

KIVIRCIK IRKI KOYUNLARDA PROGESTERON DÜZEYLERİNİN RADIOİMMUNOASSAY YÖNTEMLERİNE SAPTANMASI VE ERKEN GEBELİK TANISI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

İ. Kâmuran İLERİ¹

Huriye HOROZ²

Kemal AK¹

Adem ŞENÜNVER²

Untersuchungen zur frühen Trächtigkeitsdiagnose bei den Kıvrıkcık Schafen durch Bestimmung von Plasmalogesteronspiegel nach RIA-Verfahren.

ZUSAMMENFASSUNG

Dieser Arbeit wurde bei 60 Kıvrıkcık Schafen im Versuchsgut der Tierärztlichen Fakultät der Universität Istanbul durchgeführt. In die Vagina der sich in der Deckseason befindeten Schafen wurden die FGA (Fluorogestone acetate) beinhaltenen Schwämmchen für 14 Tage eingelegt und am letzten Tag der Behandlung wurden den Tieren 500 IE PMSG i.m. verabreicht. Am 18. Tag nach der Deckung wurden die Blutproben durch Punktion von V. jugularis in heparinisierten Röhrchen entnommen und dann wurden die Proben bei 3000 UPM zentrifugiert. Das entstandene Plasma wurde bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Bei allen zur Brunstsynchrisation behandelten Schafen wurde die Östrus beobachtet. 38 von gedeckten 60 Schafen lammten ab (63.33 %) und davon wurde 42.1 % Zwillingsrate erzielt.

Die Schafe, die bei der Progesteronbestimmung durch RIA 1 ng/ml und darüber die Werte gezeigt haben, wurden als tragend angenommen. Bei den nicht abgelammtten 22 Schafen wurden die Progesteronwerte durchschnittlich 1.00±0.15 ng/ml, bei den Einlingsmüttern (22 Schafe) 2.35±0.25 ng/ml und bei den Zwillingsmüttern (16 Schafe) 3.12±0.34 ng/ml gemessen. Nach den Ergebnissen war der Unterschied der Progesteronwerte zwischen tragenden und nichttragenden Schafen hochsignifikant höher (P<0.001). Der Unterschied der Progesteronwerte war zwischen den Einlings- und Zwillingsmüttern nicht signifikant.

In dieser Arbeit wurde die Richtigkeit der Diagnose nach den Ergebnissen bei den tragenden Schafen als 82.6 % und die Richtigkeit der Diagnose bei den nichttragenden Schafen als 100 % festgestellt.

SCHLÜSSEL WÖRTER: Kıvrıkcık schafen, traechtigkeit, progesteron, RIA

ÖZET

Araştırma, İ.Ü. Veteriner Fakültesi Araştırma, Eğitim ve Uygulama Çiftliği'nde bulunan 60 baş Kıvrıkcık koyunu üzerinde gerçekleştirildi. Aşım sezonunda bulunan bu hayvanlara, 14 gün süreyle FGA (Fluorogestone acetate) içeren süngerler yerleştirildi ve son günde 500 IU PMSG enjekte edildi. Tohumlamadan sonraki 18. gün V. jugularis'ten kan alınarak plazmaları ayrıldı ve plazmalar RIA yöntemiyle progesteron düzeyleri saptanmaya kadar -20°C de saklandı.

Bütün koyunlarda östrus gözlemlendi, tohumlanan hayvanlardan 38'i doğum yaptı (% 63.33) ve ikizlik oranı % 42.1 olarak belirlendi.

1 ng/ml ve üzerinde plazma progesteron düzeyi gösteren koyunların gebe kabul edildiği çalışmada, doğum yapmayan 22 koyunda ortalama progesteron düzeyi 1.00±0.15 ng/ml, tek doğum yapanlarda (22 adet) 2.35±0.25 ng/ml ve ikiz doğum yapanlarda (16 adet) 3.12±0.34 ng/ml olarak bulundu.

