

**ANÖSTRÜS DÖNEMİNDE PROGESTAGEN (MAP), PMSG ve GnRH
İLE SENKRONİZE EDİLEN KOYUNLARDA RADYOİMMUNOASSAY
(RIA) YÖNTEMİ İLE ERKEN GEBELİK TANISI ÜZERİNDE ÇALIŞMA***

**Erol Alaçam¹, D. Ali Dinç², Mehmet Güler²
Saffet Eröz³, A. Nuri Sezer⁴**

**Radioimmunological Diagnosis of Early Pregnancy in Ewes That Previously
Synchronised by MAP, PMSG and GnRH Hormones**

Summary: *In this study early pregnancy diagnosis rate was determined in ewes that previously synchronised by MAP, PMSG and GnRH and bred naturally in late anestrus season.*

Forty Merino ewes, 5 years old, were used as materials. Jugular blood samples were collected on 15 th, 16 th and 17 th days, after breedings. Samples were santrifuged in 2000 rpm and plasmas were stored at —20°C until assay procedures.

For the early pregnancy diagnosis, plasma progesterone and oestradiol 17 β levels were determined by RIA method. For this purpose, Mini assay type Gamma counter and ¹²⁵I Progesterone and Oestradiol 17 β assay kits were used. Laboratory results were controlled with lambing results.

As a conclusion, the high rate of correct diagnosis were obtained in pregnant and nonpregnant ewes, 84.62 % and 85.72 % respectively. While progesterone values were useful for early diagnosis, oestradiol values were not clear enough to decide the diagnosis.

Özet: *Bu çalışmada geç anöstrüs döneminde MAP, PMSG ve GnRH hormonları ile ovaryum fonksiyonları uyarılıp, doğal aşım ile gebe bırakılan koyunlarda, RIA yöntemi ile erken gebelik tanısı şansları araştırıldı.*

* Bu çalışma Tarım, Orman ve Köyişleri Bakanlığı tarafından desteklenmiştir.

1 Prof.Dr., Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya.

2 Arş.Gör., Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya.

3 Vet.Hek., Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Konya.

4 Uzm.Dr., Özel Nükleer Tıp Merkezi, Konya.

Araştırmada materyal olarak 40 adet, 5 yaşlı, Merinos ırkı koyun kullanıldı. Aşımları izleyen 15., 16. ve 17. günlerde jugular kan örnekleri alınarak plazmaları çıkartıldı ve topluca işlenmek üzere -20°C derecede derin dondurucuda saklandı. Gebelik tanısı amacıyla plazma progesteron ve östradiol 17 β yoğunlukları RIA ile araştırıldı. Assay çalışmalarında Gamma sayıcı (Mini-assay, tip 6—20) ile ^{125}I Progesteron ve Östradiol 17 β direk hormon analiz kitleri kullanıldı. Hormon analizlerine göre, progesteron yoğunluğu 2ng/ml den yüksek olanlar gebe, düşük olanlar ise gebe değil olarak tanımlandılar. RIA bulguları doğumlar beklenerek karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi.

Çalışma sonunda progesteron değerlerine bakılarak gebe olanlarda % 84.62, gebe olmayanlarda ise % 85.72 oranında bir doğrulukla tanı yapmak mümkün oldu. Östradiol 17 β değerleri ise tek başına tanıya yardımcı olabilecek farklılıklar göstermedi.

Giriş

Evcil hayvanlarda gebelik tanısı ekonomik yönden büyük önem taşır. Özellikle aşım sezonu kısa süren koyunlarda gebeliğin ya da daha doğru bir yaklaşımla gebe kalmayanların erken tanısı önemlidir. Bu sayede gebe kalmamış olanların gebe bırakılmaları için gerekli özenin gösterilmesi mümkün olur. Gebelik tanısı koçun sürü içinde serbest dolaştığı durumlarda önemsenmeyebilir. Ancak modern yetiştiricilikte, kontrollü üremenin yapıldığı sürülerde, koçun kıymetli ve sayıca yetersiz olduğu durumlarda ve sun'i tohumlama uygulamalarında büyük değer taşımaktadır.

