

31376

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KISRAKLARDA SEKSÜEL SIKLUS SIRASINDA VE ERKEN
GEBELİKTE SERUM ESTRADİOL 17 β İLE PROGESTERON
HORMON DÜZEYLERİNİN RIA VE EIA İLE ARASTIRILMASI

Veteriner Hekim Muzaffer ÇELEBİ

DOKTORA TEZİ

DOĞUM VE REPRODÜKSİYON HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

DANISMAN

Prof.Dr.S.Çetin KILIÇOĞLU

ANKARA-1993

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

1. İÇİNDEKİLER

Sayfa No

2. ÖNSÖZ.....	1
3. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	5
4. MATERYAL VE METOT.....	36
5. BULGULAR.....	47
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
7. TÜRKÇE ÖZET.....	58
8. İNGİLİZCE ÖZET.....	60
9. KAYNAKLAR.....	62
10. TEŞEKKÜR.....	71
11. ÖZGEÇMİŞ.....	72

2.ÖNSÖZ

Günümüzde iş, binek ve spor hayvanı olarak kullanılan, bazı yörelerimizde de etinden ve sütünden yararlanan at, ülkemizde uzun bir geçmişe sahip olup folklorumuzda, edebiyatımızda, resim ve spor oyunlarımızda derin izler bırakmıştır.

15. ve 16. yüzyıllarda büyük ordu ve süvari birliklerine sahip olan Osmanlılar ordunun at gereksinimini karşılamak üzere çeşitli çiftlikler kurarak, at ırklarının ıslahı konusunda ciddi çalışmalar yapmışlardır.

Gerileme devrinde ekonomik durumun bozulmasına paralel olarak ve çeşitli politikalar sonucu gerilemeye yüz tutan at yetiştiriciliği, birinci dünya savaşının da olumsuz etkileri sonucu tamamen gerileyerek atçılığın yeniden ele alındığı Cumhuriyet dönemine gelinmiştir.

Cumhuriyet döneminde "Islah-ı Hayvanat" kanununun yürürlüğe konulmasıyla birlikte, atçılık alanında etkili ıslah çalışmaları başlatılmış ancak özellikle 1950'li yıllarda tarım kesiminde ve ordu birliklerinde geniş çaplı motorizasyona gidilmesi sonucu kullanım alanı olarak at, yeniden önemini kaybetmeye yüz tutmuştur.

Son yıllarda petrol fiyatlarının yükselmesine ve çeşitli ekonomik girdilerin maliyetlerinin artmasına paralel olarak,

tarım sektöründeki insanların güç durumda kalması, özellikle küçük ve orta büyüklükteki işletmelerde tarım, ulaşım ve çekim işlerinde at'ın kullanılmasını yeniden gündeme getirmiştir.

At'ın spor hayvanı olarak kullanılmasının yaygınlaşması, çeşitli ülkelere at eti ihracatımızın artması ve bazı ülkelerin damızlık at istemlerinin yoğunlaşması, at yetiştiriciliğini özendirmekle birlikte at'ın nicel ve nitel olarak ele alınıp, atçılığın geliştirilmesi zorunluluğunu ortaya koymuştur.

Islah ve yetiştiricilikte hayvanların en önemli verim özelliği döl verimidir. Hayvanlardan iyi bir döl verimi alınması, döl verimini etkileyen tüm unsurların kontrol altında tutulmasına bağlıdır. Bu da hayvanların dölerme özellikleri ve dölerme fizyolojileri yeterince bilindiği ölçüde yapılabilir. Gelişmiş ülkelerdeki hayvancılıkla ilgili bilimsel çalışmaların büyük bir çoğunluğu dölerme konusunu içerir.

At yetiştiriciliğinin etkin ve verimli bir şekilde yapılabilmesi ilk olarak bu hayvanlardan alınacak döl verimine bağlıdır. Bilindiği gibi kısraklar, dölerme fizyolojisi karmaşık ve mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır. Aygır spermatozoitlerinin kısa ömürlü olması, kısraklarda kızgınlık ve kızgınlık sikluslarının büyük ölçüde değişiklik göstermesi bu hayvanlarda döl verimini olumsuz yönde etkilemektedir. Uzun bir gebelik dönemine sahip ve

seksüel siklus periyodları sınırlı olan kısrakların doğumdan sonraki ilk kızgınlıkta gebe kalmaları istenilen bir durumdur. İlk kızgınlığı tesbit edilemeyen kısraklarda 2. ve 3. kızgınlığın ortaya çıkması zaman alır ve bu durumdaki annelerden doğacak yavrular, yaşıtlarına göre fiziksel kondüsyonca zayıf kalarak istenilen performansı gösteremezler. Bu durum da yetiştirici açısından ve hayvanların döl verimi yönünden bir kayıp oluşturmaktadır.

Gerek yarış atlarında yaş grubu bir örnekliliği sağlamak, gerekse damızlık kısrağın döl veriminden yeterince yararlanabilmek için çiftleşmeden sonraki en erken dönemde gebeliğin saptanması ve gebe olmayanların en kısa zamanda gebeliklerinin sağlanması arzu edilen bir durumdur. Böylelikle infertiliteye bağlı ekonomik kayıpların uygun bir tedavi ve seleksiyon yöntemiyle giderilme olanağı doğabilir.

Kısraklarda erken gebeliğin teşhisi için bugüne kadar birçok klinik ve laboratuvar teşhis yöntemleri geliştirilmiştir. Ultrasound, rektal palpasyon ve radyografi gibi klinik yöntemlerin doğru sonuç vermesine karşın, kan, idrar, süt gibi biyolojik sıvılarda hormon tesbitine dayalı, duyarlı immunolojik yöntemlerin uygulamaya konulması hayvanlarda erken gebelik teşhisini kolaylaştırmaktadır.

Son yıllarda gelişmiş ülkelerde, hayvanların döl verme özelliklerinin araştırılması ve fertilitate kontrolünde,

çeşitli hormonların seviyelerini tesbit etmek amacı ile, Radioimmunoassay (RIA) ve Enzymeimmunoassay (EIA) teknikleri uygulamaya konulmuştur.

Korpus luteum hormonu olan progesteronun kanda veya sütte yoğunluğunun tesbiti ile gebeliğin erken tanısı yapılabilmekte ve ovaryum fonksiyonları hakkında bir kanı oluşabilmektedir.

Bu tekniklerin kısıraklarda uygulamaya konulmasıyla, yetiştirmelerdeki büyük maddi değeri olan damızlık hayvanların gebe olup olmadıkları erken dönemde teşhis edilebilir. Yine bugün gebelik teşhisi için kullanılmakta olan rektal ve vaginal muayene uygulamaları en aza indirilerek, bu metodlara bağlı olarak oluşabilecek rektum yaralanmaları, abortlar, embryonik ve fötal ölüm oranları azaltılabilir, ayrıca iş gücü ve zamandan kazanılabilir. Rektal muayeneye izin vermeyen kısırakların gebeliği bu yöntemlerle kontrol edilerek bunların neden olduğu iş kazaları azaltılabilir.

Bu çalışmada, seksüel siklus sırasında kanda progesteron ve estradiol 17β hormon düzeylerinin değişimi ve çiftleşmeden sonraki 20.günde kan progesteron düzeylerinin Radioimmunoassay ve Enzymeimmunoassay yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak ölçülüp gebeliğin erken dönemde teşhis edilmesi amaçlanmıştır.

3. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

3.1. KISRAKLARDA SEKSÜEL SIKLUS

Dölerme fizyolojisi diğer evcil hayvan türlerine göre daha karmaşık olan kısıraklar, bazı ırkları yıl boyunca siklus göstermelerine karşın, ilkbahardan yaza kadar düzenli siklus gösteren ve kışın seksüel dinlenmeye giren, mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olarak kabul edilirler (2, 5, 13, 18, 28, 32).

Kısıraklarda seksüel siklusun ortaya çıkması ve östrusun süresi birçok araştırmacıya göre mevsimsel düzensizlik göstermektedir. İlkbahar başında düzenli olmayan, normalden uzun olan ve genellikle ovulasyonsuz olan östrus periyodları, mayıs ayından temmuza kadar olan dönemde düzene girmekte, östrus süresi kısalmakta ve ovulasyon oranı artmaktadır (17, 18, 24, 32).

Çiftleşmeleri mevsime bağlı olan kısıraklarda seksüel aktivitenin başlamasında fotoperiyodun büyük rol oynadığı bildirilmektedir. Yapay ışıklandırma ile kısıraklarda folliküler gelişmenin hızlandığı ve çiftleşme sezonuna girdikleri belirlenmiştir (18).

Oxender ve arkadaşları (44) aralık ayının başında anöstrus dönemde olan kısıraklara uygulanan 16 saatlik bir fotoperiyodun 2 ay içinde normal östrus sikluslarını başlattığını bildirmektedirler.

Artan ya da azalan gün ışığının optik sinirler aracılığı ile beynin Chiasma opticum'u vasıtası ile hipotalamusu uyarması ve bazı çevresel faktörlerinde etkisiyle kısıraklarda seksüel aktivite başlamaktadır (4, 18).

Hipotalamusun uyarılması ile, hipotalamusun nöyro-sekretorik hücreleri gonadotropin doğurucu hormonları (Gn-RH) sentezler. Salgılanan bu hormonlar Sinozoidal portal damarlar aracılığı ile hipofizin ön lobuna (Adenohipofiz) ulaşarak, adenohipofizin bazofilik hücrelerinden gonadotropik kompleks hormonları olan FSH ve LH ile, asidofilik hücrelerinden LTH salınımını sağlarlar. Bu hormonların etkisiyle kısırakların ovaryumlarında Graff follikülünün oluşması, folliküllerden östrojenin salgılanması, ovulasyon, korpus luteumun şekillenmesi ve fekondasyon gerçekleşmezse korpus luteumun atrofisi gibi fizyolojik işlevlerin gelişmesinin yanısıra, dişi dölerme kanal sisteminde de bu gelişmelere paralel fizyolojik değişiklikler şekillenir (33, 57).

Kısıraklar üreme mevsimine günlük ışık alma süresinin uzadığı dönemde girmektedirler. Bu dönem kuzey yarımkürede ilkbahar, güney yarımkürede ise sonbahar aylarıdır. Güney yarımkürede at ırklarınının % 90'ı Kasım, Şubat ayları arasında seksüel aktivite gösterirken, kuzey yarımkürede Mayıs, Kasım ayları arasında seksüel aktivite göstermektedirler (18, 28, 32, 38). Tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşayan kısıraklar yıl boyunca östrus gösterme eğilimindedirler (30, 34).

Hayvanın ırkına, yaşına, beslenme durumuna ve çevresel koşullara bağlı olarak değişebilen kızgınlık siklusu kısıraklarda ortalama 21-23 gün olarak kabul edilir ve proöstrus (2-3 gün), östrus (4-7 gün), metaöstrus (5-6 gün) ve diöstrus (5-9 gün) dönemlerinden oluşur. Kızgınlık siklusunun proöstrus ve östrus evreleri folliküler evre, metaöstrus ve diöstrus evreleri de luteal evre olarak adlandırılır. Genital sistem proöstrustan ovulasyona kadarki östrus süresinde östrojen etkisi altında, ovulasyondan metaöstrus sonuna kadarki dönemde de Korpus Luteumdan salgılanan progesteron etkisi altındadır (2, 5, 13, 24, 28, 30, 49). Evcil hayvanlar arasında östrus periyodu en uzun olan hayvan kısıraktır (13, 28).

Kısıraklarda gerek cinsel olgunluğa gerekse çiftleşme olgunluğuna erişme çağı, diğer hayvanlarda olduğu gibi türe, ırka, çevre koşullarına göre önemli değişimler gösterir. Cinsel olgunluğa gelen bir dişinin çiftleşme olgunluğuna erişebilmesi yeterli bir vücut ağırlığına erişmesiyle mümkündür (2). Kısıraklarda pubertas 10-24 aylık, ortalama 18 aylıkta başlar (28). Yetiştirmede ise ortalama 36.aydan itibaren kullanılabilirler (45, 47).

Kısıraklarda kızgınlık süresinin uzun olması ve aygır spermatozoitlerinin yaşam süresinin kısa olması döl verimini önemli ölçüde etkilemektedir. O nedenle kısıraklarda ovulasyon zamanının bilinmesi zorunludur (45, 57, 75). Kısıraklarda en uygun tohumlama zamanını tesbit amacı ile yapılan araştırmalarda en yüksek dölverimi oranı ovulasyondan 1 gün

önce ve ovulasyon esnasında yapılan tohumlamalardan alınmıştır (45). Yine aynı amaçla yapılan başka bir çalışmada en yüksek gebelik oranı ovulasyondan 24 saat sonra yapılan tohumlamadan elde edilmiştir (45). Ülkemizde özellikle devlet kurumlarında uygulanan yöntem ise kısrağın kızgınlığının başından sonuna kadar tohumlanmasıdır. Diğer bir uygulama ise doğumdan sonraki 9.günde (tay kızgınlığında) kısrakların tohumlanmasıdır (76). En yüksek dölverimi kızgınlığın 2. veya 3. gününden başlayarak ve her 36. veya 48. saatte tekrarlanan tohumlamalardan alınabilir (45).

3.2. KISRACLARDA GEBELİK

Her hayvanda gebelik süresi genetik olarak belirlenmekle birlikte maternal, fötal ve çevresel faktörlerinde gebelik süresi üzerine etkisi vardır (2). Kısraklarda gebelik süresi 320 ila 355 gün arasında değişir. Ortalama 336 gündür (2, 13).

Hafif ırk kısrakların gebelik süresi daha uzundur. Gebelikleri kışın sonlanan kısraklarda gebelik süresi 20 gün daha uzundur. Erkek taylar uterusda dişilere göre 2 gün fazla taşınır. İkiz gebelikte gebelik süresi 10 gün daha kısadır. Eğer kısrağın katır yavrusu taşıyorsa gebelik süresi 10 gün daha uzundur (28). Yaz sonu ve sonbahar başı gebe kalan kısraklarda gebelik süresi, çiftleşme sezonu başında gebe

kalanlara göre daha kısadır. Kısıraklarda iyi beslenen annelerin, kötü beslenenlere göre gebelik süresinin 3-4 gün kısa olması belirgindir (2).

3.3. GEBELİK TANI YÖNTEMLERİ

Gebelik klinik ve laboratuvar yöntemlerle teşhis edilebilir. Yöntemin seçimi hayvanın türüne, gebeliğin dönemine, maliyetine, doğruluğuna ve çabukluğuna göre yapılır.