Verilere göre tek ve ikiz doğum yapanlarla, gebe kalmayanlar arasındaki progesteron düzeyleri farkı, istatistiksel açıdan önemli (P<0.001), tek ve ikiz doğum yapanlar arasındaki fark ise önemsiz bulundu.

Çalışmada, RIA yöntemiyle gebelik teşhisinin doğruluğu % 82.6; gebe olmayanlarda ise teşhisin doğruluğu % 100 olarak gerçekleşti.

ANAHTAR KELİMELER: Kıvrıkcık koyunu, gebelik, progesteron, radioimmunoassay.

GİRİŞ

Ülkemiz koyun varlığının 40 600 000 baş olduğu düşünüldüğünde (20), değişik ırklardan oluşan bu populasyon üzerinde kimi biyoteknolojik çalışmalar yaparak onlardan en iyi şekilde faydalanmak amaçlar arasında yer almalıdır.

Biyoteknolojik çalışmaların başında gelen sun'i tohumlama uygulamalarının, sığırlara kıyasla koyunlarda oldukça düşük düzeyde gerçekleştirildiği görülmektedir (14, 15, 17). Bu faaliyetlerin düzenlenmesinin başında koyunlarda östrusun mevsim içi ve dışı kontrol altına alınması gerekmektedir (2, 9, 14, 17, 21). Östrus senkronizasyonu olarak adlandırılan bu olay ya PGF2α kullanılarak luteal devreyi kısaltmaya (mevsim içi) ya da progestogenler kullanarak folliküler evreyi baskılamaya (mevsim içi ve dışı) yöneliktir (2, 10, 14, 17, 21).

Hormon preparatları koyunlara süngerler, koltuk altı; deri implantları, oral veya enjeksiyon şeklinde apliedilmektedir ve progesteron uygulamalarının son gününde ayrıca PMSG enjekte edilerek östrus göstermeleri ve ovulasyon yapmaları sağlanmaktadır (2, 3, 4, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 18).

Senkronizasyonu takiben meydana gelen östrusta yapılan tohumlama çalışmalarından düşük fertilitte sonuçları bildirilirken (7, 8, 11, 12); kimi araştırmacıların, optimal gebelik sonuçları elde ettikleri görülmektedir (9, 10, 19, 21).

Son yıllarda tohumlamadan sonraki 17-20. günler arasında plazma

progesteron düzeylerinin saptanması, koyunlarda erken gebelik teşhisinde yöntem olarak kullanılmaktadır (3, 4, 18, 22). Yöntemin esası, tohumlamadan sonra 17-20. günler arasındaki kan progesteron düzeylerinin gebe kalmayan koyunlarda 1 ng/ml'den az, gebelerde ise 1-11 ng/ml civarında ölçülmesine dayanmaktadır (9, 18).

EIA ve RIA yöntemlerinin, bu amaçla yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (1, 3, 4, 6, 18, 22). Tohumlamadan sonraki 17-20. günlerde, Karacabey Merinosları üzerinde EIA ile yapılan çalışmalarda gebelik için 0.5 ng/ml'yi esas alan Ünal ve ark. (22) % 95.3 oranında gebelik teşhisi doğruluğunu saptarlarken; yine, EIA ile İvesi x Akkaraman melezlerinde araştırma yapan Alan (4), bu oranı % 100 olarak belirlemiştir.

Türkgeldi koyunlarında, gebeliğin 18. gününde aynı yöntemle araştırma yapan Özpınar ve ark. (18), gebelerde ortalama 5.91±2.80 ng/ml progesteron konsantrasyonu bulmuşlar ve yöntemin erken gebelik teşhisinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

RIA yöntemiyle Merinos ırkı koyunlarda çalışan Alaçam ve ark. (3) ise; 17. günde, progesteron seviyelerini ortalama 6.78 ng/ml olarak bulmuşlar ve 2 ng/ml'den yüksek değerlerdeki verileri gebe kabul ederek araştırma sonunda gebelerde % 84.62, gebe olmayanlarda % 85.72'lik doğruluk oranları saptamışlardır.

