve gözlenebilir kızgınlıktan önceki 1-8. günlerde izlenebilmektedir (Post, 1985; Feldman ve Nelson, 1996).

Östrüs dönemdeki vaginal sitolojide, fertilizasyon zamanı ve ovulasyon veya LH piki gününü bildiren değişiklikler izlenememektedir. Bununla birlikte eksfoliatif vaginal sitoloji, önceden yükselen östrojen konsantrasyonunun etkilerini göstermektedir (Feldman ve Nelson, 1996). Süperfisiyel hücreler ve anükleer skuamoz hücreler total vaginal hücrelerin % 80'ini, hatta % 100'ünü oluşturmaktadırlar (Lindsay ve Concannon, 1986). Bu evrenin başından sonuna kadar nötrofil gözlenememektedir. Eritrositlerin varlığı ise değişken olmakla birlikte smear zemininin temiz olduğu gözlenebilir (Feldman ve Nelson, 1996).

Proöstrüs boyunca intermediyer ve parabazal hücreler azalırken buna eş zamanlı olarak süperfisiyel vaginal epitel hücreler de artmaktadır. Gözlenebilir kızgınlığın başlangıcında ve LH salınımının yükseldiği gün, vaginal epitel hücrelerin neredeyse tamamını anükleer süperfisiyel hücreler oluşturmaktadır. (Feldman ve Nelson, 1996).

Östrüsün sonunda elde edilen smearlar ile erken östrüsta elde edilen smearlar benzerlik göstermektedir. Östrüsün son bulunduğu 24-48 saatlik periyot içerisinde süperfisiyel hücrelerin % 20 oranına düşmesi, vaginal sitolojik değerlendirmede ani dönem değişikliğini ifade etmektedir (Holst ve Phemister, 1974).

Diöstrüse girmiş bir köpekten elde edilen vaginal smear ile östrüs sonlarındaki bir köpekten alınan örnek kesin olarak birbirinden ayırt edilebilmektedir. Erken östrüs sırasında elde edilen vaginal sitoloji ile gözlenebilir kızgınlığın son günlerinde elde

edilen bulgular arasında bir farklılık bulunmamaktadır. Bu smearlar, % 80'den fazla süperfisiyel hücreler içerirken nötrofil içermezler ve aynı zamanda zemin de temizdir. Östrüs sonundaki 24-48 saatlik periyotta süperfisiyel hücreler yaklaşık olarak % 20 seviyesine düşer ve hakim hücre ise genellikle intermediyer hücrelerdir (Feldman ve Nelson, 1996). LH pikinden sonraki 8-9. günlerde süperfisiyel hücrelerde azalma görülürken parabazal ve intermediyer hücrelerin oranının arttığı bildirilmektedir (England ve Concannon, 2002). Nötrofiller bazen tekrar görülebilir ve zemin kirlidir. Bununla birlikte vaginal epitel hücrelerdeki mikroskopik görünüm genellikle diöstrusun başladığını göstermektedir (Feldman ve Nelson, 1996).

Metöstrum ve köpük hücrelerinin sadece diöstrüste görülebileceği düşünülmekte ve siklusun içinde bulunduğu evrenin ne olduğu araştırılırken herhangi bir şüpheye düşüldüğünde her 2 ya da 3 günde bir smear yapılmasının gerekliliği bildirilmektedir (Holst ve Phemister, 1974; Feldman ve Nelson, 1996).

Diöstrusun ilk birkaç gününü izleyerek elde edilen vaginal smearlar anöstrüs ile benzerlik göstermektedirler. Nötrofiller az sayıda görülebilmekle beraber eritrositler ya yoktur ya da çok az miktardadır. Hakim hücre tipini küçük intermediyer hücrelerin ve parabazal hücrelerin oluşturduğu ifade edilmektedir (Feldman ve Nelson, 1996).

Anöstrüs dönemindeki vaginal sitoloji bulguları nispeten tipiktir. Bu dönemde parabazal ve küçük intermediyer hücreler gözlenir. Nötrofillerin varlığı değişken olmakla birlikte bulunabilir veya bulunmayabilir. Eritrositler genellikle izlenememektedirler. Bakteri ise görülmeyebilir, ancak gözlendiği zamanda da normal florayı temsil ettiği düşünülmelidir. Bunun yanı sıra zeminin boyamadan sonra temiz olduğu ya da bir miktar kirli olabileceği de bildirilmektedir (Feldman ve Nelson, 1996).

1.3. Hormonlar

Hormonlar, endokrin bezlerden salgılanan kan ve lenf ile organizmanın başka bölgelerine, etkileyecekleri hedef doku veya organlara taşınan ve burada bazı değişikliklere sebep olan bir tür kimyasal habercilerdir. Hedef dokulardaki özel reseptörleri ile birleşen hormonlar bu yapının fonksiyonlarını uyarırlar veya durdururlar ya da değiştirirler (Alaçam, 2005). Reprodüktif endokrinoloji; hormonlar ve reseptörlerin biyokimyası, fizyolojisi, farmakolojisi ve moleküler biyolojisi ile ilişkilidir. Endokrin bezler tarafından sentezlenen ve salgılanan hormonlar kan dolaşımı ile taşınarak, hedef organlardaki görevsel aktivitelerini uyararak, inhibe etmek ya da stimüle etmek şeklinde gösterirler. Hedef organların hücrelerinde hormon türüne karşı özel reseptör bölgeler bulunmaktadır (Alaçam, 2005).

Reprodüktif hormonlar hipotalamus, hipofizin ön ve arka lobları, ovaryum ve testis ile uterus ve plasenta olacak şekilde başlıca dört önemli sistemden köken alırlar. Reprodüktif hormonlar etkilerine göre primer ve dolaylı olarak reproduksiyona etkili olan sekonder (metabolik) hormonlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Primer reprodüktif hormonlar; spermatogenezis, ovulasyon, seksüel davranışlar, fertilizasyon, implantasyon, gebeliğin devamı, doğum, laktasyon ve maternal davranışlar üzerinde önemli rol oynarlar. Sekonder reprodüktif hormonlar ise bunların etkilerine yardımcı olurlar (Alaçam, 2005). Hormonlar oluştukları yer, yapı ve işlevine göre sınıflandırılabilirler (Yılmaz, 1999).

1.3.1. Peptid ve polipeptid yapısında olanlar

Hipotalamusta oluşan hormonlar bu grupta yer almakla birlikte prolaktin salınımını kısıtlayan hormon bunların dışında olup dopamin yapısındadır. Ayrıca hipotalamusta

oluşan ve neurohipofizde depo edilen oksitosin ve antidiüretik hormon (vazopressin) peptit, paratrioitlerden salınan parathormon, tiroitler ve başka yerlerden salınan kalsitonin, pankreastan salınan insülin ve glukagon; mide, duodenum ve pankreastan salınan gastrin; duodenum ve jejunumdan salınan sekretin polipeptit yapısındadır (Yılmaz, 1999). Hipotalamus, hipofizin anterior lobundan gonadotropinlerin salgılanmasını kontrol eder. Reprodüksiyonu düzenleyen, hipotalamustan salgılanan hormonlar; GnRH, FSH, LH; adrenokortikotrop hormon (ACTH) ve prolaktin inhibe edici faktördür. Ayrıca hipotalamus oksitosin ve vasopresin kaynağıdır. Hipofiz hormonlarının kana salınımı sikliktir. FSH ve LH sürekli küçük dozlar şeklinde kana salınmaktadır. Adenohipofiz FSH, LH ve prolaktin olmak üzere 3 önemli gonadotropik hormon salgılar. Neurohipofiz hormonları olarak bilinen oksitosin ve vasopresin (antidiüretik hormon ADH) hipotalamusta sentezlenir ve neurohipofizde depo edilir. Oksitosin ayrıca korpus luteum tarafından da üretilir. Bundan dolayı ovaryum ve hipotalamus olarak iki orjinlidir.

1.3.2. Protein yapısında olanlar

Adenohipofizden salınan büyüme hormonu, adrenokortikotrop hormon (ACTH), prolaktin (PRL), böbreklerden salınan renin, anjiotensin ve ovaryumlardan salınan relaksindir (Yılmaz, 1999).

1.3.3. Aminoasit türevi hormonlar (amin hormonlar)

Adrenal medulladan ve diğer yerlerden salınan epinefrin (adrenalin), norepinefrin (noradrenalin), dopamin, mide ve bağırsaktan salınan serotonin, epifizden salınan

melatonin ve ayrıca tiroitten oluşan tiroksin (T4) ile triiodotironin (T3) de aminoasit türevi hormonlardır.

1.3.4. Glikoprotein yapısında olanlar

Ön hipofizden salınan tirotropin (TSH), follikül uyarıcı hormon (FSH), lüteinleştirici hormon (LH), böbreklerde oluşan eritropoetin, trofoblast hücrelerinden salınan korion gonadotrop hormonları (gebe kısrak serum gonadotropini ve insan korionik gonadotropin hormonu) glikoprotein yapısındadır (Yılmaz, 1999).

