

KISRAKLARDA KAN PROGESTERON DÜZEYİNİN ÖLÇÜMÜ İLE GEBELİĞİN TANISI

Muzaffer Çelebi¹, Çetin Kılıçoğlu²

Pregnancy diagnosis in mares by determination of the blood progesterone concentration

Summary: *In this study the serum levels of progesterone in mares were determined by Radioimmunoassay (RIA) and Enzymeimmunoassay (EIA) for early pregnancy diagnosis on day 20 following mating.*

Serum progesterone concentrations on day 20th after first mating were obtained to be 5.8 ± 1.53 ng/ml and 0.83 ± 0.37 ng/ml by RIA, 5.7 ± 1.42 ng/ml and 0.74 ± 0.28 ng/ml by EIA in pregnant and non-pregnant mares, respectively.

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

Keywords: *Pregnancy Diagnosis, Progesterone, Mare.*

Özet: *Bu çalışmada, gebeliğin erken dönemde teşhisi amacı ile ilk çiftleşmeden sonraki 20. günde kan progesteron düzeyleri Radioimmunoassay (RIA) ve Enzymeimmunoassay (EIA) yöntemleri ile karşılaştırılmaları olarak ölçüldü.*

İlk çiftleşmeden sonraki 20. günde serum progesteron düzeyi, gebe olanlarda RIA ile 5.8 ± 1.53 ng/ml, gebe olmayanlarda 0.83 ± 0.37 ng/ml, EIA ile gebe olanlarda 5.7 ± 1.42 ng/ml, gebe olmayanlarda ise 0.74 ± 0.28 ng/ml tespit edildi.

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

Anahtar Kelimeler: *Gebelik teşhisi, Progesteron, Kısрак.*

Giriş

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

Korpus luteum hormonu olan progesteron'un kanda veya sütte Radioimmunoassay (RIA) veya Enzymeimmunoassay (EIA) ile yoğunluğu tesbit edilerek gebeliğin erken tanısı yapılabildiği gibi ovaryum fonksiyonları da izlenebilmektedir.

Bu tekniklerin kısraklarda uygulamaya konulması ile bugün gebelik teşhisi için kullanılmakta olan rektal ve vaginal muayene uygulamaları en aza indirilerek, bu metodlara bağlı

olarak oluşabilecek rektum yaralanmaları, abortlar, embriyonik ve fetal ölüm oranları azaltılabilir, ayrıca iş gücü ve zamandan kazanılabilir. Rektal muayeneye izin vermeyen kısrakların gebeliği bu yöntemlerle kontrol edilerek bunların neden olduğu iş kazaları azaltılabilir.

Terblanche ve Maree (9) gebe kısraklarda çiftleşmeden sonraki 21. günde plasma progesteron düzeyini 5-9 ng/ml, Margaret ve ark. (3) 5-16 ng/ml, Muesi ve ark. (4) 10.3-23.9 nmol/l, Sato ve ark. (7) çiftleşmeden sonraki 20. günde gebelerde 5.8 ng/ml, gebe olmayanlarda ise 1 ng/ml olarak bildirilmektedirler. Tomasgard ve Benjaminsen (10) 64 kısrakta yaptıkları çalışmada gebe kısrakların kan progesteron düzeyini çiftleşmeden 3 hafta sonra 2 ng/ml'nin üstünde, gebe olmayanlarda ise 2 ng/ml'nin altında bulmuşlardır. Vries ve ark. (11) tohumlamadan 18 gün sonra kan progesteron düzeyini ölçerek gebeliği belirlemek amacıyla 75 kısrakta yaptıkları çalışmada, gebelik eşik sınırını 2 ng/ml kabul ederek gebe olmayanların teşhisindeki doğruluk oranını %100, gebe olanların teşhisindeki doğruluk oranını da %78.3 olarak bildirmektedirler. Embriyonik ölümler dikkate alındığında pozitif teşhisin güvenilirliğini %91.6, tüm testin güvenilirliğini ise %87.4 olarak bildirmektedirler. Palmer ve ark. (5) 72 kısrakta yaptıkları çalışmada progesteron düzeyi 1.5 ng/ml'den düşük olan tüm kısrakların gebe olmadığını, yüksek olanların ise gebe olduğunu tesbit edip, bu yöntemle gebeliğin teşhisindeki doğruluk oranını %96 olarak bildirmektedirler. Elmore ve ark (1) gebeliği rektal palpasyon ve ultrason ile doğruladıkları çalışmalarında gebe kısrakların kan progesteron düzeylerinin çiftleşmeden sonraki 3. haftada 2 ng/ml den düşük olmadığını bildirmektedirler.