A) KLİNİK YÖNTEMLER

Gebelik, Korpus Luteumun regresyonunu inhibe eder ve hayvanın tekrar kızgınlık göstermesini engeller. Bu nedenle tohumlamadan 18 gün veya kızgınlık bitiminden 16 gün sonra kızgınlık göstermeyen kısрак gebe olarak kabul edilir. Bu bilgi çoğunlukla çiftçiler ve suni tohumlama merkezlerince gebeliğin bir indikatörü olarak kabul edilir. Fakat bu metodun doğruluğu, sürülerde yapılan östrus belirlemesinin doğruluğuna bağlı olduğu gibi, sakin kızgınlık gösteren, laktasyona bağlı olarak veya çevresel faktörlerin etkisiyle anöstrusa giren, uzun bir diöstrus veya embryonik ölümü takiben uzayan luteal faza sahip kısraklar yanlış pozitif sonuç verebilir. Gebe olmalarına karşın kızgınlık gösteren kısraklar ise yanlış negatif olarak değerlendirilebilir.

Klinik yöntemler yavru, yavru zarları ve yavru sularının tesbitine dayalı rektal muayene, radyografi ve ultrasound tekniklerini içerir (9, 18, 24).

1. Rektal Muayene

Ekonomik ve çabuk sonuç vermesi yanında pratik uygulaması özel bilgi gerektiren rektal muayene tekniği ile kısırta uterusun büyümesi, konumunun değişmesi, ovaryumlardaki değişimler, fluktuasyon, fötusun palpasyonu ve uterus arterlerinin hipertrofisi ile fremitus tesbit edilerek gebelik tanısı yapılabilir (2).

Rektal muayene tekniğine uygun yapılmadığı takdirde rektum yaralanmalarına neden olabilmekte ve ciddi sonuçlar doğurabilmektedir.

Kısıraklarda rektal yolla gebeliğin tanısı deneyimli veterinerlerce en emin olarak gebeliğin 30-40. günleri arasında yapılabilmele birlikte, deneyimi oldukça yüksek veterinerler gebeliğin 17-30. günleri arasında bu yöntemle gebeliği teşhis edebilmektedir. Ancak bu dönemde embriyonun chorionun ve blastodermik vezikülün zarar görmemesi için çok dikkat edilmelidir. Jackson'un bildirdiğine göre bu dönemde yapılan erken gebelik teşhisi muayenelerinde, rektal palpasyondan sonraki abort oranı % 5-6 civarındadır (52).

2. Ultrasound :

Rektuma veya karın bölgesine yerleştirilen alıcı bir çubuk yardımı ile yavrunun hareketlerini, ftal kalp seslerini, arteria uterina ve umbilikal damarların pulzasyonunun tesbitine dayalı ultrasound tekniği ile (59) kısıraklarda gebelik tanısı olasıdır. Bu hayvanlarda A modeli ile ortalama 50-60. günden itibaren, B modeli ile 7-15. günler arasında tanı yapılabilir. Özellikle B model ultrasound gereçlerinin geliştirilmesi ile gebeliğin daha erken tanısı olasıdır (2). Real-time scanning tekniği ile kısıraklarda çiftleşmeden sonra 18. günde gebeliğin tanısında doğruluk oranı %100'dr ve ikiz gebelikler teşhis edilebilmektedir (18).

3. Radyografi :

X ışınları yardımı ile ftal iskeletin tesbitine dayalı bir yöntemdir. Koyun, keçi, domuz, kedi ve köpekte gebeliğin teşhisi amacı ile kullanılabilir. Bu yöntem sadece gebeliğin son 1/3'de kullanılabilir. Gereкли aletin pahalı olması, operatörün radyasyon riski ile karşı karşıya olması ve erken dönemde sonuç alınamamasından dolayı pratikte uygulanan bir yöntem değildir (13, 18).

B) LABORATUVAR YÖNTEMLER

Gebeliğin teşhisinde klinik yöntemlerin kullanım alanlarının sınırlı olması, büyük sürülerde uygulanmasının çok fazla zaman alması, uygulanmasında ve doğru sonuçlar alınmasında uzman personele ihtiyaç göstermesi gibi nedenlerden dolayı, laboratuvar teşhis yöntemleri geliştirilmiş ve uygulamaya konmuştur.

Gebeliğin laboratuvar teşhisi gebelikte oluşan ve gebeliğe özel olan bir ürünün aranması veya gebelik sırasında belirli bir maddenin miktarındaki değişikliğin saptanması ile yapılır. Gebelikte aranması gereken ürünün tipi, tesbit için kullanılan testin duyarlılık ve doğruluğu ile gebeliğin dönemine bağlıdır.

Gebelik esnasında oluşan ürünler maternal dokulardan salgılanan maddeler veya yavru tarafından üretilen maddelerdir ve bu ürünler ana kanında, sütünde ve idrarında immunolojik olarak tesbit edilebilmektedir.

1. Early Pregnancy Factor (E.P.F.)

Erken Gebelik Faktörü

E.P.F. ilk kez gebe kadının kanında, preimplantasyon döneminde ortaya konmuştur. Daha sonra sırasıyla domuz, koyun ve sığırdaki tesbit edilmiştir (18). Immunosupresif bir faktör olarak meydana gelen E.P.F. plasenta oluşuncaya kadar fertilize ovumu immunolojik olarak korur. Gebeliğin erken

döneminde embriyonun cerrahi olarak alınması veya herhangi bir nedenle yok olması durumunda E.P.F. anne kanında hızla kaybolur. E.P.F.'nin kan serumunda tesbiti "Rozet inhibisyon" testi ile yapılmaktadır. Bu test henüz klinik uygulamaya girmemiştir (9).

2. Gebelikle Ortaya Çıkan Antijenler

Kısrak, inek ve koyunlarda gebelik esnasında gebeliğe özgü bazı antijenlerin ana kanında ortaya çıktığı bildirilmektedir. Bu antijenler ana kanında ancak gebeliğin son yarısında tesbit edilebilmekte ve gebelik teşhisinde pratik bir kullanım alanına sahip değildirler (18).

3. Gebelik Teşhisinde Hormonlar

Gebelik sırasında kan, süt, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarında tesbit edilebilen hormonların miktarlarındaki değişimler incelenerek gebelik teşhisi yapılabilmektedir.

Gebelikte; Progesteronlar, Östrojenler, Androjenler, Gonadotropinler, Kortikal steroidler, Relaksin, Oksitosin ve Prolaktin gibi hormonlar vücut sıvılarında tesbit edilebilir. İnsan ve hayvanlarda hormon tesbitine dayalı gebelik teşhisi ilk defa 1948 de bildirilmiş, daha sonra ayrıntılı tekniklerin geliştirilmesiyle Immuno Chemical yöntemlerle hormon tesbiti yapılabilmektedir (15).

Kısraklarda gebelik teşhisinde en çok kullanılan immunolojik testler idrar, süt ve kan serumunda hormon tesbitine dayanan yöntemlerdir.

a) PMSG :

Gebeliğin 36-38. günlerinde uterusun endometrial stromasındaki özel trofoblast hücrelerden salgılanan PMSG glikoprotein yapıda bir hormondur. Endometrial hücrelerin fetal membranlarla bağlantısı yoktur. PMSG anne kanına kompleks lenf sinusları yardımı ile geçer (15, 24). PMSG üretimi yavrunun büyüklüğü, doğum sayısı ve fötusun genotipi tarafından etkilenir (62).

PMSG veya diğer adıyla ECG, kan serumunda gebeliğin 32-36. günleri arasında bulunmasına karşın, ancak gebeliğin 40. gününde tespit edilebilecek düzey olan 40-80 IÜ/ml'ye ulaşır (5, 53). Gebeliğin 60-65. gününde en yüksek düzeye çıkar ve 120-150. güne kadar azalarak belirlenemeyecek düzeye düşer (2, 5).

PMSG'nin hem FSH hem de LH özelliği vardır. Bu özelliğinin etkisi ile maternal ovaryumlardan ovulasyonla veya patlamamış folliküllerin luteinize olması ile Aksesor Korpus Luteumların şekillenmesine neden olur (5, 25).

PMSG hormonu, gebeliğin 40-120. günleri arasında kan serumunda araştırılabilse de pratikte daha çok 50-90. günler arasında alınan kan örnekleri değerlendirilmektedir (2).

PMSG hormonu immunolojik veya biyolojik yöntemlerle tesbit edilebilmektedir. Immunolojik yöntemde bu amaçla geliştirilen ve kısıraklar için spesifik olan MIP test ve benzeri modifiye testlerde, antikor olarak anti PMS, antijen olarak test serumu ve indikatör olarak koyun eritrositleri aynı ortama konduğunda hemagglütinasyonun şekillenip şekillenmediğine bakılmaktadır. Hemagglütinasyon şekillendiği takdirde, hayvan gebe değil şeklinde değerlendirilmektedir (2). Ayrıca PMSG'nin tesbiti ELISA tekniği ile de 2 saat gibi kısa bir zaman diliminde gerçekleştirilebilmektedir. Bu testler gebeliğin 40-50. günleri arasında %100'e varan bir doğruluk oranı vermektedirler (15, 26, 72).

Son dönemde bildirilen latex agglütinasyon testi ile 7 dakikada kısıraklarda gebeliğin 50-90. gününde %89-100 doğruluk oranında gebelik teşhisi yapılabilmektedir (27, 50, 72).

PMSG'nin biyolojik yöntemlerle tesbiti ise olgun laboratuvar hayvanlarının ovaryumlarının (Ascheim Zondek Reaksiyonu) veya erkek kurbağalarda sperm üretiminin stimülasyonuna (Kurbağa testi) dayanır (2, 5, 13).

Endometrial hücrelerin tamamen dejenere olduğu 120. günden sonra ve yine PMSG salgılayan hücrelerin olduğu 40. günden sonra oluşan abortlar ve fetal ölümlerde hayvan gebe olmadığı halde bu testler yanlış pozitif sonuç verebilir (18, 24, 26).

b) Östrogenler :

Östrogenler steroid olarak bilinen lipid bileşiklerdir. Östrojen hormonlarının başlangıç maddesi kolesterindir. Östrogenler, hepsinin östrogen iskelete sahip olması ile, ayrıca kısmen aromatik karakterli A- ve B- halka sistemlerine, keza C₃ te fenolik hidroksil grubuna, C₁₇ de keto- veya oxy grubuna sahip olmakla karakterizedirler (5, 14).

Organizmada çok sayıda fraksiyonu elde edilen östrojenlerin en önemlileri estradiol 17 β , östron ve östriol'dur. Bunlardan estradiol ve östron asıl östrogenler olarak bilinir, östriol ise bir yıkım ürünü olarak genellikle dışarı atılır (5, 13, 14).

Organizmada ovaryumlar, testis, böbrek üstü bezi ve gebelikte plasentadan salgılanan östrogenlerin asıl yapım yeri Graff folliküllerindeki theca interna ve granulosa hücreleridir.

Östrogenler dişilerde kızgınlığın pisişik ve fizikal değişikliklerini meydana getirirler. Bu hormonun etkisiyle dişiler erkeklerle çiftleşme isteği gösterirler, hiperemi ve protein sentezini stimüle ederek genital aktiviteyi artırırlar. Östrogenik etki ile uterus endometriumunun bez kanalları ve laktogenesisde meme bezindeki kanal sistemi gelişir. Östrusta vaginal epitelyumda değişikliklere neden olurlar. Hipofiz bezinden salgılanan hormonları kontrol

etmesi, oxytocin ve prostaglandinin etkilerini güçlendirmesi, implantasyona yardımcı olması diğer etkileridir (13, 24, 28). Östrojenlerin genel vücut metabolizması üzerine etkisi, protein ve mineral metabolizmalarını su alış verişini ve damar geçirgenliğini etkilemesinden ibarettir (14).

Östrojenler gebelikte artan oranlarda plasentadan salgılanırlar. Kısıraklarda gebeliğin 80. gününden sonra plaseenta kaynaklı östrojenlerin immunolojik ve kimyasal yöntemlerle düzeyleri ölçülerek gebelik tanısı yapılabilmektedir. Özellikle Estradiol-17 β ve Östron sülfatın nitel varlığını ortaya koymak amacı ile geliştirilen testler gebeliğin 110. gününden doğuma kadar, daha çok 150-300. günler arasında gebelik teşhisinde kullanılmaktadır (2).

Asha Mantri (30) 5 kısırakta 15 siklus boyunca yaptığı çalışmada siklusun değişik fazlarında estradiol-17 β miktarını en düşük 5 pg/ml, en yüksek 35 pg/ml olarak tesbit ettiğini, estradiol-17 β 'nin folliküler faz boyunca yükseldiğini, ovulasyondan 1 gün önce pik seviyesine ulaştığını (31.76 \pm 0.52), ovulasyon günü estradiol düzeyinin düştüğünü, luteal fazda hızlı bir düşüş olduğunu bildirmektedir ve yine hayvanlarda östrus belirtilerinin, kanda progesteron miktarının 1 ng/ml veya altına düşmeden görülmediğini belirtmektedir.

Eraldo S. (12) 3 kısırakta iki östrus periyodu boyunca yaptığı çalışmada plasma östrojen konsantrasyonunun ovulasyondan 4-5 gün önce hızla yükselmeye başladığını,

ovulasyondan 24-48 saat önce plasmada maksimum seviyeye (60-110 pg/ml) ulaştığını follikül yırtıldıktan sonraki 48 saat içinde de 20-50 pg/ml'ye düştüğünü, östrojenin plasmada yükselmesinin ovulasyon için ilk stimulus olabileceğini belirtmektedir.

Yuan Wei (74), doğumdan sonraki ilk östrus belirtilerinin görüldüğü süreyi 13.5 ± 2.34 gün tesbit ettiği, 18 kısırta yaptığı çalışmada, doğumdan sonra ilk östrusa kadar olan sürede plasma estradiol-17 β seviyesini ortalama 12.22 ± 1.92 pg/ml, ovulasyondan 2 gün önce 20.41 ± 3.27 , 1 gün önce 19.48 ± 2.16 pg/ml ve ovulasyondan sonraki ilk günde de 11.41 ± 1.72 pg/ml olarak tesbit etmiştir. Yine Yuan Wei ovulasyondan sonraki 2-10 günlük süredeki estradiol-17 β konsantrasyonunun doğumdan sonraki ilk östrusun görüldüğü süreye kadar olan dilimdeki konsantrasyonla benzer olduğunu bildirmektedir.

Hyland, J.(22), 263 kısırta yaptığı çalışmada plasma östron sülfat düzeyini östrusta (5.8 ± 1.2 ng/ml) ve gebeliğin 37 ile 50. günleri arasında (6.7 ± 0.4 ng/ml) diöstrustaki düzeyinden (1.8 ± 0.1) ve gebeliğin 1 ila 36. günleri arasındaki düzeyinden (1.6 ± 0.04 ng/ml) yüksek bulmuştur ve yalancı gebelik olan kısırakların plasma östron sülfat konsantrasyonlarının çok düşük (1.2 ± 0.1 ng/ml) olduğunu, gebeliğin 50. gününden önce E1S konsantrasyonunun tek başına gebeliğin teşhisi için kullanılamayacağını bildirmektedir.