1.3.5. Steroid yapıda olanlar

Steroid hormonlar, nöranal sistemler ve immun sistem ile birlikte endokrin sistemin bir parçası olarak vücut fonksiyonlarının kontrolünde önemlidirler. Steroidleri çok düşük konsantrasyonlarda bile aktiftirler ve homeostasis gibi geniş bir biyolojik etkiye sahiptirler (Nozaki 2001). Böbrek üstü korteksinden salınan aldosteron, deoksikortikosteron, kortikosteron, hidrokortizon, kortizon ve kortizol; ovaryumlar, plasenta ve böbreküstü bezi korteksinden salınan östrojenler (östradiol, östron, östriol), progesteron; testislerden ve böbreküstü korteksinden salınan androjenler (androstenedion) steroid yapısındaki hormonlardır (Yılmaz, 1999). Sekresyon özellikleri cinsiyet kromozomlarına bağlıdır. Embriyonik gonadtan ovaryum gelişirse primer cinsiyet steroidi östrojen ve progesteron, testis gelişirse androjenler salınmaktadır (Yılmaz, 1999).

Steroid hormonlar, peptid ve glikoprotein hormonlardan farklı olarak, küçük ve basit moleküller olup vücut sıvılarında düşük oranda erime özelliklerine rağmen lipid hücre zarlarından kolayca geçebilirler. Çoğu steroid kanda, taşıyıcı proteinine bağlı olarak dolaşmaktadır (Yılmaz, 1999).

1.3.5.1. Steroid hormon tipleri ve fonksiyonları

Glikokortikoidler adreno-korteksten salınırlar ve en önemli glikokortikoid kortizoldür. Glikokortikoidleri stres, şok ve yangından korunma gibi fonksiyonlarda önemli rol oynarlar (Nozaki, 2001). Sentetik glikokortikoidler doğal glukokortikoidlere benzeyen antiinflamatuvar, antişok ve anti stres fonksiyonları gibi fonksiyonlara sahiptirler ve betamethazon en sık bilinen sentetik glikokortikoidtir (Nozaki, 2001). Mineralokortikoidleri kan basıncının devamı ve su ve elektrolit (sodyum ve potasyum) homeostazisinde rol oynarlar. Adrenokorteksten salınan mineralokortikoidlerin en sık bilineni ise kortikosterondur (Nozaki, 2001).

Cinsiyet hormonları da steroid yapısında olan hormonlardır. Androjenler testis ve adrenokortekten salınır ve major androjen testosterondur. Androjenler kas hacminin artmasından ve ayrıca prostat kanser hücrelerinin büyümesinden sorumludurlar (Nozaki, 2001). Östrojenler ovaryumlardan salınırlar ve sıklıkla östradiol öne çıkmaktadır. Östrojenler seksüel siklusun düzenlenmesinde ve meme ile kemik dokunun gelişmesinde rol oynamaktadırlar. Diğer taraftan östrojenler meme kanser hücrelerinin büyümesine neden olmaktadır (Nozaki, 2001). Östrojen, follikülün teka interna hücrelerinden ayrıca dişilerde plasenta, erkeklerde sertoli hücreleri tarafından sentezlenir. Ovaryumdan salınan aktif primer östrojen, östradioldür. Diğer aktif östrojenler ise östron ve östrioldür. Östrojenler inek ve koyunlarda luteolitik etkilidir (Alaçam, 2005). Progestinler ise seksüel siklusun luteal evresinde görev alırlarken uterus endometriumun maturasyonunda da rol almaktadırlar (Nozaki, 2001).

Progesteron korpus luteumdaki luteal hücreler, plasenta ve adrenal bezden salgılanır. Salınımı LH tarafından stimüle edilmektedir. Gebeliğin devamında etkili bir hormondur (Alaçam, 2005).

1.3.5.2. Steroid yapısı ve steroid analizi

Steroidler vücutta serbest ve konjuge formlarda bulunmaktadır. Serbest steroidler oldukça hidrofobik ve konjuge formları ise (glukuronid ve sülfat) hidrofiliktir. Steroidlerin sudaki çözünürlüğü örneklerden toplanma şekline göre değişkenlik göstermektedir. Steroidlerin molekül ağırlıkları 200-1000 arasında değişmekte ve non-volatil bir form sergilemektedirler. Bu nedenle gaz kromatografi (GC) analizlerin için derive edilmeleri gerekmektedir. Steroidlerin fonksiyonel gruplarının çoğu hidroksil ve keton grupları olmakla birlikte bunlar kimyasal reaktivite için zayıftırlar. Bu durum steroidler için yüksek duyarlılıkta tespit sağlayan floresans, kemiluminesans veya kütle spektrometri (MS) metodları için bir dezavantajdır (Nozaki, 2001).

Steroidlerin klinik analizlerinde idrar, kan ve salivadan yararlanılmaktadır. Bu örneklerdeki steroidler serbest konjuge veya proteine bağlı formlarda bulunabilmektedir (Nozaki, 2001).

İdrar örnekleri serbest ve konjuge formlarda steroidler içermektedirler. Konjuge steroidler idrarda %99.7'lik bir oranda tespit edilebilmektedirler. Konjuge steroidler analiz öncesi serbest form haline dönüştürülmeleri için sıklıkla güçlü bir inorganik asit (konsantre sülfirik asit, hidroklorik asit veya nitrik asit) ile ya da sülfataz veya glukuronidaz enzimleri ile hidrolize edilmektedirler. Steroidlerin konjuge formları konjugasyon enzimlerinin (delta 4-hidrojenaz, steroid dehirojenaz, hidroksilaz) konjuge olma kapasiteleri hakkında bilgi vermeleri açısından önemlidirler

ve bu nedenle ölçümleri yüksek performans likit kromatografi (HPLC)-MS ile yapılmaktadır. En yoğun olarak kullanılan MS tipi negatif kimyasal iyonizasyon tipidir (Nozaki, 2001).

İdrardaki steroidlerin serbest formları analiz edilebilmeleri için düşük düzeylerde seyretmektedir. Bu nedenle idrar örnekleri analiz öncesi oktadesil silika (ODS, C₁₈) veya BSA-ODS (sığır serum albuminine bağlı ODS) jel ile muamele edilmektedir (Nozaki, 2001).

Serum örneklerindeki steroidler üç formda bulunmaktadırlar. Bunlar serbest form, albumine bağlı form ve globuline bağlı formdur. Steroidlerin sadece serbest formları biyolojik olarak aktif iken albumin ve globuline bağlı formları inaktiftirler. Serbest serum steroidleri hakkında bilgi elde etmek için serum örnekleri dializ veya membran filtrasyon yöntemler ile ultrafiltrasyona maruz bırakılmaları gerekmektedir (Nozaki, 2001).

Konjuge olmamış serum steroidlerinin büyük bir kısmı serum globulinine bağlanmış durumdadır. Androjenler, östrojenler ve progestinler gibi steroid yapıdaki cinsiyet hormonları globulinlere bağlanırlar (cinsiyet hormonu bağlayan globulin, SBG) ve kortikosteroid hormonlar da yine globuline bağlanmaktadır (kortikosteroid bağlayan globin, CBG). Globuline bağlanan bu steroidler diğer steroidler gibi herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip değildirler. Steroidleri SBG veya CBG'ye bağlanma kuvvetleri oldukça güçlüdür ve bu steroidleri organik bir solvent veya C₁₈ jel yardımıyla ayrılırlar (Nozaki, 2001).

Serumda albumine bağlanmış durumda olan serbest steroidler ve albumine bağlanan steroidler biyolojik aktivite göstermezler. Steroidlerin albumine bağlanma güçleri çok zayıftır ve albuminden organik çözücüler (diklorometan, etil asetat ve dietil eter) ve C₁₈ jeller ile kolaylıkla ayrılırlar (Nozaki, 2001).

Saliva içerisinde konjuge olmayan steroidler serbest halde bulunurlar ve serumdaki serbest steroid düzeyleri ile iyi bir korelasyon içerisindeyler. Bu nedenle serbest salivar steroid analizleri serumdaki serbest steroidler hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılabilir. Serbest salivar steroid analizleri serbest serum steroid analizlerine göre invaziv olmayan bir metottur ve örnek toplama işlemleri daha kolay yürütülebilir (Nozaki, 2001).

Kıllardan steroid analizi günümüzde popüler bir hal almamış olmakla birlikte anabolik steroidleri, dehidroepiandrosteron, östrojen, progesteron ve kortikosteroid analizlerinin alkaline muamelesinden sonra GC veya HPLC-MS yöntemleriyle tespit edilebildiği bildirilmektedir (Nozaki, 2001).