Bu çalışmada kısraklarda çiftleşmeden sonraki 20. günde kan progesteron düzeylerinin RIA ve EIA yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak ölçülüp gebeliğin erken dönemde teşhis edilmesi ve son tohumlamadan yapıldığı gün ile son tohumlamadan sonraki 6. günde kan progesteron düzeylerinin tesbit edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma Gemlik Askeri Veteriner Araştırma ve Eğitim Merkez Komutanlığı Yetiştirme-sindeki 20 kısrakta yürütüldü. Çalışmaya 1991 yılı Mayıs ayının 2. yarısında başlandı. Kısrakların kızgınlığı Aygır muayenesi ile tesbit edildi. Tohumlama kızgınlığının 1. gününden başlayarak 48 saatte bir tekrarlamak suretiyle doğal aşım ile yapıldı. Tohumlamadan sonraki 60 günde rektal palpasyon ile gebelik araştırıldı.

Kan örnekleri son tohumlamadan yapıldığı gün; son tohumlamadan sonraki 6. gün ve ilk tohumlamadan sonraki 20. günde olmak üzere toplam 3 kez, vena jugularisten yaklaşık 3 ml alındı. 3000 rpm'de 15 dakika santrifüje edilerek serumlar ayrıldı ve hormon analizleri yapılabilmek için -20°C'de saklandı. Serumda progesteron RIA (8) ve EIA (6) yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak tayin edildi. RIA ve EIA ile elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyon MS-DOS minitab standart versiyonlu paket program kullanılarak hesaplandı. RIA ile progesteron tayininde standartlar progesteron içermeyen at serumunda 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 ng/ml olacak şekilde hazırlandı. Deney tüplerine 20 µl serum veya standart, 100 µl 3H-progesteron, 100 µl progesteron antikoru ve 300 µl tampon kondü ve 60 dakika 37°C'de, 1 gece + 4°C'de inkübe edildi. Serbest kısımlar aktif kömür ile ayrıldıktan sonra bağlı kısım beta sayacında sintilatör içinde sayıldı. Sonuçlar standart eğriden okunarak hesaplandı.

EIA ile progesteron tayininde çift antikoru mikrotitrasyon plak enzimeimmunoassay yöntemi kullanıldı. Standartlar progesteron içermeyen at serumunda 0.375, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 ng/ml düzeyinde olacak şekilde hazırlandı. Tavşan IgG'sine karşı koyunlarda üretilen antiserumdan saflaştırılan IgG ile kaplanan mikroparlaklara 1 µl serum, 100 µl progesteron antiserumu ve 100 µl horse redish peroxidase (HRP) enzimi ile işaretli progesteron konjugatı pipetlendi. 37°C'de 2 saat inkübasyondan sonra plaklar 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Plaklara delik başına 150 µl substrat solüsyonu kondü ve plaklar 40 dakika oda ısısında inkübe edildi. Her deliğe 50 µl 4N H₂SO₄ ilave edilerek renk reaksiyonu durduruldu ve oluşan renk yoğunluğu fotometrede 450 nm filtre kullanılarak okundu. Sonuçlar standart eğriden okunarak hesaplandı.

Bulgular

Kan progesteron ölçümleri sonucu gebe kabul edilen 16 kısrakta son tohumlamadan yapıldığı gün progesteron miktarı RIA ile 0.36±0.22 ng/ml, EIA ile 0.36±0.18 ng/ml (Tablo 1), son tohumlamadan sonraki 6. günde RIA ile 7.3±1.96 ng/ml, EIA ile 7.2±2.1 ng/ml, (Tablo 2), ilk tohumlamadan sonraki 20. günde RIA ile 5.8±1.53 ng/ml, EIA ile 5.7±1.42 ng/ml (Tablo 3) ölçüldü. Gebeliğin 60. gününde yapılan rektal palpasyonda, progesteron ölçümleri sonucu gebe kabul edilen 16 kısraktan 2'sinin gebe olmadığı anlaşıldı. Bu 2 kısrakın progesteron düzeyleri RIA ile 4.9 ng/ml ve 5.7 ng/ml, EIA ile 4.5 ng/ml ve 4.6 ng/ml olarak ölçüldü.

