

636.39.082.4(043)

Ö 99a

174083

ANKARA KEÇİLERİNDE
ERKEN GEBELİK TAYİNİ VE FERTİLİTE KONTROLUNDA
RADIOİMMUNOASSAY (RIA) İLE PROGESTERON
DÜZEYLERİNİN SAPTANMASI : RIA TEKNİĞİNİN
KEÇİ SERUMU İÇİN GEÇERLİLİĞİNİN KONTROLU

Semin ÖZSAR

TÜRKİYE
BİLİMSEL ve TEKNİK
ARAŞTIRMA BÜYÜK
KÜTÜPHANESİ

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü'nün
Genel Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

ANKARA

Ekim, 1983

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

İşbu çalışma, jürimiz tarafından, Genel Biyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : *A. Noyan*

Üye : *M. Akalın*

Üye : *A. Acar*

Üye : *H. Akın*

Üye : *M. Akalın*

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylarım.

.../.../1983

Acar Işın

Müdür

Prof. Dr. Acar Işın

T E Ş E K K Ü R

Bu çalışma Başbakanlık Atom Enerjisi Kurumu, Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü'nde ve Tarım Bakanlığı Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü'nde yapılmıştır.

Çalışmalarım sırasında yapıcı incelemeleri ve katkıları olan değerli tez hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Noyan'a; beni bu konuda çalışmaya yönelten ve her türlü desteği sağlayan Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Doç. Dr. Ş. Kaya Göksoy'a; çalışmalarım da ve şekillerin çizilmesinde büyük yardımlarını gördüğüm Veteriner Hekim Bülent Güven'e ve Lalahan'daki bütün çalışma arkadaşlarıma içten teşekkür ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
I. GİRİŞ _____	1
II. GENEL BİLGİLER _____	5
II.1. Ankara keçisinin genel üreme özellikleri _____	6
II.2. Ankara keçisinde östrus siklusu (temel değişiklikler ve klinik gözlemler) _____	6
II.3. Östrus süresi _____	7
II.4. Östrus siklusu süresi _____	8
II.5. Östrus tayini _____	10
II.6. Östrus sinkronizasyonu _____	12
II.7. Gebelik tayini _____	13
II.8. Steroid hormonlar _____	16
II.8.1. Steroid hormonların kimyasal özellikleri _____	16
II.8.2. Corpus luteum (C.L.) hormonu progesteron _____	18
II.8.3. Progesteron biyosentezi ve etki mekanizması _____	18
II.9. Radioimmunoassay (RIA) _____	22
II.9.1. Steroid protein konjugatları ve antisteroid antiserumu _____	24
II.9.2. Radyoaktif işaretli antijen _____	25
II.9.3. Bağlı ve bağlı olmayan fazların ayırımı _____	27
II.9.4. Radyoaktivite sayımı ve deney sonuçlarının değerlendirilmesi _____	28
II.9.5. RIA kalite kontrolü (Güvenirlilik kontrolü) _____	29
III. GEREÇ ve YÖNTEM _____	33
III.1. GEREÇLER _____	33
III.1.1. Hayvanlar _____	33
III.1.2. Deneyleerde kullanılan aletler _____	33

III.1.3. Deneylelerde kullanılan kimyasal maddeler _____	34
III.1.4. Diğer sarf maddeleri _____	35
III.2. YÖNTEM _____	35
III.2.1. Örnek alınması _____	35
III.2.2. Kızgınlık işaretleri, kızgınlık tayini _____	36
III.2.3. Gebelik tayini _____	37
III.2.4. Kanda progesteron ölçümü (RIA) _____	37
III.2.5. RIA kalite kontrolü _____	43
III.2.6. İmmünizasyon (anti-progesteron antiserumu elde edilmesi) _____	47
III.2.7. Likit sayacın (β -sintilasyon) sayım verimliliğinin hesaplanması _____	49
IV. BULGULAR _____	51
IV.1. Keçilerin anöstrus, östrus, östrus siklusu ve gebelik dönemlerindeki progesteron düzeyleri _____	51
IV.1.1. Anöstrus dönemindeki progesteron düzeyleri _____	51
IV.1.2. Östrusda progesteron düzeyleri _____	54
IV.1.3. Östrus siklusundaki progesteron düzeyleri _____	54
IV.1.4. Gebelik dönemi progesteron düzeyleri _____	59
IV.2. RIA kalite kontrolü ve tavşanlarda elde edilen anti-progesteron antiserumunun geçerliliğinin kontrolü _____	60
V. TARTIŞMA _____	73
VI. SONUÇ _____	79
VII. ÖZET _____	80
VIII. SUMMARY _____	81
IX. KAYNAKLAR _____	83