Sato,K.(56), 22 kısırakta yaptığı çalışmada östrojenin birincisi ovulasyondan 3 gün önce, ikincisi ovulasyondan 15 gün sonra olmak üzere iki pik yaptığını, östrusun 6.günü deprese olduğunu ve gebeliğin 105. gününden sonra hızla arttığını bildirmektedir.

Yine Sato,K.(55), çiftleşmeden sonraki 80 ila 300. günler arasında hızlı kolorimetrik yöntemle idrarda östrojen düzeyini belirlediği çalışmada, gebeliğin 140-180. günleri arasında östrojen konsantrasyonunun en yüksek düzeyde olduğunu, gebeliğin 240. gününden sonra belirgin derecede düştüğünü ve bu yöntemle son tohumlamadan sonraki 100. günde gebeliğin tanısının mümkün olabileceğini bildirmektedir.

Tainturier,D.(63), gebeliğin ilk 8 haftasına kadar plasma östron sülfat düzeyinin 300 pg/ml'den az olduğunu, idrar östron sülfat düzeyinin 3 ila 90 ng/ml arasında olduğunu ve gebeliğin 70. gününden sonra idrar veya kan östron sülfat düzeyinin tesbiti ile gebeliğin tanısının mümkün olabileceğini belirtmektedir.

Bamberg ve Möstl,E. (6, 7, 35), dışkıda östrojenlerin konsantrasyonlarının tesbiti ile gebeliğin 120. gününden sonra gebelik tanısının doğrulanabileceğini belirtmektedirler.

Gebe olmayan kısırakta folliküler faz östrojen düzeyi kan plasmasında 463 ± 296 pg/ml, gebe kısırak plasmasında ise gebeliğin 120. gününden önce 10-20 pg/ml olarak

bildirilmektedir. Gelişen fötusun anne kanına büyük miktarlarda östön sülfat salgılaması ile gebeliğin 75-100. gününden itibaren kanda östrojen seviyesi artmaya başlar. 180-270. günlerde pik seviyesine ulaşır (800 pg/ml). 300. günden sonra doğuma kadar 150 pg/ml'ye düşer (18, 48, 53).

Östrojenlerin kanda tesbiti ile gebelik tanısı gebeliğin 40. gününden, idrarda tesbiti ile ise 120. gününden sonra olasıdır. Gebeliğin teşhisindeki doğruluk oranı 120. günde %80, 150-300. günde ise %100'dür (18, 27, 53).

c) Progesteron :

Steroid hormonlardan olan progesteron hormonunun biyosentezi asetat, kolesterol, pregnenolon üzerinden seyreder. Progesteron östrojenlerin, Androgenlerin ve Kortikosteridlerin sentezinde önemli bir ara ürünüdür. Yan zincirlerin oksidatif olarak kısalması ve 20, 22. karbonların hidroksile olmasıyla pregnenolon, bunun da dehidrasyonu sonucu progesteron oluşur. Progesteronların başlıca vücuttan atılma ürünü pregnandioldür (14). Dişinin dölerme aktiviteleri üzerine olan etkisi ve dölerme hormonlarının yapımında bir ara basamak oluşturan progesteron korpus luteum, plasenta ve adrenal kortekste yapılır (2, 14, 28).

Progesteragenlerin en önemli görevi cinsiyet organlarını gebelik için hazırlamak ve gebeliğin devamını sağlamaktır. Bu

nedenle östrojenlerle yakın bir ilişkisi vardır. Progesteron uterus mukozasında özel bir proteinle bağlanır ve bu kompleks içinde hücre çekirdeğine götürülür. Burada RNA'nın çeşitli şekillerini sentez ettirir (14).

Progesteron östrojen tarafından proliferasyona uğratılan uterus üzerine sinerjik etki yaparak özellikle uterusun bezsel sistemini geliştirip uterusu embryo taslağının implantasyonuna hazır hale getirir, memelerin alveol sistemlerini geliştirir, uterus kaslarının kontraksiyonlarını engelleyerek gebeliği garanti altına alır (2, 13, 45).

Kısıraklarda ovulasyonu takiben östrus belirtileri iki gün daha devam eder ki bu dönemde yırtılan follikül içinde korpus luteumun gelişimi görülür. Progesteron ovulasyondan 24 saat sonra plasmada ölçülebilecek miktara yükselir ve bu yükselme yaklaşık 1 hafta devam ederek maksimum düzeye ulaşır.

Östrus döneminde 1 ng/ml'nin altında olan kan progesteron düzeyi, ovulasyonu takiben oluşan siklik korpus luteumun gelişmesine paralel olarak artmaya başlar. Ovulasyondan sonraki 6. günde en yüksek düzeyine ulaşır ve siklusun 15-16. gününe kadar bu düzeyde kalır. Gebe olmayan kısıraklarda siklik korpus luteumun dejenere olmaya başladığı 15-16. günden itibaren kan progesteron düzeyi azalmaya başlar ve siklusun sonu ile onu izleyen ovulasyon döneminde yine 1 ng/ml'nin altına düşer (5, 16, 18, 28, 31, 39, 53).

Erken gebelikte PGF_2 alfa'nın korpus luteum üzerine olan luteolitik etkisini önleyen PGE_2 genç embryo ve endometriumdaki salgılanır. Korpus luteumun salgıladığı progesteron gonadotropinlerin salgılanmasını inhibe ederek gebelik sırasında östrus sikluslarının şekillenmesini önler. Kısıraklarda gebeliğin 30-40. gününe kadar salgılanan progesteron yalnızca korpus luteum kaynaklıdır. Gebeliğin 40. gününden sonra fetal trofoblast hücrelerce salgılanan PMSG ovaryumlarda ovulasyonlu veya ovulasyonsuz gelişimleri uyarır ve bu folliküllerin luteinizasyonu ile sekonder korpus luteumlar şekillenir. Sekonder korpus luteumların oluşması ile periferik kan progesteron düzeyi artmaya başlar. Gebeliğin 150-180. gününe kadar periferik dolaşımdaki progesteron primer ve sekonder korpus luteum kaynaklıdır (5, 40, 57). Gebeliğin 150-180. gününden sonra bütün korpus luteumlar regrese olur ve bu dönemden sonra gebeliğin devamı için gerekli olan progesteron plasentadan salgılanır. Bu dönemde östrojen düzeyindeki artışa da bağlı olarak serum progesteron düzeyi azalır. Korpus luteumların regresyonuna bağlı olarak progesteron hormonunun kandaki düzeyinin kaybolması ile birlikte, pregnandiol idrarla birlikte bol miktarda dışarı atılır. Gebeliğin ikinci yarısında anne kanında progesteron düzeyi düşük olmasına karşın fetal plasental bölümde progesteron düzeyi yüksek bulunmuştur. Buna neden olarak, progesteron hormonunun plaseenta tarafından salgılanmaya başlamasından sonra, kısırak plasentasının diffus epitheliochorial yapısından dolayı, progesteronun anne kanına geçmeden önce maternal doku tarafından metabolize edilmesi gösterilmektedir (19, 62).

Kısraklarda gebeliğin 25-45. günleri arasında yapılan ovariektomi abort veya fötusun rezorbsiyonuna neden olur. Ovariektomi gebeliğin 50. gününden sonra yapılacak olursa değişik sonuçlar ortaya çıkabilir. Gebeliğin 140 ila 210. günü arasında yapılan ovariektomi gebeliği etkilemez. Gebeliğin 140. gününden sonra, gebeliğin devamı için ovaryumlar önemli olmadığı gibi 50. günden sonrada progesteron kaynağı ovaryumlar değildir (5, 18).

Margaret ve ark.(31) 23 kısrakta yaptıkları çalışmada östrusta kan progesteron düzeyinin 0.5 ng/ml'nin altında olduğunu östrus bitiminden hemen sonra hızla yükselmeye başladığını, 7-10 gün sonra 5-14 ng/ml'ye ulaştığını ve çiftleşmeden sonraki 20. günde gebe kısrakların kan progesteron düzeylerinin 5-16 ng/ml olduğunu bildirmektedirler.

Nitschelm ve ark.(41) kan progesteron düzeylerini ovulasyon günü 1 ng/ml'nin altında, ovulasyondan 2 gün sonra 1-8 ng/ml, 5 gün sonra ise 10-24 ng/ml bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar progesteronun gebeliğin 5, 11 ve 17. günü olmak üzere 3 pik yaptığını belirtmektedirler.

Terblanche ve Maree (64) gebe kısraklarda çiftleşmeden sonraki 21. günde plasma progesteron düzeyini 5-9 ng/ml buldukları çalışmada, östrusta 1 ng/ml'nin altında olan progesteron düzeyinin ovulasyondan sonraki 3-4 gün içinde 10

ng/ml'nin üstüne çıktığını, bu düzeyde 5-8 gün kaldığını ve sonra 24-48 saat içinde hızlı azaldığını bir sonraki östrustaki düşük seviyesine indiğini bildirmektedirler.

Ohsaki ve ark.(43) kan serumunda progesteron tesbiti için ticari Enzymeimmunoassay kit'i (preg-test) kullandıkları çalışmada östrusta progesteron düzeyini 0.7 ng/ml luteal faz progesteron düzeyini ise ortalama 7.0 ng/ml olarak tesbit etmişlerdir ve çiftleşmeden sonraki 18-24. günler arasındaki progesteron düzeylerinin gebe kısıraklarda gebe olmayanlardan daha yüksek olduğunu bildirmektedirler.

Palmer (49) ovulasyondan sonraki 1. günde progesteron düzeyinin 1 ng/ml'nin üstüne çıktığını, 5 ila 10. gün arasında 6-10 ng/ml olduğunu 10. günden sonra progesteron düzeyinde bir düşme eğilimi görüldüğünü, ancak asıl ani düşüşün luteolisis'in başladığı siklusun 14. gününde görüldüğünü belirtmektedir.

Muesi ve arkadaşları (36) tohumlanan 24 kısırakta, tohumlamadan sonraki 18-20. günlerde RIA ile kan progesteron düzeylerini tayin ettikleri çalışmada gebe olanlarda progesteron düzeyini ortalama 10.3-23.9 nmol/litre, tekrar kızgınlık gösteren kısıraklarda ise 0.1-4.4 nmol/litre olarak tesbit etmişlerdir ve bu yöntemin çiftleşmeden 18-20 gün sonra geri dönmeyen kısıraklarda gebeliğin tanısı için kullanılabilir bir yöntem olduğunu işaret etmektedirler.

Mantri ve ark. (30) Folliküler fazda progesteron düzeyinin yaklaşık 1 ng/ml olduğunu ovulasyondan 6-7 gün sonra pik seviyesine (7-10 ng/ml) ulaştığını ve sonra düşmeye başladığını bildirmektedirler.

9 kısırakta 12 siklus boyunca yapılan çalışmada folliküler fazda ve luteal fazda progesteron değerleri ölçülmüş; folliküler fazda Smith 0.64 ng/ml, stabenfeldt 0.65 ng/ml, plotka 0.61 ng/ml, Sharp 0.58 ng/ml, luteal fazda aynı araştırmacılar sırası ile 7.7 ng/ml, 10.0 ng/ml, 9.4 ng/ml, 10.9 ng/ml olarak belirlemişlerdir ve plasma progesteron düzeyinin 1 ng/ml'nin altına düşmeden östrus belirtilerinin görülmediğini bildirmektedirler (58).

Hunt ve ark. (20), 13 kısırakta haftada 3 kez kan ve süt örneği alarak 5 ay boyunca yaptıkları çalışmada, progesteron düzeyini östrusta 1 ng/ml'den düşük diöstrusta ise 1 ng/ml'den yüksek bulmuşlardır. Erken gebelikte ise plasma progesteron düzeyini 5.4 ng/ml süt progesteron düzeyini 4.7 ng/ml olarak tesbit etmişlerdir. Bu araştırmacılar haftada 2-3 kez alınan kan ve süt örneklerindeki progesteron değerleriyle östrus siklusunu ve ovaryum fonksiyonlarının izlenebileceğini işaret etmektedirler.

Sato ve ark. (54) Plasma progesteron düzeyinin tesbiti ile kısıraklarda erken gebeliğin tanımlanabileceğini belirttikleri çalışmalarında, gebe olmayan kısıraklarda östrusta progesteron düzeyini yaklaşık 1 ng/ml olarak belirtmişlerdir. Progesteron düzeyinin yükselmeye siklusun 5.

günü başladığını, 10. günde pik seviyesine ulaştığını (ortalama 9.4 ng/ml) ve 20. günde hızla düştüğünü bildirmektedirler. Gebe kısıraklarda ise progesteron düzeyinin gebeliğin 15. gününde 13.0 ng/ml, 20.gününde ise 5.8 ng/ml olduğunu tesbit etmişlerdir.

Vivo ve ark. (70) 37 İspanyol ve 26 arap ırkı kısırakta yaptıkları çalışmada folliküler faz ve luteal faz sürelerinin yaklaşık olarak aynı uzunlukta olmasına karşın, İspanyol ırkında luteal faz progesteron düzeyini 7.2 ng/ml, arap ırkında ise 11.0 ng/ml olarak tesbit etmişlerdir.

Niekerk ve ark. (39) üreme geçmişleri bilinen 35 siklik ve gebe kısırakta korpus luteumun gelişmesini, sekresyonunu ve regresyonunu inceledikleri çalışmada; thekal hücrelerin ovulasyondan birkaç gün önce hızla geliştiğini ve ovulasyondan sonraki 24 saat içinde thekal hücrelerin en ileri dejeneratif aşamada olduğunu, granuloza hücrelerinin hipertofisi ve luteinizasyonunun ovulasyondan 10 saat sonra başladığını bildirmekte ve gebe olmayan kısıraklarda lutein hücrelerinin dejenerasyonunun ovulasyondan 12 gün sonra, gebe kısıraklarda ise ovulasyondan 38 gün sonra başladığını işaret etmektedirler. Ayrıca plasma progesteron düzeyinin korpus, luteumun morfolojik değişimiyle paralellik gösterdiğini bildirmektedirler.

Tomasgard ve ark. (66) çiftleşmeden 3 hafta sonra 64 kısırakta yaptıkları çalışmada, kısıraklardan 48 tanesini gebe olarak (1.grub) 9 tanesini gebelikten şüpheli olarak (2.grub)

değerlendirmişler ve 7 kısırağında 3 hafta sonra tekrar kızgınlık gösterdiğini belirlemişlerdir. Grub 1 deki kısırakların % 94'ünün, grub 2 dekilerin ise % 78'inin gebeliği daha sonra doğrulanmıştır. Gebe kısırakların kan progesteron düzeyinin 2 ng/ml'nin üstünde olduğunu, gebe olmayanların ise 2 ng/ml'nin altında olduğunu belirttikleri çalışmalarında gebeliğin erken teşhisinde kan progesteron düzeyinin yardımcı olacağı görüşüne varmışlardır.

