

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİŞİ KÖPEKLERDE KAN PROGESTERON HORMONU
ÖLÇÜMLERİ AMACIYLA RADIOİMMUNOASSAY KİTİ
ÜRETİLMESİ VE KALİBRASYONU**

Serhan Serhat AY

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Erol ALAÇAM

2007-ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Pubertas	1
1.2. Dişi Köpeklerde Östrus Siklusu ve Evreleri	1
1.2.1. Proöstrus	3
1.2.2. Östrus	3
1.2.3. Diöstrus	4
1.2.4. Anöstrus	4
1.3. Östrus Siklusunun Endokrin Düzeni	4
1.3.1. Östrojen	4
1.3.2. Luteinleştirici Hormon	6
1.3.3. Follikül Uyarıcı Hormon	8
1.3.4. Progesteron	9
1.3.5. Prolaktin	11
1.4. Köpeklerde Gebeliğin Endokrinolojisi	12
1.5. Hormonların Tanımı ve Özellikleri	16
1.5.1. Hormonların Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılmaları	17
1.5.2. Steroid Hormonların Biyosentezi	18
1.6. Progesteronun Yapısı, Sentezi, Metabolizması ve Etkisi	19
1.6.1. Progesteronun Kimyasal Yapısı	20
1.6.2. Progesteronun Biyosentezi	20
1.6.3. Progesteronun Metabolizması	21
1.6.4. Progesteronun Etkileri	22
1.6.4.1. Progesteronun Reprodüktif Etkileri	22
1.6.4.2. Progesteronun Reprodüktif Olmayan Etkileri	24

1.6.4.3.	Progesteronun Yan Etkileri	24
1.7.	Endokrin Tanı Yöntemleri	25
1.8.	Radioimmunoassay	28
1.8.1.	Radioimmunoassay'ın Avantajları ve Dezavantajları	29
1.8.2.	Radioimmunoassay'ın Bileşenleri	30
1.8.2.1.	Antikor	30
1.8.2.2.	Antijen	32
1.8.2.3.	Radyoaktif İşaretli Antijen (Tracer)	35
1.8.2.4.	Bağlı ve Bağlı Olmayan Fazların Ayrılması	36
1.8.3.	Radyoaktivite Sayımı ve Deney Sonuçlarını Değerlendirilmesi	37
1.8.4.	Radioimmunoassay'ın Kalite Kontrolü (Güvenilirlik Kontrolü)	38
1.8.4.1.	Duyarlılık	39
1.8.4.2.	Özgüllük	40
1.8.4.3.	Doğruluk	42
1.8.4.4.	Hassaslık	42
2.	GEREÇ ve YÖNTEM	44
2.1	Gereç	44
2.1.1.	Hayvan Materyali	44
2.1.2.	Deneylerde Kullanılan Cihazlar	45
2.1.3.	Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	45
2.1.4.	Deneylerde Kullanılan Sarf Malzemeleri	46
2.1.5.	Deneylerde Kullanılan Progesteron Radioimmunoassay Kitleri	46
2.1.6.	Deneylerde Kullanılan ¹²⁵ I İle İşaretli Progesteron (Tracer)	46
2.2.	Yöntem	47
2.2.1.	Hayvan Materyalinin Değerlendirilmesi	47
2.2.2.	Kan Serumı Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	51
2.2.3.	Tavşanlarda İmmünizasyon Yöntemi	51
2.2.4.	Antikor Titre Tayin Yöntemi	53
2.2.5.	Antikor Kaplama Yöntemleri	54
2.2.6.	Progesteron Hormonu Ölçümleri	55
2.2.6.1.	Standart Aralığı Genişletilen RIA Kiti İle Ölçümler	55
2.2.7.	Verilerin Değerlendirilmesi	58

3.	BULGULAR	59
3.1.	Tavşanlarda İmmünizasyon Bulguları	59
3.2.	Polisteren Tüpleri Antikor ile Kaplama Bulguları	59
3.3.	Progesteron Ölçüm Bulguları	60
3.3.1.	Beşeri Progesteron Radioimmunoassay Kiti Ölçüm Sonuçları	60
3.3.2.	Köpek Progesteron Radioimmunoassay Kiti Ölçüm Sonuçları	62
3.3.3.	Standart Aralığı Genişletilmiş Progesteron RIA Kiti Ölçüm Sonuçları	64
3.3.4.	Farklı Progesteron Ölçüm Kitleriyle Elde Edilen Bulguların Karşılaştırılması	66
4.	TARTIŞMA	68
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	75
	ÖZET	77
	SUMMARY	79
	KAYNAKLAR	80
	ÖZGEÇMİŞ	88

ÖNSÖZ

Endokrinoloji, canlı organizma ile hormonlar arasındaki ilişkiyi inceleyen bir bilim dalıdır. Endokrin bezlerden salgılanan hormonlar kimyasal haberciler olarak, kandaki çok düşük düzeyleri ile, hedef yapılardaki reseptörlerine bağlanarak işlevlerini yürütürler. Evcil hayvanların hormonal düzenlerinin değerlendirilmesi birçok hastalığın tanı ve tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerin en güvenilir olanlarından bir tanesi de radioimmunoassay'dir. Yöntem, Rosalyn Yalow ve Solomon Berson'un birbirlerinden habersiz olarak, İnsülin'in belirlenmesi ile ilgili yaptıkları çalışmalar sonucunda geliştirilmiştir. Bu konudaki çalışması Yalow'a 1977 yılında Nobel ödülünü kazandırmıştır (IAEA, 1984). İnsülin için geliştirilen yöntem zamanla endokrinolojik alanda uygulanmaya başlanmış, gonadotropin ve prolaktin ölçümleri için geliştirilmesi ile reproduksiyon alanına girmiştir.

Bu teknik geliştirilene kadar kanda hormon düzeylerini ölçmede kullanılan yöntemler, fazla miktarda örnek, vakit ve iş gücü kaybına yol açmaktaydı. Örneğin, bir örnekte progesteron düzeyinin belirlenmesi için yarım litreye yakın kan plazması gerekiyordu ve bu miktardaki örnekten miligram veya mikrogram düzeyinde ölçümler yapılabilmekteydi. Tekniğin geliştirilmesi ile birlikte; hormonlar, ilaçlar, siklik nükleotidler, nörotransmitterler, aminoasit kökenli yapılar, vitaminler, mikrobiyolojik ve parazitik patojenler nanogram, pikogram ve hatta femtogram düzeyinde ölçülebilir hale gelmiştir.

Günümüzde hormon ölçümleri için kullanıma hazır radioimmunoassay kitleri ticari olarak bulunmaktadır. Ancak, örnek sayısının fazla olduğu bilimsel çalışmalarda ticari kitlerin kullanılması pahalı olmaktadır. Ayrıca hazır kitlerin yurt dışından temin edilebilmesi ve getirilen kitlerin radyoaktif

maddesinin yarılanma ömrünün kısa olması ticari kitlerin gerek bilimsel araştırmalarda gerekse klinikte rutin kullanımlarında sorunlara yol açmaktadır.

Söz konusu dezavantajları ortadan kaldırmak için sunulan doktora tez çalışmasında dişi köpeklerde kullanılabilirlik radioimmunoassay progesteron ölçüm kiti oluşturmak ve kullanılabilirliğini araştırmak amaçlanmıştır.

Bu çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen, başta doktora tez danışmanım Prof. Dr. Erol Alaçam olmak üzere, Prof. Dr. Selim Aslan'a ve tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Şükrü Küplülü ve Prof. Dr. Berrin Salmanoğlu'na şükranlarımı sunarım. Çalışmanın laboratuvar aşamalarında yardımcı olan Dr. Erdal Saban'a, klinik ve immunizasyon aşamalarında yardımcı olan Araştırma Görevlisi Duygu Kaya'ya ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üye ve elemanlarına teşekkürü borç bilirim. Ayrıca, doktora öğrenimim esnasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
α	Alfa
Aj	Antijen
An	Antikor
$\pm$	Artı Eksi
β	Beta
BH	Büyüme Hormonu
BK	Beşeri Kit
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CBG	Kortikosteroid Bağlayıcı Globulin
cpm	Bir Dakikadaki Sayım
ECG	Kısrak Korionik Gonodotropin
EIA	Enzimimmunoassay
FCA	Freund's Complete Adjuvant
FIA	Freund's Incomplete Adjuvant
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
γ	Gama
GnRH	Gonodotropin Salgılatıcı Hormon
^3H	Tritium
HCG	İnsan Korionik Gonodotropin
HDL	Yüksek Yoğunluktaki Lipoprotein
^{125}I	İyot 125
^{131}I	İyot 131
IgA	İmmunglobulin A
IgD	İmmunglobulin D
IgE	İmmunglobulin E
IgF	İmmunglobulin F
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
ISCOM	İmmun stimulatör kompleks
<	Küçük
$\leq$	Küçük Eşit
KK	Köpek Kiti
LH	Luteinleştirici Hormon
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
OH	Hidroksi
pAn	Poliklonal Antikor

PBS	Fosfatlı Tampon Solüsyonu
pg	Pikogram
PEG	Polietilen Glikol
®	Müsecel Marka
PRL	Prolaktin
RIA	Radioimmunoassay
RID	Radialimmunodiffüzyon
cm	Santimetre
SGK	Standart Aralığı Genişletilmiş Kit
SHBG	Cinsiyet Hormonu Bağlayıcı Globulin
TSH	Tiroid Uyarıcı Hormon
X±S	Ortalama değer ± Standart sapma
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Köpeklerin östrus siklusu ve gebelik dönemlerinde LH, FSH, progesteron ve östrojen konsantrasyonlarındaki değişiklikler.	12
Şekil 1.2.	Köpeklerde gebeliğin endokrin düzeni.	15
Şekil 1.3.	Steroid hormonların biyosentezi.	19
Şekil 1.4.	Progesteronun kimyasal yapısı.	20
Şekil 1.5.	RIA'dan köken alan yöntemler.	27
Şekil 1.6.	Antijen-antikor ilişkisi. Aj: antijen, An: antikor	28
Şekil 1.7.	Radioimmunoassay süreci.	29
Şekil 1.8.	RIA'nın çeşitli bileşenleri.	30
Şekil 1.9.	Bir antikorun yapısı.	31
Şekil 1.10.	Antijen antikor emülsiyonun hazırlanması.	34
Şekil 1.11.	Kaplı tüpler kullanılarak ayırma.	37
Şekil 1.12.	Log-lin eğrisi.	38

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	İmmunglobulinlerin sınıflandırılması.	31
Çizelge 1.2.	İmmunojenik özelliğe sahip olan proteinler ve bu özelliğe sahip olmayan haptenler.	32
Çizelge 1.3.	Bazı radyoizotopların ışıma tipleri, enerjileri ve yarılanma ömürleri.	36
Çizelge 1.4.	RIA'da progesteron için diğer steroid hormonlar ile çapraz reaksiyon oranları.	41
Çizelge 2.1.	Çalışmada kullanılan hayvan sayısı ve kullanılma amaçları.	44
Çizelge 2.2.	Çalışmada, materyalin reproduktif durumunun değerlendirilmesinde kullanılan vaginoskopi, vaginal sitoloji, klinik muayene ve ultrasonografi kriterleri.	50
Çizelge 2.3.	Tavşanlarda immunizasyon yöntemi.	53
Çizelge 2.4.	Standard aralığı genişletilen RIA kiti ile kan serumundan progesteron ölçüm süreci.	57
Çizelge 3.1.	Beşeri progesteron RIA kiti ile belirlenen; gruplara göre en küçük, en büyük ve ortalama progesteron düzeyleri.	61
Çizelge 3.2.	Beşeri progesteron RIA kiti ile yapılan ölçümlerin bireysel sonuçları.	61
Çizelge 3.3.	Köpek progesteron RIA kiti ile belirlenen; gruplara göre en küçük, en büyük ve ortalama progesteron düzeyleri.	62
Çizelge 3.4.	Köpek progesteron RIA kiti ile yapılan ölçümlerin bireysel sonuçları.	63
Çizelge 3.5.	Standart aralığı genişletilmiş RIA kiti ile belirlenen progesteronun en küçük, en büyük ve ortalama düzeyleri.	64
Çizelge 3.6.	Standart aralığı genişletilmiş RIA kiti ile yapılan ölçümlerin bireysel sonuçları.	65

Çizelge 3.7.	Çalışmada kullanılan kitlerden elde edilen gruplara ait sonuçların karşılaştırılması.	66
Çizelge 3.8.	Kitlerle yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyon katsayısı (r) ve önemi (p).	66
Çizelge 3.9.	Çalışmada kullanılan kitlerden elde edilen, östrus siklusunun farklı dönemlerine ait progesteron değerlerinin karşılaştırılması.	67

1. GİRİŞ

1.1. Pubertas

Pubertas, üreme kapasitesinin kazanıldığı dönem olarak tarif edilebilir. Bu dönem dişi köpeklerde ilk proöstrusun başlaması ile karakterizedir (Johnston ve ark., 2001). Dişi köpeklerde pubertasa ulaşma yaşı 6-24 ay arasında değişir. Genel olarak küçük ırklar büyük ırklara göre ve serbest dolaşanlar bağlı duranlara göre daha erken yaşta pubertasa girmektedir. Ancak, optimum üreme faaliyeti için en uygun zaman 3. veya 4. östrus siklusu ya da üç yaşlı dönem olarak söylenebilir (Olson ve ark.,1984; Olson ve Nett, 1986; Pineda, 2003).

1.2. Dişi Köpeklerde Östrus Siklusu ve Evreleri

Östrus siklusu, memeli hayvanlarda dişi gametlerin üretilmesi ve olası bir gebelik için ovaryum, uterus, vagina ve davranışlarla ilgili süreçlerin şekillendiği bir dönemi ifade eder (Jeffcoate,1998).

Dişi köpeklerin östrus siklusu diğer memelilerden farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar; dişi köpeklerin siklusunun en az beş ay sürmesi; gebeliğin diöstrus süresini değiştirmemesi ve köpek gebe olsun veya olmasın sikluslar arasında, anöstrus olarak isimlendirilen, ovaryumların inaktif olduğu uzun bir dönem bulunması şeklinde özetlenebilir (Jeffcoate, 1998).

Östrus siklusundaki bu farklılıklara rağmen siklusun hormonal kontrolü diğer hayvanlar ile benzerlik göstermektedir. Dişi köpeklerde de; hipotalamus ve hipofiz bezi kontrol merkezleridir, östrojen ve progesteronun ana kaynağı ovaryumlardır ve ovaryum hormonlarının hedef dokuları reproduktif sistem,

aksesör cinsiyet bezleri ve beynin davranışlar ile ilgili olan merkezidir (Jeffcoate, 1998).

Dişi köpekler genellikle yılda iki defa, mevsime bağlı olmadan östrus gösterirler (Hoffman ve ark., 1996). Ancak, köpeklerin mevsimsel seksüel etkinlik gösterdiğini ileri süren araştırmacılar da bulunmaktadır (Johnston ve ark., 2001). Köpeklerin östrus siklusunun daha çok kış ve yaz aylarında yoğunlaştığını bildiren yayınlar mevcuttur (Bouchard ve ark., 1991).

Dişi köpeklerde interöstrus bireysel farklılıklar göstermekle birlikte ortalama yedi ay (5-12 ay) sürer (Inaba ve ark., 1998; Verstegen ve ark., 1999). Her zaman geçerli olmasa da küçük ırklar büyük ırklara göre yıl içinde daha fazla östrus siklusu gösterirler. Hayvanın ileri yaşı da interöstrus aralığını etkilemektedir. Ancak 5-7 yaşına kadar interöstrus süreci etkilenmemektedir (Johnston ve ark., 2001).

Köpeklerde östrus siklusunun klasik dönemleri ilk olarak 1900 yılında Heape tarafından tanımlanmıştır (Olson ve ark.,1984; Olson ve Nett, 1986). O yıllarda hormonların yapısı yeterince tanımlanamadığından, yapılan siklus değerlendirilmeleri tamamen seksüel davranışlar ve yapılan fiziksel muayenelere dayanmaktaydı. Günümüzde östrus siklusunun evreleri fizyolojik, sitolojik ve hormonal yöntemlerle belirlenebilmektedir (Johnston ve ark., 2001).

Evcil köpeklerin östrus siklusları sırasıyla proöstrus, östrus, diöstrus ve anöstrus olmak üzere dört evreden oluşmaktadır (Feldman ve Olson, 1996; Goodman, 2001; Johnston ve ark., 2001). Özellikle davranış değişikliklerine göre yapılan bu klasik sınıflandırma yanında yeni bir sınıflandırmada geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre dişi köpeklerde östrus siklusu; 1) Folliküler evre, 2) Preovulatör lutenizasyon ve ovulasyon evresi, 3) Luteal evre ve 4) Anöstrus evresi olmak üzere dört bölümde ele alınmaktadır (Butinar ve ark., 2004).

Kısaca, köpek östrus siklusu ortalama 6-8 ay sürer. Bu sürenin yaklaşık iki haftasını folliküler evre, yaklaşık iki ayını luteal evre, 2-2.5 ayını endometrial rejenerasyon ve 1-3 ayını da anöstrus dönemi oluşturur (Günzel-Apel ve ark., 2006).

1.2.1. Proöstrus

Östrus öncesi yüksek folliküler aktivitenin olduğu dönemdir. Klinik olarak östrus siklusunun başladığını bildirir. Ortalama süresi dokuz gündür (0-27 gün). Kanlı bir vaginal akıntı ile başlar ve kanamanın kesilmesi ile sona erer. Vulva ödemlidir, dişi erkeğe ilgi gösterir ancak çiftleşmeyi kabul etmez (Goodman, 2001; Johnston ve ark., 2001). İdrarla işaretleme, huzursuzluk, komut dinlememe diğer davranış belirtileridir (Jeffcoate, 1998). Erkek köpeklerin ilgisi vaginal sekresyon, anal kese veya idrardaki sex feromonlerinden kaynaklanır (Feldman ve Olson, 1996; Goodman, 2001).

1.2.2. Östrus

Dişi köpeğin erkek köpeği kabul ettiği dönemdir. Ortalama süresi dokuz gündür (4-24 gün). Vulva genişlemeye devam etmekle birlikte proöstrusta olduğundan daha yumuşaktır (Feldman ve Olson, 1996; Johnston ve ark., 2001). Östrus endokrinolojik olarak Luteinleştirici Hormon (LH) yükselmesi ile başlar. Daha sonra progesteron konsantrasyonundaki yükselme ve östrojen konsantrasyonundaki azalma ile karakterizedir. Bu dönemde ovulasyon, ovumun maturasyonu ve konsepsiyon meydana gelir (Jeffcoate ve Lindsay, 1989; Goodman, 2001).

1.2.3. Diöstrus

Çiftleşme dönemini izleyen evredir. Bu dönem LH zirvesinden yaklaşık 7-10 gün sonra başlar. En belirgin özelliği erkeğin artık kabul edilmemesidir (Goodman, 2001). Ortalama süresi 70 gündür (Butinar ve ark., 2004). Luteal aktivite bu süreçtedir. Köpekte progesteron düzeyi yükselmeye devam eder. Östrus ve diöstrus dönemlerinin her ikisi de progesteronun baskın hormon olduğu dönemlerdir. Östrusta köpekler çiftleşirler, diöstrus döneminde ise fizyolojik olarak gebe sayılırlar (Feldman ve Olson, 1996).

1.2.4. Anöstrus

Luteal evrenin (diöstrus) sonundan folliküler evrenin (proöstrus) başlangıcına kadar geçen süredir (Goodman, 2001). Dişi köpekler luteal evrenin sonlanması ile zorunlu olarak anöstrus dönemine girerler (Inaba ve ark., 1998; Verstegen ve ark., 1999). Bu dönem reproduktif açıdan sakın ancak endokrinolojik açıdan oldukça aktif bir dönemdir. Bu dönemde reproduktif sistem kendini yeniler. Diğer türlerde olduğu gibi köpeklerde de bu dönemde sporadik olarak ani LH yükselmeleri görülebilir (Feldman ve Olson, 1996; Butinar ve ark., 2004). Anöstrus süresi bireye ve türe göre çeşitlilik gösterir (Hoffmann ve ark., 1996).

1.3. Östrus Siklusunun Endokrin Düzeni

1.3.1. Östrojen

Östrojen, folliküllerden sentezlenen benzer yapıli steroidler grubunu tanımlamada kullanılan ortak bir isimdir. Bu grupta östradiol-17 β , östriol ve östron bulunmaktadır. Bunlar içinde en önemlisi östradiol-17 β 'dir (Bearden ve Fuquay, 2000).

Östradiol; uterus, vagina ve vulvada bazı değişikliklere neden olur. Reprodüktif sistemde meydana gelen bu değişiklikler siklusun izleyen dönemleri için köpeği çiftleşmeye ve konsepsiyona hazırlar (Feldman ve Olson, 1996; Goodman, 2001). Bu değişiklikler; uterus bezlerinin büyümesi ve aktif hale gelmesi, mukozanın damarlaşması ve ödem şekillenmesi, damarlarda geçirgenliğin artmasına bağlı olarak vulvadan kanlı akıntı gelmesi olarak sayılabilir. Ayrıca östradiol salgılattığı sekresyonlar ile gametin yaşamasını ve taşınmasını sağlar, düz kasları uyarır. Düz kasların uyarımı tubal silier sistemi uyarır ve fertilizasyonun şekillenmesi için spermatozoayı oositin bulunduğu utero-tubal bölgeye taşır (Jeffcoate, 1998).

Proöstrus sırasında östrojen sentezi ve salınması gelişen ovaryum follikülerinden kaynaklanmaktadır. Anöstrus döneminde folliküller sürekli gelişim göstermektedirler. Ancak hipofiz desteği olmadığı için son olgunlaşmayı gerçekleştiremezler. Hipotalamus kökenli gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) etkisi ile anterior hipofizden salgılanan gonadotropin (LH, FSH) uyarımıyla gelişen folliküller östrojen sentez ve salınımını gerçekleştirebilecek olgunluğa erişirler. Salınan bu östrojen çiftleşme dışındaki diğer davranışsal değişikliklere neden olur (Feldman ve Olson, 1996; Jeffcoate, 1998; Goodman, 2001).

Anöstrus döneminde dolaşımdaki bazal östrojen miktarı ortalama 5-15 pg/ml'dir. Klinik proöstrus ile birlikte östrojen (östradiol) konsantrasyonu 15 pg/ml'nin üzerine çıkar. Erken proöstrusta konsantrasyon ortalaması 25 pg/ml iken geç proöstrus döneminde 60-70 pg/ml düzeyini geçebilir. Plazma östradiol düzeyindeki zirve proöstrus sona ermeden 24-48 saat önce gerçekleşir (Feldman ve Olson, 1996). Bu, aynı zamanda preovulatör LH zirvesinin 1-2 gün öncesidir (Concannon ve ark., 1975; Butinar ve ark., 2004). Östrojen konsantrasyonu, zirve yaptığı dönemde 50-120 pg/ml'ye kadar ulaşabilir (Goodman, 2001). Östrojenin zirve değerlerinin 22 pg/ml ile 600 pg/ml'nin sınırlarında olduğuna işaret eden bildirimler bulunmaktadır (Concannon ve ark., 1975)

Plazma östradiol konsantrasyonundaki azalma östrusun başlamasına neden olur. İzleyen 5-20 günde plazma östradiol konsantrasyonu yavaşça bazal seviyesine döner. Dişi köpek östradiol konsantrasyonu düşüp progesteron konsantrasyonu yükselmeye başladığı zaman erkeği kabul eder. Bu olay dişi seksüel davranışların uyarılmasında progesteronun östrojenden daha baskın olduğunu düşündürmektedir (Olson ve ark., 1984; Johnston ve ark., 2001)

Östrojen progesteron oranındaki azalma proöstrusun son gününde iki temel olaya yol açar. Bunlardan birincisi, dişi köpeğin davranışları ile ilgilidir: proöstrus döneminde pasif olan dişi köpek östrus döneminde aktiftir. İkincisi ve en önemlisi kombinasyonun hipotalamus ve hipofiz üzerine yaptığı pozitif geri tepki (feed back) etkisidir. Bu etki sayesinde östrus döneminde FSH ve daha önemlisi LH salgısı uyarılmaktadır (Feldman ve Olson, 1996).

Östrusun başlangıcında serum östradiol konsantrasyonu 70 pg/ml düzeyindedir. Östrusun ilk 1-3 gününde östradiol konsantrasyonunda artış daha sonra ise düşüş gözlenir. Buradaki düşüş çok önemlidir çünkü östradiol düzeyi anöstrus döneminde proöstrus döneminde olduğundan daha yüksektir. Serum östradiol düzeyi 15 pg/ml olduğu zaman östrus dönemi sona erer (Feldman ve Olson, 1996).

Anöstrus ve diöstrus dönemlerinde bireysel farklılıklar olmakla birlikte östrojen konsantrasyonu bazal seviyede (5-15 pg/ml) seyretmektedir (Feldman ve Olson, 1996).

1.3.2. Luteinleştirici Hormon

Dişi köpekte Luteinleştirici hormon (LH) ve prolaktin luteotropik etkili hormonlardır (Hoffmann ve ark., 2004). Luteinleştirici Hormonun yükselmesi, olgun folliküllerin hızlı bir şekilde büyümesini ve luteinize olmasını sağlar,

ovulasyona neden olur ve östrojen salgılayan folliküllerin progesteron salgılayan korpora luteaya dönmesine yol açar. Luteinleştirici hormon zirvesi sayesinde siklus folliküler fazdan luteal faza geçer (Concannon, 1986). Östradiol zirvesinden 1-2 gün sonra preovulatör LH zirvesi başlar ve östradioldeki azalmayla beraber plazma progesteron konsantrasyonu yükselir (Concannon ve ark., 1975; Butinar ve ark., 2004).

Geç anöstrus ve erken proöstrus dönemlerinde hipofizden kuvvetli LH salınımı şekillenir. Luteinleştirici hormon düzeyi proöstrus süresince bazal konsantrasyona döner ve öyle kalır (Olson ve ark.,1984; Feldman ve Olson, 1996; Johnston ve ark., 2001).