Tablo 1: Gebe kısıraklarda son tohumlamadan yapıldığı gün kan progesteron düzeyleri.

Table 1: Levels of progesterone on the day of last mating in pregnant mares

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

Tablo 2: Gebe kısıraklarda son tohumlamadan sonraki 6. gün kan progesteron düzeyleri

Table 2: Levels of progesterone on 6th day after last mating in pregnant mares.

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

Tablo 3: Gebe kısıraklarda ilk tohumlamadan sonraki 20. gün kan progesteron düzeyleri

Table 3: Levels of progesterone on 20 th day after first mating in pregnant mares.

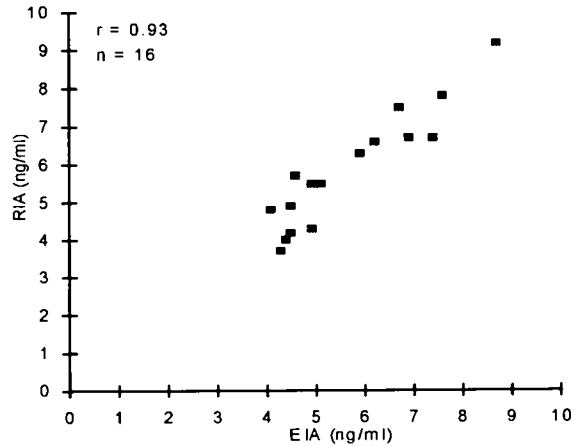
n:16

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

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

Şekil 1: RIA ve EIA ile tayin edilen progesteron miktarlarının karşılaştırılması.

Fig. 1: The comparison of the progesterone levels determined by RIA and EIA.



Gebe kısıraklarda siklusun 20. günü RIA ve EIA ile tayin edilen progesteron miktarları karşılaştırılarak her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyon $r=0.93$ olarak hesaplandı ve bu korelasyonun istatistiki olarak önemli olmadığı ($p>0.50$) anlaşıldı (Şekil 1).

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

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada gebe kısırakların kan progesteron düzeyi ilk çiftleşmeden sonraki 20. günde

Tablo 4: Gebe olmayan kısıraklarda son tohumlama günü, son tohumlamadan sonraki 6. gün ve ilk tohumlamadan sonraki 20. gün kan progesteron düzeyleri.
 Table 4: Levels of blood progesterone on the last and on 6 th day after last mating and on 20 th day after the first mating in non-pregnant mares.
 n:4

Son tohumlama günü	Son tohumlamadan sonraki 6. gün	İlk tohumlamadan sonraki 20.gün
RIA (ng/ml)	RIA (ng/ml)	RIA (ng/ml)
0.67	11.10	1.38
0.20	6.20	0.71
0.44	6.23	0.73
0.33	5.20	0.53
x=0.41±0.19	x=7.18±2.65	x=0.83±0.37
EIA (ng/ml)	EIA (ng/ml)	EIA (ng/ml)
0.72	11.70	1.10
0.18	6.40	0.61
0.53	5.90	0.82
0.38	5.40	0.45
x=0.45±0.22	x=7.33±2.95	x=0.74±0.28

RIA ile 5.8 ± 1.53 ng/ml, gebe olmayanlarda ise 0.83 ± 0.37 ng/ml ölçüldü. Gebe olanlarda en düşük progesteron düzeyi 3.7 ng/ml, en yüksek ise 9.2 ng/ml tesbit edildi. Gebelerden ve gebe olmayanlardan elde edilen progesteron değerleri diğer araştırmacıların sonuçlarına uyum gösterdi (32, 4, 7, 9).

Son tohumlamanın yapıldığı gün kan progesteron değerlerinin RIA ile 0.36 ± 0.22 ng/ml, EIA ile 0.36 ± 0.18 ng/ml olarak bulunması tohumlamanın uygun zamanda yapıldığını, son tohumlamadan sonraki 6. gün kan progesteron değerlerinin RIA ile 7.3 ± 1.96 ng/ml, son tohumlamadan sonraki 6. gün kan progesteron değerlerinin RIA ile 7.3 ± 1.96 ng/ml, EIA ile 7.2 ± 2.1 ng/ml bulunması ise progesteron düzeyinin pik seviyesine ulaştığını gösterdi.