Çeşitli araştırmacılar (3, 5, 6, 11), koyunlarda gebelik tanısı amacıyla yirmi den fazla yöntem bildirmekle birlikte, Memon ve Ott (3), bunlar arasında en erken ve inanılır tanı şansı verenleri, immunolojik yöntemler, ultrases dalgaları, rekto-abdominal palpasyon ve vaginal biyopsi olarak ileri sürmektedirler.

Immunolojik yöntemlerden radyoimmunoassay (RIA) ile yapılan çalışmalarda, özellikle gebe olmayan koyunların tanısında % 90 ın üzerinde bir doğruluğa ulaşılmaktadır (11).

MacDonell (2), aşımı izleyen 15. günde, plazma progesteron yoğunluğunu gebe koyunlarda 4.81 ng/ml, gebe olmayanlarda ise 1.41 ng/ml olarak belirlemiştir.

Özsar (4), 35 adet Ankara keçisi üzerinde yaptığı çalışmada, öst-rüs sırasında progesteron düzeylerini ortalama 0.45 ng/ml, luteal

evrede ise en yüksek 3.45 ng/ml olarak saptamıştır. Araştırmacı 21. günde progesteron yoğunluğu 1.5 ng/ml ve yüksek olanları gebe olarak kabul ederek yüksek oranda doğrulukla tanı koyabildiğini bildirmektedir.

Thimoiner ve ark. (9), koyunlardan aşımı izleyen 18. günde topladıkları kan örneklerinde progesteron hormonu düzeylerini araştırarak, gebe olanlarda % 83.5, gebe olmayanlarda ise % 100 oranında doğru tanıya ulaşmışlardır. Yapılan bir diğer araştırmada (1), 46 koyunda aşımı izleyen 18. ve 70. günlerde plazma progesteron yoğunlukları araştırılarak, sırasıyla % 80 ve % 94 oranlarında gebelik tanısı yapıldığı ileri sürülmektedir.

Tamaini ve ark. (8), koyunlarda gebeliğin ilk 50—60 gününde plazmadaki total östron yoğunluğunun saptanamayacak kadar düşük olduğunu belirtirlerken, IAEA (1)'nin hazırladığı RIA laboratuvar teknikleri kitabında, koyunlarda östron sülfat düzeylerinin araştırılması ile gebelik tanısı konusunda henüz kesin sonuçlar elde edilemediği ileri sürülmektedir. Gebeliğin daha ileri dönemlerinde yapılan çalışmalarda ise; Thimoiner ve ark. (9), koyunlarda gebeliğin 100—110. günlerinde plazma östrojen düzeylerini ölçmüşler, 0.3 ng/ml. den yüksek olanları gebe kabul ederek % 99 a varan bir isabet elde etmişlerdir.

Sunulan çalışmanın amacı ise, anöstrüs döneminin sonunda ovaryum fonksiyonları egzogen hormonlarla uyarılan koyunlardan doğal aşımaları izleyen 15—17. günlerde toplanan kan örneklerinde progesteron ve östradiol 17 β düzeylerinin ölçülmesi ile erken gebelik tanısı şanslarını araştırmaktır.

Materyal ve Metot

1- Materyal :

Bu çalışma Tarım, Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait 40 adet koyun üzerinde yapıldı. Merinos ırkından olan bu hayvanlar 5 yaşlı olup, ortalama 3 doğum yapmışlardı. Araştırmada cüsse olarak birbirlerine yakın hayvanların seçilmesine özen gösterildi.

Koyunların bakım ve beslenme şartları normaldi ve seksüel siklusların kontrolü için hormon uygulamalarından önce ve uygulamalar

sırasında ek kesif yem verildi. Yetiştirmede taze sperma ile sun'i tohumlama uygulandığı halde deneme hayvanlarına doğal aşım yapıldı.

2- Metot :

2-1. Senkronizasyon ve tohumlama çalışmaları:

Çalışma materyali 10 ar koyunluk dört gruba ayrılarak;

1. Gruba: GnRH*, 250 µg i.m. (tek enjeksiyon) uygulandı
2. Gruba: MAP** (medroxyprogesteronacetate), vaginal (13 gün) uygulandı
3. Gruba: MAP + 500 UI PMSG*** i.m. uygulandı
4. Gruba: Hiçbir uygulama yapılmadı (Kontrol)

Hormon uygulamalarına 1987 Temmuz ayının son yarısında başlandı ve bir taraftan hormon düzeylerinin RIA ile ölçülmesiyle diğer taraftan da gruplar arasına koç katılarak, bu hayvanların anöstrüste oldukları garanti altına alındı.