Siklusun folliküler evresinin sonunda (östrus başında) azalan östrojen progesteron oranı köpekte LH zirvesini başlatır (Goodman, 2001; Johnston ve ark., 2001; Butinar ve ark., 2004). Ancak bazı hayvanlarda östrus, LH zirvesini 4-5 gün sonra bazılarında ise 2-3 gün önce başlayabilir (Concannon, 1986). Bunun yanında bazı araştırmacılar LH zirvesini ile östrus başlangıcı arasında bir ilişki saptayamamışlardır (Olson ve ark.,1984).

Preovulatör LH zirvesi granuloza hücrelerinin luteinizasyonundan 2-3 gün sonra şekillenir ve korpora lutea şekillendikten sonraki 24-48 saat içinde ovulasyonu başlatır (Concannon ve ark., 1975; Johnston ve ark., 2001). Bazı araştırmacılara göre ovulasyon LH zirvesinden ortalama 24-72 saat (asgari ve azami olarak 0-96 saat içinde) sonra gerçekleşir (Olson ve ark.,1984; Butinar ve ark., 2004; de Gier ve ark., 2006). Dişi köpekler normal olarak çoklu ovulasyon gösterirler. Çoğu ovulasyon LH zirvesi sonrası 30-48 saat içinde gerçekleşir. Ancak bazı folliküller LH zirvesi sonrası, 96. saate kadar ovule olmazlar (Jeffcoate, 1998). Luteinleştirici hormon dalgasından sonra serum LH düzeyi 1-3 gün daha yükselmeye devam eder (Concannon,1986).

Köpeklerde preovulatör LH zirvesini süresi ortalama 24-96 saattir. Bu süre diğer türlerde çok daha kısadır (ineklerde 8 saat kadar) (Concannon ve ark.,

1975; Olson ve ark.,1984; de Gier ve ark., 2006). Oluşan LH zirvesini takiben LH konsantrasyonu anöstrus, erken proöstrus veya diöstrus dönemlerinde olduğundan daha düşük düzeye iner. Bu düşük düzeyin nedeni hipofizden LH salınmasının depresyonudur (Johnston ve ark., 2001).

Dişi köpeğin reproduktif siklusunda LH ovulasyonu tetikleyici özelliğinden dolayı merkezi hormondur (Concannon,1986; Goodman, 2001). Zirve döneminin belirlenmesi için günlük seri ölçümlerin yapılması gerekmektedir. Bundan dolayı LH'nın pik döneminin belirlenmesi uygun çiftleşme zamanının belirlenmesi için pek uygun bir tanı yöntemi değildir (Olson ve Husted, 1986; Jeffcoate ve Lindsay, 1989). Plazma progesteron düzeyindeki erken artış preovulatör luteinizasyonu yansıtabilir (Concannon ve ark., 1975). Bu nedenle LH yerine östrojenin veya progesteronun ölçülmesi ovulasyon zamanının belirlenmesinde daha pratik bir yöntemdir (Jeffcoate ve Lindsay, 1989). Ancak, uygun çiftleşme zamanının tespit edilmesinde LH zirvesinden yararlanılacaksa çiftleştirme için en uygun zaman zirveyi izleyen 0. ile 5. gün arasındadır (Concannon, 1986).

Dişi köpeklerde gebelik olsun veya olmasın, LH düzeyi diöstrusun ikinci yarısında artış gösterir. Konsantrasyon 20. günde 2940 ng iken 55. günde 5089 ng düzeyine ulaşmaktadır (Hoffmann ve ark., 2004).

1.3.3. Follikül Uyarıcı Hormon

Follikül uyarıcı hormon (FSH), follikül gelişimi ve östradiol sekresyonu için gerekli hormonlardan bir tanesidir. Ancak dolaşımdaki miktarı LH kadar artmamaktadır. Follikül uyarıcı hormon konsantrasyonunun artmasını, follikülerden salınan, inhibin engellemektedir. Bu hormon folliküllerin olgunlaşmasında ve ovulasyon sonrası korpora luteaya dönüşmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu süreç köpeklerin reproduktif siklusunda kilit

noktalardan bir tanesidir. Preovulatör follikülerden progesteron salınması ovulasyonu ve erkeğin kabul edilmesini sağlar (Jeffcoate, 1998).

Foliküler dönemde FSH'nın plazma konsantrasyonu düşük seviyededir (Butinar ve ark., 2004). Anöstrus döneminde ise düşük östrojen ve yükselen FSH düzeyi söz konusudur (Verstegen ve ark., 1999).

Folikül uyarıcı hormon dalgaları LH dalgası ile birlikte siklusun her döneminde görülmektedir. Preovulatör LH dalgası FSH salınımı ile birlikte şekillenir. Bununla birlikte preovulatör LH ve FSH dalgası arasında küçük farklılıklar mevcuttur. Erken ve geç anöstrus dönemlerinde bazal plazma FSH konsantrasyonunda artış görülür. Dolaşımdaki FSH düzeyinin artması, ovaryumdaki follikülogenezisin başlayıp anöstrusun sona ermesi için gereklidir. Tüm köpeklerde preovulatör FSH dalgası preovulatör LH dalgasından yaklaşık üç kat daha uzun sürer. Bu FSH'nın yarılanma ömrünün LH'dan daha uzun olması ile açıklanabilir. Bunun yanında FSH-LH salınımı GnRH dalgasının sıklığı ve yüksekliği ile ilişkilidir (de Gier ve ark., 2006).

1.3.4. Progesteron

Köpeklerde östrus siklusunun en etkin hormonlarından bir tanesidir (Hoffman ve ark., 2004). Progesteron konsantrasyonundaki yükselme östrus davranışlarını ve yoğunluğunu belirler. Progesteron ve östrojen arasındaki kombinasyon çoğu köpekte östrus davranışlarının en üst düzeyde olmasını sağlamaktadır (Olson ve ark., 1984; Feldman ve Olson, 1996).

Siklusun folliküler evresinin sonunda (geç proöstrus) progesteron düzeyi yükselirken östrojen düzeyi düşmeye başlar. Progesteronun kaynağı luteinize olan folliküller (preovulatör lüteinizasyon) ve ovulasyon sonucu oluşan korpora luteadır (Goodman, 2001; Johnston ve ark., 2001). Korpora

lutea şekilleninceye kadar folliküller progesteron sentezlerler. Bu hücreler aynı zamanda erkeğin kabul edilmeye başlandığı proöstrusun son gününde progesteron konsantrasyonunun yükselmesini sağlarlar. Buna göre folliküller; erken ve orta proöstrus döneminde östrojen, geç proöstrus döneminde ise östrojen ve az miktarda progesteron üreten yapılardır. Östrus boyunca ise esas olarak progesteron ve az miktarda östrojen üretirler (Feldman ve Olson, 1996).

Progesteron konsantrasyonu tüm proöstrus boyunca bazal düzeyde seyreder. Bu düzey, $<0,5$ ng/ml ile $<1-2$ ng/ml gibi farklı niceliklerde bildirilmektedir (Feldman ve Olson, 1996; Johnston ve ark, 2001). Bu düzeydeki konsantrasyon proöstrusun son 24-72 saatine kadar devam eder. Proöstrusun sonunda ise $2-4$ ng/ml düzeyine çıkar (Olson ve ark, 1984). Proöstrusun sonlanıp östrusun başlamasıyla birlikte plazma progesteron düzeyi kritik değerin üzerine çıkar ($1,0$ ng/ml düzeyindeki konsantrasyon östrustaki tipik davranışsal değişimler için yeterlidir) (Feldman ve Olson, 1996).

Progesteron düzeyi östrusun ilk günlerinde artmaya başlar ve diöstrusun ilk birkaç haftası boyunca da bu artış devam eder (Olson ve ark.,1984). Fonksiyonel korpora luteanın gelişmesiyle birlikte progesteron konsantrasyonu 1-3 hafta daha yükselmeye devam eder. Bu dönem hormonal olarak östrojenin devamlı azaldığı progesteronun ise devamlı arttığı bir evredir. Bu evrede LH salınması 12-24 saat süresince yoğun olarak devam eder (Feldman ve Olson, 1996).

Anöstrus sırasında $<0,5$ ng/ml olan progesteron düzeyi proöstrus sırasında $0,5-1,0$ ng/ml düzeyine ulaşmaktadır. Preovulatör LH zirvesinden 24-48 saat önce serum progesteron düzeyi 1 ng/ml'ye ve LH zirvesi sırasında ise $2-4$ ng/ml düzeyine ulaşmaktadır. Ovulasyondan iki gün sonra serum progesteron düzeyi tipik olarak $4-10$ ng/ml'yi bulur. Bu progesteronun kaynağı korpora luteadır (Feldman ve Olson, 1996). Diöstrus sırasında bazı

hayvanlarda progesteron düzeyi 50-90 ng/ml'ye (Feldman ve Olson, 1996) (15-90 ng/ml Goodman, 2001) ulaşabilir.

Ovulasyon sırasında plasma progesteron düzeyi yaklaşık 5 ng/ml düzeyindedir. Diöstrusun ilk 20 gününde en yüksek değerine ulaşır. Bu period anöstrusta düzeyin <1 ng/ml olması ile sonlanır (Hoffmann ve ark., 2004).

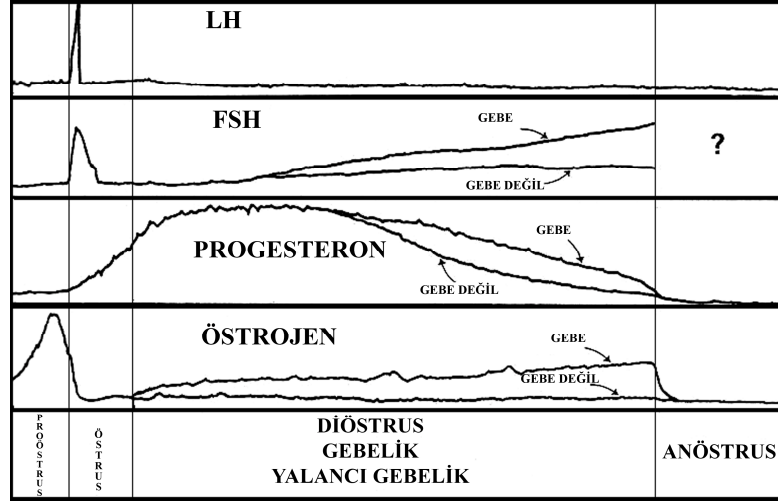
Plazma progesteron konsantrasyonu diöstrusun başlangıcından sonra yükselmeye devam eder ve 10-30 ng/ml düzeylerinde seyreder. Bu durum LH zirvesinden yaklaşık 30 gün sonrasına kadar devam eder. Bu dönemden sonra progesteron düzeyi azalmaya başlar ve LH zirvesinden 60 gün sonrasına kadar bu azalma devam eder. Bu dönemde düzey yaklaşık olarak 10 ng/ml'dir (Goodman, 2001).

1.3.5. Prolaktin

Bu hormon, meme bezlerinin gelişmesinde ve süt salgılamasında önemli role sahiptir. Meme bezinin gelişimin her aşamasında etkilidir. Doğum ve sonrası hazırlıkların oluşmasında ve klinik yalancı gebelik davranışlarının şekillenmesinde etkilidir (Onclin ve Verstagen, 1997; Özyurtlu, 2004). Ayrıca Prolaktin (PRL) dişi köpeklerde luteotropik etkilidir. Prolaktinin inhibisyonu veya bir antogonistin kullanılmasıyla luteal evre aniden sona erer. Bu amaçla Dopamin agonistleri kullanılabilir (England, 1998; Kooistra ve Okkens, 2001; Özyurtlu ve ark., 2006).

Prolaktin, proöstrus ve östrus boyunca düşük konsantrasyonlarda seyreder. Gebeliğin ikinci yarısında ise konsantrasyonu hızla artar. Prolaktin konsantrasyonundaki bu artış progesteronun azalmaya başlaması ile aynı anda şekillenir (England, 1998; Günzel-Apel ve ark., 2006). Bu ilişki hem gebe hem de gebe olmayan köpeklerde aynıdır (Hoffman ve ark., 2004;

Özyurtlu ve ark., 2006). Prolaktin konsantrasyonu gebe köpeklerde gebe olmayanlara göre dört kat daha fazla bulunmuştur. Ancak gebe olmadığı halde PRL konsantrasyonu daha yüksek olan köpekler de olabilir (England, 1998). Doğum öncesi prolaktin konsantrasyonu 1-2 gün azalır ancak yavruların emmeleri sonucu tekrar yükselir (Feldman ve Olson, 1996).



Şekil 1.1. Köpeklerin östrus siklus ve gebelik dönemlerinde LH, FSH, progesteron ve östrojen konsantrasyonlarındaki değişiklikler

1.4. Köpeklerde Gebeliğin Endokrinolojisi

Evcil memeli hayvanlarda gebeliğin devamını geçici bir endokrin bez olan korpus luteum sağlamaktadır. Bu bezin temel görevi progesteron sentezlemektir. Korpus luteumun luteal evre boyunca devam etmesi luteotropik bazı faktörler ile sağlanır. Memeli hayvanlarda bu faktörler hipofiz kaynaklı LH ve PRL, plasenta kaynaklı koriyonik gonadotropin ve pankreas kaynaklı insülinidir. Buradan anlaşılacağı gibi ovaryum, hipofiz ve plasenta gebeliğin devam etmesinde önemli rol oynamaktadır (Onclin ve Verstegen, 1997). Köpeklerde korpus lutea, gebelik bulunsun veya bulunmasın, ovulasyondan itibaren luteal dönemin 24-28. günlerine kadar, hipofiz desteği olmadan, fonksiyonunu sürdürür. Bu dönemden sonra luteotropik etkili LH ve prolaktin devreye girer ve luteal fonksiyonu devam ettirir (Galac ve ark.,

2004). Evcil hayvanların çoğunda gebeliğe bağlı olarak luteal evrenin süresinde uzama şekillenir. Bunun sonucunda bir sonraki östrus siklusu daha geç görülür. Köpeklerde bu tip bir geçikme yoktur. Dişi köpeklerde, gebe olsun veya olmasın, luteal evrenin süresi aynıdır (England, 1998).

Köpeklerin gebelik sürelerinin belirlenmesi doğumun veya sezaryen operasyonunun planlanması açısından önem taşır (Eilts ve ark., 2005). Köpeklerde gebelik süreleri, reproduktif siklusun östrus sürelerinin farklı uzunlukta olması (3-21 gün) ve spermatozoanın dişi reproduktif sisteminde uzun süre (altı güne kadar) canlı kalabilmesinden dolayı farklılık göstermektedir. Gebeliğin başlangıcı olarak kabul edilen dönem de gebelik süresinin hesaplanmasını etkilemektedir (Linde-Forsberg ve Enroth, 1998; Kutzler ve ark., 2003). Ayrıca, köpeklerde ovulasyon LH dalgasından 24-78 saat sonra şekillenir. Ovule olan oosit primer oositir ve olgunlaşması için 2-3 gün gereklidir. Bundan dolayı tohumlama LH zirvesinden 3-7 gün sonra yapılmalıdır (Rota ve ark., 1999). Eğer gebeliğin başlangıcı olarak çiftleşme günü baz alınırsa gebelik süresi çoklu çiftleşmeler için, ilk çiftleşmeden sonra 57-72 gün (Linde-Forsberg ve Enroth, 1998; Kutzler ve ark., 2003), tek çiftleşme için çiftleşmeden sonra 58-69 gün olarak kabul edilir (Kutzler ve ark., 2003). Eğer gebeliğin başlangıcı olarak preovulatör LH zirvesi baz alınırsa gebelik süresi 65 ± 1 gün olarak hesaplanmalıdır (Linde-Forsberg ve Enroth, 1998; Kutzler ve ark., 2003; Eilts ve ark., 2005). Ayrıca, gebelik süresi ovulasyondan sonra 63 ± 1 gün (Linde-Forsberg ve Enroth, 1998) ve LH zirvesini takiben progesterondaki yükselmenin belirlenmesinden sonra 65 ± 3 gün olarak hesaplanabilir (Eilts ve ark., 2005).

Östrojenin plazma konsantrasyonu gebeliğin ilk 5-6 haftasında bazal seviyededir (5-15 ng/ml). Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde östradiol konsantrasyonu yavaşça yükselir ancak proöstrustaki düzeyinin (<20 pg/ml) altında kalır. Bu artış doğuma kadar sabit kalır ve doğum esnasında progesteron gibi azalır. Östrojen meme bezlerinin gelişmesine ve serviksin açılmasına katkıda bulunmaktadır (Feldman ve Olson, 1996). Gebe ve gebe

olmayan hayvanların östradiol değerleri arasında herhangi bir farklılık yoktur (England, 1998).

Progesteron, preovulatör LH dalgası sonrası yükselmeye başlar ve gebeliğin 15-30. gününde zirve yapar. Bu dönemde progesteron düzeyi 15-90 ng/ml'dir. Gebeliğin son 1/3'ünde ise progesteron düzeyi yavaşça azalmaya başlar ve 4-16 ng/ml olan değerine ulaşır. Bir-iki hafta bu düzeyde devam ettikten sonra doğumdan 12-24 saat önce aniden 2 ng/ml'nin altına düşer (Goodman, 2001). Bu düşüş Feldman ve Olson'a (1996) göre 36-48 saat önce gerçekleşir. Gebe olan ve gebe olmayıp diöstrus döneminde bulunan köpeklerin progesteron konsantrasyonları arasında önemli bir fark yoktur. Bundan dolayı gebelik tanısında serum progesteron konsantrasyonu kullanılmamaktadır (Feldman ve Olson, 1996).

Gebelikte progesteron ve östradiol seviyelerinin tersine hipofiz kaynaklı LH, FSH, Prolaktin (PRL) ve Büyüme hormonu (BH) gibi hormonların seyri ve fonksiyonu henüz tam olarak açıklığa kavuşturulama mıştır (Concannon ve ark., 1989)

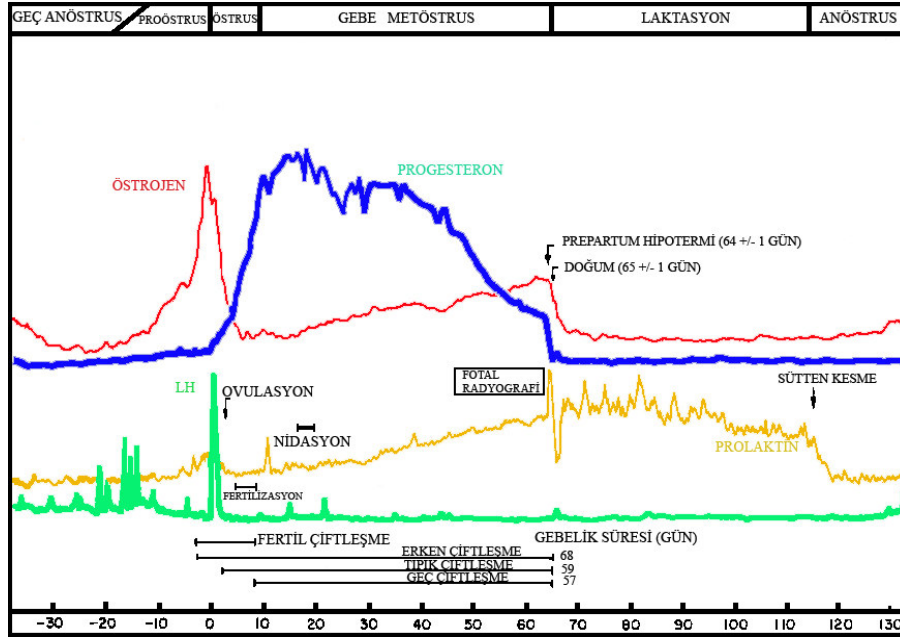
Luteinleştirici hormonun dolaşımdaki konsantrasyonu östrusun ikinci yarısı ve gebeliğin ilk yarısında düşük seyreder. Diğer hipofiz hormonlarında olduğu gibi LH'nın da salınımı pulsatildir ve luteal evrenin ikinci yarısında artar (Feldman ve Olson, 1996).

Folikül uyarıcı hormonun konsantrasyonu gebeliğin ikinci yarısında artmaktadır. Bu artış aynı dönemde östradiolün artışına katkıda bulunur (Feldman ve Olson, 1996).

Prolaktin, proöstrus ve östrus boyunca düşük konsantrasyonlarda seyreder. Ancak gebeliğin ikinci yarısında düzeyi hızla artar ve gebe olmayanların çok üzerine çıkar. Prolaktin konsantrasyonu gebe köpeklerde gebe olmayanlara göre dört kat daha fazla bulunmuştur. Prolaktinin gebeliğin

ikinci yarısındaki artışı progesteronun azalmaya başladığı dönemde olur. Doğuma kadar prolaktin konsantrasyonu 1-2 gün azalır ancak yavruların emmesi sonucu tekrar yükselir (Feldman ve Olson, 1996). Ortalama plazma prolaktin değerleri doğum esnasında 42 ng/ml'dir. Doğumdan 24-48 saat sonra 16 ng/ml düzeyine iner ve daha sonra tekrar yükselerek 40 ng/ml düzeyine ulaşır. Laktasyon sırasında prolaktin konsantrasyonları farklılık göstermektedir (Kooistra ve Okkens, 2001).

Relaksin, köpeklerde bilinen tek gebelik spesifik hormondur. Plazmada ovulasyondan sonraki 21. günde bulunmaya başlar ve zirve değerine yaklaşık olarak 50. günde ulaşır (Steinetz ve ark, 1989; England, 1998; Carlson ve Gese, 2006). Gebelik dışında, kısırlaştırılmamış dişi köpeklerde fizyolojik olarak yalancı gebelik de karşılaşılmaktadır. Bu olgunun nedenleri arasında luteal evrenin yaklaşık 60 gün sürmesi ve bu dönemde progesteron kökenli uyarımın olması sayılabilir (Johnston, 1986). Ancak, anahtar rol prolaktindir. Progesterondaki ani düşme ile birlikte prolaktinin yükselmesi sonucu yalancı gebelik şekillenmektedir (Gobello ve ark., 2001a; Özyurtlu ve ark., 2006).



1.5. Hormonların Tanımı ve Özellikleri

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 habercidirler. Hedef dokulardaki özel reseptörleri ile birleşen hormonlar bu yapının fonksiyonlarını uyarır, durdurur veya değiştirirler (Carruthers, 1986; Alaçam, 2002).

Neredeyse tüm karmaşık fizyolojik ve metabolik süreç endokrin sistem ve hormonlar tarafından düzenlenmektedir. Nadiren tek bir hormon tek bir işlemde sorumludur. Erythropoietin'in eritrositlerden hemoglobin sentezini uyarması buna örnek verilebilir. Ancak genellikle bir hormonun birden fazla etkisi vardır (tiroksinin enzim sentezi, kan yapımı, karbonhidrat ve lipid metabolizması üzerine etkileri gibi). Bazen de birçok hormonun tek bir etkisi vardır (prolaktin, kortikosteroidler, plasental laktogen, cinsiyet hormonları ve oksitosinin laktasyonu düzenlemesi gibi) ve son olarak birçok hormon birçok etkiyi sağlar (reproduktif steroidler, oksitosin ve kortikosteroidlerin gebelik, fetal gelişim ve doğumu sağlaması gibi) (Reimers, 2003).

Hormonların ortak özelliklerinden birincisi kan ve diğer ekstrasellüler sıvılarda düşük konsantrasyonda bulunmalarıdır. Hormon konsantrasyonları 10^{-11} - 10^{-9} M'a kadar değişen oranlarda bulunurlar (Reimers, 2003). Normalde hedef hücreler hormonlarına karşı plazmadaki konsantrasyonu 10^{-12} mol/L'den düşük olduğunda yanıt vermezler (Baki, 1999). Bu özellikleri ile diğer hormonal olmayan aminoasitlerden, peptitlerden ve lipidlerden ayrılırlar. Bunların ekstrasellüler sıvılardaki miktarları 10^{-5} ile 10^{-3} M arasında değişmektedir. Bu düşük düzeylere rağmen radioimmunoassay ve diğer modern kantitatif tekniklerin geliştirilmesi sonucunda, serum, plazma, süt veya idrar örneklerinin küçük miktarlarının bile araştırmalarda, klinik tanı ve tedavinin izlenmesinde kullanılmasını sağlamıştır (Reimers, 2003).

Hormonların ikinci ortak özelliği ise hedef hücre ve dokulardaki etkilerini doğrudan göstermeleridir. Bu hormonlar için çok önemli bir özelliktir çünkü ekstrasellüler sıvıda çok düşük miktarda bulunmaktadır (Reimers, 2003). Hormonlar kanda dolaşırken bütün doku hücreleri ile temasa geçebilirler; ancak hormona özgü reseptör taşıyan hücreler etkilenirler. Hormonların kandaki miktarları çok düşüktür. Ancak hücrelerdeki özgül reseptörler hormonlara karşı çok duyarlıdırlar (Noyan, 1998).

1.5.1. Hormonların Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Hormonlar kimyasal yapılarına göre protein hormonlar, peptid hormonlar, aminoasit kökenli hormonlar ve lipid hormonlar olarak sınıflandırılır (Reimers, 2003). Ayrıca gene kimyasal yapılarına göre hormonlar lipofilik ve hidrofilik olarak sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırmaya göre steroid hormonlar lipofilik hormonlardandır. Aminoasitlerden köken alan veya aminoasitlerin peptid veya proteinlerinden köken alan hormonlar ise hidrofilik hormonlardır (Kaolman ve Roehm, 2005).

Protein hormonlar: Prolaktin (PRL) ve büyüme hormonu (SH) bu grup içinde yer alır (Reimers, 2003).

Glikoprotein hormonlar: Bu gruba gonadotropik fonksiyonlu hormonlar girmektedir. Follikül uyarıcı hormon (FSH), Luteinleştirici hormon (LH), Kısırak koriyonik gonadotropini (eCG), İnsan koriyonik gonadotropini (HCG) ve Tiroid uyarıcı hormon (TSH) örnek olarak verilebilir (Hafez, 1993).