Vries ve ark. (71) tohumlamadan 18 gün sonra kan progesteron düzeyini ölçerek gebeliği belirlemek amacı ile 75 kısırakta yaptıkları çalışmada, gebelik için eşik sınırı 2 ng/ml kabul etmişler, gebe olmayanların teşhisindeki doğruluk oranınının % 100, gebe olanların teşhisindeki doğruluk oranını da % 78.3 bulmuşlardır. Embryonik ölümler dikkate alındığında pozitif teşhisin güvenilirliğini % 91.6, tüm testin güvenilirliğini ise % 84.7 olarak bildirmişlerdir.

Palmer ve ark. (47) çiftleşmeden sonraki 18.günde kan progesteron düzeylerini ölçtükleri 72 kısırakta, progesteron düzeyi 1.5 ng/ml den düşük olan tüm kısırakların gebe olmadığını yüksek olanların ise gebe olduğunu tesbit edip, bu yöntemle östrusun tesbiti ve gebeliğin teşhisindeki doğruluk oranını % 96 olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Elmore ve ark. (11) kan progesteron düzeylerinin ölçümüyle embriyonal ve fetal ölümlerin, düzensiz siklusların ve ovulasyonun gözlenmesini tartıştıkları çalışmada 26 kısırakta ovulasyondan sonraki 12. ve 24. günler arasında, 37

kısırdan da 13 ila 23. günler arasında 2 günde bir kan örneği olarak progesteron düzeylerini ölçmüşlerdir. Gebeliği rektal palpasyon ve ultrasaund ile doğruladıkları çalışmada, gebe kısırakların kan progesteron düzeylerinin 2 ng/ml'den düşük olmadığını, 18 ve 19. günlerde progesteron düzeyi 2 ng/ml veya daha yüksek olan kısırakların % 90'ının gebe olduğunu, 18.günden önce ve 19.günden sonra alınan örneklerle göre yapılan gebelik teşhisindeki yanılma oranının 18.-19. günlerde alınan örneklerle göre yapılan gebelik teşhisindeki yanılma oranından yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

3.4. HORMON TAYINI

A) RADIOIMMUNOASSAY (RIA)

Hayvan yetiştiriciliğinde bir endokrin bezin fonksiyonel durumu hakkında bilgi edinmek için kanda hormon analizlerinin önemi büyüktür. Geçmişte, kanda hormon düzeylerini ölçmede kullanılan biyolojik ve kimyasal yöntemler tek bir örneğin tayini için çok fazla miktarda kan, fazla zaman ve emek gerektiriyordu. Örneğin tek bir numunede progesteron tayini için 400-500 ml kan plasması gerekirdi (60). Bu durum bir hayvandan seri halde kan alınmasını engelliyordu. Radyoassay tekniklerinin gelişmesi ve radyoaktif işaretli izleyicilerin antikorun bağlanma yüzeyleri ile birlikte kullanılması endokrinolojide yeni ufuklar açtı. RIA tekniği ilk defa insan

plasmasında insülin hormonu ölçümünde kullanıldı. O zamandan beri de birçok hormon ve diğer maddelerin ölçümünde kullanılmaktadır (10).

RIA tekniği ilk olarak peptid hormonların tayininde kullanılmıştır. Çünkü peptid hormonlar büyük moleküller olup, antijenik özellikleri vardır. Burada ana sorun hormon için uygun bir antiserum oluşturmak ve antijeni (hormon) radyoaktif izotopla işaretlemektir. Moleküler ağırlığı 1000'in altında olan moleküllerin çoğunun immunolojik özelliği yoktur. Steroid hormonların çoğunun moleküler ağırlığı 300-400 arasındadır ve antijenik özellikleri yoktur (1). RIA'nın uygulanabilmesi için bu hormonların immunojenik yapılması şarttır. Bu işlem küçük moleküler ağırlıklı bir molekülün (steroid), büyük moleküler ağırlıklı (Sığır serum albumini, BSA gibi) bir moleküle bağlanması ile başarılmıştır. Bu buluş steroid hormonlar için de RIA tekniğinin geliştirilmesini olası kılmıştır.

RIA duyarlılığı, özgüllüğü ve yüksek örnek kapasitesinden dolayı, hormon çalışmalarında son yıllarda kullanılan en geçerli yöntemlerden birisidir.

RIA, radyoaktif işaretli ve işaretsiz antijenler arasında, her iki antijene özgü olan antikor moleküllerine bağlanabilmeleri esasını içeren bir yarış reaksiyonudur. Antijenin işaretli ve işaretsiz iki tipi sınırlı miktardaki antikor ile aynı ortamda bulduklarında (tampon çözelti içerisinde) antikordaki bağlanma yüzeyleri için yarışa

gireceklerdir. Bu demektir ki, daha fazla işaretsiz antijen olduğunda (örnek veya Standart), antikorum bağlanma yüzeylerine daha fazla bağlanacak ve radyoaktif işaretli antijenin bağlanabileceği daha az yer kalacaktır. Bu yarış doğrudan doğruya ortamda bulunan işaretsiz antijen (yani örnekte bulunan hormon) miktarı ile orantılıdır. Daha sonraki işlem, antikora bağlı antijenleri, bağlanmamış antijenlerden ayırmak ve her iki fraksiyondan birindeki radyoaktiviteyi saptamaktır. Böylece bağlı veya bağlı olmayan radyoaktif işaretli antijenin radyoaktivitesine dayanarak bilinmeyen örnekteki hormon miktarı hesaplanır.

İşaretsiz antijenin miktarını tayin etmede bu antijenin çeşitli oranlarda, bilinen miktarları, sabit miktarda antijen ve sabit miktarda antikora ile reaksiyona sokulur ve standart konsantrasyonları yatay eksene, radyoaktivite sayım sonuçları da dikey eksene işaretleterek standart eğri elde edilir. Bu standart eğri belirli konsantrasyonlardaki işaretsiz antijenin antikora bağlanma yarışı sonucu ne kadar işaretli antijenin antikora bağlanabildiğini gösterir. Örneklerin radyoaktivite sayaçlarında ölçülen aktiviteleri (cpm) standart eğriye uygulanarak bilinmeyen işaretsiz antijen miktarı hesaplanır. RIA uygulaması 3 temel unsuru içerir.

1. Antikora :

Steroid hormonlar antijenik özellikte olmadıklarından dolayı, steroidlerin taşıyıcı proteinlere bağlanmalarıyla, bu

hormonlara karşı spesifik antikorlar oluşturulur (21).

Progesterona karşı antikor, farklı steroid protein konjugatları kullanılarak oluşturulmuştur. Progesteron molekülü BSA'ya 3, 6, 7, 11 ve 20. pozisyonlarda bağlanmış ve en iyi spesifik antikorlar 11 α -hidroksi progesteronun BSA'ya bağlanması ile elde edilmiştir (25). Bu konjugat tavşan, keçi gibi hayvanlara periyodik olarak (booster injections) enjekte edilerek spesifik antikorlar elde edilir.

2. Radyoaktif İşaretli Antijen :

Radyoimmunolojik deneylerin çoğunda en çok kullanılan radyoizotoplar ^{125}I , ^{131}I ve ^3H dür. Steroidler genellikle ^3H ile (tritium) işaretlenirler. Tiroid ve proteohormonlar ise ^{125}I veya ^{131}I ile işaretlenirler. Tritium işaretli hormonlar, tritium'un yarı ömrünün (12 yıl) uzun olması nedeni ile daha stabildirler. Diğer taraftan radyoaktif iyot işaretli hormonların spesifik aktivitesi daha yüksektir (42).

3. Örnek Antijeni :

Reaksiyon sırasında radyoaktif işaretli antijenle, antikora bağlanma yarışına giren, numunede ölçülmesi istenilen antijendir.

Bağlı ve Bağlı Olmayan Fazların Ayırımı :

RIA'da antikora bağlanmış ve bağlanmamış antijenlerin ayırımında çeşitli teknikler kullanılır. Tritium işaretli steroidler için en ideal olarak kullanılan sistem dekstran'la kılıflanmış aktif kömürdür. (Dextran-coated Charcoal).

Radyoaktivite Sayımı ve Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi :

Deney sonunda bağlı ve bağlı olmayan fraksiyonlar birbirinden ayrıldıktan sonra sayım yapılır. Tritium β radyasyonu yaydığından sintilasyon sayacında sintilatör içerisinde sayılır. Sayım sonuçlarının (cpm, dakikadaki sayım) ifadesinde, doz- cevap eğrileri için çeşitli koordinat sistemleri kullanılır. Bağlı antijenin serbest oranı (B/S); bağlının total aktiviteye oranı ki bu gerçek (absolute binding) bağlanmadır (B/T); bağlının işaretli antijen içermeyen kör tüpündeki bağlıya oranı ki bu nisbi bağlanma (B/Bo, relative binding) olup, hemen bütün doz- cevap eğrilerinde en fazla kullanılandır.

B/S; B/T; B/Bo, doz- cevap eğrisinin cevap kısmını teşkil eder ve dikey eksene işaretlenir. Doz ise logaritmik veya aritmetik skala üzerinde gösterilir. Logaritmik, lineer bir doz- cevap eğrisi elde etmek için, log'a (doz) karşı logit (B/Bo) cevap, koordinat sistemi en uygun sistemdir. Doz cevap eğrisinden bilinmeyen antijen miktarı hesaplanır (46).

B. ENZYME IMMUNOASSAY (EIA) :

Radyoimmunoassay yönteminin geliştirilmesinden sonra hormonlar pikogram düzeyinde hassas, güvenilir ve seri olarak tayin edilebilmiştir. Ancak RIA yönteminin bazı dezavantajları bildirilmektedir (3). Bundan dolayı bazı araştırmacılar izotopik olmayan işaretleyicilerin kullanılması için çalışmışlar, bu da immun testlerin diğer tiplerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu amaçla enzim, fluorochrom, fluorogen gibi işaretlerin kullanıldığı görülmektedir (29).

Enzim ile işaretlemede testin duyarlılığı, özgüllüğü, çabukluk, güvenilirlik, kolay uygulanabilirlik ve ekonomik olma gibi özelliklerin daha belirgin olduğu kaydedilmektedir (68). RIA ve EIA tekniklerinin aynı temel prensibe sahip oldukları ancak EIA'da hormonun enzim, RIA'da ise radyoaktif izotop ile işaretlendiği görülmektedir. Miktarı saptanacak olan hormon, belirli miktarlardaki işaretli hormon ve bu hormonlara karşı üretilmiş belirli miktarlardaki antikör ile rekasyona sokulmaktadır (69). İşaretli ve işaretsiz hormonlar ortamda buldukları konsantrasyonları ile orantılı olarak antikora bağlanmak için yarışırlar. Antikora bağlanan enzim işaretli hormon miktarı ile örnekte bulunan işaretsiz hormon miktarı arasında ters bir ilişki vardır. Hangisinin konsantrasyonu yüksek ise antikora daha çok bağlanacaktır. Reaksiyon sonrası en önemli işlem bağlı ve serbest kısımların birbirinden ayrılmasıdır. Bu ayırma işleminden sonra antikora bağlı olan veya serbest kalan işaretli hormon ölçülerek numunedeki

hormon miktarı standart eğriden hesaplanır. Hormonun bilinen miktarları işaretli hormon ve antikor ile reaksiyona sokulur, standart hormon konsantrasyonu apsise (x eksenini), bağılı veya serbest kalan işaretli hormon miktarı ordinata (y eksenini) işaretlenerek standart eğri elde edilir. Bu eğri bilinen miktardaki işaretsiz hormonun bulunduğu ortamda ne kadar işaretli hormonun bağlanabildiğini gösterir. Ortamda işaretli hormon fazla işaretsiz hormon az ise yüksek sayım (koyu renk), bunun tersi olduğunda da düşük sayım (açık renk) elde edilir ve bu değişimler EIA'da göz ile de izlenebilecek kadar belirgindir (65).

EIA'da en çok kullanılan enzim diğer enzimlerden çok daha ucuza elde edilebilen Horse Radish Peroxidase (HRP) dir. Bu enzimin aktivitesi H_2O_2 ile saptanır fakat substrat uzun süre stabil kalamadığından daima taze olarak hazırlanmalıdır (29).

EIA'nın hassasiyetini etkileyen faktörlerden biri olan, immun reaksiyon sonundaki ayırım sırasında bağılı hormonun, serbest kalan kısımdan ayrılması işlemi, etkili bir şekilde yapılmalıdır. Bu ayırım safhası zaman alıcı olmasına karşın EIA testlerinde enzimi inhibe edici maddelerin ayrılmasını sağlar. En çok kullanılan teknikler çift antikor, çift antikor-katı faz ve katı faz teknikleridir (8). Çift antikor ve çift antikor katı faz tekniği uzun süreli inkübasyon, santrifüj ve yıkama aşamaları gerektirdiğinden, ayırma işleminin katı faz tekniği ile 96 delikli mikrotitrasyon plaklarının kullanılarak yapılması en uygun teknik olarak

önerilmektedir (37). Böylece bağı ve serbest kısımların ayrılması için santrifüje gerek duyulmamakta, plağın ters çevrilerek içeriğinin boşaltılması ile bu işlem kolayca yapılmaktadır. Bu nedenle hem süre hem de malzeme yönünden yarar sağlanmaktadır,

EIA yöntemiyle progesteron tayini son zamanlarda uygulamaya konulmuştur. Bu teknik ilk kez insan plasmasında ele alınmıştır (23). Uygulamada kanda ve sütte progesteron, ovaryumun fonksiyonel durumunun saptanması, gizli kızgınlık, kistik follikül, kalıcı korpus luteum, düzensiz siklus gibi döl verimine yönelik aksaklıkların belirlenmesi (34), uygun tohumlama zamanının anlaşılması ve erken gebelik teşhisi gibi amaçlarla tayin edilmektedir (73).

4.MATERYAL METOT

4.1. Materyal :

Bu çalışma Gemlik Askeri Veteriner Araştırma Enstitüsü ve Eğitim Merkez Komutanlığı yetiştirmesindeki 20 adet saf ve yarım kan İngiliz kısırakta yapıldı.

4.1.1. Deneme Hayvanlarının Seçimi :

Denemeye alınan kısıraklar yetiştirme kayıtlarındaki özgeçmişleri incelenerek, bir önceki yıl doğum yapmış, siklik kısıraklardan seçildi.

4.1.2. Deneme Hayvanlarının Gruplandırılması :

Denemeye alınan kısıraklar 2 grub olarak çalışıldı. 1.grubtaki 10 kısırak bir östrus siklusu boyunca serum progesteron ve östradiol 17 β düzeylerinin belirlenmesi için; 2.grubtaki 10 kısırak ise 1.grubtaki kısıraklarla birlikte ilk tohumlamadan sonraki 20.günde serum progesteron düzeylerinin belirlenerek, gebeliğin erken teşhisi amacı ile çalışıldı.