TEZDE YER ALAN ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1 : Östrus siklusundaki morfolojik ve endokrinolojik olaylar _____	20
Şekil 2 : Sıfat mevsiminin başlangıcında 2 ve 20 keçide gözlenen anöstrusdan östrusa geçişteki progesteron düzeyleri _____	53
Şekil 3 : Ankara keçisinde normal istrus siklusu progesteron modeli _____	55
Şekil 4 : Ankara keçisinde birbirini izleyen 2 östrus siklusu _____	56
Şekil 5 : Tohumlanan ve tohumlanmayan keçilerde progesteron düzeyleri _____	58
Şekil 6 : RIA standart eğrileri _____	61
Şekil 7 : Paralellik testi _____	62
Şekil 8 : Kantitatif verim grafiği _____	64
Şekil 9 : İki tavşanın antiserum titrasyon eğrileri _____	67
Şekil 10 : Tavşan 1 : Progesteron antiserumunun diğer steroidlerle çapraz reaksiyonları _____	68
Şekil 11 : Tavşan 2 : Progesteron antiserumunun diğer steroidlerle çapraz reaksiyonları _____	69
Şekil 12 : Tavşan 1 : Çeşitli antiserum dilüsyonlarında standart eğriler _____	71
Şekil 13 : Tavşan 2 : Çeşitli antiserum dilüsyonlarında standart eğriler _____	72

TEZDE YER ALAN TABLOLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1 : Tohumlanan ve tohumlanmayan keçilerde progesteron düzeyleri _____	52
Tablo 2 : Genç ve yaşlı keçilerde siklusun çeşitli dönemlerinde progesteron düzeyleri _____	57
Tablo 3 : Deneylerarası fark _____	65
Tablo 4 : Deneyiçi fark _____	65
Tablo 5 : Antiprogesteron antiserumunun diğer bazı steroidlerle olan çapraz reaksiyonları _____	70

I - G İ R İ Ő

Ankara keçisi (Tiftik keçisi, Angora goat), baŐta tiftik olmak üzere et ve süt verimi ile Orta Anadolu köylüsünün geğim kaynaklarından birisidir. Ankara keçisi, yüzyıllardan beri Anadolu'nun İç, Batı, Orta ve Güneydoğusunda yetiŐtirilmektedir (Örkiz, 1980). Yetiştirildiği çevre Őartlarına gösterdiği uyumla bir doğa harikasıdır. Batu'nun (1940) araŐtırmalarına göre Ankara keçisinin anayurdu Orta Asya'dır ve XIII. yüzyılda Türkler tarafından Anadolu'ya getirilmiŐtir. Ankara keçisi Orta Anadolu platosunun doğal Şartlarında çeşitli mutasyonlar geğirerek, çevre Őartlarına uygun bir hayvan türü özelliğini almıştır. XIX. asır ortalarına kadar yalnız Anadolu'da yetiştirilen Ankara keçisi asrın ikinci yarısında İngiltere'ye ve oradan da Güney Afrika'ya götürölmüŐtür. Buradaki yerli keğilerle çevirme melezleme çalışmaları ile tiftik keçisi haline dönüŐtürölmüŐtür (Grobler, 1975; Outram, 1979). Diğer taraftan A.B.D. ne götürölen tiftik keçilerinin Teksas ve Kaliforniya bölgesine uyum sağlaması temin edilmiştir (Shelton, 1965). Fakat Türkiye'de yetiştirilen Ankara keçisinin tiftik kalitesini incelik, uzunluk ve parlaklık bakımından hiç bir ölkenin tiftiği tutmamaktadır (İmeryüz, 1969).