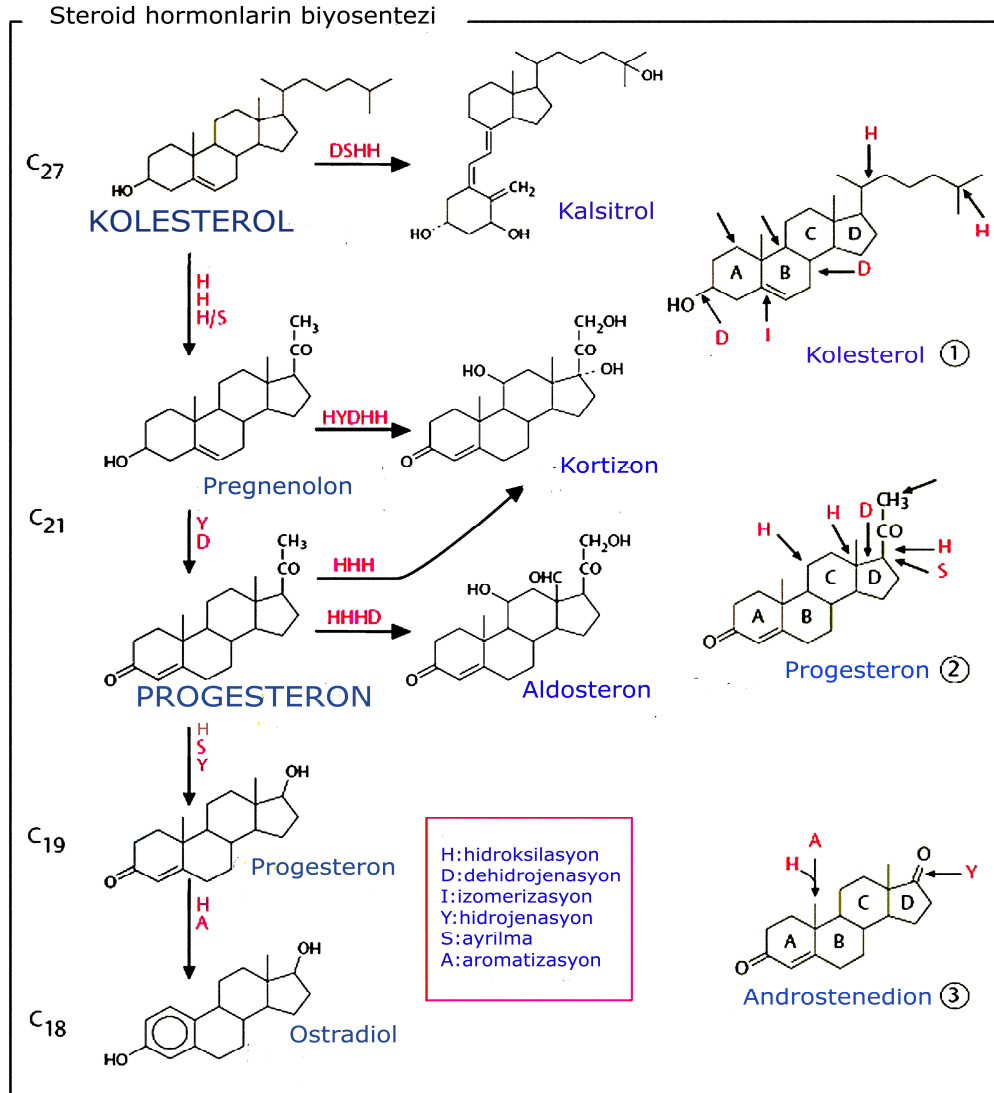
Peptid hormonlar: İnsülin, İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), Adrenokortikotropik hormon (ACTH), Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ve Oksitosin olarak sayılabilir (Hafez, 1993; Reimers, 2003)

Lipid hormonlar: Bu katogorideki hormonların çoğu steroid hormonlar alt grubu altında bulunmaktadır (Reimers, 2003). Vücuttaki hormonların en büyük ve en önemli kısmını steroid hormonlar oluşturur. Bu hormonlar, ovaryum, testis, adrenal korteks ve plasentanın iç salgılarından oluşurlar. Steroid molekülündeki karbon atomları 1'den 21'e kadar numaralandırılır ve molekülü oluşturan halkalar da A, B, C, D harfleriyle gösterilir. Steroid, siklopentanoperhidrofenantren çekirdeğini kapsayan bileşiklere verilen isimdir. Bu çekirdek bir siklopentan (D) halkası ve tamamen hidrojenize olmuş bir fenantren halkasından (A, B, C) oluşmuştur. Östrojenler, progestagenler, androgenler ve adrenal kortikoidler bu grupta yer alan hormonlardır (Hafez, 1993).

1.5.2. Steroid Hormonların Biyosentezi

Steroid hormonların tamamı kolesterolden sentezlenmektedir. Hormon sentezi için gerekli kolesterol çeşitli kaynaklardan sağlanır. Kolesterol, hidroksilasyon ve ayrılma reaksiyonları ile birçok hormonun biyosentezi için önemli olan pregnenolon'a değişir. Pregnenolon dehidrojenasyon ve hidrojenasyon ile progesterona dönüşür. Ayrıca Kalsitrol dışındaki tüm steroid hormonlar progesterondan sentezlenir (Şekil 1.3) (Bearden ve Fuquay, 2000; Martin ve Crump, 2003; Kaolman ve Roehm, 2005).

Steroid hormonların çekirdek yapısı kolesterol, safra asitleri, ergosterol, vitamin D ve kalp glikozitleriyle aynıdır. Esas halkanın C atomlarına bağlı gruplarında ve C17'ye bağlanan zincirlerinde çok küçük farklar bulunmasına rağmen bu bileşiklerin biyolojik fonksiyonları büyük farklar göstermektedir (Özsar, 1983). Sonuç olarak; moleküldeki karbon atomlarının yapısına göre steroid hormonlar aşağıdaki üç gruba ayrılmaktadır; a) Östrojenler: 18 karbon atomuna ve fenol taşıyan bir A halkasına sahiptirler, b) Androgenler: 19 karbon atomuna sahiptirler, c) Gestagenler ve Kortikoidler: 21 karbon atomuna sahiptirler (Hafez, 1993).



Şekil 1.3. Steroid hormonların biyosentezi (Kaolman ve Roehm, 2005)

1.6. Progesteronun Yapısı, Sentezi, Metabolizması ve Etkisi

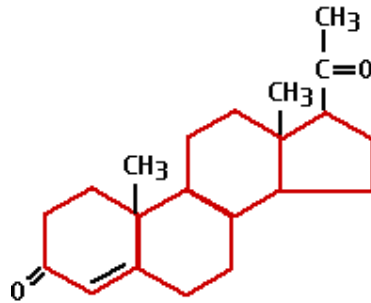
Progesteron dişi cinsiyet steroidi olan progestin (gestagen) ailesinin (progesteron, 17-hidroksiprogesteron ve 20 β -dihidroprogesteron) en önemli üyesidir (Kaolman ve Roehm, 2005). Progestin ve progestagen terimleri progestasyonel aktiviteli ve progesteron kökenli veya ilgili steroidlerden köken alan steroid yapılar için yekdiğeri yerine kullanılabilir (Romagnoli ve Concannon, 2006).

Doğal progesteron, siklusun luteal evresinde korpora luteadan fazla miktarda üretilir ve salınır. Bazı türlerde bu işlem plasenta tarafından gerçekleştirilir. Progesteron ayrıca bazı dokulardan ön madde olarak da sentezlenir (Romagnoli ve Concannon, 2006).

1.6.1. Progesteronun Kimyasal Yapısı

Gestagenler, steran (cyclopentanoperhydrophenantren) kimyasal yapısında olup steroid hormonların en büyük grubunu oluşturmaktadır. Progesteron bu grubun en önemli üyesidir. Bu hormon ilk kez 1934 yılında Butenandt ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve kimyasal yapısı belirlenmiştir (Gökçen, 1975).

Progesteronun toplu formülü $C_{22}H_{30}O_2$ 'dir. Moleküldeki 3. ve 20. karbon atomları keton gruplarına sahiptirler ve A halkasındaki 4. ve 5. karbon atomları arasında çift bağ vardır. Buna göre progesteronun tam kimyasal formülü "pregn-4en-3,20 dion" dur (Edqvist ve Stabenfeldt, 1993).



Şekil 1.4. Progesteronun kimyasal yapısı

1.6.2. Progesteronun Biyosentezi

Progesteronun sentezinde ilk basamak Asetilkoenzim A'dır (aktive edilmiş sirke asidi) ve bir dizi ara basamaklardan sonra (mevalon asidi, isopentenyl-pyrophosphat, farnesyl-pyrophosphat, squalen, lanosterin) kolesterol oluşur.

Kolesterinin yan zincirlerinin oksidatif kısalması, 20. ve 22. karbon atomlarının hidroksilasyonu ile pregnenolon şekillenir. Nihayet dehidrasyon sonucu progesteron meydana gelir (Granner, 2000; Niswender ve ark., 2000). Progesteron hem dişide fertilizasyon olaylarında rol oynar hem de diğ er cinsiyet hormonlarının ve kortikoidlerin sentezinde önemli bir basamak oluşturur (Kaolman ve Roehm, 2005).

1.6.3. Progesteronun Metabolizması

Progesteron, steroid hormon sentezinin son ürünüdür ve üretildiğı en önemli organ korpus luteumdur. Ancak birkaç türde progesteron plasentadan da üretilir. Hormon,  retildiğı organlardan doğırudan kana salgılanır (Gökçen, 1975).

Progesteron kanda serbest ve plazma proteinlerine bağılı halde (glukuronid ve sulfatkonjugat) bulunur. Proteinlere bağılı olarak bulunan progesteron biyolojik olarak aktif halde değıildir. Ayrıca steroid-protein bağılantısı geri dönüşümlüdür. Steroidler en fazla albumine bağılanırlar, globulinler ve alt grupları daha sonra gelmektedir. Kanda  zel bağılantı proteinlerinin bulunması progesteronun ileri metbolizmasını önemli ölçüde etkilemektedir. Globulinler, hormonu taşımak yanında fonksiyon düzenleyici olarak da görev yaparlar. Bu proteinlerin özellikleri türe, kandaki konsantrasyonlarına, fizyolojik ve patolojik durumlara, yaşa, cinsiyete, gebeliğı ve uygulanan tedavilere göre farklılık göstermektedir. Örneğın, proteinlere bağılı olarak bulunan progesteronun fare uterusunda etkisiz olduğı kanıtlanmıştır. Proteinlere bağılanma sonucunda steroid hormonların aktivitelerinde, damar duvarından ve diğ er yüzeylerden emilmesinde azalmalar olur. Steroid-protein kompleksi bir tür depodur ve uygun koşullarda büyük miktardaki hormonlar etkisiz hale getirilmeden bu şekilde saklanabilirler (Martin ve Crump, 2003).

Progesteronun parçalanması ve inaktif hale getirilmesi büyük ölçüde karaciğerde, daha az olarak ta böbrekler ve diğer dokularda gerçekleşmektedir. Parçalanma işlemi moleküldeki her iki keton grubunun redüksiyonu ve A halkasının hidrolize olması sonucu gerçekleşir. Parçalanma sonucu oluşan ürünlerin atılması ise idrar ve dışkı yolu ile gerçekleşir (Carruthers, 1986; Martin ve Crump, 2003; Kaolman ve Rohem, 2005).

1.6.4. Progesteronun Etkileri

Progesteron birkaç organda endokrin rol oynamaktadır. Bu organlar uterus, meme bezi, beyin ve kemiktir (Swan ve ark., 2002). Dolayısıyla progesteronun etkileri reproduktif ve reproduktif olmayan şeklinde ikiye ayrılabilir. Bunun yanında hormonun etkileri türe ve doza göre de değişiklik gösterebilir. Örneğin, bazı progestinler insanlarda tam olarak progestasyonel etki gösterirken köpeklerde biraz östrojenik etki gösterebilmektedir. Kimi etkiler düşük farmakolojik dozlarda kimisi de yüksek dozda ve uzun sürede kendini göstermektedir. Ayrıca etkilerden bazıları klinik uygulamalarda bazıları da deneysel çalışmalar esnasında görülmektedir (Romagnoli ve Concannon, 2006).

1.6.4.1. Progesteronun Reprodüktif Etkileri

Progesteron ve progesteron benzeri yapıların (progestasyonel aktivite gösteren yapılar) en önemli etkisi gebeliğin devamının sağlanmasıdır. Ayrıca, yapılan reproduktif çalışmalar bu hormonların; progestasyonel, antiöstrojenik, antiandrojenik, antigonadotropik ve kontraseptif etkileri olduğunu da göstermiştir (Romagnoli ve Concannon, 2006). Ayrıca progesteronun immunsupresif etkisi de bulunmaktadır (Choi ve ark., 2000). Progesteronun reproduktif etkileri şu şekilde özetlenebilir;

a. Progestasyonel etki: Gebeliğin devamını sağlaması, endometrial bezlerin gelişimini ve sekresyonu uyarması, servikal kapanmayı sağlaması, uterus motilitesini baskılaması ve meme bezinin gelişimini sağlaması (özellikle lubulo-alveolar dokuları) şeklindedir.

b. Anti-Östrojenik etki: Progesteron bu etkisini östrojen reseptör sentezini baskılayarak gösterir. Vaginal kanama, östrus davranışları ve oviducttaki sililerin hareketleri progesteron uygulanması sonucu ortadan kalkmaktadır.

c. Anti-Androjenik etki: Progesteronun bu etkisi etkisini muhtemelen androjen veya diğer hormonların interferensi ile bağlantılıdır. Progesteron uygulaması libido gibi davranışları ortadan kaldırmaktadır.

d. Anti-Gonadotropik etki: Progesteron uygulanması sonucunda LH ve FSH sekresyonu azalır, follikül gelişimi baskılanır ve ovulasyon engellenir. Ancak düşük konsantrasyondaki bazal gonadotropin sekresyonunu etkilemezler, pulsatil gonadotropin sekresyonunu azaltırlar.

e. Kontraseptif etki: Bu etkilerini çoklu mekanizmalarla reproduktif sistemin senkronizasyonunu bozarak, follikül maturasyonu ve ovulasyonu engelleyerek ve spermatozoa taşınmasını bozarak gerçekleştirirler (Evans ve Sutton, 1989; Niswender ve ark, 2000; Romagnoli ve Concannon, 2006).

Küçük hayvan reproduksiyonunda progestagenlerin en çok anti-gonadotropik etkisinden yararlanılmaktadır. Kedi ve köpeklerde progestin uygulamalarıyla ovaryum siklusu değişik derecelerde baskılanabilir. Ancak progestinlerin dozu siklusun dönemlerine göre farklılıklar gösterir (Romagnoli ve Concannon, 2006).

1.6.4.2. Progesteronun Reprodüktif Olmayan Etkileri

- a. Kortizol düzeylerini azaltarak hipofizden ACTH sekresyonunu ve adrenokortikol fonksiyonu baskılayabilir,
- b. Büyüme hormonu sekresyonunu uyarabilir,
- c. İnsülin resistansı, insülin konsantrasyonunda artma ve glukoz toleransında değişiklik yapabilir,
- d. Vücut ısısını yavaşça artırabilir,
- e. Lipoprotein lipaz'ın uyarılmasına bağlı olarak yağ depolanmasında artışa neden olabilir,
- f. Yüksek yoğunluktaki lipoprotein (HDL) serum konsantrasyonunda azalmaya neden olabilir,
- g. Böbreklerde aldosteronun etkisini azaltarak sodyum retensiyonunda azalmaya neden olabilir (Evans ve Sutton, 1989; Bhatti ve ark., 2006; Romagnoli ve Concannon, 2006).

Bu etkileri dışında progesteron ve sentetik progestinlerin beyin aktivitelerinin ve çevresel uyarımların düzenlenmesinde reprodüktif olan ve olmayan önemli etkileri vardır. Bu etkilerini merkezi ve çevresel sinir sisteminde bulunan reseptörleri sayesinde doğrudan gerçekleştirirler (Graham ve Clarke, 1997; Pluchino ve ark., 2006).

1.6.4.3. Progesteronun Yan Etkileri

Hormonun yan etkisi kullanıldığı döneme göre değişmektedir. Gebelik sırasında uygulanan progestagenler doğumun başlamasını erteler gebelik süresini uzatır. Ayrıca gebelik sırasında uygulanan progesteron dişi föetuslarda maskulinizasyona erkek föetuslarda kriptorşidiye yol açabilir. Progestinler yüksek bir östrojen dozundan hemen sonra ya da endojen östrojen miktarının en yüksek olduğu proöstrus sonunda uygulandığında anti-gonadotropik etkilerine rağmen pro-gonadotropik etki göstererek ve LH, FSH

dalgası salınmasına yol açabilir (England 1998; Romagnoli ve Concannon, 2006). Normal siklusta östrojen uyarımı sonrasında progesterona maruz kalma ve/veya siklus baskılamak amacıyla dışarıdan progestagen uygulanması kistik endometrial hiperplazi-pyometra riskini artırmaktadır (Ververidis ve ark., 2004; Bhatti ve ark., 2006; Corrada ve ark., 2006; Smith, 2006)

Progestagenlerin bu etkileri dışında da etkileri vardır; çoğu progestagen meme tümörlerinin gelişimini uyarmaktadır, özellikle benign miks adenokarsinom ve bazen malignant karsinoma veya adenokarsinoma neden olabilirler (Evans ve Sutton, 1989; Millanta ve ark., 2005; Bhatti ve ark., 2006). Hayvanların bazılarında uzun süreli progestagen kullanılması sonucunda meme hipertrofisi gelişebilir. Hormonun bu etkisi kedilerde köpeklerden daha sık görülmektedir. Ayrıca hormon kullanımına bağlı olarak iştah artışı, kilo artışı ve nadiren letarji görülebilir (Evans ve Sutton, 1989). Hayvanın kıl yapısında düzelmelerde görülebilir. Bu olay sekonder pyoderma ile birlikte gelişebilir (Knottenbelt ve Herrtage, 2002). Ayrıca özellikle depo progesteronların deri altı olarak uygulanmalarını takiben enjeksiyon bölgesinde kıl dökülmeleri görülebilmektedir. Bundan dolayı progesteron enjeksiyonlarının arka bacakların iç tarafında kılsız bölgeden yapılması önerilmektedir (England, 1998).

1.7. Endokrin Tanı Yöntemleri

Hayvan yetiştiriciliğinde bir endokrin bezin fonksiyonel durumu hakkında bilgi edinmek için kanda hormon analizlerinin önemi büyüktür. Bu amaçla biyolojik, kimyasal ve biyokimyasal ilkelere dayalı hormon ölçüm teknikleri geliştirilmiştir. Günümüzde çeşitli ölçüm yöntemleri ile hormonların en küçük miktarları bile hızlı ve güvenilir şekilde tespit edilebilmektedir.

Endokrin tanı amacıyla yararlanılan yöntemlerden bir tanesi immunolojik yöntemlerdir. Bu yöntemlere; İmmunoelektroforez, Radialimmunodiffüzyon (RID), İmmunohistokimyasal yöntemler ve Radioimmunoassay (RIA) yöntemi örnek olarak verilebilir (Wood ve Sokolowski, 1981).

Radioassay tekniklerinin geliştirilmesi ve radyoaktif işaretli izleyicilerin antikorun bağlanma yüzeyleriyle birlikte kullanılması endokrinolojide yeni ufuklar açmıştır (Özsar, 1983).

Radyoaktif madde ile işaretlenmiş ölçümler üç başlık altında toplanabilir.

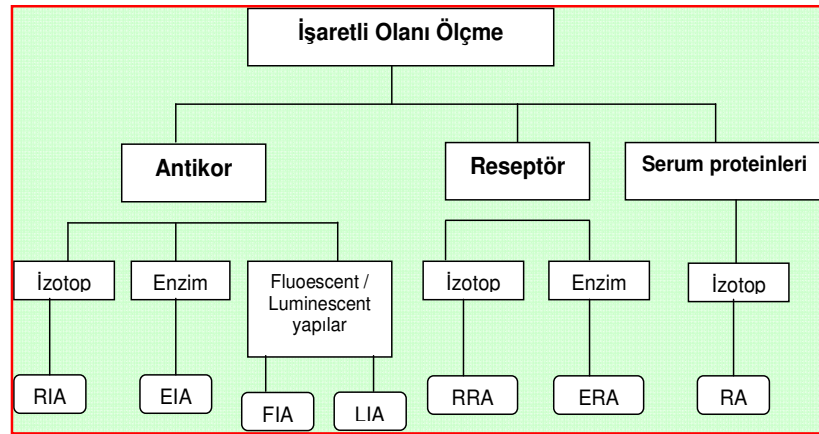
A. Protein bağlayıcılarının yarışmalı ölçümü: Bağlayıcı proteinler serum proteinleri gibi doğal şekillenen proteinlerdir. Steroid hormonlar suda zayıf eriyen ve kanda spesifik taşıyıcı proteinlerle taşınan hormonlardır. Steroid hormonların ölçülmesinde kortikosteroid bağlayıcı globulin (CBG) ve cinsiyet hormonu bağlayıcı protein (SHBG) kullanılmaktadır. Bu proteinlerin steroidlere bağlanma spesifitesi yüksek değildir. Örneğin, CBG progesteron, 17α -hidroksi progesteron ve kortikosteroidlere, SHBG ise östrojen ve androjenlere bağlanır (IAEA, 1984). Bu teknik ile aldosteron, cAMP, serum folat, antimikrozomal ve antitiroglobulin antikorları ve vitamin D analogları da ölçülebilir. Bu yöntemin düzenlenmesi kolaydır ancak birkaç örnek için ucuz görünse de fazla sayıda örnek bakmak için RIA daha avantajlı bir yöntemdir. Gene bu yöntemde örneklerin deproteinizasyonu gerekmektedir. Radioimmunoassay'de ise doğal antikor kullanılmaktadır (Skelley ve ark., 1973). Hepsinden önemlisi, bu yöntemde spesifite ve sensitivite kaybı fazla olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı bu sistem yerine daha spesifik olan RIA kullanılmaktadır (Skelley ve ark., 1973; IAEA, 1984).

B. Radioreseptör assay: Follikül uyarıcı hormon, LH ve PRL gibi bazı protein hormonlar kanda serbest halde bulunurlar. Hedef organlarda ise bu

hormonlara spesifik hücre membran reseptörleri bulunur. Bu ölçüm yönteminde proteinler yerine bu reseptörler ölçülür (IAEA, 1984). Bu yöntemle SCTH doku reseptörleri, östrojen reseptörleri, LH, HCG ve cAMP reseptörleri ölçülebilir. Bu yöntemin avantajı göreceli olarak daha kısa zaman almasıdır (Skelley ve ark., 1973). Ancak bazı olgularda spesifite yükselir ve yöntemin sensitivitesi ise genellikle zayıftır. Bundan dolayı, Protein hormonların belirlenmesinde RIA kullanılmaktadır (IAEA, 1984).

C. Radioimmunoassay (RIA): Yüksek spesifite ve sensitivitesinden dolayı bu yöntem hormon konsantrasyonlarının belirlenmesinde geniş uygulama alanı bulmuştur. Bu yöntemde bağlayıcı proteinler gibi hormona spesifik antikor kullanılmaktadır. Antikorlar ticari olarak satın alınabileceği gibi tavşan, koyun, kobay veya atlarda da üretilebilir (IAEA, 1984).

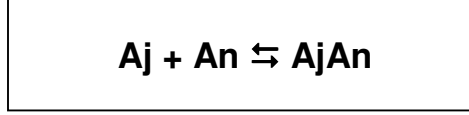
Radioimmunoassay geliştirildikten sonra onun ilkelerinden köken alan birçok yöntem geliştirilmiştir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. RIA'dan köken alan yöntemler. Tek farkları fiziksel ve kimyasal manipulasyonlardır. RIA: Radioimmunoassay, EIA: Enzimimmunoassay, FIA: Floresans immunoassay, LIA: Luminisent immunoassay, RRA: Radioreseptörassay, ERA:Enzimreseptörassay .

Radioimmunoassay ve ondan köken alan testlerin süreçleri birbirlerinden farklıdır. Ancak, her bir ölçüm sistemindeki yapıların birbirleriyle olan ilişkilerindeki kinetik reaksiyonlar ve matematiksel yorumlar benzerdir. Antijen-antikor ilişkisinin kesin doğası henüz tam olarak bilinmemektedir

ancak genellikle aşağıdaki reaksiyon şeklinde olduğu kabul edilmektedir (Şekil 1.6) (Skelley ve ark., 1973).



Şekil 1.6. Antijen-antikor ilişkisi. Aj: antijen, An: antikor

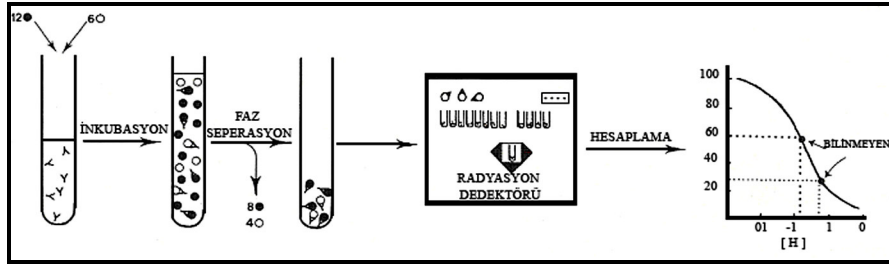
1.8. Radioimmunoassay

Radioimmunoassay'ın prensibi antijen-antikor reaksiyonunun radyoaktif metotla ölçülmesine dayanır. Saturasyon (doyurma) yöntemlerinden biri olan RIA'nın prensibinin temelinde ilk olarak bağlanma bölgelerinin tamamıyla doyurulması, ikinci olarak bilinmeyen antijenin ve işaretli antijenin antikora bağlanmak için yarışdırılması vardır (Biodata, 1984). Prensipden anlaşıldığı gibi RIA'da üç temel unsur vardır. Bu unsurlar; aranan hormon (bilinmeyen veya aranan antijen), işaretli hormon (İşaretli antijen, Tracer; reaksiyon indikatörü) ve spesifik antikordur (aranan antijene spesifik; reaksiyon spesifik faktörü) (Stabenfeldt ve ark., 1976; Biodata, 1984; IAEA,1984; Van de Wiel ve ark., 1986; Cupps, 1991).