2.2. Kan örneklerinin toplanması:

Deneme hayvanlarından jugular kan örnekleri, aşımaları izleyen 15, 16. ve 17. günlerde toplandı. Alınan örnekler 2000 rpm de 20 dakika santrifüje edilerek plazması ayrıldı ve özel plastik assay tüplerine aktarıldı. Örneklemeler tamamlanıncaya kadar kan plazmaları -20C derecede, derin dondurucuda saklandı.

2.3. RIA Çalışmaları:

Tüm örnekler toplandıktan sonra Konya Özel Nükleer Tıp Merkezinde RIA yöntemi ile plazma progesteron ve östradiol 17 β düzeyleri tayin edildi.

RIA çalışmalarında;

Gamma sayıcı (Mini-assay tip, 6—20), derin dondurucu, vorteks mikser, su banyosu (37°C dereceye ayarlı), yarı ve tam otomatik ayarlanabilir socorex pipetler (50—1000 ml) ve aksesuar laboratuvar aletleri ile,

* Fertagyl, enj.sol., Intervet, Hollanda.

** Veramix, sponge, 60 mg, Upjohn, İngiltere.

*** Folligon, amp., 1000 UI, Intervet, Hollanda.

¹²⁵I Progesteron Analiz Kiti, IMM 1024****

¹²⁵I Östradiol 17 β analiz Kiti, IMM 1018**** direkt hormon analiz kiti kullanıldı.

RIA çalışmaları IAEA (1)'nin tarif ettiği şekilde yürütüldü.

2.4. Bulguların değerlendirilmesi:

Hormon düzeylerinin ölçülmesinden sonra, deneme hayvanlarının doğumları beklendi ve laboratuvar bulguları ile karşılaştırılarak doğru tanı oranları belirlendi.

Bulgular

Toplam 40 adet koyunda, gebelik tanısı amacıyla belirlenen plazma progesteron ve östradiol 17 β değerleri ve diğer çalışma bulguları tablolar ve grafikler biçiminde sunulmuştur.

Tablo 1. Gebe ve gebe olmayan koyunlardaki progesteron ve östradiol 17 β değerleri (17. gün).

Hormon	Gebe (+)				Gebe değil (—)			
	n	min.	max.	ort.	n	min.	max.	ort.
Progesteron (ng/ml)	20	2.40	14.40	6.78	10	0.80	1.60	0.54
Östradiol 17 β (pg/ml)	20	0.25	54.00	26.91	10	0.35	100.0	33.53

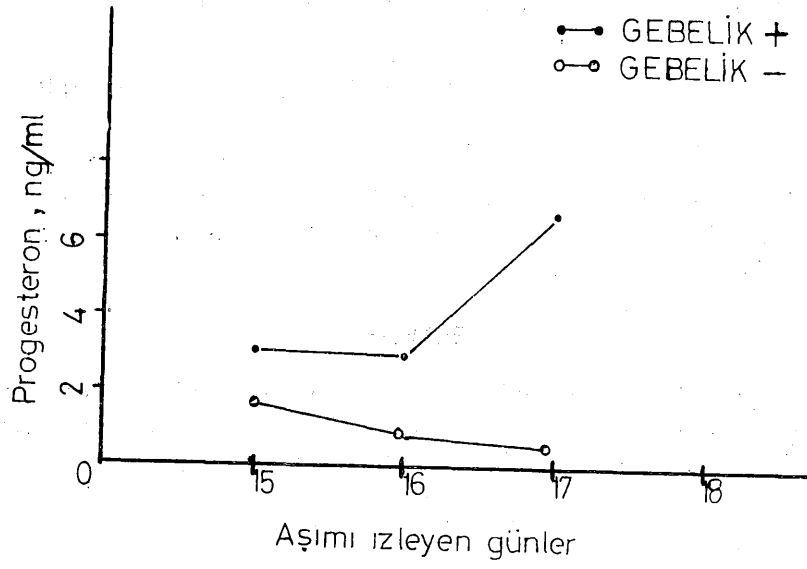
Tablo 2. Gebe koyunlarda örnekleme günlerine göre progesteron ve östradiol 17 β değerleri.