4.1.3. Aletler :

- Sekiz kanallı fotometre (Titertek-Multiskan,

Finlandiya)

- Mikrotitrasyon plak alkalayıcısı (Titertek-Finlandiya)
- Sekiz ve oniki kanallı otomatik pipetler (0-250 µl, 0-50 µl, Titertek, Finlandiya)
- Mikrotitrasyon plak yıkayıcısı (Titertek, Finlandiya)
- Soğutuculu santrifüj (IEC CENTRA-7R, A.B.D.)
- Çalkalayıcı su banyosu (Grant, İngiltere)
- Likit sintilasyon sayacı (ICN-Corumat 2700, Belçika)
- Otomatik karıştırıcı (Sybron-Thermolyne, A.B.D.)
- Vakumlu fırın (Jet-1 Otomatik, B.Almanya)
- Derin dondurucu (Bosch, B.Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Spin-Master, A.B.D.)

4.1.4. Hormonlar :

- progesteron-7 α Carboxyethyltioether-BSA
- 6 β hydroxyprogesteronhemisuccinate-HRP
- 2, 4, 6, 7, 16, 17- 3 H östradiol
- 1, 2, 6, 7- 3 H progesterone

4.1.5. Diğer Sarf Malzemesi :

- Mikrotitrasyon plakları (Nunc-Immuno plate)
- 12x75 mm cam deney tüpleri (bir defa kullanıldı ve atıldı.)
- 12x60 mm, polietilen ağzı kapaklı radyoaktif sayım tüpleri (Vial). Bir kere kullanıldı ve atıldı.

- Plastik, otomatik pipet uçları. Bir kere kullanıldı ve atıldı
- 5 mm'lik kapaklı steril tüpler

4.1.6. DeneYlerde Kullanılan Tampon ve Solusyonlar

- Karbonat Tamponu (pH 9.6)

4.29 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
2.93 g NaHCO_3
0.2 g Thimerosal
1.0 lt. Distile Su

- Phosphate Buffer Saline (PBS) Tamponu (pH 7.2)

1.27 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
12.10 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
8.5 g NaCl
0.2 g Thimerosal
1.0 lt Distile su

- DeneY Tamponu (pH 7.2)

7.12 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
8.5 g NaCl
0.2 g Thimerosal
1.0 g BSA
1.0 lt Distile su

- Substrat Tamponu (pH 5.5)

13.61 g Sodium acetate $3 \text{H}_2\text{O}$

0.50 g Citric acid

160 μ l H_2O_2 (% 30)

100 ml Distile su

- Bovine Serum Albumin (BSA) Solusyonu

1.0 g BSA

100 ml PBS tamponu

- Tetramethylbenzidine (TMB) solusyonu

60 mg TMB

10 ml Dimethylsulfoxide

- Substrat Solusyonu

1.5 ml substrat tamponu

200 μ l TMB solusyonu

15 ml Distile su

- Sülfirik Asit Solusyonu (SN)

110 ml H_2SO_4

890 ml Distile su

- Yıkama Solusyonu

0.50 g Tween-80

1.0 lt Distile su

- Fosfat Tamponu (pH 7.2)

2.69 g KH_2PO_4

8.34 g Na_2HPO_4

0.33 g NaH_2

1.0 lt Distile su

- Aktif Kömür Süspansiyonu (% 0.4)
 - 4.0 g Aktif kömür (Norit A)
 - 0.4 g Dextran T-70
 - 1.0 lt Distile su

4.2. Metot

4.2.1. Kızgınlığın Tesbiti :

Kısraklar kızgınlık göstermeye Mart, Nisan aylarında başladı. Çalışmaya Mayıs ayının ikinci yarısında başlandı. Kızgınlığın tesbiti aygır muayenesi, spekülüm ile serviks uteri ve vaginanın muayenesi ve ovaryumların palpasyonu ile yapıldı.

4.2.2. Kan Örneklerinin Alınması :

Çalışmanın birinci aşamasında muayeneler sonucu östrusta olduğu belirlenen 10 kısraktan, bir siklus boyunca serum estradiol 17- β ve progesteron düzeylerini belirlemek için, kızgınlığın 1. gününden başlamak üzere haftada 3 kez jugular vena'dan yaklaşık 3 ml. kan alındı. İkinci aşamada müteakip sikluslarında tohumlanan 1.grubtaki 10 kısrak ve değişik zamanlarda tohumlanan 2. grubdaki 10 kısraktan kan progesteron düzeyinin tesbiti ile gebeliğin erken dönemde teşhisi için son tohumlamanın yapıldığı gün, son tohumlamadan sonraki 6. gün ve ilk tohumlamadan sonraki 20. günü olmak üzere toplam 3 kez aynı yöntemle kan alındı. Alınan kan

örnekleri 3 saat +4°C de pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra 3000 rpm'de 15 dakika santrifüje edilerek serumları ayrıldı ve hormon analizleri yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Tohumlama kızgınlığının 1.gününden başlayarak 48 saatte bir tekrarlanmak suretiyle doğal aşımia yapıldı. Tohumlamadan sonraki 60. günde rektal palpasyonla gebelik araştırıldı.

4.2.3. HORMON TAYİNİ

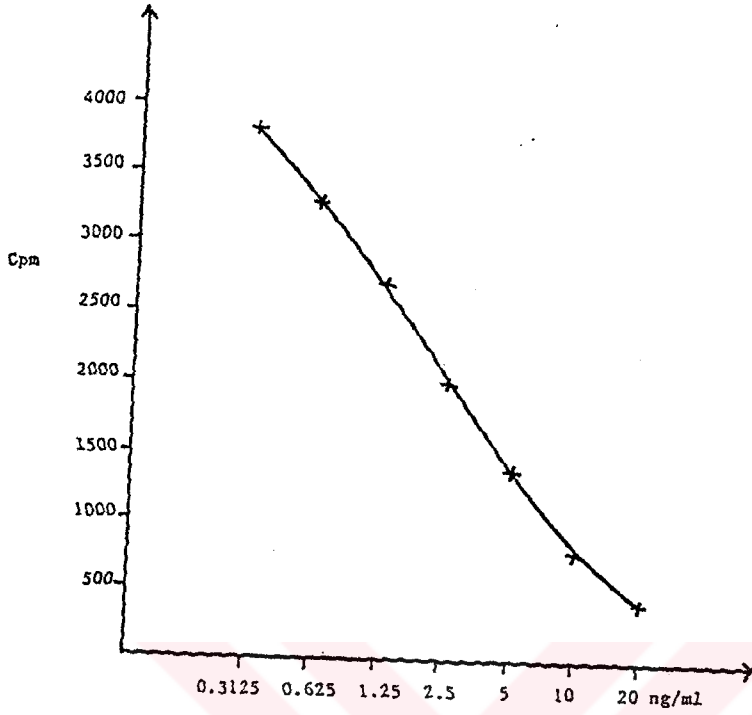
RIA ile Progesteron Tayini :

Serumda progesteron RIA yöntemiyle direk olarak tayin edildi (61). Standartlar progesteron içermeyen at serumunda 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ng/ml düzeyinde olacak şekilde hazırlandı.

Deney tüplerine 20 µl serum veya standart, 100 µl ³H-progesteron, 100 µl progesteron antikoru ve 300 µl tampon kondu ve 60 dakika 37°C'de, 1 gece +4°C de inkübe edildi. Serbest kısımlar aktif kömür ile ayrıldıktan sonra bağlı kısım beta sayacında sintilatör içinde sayıldı. Tablo 4.2.3.1'de gösterilen progesteron tayininde sonuçlar standart eğriden (Şekil 4.2.3.1.) okunarak hesaplandı.

RIA ile E₂17β Tayini :

E₂17β'nın serumda RIA ile tayini direkt olarak yapıldı



Şekil. 4.2.3.1.: Standart Eğri (RIA ile progesteron tayini)

Tablo 4.2.3.1.: RIA ile Serumda Direk Progesteron Tayini

	T	NSB	Q	std	Numune
Tampon	900 µl	400 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Numune	---	---	---	---	20 µl
Standart	---	---	---	20 µl	---
- Serum	20 µl	20 µl	20 µl	---	---
³ H-Progesteron	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Antikor	---	---	100 µl	100 µl	100 µl

- Karıştırılır
- 60 dakika 37°C'de,
- 1 gece +4°C de inkübe edilir

Aktif Köşür	---	500 µl	500 µl	300 µl	500 µl
-------------	-----	--------	--------	--------	--------

- 1 dakika karıştırılır
- 10 dakika buz banyosunda inkübe edilir
- 15 dakika 3000 rpm'de santrifüje edilir

Xyloflour	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
-----------	------	------	------	------	------

- Beta sayacında 1 dakika sayılır

T = Total aktivite (10.000 cpm)
 NSB= Nişgöl oluşan bağlanma
 Q = Relatif bağlanma
 std= Standart hormon
 - Serum : Progesteron içermeyen serum

(67). Bu amaçla 50 µl serum, 100 µl $^3\text{H}\text{E}_{217\beta}$ (~ 10.000 cpm/tüp) 100 µl $\text{E}_{217\beta}$ antikorunu ile 60 dakika 37°C 'de ve 1 gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Serbest kısmı bağlıdan ayırmak için tüplere %0.4 lük aktif kömür süspansiyonundan 200 µl konuldu ve 10 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki inkübasyondan sonra tüpler 15 dakika 3000 rpm.'de santrifüje edildi. Bağlı fraksiyon 3 ml. sintilatör kokteyli (xyloflour) ile karıştırılarak beta sayacında sayıldı.

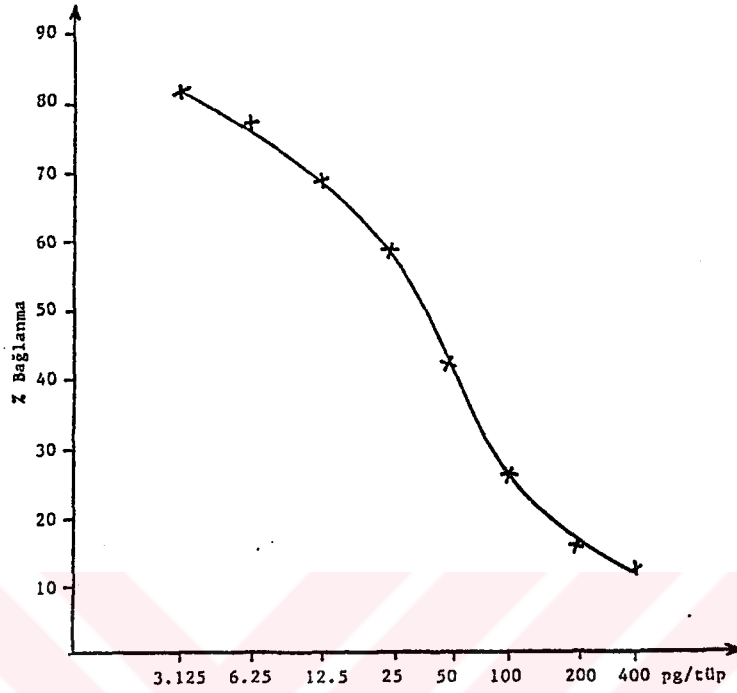
Tablo 4.2.3.2.'de gösterilen $\text{E}_{217\beta}$ tayininde sonuçlar standart eğriden okunarak hesaplandı (Şekil 4.2.3.2.).

EIA ile Progesteron Tayini :

Kısarak serumunda EIA ile progesteron tayini için belirtilen çift antikorlu mikrotitrasyon plak Enzymeimmunoassay (EIA) yöntemi kullanıldı (51).

Standartlar progesteron içermeyen at serumunda 0.375, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24 ng/ml düzeyinde olacak şekilde hazırlandı.

İlk olarak mikrotitrasyon plakları tavşan IgG'sine (immunoglobulin G) karşı koyunlarda üretilen antiserumdan saflaştırılmış olan IgG ile kaplandı. Delik başına 1 µg IgG olacak şekilde karbonat tamponu (PH:9.6) ile kaplanan plaklar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat inkübe edildi. Daha sonra içeriği boşaltılan



Şekil 4.2.3.2.: Standart Eğri (RIA ile E_{217β} tayini)

Tablo 4.2.3.2.: RIA ile Serumda Direk E_{217β} Tayini

	T	NSB	0	std	Numune
Tampon	600 µl	400 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Numune	---	---	---	---	50 µl
Standart	---	---	---	50 µl	---
- Serum	50 µl	50 µl	50 µl	---	---
³ HE _{217β}	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Antikor	---	---	100 µl	100 µl	100 µl

- Karıştırılır
- 60 dakika 37°C de
- 1 gece +4°C de inkübe edilir

Aktif Köşür	---	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
-------------	-----	--------	--------	--------	--------

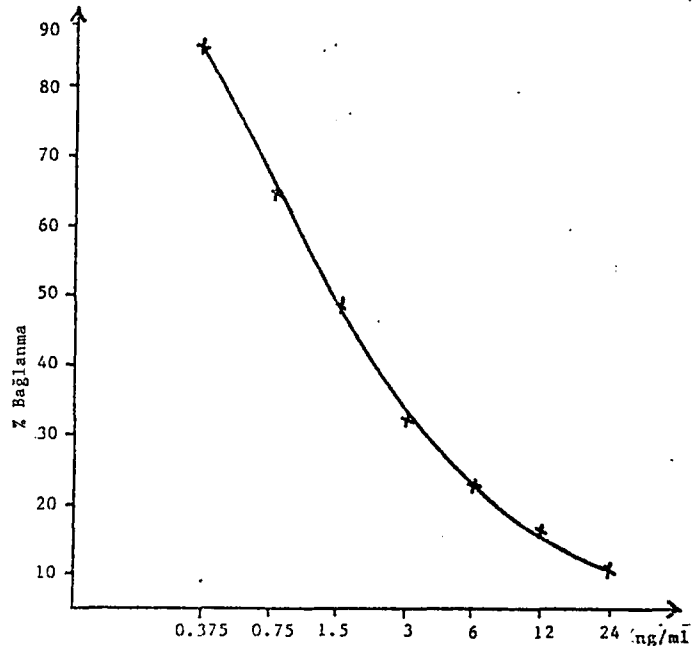
- 1 dakika karıştırılır
- 10 dakika buz banyosunda inkübe edilir
- 15 dakika 3000 rpm'de santrifüje edilir

Xyloflour	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
-----------	------	------	------	------	------

- Beta sayacında 1 dakika sayılır
- T= Total aktivite (10.000 cpm)
- NSB= Özgül olmayan bağlanma
- 0= Relativ bağlanma
- std= Standart hormon
- Serum : E_{217β} içermeyen serum

plaklar spesifik olmayan bağlanmayı (NSB) minimuma indirmek için %1'lik BSA (Sığır serum albumini) solüsyonu ile 40 dakika inkübe edildi.