Radioimmunoassay, aranan antijenin (örneğin hormon) ve radyoaktif işaretli antijenin, antijene karşı üretilmiş antikor moleküllerine bağlanabilmek için yarıştıkları bir reaksiyondur. Radyoaktif işaretli antijen ve aranan antijen sınırlı miktardaki antikor ile aynı ortama konulduklarında antikordaki bağlanma yüzeylerine bağlanmak için yarışa girerler. Ortamdaki aranan antijen (örnek ve standart) miktarı artırılırsa antikorun bağlanma yüzeylerine daha fazla sayıda aranan antijen bağlanır ve radyoaktif işaretli antijenin bağlanabileceği yer azalır. Kısaca bu yarış doğrudan doğruya ortamda bulunan aranan antijenin (yani örnekte bulunan hormon) miktarı ile orantılıdır. Bu üç unsuru bir araya getirip reaksiyona girmelerini sağladıktan 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 (Şekil 1.7) (Özsar, 1983; IAEA, 1984).

Aranan antijenin miktarını tayin etmede bu antijenin çeşitli oranlarda bilinen miktarları, sabit miktarda antijen ve sabit miktarda antikör ile reaksiyona sokulur ve standart çözeltilerin konsantrasyonları yatay eksene (x ekseni), radyoaktivite sayım sonuçları da dikey eksene (y ekseni) işaretlenerek standart eğri elde edilir (doz-cevap eğrisi). Bu standart eğri, belirli konsantrasyondaki aranan antijenin antikora bağlanma yarışı sonucu, ne kadar aranan antijenin (ligand) antikora bağlanabildiğini gösterir. Örneklerin radyoaktivite sayaçlarında ölçülen aktiviteleri (cpm) standart eğriye uygulanarak bilinmeyen işaretli antijen (aranan antijenin) miktarı hesaplanabilir (Özsar, 1983).



Şekil 1.7. Radioimmunoassay süreci. İşaretli (•) antijen ile işaretli olmayan (bilinmeyen: o) antijen aynı ortama konularak hormona spesifik antikora (Y) bağlanması için yarışdırılır. İnkubasyondan sonra bağlı olan ve olmayan kısımları ayrılır ve her iki kısımdan biri radyasyon detektörü ile ölçülür (Reimers, 2003'den uyarlanmıştır).

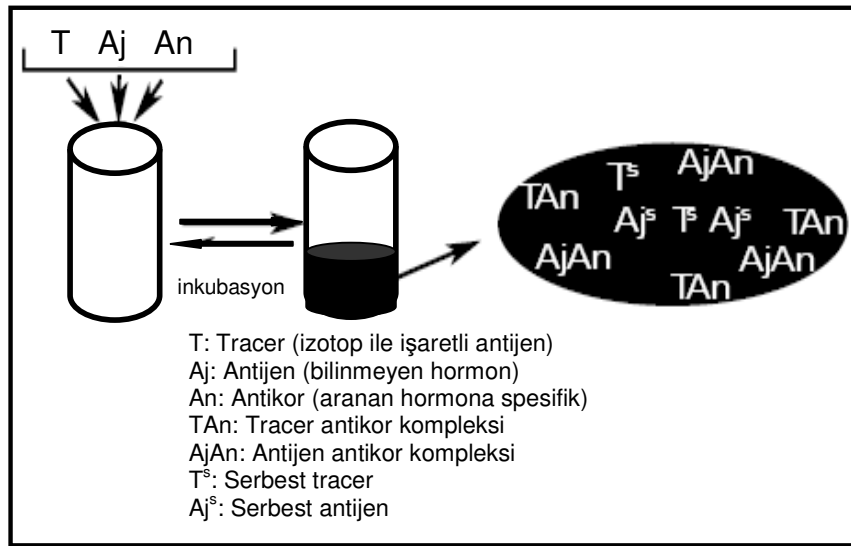
1.8.1. Radioimmunoassay'ın Avantajları ve Dezavantajları

Her yöntemin olduğu gibi RIA'nında avantajları ve dezavantajları söz konusudur. Radioimmunoassay'de az miktarda örneğe ihtiyaç duyulur, bir defada birden fazla örnek ölçülebilir, herhangi bir örnek hazırlama gereksinimi asgari düzeydedir, sonuçları mükemmel spesifikite, doğruluk, duyarlılık ve kesinliktedir. Bu avantajlar yanında daha fazla el işlemi gerektirmesi, radyoaktif atıkların ortaya çıkması, gerekli radyoaktif

maddelerin pahalı olması, hayvan hormonları için piyasada sınırlı sayıda reajanların bulunması ve reajanların yarı ömrünün kısa olması gibi dezavantajları da vardır (Reimers, 2003).

1.8.2. Radioimmunoassay'ın Bileşenleri

Bir RIA sistemi üç unsur ve güvenli bir ayırma sistemini kapsar. Bu unsurlar; antikor, antijen ve işaretli antijen (tracer)'dir.



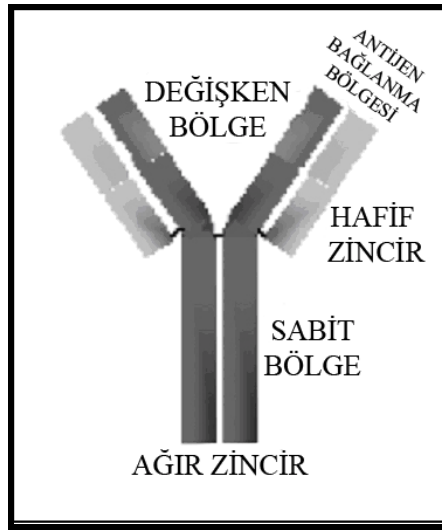
Şekil 1.8. RIA'nın çeşitli bileşenleri. Aynı ortama koyulan işaretli antijen (T), miktarı aranan antijen (Aj) ve antijene spesifik antikor uygun inkubasyon sonrasında işaretli antijen ve antikor (TAn), aranan antijen ve antikor (AjAn) kompleksleri oluştururlar. Ortamda bulunan antikora bağlanamayan işaretli antijen veya aranan antijen ise ortamda serbest (T^s ve Aj^s) olarak bulunurlar. Serbest olan bu fazlar ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra bağlı olan fazlardan bir tanesi ölçülür.

1.8.2.1. Antikor

Bir immunojen tarafından uyarılan immün sistem tarafından üretilen yapılardır. Antikorlar vücuda yabancı bir immunojen tarafından uyarılan immün sistemin B lenfositlerinden köken alan plazma hücreleri tarafından salgılanırlar. Antikorlar poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki çeşittir. Poliklonal antikorlar B lenfosit ve ondan köken alan yapılar tarafından üretilen

antikorlardır. Günümüzde bir çok testte poliklonal antikorlar kullanılmaktadır (Clark ve ark., 2002).

Bir antikor molekülü iki ağır zincir ve iki hafif polipeptid zincirden meydana gelmiştir. Bu zincirler sırasıyla 450 ve 215 aminoasitten oluşmuştur. İntra ve inter moleküler disülfid köprüleri molekülü bir arada tutar ve moleküle Y şeklini verir (Şekil 1.9) (Wood ve Sokolowski, 1981).



Şekil 1.9. Bir antikorun yapısı

Antikorlar IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE olmak üzere beş grupta toplanabilir (Clark ve ark., 2002). Kan serumunda bulunan antikorların %80'i IgG sınıfına ait olduğu için RIA'da kullanılan antikor molekülleri de çoğunlukla bu sınıftandır (Çizelge 1.1) (Wood ve Sokolowski, 1981).

Çizelge 1.1. İmmunglobulinlerin sınıflandırılması (Wood ve Sokolowski, 1981).

Sınıf	Moleküler ağırlığı	Sedimentasyon sabiti	Serum konsntrasyonu $g \times 1^{-1}$	Toplam gammaglobulinler içindeki %'si
IgG	150,000	7 S	3-16	~80
IgM	900,000	19 S	0,5-2,0	6
IgA	160,000	7 S, 9 S	1,5-4,0	13
IgD	185,000	7 S	0-0,4	1
IgE	200,00	8 S	<0,1	0,002

Radioimmunoasay'de kullanılan antikor ticari olarak satın alınabilir veya uygun immunizasyonlar yapılarak deney hayvanlarından elde dileyebilir. Antikor elde etmek için immunojenik özelliklere sahip antijenik bir molekül gerekmektedir.

1.8.2.2. Antijen

Antijenler, doğal veya sentetik yapıda olması önemli olmayan, immunojenik özelliğe sahip olup vücuda enjekte edildiği zaman yabancı moleküller olarak algılanan yapılardır. Antijenlerin doğal immunojenik özelliğe sahip olanları ve olmayanları vardır. Antijenik özellikleri olan ancak immunojenik olmayan bu maddelere haptten denilmektedir (Wood ve Sokolowski, 1981).

Çizelge 1.2. Immunojenik özelliğe sahip olan proteinler ve bu özelliğe sahip olmayan hapttenler

Hapttenler	Proteinler
Steroidler ve peptid hormonlar	Glikoproteinler ve lipoproteinler
Molekül ağırlıkları <3000	Molekül ağırlıkları >3000

Haptten grubuna giren antijenik moleküller hayvana doğrudan enjekte edildiklerinde immunojenik aktivite göstermezler veya gösterdikleri aktivite çok zayıf olur. Kuvvetli bir immunojenik yanıt isteniyorsa bu moleküllerin enjeksiyondan önce yüksek molekül ağırlıklı taşıyıcı proteinlere bağlanmaları gereklidir. Bu amaçla en çok kullanılan taşıyıcı proteinler bovine serum albumin (BSA) veya bovine tiroglobulindir. Protein grubunda yer alan moleküller için böyle bir işleme gerek yoktur. Moleküller ağırlıkları büyük olduğu için doğal olarak immunojenik özelliklere sahiptirler. Doğrudan hayvanlara enjekte edilebilirler. Bu maddelerin oral olarak verilmesi immunojenik özelliklerini ortadan kaldırır veya azaltır (Wood ve Sokolowski, 1981).

Radioimmunoassay'de antijenler hem bilinmeyendir yani aranan hormondur hem de işaretli antijendir. Ölçümün prensibi gereği antijenlerin bağlanacağı antikorun bu antijenlere spesifik olması gerekmektedir. Spesifik antikor ise antijen kullanılarak yapılan immunizasyonlar sonucunda elde edilir.

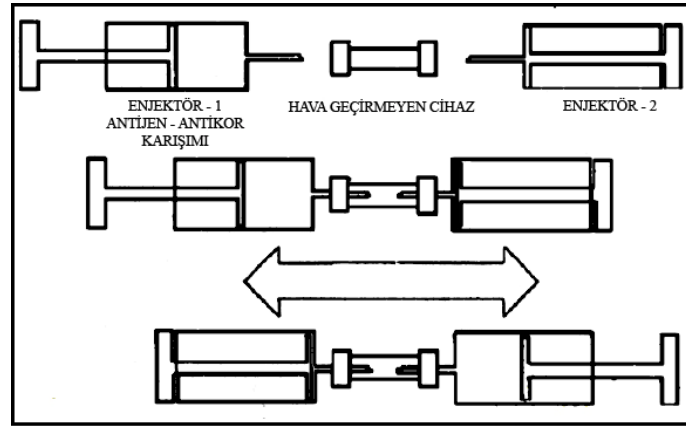
İmmunizasyon çalışmaları için önerilen belirli bir yöntem yoktur. Çok sayıda immunizasyon yöntemi bulunmaktadır. Kullanılan antijenin konsantrasyonu, seçilen adjuvant, kullanılan hayvan, hayvanın genetik yapısı, hayvanın bakım ve beslenme şartları, immunizasyon yöntemi, kan örneklerinin toplanması ve saklanması, booster (ikinci enjeksiyonlar) enjeksiyonları arasındaki süre gibi bir çok faktör immunizasyon başarısını etkilemektedir (Wood ve Sokolowski, 1981; Clark ve ark., 2002).

İmmunizasyon için tavşan, tavuk, kobay, koyun ve keçi gibi hayvanlar kullanılabilir. Bu hayvanlardan elde edilen antikorlar substans spesifiktir. İlk antikora karşı antikor elde edilmek istendiği zaman koyun, keçi ve eşek gibi hayvanlar kullanılabilir. Kullanılacak hayvan, elde edilmek istenen antikor miktarına, bakım ve besleme olanaklarına göre değişir. Ayrıca kullanılacak olan hayvanların sağlıklı olması da önemlidir (Wood ve Sokolowski, 1981; Clark ve ark., 2002).

İmmunizasyonda kullanılacak olan adjuvantın seçimi ve kullanılan miktarı da önemlidir. Adjuvant, yüksek toksisite özelliği olan antijenlerin yavaş emilmesine yardım eder, lenfositlerin yüzeyinde bulunan reseptörlerin immuojenin çok düşük konsantrasyonlarıyla uzun süre temas etmesini sağlar, immun sistemin çeşitli hücrelerini doğrudan harekete geçirir (Wood ve Sokolowski, 1981; Clark ve ark., 2002). İmmunizasyon için kullanılacak antijen Freund's complete adjuvantı ile karıştırılarak uygulanır. Bu adjuvant mineral yağ, deterjan ve ölü tüberküloz basili içeren bir solüsyondur. Freund's incomplete adjuvantı içerisinde ise tüberküloz basili yoktur (Wood ve Sokolowski, 1981).

İmmünizasyon için enjeksiyonlar deri içi veya deri altı yolla yapılmalıdır. Kas içi, damar içi, periton içi, n d l içi uygulamalar tavsiye edilmemektedir. Enjeksiyonlar sırt kısmına çok küçük miktarlarda (10  l, azami 250  l-0,25ml) deri altı olacak şekilde fazla sayıda bölgeye yapılır. Enjeksiyon sonrası hayvanlar, anafilaktik  oka karşı, gözetim altında tutulmalıdır. Enjeksiyonlar için adjuvant kullanılarak yapılan emülsiyonlar taze olarak hazırlanmalıdır (Wood ve Sokolowski, 1981; Clark ve ark., 2002).

Adjuvant ve antijen, 50:50 oranında, bir enjektöre çekilir. Daha sonra iki ucu k t sonlanan kanülün bir ucuna karışım çekilen enjektör diğer ucuna da boş enjektör yerleştirilir ve dolu enjektörden boş enjektöre karışım boşaltılır. Bu işleme antijen ve adjuvant birbirine tamamen karı ana ve her iki faz birbirinden ayrılmayacak duruma gelene kadar tekrar edilir ( ekil 1.10) (Wood ve Sokolowski, 1981). Emülsiyon hazırlanırken mümkün olduğunca steril çalışılmalıdır. Aksi takdirde lokal veya sistemik sorunlar ile kar ıla ılabilir (Clark ve ark., 2002).



Şekil 1.10. Antijen antikor emülsiyonun hazırlanması (Wood ve Sokolowski, 1981).

İmmünizasyonlara ba ladıktan 14 gün sonra tavşanların ana kulak venasından kan örnekleri alınır ve antikor titre tayini yapılır. Uygun titrede antikor bulunduğu takdirde antiserum 0,1-0,5 ml'lik porsiyonlara ayrılır ve -20 C'de birkaç yıl saklanabilir ancak -70 C'de saklanması  onerilmektedir. Birkaç mililitre yüksek titredeki antikor radioimmunoassay çalışmaları için

milyonlarca örnek için yeterli olur. Antikorların tekrarlayan çözündürülüp dondurulmalarından denaturasyona neden olacağı için kaçınılmalıdır (Wood ve Sokolowski, 1981; IAEA, 1984).

1.8.2.3. Radyoaktif İşaretli Antijen (Tracer)

Radioimmunoassay çalışmalarında bir çok izotop işaretleyici olarak kullanılmıştır (Çizelge 1.3).

Bu izotoplar içinde en çok kullanılanlar ^{125}I , ^{131}I ve ^3H (tritium) dur ve bunların birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. ^{131}I molekülünün yarı ömrü 8,04 gündür, hem gama hem beta ışıması yapmaktadır ve yapılan karşılaştırmalarda ^{125}I 'in gama sayacında daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Wood ve Sokolowski, 1981). ^3H işaretleyici olarak çok istikrarlı, yarılanma ömrü çok uzun, gama ışını yayan ve radyasyon hasarı az olan bir izotopdur. Parlayıcı maddeye gereksinim duyması nedeniyle pahalı olması ve son derece yanıcı olup toksik radyoaktif hasar bırakması dezavantajıdır (IAEA, 1984). ^{125}I 'in gama sayacında %75'inden fazlası okunabilmektedir ve yarı ömrü ^{131}I 'e göre daha uzun olup daha düşük enerji yaymaktadır. Ayrıca ^{125}I bağlandığı molekülün elektrik geçirgenliğini dolayısı ile fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmemektedir (Wood ve Sokolowski, 1981). Önceleri Tiroid ve proteohormonlar ^{125}I , ^{131}I ile, steroid hormonlar ^3H ile işaretlenirdi. Ancak diğer izotoplara olan avantajları nedeniyle steroid hormonların işaretlenmesi de uzun zamandır ^{125}I ile yapılmaktadır (Wood ve Sokolowski, 1981; Özsar, 1983; IAEA, 1984)

Çizelge 1.3. Bazı radyoizotopların ışıma tipleri, enerjileri ve yarılanma ömürleri (Wood ve Sokolowski, 1981).

İzotop	Işın tipi	Enerji (KeV)	Yarı ömrü
³ H	β ⁻	20	12,25 yıl
¹⁴ C	β ⁻	200	5736 sn
³² P	β ⁻	1700	14,3 gün
³⁵ S	β ⁻	200	87,5 gün
⁵¹ Cr	λ	320	27,7 gün
⁵⁷ Co	λ	122,136	270 gün
⁵⁹ Fe	β, λ	500, 1600, 1099, 1232	44,6 gün
⁷⁵ Se	λ	121, 136, 265, 280	120 gün
^{99m} Tc	IT	140	6,05 saat
¹²⁵ I	λ	25.35	60,14 gün
¹³¹ I	β, λ	60, 800, 284, 364, 637	8,04 gün

Antijenin radyoaktif izotopla işaretlenmesinde mümkün olduğu kadar çok sayıda molekülün işaretlenmesine özen gösterilir. Böylelikle spesifik aktivitesi yüksek olan radyoaktif işaretli hormonlar elde edilir. Daha yüksek spesifik aktivite daha fazla deney duyarlılığı demektir (Özsar, 1983).

Anijen-antikor reaksiyonun miktarını tespit etmek için kullanılan Tracer'in radyoaktivitesini belirlemek için β (beta) ve γ (gama) sayaçları kullanılır (Biodata, 1984).

1.8.2.4. Bağlı ve Bağlı Olmayan Fazların Ayrılması

Herhangi bir radioimmunoassay sisteminin temel unsurlarından bir tanesi antikora bağlanan işaretli antijen (bağlı kısım) ile bağlanmayan (serbest kısım) kısmı birbirinden ayırmaktır (separasyon). Bu işlem “faz ayırma” diye bilinir. Ayrıma işleminde birçok yöntem vardır ve bunlar dört grup altında toplanabilir.

A. Kimyasal çöktürme: Amonyum sülfat, etanol veya polietilen glikol (PEG) gibi kimyasallar kullanılarak antikor bağlı hormon kimyasal olarak çöktürülür.

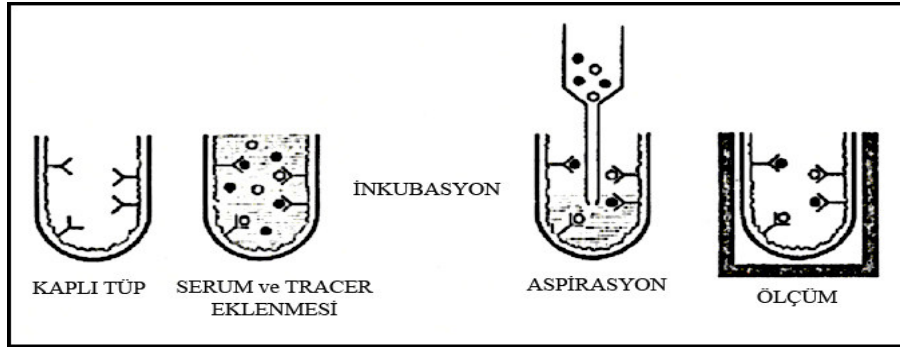
B. Adsorbsiyon: Serbest hormon kaplı kömür veya protein A gibi maddeler kullanılarak adsorbe edilir.

C. İmmunolojik yöntemler: İlk antikora karşı ikinci antikor hazırlanarak yapılır

D. Solid faz ayırma: Antikor kaplı tüpler veya matrix kullanılarak yapılır (IAEA, 1984).

Uygun ayırma yöntemi basit, çabuk, ucuz ve güvenilir, oda ısı, zaman ve serum bileşenlerinden etkilenmeyecek şekilde olmalıdır (Wood ve Sokolowski, 1981).

Solid faz ayırma yönteminde kaplı tüplerin kullanılması (şekil 1.11) basit, hızlı ve kolaylıkla fazla donanımı olmayan küçük laboratuvarlarda uygulanabilir bir yöntemdir. Bu yöntemde polipropilen ve polisteren tüplerin yüzeyi iyonik ve hidrofobik ilişkiler ile antikorları bağlar. Bağlı olan bu antikorlar uygun koşullarda saklanırsa 12 aydan daha uzun süre özelliğini korur (Wood ve Sokolowski, 1981).

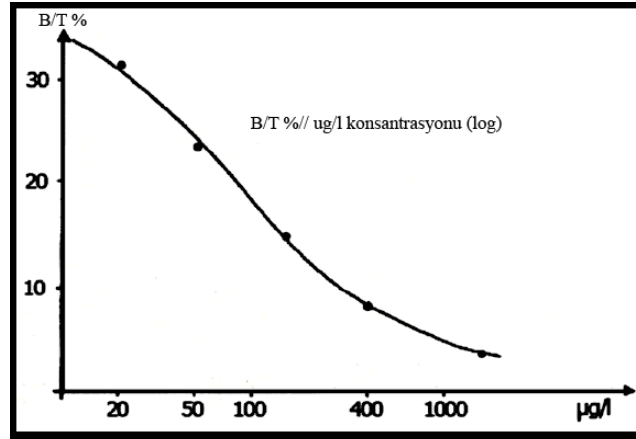


Şekil 1.11. Kaplı tüpler kullanılarak ayırma (Wood ve Sokolowski, 1981)

1.8.3. Radyoaktivite Sayımı ve Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deney sonunda bağlı ve bağlı olmayan kısımlar birbirinden ayrıldıktan sonra kullanılan izotopun yaydığı ışınlar için tasarlanmış sayaçlar (^{125}I için gama sayacı, ^3H için β sayacı) ile ölçümler yapılır. Sayım sonuçlarının (cpm;

dakikadaki sayım) ifadesinde, doz-cevap eğrileri için çeşitli koordinat sistemleri kullanılır. Bağlı antijenin serbest antijene oranı (B/S); bağlının toplam aktiviteye oranı ki bu gerçek (absolute binding) bağlanmadır (B/T); bağlının, işaretli antijen içermeyen kör tüpündeki bağliya oranı ki bu nispi bağlanma (relative binding) olup hemen bütün doz-cevap eğrilerinde en fazla kullanılır (B/B_0). B/S ; B/T ; B/B_0 doz-cevap eğrisinin yanıt kısmını oluşturur 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 $\log$ it (B/B_0) cevap, koordinat sistemi en uygun sistemdir (Log-Lin eğrisi) (Özsar, 1983). Önceleri bu eğri el ile çizilmekteydi ve bu da deneyin duyarlılığında azalmalara yol açmaktaydı. Bugün ise eğriler bilgisayar programları ile oldukça başarılı şekilde çizilmektedir ve sonuçları daha duyarlıdır (Wood ve Sokolowski, 1981). Doz-cevap eğrisinden bilinmeyen antijen miktarı hesaplanır (Özsar, 1983).



Şekil 1.12. Log-lin eğrisi. Tipik sigmoid eğri

1.8.4. Radioimmunoasay'in Kalite Kontrolü (Güvenilirlik Kontrolü)

Çok düşük düzeydeki hormonların RIA ile tayininde, her deney serisi için devamlı bir şekilde kalite kontrolü yapılması çok önemlidir (Özsar, 1983). Radioimmunoassay ile yapılacak deneylerde testin farklı türlerde, medyum

ve doku ekstraktlarında, değişik laboratuarlarda çalışıp çalışmayacağını tespit etmek için dört ölçütten yararlanılır. Bunlar;

- 1) Duyarlılık (sensitivity),
- 2) zgllk (specificity),
- 3) Doğruluk (accuracy),
- 4) Hassasiyet (precision)'dır (Wood ve Sokolowski, 1981; zsar, 1983; IAEA, 1984).

1.8.4.1. Duyarlılık

Bir biyolojik sıvıdaki hormon düzeyinin belirlenmesinde ölçümün duyarlılığı çok önemlidir. Tayin edilebilen en düşük hormon miktarıdır. Bu miktar sıfır standart düzeyinden farklı olmalıdır. Deneyin duyarlılığı bazı faktörlere bağlıdır. Bunlar; standart eğrinin eğimi, işlemsel kayıplar, solvent kr ve plazma kr şeklinde sıralanabilir (Skelley ve ark., 1973; Wood ve Sokolowski, 1981; zsar, 1983; IAEA, 1984).

Bu faktörler de deney esnasında bazı faktörlerden etkilenmektedirler. Örneğin; standart eğrinin duyarlılığı; hormon ölçümü için kullanılan antiserumun affinitesine, deneyde kullanılan radyoaktif işaretli antijen ve antikorun miktarına, inkubasyon ortamının hacmine ve deneyin hassaslığına bağlıdır (zsar, 1983).

Deney krn etkileyen faktörler ise aşağıda sıralanmaktadır;

- a) Anti-steroid antiserumun affinitesi: Daha düşük affinite daha az kr etkisi demektir,
- b) Tampon sistemi: Jelatin veya BSA gibi bir protein kr etkisini azaltır,
- c) Ayırma yöntemi: Steroid hormonlar için, kr etkisi aktif kömür ile ayırma yönteminde en azdır,

d) Teknisyenlerin fizyolojik durumu: Deneyi yapan kişinin hamile olması, kişinin elinden bulaşmalar olabileceği için, progesteron tayinlerinde kör etkisini artırır (Özsar, 1983).