Hormon	n	Günler			
		15.	16.	17.	Ortala.
Progesteron (ng/ml)	20	3.04	2.98	6.78	4.26
Östradiol 17 β (pg/ml)	20	3.64	26.84	26.91	19.13

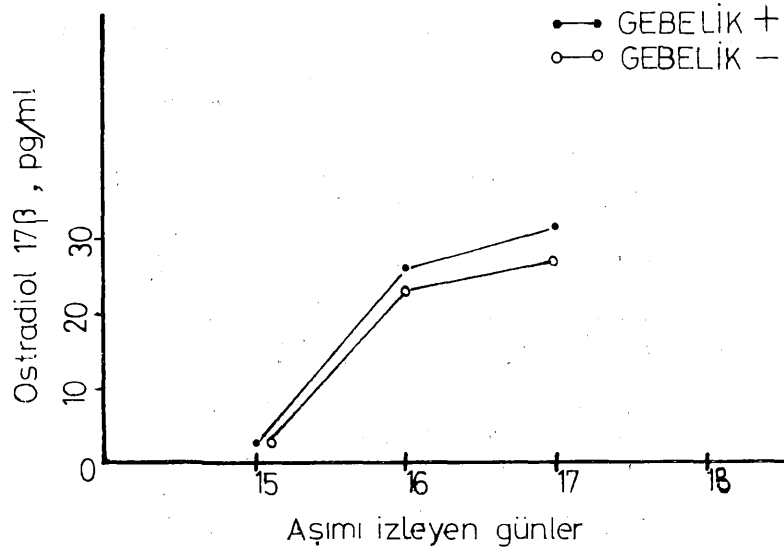
Tablo 3. Gebelik tanısı yönünden RIA testinin doğruluk oranları.

Hormon	Gebe (+)	Gebe değil (—)
Progesteron	% 84.62	% 85.72

**** Immuchem Corp., A.B.D.



Grafik 1, Progesteron hormonu eğrileri



Grafik 2. Östradiol 17β hormonu eğrileri.

Tartışma ve Souç

Modern koyun yetiştiriciliğinde parasal yönden önemli bir yeri olan erken gebelik tanısı konusunda, RIA yönteminin değişik birçok çalışmada % 90 ın üzerinde bir doğrulukla kullanıldığı bildirilmektedir (1, 4, 11). Bu arada özellikle gebe olmayan hayvanların tanısında başarı oranının daha da yüksek olduğu ileri sürülmektedir (14). Literatür çalışmalarında (2, 4, 7), daha çok gebeliğin 16—18. günleri arasında progesteron hormonu ölçümleri yapılarak, gebe koyunlarda 4 ng/ml veya daha yüksek, gebe olmayanlarda ise 1 ng/ml den daha düşük olarak (0.15—0.8 ng/ml) değerler elde edilmiştir. Sunulan çalışmada da plazma progesteron hormonu düzeyleri, 17. günde, gebe olanlar için ort. 6.78, gebe olmayanlar için ise ort. 0.54 ng/ml olarak belirlenmiştir. Çalışma sırasında 2 ng/ml den yüksek değerler gebe, bundan düşük olanlar ise gebe değil şeklinde tanımlanmıştır.

Bazı araştırmacılar (8, 9, 10), östradiol 17 β düzeylerinin tayini ile gebelik tanısı konusunda, erken gebelikte sonuç alınmayacağını, ancak 100. günden sonra tanıda yardımcı olabileceğini ileri sürmektedirler. Sunulan çalışmada 17. günde östradiol 17 β düzeyleri, gebelerde ort. 26.91 pg/ml, gebe olmayanlarda ise ort. 33.53 pg/ml olarak belirlenmiştir. Östrüse yakın, östradiol 17 β düzeyinin yükseleceği varsayımıyla, gebe olmayan koyunların tanınması amacıyla yapılan bu ölçümlerde, gebe olanlarla olmayanlar sadece östradiol değerlerine bakılarak ayırt edilememiştir.

Araştırmacılar (4, 9, 11), RIA yöntemiyle progesteron yoğunluğunu ölçerek doğru gebelik tanısı oranlarını, gebelerde % 85 gebe olmayanlarda ise % 100 olarak bildirmektedirler. Bu çalışmada da gebe olanlarda % 84.62, gebe olmayanlarda % 85.72 oranında doğru tanı konulabilmiştir.