Tohumlamadan sonraki 18. günde, kan progesteron tayinini karşılaştırmalı olarak EIA ve RIA ile yürüten Flores ve ark. (6), 1 ng/ml ve üzerinde progesteron konsantrasyonu gösteren koyunları gebe kabul etmişler ve pozitif gebelik oranını RIA ile % 89.9 ve EIA ile % 91.6, negatif diagnoz oranlarını Araştırmacılar (6) sırasıyla % 90 ve % 86.9 olarak saptamışlardır. Her iki yöntemin, gebelik teşhisi için benzer sonuçlar verdiklerini, ancak RIA'nın gebe olmayanların teşhisinde daha güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

1: İ.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Toh. Anabilim Dalı 34850 Avcılar-İstanbul.

2: İ.Ü. Vet. Fak. Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı 34850 Avcılar-İstanbul.

Sunulan bu çalışma ile Kıvrıcık ırkı koyunlarda, tohumlamadan sonraki 18. günde kan örneklerinde progesteron düzeylerinin RIA yöntemiyle belirlenerek, gebeliğin erken dönemde tanısı amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışma, İ.Ü. Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde bulunan, bir kez doğum yapmış, 60 baş Kıvrıcık ırkı koyunda gerçekleştirildi.

Haziran 1994 başlangıcında belirli aralıklarla sürüye arama koçu katıldı ve Temmuz ayının 2. yarısında koyunların mevsimsel östrusa girdiğine karar verildi. Ağustos ayı başlangıcında tüm koyunların vaginasına 14 gün süreyle 40 mg FGA (Fluorogestone acetate)* içeren süngerler yerleştirildi. 14. günde süngerler çıkartılarak aynı gün 500 İÜ PMSG** uygulandı. Arama koçu ile östrusu belirlenen koyunlar, elde sıfat yöntemiyle tohumlandı. Tohumlama tarihi 0. gün olarak kabul edildi ve 18. günde her koyundan 10'ar ml kan alındı. Vena jugularis'ten heparinli cam tüplere alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Örnekler, ölçüm gününe kadar -20°C'de saklandı.

Ölçümlerde hazır ticari kitleler*** kullanıldı. Progesteron düzeyi, örneklerin alınmasından yaklaşık 60 gün sonra radioimmunoassay yöntemle, gama counterde incelendi. Progesteron düzeyi 1 nI/mg ve üzerinde değer gösteren koyunlar gebe kabul edildi.

Gebeliği takip edilen koyunlarda, doğumların 6 gün içerisinde tamamlandığı görüldü.

Doğumlar sona erdikten sonra, elde edilen veriler, hormonal değerler ile karşılaştırılarak "Gebelik Diagnozunun Doğruluğu" = Doğru Pozitif (DP) / Doğru Pozitif (DP) + Yanlış Pozitif (YP), "Gebe olmayanların Diagnozunun Doğruluğu" = Doğru Negatif (DN) / Doğru Negatif (DN) + Yanlış Negatif (YN) formülüyle Flores ve ark. (6)'larının tanımlamasına göre hesaplandı.

Tohumlamayı izleyen 18. gündeki progesteron düzeylerinin frekans dağılımında ise; Ünal ve ark. larının, değerlendirmesi örnek alındı (22). İstatistiksel analizlerde "t - testi"nden yararlanıldı.

BULGULAR

Senkronize edilen 60 koyunun tamamının östrus gösterdiği, tohumlanan hayvanlardan 38'inin doğum yaptığı ve toplam 54 kuzu alındığı Tablo 1'de görülmektedir.

Çiftleşme sonrası plazma progesteron düzeyleri; doğum yapmayan, tek doğum yapan ve ikiz doğum yapan koyunlar olmak üzere karşılaştırmalı olarak 3 bölümde incelendi (Tablo 2).