Kör değerlerinin deney duyarlılığından daha az olması idealdir. Solvent körünün etkisi, progesteron için, petrol eterli standartlar kullanılarak denenir. Daha duyarlı deney sistemi, antiserumun daha yüksek dilüsyonlarda hazırlanması ile elde edilir. Yüksek dilüsyonlarda standart eğrinin eğimi en ideal durumundadır (Özsar, 1983).

Deneyin duyarlılığı Ekins'e göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır (Skelley ve ark., 1973).

$$\text{Duyarlılık} = (B/F)'\text{nin çift ölçümleri arasındaki farkın ortalaması} / 1.1 \times (B/F) \text{ deki cevap eğrisinin eğimi}$$

1.8.4.2. Özgüllük

Özgüllük, ölçülmesi istenen yapının karışımdaki diğer yapılardan ayrılması olarak tanımlanabilir (Skelley ve ark., 1973).

Özgüllük de üç önemli kıstas vardır. Bunlardan birincisi; immunizasyon için kullanılan hormon antijeninin çok saf olması ve spesifik antikor üretebilmesidir, ikincisi; radyoaktif madde ile işaretlenen hormonun çok saf olması ve üçüncüsü; hormonun örnekteki diğer materyalden ayrılabilir olmasıdır (Skelley ve ark., 1973; IAEA, 1984). Radioimmunoassay'in özgüllüğü iki yol ile belirlenir. Bunlar;

a) Deneyde kullanılan antikorun özgüllüğüne bağlıdır. Özgül antikorun diğer steroidlerle olan çapraz reaksiyonları denenir ve çapraz reaksiyon eğrisi çizilir (Özsar, 1983; IAEA, 1984). Aynı türden elde edilen iki farklı antijen

Çapraz reaksiyon verebilir. Örneğin FSH, LH ve sıklıkla TSH'ya tamamen ya da kısmen çapraz reaksiyonlar şekillenmektedir. Çapraz reaksiyonlar hormonlar arasında, hormonların n maddeleri arasında, türevleri arasında, fragmentleri, metabolitleri arasında ve farklı tipteki steroid hormonlar arasında da ekillenebilmektedir. Ayrıca antijenik olmayan çapraz reaksiyonlar da vardır. Bunlar genelde çevresel faktörlerden kaynaklanır. İyonik ekim kuvveti, pH, heparin, üre, aşıırı bilirubin konsantrasyonu, yüksek ısı, tampon medyumunu çevresel faktörlerdir ve antijenin antikor ile verdiği reaksiyonunu değiştirirler (Skelley ve ark., 1973). Progesteron için genelde bulunan çapraz reaksiyon değerleri izelge 1.4 de gösterilmiştir (IAEA, 1984).

Çizelge 1.4. RIA'da progesteron için diğer steroid hormonlar ile çapraz reaksiyon oranları (IAEA, 1984).

Steroidler	apraz reaksiyon oranları (%)
Progesteron	100.0
11 α -hidroksiprogesteron	51.1
Kortikosteron	0.8
Pregnenolon	0.5
Deoksikortikosteron	0.5
17 α -hidroksiprogesteron	0.5
Testosteron	0.1
Kortizon	0.1
Östradiol-17 β	0.1
Kolesterol	0.1
Kortizol	0.1

b) Seğici solvent kullanılması: Tayin edilmek istenen steroidle çapraz reaksiyon veren steroidler çok veya az polar ise, seğici solvent ekstraksiyonu ile bunlar ortamdaki uzaklaştırılır. Birçok RIA sürecinde Progesteron-11-protein konjugata karşı elde edilen antiserum kullanılmaktadır. Bu antiserumun özgüllüğü çok yüksektir ve diğer steroidlerle (kortikoidler) ok az çapraz reaksiyon verir. Petrol eter gibi polar olmayan solventler kullanılarak serum veya plazma örneklerinden %80-90 oranında progesteron, son derece polar olan kortikosteroidler plazmada bırakılarak ekstrakte edilebilir. Kısaca, kromatografi kullanılmaksızın, seğici solvent ekstraksiyonu kullanarak RIA ile duyarlı bir şekilde progesteron tayin edilebilmektedir (zsar, 1983; IAEA, 1984).

1.8.4.3. Doğruluk

Deneyin doğruluğu için “recovery” testleri yapılır. Düşük düzeyde steroid kapsayan plazmalara artan miktarda standart steroidler ilave edilir. Deney sonucu elde edilen değerlerden, düşük progesteron kapsayan plazmadaki değerler çıkartılarak her standart nokta için “recovery” hesaplanır. Standart noktalar yatay eksene ve bu standartların deney sonunda elde edilen değerleri ise dikey eksene işaretlenerek bir eğri çizilir (Özsar, 1983; IAEA,1984). Bu eğri için, teorik olarak regresyon katsayısının 1.00 olması gerekir. Yöntemde sistematik (antijen ve antikordan kaynaklanan hatalar) bir hata yoksa bu katsayının 1.00 den sapmaları, deneyde yöntemsel bir hata bulunduğu işaret eder (Özsar, 1983).

Doğruluk testinin diğer önemli bir kısmı ise “paralellik” testidir. Standartların logit log transformasyonu ile elde edilen eğri, değişik dilüsyonlarda herhangi bir plazma kullanılarak elde edilen eğri ile paralel olmalıdır (Özsar, 1983).

Bu yöntemlere ek olarak doğruluk RIA sonuçlarının diğer bazı metotların (bioassay, gaz kromatografisi, kütle spektrometrisi gibi) sonuçlarıyla karşılaştırılması ile yapılabilir (IAEA, 1984).

1.8.4.4. Hassaslık

Bir RIA değerinin hassaslığı, deney sonuçları arasındaki sapmanın ortalama derecesini gösterir. Diğer bir deyişle, çift işlenen aynı örnekler arasındaki ortalama farktır. Hassaslık deney içi fark ve deneyler arası fark bulunarak hesaplanır. Genel olarak deneyler arası fark, deney içi farktan daha büyüktür (Özsar, 1983; IAEA, 1984).

Deneyler arası fark, aynı örneklerin farklı deney serilerinde tekrarlanmasıyla elde edilir (Özsar, 1983; IAEA, 1984). Deneyler arası farkta, farklılığın büyük oluş nedenleri: Farklı standart eğriler, saklama koşullarından kaynaklanan deney çözeltilerinin kimyasal yapısındaki değişimler, farklı teknisyenler, aktif kömürdeki, santrifüjdeki ve laboratuardaki ısı değişimleri ve farklı inkübasyon süreleridir (Özsar, 1983). Deneyler arası fark deney sisteminin kalite kontrolü için çok önemlidir ve sistematik olarak kontrolü gerekir (IAEA, 1984).

Deney içi fark, aynı deney içerisinde plazma örneklerinin çift çalışmasıyla hesaplanır (Özsar, 1983; IAEA, 1984). Deney içi fark, pipete edilmiş radyoaktif maddenin, antikorun ve standartların da hassaslığına bağlıdır. Ayrıca sayım hataları da göz önünde bulundurulmalıdır (Özsar, 1983).

Deney tamponuna jelatin veya BSA eklenmesi kör etkisini azaltır ve hassaslığını artırır. Jelatin, progesteron gibi az polar steroidlerin, deney tamponundaki çözünürlüğünü artırır ve interferans yapan bileşiklerden deneyi korur (Özsar, 1983).

Sunulan tez çalışmasının amacı, dişi köpeklerin farklı siklik evrelerinde, gebelik ve yalancı gebeliklerinde, progesteron hormonu düzeylerini türe spesifik, insanlarda kullanılan ve bu çalışma için oluşturulan RIA kitleri ile araştırarak tanı yönünden uyum, olası fark ve benzerlikleri ortaya koymak şeklinde özetlenebilir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmanın materyalini Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Küçük Hayvan Kliniğine jinekolojik muayene amacıyla getirilen dişi köpekler oluşturdu. Çalışmada, anamnez, vaginal sitoloji, vaginoskopik ve ultrasonografik muayeneler sonucunda seksüel siklusun proöstrus, östrus, diöstrus ve anöstrus dönemlerinde olduğu belirlenen; ayrıca, yalancı gebelik ve gebelik saptanan köpeklerden, her grupta yedi adet olmak üzere, toplam 42 adet dişi köpek ile boş serum elde etmek üzere iki adet erkek köpek, birer defa kullanıldı (çizelge 2.1).

Ayrıca, altı adet, beş aylık, erkek Yeni Zelanda tavşanı, progesteron hormonuna karşı antikor oluşturmak amacıyla kullanıldı.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan hayvan sayısı ve kullanılma amaçları.

Hayvan materyali	Kullanılan hayvan sayısı ve kullanılma amaçları					
Dişi köpek (n=42)	Proöstrus (n=7)	Östrus (n=7)	Diöstrus (n=7)	Anöstrus (n=7)	Yalancı gebe (n=7)	Gebe (n=7)
	P ₄ değerlerini ölçmek ve karşılaştırmak amacıyla birer uygulama					
Erkek köpek (n=2)	Boş serum (P ₄ = 0ng/ml) elde etmek amacıyla birer uygulama					
Erkek tavşan (n=6)	Antikor elde etmek amacıyla tekrarlayan uygulamalar					

2.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj cihazı (0-6000 devir/dakika Haraeus Labofuge GL, Hannover, Almanya)
- 5-50 µl, 20-100 µl, 100-1000 µl ve 25 µl'lik otomatik pipetler (Transferpette®, Almanya)
- Vorteks karıştırıcı (Falc®, İtalya)
- Horizontal Çalkalayıcı (SL 350, Nüve®, Türkiye)
- Aspirasyon sistemi
- Tek kuyucuklu, ¹²⁵I için Gamma counter set (Mini-Assay 6.20; Mini-Instruments LTD, İngiltere)
- Hassas tartı (Bx320H Shimadzu®)
- Manyetik karıştırıcı (CLP®, Amerika)
- Inkubatör (EN 120, Nüve®)
- Bilgisayar programı (Berthold Immunoprocessing System 1990, Laboratorium Prof. Dr. Berthold version 3.00)

2.1.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Freund's complete adjuvant (Sigma®, F5881)
- Freund's incomplete adjuvant (Sigma®, F5506)
- Progesteron (Sigma®, P0130)
- 11α-OH-Progesteron-Hemisuccinate: BSA (Sigma®, H4508)
- NaH₂PO₄-Sodyum hidrojen fosfat (Sigma®, 9638)
- Na₂HPO₄-Disodyum hidrojen fosfat (Riedel-de Haën®, 04273)
- NaCl-Sodyum klorür (Riedel-de Haën®, 13423)
- Thimerasol (Sigma®, T5125)
- BSA (Sigma®, A7887)
- Metanol (Sigma®, M1775)
- Distile su

2.1.4. Deneylerde Kullanılan Sarf Malzemeleri

- 12 x 75 mm, cam deney tüpleri
- 10 x 75 mm, polisteren tüpler
- Tek kullanımlık sarı otomatik pipet ucu
- Tek kullanımlık mavi otomatik pipet ucu
- 1,5 ve 2 ml'lik eppendorf tüpler
- Balon joje
- Cam ölçü aparatı
- Cam beher 50 ml'lik
- Kan alma tüpü ve sistemi 10 ml'lik (Venoject[®], Belçika)
- Steril tek kullanımlık 5 ve 10 ml'lik enjektörler
- Steril tek kullanımlık tüberkülin enjektörü

2.1.5. Deneylerde Kullanılan Progesteron Radioimmunoassay Kitleri

- RIA progesteron assay system, anti-progesteron ab-coated, 100 test (Immunotech[®], Belçika),
- Veterinary Research progesteron assay system, anti-canine progesterone ab-coated, 100 test (Immunotech[®], Belçika) kitleri,
- Bu çalışma için geliştirilen, standart aralığı genişletilmiş, anti-progesteron antikoruyla kaplı kitler kullanıldı.

2.1.6. Deneylerde Kullanılan ¹²⁵I ile İşaretli Progesteron (Tracer)

Deney tekrarlamaları ve antikor titre tayini amacıyla gereken ¹²⁵I işaretli progesteron (55 ml, <185 kBq) ticari olarak Immunotech[®] (Belçika) firmasından temin edildi. Deneylerde kullanılan ¹²⁵I işaretli progesteron ise ticari olarak temin edilen kitlerin içerisinde kullanıma hazır olarak bulunmaktadır.

2.2. Yöntem

Çalışma süreci Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Klinik ve Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

2.2.1. Hayvan Materyalinin Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan dişi köpekler anamnez, klinik bulgular, vaginal sitoloji, vaginoskopik ve ultrasonografik muayenelerin sonucuna göre gruplandırıldı.

Klinik muayenede dişi köpektaki davranış değişiklikleri ve klinik bulgular değerlendirildi. Davranış değişiklikleri olarak, anamnez ile erkek köpeğe ilgi, erkek köpeği kabul etmesi; klinik bulgular olarak da vulvadan gelen akıntının karakteri, vulvanın büyüklüğü, meme bezlerinin gelişmesi ve süt salgısı dikkate alındı (Çizelge 2.2).

Dişi köpeğin erkek köpeğe ilgisinin olmasına rağmen çiftleşmeyi kabul etmemesi, kanlı vaginal akıntının gelmesi ve vulvanın ödemli olması proöstrus belirtileri; dişinin erkeği kabul etmesi ise östrus bulguları olarak kabul edildi. Erkeğin artık kabul edilmediği, vulvanın küçülmeye başladığı dönem diöstrus; erkeğin kabul edilmediği, vulvanın tamamen küçüldüğü, herhangi bir vaginal akıntının görülmediği evre anöstrus olarak değerlendirildi (Johnston ve ark, 2001).

Vaginoskopik muayene amacıyla, hayvanın büyüklüğüne göre, üç değişik çap ve uzunlukta olan (0,9 cm x 1,3 cm; 1,3 cm x 10 cm; 2 cm x 19 cm), soğuk ışık kaynaklı (Heine, 2.5 v) sabit tipteki vaginoskoplar kullanıldı. Bu değerlendirmede mukoza katlarının görüntüsü, şekli, rengi, kıvamı ve akıntının nitelik ve niceliği dikkate alındı.

Vaginoskopik değerlendirmeler Dreier (1975), ve Lindsay'e (1990) göre yapıldı. Vaginoskopik muayenelerde; mukozanın ödemli, şişkin, nemli, pembe ya da pembe-beyaz renkte görüldüğü dönem proöstrusun erken veya orta dönemi; mukoza kıvrımlarının gerginliğini kaybettiği ve renginin pembe-gri, gri-beyaz veya krem rengi olarak görüldüğü dönem geç proöstrus ve östrus (ovulasyon) evresi olarak değerlendirildi. Mukoza kıvrımlarının dirsekli, keskin ve düzensiz olarak görüldüğü dönem östrusun sona erdiği evre; mukoza kıvrımlarının kaybolmaya başladığı, pembe-kırmızı-solgun görünüm diöstrus evresi; mukoza kıvrımlarının kaybolduğu, renginin kırmızı-pembe veya soluk renkte olduğu dönem ise anöstrus olarak kabul edildi (izelge 2.2).

Vaginal sitoloji için England ve Concannon'ın (2002) bildirdiği şekilde vaginoskop yerleştirildikten sonra birkaç damla fizyolojik tuzlu su ile ıslatılmış pamuklu eküvyonlar kullanılarak, orificium uretra externa'nın cranialindeki bölgede, vagina mukozasından hücre örnekleri alındı. Alınan rnekler eküvyon bastırılmadan, ince bir tabaka oluşturulacak şekilde çevirme hareketi ile lam üzerine aktarıldı. Hazırlanan preparatlar kurutulduktan sonra Papanicolaou (1942) yöntemine göre boyandı ve ışık mikroskobunda 10x40'lık büyütmede değerlendirmeleri yapıldı.

Preparatların değerlendirilmesinde hücrelerin büyüklüğüne, sayısına, şekline, çekirdek yapısına, asidofilik veya bazofilik boyanmalarına, ayrıca eritrosit, nötrofil ve döküntü hücrelerinin varlığına dikkat edildi. Değerlendirmeler esnasında Post, (1985) ve Holst'un (1986) ltleri kullanıldı. Hücreler "bazal, parabazal, intermediyer ve süperfisial" olarak sınıflandırıldı.

Bu kriterlere göre; küçük ve en sağlıklı olan, çekirdekleri silindirik yapıda olup bazal durumda bulunan ve bazofilik boyanan (mavi) hücreler bazal hücreler; yuvarlak-oval şekilli, çekirdeği bazofilik boyanan ve çekirdek sitoplazma oranı çekirdek lehine olan hücreler parabazal hücreler; farklı

büyükliklerde, oval veya yuvarlak yapılı, parabazal hücrelerin çekirdeğinden daha küçük çekirdekli olan ve çekirdek sitoplazma oranı sitoplazma lehine değişen hücreler intermediyer hücreler olarak değerlendirildi. Vaginal sitolojideki en büyük hücreler olan, aşırı köşeli, zayıf boya alan, küçük-piknotik çekirdekli, kısmen veya tamamen kornifiye olmuş hücreler de süperfisiyal hücreler olarak kabul edildi. Bu hücreler dışında bakteriler, nötrofiller, çekirdeksiz döküntü hücreleri, metöstrus hücreleri ve köpük hücreleri de sitolojik değerlendirmede göz önünde tutuldu (Çizelge 2.2).

Vaginanın sitolojik değerlendirmesinde, parabazal ve intermediyer hücrelerin bazen de nötrofillerin görüldüğü ve kirli olduğu dönem erken proöstrus; nötrofillerin görülmediği, intermediyer hücrelerin yerini süperfisiyal hücrelerin aldığı dönem orta proöstrus evresi olarak değerlendirildi. Görüntüdeki hücrelerin %80'den fazlasının süperfisiyal hücreye dönüştüğü dönem ise proöstrusun geç evresi olarak kabul edildi.

Vaginal sitolojide keratinize süperfisiyal hücrelerin %80-100 oranında görüldüğü, nötrofillerin görülmediği ve zeminin temiz olduğu dönem östrus evresi olarak kabul edildi (Linde ve Karlsson, 1984).

Süperfisiyal hücrelerin %20 oranında görüldüğü, intermediyer ve parabazal hücre oranının gittikçe artmaya başladığı, bazen metöstrus hücrelerinin de görüldüğü dönem diöstrus olarak kabul edildi.

Bazal hücrelerin % 95-100 oranında görüldüğü, zeminin temiz olduğu dönem ise anöstrus olarak değerlendirildi (Johnston ve ark., 2001).

Ultrasonografik muayeneler (6,0-8,0 mHz linear prob, PieMedikal, Falco 100) olası uterus patolojileri veya gebelik tanısı amacıyla uygulandı. Östrus dönemi 6-12 hafta önce biten, yuva yapma, kilo artışı, meme bezlerinin gelişmesi ve süt salgısı gibi klinik bulgular gösteren köpeklere

yapılan ultrasonografik muayenede gebelik belirlenemeyen hayvanlar yalancı gebe olarak kabul edildi (Harvey ve ark., 1999; Gobello ve ark., 2001b).

Anamnezinde çiftleştigi belirtilen, yapılan ultrasonografik muayeneler sonucunda, fötüsün üzerinde yapılan ölçümler ile gebeliğin 30-35. günlerinde bulunduğu belirlenen köpekler gebelikle ilgili ölçümler için değerlendirildi. (Kahn, 2004; Alaçam ve ark., 2005).

Çizelge 2.2. Çalışmada, materyalin reproduktif durumunun değerlendirilmesinde kullanılan vaginoskopi, vaginal sitoloji, klinik muayene ve ultrasonografi kriterleri.

Yapılan değerlendirmeler		Östrus siklusun dönemleri				
		Proöstrus	Östrus	Diöstrus		Anöstrus
				Erken	Geç	
Sitolojik Değerlendirme	Eritrosit	++	+	-	-	-
	Nötrofil	+/-	-	++	+	+/-
	Ker. süperfisiyal (%)	10	90	30	0	0
	Süperfisiyal (%)	30	8	20	10	2
	İntermediyer (%)	50	2	20	30	3
	Bazal/Parabazal (%)	10	0	30	60	95
Vaginoskopik Değerlendirme		Mukoza ödemli, yuvarlak ve pembe renkli	Mukoza dikenli, keskin, düzensiz görünüm	Mukoza kısmen düzleşmiş pembe-kırmızı-solgun renkli		Mukoza düzleşmiş, kırmızı-pembe-solgun renkli
Klinik Değerlendirme		Kanlı akıntı, ödemli vulva, erkeğe ilgi	Erkeği kabul etme	Erkeği reddetme, meme bezlerinin gelişmesi		Erkeği reddetme, reproduktif etkinlik (-)
Ultrasonografik Değerlendirme		Anamnez		Bulgular		Sonuç
		Yuva yapma, kilo artışı, meme bezlerinin gelişmesi ve süt salgısı		Yavruya dair bulgu veya patolojik bir durum yok		Yalancı gebe
		Koitus (+)		Konseptus ve hareketleri		Gebe

Çalışmada, sitolojik, vaginoskopik, ultrasonografik ve klinik parametrelerden elde edilen veriler sadece kan serum örneklerindeki progesteron düzeylerinin ölçülmesinde yararlanılacak hayvanların gruplandırılmasında kullanıldıkları için çalışmanın bulguları arasında değerlendirilmediler.

2.2.2. Kan Serum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Yapılan muayeneler sonucu çalışma materyali olarak kullanılmaya uygun bulunan ve gruplandırılan köpeklerin Vena cephalica antebrachi'sinden periferik kan örnekleri toplandı. Toplanan kanlar bir gece +4°C pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra 3000 devir/dakikada, 15 dakika süre ile santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve ölçümler yapılmaya kadar -18°C'de saklandı.

Ayrıca hazırlanacak özel kitin standartlarını oluşturmak amacıyla, iki erkek köpekten, yukarıdaki yöntem kullanılarak serum alındı. Erkek köpek serumunda progesteron düzeyi yaklaşık olarak 0 ng/ml (boş serum) olarak kabul edildi.

2.2.3. Tavşanlarda İmmünizasyon Yöntemi

Deney tavşanlarına enjeksiyonlar iki hafta aralıklarla deri altı olarak yapıldı. Hazırlanan antijen, tavşanların tüyleri traş edilmiş sırt kısmında, 15-18 bölgeden enjekte edildi.

İmmünizasyon çalışmaları için öncelikle 14,6 mg antijen (11 α -OH-Progesteron-Hemisuccinate: BSA) 15,5 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS: 1,27 g NaH₂PO₄; 12,1 g Na₂HPO₄; 8,5 g NaCl; 0,2 g Thimerasol; 1 L distile su; pH: 7,2) içinde eritildi ve 2 ml'lik eppendorf tüpler vasıtasıyla porsiyonlara ayrılıp -18°C'de saklandı.

Enjeksiyonlarda kullanılacak antijen, birinci enjeksiyon için 250 µg/tavşan diğer enjeksiyonlar için 300 µg/tavşan olacak şekilde hesaplandı. Enjeksiyonlarda kullanılan antijen 1:1 oranında adjuvant ile karıştırılıp emülsiyon haline getirildikten sonra tavşanlara enjekte edildi. Adjuvant olarak birinci enjeksiyon için Freund's Complete Adjuvantı (FCA) diğer enjeksiyonlar için Freund's Incomplete Adjuvant'ı (FIA) kullanıldı. Emülsiyon her enjeksiyon öncesinde taze olarak hazırlandı. Antijen-adjuvant emülsiyonunu hazırlamak için daha önce porsiyonlara ayrılan antijenden steril bir cam tüp içerisine konuldu. Bu işlemin ardından, aynı miktardaki adjuvant vorteks karıştırıcıya konulan antijenin içine damlatılarak karıştırıldı. Karıştırma işlemine beyaz renkte bir emülsiyon elde edilinceye kadar devam edildi. Elde edilen bu emülsiyon tüberkülin enjektörlerine çekilerek, bir bölgeye en fazla 0,2 ml olacak şekilde, tavşanlara enjekte edildi (çizelge 2.3).

Üçüncü immunizasyon enjeksiyonundan sonra tavşanların Vena auricularis'inden kan alındı. İşlem öncesinde tavşanın kulağı ksilol ile silindi ve 18 G'luk steril kanül ile kanlar toplandı. Toplanan kanlar bir gece +4°C pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra 3000 devir/dakikada, 15 dakika santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Elde edilen bu serumlardan antikor titre tayini yapıldı.

Çizelge 2.3. Tavşanlarda immunizasyon yöntemi

Enjeksiyon ve kan alma haftaları	Yapılan işlem	Enjeksiyon miktarı (DA)
1. hafta	İmmünizasyon (Aj + FCA)	250 µg/tavşan
3. hafta	İmmünizasyon (Aj + FIA)	300 µg/tavşan
5. hafta	İmmünizasyon (Aj + FIA)	300 µg/tavşan
6. hafta	Kan alınması ve titre ölçümü	
7. hafta	İmmünizasyon (Aj + FIA)	300 µg/tavşan
8. hafta	Kan alınması ve titre ölçümü	
9. hafta	İmmünizasyon (Aj + FIA)	300 µg/tavşan
10. hafta	Kan alınması ve titre ölçümü	
11. hafta	İmmünizasyon (Aj + FIA)	300 µg/tavşan
12. hafta	Kan alınması ve titre ölçümü	
13. hafta	İmmünizasyon (Aj + FIA)	300 µg/tavşan
14. hafta	Kan alınması ve titre ölçümü	
15. hafta	İmmünizasyon (Aj + FIA)	300 µg/tavşan
16. hafta	Kan alınması ve titre ölçümü	

Aj:Antijen, FCA: Freund's Complete Adjuvant, FIA: Freund's Incomplete Adjuvant

2.2.4. Antikor Titre Tayin Yöntemi

İmmünizasyonlar sonucunda tavşanlarda oluşan antikor titresinin tayini Güven'in (1988) bildirdiği yöntemle yapıldı.