1.3.5.3. Steroid analizinde kullanılan yöntemler

Steroidlerin GC, HPLC veya kapillar elektroforezis (CE) ile seperasyon analizleri her bir örnek için çok uzun süren (40-60 dakika) işlemlerdir. Bununla birlikte ekstraksiyon ya da derivatizasyon işlemleri de mevcut işlemlerin süresini daha da arttıran prosedürlerdir. Steroidlerin klinik analizleri için daha kısa zamanda sonuçlar alınması gerekmektedir (Nozaki, 2001). Bu amaçla geliştirilmiş pek çok yöntem bulunmakla birlikte klinik uygulamalar açısından sıklıkla kullanılan RIA ve günümüzde kullanım alanı bulan ECLIA bu yöntemlerdendir.

İşaretlenmiş antijen veya antikorların tespit edilmesi prensibine dayalı olan radioimmunoassay (RIA) yarışmalı bağlanmayı sergilemektedirler ve denge analizi ile ardışık analiz olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Serum örneği içerisinde bulunan işaretlenmiş ve işaretlenmemiş her iki antijen spesifik antikor üzerindeki bağlanma

bölgelerini eş zamanlı olarak tamamlamaya çalışmaktadırlar. Denge analizinde antikorun işaretlenmiş ve işaretlenmemiş antijen kombinasyonu serbest işaretlenmiş ve işaretlenmemiş antijenden ayrıştırılmaktadır. Serbest işaretlenmiş antijenin bağlanma oranı serumdaki işaretlenmemiş antijenin konsantrasyonuyla ters orantılıdır.

1.3.5.3.1. Radioimmunoassay (RIA)

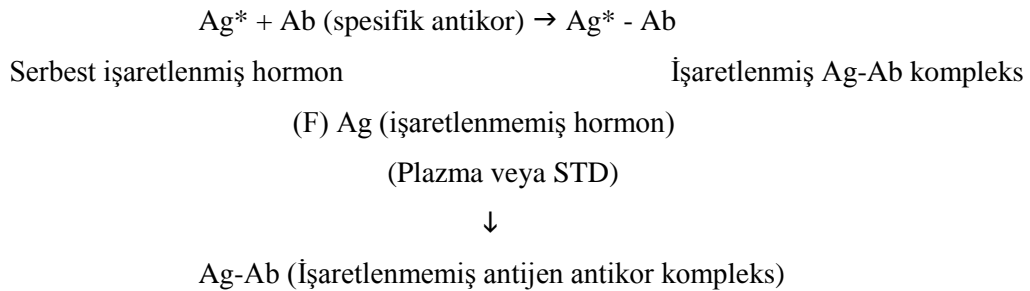
Radyo aktif iodin (^{125}I) sıklıkla immunoassay işaretleyici olarak kullanılmaktadır ve yaydıkları gamma ışınları solid gamma zerrecikleri sayıcıları yardımıyla tespit edilebilmektedir. Hormonlar gibi herhangi bir örnekte bulunan bağlanmış veya bağlanmamış antikor fraksiyonları arasındaki içeriğin dağılımını ölçmeye imkan sağlamaktadırlar. Teknik antikor alanlarında sınırlı sayıda ölçülebilir miktardaki işaretlenmiş antijene karşılık gelen antijen (^{125}I -işaretlenmiş tiroksin) ile işaretlenmemiş antijen (örnek içeriğinde bulunan tiroksin) arasındaki yarışma temeline dayanmaktadır. Bilinmeyen antijenin bağlanmamış fraksiyonu gamma sayıcılar yardımıyla özel yıkama teknikleri kullanılarak antikora bağlanan ^{125}I ile işaretlenmiş antijenin tespit edilmesiyle ortaya koyulabilmektedir. ^{125}I γ -radyasyon yaymaktadır. Elektromagnetik radyasyonlar X ışınlarına göre daha kısa dalga boyuna sahiptirler. Gamma radyasyonları yüksek penetrasyon gösteren düşük iyonizasyon gücü sergilerler. Bu durum gamma sayıcılar ile ölçülebilmektedir. ^{125}I tarafından üretilen gamma radyasyonun tespit edilmesi işaretlenmiş antijenin (örnekteki mevcut işaretlenmemiş antijen) konsantrasyonunu indirekt olarak ölçülmesini sağlamaktadır. Sodyum iodid kristalleri %1 thallium ile aktive edildikten sonra solid zerrecik olarak kullanılmaktadır. Antijen-antikor-(^{125}I)/işaretlenmiş antijen reaksiyonundan sonra ve yıkama sonrası gerçekleştirilen prosedür kısaca aşağıdaki gibidir (Tembhare, 2008).

- 1- Sodyum kristal iodid kristali tüpü fotomultiplier tüpü üzerine kristal tarafından 410 nm boyutunda salınan ışık atımlarının tespiti için yerleştirilir.

- 2- Test tüpü içerisindeki yüksek penetrasyon özelliğine sahip gamma ışınları sodyum iodid kristallerine çarpar ve fotonlar salınır.
- 3- Elektron salınımını arttıran sinyalleri amplifiye eden fotonlar fotomultiplier yardımıyla tespit edilir.
- 4- Fotoamplifier tüğ preamplifier ile desteklenir.
- 5- Amplifiye edilmiş atımlar atım yükseklik ölçen cihaz ile ölçülerek kaydedilir.
- 6- Atım sayıları ve atımlar arası süre hesaplanır.
- 7- Elde edilen veriler kantitatif olarak değerlendirilir.

İşaretlenmiş antijen spesifik bir antikoruna bağlanır ve RIA sisteminin kullanabileceği işaretlenmiş bir Ag-Ab kompleksini oluşturur. Plazma veya herhangi bir solüsyondaki işaretlenmemiş hormonun, antikor için işaretlenmiş hormon ile yarışma kabiliyeti işaretlenmiş Ag-Ab kompleksinin formasyonunu azaltmaktadır. Antikora bağlanmış İşaretlenmiş hormon (B) ile serbest işaretlenmiş hormonun (F) yarışmalı inhibisyon oranının bir sonucu olarak (B/F) işaretlenmemiş hormonun konsantrasyonundaki artışın oranı progresif olarak düşmektedir. Bilinmeyen bir örnekteki konsantrasyon bilinen değerlerdeki hormon içeren standart solüsyon tarafından üretilen inhibisyonun karşılaştırılmasıyla elde edilmektedir. Elde edilen değerlerin okunması γ -sayıcı temelli mikroprosesör üzerinden yapılmaktadır. RIA tekniği yüksek spesifitesi, sensitivitesi, doğruluğu ve kesinliğinden dolayı serumda bulunan hormonların tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. RIA sistemleri, spesifik antijen ve antikor arasındaki yarışmalı bağlanmayı içermektedir (Çizelge 1.1.) (Tembhare, 2008).

Çizelge 1.1. RIA tekniğinde çalışma prensibi (Tembhare, 2008). Ag: antijen, Ab: antikor



Radyoimmunoassay tekniği ile serum T₃, T₄, TSH, FSH, LH, prolaktin, östradiol, progesteron ve 17-OH-progesteron hormonları ölçülebilmektedir (Tembhare, 2008).

Radyoimmunoassay teknikleri enzim bağlantılı immunosorbent assay (ELISA) ile iletirilmiştir. ELISA tekniği de indirek ELISA, yarışmalı ELISA, kemiluminesens ELISA gibi farklı uygulama tekniklerine göre ayrılmaktadır. Diğer immunoassay teknikleri ELISPOT assay, western-blot, immunofluoresens, flow sitometri ve immunoelektron mikroskopi olarak sayılabilmektedir (Tembhare, 2008).

1.3.5.3.2. Luminesens Metodları

Luminesens metotlarının pek çok çeşidi analitik kimyada sıklıkla kullanılmaktadır (Çizelge 1.2.). Bunlardan radyokemiluminesens (RCL), Lyoluminesens (LL) ve Sonoluminesens, fotoluminesens (PL) ve kemiluminesens (CL)'ten daha az sıklıkta kullanılmaktadır (Kulmala ve Suomi, 2003). Pahalı optikler ve ışık kaynaklarına olan ihtiyaç bir tarafa bırakıldığında, PL en önemli analitik luminesens metodu olarak değerlendirilmeye devam edecektir ve CL'nin farklı formları PL'nin spesifik uygulama alanlarında yarışmaya devam edecektir. PL iki temel alt sınıfa ayrılabilir ki bunlar fluoresens ve fosforesenstir. CL'nin en çok yönlü tipinin elektrokemiluminesens (ECL) olduğu ifade edilmektedir. ECL tipik olarak aynı luminofor molekülününün birkaç zamanda uyarılmasına izin verir ve kolaylıkla zaman çözömlü ölçümlerin yapılmasına olanak sağlarken, diğer CL metotlarında bir molekülün uyarılma olayı tek zamanlı olarak yürütölmekte ve sonrasında da molekül yok olmaktadır. Zaman çözömlü ölçümler ECL'ye göre CL metodunda kullanışsız veya çok zordur (Kulmala ve Suomi, 2003).

Çizelge 1.2. Farklı luminesens tipleri (Kulmala ve Suomi 2003).