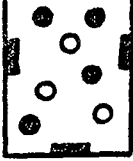
Böylece kaplama işlemi tamamlanan plaklar -20°C 'de saklandı. Progesteron tayini için bu plaklara 1 μl serum, 100 μl progesteron antiserumu (1:30.000 lik konsantrasyonda) ve 100 μl horse radish peroxidase (HRP) enzimi ile işaretli progesteron konjugatı pipetlendi. Plaklar 37°C 'de karanlık ortamda 2 saat inkübe edildi ve inkübasyon sonrası plak 4 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Böylece serbest kısım bağlı kısımdan ayrılarak atılmış oldu. Plak yüzeyine bağlı kalan işaretli hormon miktarını tesbit etmek için, plaklara delik başına 150 μl substrat solüsyonu kondu ve plak 40 dakika oda ısısında inkübe edildi. Her deliğe 50 μl 4N H_2SO_4 ilave edilerek renk reaksiyonu durduruldu ve oluşan renk yoğunluğu fotometrede 450 nm filtre kullanılarak okundu. Şekil 4.2.3.3.'de gösterilen EIA ile progesteron tayininde sonuçlar standart eğriden (Şekil 4.2.3.4.) okunarak hesaplandı.



Şekil 4.2.3.4.: Standart Eğri (EIA ile Progesteron Tayini)



Plak anti tavşan-koyun
IgG ile kaplanır.



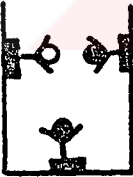
Numune ve enzim işaretli
progesteron pipetlenir.



Progesteron antikoru ilave
edilir ve plak 37 °C de
2 saat inkübe edilir.



Bağlanmayan kısımlar yıkanarak
atılır.



Substrat konarak oluşan renk
fotometrede okunur.

- Anti tavşan-koyun IgG
- Y Progesteron antikoru
- Enzim işaretli progesteron
- Numune (serbest progesteron)

Şekil 4.2.3.3.: Çift Antikorlu Mikrotitrasyon Plak
EIA Yöntemi İle Serumda Progesteron
Tayini

5. BULGULAR

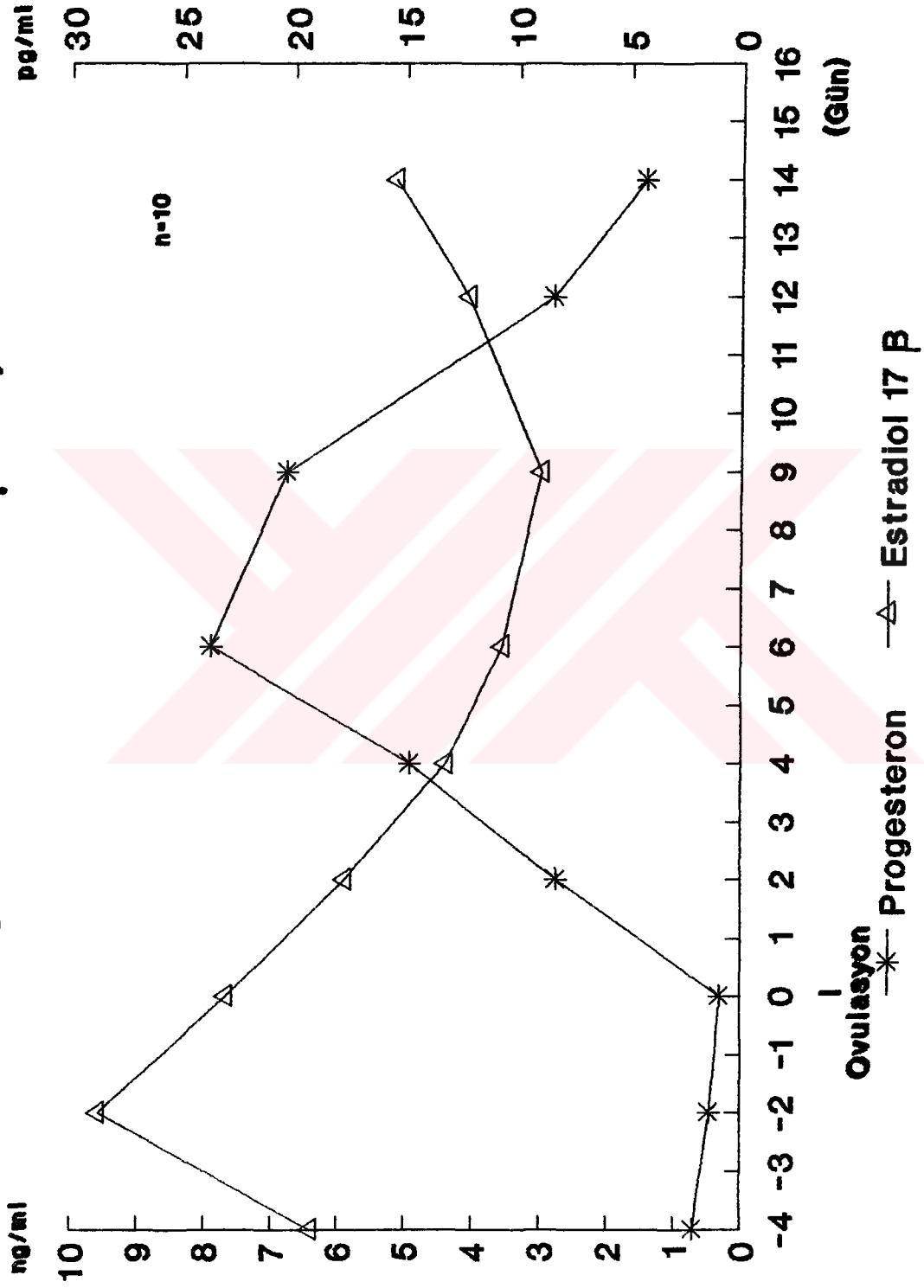
Östrus siklusu uzunluğu ortalama 20.7 ± 1.0 gün olarak tesbit edilen 10 kısrağın siklus boyunca kan progesteron ve estradiol 17β hormon seviyeleri Tablo 5.1'de verilmiştir

Tablo 5.1. Siklusun Belirli Günlerinde Kan Progesteron ve Estradiol 17β Düzeyleri

Siklus Boyunca Kan Alınan Günler (n=10)	Progesteron (ng/ml)	Estradiol 17β (pg/ml)
-4	0.71 ± 0.20	19.21 ± 2.51
-2	0.46 ± 0.16	28.71 ± 3.33
0	0.30 ± 0.12	22.98 ± 2.21
2	2.75 ± 0.63	17.66 ± 1.54
4	4.92 ± 1.23	13.16 ± 2.02
6	7.89 ± 1.86	10.65 ± 1.18
9	6.77 ± 1.69	8.94 ± 1.02
12	2.80 ± 0.63	12.17 ± 2.35
14	1.44 ± 0.35	15.45 ± 2.71

Grafik 5.1.'den de izleneceği gibi progesteron seviyesi östrusun 1. gününden ovulasyona kadar olan dönemde 1 ng/ml'nin altında bulundu. Ovulasyondan sonraki 2.günde 2.75 ± 0.63 ng/ml'ye yükselen progesteron miktarı 6.günde pik seviyesi olan 7.89 ± 1.86 ng/ml'ye ulaştı. Progesteron yoğunluğu siklusun 14.günü 6.77 ± 1.69 ng/ml, 17.günü 2.80 ± 0.63 ng/ml 19.günü de 1.44 ± 0.35 ng/ml olarak ölçüldü.

**Grafik 5.1.:Östrus Siklusu Boyunca
Progesteron ve Östradiol 17 β Düzeyleri**



Östrusun 1.günü 19.21 ± 2.51 pg/ml olan estradiol- 17β , östrusun 3.günü 28.71 ± 3.33 pg/ml'ye yükseldi. Ovulasyon günü 22.98 ± 2.21 pg/ml ölçülen estradiol 17β , siklusun 14.gününe kadar 8.94 ± 1.02 pg/ml'ye düştü. Siklusun 17.gününde 12.17 ± 2.35 pg/ml'ye yükselen estradiol 17β 19.günde 15.45 ± 2.71 pg/ml olarak ölçüldü.

Progesteron miktarı folliküler fazda 0.49 ± 0.20 ng/ml, luteal fazda 5.02 ± 2.31 ng/ml, estradiol 17β miktarı folliküler fazda 23.63 ± 4.78 pg/ml, luteal fazda 12.51 ± 3.28 pg/ml ölçüldü (Tablo 5.2.).

Tablo 5.2. Folliküler Faz ve Luteal Faz Progesteron ve Estradiol 17β Hormon Düzeyleri

n= 10	Progesteron (ng/ml)	Estradiol 17β (pg/ml)
Folliküler Faz	0.49 ± 0.20	23.63 ± 4.78
Luteal Faz	5.02 ± 2.31	12.51 ± 3.28

Kan progesteron ölçümleri sonucu gebe kabul edilen 16 kısırakta son tohumlamanın yapıldığı gün progesteron miktarı RIA ile 0.36 ± 0.22 ng/ml, EIA ile 0.36 ± 0.18 ng/ml (Tablo 5.3.), son tohumlamadan sonraki 6.günde RIA ile 7.3 ± 1.96 ng/ml, EIA ile 7.2 ± 2.1 ng/ml, (Tablo 5.4.), ilk tohumlamadan sonraki 20.günde RIA ile 5.8 ± 1.53 ng/ml, EIA ile 5.7 ± 1.42 ng/ml (Tablo 5.5.) ölçüldü. Gebeliğin 60.gününde yapılan rektal palpasyonda gebe olarak kabul edilen 16 kısıraktan 2'sinin gebe olmadığı tesbit edildi.

Tablo 5.4.: Gebe Kısırlarda Son Tohumlamadan Sonraki 6.6ün Kan Progesteron Düzeyleri:

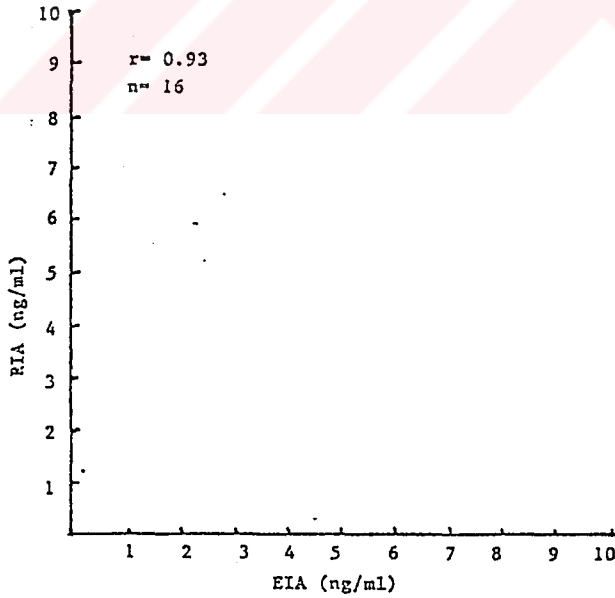
RIA (ng/ml)	EIA (ng/ml)
9.2	9.8
5.3	5.9
6.3	6.8
7.6	7.1
6.1	7.2
9.9	8.6
7.8	8.1
7.1	6.3
5.3	4.8
6.9	6.2
10.1	11.4
8.6	9.5
10.3	9.2
7.8	6.9
3.8	3.2
4.9	4.2
$\bar{x}=7.3\pm 1.96$	$\bar{x}=7.2\pm 2.1$

Tablo 5.5.: Gebe Kısırlarda Tohumlamadan Sonraki 20.6ün Kan Progesteron Düzeyleri

RIA	EIA
4.0	4.4
6.7	6.9
9.2	8.7
5.5	4.9
7.5	6.7
4.2	4.5
6.3	5.9
3.7	4.3
5.5	5.1
4.9	4.5
7.8	7.6
6.6	6.2
6.7	7.4
4.8	4.1
4.3	4.9
5.7	4.6
$\bar{x}=5.8\pm 1.53$	$\bar{x}=5.7\pm 1.42$

Kan progesteron ölçümleri sonucu gebe olmadığı saptanan 4 kısırta son tohumlama günü progesteron miktarı RIA ile 0.41 ± 0.19 ng/ml, EIA ile 0.45 ± 0.22 ng/ml, son tohumlamadan sonraki 6.günde RIA ile 7.18 ± 2.65 ng/ml, EIA ile 7.33 ± 2.95 ng/ml, ilk tohumlamadan sonraki 20.günde RIA ile 0.83 ± 0.37 ng/ml, EIA ile 0.74 ± 0.28 ng/ml ölçüldü (Tablo 5.6.). Bu kısırakların tamamı izleyen siklus dönemlerinde tekrar kızgınlık gösterdi.

Gebe kısıraklarda siklusun 20.günü RIA ve EIA ile tayin edilen progesteron miktarları karşılaştırılarak her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyon $r=0.93$ olarak hesaplandı ve bu korelasyonun istatistikî olarak önemli olduğu ($P<0.01$) anlaşıldı (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1.: RIA ve EIA ile Tayin Edilen Progesteron Miktarlarının Karşılaştırılması

Tablo 5.3.: Gebe Kısıraklarda Son Tohumlamanın Yapıldığı Gün Kan Progesteron Düzeyleri

RIA (ng/ml)	EIA (ng/ml)
0.23	0.32
0.42	0.38
0.50	0.48
0.49	0.56
0.23	0.26
0.19	0.30
0.15	0.22
0.15	0.33
0.22	0.25
0.57	0.48
0.38	0.42
0.97	0.78
0.67	0.72
0.27	0.25
0.24	0.17
0.18	0.16
$\bar{x}=0.36.6\pm 0.22$	$\bar{x}=0.36\pm 0.18$

Tablo 5.6.: Gebe Olmayan Kısıraklarda Son Tohumlama Günü, Son Tohumlamadan Sonraki 6.Gün ve İlk Tohumlamadan Sonraki 20.Gün Kan Progesteron Düzeyleri

Son Tohumlama Günü	Son Tohumlamadan Sonraki 6.Gün	İlk Tohumlamadan Sonraki 20.Gün
RIA (ng/ml)	RIA (ng/ml)	RIA (ng/ml)
0.67	11.10	1.38
0.20	6.20	0.71
0.44	6.23	0.73
0.33	5.20	0.53
$\bar{x}=0.41\pm 0.19$	$\bar{x}=7.18\pm 2.65$	$\bar{x}=0.83\pm 0.37$
EIA (ng/ml)	EIA (ng/ml)	EIA (ng/ml)
0.72	11.70	1.10
0.18	6.40	0.61
0.53	5.90	0.82
0.38	5.40	0.45
$\bar{x}=0.45\pm 0.22$	$\bar{x}=7.33\pm 2.95$	$\bar{x}=0.74\pm 0.28$

6.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kısraklarda kızgınlık siklusu hayvanın ırkına, yaşına, beslenme durumu ve çevresel koşullara bağılı olarak değişiklik göstermekle birlikte ortalama 21-23 gün olarak kabul edilir (2, 5, 13, 24, 28, 30, 49). Çalışmamızda 10 kısrakta kızgınlık siklusu uzunluğu ortalama 20.7 ± 1.0 gün tesbit edildi.