Buna göre tek doğum yapan koyunlarda en düşük ve en yüksek

Tablo 1. Senkronize Edilen Koyunlarda Saptanan Doğum ve İkizlik Oranları.

Toplam koyun sayısı	Doğum yapan koyun sayısı	Elde edilen kuzu sayısı	Doğum oranı (%)	İkizlik oranı (%)
60	38	54	63.33	42.1

Tablo 2. 18. günde alınan kan örneklerinde saptanan plazma progesteron düzeyleri (ng/ml).

Doğum Yapmayan Koyunlar		Tek Doğum Yapan Koyunlar		İkiz Doğum Yapan Koyunlar	
n	Progesteron düzeyi	n	Progesteron düzeyi	n	Progesteron düzeyi
22	1.00±0.15	22	2.35±0.25	16	3.12±0.34

* Syncro - Part (Sanofi - DİF)

** Syncro - Part PMSG (Sanofi)

*** Medgenix P-RIA-CT

progesteron düzeyleri 1.00-4.80, ikiz yavru doğuran koyunlarda 1.10-6.80 ve gebe kalmayan koyunlarda 0.10-2.70 arasında bulundu.

Tek veya ikiz yavru doğuran tüm koyunlarda progesteron düzeylerinin 1 ng/ml'den yüksek olduğu görüldü. Gebe kalmayan hayvanlarda progesteron düzeyinin 22 koyundan 14'ünde 1 ng/ml'den az, 8 tanesinde ise değerlerin 1.10 ile 2.70 arasında olduğu belirlendi.

Verilere göre, tek doğum yapanlarla gebe kalmayanlar ve ikiz yavru yapanlarla gebe kalmayanlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu (P<0.001), tek ve ikiz yavru yapanlarla, gebeliğin 18. günündeki progesteron düzeyleri arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlendi.

Tohumlamayı izleyen 18. günde progesteron değerleri ile doğum yapan ve yapmayan koyunlar arasındaki frekans dağılımı ise Şekil 1'de görüldüğü gibi gerçekleşti.

Şekil 1. Tohumlamadan sonraki 18. günde progesteron değerlerinin frekans dağılımı

Progesteron (ng/ml)	Frekans	5	10	15	20	%
.00 - .49	5	0	0	0	0	
.50 - .99	9	0	0	0	0	
1.00 - 1.49	13	x	x	x	x	x
1.50 - 1.99	6	x	x	x	0	
2.00 - 2.49	6	x	x	x	x	
2.50 - 2.99	6	x	x	x	0	
3.00 - 3.49	6	x	x	x	x	
3.50 - 3.99	2	x	x			
4.00 - 4.49	3	x	x	x		
4.50 - 4.99	3	x	x	x		
5.00 - 5.49	0					
5.50 - 5.99	0					
6.00 - 6.49	0					0 boş
6.50 - 6.99	1	x				x gebe

TARTIŞMA ve SONUÇ

Koyun yetiştiriciliğinin gittikçe önem kazandığı günümüzde, kimi biyoteknolojik çalışmaların hız kazanması dikkati çekerken, oldukça yorucu ve masraflı bu çalışmalarda, tohumlanan koyunların gebeliklerinin erken teşhisi her zaman güncelliğini korumaktadır. Bu amaç için, bazı erken gebelik teşhis teknikleri yanında, EIA ve RIA yöntemleri de oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sunulan bu çalışmada, tohumlamadan sonraki 18. günde alınan kan örneklerinin RIA ile plazma progesteron düzeylerinin belirlenmesinde, 1 ng/ml ve üzerindeki değere sahip koyunlar gebe kabul edilirken, kimi araştırmacıların değişik koyun ırklarında yaptıkları çalışmalar 0.5 ng/ml (22), 1 ng/ml (6) ve 2 ng/ml (3) progesteron değerlerini gebelik tanısı için alt sınır olarak aldıkları görülmektedir. Bu çalışmada ise 1 ng/ml kan progesteron düzeyine sahip koyunlar doğurdıkları için, belirtilen değer, Kıvrıcık ırkı koyunların erken gebelik teşhisinde alt sınır olarak kabul edilmiştir.