Luminesens Tipleri	Oluşum Şekli
Fotoluminesens (PL)	Bileşiklerin Foto-uyarımı
Kemiluminesens (CL)	Bileşiklerin kimyasal uyarımı
Elektrokemiluminesens (ECL)	Elektrik ile üretilmiş kimyasal uyarım
Radyokemiluminesens (RCL)	Radyasyon ile indüklenmiş kimyasal uyarım
Lyoluminesens (LL)	Irradiye veya diğer solid enerji dağılması yardımıyla indüklenmiş uyarım
Sonoluminesens (SL)	Ultrasonik olarak bileşiklerin uyarılması

Elektrokemiluminesens bazı solüsyon türleri veya elektrot yüzeyine bağlanan türleri ile bir elektrot arasındaki elektron transferinin bir sonucu olarak direkt ya da indirekt olarak üretilen kemiluminesens olarak ifade edilebilmektedir. Diğer taraftan elektrokemiluminesens elektrik ile üretilen kemiluminesens ile herhangi bir farklılık göstermediği de ileri sürülmektedir (Kulmala ve Suomi, 2003).

Ticari olarak kullanılan $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ işaretleyicileri temel almış ECL metotları çok sayıda işaretleyici veya internal standartların kullanımına izin vermemektedir. Buna karşın, yeni geliştirilen sıcak elektron ile indüklenmiş ECL teknolojisi internal standardizasyon ve çoklu işaretleyici kullanımında daha iyi sonuçlar sergilemektedir. Tünel emisyon elektrodlarından aköz solüsyonlar içerisine sıcak elektron transferi farklı işaretleyicilerden salınan sinyallerin ayrılmasında dalga boyunun ve zaman ayırımının ve hatta her ikisinin kombinasyonuna olanak vermektedir. Elektro kemiluminesensin çalışma prensibi kısaca bir akım jeneratörü yardımıyla anodik ve katodik kutuplar arasında çalışan bir elektrodun hızlı bir şekilde pulzasyon üretmesi olarak ifade edilebilmektedir. En önemli göze çarpan özelliği ise oda sıcaklığında

redoks reaksiyonu yoluyla doğrudan üçlü uyarım elde edilebilmesidir (Kulmala ve Suomi, 2003).

Küçük hayvan reproduksiyonu ile ilgilenen Veteriner Hekimler, sıklıkla etkili uygun çiftleşme ve sun'i tohumlama zamanının belirlenmesi, doğum zamanının tespit edilmesi ve hipoluteodizm gibi patolojik durumların belirlenebilmesi için serum progesteron ve 17 β -östradiol ölçümüne ihtiyaç duymaktadırlar (Concannon ve ark, 1977a; Johnston ve ark, 2001). RIA tekniği pek çok klinisyen ve akademisyen tarafından hormon ölçümlerinde altın standart olarak değerlendirilmekle birlikte günümüzde tehlikeli radyoaktif materyal ile çalışılıyor olması, lisans sahibi olmayan laboratuvarların kullanamıyor olması, uygulama zamanının uzun olması kadar pahalı bir yöntem olması diğer başka analitik yöntemlerin kullanılmasını zorunlu kılmaktadır (Hannon ve ark, 2004; Chapwanya ve ark, 2008). İnsanlarda kullanılan RIA tekniği yerini daha güncel tekniklere bırakırken veteriner sahada da bu tür çalışmalar devam etmektedir. Bununla birlikte kemiluminesens yöntemi ile bazı çalışmalar bulunurken (Kutzler ve ark, 2003; Chapwanya ve ark, 2008) ECLIA ve RIA yöntemleri ile östrojen ve progesteronun karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle sunulan çalışmada, seksüel siklusun değişik dönemlerindeki köpeklerin serum örneklerinde RIA yöntemiyle ölçülen progesteron ve 17 β -östradiol düzeylerinin ECLIA yöntemiyle karşılaştırılarak, ECLIA yönteminin köpeklerde progesteron ve 17 β -östradiol düzeyinin belirlenmesindeki doğruluğunun tespit edilmesi amaçlandı.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmanın materyalini, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Hastanesine ovariohisterektomi amacıyla getirilen çeşitli ırklardan, ergin, sağlıklı ve en az 1,5 yaşını dolduran 25 adet dişi köpek oluşturdu. Hayvanların yaşının belirlenmesinde Samsar ve Akın (80)'ın bildirdiği yöntem kullanıldı.

2.2. Yöntem

Çalışmada yer alan köpeklere östrüs siklusu evresini belirlemek için vaginal smear yapıldı. Vaginal sitoloji için örnek alınmasını takiben 10 ml'lik steril vakumlu tüplere kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen serum örnekleri sonraki östrojen ve progesteron analizleri için -20 °C'de muhafaza edildi.

Uygun tekniğe göre ovariohisterektomi gerçekleştirilerek serviksin hemen önünden korpus uteri ile birlikte her iki kornu uteri ve ovaryumlar operatif olarak uzaklaştırıldı. Postoperatif olarak köpeklere 100.000 IU prokain penisilin, 100.000 IU benzatin penisilin G, 200 mg dihidrostreptomisin 1-2 ml/25 kg (Penoksal LA, Vilsan) dozda kas içi uygulanarak hayvanların postoperatif tedavileri sağlandı.

2.2.1. Vaginal Sitoloji

Vaginal smear örneklerin alınması için; vaginal spekulum, steril pamuklu svap, serum fizyolojik ve lam kullanıldı. Alınan örneklerin boyama ve değerlendirme işlemlerinde ise Giemsa boya solüsyonu (Merck), distile su, etil alkol (%96) ve ışık mikroskobu (Olympus) kullanıldı. Her hayvandan iki adet örnek alındı. Öncelikle, temiz iki adet lam ile birlikte serum fizyolojik ile ıslatılmış olan iki adet steril pamuklu svap hazırlandı. Antiseptik solüsyondan geçirilen vaginal spekulum vulva dudakları arasından 45 °'lik açıyla dorsal yönde yerleştirilerek ileriye doğru ilerletildi. Vaginaya yerleştirilen spekulum açılarak önceden serum fizyolojik damlatılmış olan steril pamuklu svap, vulva ve spekulumla değdirilmeden vaginanın kaudo-dorsaline ulaştırıldıktan sonra vagina mukozasından kendi eksenine etrafında döndürülme suretiyle gerekli örnek alındı. Daha sonra svap spekulum ve vulvaya değdirilmeden dışarı çekildi. Svap, lam üzerine yerleştirildikten sonra, yuvarlama hareketiyle ilerletilerek film tarzında bir hat oluşturuldu ve havada kurutulmaya bırakıldı. Aynı yöntemle ikinci bir preparat daha hazırlandı.

Hazırlanan preparatlar, Giemsa boyama yöntemine göre aşağıda belirtildiği şekilde boyandı. Bu amaçla;

- Havada kurutulmuş preparatlar üzerine %96'lık etil alkol dökülerek, 10 dakika beklemek suretiyle fikzasyonu sağlandı.
- Fikse olan preparatlar distile su ile yıkandı.
- Giemsa stok solüsyonundan her preparat için 5 damla alınarak 5 ml distile su ile karıştırıldı. Preparatlar bu solüsyon ile boyandı.
- Preparatlar 30 dakikalık bir boyanma sürecine alındı.
- Boyama sonunda distile su ile yıkanan preparatlar kurumaya bırakıldı.

Elde edilen preparatlar, ışık mikroskobunda 40'lık büyütmede incelenerek hücre sayımı yapıldı. Hücreler sayılırken; hücrelerin üst üste gelmemiş, yapılarının

bozulmamış olmalarına dikkat edildi. Toplam 100 adet hücre sayılarak gözlenen hücre oranları belirlendi ve kaydedildi.

2.2.2. Serumda RIA ve ECLIA yöntemlerine göre progesteron ve 17 β -östradiol analizleri

2.2.2.1. RIA

Progesteron analizleri için immunojen olarak Progesteron-11 α -BSA kullanılan liyofilize tavşan antiserumu (P 5289, Sigma) seçilerek RIA protokolü yürütüldü. Liyofilize antiserum toza 0.1 M NaCl, %0.1 Gelatin (G2500) ve %0.1 sodyum azid içeren 5 ml Tris-HCL (T 3253) buffer (0.05 M, pH 8.0) eklendi. Polipropilen test tüpleri içerisine 0.1 ml örnek ile standart ve 0.5 ml antiserum eklendi. Tüpler vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Buffer içerisinde taze hazırlanmış 0.1 ml radyoaktif traser tüplere eklendi ve vortekslendi. Tüpler 37 °C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra 4 °C'de 15 dakika boyunca bekletildi. Hızlı bir şekilde 0.2 ml dekstran kaplamalı kömür (³H-RIA) süspansiyonu tüplerle eklendi ve vortekslendi. Tüpler 0 °C'de 10 dakika inkübe edildi ve 4°C'de 15 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Her tüpteki süpernatant uzaklaştırılarak radyoaktivite varlığı tespit edildi.