Asha Mantri (30) siklusun değişik fazlarında en düşük 5, en yüksek 35 pg/ml ölçtüğü E_2 17 β 'nin folliküler faz boyunca yükseldiğini, pik seviyesine ovulasyondan 1 gün önce ulaştığını (31.7 ng/ml), ovulasyon günü E_2 17 β da bir düşme görüldüğünü ve luteal fazda hızlı bir düşüş olduğunu, östrus belirtilerinin kan progesteron düzeyi 1 ng/ml'nin altına düşmeden görülmeyişini belirtmektedir.

Yuan Wei (74) E_2 17 β seviyesini ovulasyondan 2 gün önce 20.4, 1 gün önce 19.5 ve ovulasyondan sonraki 2-10 günlük sürede de 12.2 pg/ml olarak bildirmektedir. Çalışmamızda E_2 17 β seviyesi en düşük siklusun 14.günü (8.94 ± 1.02 pg/ml), en yüksek siklusun 3.günü (28.71 ± 3.33 pg/ml) ölçüldü. Siklusun 1.günü 19.21 ± 2.51 pg/ml olan E_2 17 β , 3.günde 28.71 ± 3.33 pg/ml'ye yükseldi. Ovulasyon günü 23 pg/ml ölçülen E_2 17 β miktarı siklusun 14.gününe kadar 8.94 ± 1.02 pg/ml'ye düştü ve 17.günde tekrar yükselmeye başlayarak, 19.günde 15.5 pg/ml'ye ulaştı. Elde ettiğimiz ölçümler Yuan Vei ve Asha Mantri'nin ölçümlerine uyum gösterdi.

Kısıraklarda kan progesteron düzeyi ovulasyondan 24 saat sonra yükselmeye başlar ve bu yükselme yaklaşık 1 hafta devam ederek maksimum seviyeye ulaşır. Östrusta 1 ng/ml'nin altında olan kan progesteron düzeyi, ovulasyonu takiben oluşan siklik korpus luteumun gelişmesine paralel olarak artmaya başlar. Ovulasyondan sonraki 6.günde en yüksek düzeyine ulaşır ve siklusun 15-16. gününe kadar bu düzeyde kalır. Gebe olmayan kısıraklarda siklik korpus luteumun dejenere olmaya başladığı 15-16. günden itibaren kan progesteron düzeyi azalmaya başlar ve siklusun sonu ile onu izleyen ovulasyon döneminde yine 1 ng/ml'nin altına düşer (5, 16, 18, 28, 31, 39, 53).

Margaret ve ark. (31) kan progesteron düzeyinin östrusta 0, 5 ng/ml'nin altında olduğunu, östrus bitiminden hemen sonra yükselmeye başladığını 7-10 gün sonra 5-14 ng/ml'ye ulaştığını, Nitschelm ve ark. (41) progesteronun ovulasyon günü 1 ng/ml'nin altında olduğunu ovulasyondan 2 gün sonra 1-8 ng/ml, 5 gün sonra ise 10-24 ng/ml olduğunu, Terblanche ve Maree (64) östrusta 1 ng/ml olan progesteron düzeyinin ovulasyondan sonraki 3-4 gün içinde 10 ng/ml'nin üstüne çıktığını bu düzeyde 5-8 gün kaldığını ve sonra 24-48 saat içinde hızla azaldığını bir sonraki östrustaki düşük seviyesine indiğini bildirmektedirler.

Palmer (49) ovulasyondan sonraki 1.günde progesteron düzeyinin 1 ng/ml'nin üstünde olduğunu, 5 ile 10. gün arasında 6-10 ng/ml olduğunu 10.günden sonra progesteron düzeyinde bir düşme eğilimi görüldüğünü ancak asıl ve ani düşüşün luteolisisin başladığı siklusun 14.gününde görüldüğünü, Sato ve ark. (54) progesteron düzeyinin

yükselmeye siklusun 5.gününde başladığını 10.günde pik seviyeye ulaştığını (9.4 ng/ml) ve 20.günde hızla düştüğünü bildirmektedirler.

Çalışmamızda progesteron seviyesi östrusun birinci gününden ovulasyona kadar olan dönemde 1 ng/ml'nin altında ölçüldü. Ovulasyondan sonraki 2.günde 2.75 ± 0.63 ng/ml'ye 6.günde pik seviyesi olan 7.89 ± 1.86 ng/ml'ye ulaştı. Siklusun 14.gününe kadar önemli bir düşüş gözlenmedi ve 17.günde 2.8 ng/ml'ye, 19.günde'de 1.4 ng/ml ye düştü. Siklus sırasında elde edilen progesteron ölçümleri diğer araştırmacıların ölçümleri ile paralellik gösterdi.

Foliküler fazda kan progesteron seviyesini Smith 0.64, Stabenfeldt 0.65, Plotka 0.61, Sharp 0.58 ng/ml (58) Ohsaki ve ark. (53) 0.7 ng/ml, Luteal fazda aynı araştırmacılar sırası ile 7.7, 10.0, 9.4, 10.9, 7.0 ng/ml. bildirmektedirler. Çalışmamızda progesteron seviyesi folliküler fazda 0.49 ± 0.20 , luteal fazda 5.02 ± 2.31 ng/ml ölçüldü.

Margaret ve ark. (31) gebe kısıraklarda çiftleşmeden sonraki 20.günde kan progesteron seviyesini 5-16 ng/ml, Terblanche ve Maree (64) çiftleşmeden sonraki 21.günde 5-9 ng/ml, Muesi ve ark. (36) çiftleşmeden sonraki 18-20. günlerde gebe olanlarda 10.3-23.9 nmol/l, tekrar kızgınlık gösterenlerde 0.1-4.4. nmol/l, Sato ve ark. (54) gebeliğin 20.gününde 5.8 ng/ml bildirmektedirler. Tomasgard ve ark. (66) çiftleşmeden 3 hafta sonra gebe kısırakların kan progesteron düzeyinin 2 ng/ml'nin üstünde olduğunu, gebe

olmayanlarda ise 2 ng/ml'nin altında olduğunu, Palmer ve ark. (47) çiftleşmeden sonraki 18.günde progesteron düzeyi 1.5 ng/ml'den düşük olanların gebe olmadığını yüksek olanların ise gebe olduğunu tesbit etmişlerdir. Elmore ve ark. (11) Çiftleşmeden sonraki 18-19. günlerde progesteron düzeyi 2 ng/ml veya daha yüksek olan kısırakların %90'ının gebe olduğunu bildirmektedir.

Çalışmamızda gebe kısırakların kan progesteron düzeyi ilk çiftleşmeden sonraki 20.günde 5.8 ± 1.53 ng/ml, gebe olmayanlarda ise 0.83 ± 0.37 ng/ml ölçüldü. Gebe olanlarda en düşük progesteron düzeyi 3.7 ng/ml, en yüksek ise 9.2 ng/ml tesbit edildi. Gebelerden ve gebe olmayanlardan elde ettiğimiz progesteron değerleri diğer araştırmacıların değerlerine uygun bulundu.

Serum progesteron seviyesine bağlı olarak yapılan gebelik teşhisindeki doğruluk oranı Lorin ve ark. (27) 17-19 günlük gebeliklerde % 84.6, Tomasgard ve ark. (66) 3 haftalık gebelikte % 94, Palmer (47) 18 günlük gebelikte % 96 olarak bildirmektedir.

Bazı araştırmacılar (11, 66) çiftleşmeden sonraki 21.günde gebeliğin teşhisi için progesteronun eşik sınırını 2 ng/ml olarak bildirmektedir. Vries (71) 2 ng/ml'den yüksek progesterona sahip kısırakları gebe kabul ettiği çalışmasında, gebe olanların teşhisindeki doğruluk oranını % 91.6, gebe olmayanların teşhisindeki doğruluk oranını da %100 olarak bildirmektedir.

Çalışmamızda yüksek progesteron ölçümü sonucu (4.9 ng/ml ve 5.7 ng/ml) gebe olarak değerlendirilen 2 kısırağın 60.günde yapılan rektal muayenede gebe olmadıkları anlaşıldı. Bu kısırakların embriyonik ölümü takiben uzayan bir luteal faza girmiş olabilecekleri sanılmaktadır.

Bu çalışmamızda, progesteron ölçümü ile ilk çiftleşmeden sonraki 20.günde gebe olanların teşhisindeki doğruluk oranı % 87.5 gebe olmayanların teşhisindeki doğruluk oranı da % 100 olarak bulundu.

RIA veya EIA yöntemi ile elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyonun 0.93 bulunması, deneylerin hassasiyetini ve hormon tayininde RIA veya EIA yöntemlerinden birisinin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini gösterdi.

Sonuç olarak, bu tekniklerle progesteron hormonunun ölçülmesi, gebeliğin erken teşhisi amacı ile kullanılabileceği gibi, bu alanda yapılacak diğer çalışmalarla kısıraklarda önemli ekonomik kayıplara neden olan çeşitli infertilite problemlerinin tanısı ve tedavisi mümkün olabilecektir.

7. ÖZET

Bu çalışmada, kısıraklarda östrus siklusu sırasında kan progesteron ve estradiol 17β hormon düzeyleri radioimmunoassay yöntemi ile tayin edildi. Gebeliğin erken dönemde teşhisi amacı ile ilk çiftleşmeden sonraki 20.günde kan progesteron düzeyleri radioimmunoassay ve enzyeimmunoassay yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak ölçüldü.

Çalışılan 10 kısırakta östrus siklusu uzunluğu 20.7 ± 1.0 gün bulundu. Estradiol 17β pik seviyesine östrusun 3.günü ulaştı (28.71 ± 3.33 pg/ml). Daha sonra düşmeye başlayan estradiol 17β seviyesi en düşük siklusun 14.günü (8.94 ± 1.02 pg/ml) ölçüldü ve tekrar yükselmeye başlayarak siklusun 19.gününde 15.45 ± 2.71 pg/ml'ye ulaştı.

Östrusun 1.gününden ovulasyona kadar olan dönemde 1 ng/ml'nin altında olan serum progesteron düzeyi pik seviyesine ovulasyondan sonraki 6.günde ulaştı (7.89 ± 1.86 ng/ml). Siklusun 14.gününe kadar önemli bir düşüş görülmeyen progesteron seviyesi siklusun 17.günü 2.8 ± 0.6 , 19.günü de 1.4 ± 0.4 ng/ml'ye düştü.

Estradiol 17β ve progesteron seviyesi folliküler faz ve luteal fazda sırası ile 23.63 ± 4.78 pg/ml, 12.51 ± 3.28 pg/ml, 0.49 ± 0.20 ng/ml, 5.02 ± 2.31 ng/ml olarak ölçüldü.

Çiftleşmeden sonraki 20.günde serum progesteron düzeyi gebe olanlarda 5.8 ± 1.53 ng/ml, gebe olmayanlarda ise

0.83±0.37 ng/ml tesbit edildi.

RIA ve EIA ile tayin edilen progesteron miktarlarının karşılaştırılmasında korelasyonun 0.93 bulunduğu bu çalışmada, 20.günde gebe olanların teşhisindeki doğruluk oranı % 87.5, gebe olmayanların teşhisindeki doğruluk oranıda %100 olarak tesbit edildi.



8. SUMMARY

In this study the serum levels of progesterone and estradiol 17β during the estrus cycle in mares were determined by RIA. For early pregnancy diagnosis on day 20 following mating, serum progesterone levels were compared by using both RIA and EIA.

The mean length of the estrus cycle was found to be 20.7 ± 1.0 days in 10 mares. Estradiol 17β reached peak levels on the third day of the cycle (28.70 ± 3.33 pg/ml). Thereafter the levels decreased and the minimum levels of estradiol 17β was obtained on the 14th day of the cycle (8.94 ± 1.02 ng/ml). Gradually increasing levels reached to the value of 15.45 ± 2.71 pg/ml on day 19th.

Low serum progesterone concentrations of the follicular phase rised to peak levels on day 6 during the cycle (7.89 ± 1.86 ng/ml) and remained at high levels until day 14 and decreased to 2.8 ± 0.6 and 1.4 ± 0.4 ng/ml on days 17 and 19, respectively.

Estradiol -17β and progesterone levels were estimated 23.63 ± 4.78 pg/ml, 12.51 ± 3.28 pg/ml for follicular phase and 0.49 ± 0.20 ng/ml, 5.02 ± 2.31 ng/ml for luteal phase, respectively.

Serum progesterone concentrations on day 20th after mating were obtained to be 5.8 ± 1.53 ng/ml and 0.83 ± 0.37 ng/ml in pregnant and non-pregnant mares, respectively.

Progesterone levels were compared by using both RIA and EIA and the coefficient of correlation was 0.93. The accuracy of the progesterone test to pregnancy and non-pregnancy were % 87.5 and 100 %, respectively



9. KAYNAKLAR

1.ABRAHAM,G.E.: Radioimmunoassay of Steroids in Biological Materials. IAEA Symposium, Istanbul, Turkey, 1973.

2.ALAÇAM,E.: Theriogenology. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun' i Tohumlama Obstetrik ve Infertilite Nurolo Matbacılık A.S., Ankara-1990.

3.ARNSTADT,K.I., CLEERE,W.F.: Enezymeimmunoassay for Determination of Progesterone in Milk From Cows. J.Reprod. Fert. 62:173-180, 1981.

4.ARTHUR,O.H. and ALLEN,W.E.: Clinical Observations on Reproduction in a Pony Stud. Equine Vet.J., 4:109-117, 1972.

5.ARTHUR,G.H., NOAKES,D.E., PEARSON, H.: Pregnancy and its Detection in the Mare. Veterinary Reproduction and Obstetrics. 5 ed., Bailliere Tindall, London., 50-55. 1982.

6.BAMBERG,E., CHOI,H,S., MOSTL,E., WURM,W., LORIN,D., ARBEITER,K.: Enzymatic Determination of Unconjugated Oestrogens in Faeces for Pregnancy Diagnosis in Mares. Equine Veterinary Journal. 16: 537-539. 1984.

7. BAMBERG,E., MOSTL,E.: Pregnancy Test in 200 Animals by EIA of oestrogens in faeces 11 th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination Dublin, Ireland. 82. 1988

8.BOSCH,A.M.G.: Bound/Free Separation in Enzyme-immunoassays. EnzymeImmunoassay Techniques: Principles, Methods and Applications International Workshop, Zeist, Netherland, Report B-237, 13-17, 1983.

9.DEAN,P.N., IRWIN,K.M., LUT, ROBERTS,B., HILMAN.: Equine Reproduction. 58-69, 1983.

10. EDQVIST, L.E., JOHANSSON, E.D.B.: Radioimmunoassay and Competitive Protein Binding for the Measurement of Certain Steroid Hormones in Farm Animals. International Atomic Energy Agency, Vienna. 245-258. 1972.

11. ELMORE, R.G., KLOPPE, L.H., VARNER, D.D., MEYERS, P.J.: Clinical Applications for progesterone Assays in Equine Practice. Veterinary Medicine. 83: 294-297. 1988.

12. ERALDO, S., FANTI, C., NANNETTI, G.: Variations in Plasma Progesterone Concentration During the Oestrous Cycle of the Mare. Animal Breeding Abstract. Vol. 42. No: 11. 1974.