Bazı araştırmacıların (1, 9), gebelik ilerledikçe ve özellikle 60. günden sonra progesteron hormonu yoğunluğunun artmasına paralel olarak daha belirgin sonuçlar alınabileceğini öne sürmelerine karşılık, özellikle yerli koyun ırklarının aşım sezonu içinde az sayıda seksüel siklus gösterdikleri ve gebelik tanısında amacın, gebe olmayanların mümkün olduğunca erken tanınması olduğu göz önünde tutulursa, araştırmaların hemen tamamı, bu çalışmada da yapıldığı gibi, aşımı izleyen 15—18. günler arasında yoğunlaştırılmaktadır.

Sunulan çalışmada, seksüel siklusların senkronizasyonuna ve uygulanan hormonlara ilişkin olarak, gebelik tanısı amacıyla aranarak

belirlenen hormon değerleriyle, normal olarak sezon içinde gebe bırakılanlar için literatürde belirtilen değerler arasında önemli bir fark görülmedi. Buna karşılık senkronizasyon işlemi hayvanlardan yapılan örneklemeler yönünden büyük kolaylıklar sağlamıştır.

Kontrol grubundaki koyunlarda ise henüz aşım sezonuna girmediklerinden plazma hormon yoğunlukları 0.1 ng/ ml den düşük değerler göstermiştir.

Sonuç olarak, 40 koyun üzerinde erken gebelik tanısı amacıyla yapılan bu çalışmada, aşımı izleyen 17. gündeki rakamlar göz önünde tutularak, gebe olanlarda % 84.62, gebe olmayanlarda ise % 85.72 oranında bir doğrulukla gebelik tanısı sağlanmıştır. RIA ile hormon tayinlerinin değerlendirilmesinde progesteron hormonu düzeyleri tanıya yardımcı bulgular verirken, östradiol 17 β düzeyleri ancak progesteronla birlikte değerlendirilebilecek farklılıklar göstermiştir.

Kaynaklar

1. **International Atomic Energy Agency** (1984) *Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction*, Technical Report Series, No: 233, Vienna.
2. **MacDonell, H.** (1976) *Peripheral plasma progesterone in the ewe: It's application to the diagnosis of early pregnancy following synchronisation treatment*, Irish Vet. J., 30, 11, 15.
3. **Memon, M.A. and Ott, R.S.** (1980) *Methods of pregnancy diagnosis in sheep and goats*, Correll vet., 70, 226-231.
4. **Özsar, S.** (1983) *Ankara keçilerinde erken gebelik tayini ve fertilité kontrolunda radioimmunoassay (RIA) ile progesteron düzeylerinin saptanması: RIA tekniğinin keçi serumu için geçerliliğinin kontrolü*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 95.
5. **Richardson, C.** (1972) *Pregnancy diagnosis in the ewe: A review*, Vet. Rec., 90, 264-275.
6. **Robertson, H.A., Chan, J.S.D., Hackett, A.J., Marcus, G.J. and Priesen, H.G.** (1980) *Diagnosis of pregnancy in the ewe at mid-gestation*, Anim Reprod.Sci., 3, 67-71.
7. **Swenson, M.J.** (1977) *Duke's Physiology of Domestic Animals*, 9th Ed., Cornell Univ. Press, London, 914.
8. **Tamanini, C., Chiesa, F., Parandi, A. and Galeati, G.** (1986) *Estrone and estrone conjugate plasma levels throughout pregnancy in the goat: Their determination as a pregnancy diagnosis test*, Anim. Reprod. Sci., 11, 35-42.
9. **Thimoiner, J.M., Bosc, M., Dijane, J., Martel, J. and Terqui, M.** (1977) *Hormonal diagnosis of pregnancy and number of fetuses in sheep and goats*, Symposium of Management of Reproduction in Sheep and Goats, University of Wisconsin, Madison, 79-88.
10. **Thorburn, G.D., Nicol, D.A., Bassett, J.M., Scgutt, D.A. and Cox, R.I.** (1972) *Parturition in the sheep and goat: Changes in corticosteroids, progesterone, oestrogens and prostaglandin*, F. J. Reprod. Fert., 16, 61-84.
11. **West, D.M.** (1980) *Pregnancy diagnosis in the ewe, (As quoted), D.A. Morrow, Editor, "Current Therapy in Theriogenology"*, W.B. Saunders, London, 900-902.