17 β -östradiol analizleri için immunojen olarak 17 β -östradiol-6-BSA kullanılan liyofilize tavşan antiserumu (E 2885, Sigma) seçilerek RIA protokolü yürütüldü. Liyofilize antiserum toza 0.1 M NaCl, %0.1 Gelatin (G2500) ve %0.1 sodyum azid içeren 5 ml Tris-HCL (T 3253) buffer (0.05 M, pH 8.0) eklendi. Polipropilen test

tüpleri içerisine 0.1 ml örnek ile standart ve 0.5 ml antiserum eklendi. Tüpler vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Buffer içerisinde taze hazırlanmış 0.1 ml traser tüplere eklendi ve vortekslendi. Tüpler 37 °C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra 4 °C'de 15 dakika boyunca bekletildi. Hızlı bir şekilde 0.2 ml dekstran kaplamalı kömür (³H-RIA) süspansiyonu tüplerle eklendi ve vortekslendi. Tüpler 0 °C'de 10 dakika inkübe edildi ve 4°C'de 15 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Her tüpteki süpernatant uzaklaştırılarak radyoaktivite varlığı tespit edildi.

Test sırasında kullanılan reaktifler ve çalışma solüsyonları (Sigma) aşağıdaki gibi oluşturuldu:

- Standart: Stok standart solüsyonu absolut etanol içerisindeki 1 µg/ml 17β-östradiol (P 0130) ile oluşturuldu. Stok standart solüsyonu 500 pg/0.1 ml konsantrasyonda dilüe edildi. Daha sonraki dilüsyonlar sırasıyla 15, 31, 63, 125, 250 pg/0.1 ml olacak şekilde düzenlendi.
- 0.1 M NaCl, %0.1 Gelatin (G 2500) ve %0.1 sodyum azid içeren Tris-HCL (T 3253) buffer (0.05 M, pH 8.0)
- Dekstran kaplı kömür solüsyonu

2.2.2.2. ECLIA

Köpek serumunda progesteron ve östradiolün in vitro kantitatif tayini için cobas e601 (Roche, Almanya) immünolojik test analizöründe immünolojik bir test olan elektrokemiluminesens immünolojik test (ECLIA) kullanıldı.

Progesteron analizleri için toplam test süresi 18 dakika sürdü. 1. İnkübasyon; biyotinli monoklonal progesteron-spesifik antikor ile birlikte 30 µL numune ve rutenyum kompleksi (Tris (2,2'-bipiridil)rutenyum(II)-kompleks (Ru(bpy)₃²⁺) ile işaretlenmiş progesteron türevi Danazol ile birlikte inkübe edildi ve progesteronun serbest kalması sağlandı. Dolayısıyla numuneden gelen progesteronun antikor bağlanma yeri için işaretlenmiş progesteron türevi ile yarışması sağlanmış oldu. 2. İnkübasyon; streptavidin kaplı mikropartiküller eklendikten sonra biyotin ile streptavidin etkileşimi aracılığı ile kompleks katı faza bağlanmış hale getirildi. Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edildi. Daha sonra bağlanmamış maddeler ProCell ile uzaklaştırıldı. Elektrod üzerine voltaj uygulanması ile kemilüminesans emisyonu sağlanarak foton sayıcı ile ölçüldü. Sonuçlar, 2 noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkod aracılığıyla edinilen ana eğri ile tayin edildi.

Test sırasında kullanılan reaktifler ve çalışma solüsyonları aşağıdaki gibi oluşturuldu:

- M: Streptavidin kaplı mikro partiküller (0,72 mg/mL; koruyucu madde)
- R1: Anti-progesteron-Ab-biyotin (Biyotinli monoklonal anti-progesteron antikor (fare); 0,15 mg/L, fosfat tamponu 25 mmol/L, pH 7,0; koruyucu madde)
- R2: Progesteron-peptid-(Ru(bpy)₃²⁺) (Rutenyum kompleksi ile işaretli bir sentetik peptide bağlanmış progesteron (bitki kaynaklı), 10 ng/mL;fosfat tamponu)

Kullanılan testeki ölçüm aralığı 0,095-191 nmol/L (alt ölçüm sınırı; 0,030 ng/mL, ana eğrinin maksimum değeri; 60,00 ng/mL) ve fonksiyonel duyarlılığı ise 0,48 nmol/mL (0,15 ng/mL) değerlerinde değişti.

Östradiol analizleri için toplam test süresi 18 dakika sürdü. 1. inkübasyon; biyotinli östradiol-spesifik antikor ile birlikte 35 µL numune ile birlikte inkübe edildi ve bir immunokompleks oluşturulması sağlandı. 2. İnkübasyon: Streptavidin kaplı mikropartiküller ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş östradiol antikor-hapten kompleksinin formasyonu ile boş alanlara sahip biyotinli antikorlar oluşturuldu. Biyotin ile streptavidin etkileşimi aracılığı ile kompleks, katı faza bağlanmış hale getirildi. Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edildi. Daha sonra bağlanmamış maddeler ProCell ile uzaklaştırıldı. Elektrod üzerine voltaj uygulanması ile kemilüminesans emisyonu sağlanarak foton sayıcı ile ölçüldü. Sonuçlar, 2 noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkod aracılığıyla edinilen ana eğri ile tayin edildi.

Test sırasında kullanılan reaktifler ve çalışma solüsyonları aşağıdaki gibi oluşturuldu:

- M: Streptavidin kaplı mikro partiküller (0,72 mg/mL; koruyucu madde)
- R1: Anti-östradiol-Ab-biyotin (Biyotinli poliklonal anti-östradiol antikor (tavşan); 45 ng/mL, mestereon 130 ng/mL MES buffer 50 mmol/mL, pH 6,0; koruyucu madde)
- R2: Östradiol-peptid-(Ru(bpy)₃²⁺) (Rutenyum kompleksi ile işaretli bir sentetik peptide bağlanmış östradiol, 2,75 ng/mL, MES buffer 50 mmol/L, pH 6,0; koruyucu madde)

Kullanılan testeki ölçüm aralığı 18,4-15,781 pmol/L (alt ölçüm sınırı; 5,00 pg/mL, ana eğrinin maksimum değeri; 4300 pg/mL) ve fonksiyonel duyarlılığı ise 0,44 pmol/L (12 pg/mL) değerlerinde değişti.

2.2.3. İstatistiksel değerlendirmeler

Herbir hayvandan elde edilen serumların RIA ve ECLIA yöntemlerine göre progesteron ve 17 β -östradiol analizleri sonucunda elde edilen veriler regresyon analiz ile karşılaştırıldı (SPSS 16.0).

3. BULGULAR

3.1. Vajinal sitoloji

Çalışmada değerlendirilen köpeklerin (n = 25) % 60'ının anöstrüste (n = 15), % 16'sının proöstrüste (n = 4), % 16'sının östrüste (n = 4) ve % 8'inin (n = 2) diöstrüste oldukları belirlendi.

3.2. RIA ve ECLIA yöntemlerine göre progesteron ve 17 β -östradiol değerleri

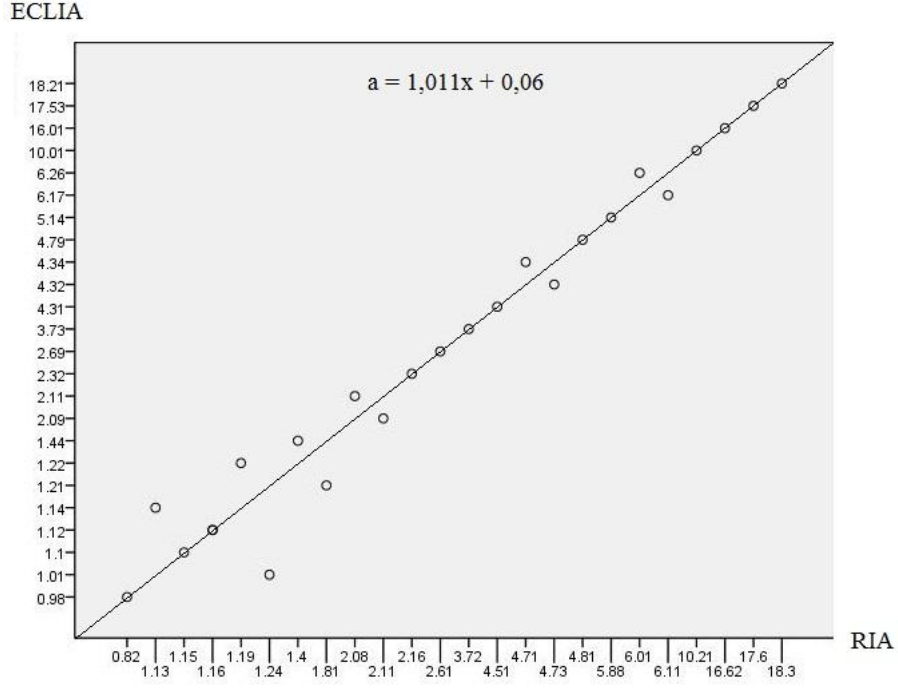
Anöstrüs, proöstrüs, östrüs ve diöstrüs dönemlerinde bulunan köpeklerin RIA ve ECLIA yöntemlerine göre ortalama progesteron ve 17 β -östradiol değerlerinin Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Seksüel siklusun farklı dönemlerinde RIA ve ECLIA yöntemleriyle elde edilen ortalama progesteron (ng/ml) ve 17 β -östradiol (pg/ml) değerleri (\pm SEM).