1 ng/ml'nin altında değer gösteren koyunlardan hiç birinin doğurmadığı gözlenirken (14 adet), 1 ng/ml ve üzerinde değere sahip ve gebe oldukları tahmin edilen 46 koyundan 38'i doğum yapmış, progesteron düzeylerine göre gebe oldukları beklenen 8 koyun ise doğum yapmamıştır. Bu hayvanların yüksek progesteron değerlerine sahip olmalarına rağmen doğum yapmamaları, onlarda erken embrional ölümlerin meydana geldiğini düşündürmektedir. Nitekim, bu görüşü destekler çalışmalara rastlanılmaktadır (2, 22).

Bu çalışmada, tek yavru yapan koyunlarda en düşük ve en yüksek progesteron değerleri 1.00-4.80 ng/ml, ikiz yavru doğuranlarda 1.10-6.80 ng/ml arasında saptanmış ve aradaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Bu değerlerin, diğer çalışmalardaki (3, 18), 17-20. günler arası belirlenen kan progesteron düzeyleri ile karşılaştırıldığında, düşük oldukları dikkati çekmekte ve nedeninin ırk özelliklerine ve hormon ölçüm

tekniklerine bağlanabileceği düşünülmektedir.

RIA yöntemiyle Merinos ırkı koyunlarda çalışan Alaçam ve ark. (3), 2 ng/ml progesteron değerini gebelik için baz aldıkları araştırmalarında, gebelerde tanı doğruluğunu % 84.62, gebe olmayanlarda ise % 85.72 olarak bulmuşlardır. Flores ve ark. (6), da RIA ile aynı kriterler için yukarıdaki sırayla % 89.9 ve % 90 oranlarını bildirirken, gebelik tanısında 1 ng/ml progesteron değerini esas almışlardır. Yürütülen bu çalışmada, gebeliğin erken tanısı için bulunan % 82.6'lık doğruluk oranı diğer araştırmacıların (3,6) bulguları ile benzer görülürken, gebe olmayanların doğruluk oranı (% 100), aynı araştırmacıların sonuçlarından daha yüksek gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak; Kıvırcık ırkı koyunlarda, erken gebelik teşhisinin, tohumlamadan sonraki 18. günde plazma progesteron düzeylerinin RIA yöntemiyle saptanarak, belirli bir güvenlik içerisinde tahmin edilebileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Alaçam E (1994) Gebelik tanısı, E. Alaçam (Edit.), Evcil hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve Infertilite, 127-136 Dizgievi, Konya.
- Alaçam E (1994) Üremenin Denetlenmesi, E. Alaçam (Edit.), Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve Infertilite, 81-88, Dizgievi, Konya.
- Alaçam E, Dinç DA, Güler M, Eröz S, Sezer AN (1988) Anöstrus döneminde progesteron (MAP), PMSG ve GnRH ile senkronize edilen koyunlarda radioimmunoassay (RIA) yöntemi ile erken gebelik tanısı üzerine çalışma, S.Ü. Vet. Fak. Derg., 4 (1) 91-98.
- Alan M (1993) Koyunlarda ultrasonografi ve progesteron düzeylerinin ölçülmesiyle gebelik ve fötüs sayılarının belirlenmesi, Hay. Araş. Derg. 3 (2) 84-87.
- Arthur GH, Noakes DE, Pearson H (1989) Veterinary Reproduction and obstetrics, Sixth Edit. Baillière Tindall, London.