Birkaç devlet hayvancılık kuruluŐu dışında, bilimsel yetiŐtiricilikten yoksun ve tamamen tabiat Őartlarına terkedilmiŐ olan Ankara keçisi yetiŐtiricilięimiz duraklama ve gerilemeye baŐlamıŐtır. Ankara keçisinin ölkemizdeki sayısı 1960 dan beri devamlı düşüŐ göstermiştir. 1960 yılında 5.9 milyon olan Ankara keçisi sayısı, 1965 de 5.5 milyon, 1970 de 4.5 milyon, 1975 de 3.5 milyon, 1980 de 3.658 milyon olmuştur (Başbakanlık, Devlet İstatistik Enstitüsü 1977, 1979, 1981; T.C. Tarım Bakanlığı, Hayvancılık İstatistikleri 1981).

Anayurdunun ülkemiz olması, koşullarımıza iyi uyum sağlamış bulunması, ekonomik açıdan ve sosyal yönden önemli bir yer tutması, Ankara keçisinin sayısal ve verimsel olarak geliştirilmesini gerektirmektedir.

Ankara keçisi yetiştiriciliğinde en önemli unsur tiftik (moher) verimidir. İkinci planda et ve süt verimi gelir. Bu nedenle tiftik kalitesi ve fiyatı ile ilgili olarak, Tiftik endüstrisinde yüksek üreme hızının büyük önemi vardır (Westhuysen 1974 ve 1979). Çünkü Ankara keçisi yaşlandıkça, tiftiğinde hem kalite hem de miktarca değer düşüklüğü olur. Yüksek bir üreme verimi (hızı), sürünün ortalama yaşını genç tutarak tiftik üretiminin ilerleme ve gelişmesine olanak tanır. Her doğan yavru ve iyi yetişen her genç hayvan, çiftçi için ve dolayısıyla ekonomi için fazladan yarar sağlar. Bu nedenle, üreme verimini etkileyen unsurların tanımlanması ve buna göre yetiştiricilik yapılması önemlidir.

İslah ve yetiştiricilikte, hayvanların en önemli verim özelliği döl verimidir. Döl verimi düşük hayvanlarla yapılan yetiştiricilikte, istenilen düzeye varılamıyacağı gibi, harcanacak zaman ve emek de boşa gidecektir. Hayvanlardan iyi bir döl verimi alınması, döl verimini etkileyen tüm unsurların kontrol altında tutulmasına bağlıdır. Bu da hayvanların dölleme özellikleri ve fizyolojik mekanizması yeterince bilindiği ölçüde yapılabilir (Karg ve ark. 1976; Post, 1980). Tüm gelişmiş ülkelerdeki hayvancılıkla ilgili bilimsel çalışmaların büyük bir çoğunluğu dölleme konusunu içerir (Kakusya 1980; Kinser ve ark. 1983; Shemesh ve ark. 1983). Bu da bu konunun önemini yansıtır.

Ankara keçilerinde dölleme sorunlarını incelemek için, Ankara keçisinin yetiştirildiği diğer ülkelerde yoğun çalışmalar yapılmaktadır

(Badawy, 1972; Cawood, 1979; Ritar ve Salamon, 1982; Salamon ve Ritar, 1982; Ritar ve Salamon, 1983). Son zamanlarda Avusturalya'da, Ankara keçilerinden yerli keçilere embryo transferi yapılarak hızla Ankara keçisinin sayısının arttırılması yoluna gidilmektedir (Armstrong ve Evans, 1983; Trounson, 1983).

Son yıllarda gelişmiş ülkelerde, nükleer tekniğin kullanılması, diğer konularda olduğu gibi, veteriner hekimlik ve hayvancılık alanında da yaygınlaşmaktadır. Hayvancılıkta özellikle döl verimi, gebelik ve kısırılık kontrollerinde, hormon testlerini içeren radyoimmunoassay (kısaca RIA) yöntemi, modern hayvan yetiştiriciliğinde gerçek yerini almıştır (Karg ve ark., 1976). RIA testleri, hormon tayinlerinde, sadece nanogram ve pikogram düzeyindeki duyarlılığından değil, aynı zamanda doğruluğu, etkinliği ve uygulamadaki kolaylığı bakımından da hayvan yetiştiriciliği için önem kazanmıştır (Karg ve ark., 1976).