	Progesteron (ng/ml)		17 β -östradiol (pg/ml)	
	RIA	ECLIA	RIA	ECLIA
Anöstrüs	3,04 \pm 0,43	2,89 \pm 0,40	6,26 \pm 0,21	6,20 \pm 0,22
Proöstrüs	1,14 \pm 0,11	1,20 \pm 0,09	19,34 \pm 0,25	19,28 \pm 0,37
Östrüs	15,68 \pm 1,85	15,44 \pm 1,86	9,06 \pm 0,69	9,11 \pm 0,68
Diöstrüs	3,68 \pm 2,43	3,59 \pm 2,58	4,45 \pm 2,57	4,46 \pm 2,53

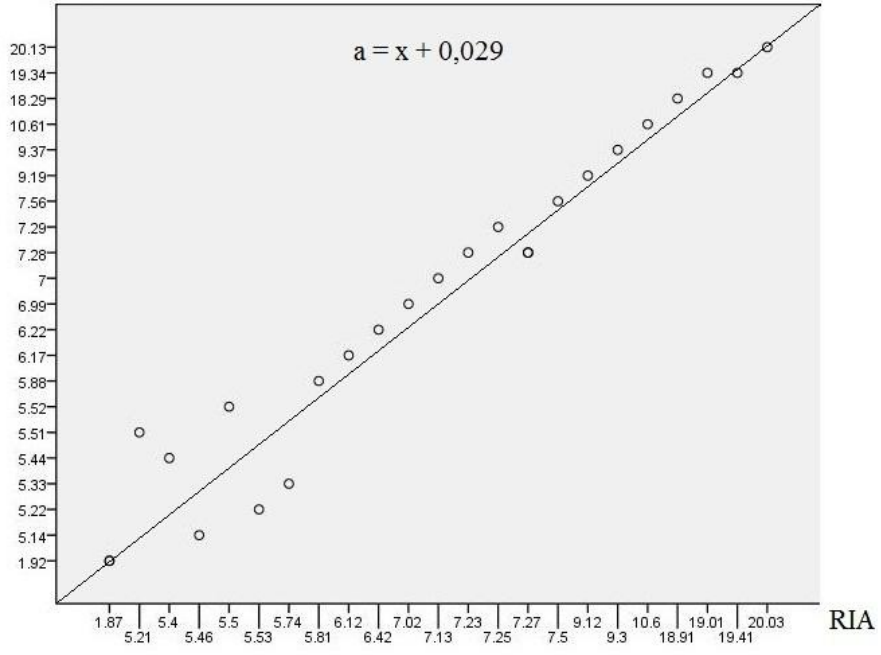
Sunulan çalışmada her bir hayvana ait serum örneğinin RIA ve ECLIA yöntemleri ile belirlenen progesteron (ng/ml) değerlerinin birbirine benzer olduğu ve

istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0.001$; $r = 0.998$) (Şekil 3.1). Bununla birlikte her bir hayvana ait serum örneğindeki 17β -östradiol (pg/ml) değerlerinin de birbirine benzer olduğu ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0.001$; $r = 0.098$) (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. RIA ve ECLIA yöntemleri ile aynı örnekte ölçülen progesteron (ng/ml) değerleri.
a = RIA ($p < 0.001$; $r = 0.998$)

ECLIA



Şekil 3.2. RIA ve ECLIA yöntemleri ile aynı örnekte ölçülen 17β-östradiol (pg/ml) değerleri.

$a = \text{RIA}$ ($p < 0.001$; $r = 0.998$)

4. TARTIŞMA

Köpeklerde kan progesteron ve/veya östrojen düzeylerinin tespiti, seksüel siklus tespiti gibi fizyolojik ve ovaryum kökenli tümörler gibi patolojik olguların tespitinde kullanılan bir muayene yöntemidir. Kullanılan hormon analiz yönteminin kısa sürede en doğru ve ekonomik şekilde sonuç vermesi teşhis için önemli bir kriterdir. Vaginal sitoloji, köpeklerde seksüel siklusun belirlenmesinde sıklıkla kullanılan maliyeti düşük ve pratik bir yöntemdir. Vaginal sitoloji ile belirlenen vaginanın epitelyum katından alınan hücrelerin şekilleri ve sayılarına göre köpeğin östrüs siklusunun hangi evresinde olduğunu belirlemek, tecrübeli hekimler tarafından birkaç muayenede ortaya koyulabilmektedir. Sunulan çalışmada araştırmacıların bildirdiği şekilde (Lindsay ve Concannon, 1986; Feldman ve Nelson, 1996) anöstrüste parabazal ve küçük intermediyer hücreler, proöstrüste değişen sayıda eritrosit ve süperfisiyel-intermediyer hücreler ile büyük intermediyer hücreler, östrüste % 80-100 oranında süperfisiyel hücreler ve anükleer skuamoz hücreler ve diöstrüste yaklaşık olarak % 20 seviyesine düşmüş süperfisiyel hücreler ve intermediyer hücreler izlendi. Vaginal sitoloji bulgularına göre çalışmada değerlendirilen köpeklerin % 60'ının anöstrüste, % 16'sının proöstrüste, % 16'sının östrüste ve % 8'inin diöstrüste oldukları belirlendi.

17 β -östradiol konsantrasyonunun anöstrüsün sonlarına doğru, proöstrüsten 4.5 hafta önce 7-13 pg/ml ve pik değerinin de 17.2-97.7 pg/ml düzeylerinde olduğu bildirilmektedir (Christiansen 1984). Feldman ve Nelson (1996), anöstrüste sirküle eden östrojen konsantrasyonunun 8-15 pg/ml arasında olduğunu, proöstrüs kanamasından önce 15 pg/ml üzerinde bir artış olduğunu bildirmektedirler. Bununla birlikte, diöstrüs dönemindeki 17 β -östradiol konsantrasyonunun bazal seviyelerde olduğu ve anöstrüs evresindeki seviyelerde seyrettiği belirtilmektedir (Edqvist ve ark, 1975; Hadley, 1975; Nett ve ark, 1975). Sunulan çalışmada vaginal sitoloji ile anöstrüs ve diöstrüs dönemlerinde olduğu belirlenen köpeklerin 17 β -östradiol

düzeylerinin RIA ve ECLIA yöntemlerine göre sırasıyla 6.26 pg/ml ve 6.20 pg/ml ile 4.45 pg/ml ve 4.46 pg/ml olduğu belirlendi. Çalışmada elde edilen değerler bildirimlere uyumlu olmakla birlikte, anöstrüs dönemindeki 17 β -östradiol düzeyinin diöstrüs dönemine göre yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durumun, anöstrüs dönemindeki follüküllerin gelişimi ile 17 β -östradiol konsantrasyonunun dönemin başından sonuna kadar önemli derecede dalgalanma göstermesi (Olson ve ark, 1982) ve hipofizer FSH'nın tekrarlanan salınımlarının, follüküllerin östrojen sentezi ve sekresyonu ile sirküle eden östrojen konsantrasyonunda hafif artışa neden olmalarından (Feldman ve Nelson 1996) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Feldman ve Nelson (1996), erken proöstrüsün genellikle 25 pg/ml'den fazla seviyede östrojen konsantrasyonuyla birlikte seyrettiğini ve geç proöstrüs döneminde bu hormonun 60-70 pg/ml'ye varacak şekilde pik değere ulaştığını ileri sürmektedirler. Bunun yanı sıra plazmadaki östrojen konsantrasyon pikinin östrüsten 24-48 saat önce meydana geldiğini (gözlenebilir kızgınlık), plazma östrojen konsantrasyonundaki azalmanın gözlenebilir kızgınlığın başlangıcıyla ilişkili olduğunu ve 5-9 gün sonra ise plazma östrojen konsantrasyonunun hızla bazal seviyeye geri döndüğünü ifade etmektedirler. Bunun yanı sıra, plazma 17 β -östradiol konsantrasyonunun erken follüküler evrede dereceli olarak arttığı ve preovulatr LH pikinin başlamasından önce keskin bir yükselme gösterdiği, ayrıca bu keskin artışın her zaman gözlenmediği de belirtilmektedir (de Gier ve ark 2006). Başka bir araştırmacı (Christiansen 1984) da proöstrüsteki 17 β -östradiol konsantrasyonunun 26 pg/ml olduğunu, LH pikinden 3 gün önce 43 pg/ml düzeyine doğru yavaş bir artış gözlemlendiğini ve LH pikinden 1 gün önce 62 pg/ml olan maksimum konsantrasyonun izlenmesini takiben ani bir düşüşün gerçekleştiğini belirtmektedir. Östrüsün dördüncü gününde ise proöstrüsten daha düşük bir düzeyde 18 pg/ml düzeylerinde 17 β -östradiol konsantrasyonunun tespit edildiği ifade edilmektedir. Ortalama 17 β -östradiol konsantrasyonunun LH piki sırasında 44 ± 9.2 pg/ml olduğu, sonra hızlı bir şekilde azaldığı ve sitolojik olarak metöstrüsün ilk günün olan 9. günde (6.8 ± 1.8 pg/ml) ve östrüsün sonunda (8.7 ± 1.1 pg/ml) bazal seviyeye ulaştığı bildirilmektedir. 17 β -