13. ERK, H., DOGANELI, M., AKKAYAN, C. : Veteriner Doğum Bilgisi. (Obstetrik) ve Jinekoloji. 2. Baskı. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları. No:363-Ankara 1980.

14. ERSOY, E., BAYŞU, N.: Biyokimya. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları No:408, Ankara-1986.

15. FINDLAY, J.K.: Immunological Diagnosis of Early Pregnancy-Immunological Aspects of Reproduction. 63-67. 1980.

16. GANJOM, V.K., KENNEY, R.M., FLIKINGER, G.: Plasma Progestagens in Cyclic, Pregnant and Postpartum Mares J.Reprod. Fert. Suppl. 23:441-447, 1975.

17. GINTHER, D.J., PINEDA, M.H., WENTWORT and NUTI, L.: Rate of Disappearance of Exogenous LH From the Blood in Mares. J.Anim. Sci. 39:397-403. 1974.

18. HAFEZ, E.S.E.: Horses., Reproduction in Farm Animals. 5 th ed., Lea x Febiger, Philadelphia., 1987.

19. HUBERT, R.: Hormonal Mechanism During Pregnancy and Parturation. 2 th ed. H.H. Cole D.T. Cupps. London, 415-437, 1969.

20.HUNT,B., LEIN,D.H., FOOTE,R.H.: Monitoring of Plasma and Milk Progesterone for Evaluation of Post partum Estrous Cycles and Early Pregnancy in Mares. Journal of the American Veterinary Medical Association. 172; 1292-1302. 1978.

21.HUNTER,W.M.: Recent Advances in Radioimmunoassay and Related Procedures. International Atomic Energy Symposium, Vienna, 1982.

22.HYLAND,J.H., WRIGHT,P.J., MANNING,S.J.: An Investigation of the Use of Plasma Oestrone Sulphate Concentrations for the Diagnosis of Pregnancy in Mares. Australian Veterinary Journal. 61. 4:123. 1984.

23.JOYCE,B.G., READ,G.F., FAHMY,D.R.: Specific Enzymeimmunoassay for Progesterone in Human PLASMA. Steroids. 29:761-770, 1977.

24.KILIÇOĞLU,Ç., ALAÇAM,E.: Veteriner Doğum Bilgisi ve Üreme Organlarının Hastalıkları (Therfögenoloji). A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları. No:403, Ankara-1985.

25.KOHNEN,F., BAMNINGER,S., LINDNER,H.R.: Preparation of Antigenic Steroid Protein Conjugates. Steroid Immunoassay. Alpha Omega Publ. Ltd. Cardiff. 11-32. 1975.

26. LAING,J.A., BRINLEY,W.J., WAGNER,W.C.: Fertility and Infertility in Veterinary Practice. 4 th ed. Bailliere, Tindall. 67-68. 1988.

27.LORIN,D., MOSTL,E., CHOI,H.S., SCHMEHLIK,O., ARBEITER,K.: Pregnancy Diagnosis in the Mare: Diagnostic Value and Time of Application of Various Direct and Indirect Methods. Animal Breeding Abstracts. Vol.54, No: 10 6371, 1986.

28.MC.DONALTS,L.E., D.V.M., PhD.: Veterinary Endocrinology and Reproduction. 3 rd. ed., Lea X Febiger, Philadelphia., 399-409, 1980.

29.MAGGIO,E.T.: Enzymeimmunoassay. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 167-179, 1980.

30.MANTRI,A., SARDESHPANDE,P.D., MANTRI,M.B.: Level of Serum Progesterone and Oestradiol 17β During the Oestrous Cycle in Mares. Indian Journal of Animal Sciences. 55: 526-534, 1985.

31.MARGARET,J., EVANS and IRVINE,C.H.G.: Serum Concentrations of FSH, LH and Progesterone During the Oestrous Cycle and Early Pregnancy in the Mare. J.Reprod. Fert. Suppl. 23. 193-200. 1975.

32.MELVIN,J.S.: Dukes Physiology of Domestic Animal. 9 th ed., ithaca and London., 783-784.

33.MERKT,H. und KLUG,E.: Anwendung der Hormone Beim Pferd. Der Praktische Tierarzt. 7:586, 1979.

34.MORINO,S., NAKAOT,T., TSUNODA,N., KAWATA,K., MORIMOTO,R., MURAI,Y.: Use of Direct Enzymeimmunoassay of Milk Progesterone for Monitoring Postpartum Ovarian Activity in Dairy Cows. Japanese Journal of Animal Reproduction. 30:61-67, 1984.

35.MöSTL,E., NOBAURE,H.M.,CHOI,H.S., WURM,W., BAMBERG,E.: Means of Measuring Faecal Oestrogen. Animal Breeding Abstracts. Vol. 51. No:12. 1983. 6878.

36.MUESI,I., FALKAY,G., KUESORA,I.: Pregnancy Diagnosis in Hungarian Half Breed Mares by Determination of the Blood Progesterone Concentration. Animal Breeding Abstracts. Vol.58. No:4. 1889, 1990.

37.MUNRO,C., STABENFELDT,G.: Development of a Microtitre Plate Enzymeimmunoassay for the Determination of Progesterone. J.Endocr. 101:41-49, 1984.

38.NIEKERK,C.H. VAN.: Pattern of Oestrous Cycle of Mares. I. The Breeding Season. J.S. Afr. Vet. Med. Assoc. 38:299-307. 1967.

39.NIEKERG,C.H.VAN., MORGENTHAL,J.C., GERNEKE,W.H.: Relationship Between the Morphology of and Progesterone Production by the Corpus Luteum of the Mare. Journal of Reproduction and Fertility. Suppl. 23. 171-175. 1975.

40.NISWENDER,G.D., NETT,T.M., AKBAR,A.M.: Hormones of Reproduction. Reproduction in Farm Animals 3 rd. ed. Philadelphia. 74-75, 1975.

41.NITCHELM,D., HORST,C.J.G., VAN DER.: Hormonal Pattern in the Blood of Eight Mares During the First Week of Pregnancy. Animal Breeding Abstracts. Vol.44. No:5. 2001

42.OFLAZ,G.: Kısa Yarı Ömürlü Radionükleidlerin RIA da Kullanılması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Bilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara, 1982.

43.OHSAKI,K., NOZAKI,N., OKUDA,K., MIYAZAWA,K., IWAMURA,T., SATO,K.: Use of an EIA Kit (Preg-Test) for Determination of Progesterone Concentrations in the Mare Serum Japanese Journal of Animal Reproduction. 35:204-210. 1989.

44.OXENDER,V.D., NODEN,P.A.: Photoperiod Initiation of Estrous and Ovulation in Seasonally Anestrous Mares. VIII th. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Vol. I. Krakow, 1976.

45.ÖZKOCA,A. Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'î Tohumlama. I.Ü.Vet.Fak. Yayınları, 3209, İstanbul, 1984.

46.ÖZSAR,S.: Ankara Keçilerinde Erken Gebelik Tayini ve Fertilite Kontrolünde Radioimmunoassay ile Progesteron Düzeylerinin Saptanması: RIA Tekniğinin Keçi Serumuna İçin Geçerliliğinin Kontrolü. H.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Ankara, 1983.

47.PALMER,E., THIMONIER,J., LEMON,M.: Early Pregnancy Diagnosis in the Mare by Estimation of the Level of Progesterone in the Peripheral Blood. *Livestock Production Science*. 1:197-206. 1974.

48.PALMER,E., JOUSSET,B.: Urinary Oestrogen and Plasma Progesterone Levels in Non-pregnant Mares. *J.Reprod. Fert. Suppl.* 23, 213-221, 1975.

49.PALMER,E.: Control of the Oestrous Cycle of the Mare. *J.Reprod. Fert.* 54:495-505, 1978

50.PARKER,W.G., SULLIVAN,J.J., LARSON,L.L.: Comparison of the Methods of Rectal Palpation and Hameglutination, Inhibition Assay for Diagnosis of Pregnancy in Mares. *J.Reprod. Fert. Suppl.* 23, 489-493, 1975.

51.PRAKASH,B.S., MEYER,H.H.D., SCHALLENBERGER,E. VAN DE WIEL,D.V.M.: Development of a Sensitive Enzymeimmunoassay (EIA) for Progesterone Determination in Unextracted Bovine Plasma Using the Second Antibody Techniques. *J. Steroid Biochem.* Vol. 28. No:6. 623-627, 1987.

52.ROBERTS,S.J.: *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases* 2 ed., Ithaca, New York., 24-30. 1971.

53.ROBERTS,S.J.: Gestation and Pregnancy Diagnosis in the Mare. *Current Therapy in Theriogenology* 2 th. Ed. Morrow, D.A. 670-684. 1986.

54.SATO,K., MIYAKE,M., YOSHIKAWA,T., KAMBEGAWA.A.: Alterations in Serum Progesterone Level of Pregnant and Non-Pregnant Mares. Japanese Journal of Animal Reproduction. 21:113-115. 1975.

55.SATO,K., MIYAKE,M.M., HAYASHI,T., YOSHIKAWA,T., KAMBEGAWA,A., MAKINO,T.: Rapid Colorimetric Determination of Oestrogenic Hormones in Pregnant Mares. Animal Breeding Abstracts. Vol.44. No:1. 31. 1976

56.SATO,K., MIYAKE,M., YOSHIKAWA,T., KAMBEGAWA, A.: Studies on Serum Oestrogen and Progesterone Levels During the Oestrous Cycle and Early Pregnancy in Mares. Equine Veterinary Journal. 9: 57-60. 1977.

57.SEVINÇ,A.: Dölermenin Endokrin Düzeni. Dölerme ve Sun'i Tohumlama. A.Ü.Vet.Fak. Yayınları, 397, 47-60, Ankara, 1984.

58.SHARP,D.C., BLACK,D.L.: Changes in Peripheral Plasma Progesterone Throughout The Oestrous Cycle of the Pony Mare. J.Reprod. Fert. 33:535-538. 1973.

59.SHILLE,V.M., GANTAREK,J.: The use of Ultrasonography for Pregnancy Diagnosis, Jawa, 187:10, 1985.

60.SHORT,R.V.: Progesterone in Blood of Pregnant Cows. J.Endocr. 16:426-428. 1958.

61.SMITH,V.G., EDGERTON,H.D., CONVEY,E.M.: Bovine Serum Estrogens, Progestins and Glucocorticoids During Late Pregnancy, Parturition and Early Lactation. J.of Anim. Sci. Vol. 36, No:2, 1973.

62.STABENFELDT,G,H., HUGHES,J.P.: Pregnancy: Recognition of Pregnancy. Reproduction in Domestic Animals. 3 rd. ed. London, 415-417, 1977.

63. TAINTURIER, D., ANDRE, F., FIENI, F., SILIART, B., ESCOUFLARIE, P.: Pregnancy Diagnosis in Mares by Means of Radio-Immunological Concentration of Oestrone Sulphate in Plasma and Urine. *Animal Breeding Abstracts*. Vol. 55. NO:7, 4190, 1987

64. TERBLANCHE, H.M.M., MAREE, L.: Plasma Progesterone Levels in the Mare During the Oestrous Cycle and Pregnancy. *Journal of the South African Veterinary Association*. 52:181-185. 1981.

65. TIJSSSEN, P.: Practice and Theory of Enzymeimmunoassays. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. 15, 1985.

66. TOMASGARD, D., BENJAMINSEN, E.: Plasma Progesterone in Mares Exhibiting Oestrus During Early Pregnancy. *Animal Breeding Abstracts*. Vol.45. No:6 1977. 2652.

67. TSANG, C.P.W., HACKETT, A.J., TURNER, E.M.: Plasma Levels of Estrone Sulfate, Estrone and Estradiol 17 β in the Cow Around Parturation. *Can. J. Anim. Sci.* 55:509-512, 1975.

68. VAN DE WIEL, D.F.M., KOOFS, W., VOS, E.: Enzyme and Radioimmunoassay Techniques for Hormone Determination in Livestock. IAEA. SM. 243-253, 1986.

69. VAN, WEEMAN, B.K.: Enzymeimmunoassay. The Use of Enzymelabelled Compounds for Immunoassays of Human Chorionic Gonadotrophin, Luteinizing Hormone and Oestrogens. Rijksuniversiteit Te Groningen. Doktora Tezi, 1974.

70. VIVO, R., SANTISTEBAN, R., TOVAL, P., CASTEJON, M.F.: Plasma Progesterone Volues in Spanish and Arab Mares During the Reproductive Cycle. *Animal Breeding Abstracts*. Vol.54. No:12, 7637, 1986.

71.VRIES,P.J.DE., HOLST,W., VAN DER.: Value of Measuring Blood Plasma Progesterone Around 18 Days After Ovulation for Pregnancy Diagnosis in the Mare. Animal Breeding Abstracts. Vol.51. No:9. 5364, 1983.

72.WILLAHÖZ,M.D., VOSS,J.L., SQUIRES,E.L.: Comparison of Early Pregnancy Diagnostic Tests in the Mare. 10 th. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 10-14, Illinois, 1984.

73.WIMPY,T.H., CHANG,C.F., ESTERGREEN,V.L., HILLERS,J.K.: Milk Progesterone Enzymeimmunoassay: Modifications and a Field Trial For Pregnancy Detection in Dairy Cows. J.Dairy Sci. 69:1115-1121, 1985.

74.YUAN,W.: Changes in Plasma Oestradiol 17β of Guanzhong Asses During the Postpartum Period and the Oestrous Cycle. Application of Atomic Energy in Agriculture. No:1, 55-59. 1983.

75.YURTAYDIN,N., SEVİNÇ,A.: Karacabey Harasında Yetiştirilen Değişik Irktan Kısıraklarda Döl Verimi. A.Ü. Vet.Fak. Dergisi. 30: 283-291, 1983.

76.YURTAYDIN,N.: Atlarda Dölerme özellikleri. A.Ü.Vet.Fak. Derg. 33:210-224, 1986.

10. TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam sırasında her türlü yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof.Dr. S.Çetin KILIÇOĞLU'na, Hormon analizlerinde yardım ve önerilerinden yararlandığım Doç.Dr. Bülent GÜVEN'e, Bu çalışmayı destekleyen Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'na, Materyal olanağı sağlayan Gemlik Askeri Veteriner Araştırma Enstitüsü ve Eğitim Merkez Komutanlığına ve Dr.Nasif ALDEMİR'e teşekkür ederim.



11. ÖZGEÇMİŞ

1959 yılında Malatya'da doğdum. İlk öğrenimimi Ankara, Orta ve Lise öğrenimimi Malatya'da tamamladım. 1978 yılında A.Ü. Veteriner Fakültesine girdim. 1983 yılı Haziran döneminde mezun oldum. 1983-1984 yılları arasında Tarım Bakanlığı Laborant Meslek Lisesinde çalıştım. 1984 yılında Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsünde araştırmacı olarak çalışmaya başladım. Halen aynı kurumda çalışmaktayım.