Serum progesteron seviyesine bağlı olarak yapılan gebelik teşhisindeki doğruluk oranlarını Lorin ve ark. (2) 17-19 günlük gebeliklerde %84.6, Tmasgard ve Benjaminsen (10) 3 haftalık gebeliklerde %94, Palmer ve ark. (5) 18 günlük gebeliklerde %96 olarak bildirmektedir.

Bazı araştırmacılar (1, 10) çiftleşmeden sonraki 21. günde gebeliğin teşhisi için progesteronun eşik sınırını 2 ng/ml olarak bildirmektedirler. Vries ve ark. (11) 2 ng/ml'den yüksek progesterona sahip kısırakları gebe kabul ettikleri çalışmada gebe olanların teşhisindeki doğruluk oranını %91.6, gebe olmayanların teşhisin-

deki doğruluk oranını da %100 olarak bildirmektedirler.

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

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

Sonuç olarak, RIA ve EIA teknikleri ile progesteron hormonunun ölçülmesi, gebeliğin erken teşhisi amacı ile kullanılabilirliği gibi, bu alanda yapılacak diğer çalışmalarla kısıraklarda önemli ekonomik kayıplara neden olan çeşitli infertilite problemlerinin tanısı ve sağaltımı mümkün olacaktır.

Kaynaklar

- Elmore, R.G., Kloppe, L.H., Varner, D.D., Meyers, P.J. (1988). *Clinical applications for progesterone assays in equine practice*. Vet. Med. 83, 294-297.
- Lorin, D., Mostl, E., Choi, H.S., Schmechlik, O., Arbeiter, K. (1986). *Direkte und indirekte trachtigkeitsdiagnose bei der stute-anwendungszeitpunkt und diagnostische sicherheit*. Wien. tierarztl. Mschr. 73, 83-86 "Alınmıştır" Anim. Breed. Abst. 54, 6371, 1986.

3. **Margaret, J., Evans, Irvine, C.H.G.** (1975). *Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare.* J. Reprod. Fert. Suppl. **23**, 193-200.
4. **Muesi, I., Falkay, G., Kuesora, I.** (1989). *A magyar felver fajtaju kancak vemhessegenek, megallapitasa a ver progeszterontartalma alapjan.* Magy. Allatorv. Lap. **44**, 217-219 "Alınmıştır" Anim. Breed. Abstr. **60**, 2263, 1990.
5. **Palmer, E., Thimonier, J. Lemon, M.** (1974). *Early pregnancy diagnosis in the mare by estimation of the level of progesterone in the peripheral blood.* Livestock Prod. Sci. **1**, 197-206.
6. **Prakash, B.S., Meyer, H.D., Schallanberger, E. Van De Viel, D.V.M.** (1987). *Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody techniques.* J. Steroid Biochem **28**, 623-627.
7. **Sato, K., Miyake, M., Yoshikawa T., Kambe-gava, A.** (1975). *Alterations in serum progesterone level of pregnant and non-pregnant mares.* Jap. J. Anim. Reprod. **21**, 113-115.
8. **Smith, V.G., Edgerton, H.D., Convey, E.M.** (1973)a. *Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy, parturition and early lactation.* J. Anim. Sci. **36**, 391-3896.
9. **Terblanche, H.M.M., Maree, I.** (1981). *Plasma progesterone levels in the mare during the oestrous cycle and pregnancy.* J. S. Afr. Vet. Med. Ass. **52**, 181-185.
10. **Tomasgard, D., Benjaminsen, E.** (1975). *Plasmapro-gesteron hos hopper som viser brunst under tidlig dregtighed.* Nord. VetMed. **27**, 570-574 "Alınmıştır" Anim. Breed. Abstr. **45**, 2652, 1977.
11. **Vries, P.J., Holst, W., Van, D.** (1983). *De waarde van een progesterobepaling in bloedplasma rond de 18e dag post ovulationem voor het drachtigheidsonderzoek bij de merrie.* Tijdschr. Diergeneesk. **108**, 401-406. "Alınmıştır" Anim. Breed. Abstr. **51**, 5364, 1983.