östradiol konsantrasyonu 10. gün tekrar yükselmeye başlamakta ve luteal evre sırasında 21-42 pg/ml düzeyleri arasında seyretmektedir (Onclin ve ark 2002). Diğer taraftan Gräf (1978), Beagle köpeklerinde östrojen konsantrasyonunun östrüs siklusunun dönemlerine göre ayırt edilebilir değişimler göstermediğini aktarmaktadır. Başka bir ifade ile araştırmacılar (Onclin ve ark 2002) 17 β -östradiol düzeyinin proöstrüs evresinde yüksek seyrettiğini ve LH pikinden önce maksimum düzeyine ulaştığını ve ovulasyon sonrasında da seviyesinin düştüğünü belirtmektedirler. Östradiolün seviyesinin bazı hayvanlarda klinik ve sitolojik muayene sonucu tespit edilen proöstrüsten bir hafta önce artmaya başladığı belirtilmektedir (Onclin ve ark 2002). Sunulan çalışmada da proöstrüs ve östrüs dönemlerindeki köpeklerin 17 β -östradiol düzeylerinin RIA ve ECLIA yöntemlerine göre sırasıyla 19.34 pg/ml ve 19.28 pg/ml ile 9.06 pg/ml ve 9.11 pg/ml olduğu belirlendi. Elde edilen sayısal değerlerin kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanabileceği ileri sürülmekle birlikte sözü edilen dönemlerde gözlenen östrojen düzeylerinin diğer çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlendi.

Ortalama plazma progesteron konsantrasyonunun LH salınımının başlamasından önceki 4-12 saatte yükselmeye başladığı, bazı hayvanlarda LH salınımının başlamasından 20 saat sonra da başlayabileceği ve progesteronun yükselen düzeylerinin luteal evrenin ilk yarısı sırasında bulunduğu bildirilmektedir (de Gier ve ark 2006). Progesteron hormonu proöstrüsün son 12-48 saatinde bazal seviyede bulunurken (<0,5 ng/ml) proöstrüsün sonunda veya östrüsün başlangıcında yükselmektedir (Concannon ve ark, 1975; Tsutsui, 1982; England ve Anderton, 1992; Feldman ve Nelson, 1996). Sunulan çalışmada proöstrüs döneminde olduğu belirlenen köpeklerin progesteron düzeylerinin RIA ve ECLIA yöntemlerine göre sırasıyla 1.14 ng/ml ve 1.20 ng/ml olduğu belirlendi. Araştırmada klinik olarak ve vaginal sitoloji verilerine göre proöstrüs döneminde olduğu belirlenen köpeklerin kan progesteron düzeylerinin 0.5 ng/ml'den yüksek çıkması, araştırmacıların da bildirdiği şekilde köpeklerin geç proöstrüs döneminde olmasından kaynaklanabilir. Diğer taraftan seksüel siklus dönemlerine göre kan progesteron bulguları değerlendirildiğinde en

düşük progesteron düzeyinin proöstrüs evresinde olduğu da gözlenebilmektedir. Serum progesteron konsantrasyonu proöstrüste yavaş bir artış periyodunu takiben ovulasyon zamanında keskin bir yükselme ile karakterizedir (Chapwanya ve ark 2008). Bunun yanı sıra LH pikinden önce 0,5 ng/ml'yi aşarak yükselmeye başlayan progesteron düzeyini takip eden 15-25. günlerde artışına devam ettiği ve LH piki sonrası 20-25. günde $47 \pm 3,1$ ng/ml'ye ulaştığı belirtilmektedir (Tsutsui, 1982; Concannon ve Hansel, 1977; England ve ark, 1989; Mestre ve ark, 1990). Concannon ve ark (1977a), progesteron konsantrasyonunun bazal konsantrasyonun üzerine çıktıktan sonra genellikle 15-60 ng/ml aralığına ulaştığını ileri sürmektedirler. Gräf (1978) progesteron konsantrasyonun geç proöstrüs ve östrüs sırasında artmaya başladığını, erken metöstrüste azalmaya başlamadan 20 gün önce maksimum düzeylerde seyrettiğini bildirmektedir. Sunulan çalışmada östrüs döneminde olduğu belirlenen köpeklerin progesteron düzeylerinin RIA ve ECLIA yöntemlerine göre sırasıyla 15.68 ng/ml ve 15.44 ng/ml olduğu ve diğer dönemlere göre en yüksek progesteron düzeylerinin tespit edildiği gözlemlendi. Köpeklerde, östrüsün progesteron hormonu etkisi altında gerçekleşiyor olması (Alaçam, 2005) da çalışmada elde edilen bulguları desteklemektedir.

Progesteron konsantrasyonundaki pikin, korpus luteumdan kaynaklandığı ve genellikle ovulasyondan sonraki 20-30 günde elde edildiği bildirilmektedir. Aynı zamanda bu maksimum sekresyon değerinin yaklaşık olarak diöstrüsün başlangıcından sonraki 2-3 haftada meydana geldiği ifade edilmektedir (Johnston, 1980). Sunulan çalışmada RIA ve ECLIA yöntemlerine diöstrüs döneminde olduğu belirlenen köpeklerin progesteron düzeylerinin göre sırasıyla 3.68 ng/ml ve 3.59 ng/ml olduğu belirlendi. Bunun nedeninin ise vaginal sitoloji değerlendirmelerine göre köpeklerin diöstrüste oldukları belirlenmesine rağmen kan örneklerinin alındığı zamanın progesteron düzeyinin yükselmeye veya düşmeye başladığı zaman ile uyum göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Klinik uygulamalarda, progesteron konsantrasyonu hakkında bilgi sahibi olmak klinik ve endokrinolojik karşılaştırma sonrası kesin bir teşhise olanak sağlayabilmektedir (Brugger ve ark 2011). Progesteron tespiti için kullanılan yarı kantitatif metodlar kan örneklerinin test edilmesine olanak vermelerine rağmen yeterli oranda doğruluğa ve güvenilirliğe sahip değildirler (Laiblin 1991; Hospes et al 2004). Radioimmunoassay günümüzde hala önemini koruyan bir kantitatif methoddur. Pratikte radioimmunoassayler radioaktif boşa harcama probleminin önlenmesi ve otomasyonun sağlanabilmesi amaçlarıyla sıklıkla analizörler üzerinde non-radio izotopik immunoassayler ile yer değiştirmektedirler (Brugger ve ark 2011). Sunulan çalışmada her bir hayvana ait serum örneğinin RIA ve ECLIA yöntemleri ile belirlenen progesteron (ng/ml) değerlerinin birbirine benzer olduğu ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0.001$; $r = 0.998$) (Şekil 3.1). Bununla birlikte her bir hayvana ait serum örneğindeki 17β -östradiol (pg/ml) değerlerinin de birbirine benzer olduğu ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0.001$; $r = 0.098$) (Şekil 3.2). Anckaert ve ark (2002) yaptıkları araştırmasında kan P4 değerlerini MiniVidas ve ECLIA ile karşılaştırmış ve her ikisi arasında elde ettiği sonuçlar yönünden korelasyon gözlendiğini bildirmektedirler. Benzer şekilde Brugger ve ark (2011) enzim bağlantılı floresens (ELFA) ve RIA yöntemlerinde de aynı sonuçları elde ettiklerini aktarmaktadırlar. Chapwanya ve ark (2008) kemoluminisens assay (Immulit) ve RIA yöntemleriyle köpeklerde kan progesteron düzeylerini karşılaştırdıkları çalışmalarında immulit assay tekniğinin RIA ile benzer sonuçlar verdiğini belirtmektedirler. Sunulan çalışma da RIA yöntemiyle elde edilen sonuçların ECLIA yöntemiyle elde edilen sonuçlarla istatistiksel olarak benzerlik gösterdiği belirlendi.