Dişi dölermesinde östrus (kızgınlık) siklusu ve gebelik ile ilgili hormonal olaylar birçok türde çalışılmıştır (Challis ve ark., 1971; Jarosz ve ark., 1971; Pretorius, 1973; Symons ve ark., 1974; Claus ve Rattenberg, 1979; Prasad, 1979 a,b,c; Eddy, 1983; Kinser ve ark., 1983). Bu çalışmalarda kan plazmasındaki "progesteron", fertilitate kontrolü ve erkek gebelik tayininde, keçileri de kapsayan evcil ruminantlarda ovaryum aktivitesini gösteren en güvenilir hormon olmuştur (Linzell ve Heap, 1968; Thornburn ve ark., 1969; Basset ve ark., 1969; Thornburn ve Schneider, 1972; Irving ve Jones, 1972; Laing, 1976; Wentzel, 1979 a; Quirke ve ark., 1979; Thibier ve ark., 1981).

Ankara keçisinde ovaryum fonksiyonunu kontrol etmek için çeşitli araştırmacılar tarafından çalışmalar yapılmıştır (Marincowitz, 1971 a,b);

Pretorius, 1971 ve 1973; Corteel, 1975 ve 1977; Westhuysen, 1976, 1978; Wentzel, 1979 a). Bugüne kadar ülkemizde Ankara keçilerinin tiftik, et ve süt verimi dışında fizyolojik ve dölerme özellikleriyle ilgili hormonal parametreleri de içine alan bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada Veteriner Hekimlik ve hayvancılıkta, ülkemizde RIA'nın ilk uygulaması olarak, Ankara keçilerinin dölerme özelliklerinin çalışılmasında ve erken gebelik tayini için RIA ile progesteron hormonu saptamayı amaçladık.

I I - G E N E L B İ L G İ L E R

Koyun ırklarının çoğu ve keçiler mevsimsel olarak yetiştirilirler (Pretorius, 1973). Cinsel aktivite genellikle sonbahar ve kış aylarında en yüksek düzeye ulaşır; bunu uzun bir anöstrus dönemi takip eder. Keçilerin bulunduğu ortam daha güneyde ise sıfat mevsiminin başlaması daha erken olmaktadır. Keçiler gün ışığının azalmasına cevap olarak cinsel aktivitelerini başlatırlar (Wentzel, 1979 a), ya gebe kaldıklarında ya da sıfat mevsiminin bitmesiyle bu aktivitelerini durdururlar.

Kışın erken döneminde doğan yavzuların daha iyi büyüme olanaklarının oluşu (Fraser, 1975; Wentzel, 1978), erken tohumlamanın ana avantajıdır. Hatta sıfat mevsimi 4-6 hafta daha erken olursa daha da avantajlıdır. Şimdiye kadar memeli hayvanların cinsel aktivitelerini kontrol etmek için hemen daima ekzojen hormon işlemleri uygulanmıştır (Marincowitz, 1968; Dhinsa, 1971; Symons ve ark., 1974; Cunningham, 1975; Saba ve ark., 1975; Bosu ve ark., 1978; Ogubiyi, 1980.; Eddy ve ark., 1983; Glazzel ve ark., 1983; Karagiannidis, 1979; Bristol, 1983; Richardson, 1983; Ainsworth, 1983).

Ankara keçisinin mevsimsel üreme aktivitesini tayin etmede çok fazla olmamakla birlikte çalışmalar vardır (Lamont, 1964; Marincowitz, 1967; Marincowitz, 1971 a ve b; Pretorius, 1971; Moore, 1979; Wentzel, 1979 a ve b). Ankara keçileri diğer keçi ırklarına göre daha duyarlı hayvanlardır. Senede ancak bir kez tohumlanabilirler. Doğumdan sonra uzun bir dinlenme dönemi vardır. Bunlara özel iyi bir gıda verilerek tekrar aktif hale getirilirler. Özellikle yeşil yiyeceklerin ovulasyon üzerinde mükemmel stimule edici etkisi vardır (Cawood, 1979, 1980).

2.1. Ankara Keçisinin Genel Üreme Özellikleri :

2.1.a. Ergenlik yaşı (puberti) : 4-12 ay arasında değişir. İlkbaharda doğan yavrular aynı yılın sonbaharında kızgınlık gösterirler.

b. Gebelik dönemi : 145-156 gün arasında değişir. Primitif ırklar evcil ırklardan daha kısa gebelik dönemi gösterirler.

c. Östrus siklusu uzunluğu : Ortalama 19 gündür; 18-21 gün arasında değişir.

d. Östrus gözükmesinden sonra ovulasyon zamanı : Ortalama 24 saattir; 12-36 saat arasında değişir. Östrus sona ermeden önce ovulasyon olur.

e. Doğumdan sonra ilk kızgınlık : Sonbahardadır.

f. Siklus tipi : Mevsime bağlı poliöstrus şeklindedir. Bir mevsimde 8-10 östrus periyodu vardır.

g. Ortalama çiftleşme ömrü : 6-10 yıldır.

h. Fekundite : Genellikle 1, bazen 2-3 kez olur.

i. Sıfat mevsimi : Sonbaharda başlar; kuzey yarı kürede Eylül-Ocak aylarıdır.