- Flores G, Amezcua R, Zarco L, Ducoing A, Quispe T (1992) Pregnancy diagnosis by progesterone determination on day 18 post-service in the ewe, Comparison of radioimmunoassay and enzymeimmunoassay, 12. Int. Cong. on Amin. Reprod. Vol., 1, 45-47.
- Foote WC, Mattews DJ (1962) Effects of progesterone injection on synchronisation of estrus and on subsequent fertility in the ewe, J. Anim. Sci., 21, 657-662.
- Foote WC, Waite AB (1965) Some effects of progesterone on estrus behavior and fertility in the ewe, J. Anim. Sci., 24, 151-157.
- Gökçen H, Ünal EF, Tümen H, Deligözoğlu F, Soyulu M K, Çelik F (1992) Kızgınlıkları değişik yöntemlerle senkronize edilerek tohumlanan Merinos koyunlarında dölvürümü üzerine çalışmalar, U.Ü. Vet. Fak. Derg., 2 (11) 81-90.
- Gökçen H, Ünal EF, Tümen H, Nak D (1992) Anöstrus ve üreme mevsimindeki koyunlarda kızgınlıkların uyarılması, toplulaştırılması ve dölvürümü üzerinde araştırmalar, U.Ü. Vet. Fak. Derg., 2 (1) 71-79.
- Hancock JL, Hovell GJR (1961) Transfer of sheep ova, J. Reprod. Fert., 2, 295-299.
- Haraszi J (1970) Untersuchungen über die Regulation der Sexuafunktion bei Schafen und Schweinen, Wien. Tierärztl. Mschr., 5, 196-201.
- Hunt WL, Addleman D, Bogart R (1971) Induktion of multiovulation in the ewe following synchronization of estrus, J. Animal Sci., 32, 491-495.
- İleri İK (1985) Koyunlarda bir PGF_{2α} analogu olan Tiaprost (İliren) ile östrus senkronizasyonu ve sun'i tohumlama çalışmaları, İ.Ü. Vet. Fak. Derg., 11 (1) 15-30.
- Kaymakçı M, Kızılay E, Demirören E, Aşkın Y, Karaca O (1992) Hayvansal üretimde biyoteknoloji, 105-111, Trakya Bölgesi 1. Hayv. Sempozyumu, 8-9 Ocak 1992, Tekirdağ, Hasad Yayıncılık.
- Meinecke-Tillmann S (1977) Eitransplantation beim Schaf mit Studien zur prä- und postnatalen Entwicklung von Lämmern, Diss J.L.U. Giessen.
- Özkoca A (1984) Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama, İ.Ü. Vet. Fak. Yay. No: 4, İstanbul.
- Özpinar A, Özpinar H, Fırat A, Pabuçcuoğlu S, Alkan S, Leidl W (1992) Untersuchungen zur Beziehung zwischen Blutprogesteronspiegel und Ablamtrate unter verschiedenen Haltungs- und Ernährungsverhältnissen bei Türkgeldischafen, Hay. Araş. Derg., 2 (2) 35-38.
- Robinson TJ (1964) Synchronisation of oestrus in sheep by intravaginal and subcutaneous application of progestin impregnated sponges, Prof. Aust. Soc. Anim. Prod., 5, 47-53.
- Tan B (1992) Hayvan sağlığı, mevcut durum, problemler ve çözüm önerileri, 112-115, Trakya Bölgesi 1. Hayv. Sempozyumu, 8-9 Ocak 1992, Tekirdağ, Hasad Yayıncılık.
- Tekin N, Apel RG, Yurdaydın N, Yavaş Y, Daşkın A, Keskin O, Ethem H (1991) Östrusları senkronize edilen koyunlarda sun'i tohumlama yöntemiyle elde edilen dölvürümü, A.Ü. Vet. Fak. Derg., 38 (1-2) 60-73, Ankara.
- Ünal EF, Eroğlu A, Deligözoğlu F, Nak Y (1992) Koyunlarda gebelik tanısı ve yavru sayısının belirlenebilmesi konusunda karşılaştırmalı çalışmalar, U.Ü. Vet. Fak. Derg., 11 (2) 101-112.