5. SONUÇ

Sunulan çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, ECLIA tekniğinin köpeklerde serum progesteron ve 17β -östradiol konsantrasyonlarının tespitinde kullanılan RIA yöntemi kadar doğru ve güvenilir bir yöntem olduğu kanısına varıldı. Bununla birlikte, veteriner hekimlerin ve akademisyenlerin bu tür steroid hormonların analizlerinde hem zaman hem de ekonomik yönden fayda sağlamaları nedeniyle ECLIA yönteminin RIA yönteminin yerini alacak bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- ALAÇAM, E. (2005). Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite (5. Baskı). Medisan Yayınevi, Ankara.
- ANCKAEERT, E., MEES, M., SCHIETTECATTE, J., SMITZ, J. (2002). Clinical validation of a fully automated 17beta-estradiol and progesterone assay (VIDAS) for use in monitoring assisted reproduction treatment. *Clin Chem Lab Med*, **40**: 824-831.
- ASLAN, S., ERÜNAL, N., KILIÇOĞLU, Ç., FINDIK, M., BAŞTAN, A., KAYMAZ, M., TOPAÇLIOĞLU, S. (1995). Einsatz der Papanicolaou-Färbemethode zur vaginalzytologischen untersuchung bei der hündin. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **42**: 431-439.
- BİRDANE, F.M. (2001). Buzağularda solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında bronkoalveolar lavaj sıvısı muayenelerinin önemi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- BRUGGER, N., OTZDORFF, C., WALTER, B., HOFFMANN, B., BRAUN, J. (2011) Quantitative determination of progesterone (P4) in canine blood serum using an enzyme-linked fluorescence assay. *Reprod Dom Anim*, **46**: 870-873.
- CHAPWANYA, A., CLEGG, T., STANLEY, P., VAUGHAN, L. (2008). Comparision of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology*, **70**: 795-799.
- CHRISTIANSEN, I.B.J. (1984). Cytological examination of the vaginal smear. In: Christiansen, I.B.J. (ed) *Reproduction in the dog and cat*. Bailliare Tindall, London.
- CONCANNON, P.W., HANSEL, W., VISEK, W. (1975). Pregnancy and parturation in the bitch. *Biol Reprod* **16**: 517-526.
- CONCANNON, P.W., HANSEL, W. (1977). Prostaglandin F2 α induced luteolysis, hypotermia and abortions in the Beagle bitches. *Prostaglandins* **13**: 533-542.

- CONCANNON, P.W., POWERS, ME., HOLDER, W. (1977a). Pregnancy and parturition in the bitch. *Biol Reprod* **16**: 427-431.
- CONCANNON, P.W., HANSEL, W., McENTEE, K. (1977b). Changes in LH, progesterone and sexual behaviour associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod*, **17**: 604-613.
- CONCANNON, P.W., DIGREGORIO, G.B. (1986). Canine vaginal cytology. In: Burke, T. (ed). Small animal reproduction and infertility. Lea & Febiger, Philadelphia.
- CONCANNON, P.W. (1993). Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fert Suppl* **47**: 3-27.
- COWEL, R.L., TYLER, R.D. (1989). Diagnostic cytology of the dog and cat (*1 st ed*). American Veterinary Publications, California.
- de GIER, J., KOOISTRA, H.S., DJAJADININGRAT-LAANEN, S.C., DIELEMAN, S.J., OKKENS, A.C. (2006). Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 β , progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*, **65**:1346-1359.
- EDQVIST, L.E., JOHANSSON, E.D.B., KASSTROM, H. ET AL. (1975). Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oestrus cycle and pregnancy. *Acta Endocrinol* **78**: 554-564.
- ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E., PORTER, D.J. (1989). A comparison of radioimmunoassay with quantitative and qualitative enzyme-linked immunoassay for plasma progestagen detection in bitches. *Vet Rec* **125**: 107-108.
- ENGLAND, G.C.W., ANDERTON, D.J., (1992). Determination of progestogen concentrations in the vaginal fluid of bitches in oestrus. *Vet Rec* **130**: 143-144.
- ENGLAND, G.C.W, CONCANNON, P.W. (2002). Determination of the breeding time in the bitch: Basic considerations In: Recent advances in small animal reproduction. www.ivis.org

- ERÜNAL-MARAL, N., FINDIK, M., ASLAN, S. (2000). Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumor and controlling the recovery period in the bitch. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* **5**: 175-180.
- ERÜNAL-MARAL, N. (2000). Dişi köpeklerde vaginal sitoloji, vaginoskopi ve hızlı progesteron test yöntemlerinin optimum çiftleşme zamanının saptanması amacıyla kullanılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. (1996). Canine female reproduction (2nd ed). In: Pedersen D. (ed) Canine and feline endocrinology and reproduction, WB Saunders Company, Philadelphia.
- GRÄF, K.J. (1978). Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. *J Reprod Fert*, **52**: 9-14.
- HADLEY, J.C. (1975). Total unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in peripheral blood during pregnancy in the dog. *J Reprod Fert* **44**: 453-460.
- HANNON, W., ATKINSON, M.A., BALL, D.J., LORENZ, L.G., MATTSON, P., MOORE, D.M., WHITLEY, R.J. (2004). Assessing the Quality of Immunoassay Systems: Radioimmunoassays and Enzyme, fluorescence, and Luminescence Immunoassay; NCCLS, I/LA23 Approved Guidelines, Wayne, PA.
- HOLST, P.A., PHEMISTER, R.D. (1974). Onset of diestrus in the Beagle bitch: Definition and significance. *Am J Vet Rec* **35**: 401-406.
- HOSPES, R., RICHTER, B.R., RIESENBECK, A., BOSTEDT, H. (2004). Untersuchungen zur Zuverlässigkeit handelsüblicher Progesterone-Schnelltests in der gynäkologischen Diagnostik beim Hund. *Tierärztl Prax*, **32**: K247-251.
- JOHNSTON, S.D. (1980). Diagnostic and therapeutic approach to infertility in the bitch. *Javma* **176**: 1335-1338.
- JOHNSTON, S.D., ROOT KUSTRITZ, M.V., OLSON, P.N.S. (2001). Breeding Management and Artificial Insemination of the bitch. In: Canine and feline theriogenology. Johnston SD, Root Kustritz, M.V., Olson P.N.S. (eds). WB Saunders, Philadelphia, 41-65.
- KULMALA, S., SUOMI, J. (2003). Current status of modern analytical luminescence methods. *Analytica Chimica Acta*, **500**: 21-69.

- LAIBLIN, C. (1991). Estrus detection in the bitch with a progesterone rapid test (EIA) – a sensible supplement to vaginal cytology. *Tierärztl Prax*, **19**: 197-199.
- LINDSAY, F.E.F., CONCANNON, P.W. (1986). Normal canine vaginoscopy. In: Burke, T. (ed). Small animal reproduction and infertility. Lea & Febiger, Philadelphia.
- MESTRE, J., WANKE, M., SUCHEYRE, S. (1990). Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol-17 β during oestrus in the bitch. *J Small Animal Practice* **31**: 568-570.
- NASCIMENTO, M.C.O., LOPEZ, M.D. (1999). Estudo da sazonalidade reprodutiva em gatas domesticas atraves de exames citologicos. *Rev Bras Anim* **23**: 205-207.
- NETT, T.M., AKBAR, A.M., PHEMISTER, R.D. ET AL. (1975). Levels of luteinizing hormone, estradiol an progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the Beagle bitch. *Proc Soc Exp Biol Med* **148**: 134-139.
- NOZAKI, O. (2001). Steroid analysis for medical diagnosis. *J Chromatogr A* **935**:267-278.
- OLSON, P.N., BOWEN, R.A., BEHRENDT, M.D., (1982). Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughtout late anestrus, proestrus and estrus. *Biol Reprod* **27**: 1196-1202.
- ONCLIN, K., MURPHY, B., VERSTEGEN, J.P. (2002). Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology*, **57**: 1957-1972.
- PAPANICOLAU, G.N. (1942). A new procedure for staining vaginal smears. *Science* **95**: 438-439.
- PINEDA, M.H. (1989). Reproductive patterns of dogs. In: McDonald, L.E., Pineda, M.H. (Eds). Veterinary Endocrinology and Reproduction. Lea & Febiger, Philadelphia.
- POST, K. (1985). Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *Can Vet J* **26**: 101-104.
- RIJNBERK, A. (1996). Clinical Endocrinology of Dogs and Cats (*1st ed*). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- SAMSAR, E., AKIN, F. (1998) Özel cerrahi (*1. Baskı*). Tamer Matbaacılık, Ankara.

- TEMBHARE, D.B. (2008). *Techniques in Life Sciences: Radioimmunoassay of hormones*. Himalaya Publishing House, Mumbai, India, 375-400.
- TSUTSUI, T. (1982) Peripheral plasma gestagen levels during in the estrous cycle and pregnancy in the bitch. *Jpn J Anim Reprod* **31**: 150-156.
- VANNUCCHI, C.L., SATZINGER, S., SANTOS, S.E.C. (1997). Tecnicas de citologia vaginal como metodo de diagnostico da fase do ciclo estral em cadelas. *Clin Vet* **9**: 14-19.
- YILMAZ, B. (1999). *Hormonlar ve üreme fizyolojisi (1. Baskı)*. Feryal matbaacılık, Ankara.