Tavşanlardan elde edilen serumların dilüsyonları her tavşan için ayrı ayrı çift çalışmak suretiyle cam tüplere yedi dilüsyon olacak şekilde yapıldı. Öncelikle birinci tüplere 2 ml diğer tüplere 1 ml PBS konuldu. Tavşanlardan alınan serumlar ayrı ayrı tüplere 20 µl/tüp konuldu ve vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. Böylelikle, ilk dilüsyon 1:100'lük olarak hazırlandı. Bu dilüsyondan 1 ml alındı ve ikinci tüpe konuldu ve vorteks karıştırıcıda karıştırıldı; ikinci tüpten 1 ml alınıp üçüncü tüpe konuldu ve vorteks karıştırıcıda karıştırıldı; üçüncü tüpten 1 ml alınıp dördüncü tüpe konuldu ve vorteks karıştırıcıda karıştırıldı. Bu şekilde dilüsyonlara yedinci tüpe kadar devam edildi. İşlem sonunda birinci tüpte 1:100, %1'lik dilüsyon; ikinci tüpte 1:200, %0.5'lik dilüsyon; üçüncü tüpte 1:400, %0.25'lik dilüsyon; dördüncü tüpte 1:800,

%0.125'lik dilüsyon; beşinci tüpte 1:1600, %0.0625'lik dilüsyon; altıncı tüpte 1:3200, %0.03122'lik dilüsyon ve yedinci tüpte 1:6400, %0.01562'lik dilüsyon elde edildi.

Dilüsyonlar tamamlandıktan sonra her bir tavşan için ayrı ayrı işaretlenen polisteren test tüplerine 200 µl hazırlanan antiserum dilüsyonlarından konuldu. Bu işlemi takiben tüpler 3 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüplerin içeriği aspire edildi. Tüpler kuruduktan sonra bütün tüplere 100 µl ¹²⁵I-progesteron konuldu ve tüpler oda ısısında 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüplerdeki içerik aspire edildi ve gama sayacında okundu. Elde edilen sonuçlar bilgisayar programına girildi ve değerlendirildi.

2.2.5. Antikor Kaplama Yöntemleri

Türkiye Atom Enerjisi Kurumundan “7α-OH-progesteron-hemisuccinate: BSA”ya ve Münih Maximillian Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Reprodüksiyon hastalıkları Kliniğinden temin edilen “6β-OH-progesteron-hemisuccinate: BSA”ya karşı üretilmiş antikorlar ile polisteren tüpler kaplanmaya çalışıldı.

Polisteren tüplerin kaplanması işlemi Güven'in (1988) bildirdiği yönteme göre yapıldı.

- Antikor 1:500 oranında PBS ile dilüe edildi,
- Bu solüsyondan 100 µl/tüp pipetlendi,
- +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı,
- Tüplerdeki içerik aspire edildi,
- Tüm tüplere %1'lik BSA dan 300 µl konuldu,
- Tüpler 40 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı,
- Tüplerdeki içerik aspire edildi,
- Tüm tüpler distile su ile beş defa yıkandı,

- Tüplere 20 µl progesteron standardı ve 200 µl ¹²⁵I-progesteron konuldu,
- Tüpler 37°C'de iki saat inkubasyona bırakıldı,
- Tüplerdeki içerik aspire edildi,
- Gama sayacında 50 saniye süre ile ölçüldü.

Ancak bu yöntemden istenilen sonuç alınamayınca, antikor:PBS dilüsyonları, bu dilüsyonların tüplere konulan miktarları, inkubasyon süreleri ve kullanılan ¹²⁵I-progesteron miktarları değiştirilerek altı farklı yöntem daha denendi.

2.2.6. Progesteron Hormonu Ölçümleri

Çalışmada progesteron ölçümleri RIA yöntemi ile, üç farklı kit kullanılarak yapıldı. Anılan kitler; beşeri RIA progesteron kiti (BK), köpek RIA progesteron kiti (KK) ve bu çalışma için geliştirilen, standart aralığı genişletilmiş, anti-progesteron antikoruyla kaplı kitler (SGK) olarak gereç bölümünde açıklanmaktadır.

Beşeri ve köpek RIA kitleri ile ölçümler üretici firmanın belirtmiş olduğu yöntemlere göre yapıldı.

2.2.6.1. Standart Aralığı Genişletilen RIA Kiti ile Ölçümler

Standartın hazırlanışı: Bir mg saf progesteron (Sigma®, P0130) hassas terazide cam ölçüm aparatında tartıldı ve balon joje içerisinde 10 ml metanol kullanılarak çözündürüldü. Metanolun ısıya bağlı olarak hacminin değişmesi özelliğinden dolayı standartlar soğuk su banyosu içerisinde hazırlandı. Böylece, birinci stok solüsyonu 1 mg P₄/10 ml metanol olarak hazırlandı (1000 µg P₄/10 ml içinde). Bu stok solüsyonundan 100 µl alındı ve bir balon

joje içinde metanol ile 10 ml'ye tamamlandı. İkinci stok solüsyonu 10 µg P₄/10 ml metanol (10.000 ng P₄/10 ml metanol) olarak hazırlandı. Standart solüsyonlar bu ikinci stok solüsyonundan yapıldı.

- Bu stok solüsyondan 200 µl alındı (200 ng/200 µl) ve cam bir şişeye aktarıldı ve metanolu uçuruldu. Metanol tamamen uçtuktan sonra cam tüpün dibinde 200 ng progesteron kaldı.
- Bu tüpe 2 ml progesteron içermeyen serum (sıfır serum) konuldu ve vorteks karıştırıcıdan geçirilerek progesteronun sıfır serum ile iyice karışması sağlandı (200 ng/2 ml).
- Ardından 8 adet cam tüp alındı, numaralandı, sadece ikinci tüpe 0,2 ml sıfır serum ve geri kalan tüplere 0,5'er ml sıfır serum konuldu.
- 200 ng/2 ml olan solüsyondan 1 ml alınıp (100 ng/ml) 1 numaralı tüpe konuldu ve vorteks karıştırıcıdan geçirildi. Bu birinci standart noktası oldu. 200 ng/2 ml'lik solüsyondan 0,8 ml alınıp ikinci tüpe konuldu ve vorteks karıştırıcıdan geçirildi (80 ng/ml). İkinci tüpten 0,5 ml alınıp üçüncü tüpe konuldu ve vorteks karıştırıcıdan geçirildi (40 ng/ml). Bu şekildeki 1:1 dilüsyonlar sonucunda dördüncü tüpte 20 ng/ml, beşinci tüpte 10 ng/ml, altıncı tüpte 5 ng/ml, yedinci tüpte 2,5 ng/ml ve son olarak sekizinci tüpte 0 ng/ml progesteron konsantrasyonu elde edildi.

Standartlar oluşturulduktan sonra, uygulanan yedi farklı modifiye yönteme rağmen, antikor kaplama işleminde yeterli başarı sağlanamaması üzerine ticari olarak satın alınan RIA progesteron kiti içindeki anti-progesteron antikor ile kaplı olan tüpler, hazırlanan standart noktalar için, 100 ng, 80 ng, 40 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng ve 0 ng olacak şekilde, numaralandırılarak kullanıldılar. Reaksiyonun diğer aşamaları ise aşağıdaki şekilde yürütüldü;

- Antikor kaplı tüplerden iki tanesi toplam radyoaktivitenin belirlenmesi için (Toplam cpm), 16 tanesi ise standart tüpler için (çift standart çalışıldı) kullanıldı,
- Standart noktalar için antikor kaplı tüplerin her birine 50 µl hazırlanan standartlardan konuldu,

- Diğer tüplere 50 µl serum örneklerinden konuldu,
- Standart ve serum örneklerini tüplere koyma işlemi bittikten sonra tüm tüplere (Toplam cpm tüpleri dahil) 500 µl tracer konuldu,
- Tüm tüpler vorteks karıştırıcıdan geçirilerek iyice karıştırıldı,
- Oda ısında (18-25°C) 1 saat horizontal çalkalayıcıda 250 rpm'de inkubasyona bırakıldı,
- Toplam cpm tüpleri dışındaki tüpler, içerik kalmayacak şekilde aspire edildi,
- Her tüp gama sayacında 50 saniye ölçüldü ve çıkan cpm değerleri not edildi,
- Son olarak, cpm değerleri bilgisayarda Berthold version 3.00 programına girildi ve sonuçlar ng/ml cinsine çevrildi.

Çizelge 2.4. Standard aralığı genişletilen RIA kiti ile kan serumundan progesteron ölçüm süreci

Tüp no	Tanımlama	Standart (µl)	Örnek (µl)	Tracer (µl)
1	Toplam cpm	0	0	500
2		0	0	500
3	Standart 0.0 ng/ml	50	0	500
4		50	0	500
5	Standart 2.5 ng/ml	50	0	500
6		50	0	500
7	Standart 5.0 ng/ml	50	0	500
8		50	0	500
9	Standart 10.0 ng/ml	50	0	500
10		50	0	500
11	Standart 20.0 ng/ml	50	0	500
12		50	0	500
13	Standart 40.0 ng/ml	50	0	500
14		50	0	500
15	Standart 80.0 ng/ml	50	0	500
16		50	0	500
17	Standart 100.0 ng/ml	50	0	500
18		50	0	500
19	Örnek 1	0	50	500
20	Örnek 2	0	50	500
21	Örnek 3	0	50	500
22	Örnek 4	0	50	500
Örnek sayısı kadar devam edildi				
1 saat oda ısısında inkübe edildi				
İlk iki tüp dışındaki tüpler aspire edildi				
Gama sayacında 50 saniye süreyle ölçüldü				

2.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Deneyler sonucunda cpm olarak elde edilen radyoaktivite verileri, "Berthold Immunoprocessing System 1990, Laboratorium Prof. Dr. Berthold version 3.00" bilgisayar programına girilerek ng/ml türünden verilere dönüştürüldü.

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel hesaplaması SPSS® (SPSS, 14.0) programı kullanılarak yapıldı. Verilerin ortalama değer ve standart sapmalarının hesaplanmasında "Descriptive Statistics" yöntemi kullanıldı. Gruplardan elde edilen sayısal verilerin karşılaştırılması "Non Parametrik" testler kullanılarak yapıldı. Birbirinden bağımsız ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında "Kruskal-Wallis H" testinden, birbirinden bağımsız örneklerin değerlendirilmesinde ise "One Way Anova" testinden yararlanıldı. Ayrıca, çalışmada kullanılan gruplar ve kitler arasındaki ilişkinin önemi "Bivariate Correlation" testi ile belirlendi ve Correlation Coefficient hesaplaması "pearson"a göre yapıldı (Özdamar, 2003).

İstatistiksel değerlendirmelerde $p < 0,001$ değeri önemli ve $p > 0,05$ değeri önemsiz olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Tavşanlarda İmmunizasyon Bulguları

Uygulanan immunizasyon enjeksiyonlarından sonra enjeksiyon bölgelerinde sıklıkla granulom ve nadiren de aseptik deri lezyonları şekillendiği belirlenmiştir.

İmmunizasyonlar sırasında tavşan kan serumundan antikor titre tayini için hazırlanan dilüsyonlardan, ¹²⁵I-progesteron ile en az %50 oranında bağlanma veren dilüsyonun, yeterli antikor titresinin elde edildiği, ideal dilüsyon olarak kabul edilmesi planlanmıştır. Ancak, üçüncü immunizasyon enjeksiyonundan sonra iki hafta aralıklarla alınan kanlarda bu oranda bir bağlanma tespit edilememiştir. Dolayısıyla, yapılan immunizasyonlar sonucunda “11 α -OH-Progesteron-Hemisuccinate:BSA”ya karşı istenilen duyarlılıkta, karakterde, özgüllükte ve affinite de bir antikor üretilmediği görülmüştür.

3.2. Polisteren Tüpleri Antikor ile Kaplama Bulguları

Yapılan immunizasyonlar sonucunda, istenilen duyarlılıkta, karakterde, özgüllükte ve affinite de antikor elde edilemediği için, Türkiye Atom Enerjisi kurumundan ve Münih Maximillian Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Kliniğinden temin edilen, saflaştırılmış ve çapraz reaksiyon oranları yapılmış antikorlar ile polisteren tüplerin kaplanma aşaması denenmiştir.

Bu aşamada da toplam radyoaktivitenin %50'sini veren yöntemin ideal olarak kabul edilmesi planlanmıştır. Ancak, denenilen yöntemlere rağmen

polisteren tüplerin dışarıdan temin edilen progesterona karşı üretilmiş antikorlar ile kaplanması sağlanamamıştır.

3.3. Progesteron Ölçüm Bulguları

Köpeklerden toplanan kan serumu örnekleri; beşeri progesteron RIA kiti, köpek progesteron RIA kiti ve standart aralığı genişletilmiş RIA kiti kullanılarak ölçülmüş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

3.3.1. Beşeri Progesteron Radioimmunoassay Kiti Ölçüm Sonuçları

Beşeri hekimlikte kullanılmak amacıyla üretilmiş olan bu kit ile yapılan radioimmunoassay ölçümleri sonucunda; proöstrus döneminde progesteronun en düşük düzeyi 0,03 ng/ml, en yüksek düzeyi 1,92 ng/ml ve ortalama düzeyi ise 0,83 ng/ml olduğu bulunmuştur. Östrus evresinde; progesteronun en düşük ve en yüksek düzeyi 3,01 ng/ml ve 8,86 ng/ml, ortalama düzeyi ise 4,91 ng/ml olarak belirlenmiştir. Diöstrus döneminde, progesteronun en düşük düzeyi 10,63 ng/ml, en yüksek düzeyi 47,00 ng/ml ve ortalama düzeyi 29,71 ng/ml olarak bulunmuştur. Anöstrus döneminde ise progesteronun en düşük düzeyi 0,02 ng/ml, en yüksek düzeyi 0,92 ng/ml ve ortalama düzeyi 0,37 ng/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Yalancı gebelikleri klinik yöntemlerle belirlenen köpekler için progesteronun en düşük düzeyi 1,01 ng/ml, en yüksek düzeyi 5,42 ng/ml ve ortalama düzeyi 3,01 ng/ml olarak bulunmuştur. Anamnez ve ultrasonografik muayeneler ile gebe olduğu belirlenen köpeklerde en düşük ve en yüksek progesteron düzeyi sırasıyla 15,56 ng/ml, 31,37 ng/ml ve ortalama progesteron düzeyi de 22,71 ng/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Beşeri RIA kiti ile belirlenen; gruplara göre en küçük, en büyük ve ortalama progesteron düzeyleri

Gruplar	n	En düşük P ₄ değeri (ng/ml)	En yüksek P ₄ değeri (ng/ml)	X±S (ng/ml)
Proöstrus	7	0,03	1,92	0,83 ± 0,61
Östrus	7	3,01	8,86	4,91 ± 2,02
Diöstrus	7	10,63	47,00	29,71 ± 16,37
Anöstrus	7	0,02	0,92	0,37 ± 0,39
Yalancı gebe	7	1,01	5,42	3,01 ± 1,70
Gebe	7	15,56	31,37	22,71 ± 5,58

Çizelge 3.2. Beşeri progesteron RIA kiti ile yapılan ölçümlerin bireysel sonuçları

Köpek no	Proöstrus P ₄ düzeyi (ng/ml)	Köpek no	Anöstrus P ₄ düzeyi (ng/ml)
1	0,90	22	0,09
2	1,14	23	0,02
3	0,03	24	0,82
4	0,49	25	0,05
5	0,99	26	0,92
6	1,92	27	0,11
7	0,36	28	0,64
	Östrus P ₄ düzeyi (ng/ml)		Yalancı gebelik P ₄ düzeyi (ng/ml)
8	4,76	29	3,98
9	4,03	30	1,54
10	3,28	31	3,76
11	4,34	32	1,31
12	8,86	33	1,01
13	3,01	34	4,07
14	6,15	35	5,42
	Diöstrus P ₄ düzeyi (ng/ml)		Gebelik P ₄ düzeyi (ng/ml)
15	45,28	36	15,56
16	38,84	37	26,24
17	12,09	38	21,14
18	10,63	39	16,40
19	47,00	40	23,81
20	14,91	41	24,09
21	39,24	42	31,37

3.3.2. Köpek Progesteron Radioimmunoassay Kiti Ölçüm Sonuçları

Köpek progesteron radioimmunoassay kiti ile kan serumundan yapılan ölçümler sonucunda; proöstrus döneminde, progesteronun en düşük düzeyi 0,22 ng/ml, en yüksek düzeyi 1,03 ng/ml ve ortalama düzeyi ise 0,65 ng/ml olarak bulunmuştur. Östrus evresinde; progesteronun en düşük ve en yüksek düzeyi 3,96 ng/ml ve 12,57 ng/ml, ortalama düzeyi ise 6,72 ng/ml olarak belirlenmiştir. Diöstrus döneminde, progesteronun en düşük düzeyinin 13,19 ng/ml, en yüksek düzeyinin 47,43 ng/ml ve ortalama düzeyinin 30,70 ng/ml olduğu belirlenmiştir. Anöstrus döneminde ise progesteronun en düşük düzeyi 0,01 ng/ml, en yüksek düzeyi 0,38 ng/ml ve ortalama düzeyi 0,15 ng/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.3).

Yalancı gebe bulunan köpekler için progesteronun en düşük düzeyi 0,93 ng/ml, en yüksek düzeyi 8,78 ng/ml ve ortalama düzeyi 3,96 ng/ml olarak bulunmuştur. Gebe köpeklerde ise, en düşük ve en yüksek progesteron düzeyi sırasıyla 16,82 ng/ml, 35,50 ng/ml ve ortalama progesteron düzeyi de 25,20 ng/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Köpek RIA kiti ile belirlenen; gruplara göre en küçük, en büyük ve ortalama progesteron düzeyleri

Gruplar	n	En düşük P ₄ değeri (ng/ml)	En yüksek P ₄ değeri (ng/ml)	X±S (ng/ml)
Proöstrus	7	0,22	1,03	0,65 ± 0,32
Östrus	7	3,96	12,57	6,72 ± 3,32
Diöstrus	7	13,19	47,43	30,70 ± 14,34
Anöstrus	7	0,01	0,38	0,15 ± 0,15
Yalancı gebe	7	0,93	8,78	3,96 ± 2,87
Gebe	7	16,82	35,50	25,20 ± 6,51

Çizelge 3.4. Köpek progesteron RIA kiti ile yapılan ölçümlerin bireysel sonuçları

Köpek no	Proöstrus P₄ düzeyi (ng/ml)	Köpek no	Anöstrus P₄ düzeyi (ng/ml)
1	0,75	22	0,3
2	0,98	23	0,15
3	0,22	24	0,01
4	0,3	25	0,38
5	0,83	26	0,01
6	1,03	27	0,22
7	0,46	28	0,01
	Östrus P₄ düzeyi (ng/ml)		Yalancı gebelik P₄ düzeyi (ng/ml)
8	5,18	29	4,28
9	4,43	30	1,34
10	4,58	31	4,21
11	6,16	32	1,84
12	12,57	33	0,93
13	3,96	34	6,37
14	10,19	35	8,78
	Diöstrus P₄ düzeyi (ng/ml)		Gebelik P₄ düzeyi (ng/ml)
15	42,31	36	16,82
16	40,17	37	35,50
17	13,19	38	24,65
18	15,78	39	18,66
19	47,43	40	25,99
20	18,36	41	23,90
21	37,68	42	30,91

3.3.3. Standart Aralığı Genişletilmiş RIA Kiti Ölçüm Sonuçları

Köpek progesteron radioimmunoassay kiti ile yapılan kan serumu ölçümleri sonucunda; proöstrus döneminde, progesteronun en düşük ve en yüksek düzeylerinin 0,10 ng/ml ile 1,17 ng/ml arasında değiştiği ve ortalama düzeyinin ise 0,51 olduğu bulunmuştur. Östrus evresinde; progesteronun en düşük ve en yüksek düzeyi 4,18 ng/ml ve 12,72 ng/ml, ortalama düzeyi ise 7,28 ng/ml olarak belirlenmiştir. Diöstrus döneminde; progesteronun en düşük, en yüksek ve ortalama düzeyleri sırasıyla 16,04 ng/ml, 61,80 ng/ml ve 40,78 ng/ml olarak bulunmuştur. Anöstrus döneminde ise progesteronun en düşük düzeyi 0,01 ng/ml, en yüksek düzeyi 0,80 ng/ml ve ortalama düzeyi 0,31 ng/ml olarak ölçülmüştür (Çizelge 3.5).

Yalancı gebe oldukları saptanan köpeklerde; progesteronun en düşük düzeyi 1,34 ng/ml, en yüksek düzeyi 9,32 ng/ml ve ortalama düzeyi 4,93 ng/ml olarak bulunmuştur. Gebe köpeklerde ise, en düşük ve en yüksek progesteron düzeyi sırasıyla 15,90 ng/ml, 38,29 ng/ml ve ortalama progesteron düzeyi de 28,41 ng/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Standart aralığı genişletilmiş RIA kiti ile belirlenen progesteronun en küçük, en büyük ve ortalama düzeyleri.

Gruplar	n	En düşük P ₄ değeri (ng/ml)	En yüksek P ₄ değeri (ng/ml)	X ± S (ng/ml)
Proöstrus	7	0,10	1,17	0,51 ± 0,43
Östrus	7	4,18	12,72	7,28 ± 3,45
Diöstrus	7	16,04	61,80	40,78 ± 20,96
Anöstrus	7	0,01	0,80	0,31 ± 0,32
Yalancı gebe	7	1,34	9,32	4,93 ± 3,17
Gebe	7	15,90	38,29	28,41 ± 8,35

Çizelge 3.6. Standart aralığı genişletilmiş RIA kiti ile yapılan ölçümlerin sonuçları.

Köpek no	Proöstrus P₄ düzeyi (ng/ml)	Köpek no	Anöstrus P₄ düzeyi (ng/ml)
1	1,17	22	0,50
2	1,03	23	0,01
3	0,2	24	0,3
4	0,1	25	0,01
5	0,52	26	0,01
6	0,47	27	0,60
7	0,12	28	0,8
	Östrus P₄ düzeyi (ng/ml)		Yalancı gebelik P₄ düzeyi (ng/ml)
8	4,18	29	4,85
9	6,01	30	1,34
10	6,47	31	5,14
11	5,24	32	2,17
12	12,72	33	2,78
13	4,69	34	8,95
14	11,68	35	9,32
	Diöstrus P₄ düzeyi (ng/ml)		Gebelik P₄ düzeyi (ng/ml)
15	61,80	36	15,90
16	46,20	37	37,46
17	16,04	38	27,91
18	21,42	39	23,23
19	61,05	40	33,33
20	19,93	41	22,76
21	59,03	42	38,29

3.3.4. Farklı Progesteron Ölçüm Kitleriyle Elde Edilen Bulguların Karşılaştırılması

Beşeri kit, köpek kiti ve standart aralığı genişletilmiş kit ile yapılan ölçümler sonucunda elde edilen progesteron düzeyleri arasında istatistiksel yönden bir fark olmadığı ($p>0,05$) ortaya konulmuştur (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Çalışmada kullanılan kitlerden elde edilen, gruplara ait sonuçların karşılaştırılması.

GRUPLAR	BK X ± S (ng/ml)	KK X ± S (ng/ml)	SGK X ± S (ng/ml)	Önem Değeri
Proöstrus	0,83 ± 0,61	0,65 ± 0,32	0,51 ± 0,43	$p>0,05$
Östrus	4,9 ± 2,02	6,72 ± 3,32	7,28 ± 3,45	$p>0,05$
Diöstrus	28,71 ± 16,37	30,70 ± 14,34	40,78 ± 20,96	$p>0,05$
Anöstrus	0,37 ± 0,39	0,15 ± 0,15	0,31 ± 0,32	$p>0,05$
Yalancı gebe	3,01 ± 1,70	3,96 ± 2,87	4,93 ± 3,17	$p>0,05$
Gebe	22,71 ± 5,58	25,20 ± 6,51	28,41 ± 8,35	$p>0,05$

BK: beşeri kit ile yapılan ölçüm sonuçları. KK: köpek kiti ile yapılan ölçüm sonuçları. SGK: standartı genişletilmiş kit ile yapılan ölçüm sonuçları.

Beşeri kit ölçüm sonuçları (BK), köpek kiti ölçüm sonuçları (KK) ve standart aralığı genişletilmiş kit ölçüm sonuçları (SGK) arasında yapılan istatistiksel değerlendirmelerde, elde edilen veriler arasındaki ilişkinin öneminin hesaplanmasında, bütün kitlerin ölçüm sonuçları arasında $r=0,994$ ve $r=0,998$ oranında pozitif bir korelasyon olduğu ve bu korelasyonun $p<0,001$ ile istatistiksel yönden önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Kitlerle yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyon katsayısı (r) ve önemi (p).

Kitler	BK	KK	SGK
BK	-	$r= 0,998$ $P<0,001$	$r= 0,998$ $P<0,001$
KK	$r= 0,998$ $P<0,001$	-	$r= 0,994$ $P<0,001$
SGK	$r= 0,998$ $P<0,001$	$r= 0,994$ $P<0,001$	-

BK: Beşeri kit ile yapılan ölçüm sonuçları. KK: Köpek kiti ile yapılan ölçüm sonuçları. SGK: Standartı genişletilmiş kit ile yapılan ölçüm sonuçları.

Progesteron ölçümü için kullanılan kitlerden, östrus siklusunun ayrı dönemlerinde elde edilen sonuçlar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel yönden herhangi bir fark olmadığı ($p>0,05$) bulunmuştur (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan kitlerden elde edilen, östrus siklusunun farklı dönemlerine ait progesteron değerlerinin karşılaştırılması.

Siklus Dönemi	Kullanılan Kit	$X \pm S$ (ng/ml)	Varyans Analizi
Proöstrus	Beşeri Kit	$0,83 \pm 0,61$	F=0,41 $p>0,05$
	Köpek Kiti	$0,65 \pm 0,32$	
	Standardı Gen. Kit	$0,51 \pm 0,43$	
Östrus	Beşeri Kit	$4,9 \pm 2,02$	F=0,41 $p>0,05$
	Köpek Kiti	$6,72 \pm 3,32$	
	Standardı. Gen. Kit	$7,28 \pm 3,45$	
Diöstrus	Beşeri Kit	$28,71 \pm 16,37$	F=0,41 $p>0,05$
	Köpek Kiti	$30,70 \pm 14,34$	
	Standardı. Gen. Kit	$40,78 \pm 20,96$	
Anöstrus	Beşeri Kit	$0,37 \pm 0,39$	F=0,41 $p>0,05$
	Köpek Kiti	$0,15 \pm 0,15$	
	Standardı. Gen. Kit	$0,31 \pm 0,32$	

4. TARTIŞMA

Radioimmunoassay'in prensibinde, birçok immunolojik ölçüm yönteminde olduğu gibi, antikor-antijen reaksiyonu yatmaktadır.

Antikor; belirli antijenlere karşı vücudun, immun sistemin humoral mekanizması ile, verdiği cevap sonucu oluşturduğu bir proteindir. İmmunolojik deneylerin de içinde olduğu birçok testte antikor olarak poliklonal antikor (pAn) kullanılmaktadır. Poliklonal antikor, immunojen tek bir antijen bile olsa, onu tanımak için birden fazla epitopunu kullanan ve B lenfositlerin farklı aileleri tarafından üretilen bir antikor türüdür. Dolayısıyla, pAn üretimi vücudun çok sayıda klonu tarafından gerçekleştirileceği için zor bir süreç olarak kabul edilir (Clark ve ark., 2002).

İmmunizasyon çalışmaları için değişik deney hayvanları kullanılabilir. Ancak, pAn elde etmek amacıyla bakım ve besleme koşullarının kolaylıkla uygulanabilmesi, işlemlerin rahatlıkla yapılabilmesi, yüksek titrede ve affinitede antikor üretebilmeleri nedeni ile tavşanlar tercih edilmektedir (Clark ve ark., 2002).

Hazırlanan immunojen/adjuvant formülasyonun; emülsiyon, liposom veya immunostimülatör kompleks (iscm) yapıda olması, uygulama yeri, uygulama miktarı immun yanıtı etkilemektedir. İmmunojenin moleküler büyüklüğü de verilen immun yanıtta önemli rol oynamaktadır. Büyük yapılı olan immunojenler daha iyi yanıt vermektedir. (Skelley ve ark., 1973; Clark ve ark., 2002). Ayrıca, immunojen/adjuvant karışımı mümkün olduğunca aseptik koşullarda hazırlanmalıdır. İmmunojen/adjuvant kompleksinin hazırlanması için en uygun adjuvant olarak Freund's complete ve incomplete adjuvantı (FCA ve FIA) önerilmektedir. Birçok çalışmada adjuvant olarak FCA ve FIA kullanılmıştır. Bu adjuvant diğerlerine göre daha yüksek düzeyde immun yanıt verilmesini sağlamaktadır. Ancak, enjeksiyonlar esnasında tavşanlarda

ağrıya ve strese yol açmakta ayrıca enjeksiyon yerlerinde lezyonlara, granülom oluşumlarına ve nadiren de aseptik yaralara neden olmaktadır (Yalow ve Gross, 1976; Bollen ve ark, 1996; Vakkuri ve ark., 2000; Stills, 2005). Hazırlanan emülsiyon tavşanlara, bir bölgeye en fazla 0,25 ml olacak şekilde deri altı, deri içi veya kas içi yollarla uygulanabilir. Ancak adjuvant olarak FCA ve FIA seçildiğinde enjeksiyonlar için en uygun yol deri altı olarak bildirilmektedir (Clark ve ark., 2002; Rajput ve ark., 2007).

Sunulan doktora çalışmasında söz konusu literatürlere uyularak, enjeksiyonlar sonucunda yüksek düzeyde immun yanıt alabilmek amacıyla adjuvant olarak FCA ve FIA kullanılmış ve immunojen/adjuvant emülsiyonları steril ortamda hazırlanmıştır.

Hoffmann (1977), “11 α -OH-Progesteron-Hemisuccinate”ı BSA ile formüle ederek steroid hormonların saptanmasında ve RIA yöntemini geliştirmede kullanmıştır. Bu çalışmada da, sunulan literatür dikkate alınarak “11 α -OH-Progesteron-Hemisuccinate: BSA” immunojen olarak kullanılmıştır.

Tavşanlardan kan alınması işlemi de antikor elde etme sürecini etkilemektedir. Kulağın veya kulak damarının kesilerek kan alınması, nekrozlara, yara bölgesinde kabuklanmaya, enfeksiyona ve aşırı strese yol açacağı için önerilmemektedir. Bu yöntem yerine Vena auricularis’in büyüklüğüne uygun steril bir kanül kullanılarak kan alınmalıdır. Herhangi bir enfeksiyöz etken ve stres immun cevabı baskılayarak üretilen antikorun miktarını veya kalitesini azaltabilir hatta antikor üretimini durdurabilir (Clark ve ark., 2002). Yüksek titre ve affinitede bir pAn üretmek için tüm şartlar sağlansa bile, antikor üretme sürecinde başarı sağlanması her zaman mümkün olamamaktadır (Skelley ve ark., 1973; Wood ve Sokolowski, 1981; Clark ve ark., 2002).

Sunulan çalışmada da söz konusu literatürlere dayanılarak enjeksiyonlar sırt bölgesinden birçok noktaya ve her noktaya da en fazla 0,2

ml emülsiyon verilecek şekilde, deri altı olarak uygulanmış ve kan alma işlemleri 18 G'luk steril kanüller kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İmmünizasyonda esas olan uygun immunojenik materyalin uygun yoldan, uygun miktarda ve tekrarlayan uygulamalarla verilmesidir. Bundan dolayı literatürde immünizasyon protokolü olarak önerilen belirli bir yöntem yoktur. Bu çalışmada, iki hafta aralıklarla uygulanan ve üçüncü immünizasyon enjeksiyonundan sonra titre tayinine başlanan bir immünizasyon süreci izlenmiştir. Titre tayini için kan toplama işlemine, antikor titresinin yükselmeye başladığı dönem olarak tahmin edilen, ilk immünizasyondan altı hafta sonra başlanmıştır. Clark ve ark.'da (2002) ilk immünizasyonunu takip eden bir veya iki aylık süreç içerisinde titre elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Titre tayin yöntemi de antikor üretilmesini etkileyen faktörlerden bir tanesi olarak sayılabilir. Ancak, bu çalışmada daha önce test edilen ve sonuç alınan Güven'in (1988) yöntemi kullanılmasına rağmen istenilen sonuç alınamamıştır. Titre tayininde elde edilen ¹²⁵I-progesteron ile bağlanma oranı %50 den düşük olduğu için anti progesteron antikorunun üretilmediği ancak antikorun istenilen duyarlılıkta, karakterde, özgüllükte ve affinite de olmadığı kabul edilmiştir.

Literatürde, immünizasyon; oldukça deneysel ve birçok faktörden etkilenen bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Tijssen, 1985). Ayrıca, antikor elde etmek için yapılan çalışmalarda şans faktörünün de çok önemli olduğundan bahsedilmektedir (Wood ve Sokolowski, 1981).

İmmünizasyonu ya da başka bir ifade ile pAn üretimini etkileyen faktörler; uygulamalar için seçilen deney hayvanı, immünizasyon protokolü, immunojenin hazırlanması ve hazırlama şartları, seçilen adjuvant, enjeksiyon yolu, enjekte edilen miktar ve enjeksiyon bölgesinin sayısı, kan örneklerinin

toplanması, bireysel farklılıklar ile hayvanların bakım ve besleme şartları olarak sayılabilir (Tijssen, 1985; Clark ve ark., 2002).

Bu çalışmada da antikor titre tayininde, antikor ile ¹²⁵I-progesteron'un bağlanma oranının %50'den düşük elde dilmesinde bu faktörlerden biri veya birkaçının etkilediği düşünülmektedir.

Köpekler için östrus siklusunun başlangıcı proöstrus evresidir. Bu dönemde progesteron konsantrasyonu bazal düzeyde seyretmektedir. Ancak yazarlar arasında progesteronun bazal konsantrasyonunun hangi düzeyde olduğuna dair ortak bir veri yoktur. Smith ve McDonald'a (1974) göre progesteronun bazal düzeyi <0,5 ng/ml iken diğer bazı yazarlara göre <1-2 ng/ml'dir (Concannon ve ark., 1977; Olson ve ark., 1982).

Sunulan çalışmada progesteron düzeylerinin, beşeri kit (BK), köpek kiti (KK) ve standart aralığı genişletilmiş kit (SGK) ile yapılan ölçümlerinde; progesteronun proöstrus dönemindeki en yüksek düzeyi sırasıyla 1,92 ng/ml; 1,03 ng/ml ve 1,17 ng/ml olarak bulunmuştur. Ortalama progesteron düzeyleri; BK ile yapılan ölçümlerde 0,83 ng/ml, KK ile yapılan ölçümlerde 0,65 ng/ml ve SGK ile yapılan ölçümlerde 0,51 ng/ml olarak belirlenmiştir.

Östrus dönemine ait kan serumu örneklerinin değerlendirilmesinde ise BK ile yapılan ölçümlerde ortalama progesteron değeri 4,91 ng/ml olarak bulunmuştur. Köpek kiti ve SGK ile yapılan ölçümlerde ortalama progesteron düzeyleri sırasıyla 6,72 ng/ml ve 7,28 ng/ml olarak bulunmuştur.

Proöstrus ve östrus dönemlerinde diğer yazarlar tarafından yapılmış standart aralığı değiştirilmiş kitlerle (Phemister ve ark., 1973; Concannon ve Hansel.,1977; Olson ve ark., 1982), beşeri ve köpek kitleriyle elde edilen progesteron sonuçları (Post ve ark.,1988; Wright,1990; Wright, 1991) ile bu çalışmada elde edilen değerler uyum göstermektedir.

Diöstrus dönemi erkeğin tekrar red edilmeye başladığı dönemdir. Proöstrusun son iki gününde artmaya başlayan, artışını östrus döneminde devam ettiren progesteron, diöstrus döneminde en üst düzeylerine çıkar. Hoffmann ve ark.'a (2004) göre bu düzeye diöstrusun ilk 20 gününde ulaşır ve daha sonra azalmaya başlar. Diöstrus dönemindeki progesteron düzeyleri araştırmacıların elde ettiği verilere göre farklılık göstermektedir. Bazı araştırmacılar bu dönemde progesteron konsantrasyonunun 15-90 ng/ml (Goodman, 2001), bazıları ise 50-90 ng/ml (Fedman ve Olson, 1996) olduğunu bildirmektedirler. Wildt ve ark. (1979), ise ovulasyondan sonra progesteron düzeyinin 19,9-55,0 ng/ml arasında değiştiğini bildirmiştir. Değişik araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda progesteronun en yüksek düzeyleri farklı olarak belirlenmiştir. Anılan hormonun en yüksek düzeyleri Edqvist ve ark.'na (1975) göre 50 ng/ml, Weilenman ve ark.'a (1993) göre 70 ng/ml ve Concannon ve ark.'a (1989) göre de 90 ng/ml olarak bildirilmiştir.

Çalışmada elde edilen diöstrus dönemine ait ortalama progesteron düzeyleri; BK ile ölçümde 29,71 ng/ml (10,63-47,00 ng/ml); KK ile ölçümde 30,70 ng/ml (13,19-47,43 ng/ml); ve SGK ile ölçümde 40,78 ng/ml (16,04-61,80 ng/ml) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar söz konusu araştırmacıların bildirdikleri sonuçlar ile benzer bulunmuştur.

Anöstrus döneminde toplanan kan serum örneklerinin değerlendirilmesinde;. BK'de ortalama değer 0,37 ng/ml (0,02-0,92 ng/ml) olarak bulunmuştur. Köpek kitinde değerler ortalama değer 0,15 ng/ml (0,01-0,38 ng/ml) ve SGK'de ortalama değer 0,31 ng/ml (0,01-0,80 ng/ml) olarak bulunmuştur.

Bu dönemde progesteron düzeylerinin değişik kitlelerle ölçümlerinin yapıldığı çalışmalarda, progesteron sonuçlarının <0,5 ng/ml (Nett ve ark., 1975; Feldman ve Olson 1996) ve <1 ng/ml (Olson ve ark., 1982; Hoffmann ve ark., 1996) arasında olduğu saptanmıştır.

Sunulan çalışmada kullanılan kitlerden elde edilen sonuçlar da sözü geçen araştırmacıların verileri ile benzerlik göstermektedir.

Gebe olmayan ancak meme bezlerinin gelişmesi, süt sekresyonunun ve maternal davranışların başlaması gibi peripartum klinik belirtiler gösteren dişi köpekler klinik yalancı gebe olarak kabul edilirler. Bu belirtiler diöstrusun son dönemlerinde, östrustan 60-80 gün sonra ortaya çıkar. Etiyolojisinde progesteron düzeyinin ani olarak düşmesi ile birlikte prolaktin düzeyinin yükselmesi söz konusudur (Tsutsui ve ark., 2007).

Klinik yalancı gebe olduğu belirlenen köpeklerden toplanan kan serum örneklerinin ölçüm sonuçları; BK ile ölçümlerde 3,01 ng/ml (1,01-5,42 ng/ml), KK ile ölçümlerde 3,96 ng/ml (0,93-8,78 ng/ml) ve SGK ile ölçümlerde 4,93 ng/ml (1,34-9,32 ng/ml) olarak bulunmuştur. Özyurtlu ve ark. (2006), klinik yalancı gebe olan köpeklerde progesteron düzeyini $5,07 \pm 3,00$ ng/ml (1,18-11,31 ng/ml) olarak bildirmişlerdir. Tsutsui ve ark. (2007) ise bu dönemde progesteron düzeyinin <2 ng/ml olduğunu rapor etmiştir.

Yapılan muayenelerde gebeliğin ortalama 30-35. günlerinde bulunan köpeklerden alınan kan serum örneklerinin radioimmunoassay yöntemi ile değerlendirilmesinde ise ortalama progesteron düzeyleri; BK ile 22,71 ng/ml (15,56-31,37 ng/ml), KK ile 25,50 ng/ml (16,82-35,50 ng/ml) ve SGK ile 28,41 ng/ml (15,90-38,29 ng/ml) olarak bulunmuştur.

Diöstrus döneminde bulunan gebe ve gebe olmayan köpeklerin kan serumunda progesteron düzeylerinin karşılaştırılmasında ya çok küçük farklar bulunmuş ya da hiç fark bulunamamıştır. Luteinleştirici hormon zirvesinden 15-30 gün sonra progesteron düzeyi 15-85 ng/ml'ye kadar çıkmaktadır. Progesteron zirve döneminden sonra gebeliğin ikinci yarısında azalmaya başlar ve son 1/3'lik dönemde 4-16 ng/ml düzeyine ulaşır (Concannon,1983). Bir veya iki hafta bu düzeyde kalan progesteron doğumdan bir iki gün önce aniden 1-2 ng/ml düzeyine kadar iner (England ve

Verstagen, 1996). Dişi köpeklerde gebelik sırasında progesteron genellikle >10 ng/ml düzeylerinde seyreder (Scott-Moncrieff ve ark., 1990). Onclin ve Verstegen (1996), gebelik dönemindeki progesteron düzeylerinin $26,5 \pm 10,2$ ng/ml olduğunu bildirilmiştir.

Yapılan istatistiksel hesaplamalar sonucunda; östrus siklusunun tüm dönemlerinde, yalancı gebelikte ve gebelikte, BK, KK ve SGK ile elde edilen veriler arasında istatistiksel yönden önemli düzeyde bir farklılığın olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir. Bu sonuç, çalışmada kullanılan kitlerden elde edilen verilerin birbirleri ile uyumlu olduğunu gösterirken yukarıda adı geçen literatür çalışmaları da benzerlik göstermektedir.

Sunulan çalışmada kullanılan BK, KK ve SGK'dan elde edilen verilerin daha duyarlı karşılaştırılması amacıyla, her siklus dönemi aralarında karşılaştırılmış ve istatistiksel yönden herhangi bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Beşeri kit, KK ve SGK'dan elde edilen verilerin birbiri ile korelasyonu sonucunda, korelasyon katsayısının (r) $0,994$ ile $0,998$ arasında değiştiği ($p<0,001$) bulunmuştur. Melcher ve Arbeiter (1994) tarafından yapılan bir çalışmada da yarı kantitatif test (Target[®]), köpek EIA testi (Status-ProTM) ve beşeri testi (Fa. Serono, Wien) ölçümleri sonucunda elde edilen veriler arasındaki korelasyonun $r=0,927$ ($p\leq 0,001$) olduğu ortaya konulmuştur.

Elde edilen istatistiksel sonuçlar; çalışmada kullanılan her üç kitin de köpek kan serumundan progesteron ölçmek amacıyla sağlıklı biçimde kullanılabileceğini ortaya koymakta ve Eckersall ve Harvey' in (1987) bir türe spesifik immunoassay kitlerinin diğer türler içinde kullanılabileceği görüşünü de desteklemektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan doktora tez çalışmasında elde edilen veriler değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Yapılan immunizasyon çalışmaları sonucunda, tavşanlardan toplanan kan serumu örneklerinde radyoaktif madde ile bağlanma oranı %50'den düşük bulunduğu için anti progesteron antikorunun üretilmediği ancak antikorun istenilen duyarlılıkta, karakterde, özgüllükte ve affiniteye olmadığı kabul edilmiştir.

2. Östrus siklusunun tüm dönemlerinde, yalancı gebelikte ve gebelikte, beşeri kit (BK), köpek kiti (KK) ve standart aralığı genişletilmiş kit (SGK) ile elde edilen veriler arasında istatistiksel yönden önemli düzeyde bir farklılığın olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir. Elde edilen sonuç, çalışmada kullanılan tüm kitlerin östrus siklusu dönemlerindeki progesteron düzeylerini ölçmede yekdiğeri yerine kullanılabileceğini göstermektedir.

3. Beşeri kit, KK ve SGK'dan elde edilen verilerin daha duyarlı karşılaştırılması amacıyla, her siklus dönemi aralarında karşılaştırılmış ve istatistiksel yönden herhangi bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

4. Beşeri kit, KK ve SGK'dan elde edilen verilerin birbiri ile korelasyonu sonucunda, korelasyon katsayısının (r) 0,994 ile 0,998 arasında değiştiği ($p<0,001$) bulunmuştur. Bu sonuç, çalışmada kullanılan tüm kitlerin verileri arasında çok yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir.

5. Östrus siklusunun değişik dönemlerinde, yalancı gebelikte ve gebelikte BK, KK ve SGK ile, köpek kan serumundan yapılan progesteron ölçümlerinin daha önce yapılmış olan araştırmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür.

6. Sonuç olarak;

a) Deney sürecini olumsuz etkileyecek laboratuvar koşulları ve deney hayvanlarında strese neden olabilecek faktörlerin ortadan kaldırılması temel noktalardan biri olmalıdır.

b) Antikor üretme süreci titizlikle planlanmalıdır. Ancak, deney hayvanlarından antikor elde edebilmek amacıyla uygun koşullar sağlansa bile immunizasyon sürecinde her zaman başarılı olunamayacağı unutulmamalıdır. Dolayısıyla önlem olarak, bu tip materyallerin işleri sadece spesifik antikor ve hormon tanı kitleri üretmek olan laboratuvarlardan sağlanması önerilmektedir.

c) Laboratuvar faktörlerinden oldukça fazla etkilenen polisteren tüplerin antikor ile kaplaması işlemi yerine ticari olarak temin edilen antikor ile kaplı tüplerin kullanılması önerilmektedir.

d) Beşeri progesteron radioimmunoassay kiti, köpek progesteron radioimmunoassay kiti ve standart aralığı genişletilmiş progesteron radioimmunoassay kiti kullanılarak gerçekleştirilen köpek kan serumunda progesteron ölçüm sonuçlarının birbirleri ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Bu sonuçtan yola çıkarak, daha ucuz ve bulunması daha kolay olan beşeri progesteron radioimmunoassay (Immunotech®) kitlerinin köpek kan serumu kullanılarak gerçekleştirilecek olan çalışmalarda köpeğe özel kitlerin yerine kullanılabileceği söylenebilir. Bu konu ile ilgili olarak, ticari radioimmunoassay kiti üreten çoğu firma, türe spesifik progesteron kitlerin üretimini durdurmuştur.

ÖZET

Dişi Köpeklerde Kan Progesteron Hormonu Ölçümleri Amacıyla Radioimmunoassay Kiti Üretilmesi ve Kalibrasyonu

Sunulan tez çalışmasının amacı, dişi köpeklerin farklı siklik evrelerinde, gebelik ve yalancı gebeliklerinde, progesteron hormonu düzeylerini türe spesifik (KK), insanlarda kullanılan (BK) ve bu çalışma için oluşturulan RIA kitleri (SGK) ile araştırarak tanı yönünden uyum, olası fark ve benzerlikleri ortaya koymaktır.

Bu amaçla çeşitli muayene yöntemleri kullanılarak östrus siklunun proöstrus, östrus, diöstrus ve anöstrus dönemlerinde oldukları belirlenen, ayrıca yalancı gebelik ve gebelik bulunan hayvanlardan, her grupta 7 adet olmak üzere toplam 42 adet dişi köpekten kan alınmıştır. Ayrıca, çalışma süresince 6 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı da antikor üretmek amacıyla kullanılmıştır.

Antikor üretmek amacıyla; immunojen olarak “11 α -OH-Hemisuccinate:BSA”, adjuvat olarak Freund's complete ve incomplete adjuvantı kullanılmıştır. İmmunizasyon süreci olarak iki hafta aralıklar ile tavşanlara deri altı immunizasyonlar yapılmıştır. Üçüncü enjeksiyondan sonra kulak venalarından kan alınmış ve titre tayinleri yapılmaya başlanmıştır. Titre tayinleri sonucunda bir miktar antikor üretilebildiği ancak bağlanma oranı %50'nin altında olduğu için, istenilen duyarlılıkta, karakterde, özgüllükte ve affinitede olmadığı görülmüştür. Polisteren tüpleri antikor ile kaplama işlemi için dışarıdan temin edilen “7 α -OH-progesteron-hemisuccinate” ve “6 β -OH-progesteron-hemisuccinate” iki farklı antikor ve yedi farklı yöntem kullanılmıştır. Ancak, çalışmanın bu sürecinde istenilen düzeyde bağlanma sağlanamamıştır.

Dişi köpeklerden toplanan kan serumlarından BK (İmmunotech®), KK (İmmunotech®) ve SGK kullanılarak progesteron düzeyleri ölçülmüştür. Progesteron ölçümlerine kullanılan BK ve KK ile ölçümler üretici firmanın belirtmiş olduğu yöntemle göre yapılmıştır. SGK ile ölçüm yapabilmek için öncelikle standart aralığı genişletilmiş ve standart noktalar olarak 0 ng/ml, 2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml ve 100 ng/ml düzeyleri kullanılmıştır. Bu kit ile yapılan ölçümlerde takip eden süreç önceki iki kit ile aynı şekilde yapılmıştır.

Beşeri kit ile yapılan ölçümlerde elde edilen ortalama değerler şu şekildedir. Proöstrus döneminde 0,83 ng/ml; östrusta 4,91 ng/ml; diöstrusta 29,71 ng/ml; anöstrusta 0,37 ng/ml; yalancı gebelikte 3,01 ng/ml ve gebelikte 22,71 ng/ml. Aynı dönemlerde KK ile yapılan ölçümlerde ise sırasıyla 0,65 ng/ml; 6,72 ng/ml; 30,70 ng/ml; 0,15 ng/ml; 3,96 ng/ml ve 25,20 ng/ml düzeyleri bulunmuştur. SGK ile yapılan ölçümlerde aynı dönemlere ait progesteron düzeyleri ise sırasıyla 0,51 ng/ml; 7,28 ng/ml; 40,78 ng/ml; 0,31 ng/ml; 4,93 ng/ml ve 28,41 ng/ml olarak bulunmuştur.

Ölçümlerden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; tüm gruplardan her üç kit kullanılarak elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel yönden önemli bir farklılığın olmadığı ($p>0,05$) ortaya konmuştur. Her siklus döneminin verilerinin elde edildiği test yöntemleri kendi aralarında karşılaştırılmış ve istatistiksel yönden bir fark

bulunamamıştır ($p>0,05$). Kitlerden elde edilen sonuçların korelasyonu yapıldığında ise $r=0,994$ ve $0,998$ düzeyinde bir ilişki bulunmuştur.

Sonuç olarak, dişi köpeklerde progesteron ölçümü amacıyla türe spesifik kitler yerine beşeri kitlerin sağlıklı biçimde kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Dişi köpek, radioimmunoassay, progesteron kiti

SUMMARY

Production and Calibration of Radioimmunoassay Kit for Progesterone Hormone Assay in The Bitch

The aim of this study was to investigate blood progesterone levels by using human progesterone RIA kit, canine progesterone RIA kit and validated human progesterone kit in different stages of the sexual cycle, pregnancy and pseudopregnancy in the bitch.

A total of 42 bitches were used in the study. Dogs were assigned in to six groups according to the reproductive status as follows proestrus (n=7), estrus (n=7), diestrus (n=7), anestrus (n=7), pregnancy (n=7) and pseudopregnancy (n=7). In addition, six male New Zeland rabbits were used in antibody production.

11 α -OH-Hemisuccinate:BSA and Freund's complete and incomplete adjuvant were used as immunogen and adjuvant for antibody production, respectively. Rabbits were immunized by s.c. injections in two week intervals. Following the 3rd injention, blood samples were collected via auricular venapuncture and antisera were tested. Although an amount of antibody were obtained, the binding ratio was < 50% resulting in undesirable sensitivity, spesify and affinity.

Two different antibodies "7 α -OH-progesteron-hemisuccinate" and "6 β -OH-progesterone-hemisuccinate: BSA"were used in antibody coating of polystyren tubes. Nonetheless,efficient antibody binding could not been reached. Progesterone levels in blood samples of the dogs were measured by human progesterone RIA kit (immunotech[®]), canine progesterone RIA kit (immunotech[®]) and a validated human RIA kit. Measurement made instructures with minor modifications to SGK. For that; standart interval was extended standart points were set to 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 and 100 ng/ml.

Mean values obtained using by human RIA kit were as follows ; proestrus 0.83 ng/ml, estrus 4.91 ng/ml, diestrus 29.71 ng/ml, anestrus 0.37 ng/ml, pseudopregnancy 3.01 ng/ml and pregnancy 22.71 ng/ml. Mean values obtained by using canine progesterone kit were 0.65 ng/ml; 6,.2 ng/ml; 30.70 ng/ml; 0.15 ng/ml; 3.96 ng/ml and 25.20 ng/ml. Mean values obtained by using validated human RIA kit were 0.51 ng/ml; 7.28 ng/ml; 40.78 ng/ml; 0.31 ng/ml; 4.93 ng/ml and 28.41 ng/ml for the same reproductive stages, respectively .

There was no statistically important difference between the mean progeterone values obtained by using different test kits (p>0.05). The results were correlated at the level of r= 0.994 and 0.998.

In conclusion, human progesterone RIA kit can be use safely instead of species specific test kits for the blood mesurement in the bitch.

Key words: Bitch, radioimmunoassay, progesterone kit.

KAYNAKLAR

- ALAÇAM, E. (2002). Hormonların klinik kullanımları. İçinde: *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*, Ed.: E. Alaçam, Medisan: Ankara, s.: 41-54.
- ALAÇAM, E., ORAL, H., MACUN, C. (2005). Evaluation of blood relaxin in bitches and queens for the diagnosis of pregnancy, false pregnancy and foetal deaths. *Indian Vet. J.*, **82**: 269-271.
- BAKİ, Y. (1999). Hormonların sınıflandırılması. İçinde: *Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi*, Feryal Matbaacılık: Ankara, s.: 1-31.
- BEARDEN, H.J., FUQUAY, J.W. (2000). Neuroendocrine regulators of reproduction. In: *Applied Animal Reproduction*, Prentice-Hall Inc: London, p.: 35-53.
- BHATTI, S.F., DUCHATEAU, L., OKKENS, A.C., VANHAM, L.M., MOL, J.A., KOOISTRA, H.S. (2006). Treatment of growth hormone excess in dogs with the progesterone receptor antagonist aglepristone. *Theriogenology*, **66**: 797-803.
- BIODATA, TECHNICAL INFORMATION (1984). Radioimmunoassay: Generalities. Scientiic Marketing Dept.: via Abbadesse 40, Milano.
- BOLLEN, L.S., CROWLEY, A., STODULSKI, G., HAU, J. (1996). Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *Journal of Immunological Methods.*, **191**: 113-120.
- BOUCHARD, G., YOUNGQUIST, R.S., VAILLANCOURT, D., KRAUSE, G.F., GUAY, P., PARADIS, M. (1991). Seasonality and variability of the interestrous interval in the bitch. *Theriogenology*, **36**: 41-50.
- BUTINAR J., MUJAGIC E., GALAC S. (2004). The oestrus cycle in the bitch: a review article. *Slov Vet Res.*, **41**: 5-11.
- CARLSON, D.A., GESE, E.M. (2006). Relaxin as a diagnostic tool for pregnancy in the coyote (*Canis latrans*). *Anim. Reprod. Sci.*, Sep.**17**:17069998.
- CARRUTHERS, T.D. (1986). Principles of hormone therapy in theriogenology. In: *Current therapy in Theriogenology 2.*, Ed.: D.A. Morrow, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p.: 3-13.
- CHOI, B.C., POGLAR, K., XIAO, L., HILL, J.A. (2000). Progesterone inhibits in-vitro embriyotoxic TH1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum. Reprod. Suppl.*, **15**: 46-59.
- CLARK, A., BEFUS, D., O'HASHI, P., HART, F., SCHUNK, M., FLETCH, A., GRIFFIN, G. (2002). Antibody production. In.: *Canadian Council on Animal Care*, Ottawa: Canada, p.:1-40.

- CONCANNON, P.W. (1983). Reproductive physiology and endocrine patterns of the bitch. In: *Current Veterinary Therapy*, Ed.: R.W. Kirk, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p.: 886-901.
- CONCANNON, P.W. (1986). Canine pregnancy and parturition. In: *Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice*, W.B. Saunders Company: Philadelphia, **16**: 453-475.
- CONCANNON P.W., HANSEL W. (1977). Prostaglandin F₂ α induced luteolysis, hypothermia, and abortions in beagle bitches. *Prostaglandins*, **13**: 533-542.
- CONCANNON P.W., HANSEL W., MCENTEE, K. (1977). Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biology of Reproduction*, **17**: 604-615.
- CONCANNON P.W., HANSEL W., VISEK W.J. (1975). The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH ve progesterone. *Biology of Reproduction*, **13**: 112-121.
- CONCANNON, P.W., LEIN, D.H. (1989). Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy, and pregnancy in dogs. In: *Current Veterinary Therapy X*, Ed.: R.W. Kirk, J.D. Bonagura, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p.: 1269-1282.
- CONCANNON P.W., MCCANN, J.P., TEMPLE, M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **39**: 3-25.
- CORRADA, Y., ARIAS, D., RODRIGUEZ, R., TORTORA, M., GOBELLO, C. (2006). Combination dopamine agonist and prostaglandin agonist treatment of cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, **66**: 1557-1559.
- CUPPS, P.T. (1991). Assays. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Ed.: P.T. Cupps, Academic Press: San Diego, p.:69-76
- 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.
- DREIER, H.K. (1975). Möglichkeiten der Läufigkeitskontrolle und der Deckvorbereitung bei der Hündin. *Wien tierarztl. Mschr.*, **62**: 349-351.
- ECKERSALL, P.D., HARVEY, M.J.A. (1987). The use of a bovine plasma progesterone ELISA kit to measure progesterone in equine, ovine and canine plasmas. *Vet. Rec.* **120**: 5-8.
- EDQVIST, L.-E., JOHANSSON, E.D.B., KASSTRÖM, H., OLSSON, S.E., RICHKIND, M. (1975). Blood plasma levels of progesterone and estradiol in the dog during the oestrus cycle and pregnancy. *Acta Endocrinol.*, **78**: 554-564

- EDQVIST, L.-E., STABENFELDT, G.H. (1993). The hormones of reproduction. In: *Reproduction in Domesticated Animals*, Ed.: G.J. King, Elsevier: Amsterdam, p.: 55-73.
- EILTS, B.E., DAVIDSON, A.P., HOSGOOD, G., PACCAMONTI, D., BAKER, D.G. (2005). Factors affecting gestation duration in the bitch. *Theriogenology*, **64**: 242-251.
- ENGLAND, G.C.W. (1998). Pregnancy diagnosis, abnormalities of pregnancy and pregnancy termination. In: *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, Ed.: G. Simpson, BSAVA: Cheltenham, p.: 113-125.
- ENGLAND,, G.C.W., CONCANNON, P.W. (2002). Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. Erişim: [<http://www.ivis.org>]. Erişim Tarihi: 17.02.2006
- ENGLAND G.C.W., VERSTEGEN, J.P. (1996). Prediction of parturition in the bitch using semi-quantitative ELISA measurement of plasma progesterone concentration. *Vet. Rec.*, **16**: 496-497.
- EVANS, J.M., SUTTON, D.J. (1989). The use of hormones, especially progestagens, to control oestrus in bitches. *J.Reprod. Fert. Suppl.* **39**: 163-173.
- FELDMAN, E.C., OLSON, R.W. (1996). Ovarian cycle and vaginal cytology. In.: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p.: 526-547.
- GALAC, S., KOOISTRA, H.S., DIELEMAN, S.J., CESTNIK, V., OKKENS, A.C. (2004). Effects of aglépristone, a progetserone receptor antagonist, administered during the early luteal phase in non-pregnant bitches. *Theriogenology*, **62**: 494-500.
- GOBELLO, C., COLOMBANI, M., SCAGLIA, H., DE LA SOTA, R.L., GOYA, R.G. (2001a). Heterogeneity of circulating prolactin in the bitch. *Reprod. Nutr. Dev.*, **41**: 505-511.
- GOBELLO, C., CONCANNON, P.W., VERSTEGEN, J. (2001b). Canine pseudopregnancy: a review. In: *Small Animal Reproduction*, Ed.: P.W. Concannon, G. England, J. Verstegen, International veterinary information, Ithaca: NewYork.
- GOODMAN, M. (2001). Ovulation timing. In. *Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice*, Ed: A.D. Davidson, W.B. Saunders Company: Philadelphia, **31**: 219-235.
- GÖKÇEN, H. (1975). İneklerde radioimmunotest yöntemiyle progesteron hormonunun kızgınlık siklusu süresince gösterdiği değışimlerin saptanması. T.B.T.A.K. V Bilim Kongresi, s.: 205-227.
- GRAHAM, J.D., CLARKE, C.L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, **18**: 502-517.
- GRANNER, D.K. (2000). Diversity of the endocrine system. In.: *Harper's Illustrated Biochemistry*, Ed.: R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell, McGraw-Hill: New York, p.: 434-455.

- GÜNZEL-APEL, A.-R., ZABEL, S., BUNCK, C.F., DIELEMAN, S.J., EINSPAINER, A., HOPPEN, H.-O. (2006). Concentrations of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Shepherd dogs. *Theriogenology*, **66**: 1431-1435.
- GÜVEN, B. (1988). Mikrotitrasyon plak enzymeimmunoassay yöntemiyle ineklerde doğum sonrası süt progesteron düzeylerinin tayini. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- HAFEZ, E.S.E. (1993). Hormones, growth factors and reproduction. In.: *Reproduction in Farm Animals*, Ed.: E.S.E. Hafez, Lea and Febiger: Philadelphia, p.: 59-93.
- HARVEY, M.J.A., DALE, M.J., LINDLEY, S., WATERSON, M.M. (1999). A study of the aetiology of pseudopregnancy in the bitch and the effect of cabergoline therapy. *Vet. Rec.*, **144**: 433-436.
- HOFFMANN, B. (1977). *Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind Entwicklung von Messverfahren und physiologische Daten*. Verlag Paul Parey: Berlin und Hamburg.
- HOFFMANN, B., BUSGES, F., ENGEL, E., KOWALEWSKI, M.P., PAPA, P. (2004). Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reprod Dom Anim.*, **39**: 232-240.
- HOFFMAN B., REISENBECK A., KLEIN R. (1996). Reproductive endocrinology of bitches. *Anim Reprod. Sci.*, **42**: 275-288.
- HOLST, P.A. (1986). Vaginal cytology in the bitch. In.: *Current Therapy in Theriogenology*, Ed.: D.A. Morrow, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p.: 457-462.
- IAEA, TECHICAL REPORT SERIES NO.233 (1984). Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction. *International Atomic Energy Agency*; Vienna
- INABA T., TANI H., GONDA M., NAKAGAWA A., OHMURA M., MORI J., TORII R., TAMADA H., SAWADA T. (1998). Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (Leuprolide Acetate). *Theriogenology*, **49**: 975-982.
- JEFFCOATE, I. (1998). Physiology and endocrinology of reproduction in female dogs. In. *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, Ed.: G. Simpson, BSAVA: Cheltenham, p.: 1-9.
- JEFFCOATE, I.A., LINDSAY, F.E.F. (1989). Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J. Reprod Fert., Suppl.*, **39**: 277-287.
- JOHNSTON, S.D. (1986). Pseudopregnancy in the bitch. In: *Current therapy in Theriogenology 2.*, Ed.: D.A. Morrow, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p.: 490-491.

- JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OLSON, P.N.S. (2001). The canine estrus cycle. In: *Canine and Feline Theriogenology*, W.B.Saunders Company: Philadelphia, p.:16-31.
- KÄHN, W. (2004). Ultrasonography in dogs and cats. In: *Veterinary Reproductive Ultrasonography*, Ed.: W. Kähn, Schlütersche: Hannover, p.: 227-252
- KAOLMAN, J., ROEHM, K-H. (2005). Hormones. In: *Color Atlas of Biochemistry*, Ed.: J. Kaolman, K-H. Roehm, Theime: Stuttgart, p.: 370-394.
- KNOTTENBELT, C.M., HERRTAGE, M.E. (2002). Use of proligestone in the management of three german shepherd dogs with pituitary dwarfism. *J.Small Anim Pract.*, **43**: 164-170.
- KOOISTRA, H.S., OKKENS, A.C. (2001). Secretion of prolactin and growth hormone in relation to ovarian activity in the dog. *Reprod Dom Anim.*, **36**: 115-119.
- KUTZLER, M.A., MOHAMMED, H.O., LAMB, S.V., MEYERS-WALLEN, V.N. (2003). Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*, **60**: 1187-1196.
- LINDE, C., KARLSSON, I. (1984). The correlation between cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *J.Small Anim. Pract.*, **25**: 77-82.
- LINDE-FORSBERG, C., ENEROTH, A. (1998). Parturition. In: *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, Ed.: G. Simpson, BSAVA: Cheltenham, p.:127-142.
- LINDSAY, F.E.F. (1990). Postuterine endoscopy in the bitch. In: *Small Animal Endoscopy*, Ed.: T.R. Rams, Mosby: St.Louis, p.: 327-266.
- MARTIN, P.A., CRUMP, M.H. (2003). The adrenal gland. In: *McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Ed.: M.H. Pineda, M.P. Dooley, Iowa State Pres: Iowa, p.: 165-200.
- MELCHER, M., ARBEITER, K. (1994). Die progesteronbestimmung als Deckzeitdiagnostikum-3 Nachweisverfahren im vgleichstest. (determination of progesterone diagnosing mating time-a comparison of three analysing methods). *Reprod Dom Anim.*, **29**: 259.
- MILLANTA, F., CALANDRELLA, M., BARI, G., NICCOLINI, M., VANNOZZI, I., POLI, A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, **79**: 225-232.
- NETT, T.M., AKBAR, A.M., PHEMISTER, R.D., HOLST, P.A., REICHERT, L.E., NISWENDER, G.D. (1975). Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrus cycle and pregnancy in the beagle bitch. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*. **148**: 134-139.
- NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., SILVA, P.J., ROLLYSON, M.K., MCINTUSH, E.W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *The American Physiological Society*, **80**: 1-28.

- NOYAN, A. (1998). Hormonlar. İçinde: *Fizyoloji*, Ed.: A. Noyan, Ankara: Meteksan, s.: 979-987.
- OLSON, P.N., BOWEN, R.A., BEHRENDT, M.D., OLSON, J.D., NETT, T.M. (1982). Concentrations of reproductive hormones in canine serum through late anestrus, proestrus and estrus. *Biology of Reproduction*, **27**: 1196-1206.
- OLSON, P.N., HUSTED, P.W. (1986). Breeding management for optimal reproductive efficiency in the bitch and stud dog. In: *Current Therapy in Theriogenology*, Ed.: D.A. Morrow, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p.463-466.
- OLSON, P.N., HUSTED, P.W., ALLEN, T.A., NETT, T.M. (1984). Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen. In: *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, W.B. Saunders Company: Philadelphia, **14**: 927-947.
- OLSON, P.N., NETT, T.M. (1986). Reproductive endocrinology and physiology of the bitch. In: *Current therapy in Theriogenology 2.*, Ed.: D.A. Morrow, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p.: 453-457.
- ONCLIN, K., VERSTEGEN J.P. (1996). Practical use of a combination of a dopamine agonist and a synthetic prostaglandin analogue to terminate unwanted pregnancy in dogs. *J. Small Anim. Pract.*, **37**: 211-216.
- ONCLIN, K., VERSTEGEN J.P. (1997). In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and diestrus. *Domestic Animal Endocrinology*, **14**: 25-38.
- ÖZDAMAR, K. (2003). *SPSS ile Biyoistatistik*, Kaan Kitapevi: Eskişehir.
- ÖZSAR, S. (1983). Ankara keçilerinde erken gebelik tayini ve fertilite kontrolünde radioimmunoassay (RIA) ile progesteron düzeylerinin saptanması: RIA tekniğinin keçi serumu için geçerliliğinin kontrolü. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- ÖZYURTLU, N. (2004). Dişi köpeklerde yalancı gebeliğin sağaltımında homeopati uygulamasının etkisi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- ÖZYURTLU, N., AY, S.S., ALAÇAM, E. (2006). Evaluation of vaginal smears, and progesterone and relaxin levels in pregnant, and overt and covert pseudopregnant bitches. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **30**: 465-470.
- PAPANICOLAOU, G.N. (1942). A new procedure for staining vaginal smears. *Science*, **95**: 438-439.
- PHEMISTER, R.D., HOLST, P.A., SPANO, J.S., HOPWOOD, M.L. (1973). Time of ovulation in the beagle bitch. *Biology of Reproduction*, **8**: 74-82.
- PINEDA M.H. (2003). Reproductive patterns of dogs. In: *McDonal's Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Ed.: M.H. Pineda, M.P.Dooley, Iowa State Pres: Iowa. p.: 475-504.

- PLUCHINO, N., LUISI, M., LENZI, E., CENTOFANTI, M., BEGLIUMINI, S., FRESCHI, L., NINNI, F., GENAZZANI, A.R. (2006). Progesterone and progestins: Effects on brain, allopregnanolone and β -endorphin. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **102**: 205-213.
- POST, K. (1985). Canine vaginal cytology during the estrus cycle. *Can Vet J.*, **26**: 101-104.
- POST, K., EVANS, L.E., JÖCHLE, W. (1988). Effects of prolactin suppression with cabergoline on the pregnancy of the bitch. *Theriogenology*, **29**: 1233-1243.
- RAJPUT, Z.I., HU, S-H, XIAO C-W, ARIJO, A.G. (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B.*, **8**: 153-161.
- REIMERS, T.J. (2003). Introduction. In: *McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Ed.: M.H. Pineda, M.P. Dooley, Iowa State Pres: Iowa, p.: 1-15.
- ROMAGNOLI S., CONCANNON P. W. (2006). Clinical use of progestins in bitches and queens: a review. Erişim: [<http://www.ivis.org>]. Erişim Tarihi: 17.02.2006
- ROTA, A., IGUER-OADA, M., VERSTEGEN, J., LINDE-FORSBERG, C. (1999). Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without equex stm paste. *Theriogenology*, **51**: 1045-1058.
- SCOTT-MONCRIEFF, J.C., NELSON, R.W., BILL, R.L., MATKOCK, C.L., BOTTOMS, G.D. (1990). Serum disposition of exogenous progesterone after intramuscular administration in bitches. *Am J Vet Res.*, **51** (6): 893-895.
- SKELLEY, D.S., BROWN, L.P., BESCH, P.K. (1973). Radioimmunoassay. *Clinical Chemistry*, **19**: 146-186.
- SMITH, F.O. (2006). Canine pyometra. *Theriogenology*, **66**: 610-612.
- SMITH, M.S., McDONALD, L.E. (1974). Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrus cycle, pseudopregnancy and pregnancy in the dog. *Endo*, **94**: 404-412.
- STABENFELDT, G.H., KINDAHL, H., EDQVIST, L.E. (1976). Radioisotop techniques for the study of reproductive physiology in domestic animal. International Atomic Energy Agency: Vienna, SM-205/4:525-537.
- STEINETZ, B.G., GOLDSMITH, L.T., HARVEY, H.J., LUST, G. (1989). Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *Am. J. Vet. Res.*, **50**: 68-71.
- STILLS, H.F. (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's Complete and other adjuvants. *ILAR Journal*, **46**: 280-293.

- SWAN, C.L., AGOSTINI, M.C., BARTLEWSKI, P.M., FEYLES, V., URBAN, R.J., CHEDRESE, P.J. (2002). Effects of progestins on progesterone synthesis in a stable porcine granulosa cell line: control of transcriptional activity of the cytochrome P450 side-chain cleavage gene. *Biology of Reproduction*, **66**: 959-965.
- TIJSSEN, P. (1985). Production of antibodies. In.: *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier:Amsterdam, p.: 43-63.
- TSUTSUI, T., KIRIHARA, N., HORI, T., CONCANNON, P.W. (2007). Plasma progesterone and prolactin concentrations in overtly pseudopregnant bitches: A clinical study. *Theriogenology*, **67**: 1032-1038.
- VAKKURI, O., ÁRNASON, S.S., POUTA, A., VUOLTEENAHON, O., LEPPALUOTO, J. (2000). Radioimmunoassay of plasma ouabain in healthy and pregnant individuals. *Journal of Endocrinology*, **165**: 669-677.
- VAN DE WIEL, D.F.M., KOOPS, W., VOS, E. (1986). Enzyme and radioimmunoassay techniques for hormone determination in livestock. International Atomic Energy Agency: Vienna, SM-297/7:243-253.
- VERSTEGEN J.P., ONCLIN K., SILVA L.D.M., CONCANNON P.W. (1999). Effect of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology*, **51**: 597-611.
- VERVERIDIS, H.N., BOSCO, C.M., STEFANAKIS, A., SARATIS, P., STAMOU, A.I., KRAMBOVITIS, E. (2004). Serum estradiol-17 β , progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. *Theriogenology*, **62**: 614-623.
- WEILLENMANN, R., ARNOLD, S., DOBELI, M., RÜSCH, P., ZEROBIN, K. (1993). Östradiol und progesteronkonzentrationen im Plasma von nicht trächtigen Hündinnen während des Sexualzyklus. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **135**: 51-57.
- WILDT, D.E., PANKO, W.B., CHAKRABORTY, P.K., SEAGER, S.W.J. (1979). Relation ship of serum estrone, estradiol-17 β and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biology of Reproduction*, **20**: 648-658.
- WRIGHT, P.J. (1990). Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. *J. Small Anim. Pract.*, **31**: 335-340.
- WRIGHT, P.J. (1991). Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. *Australian Veterinary Journal*, **68**: 10-13.
- WOOD W.G., SOKOLOWSKI, G. (1981). Radioimmunoassay in Theory and Practice. Kern&Birner: Frankfurt.
- YALOW, R.S., GROSS, L. (1976). Radioimmunoassay for intact mouse leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 2847-2851.

ÖZGEÇMİŞ

Ad: Serhan Serhat
Soyad: AY
Doğum yeri/tarihi: Ankara-1976
Medeni durumu: Bekar
Askerlik durumu: Tecilli
İletişim adresi: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 55139, Kurupelit/SAMSUN
Telefon: 0 362 312 19 19 / 6236
Eğitim: A.Ü. Veteriner Fakültesi, 1995-2001
Mustafa Kemal Lisesi (Lise Bölümü), Ankara, 1990-1993
Mustafa Kemal Lisesi (Orta Bölümü), Ankara, 1987-1990
Batıkent İlkokulu, Ankara, 1982-1987
Yabancı Dil: İngilizce
Ünvanları: Veteriner Hekim, Haziran-2001
Araştırma Görevlisi, Aralık-2005
Mesleki deneyim: Kasım 2006-Aralık 2006; Viyana Veteriner Üniversitesi Doğum, Jinekoloji ve Androloji Kliniği-Avusturya, (Direktör: Prof. Dr. Sabine Schaefer-Somi) “köpekte gebelik sürecinde immunsistem (gelişme faktörleri, enzimler, MHC I-II ve uterustaki, plasenta dokusundaki reseptörler)” isimli projede araştırmacı olarak.
Üye olduğu Bilimsel kuruluşlar: IVIS, International Veterinary Information Service, 2002
Türk Veteriner Jinekoloji Derneği, 2003

Bilimsel etkinlikler:

- Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, 22-24 Şubat 2007, Berlin
- II. Ulusal Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006, Belek/Antalya

- II. Ulusal Küçük Hayvan Hekimliği Kongresi, 18-21 Mayıs 2006, Bursa
- Ulusal Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi, 4-6 Eylül 2003, Konya

Bilimsel ilgi alanları:

Yayınları:

- 1) NİHAT ÖZYURLU, **SERHAN S. AY**, EROL ALAÇAM (2006). Evaluation of vaginal smears, and progesterone and relaxine levels in pregnant, and overt and covert pseudopregnant bitches. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 30: 465-470.
- 2) H.B. BECERİKLİSOY, **S. S. AY**, A. K. ZONTURLU, Y. ÇETİN, C. KAÇAR, J. HANDLER, S. ASLAN (2006). Reprodüktif açıdan sorunlu kısıraklarda aşım sezonu başlangıcında uterus yıkamaları ve hormon kullanımının siklus aktivitesi ve fertilite parametreleri üzerindeki etkisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 53: 169-173.

Dergilerde Yayınlanan Kongre ve Poster Özetleri:

- 1) D. KAYA, **S. S. Ay**, H. B. BECERİKLİSOY, A. R. AĞAOĞLU, İ. KÜÇÜKASLAN, O. ÇELİK, S. ASLAN. (2007). Metaphylactic effect of ceftiofur HCl, Oxytocin and PGF₂ α applications on fertility parameters in dairy cows during postpartum period. Reproduction in Domestic Animals, 42 (suppl.1)
- 2) H.B. Beceriklisoy, İ. Küçükcaslan, **S.S. Ay**, D. Kaya, A.R. Ağaoğlu, O. A. Aksoy, N.Erūnal-Maral, M. Fındık, S. Aslan. (2006). Erkek köpeklerde delmadinon asetat (Tardax[®] veya Tardastrex[®]) ile hiperseksülaite ve prostat hipertrofisi olgularının sağaltımı. III. Ulusal küçük hayvan hekimliği kongresi, 18-21 mayıs 2006, Uludağ/Bursa
- 3) D. Kaya, **S. S. Ay**, H. B. Beceriklisoy, A. R. Ağaoğlu, İ. Küçükcaslan, O. Çelik, N. Özyurtlu, S. Aslan. (2006). Sütçü ineklerde postpartum dönemde profilaktik amaçlı ceftiofur ve oksitosin uygulamalarının fertilite parametreleri üzerine etkisi. II. Ulusal Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006, Belek/Antalya
- 4), **S.S. Ay**, H.B. Beceriklisoy, D. Kaya, A.R. Ağaoğlu, İ. Küçükcaslan, S.B. Mülazımoğlu, S. Aslan. (2006). Köpeklerde uterus patolojilerinde parenteral PGF₂ α ve intrauterin antibiyotik sağaltım yöntemlerinin kombinasyonu. II. Ulusal Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2006, Belek/Antalya