2.2. Ankara Keçisinde Östrus Siklusu (Temel Değişiklikler ve Klinik Gözlemler) :

Ankara keçisinde östrus siklusu, birbirini izleyen 4 dönemde cereyan eder (Erk, 1980).

2.2.1. Proöstrus : Corpora lutea (sarı cisimler) dejenere olur, foliküller büyür. Serviksten musin salgılama, vulva normaldir. Keçinin davranışında huzursuzluk görülür, iştah azalır. Ortalama 3 gün sürer.

2.2.2. Östrus : Foliküller olgunlaşır ve ovulasyon olur. Ovulasyon, östrusun başlangıcından 12-36 saat sonra olur. Serviksten musin salgılanır, mukus kalınlaşır. Vajina, hiperemik olup mukus salgısı artar. Vulva hafifçe büyür. Keçi bu dönemde sıklıkla meler, çevresine karşı çok dikkatli ve duyarlıdır. Şiddetli ve devamlı kuyruk sallama görülür. İştah azalmıştır. Östrus süresi 0-2 gün arasındadır. Kısa sikluslu kızgınlıklar genellikle sterilite ile sonlanır.

2.2.3. Metöstrus : Corpus luteum şekillenmeye başlar. Serviks kapanır. Vajinada mukoz membranlar kurur ve soluklaşır, vulva normaldir. Davranıştaki huzursuzluk nispeten azalmıştır. Yaklaşık 5-6 gün sürer.

2.2.4. Diöstrus : Corpora lutea büyümeye devam eder. Hayvanda cinsel davranış gözlenmez. 8-9 gün sürer.

2.3. Östrus Süresi :

Keçilerde östrus süresi 32-40 saat arasındadır (Robertson, 1977). Van Rensburg (1971), Ankara keçisinde kızgınlık süresini 22.3 saat olarak bulmuştur. Pretorius (1973) 28.5 saat, Marincowitz (1971 a) 33-39 saat, Asdell (1969) 39.2 saat, Grobler (1975) 33 saat ve Nikolaeuskaya (1979) ise 22-23 saat olarak bildirmişlerdir.

Ankara keçisi dışındaki keçi ırklarında ortalama östrus süresi Sahni ve arkadaşları (1967) Barbari keçilerinde 30 saat, Prasad (1979 a,b,c) aynı keçilerde 1.73 gün; Carmenate (1977) Toggenburg keçilerinde

24-36 saat, Saanen de (24-36) saat; Otchere ve arkadaşları (1975) West African Dwarf' (W.A.D) larda 17.0 saat; Carrero (1969 a) Granada keçilerinde 34.3 saat; yine Carrera (1969 b) Meksika keçilerinde 34.3 saat bulmuşlardır.

2.4. Östrus Siklusu Süresi (Uzunluğu) :

Ankara keçisi bir sıfat mevsiminde 4-7 östrus siklusu gösterir (Marincowitz, 1971 a). Bu, Dorper koyunlarında gözlenen 20 siklus periyoduna göre çok azdır (Marincowitz, 1964).

Çok kısa sıfat mevsimi ve az sayıda östrus siklusu senede birden fazla yavrulama ihtimalini ortadan kaldırır. Hatta sıklıkla koyunculukta kullanılan 2 senede 3 yavru alma verimi gibi yetiştiricilik, doğal kızgınlık şartları altında uygulanamaz (Robertson, 1977).

Sıfat mevsiminin başında ovulasyonsuz kısa östrus siklusları gözlenmiştir (Robertson, 1977). Yaklaşık bunların % 50 si ovulasyonsuzdur. Keçilerdeki bu ovulasyonsuz östrus koyunlarındaki ile karşılaştırıldığında ilginçtir. Koyunlarda östrus davranışı göstermeden ovulasyon olabilmektedir (Robertson, 1977).

Bir sürüde kızgınlık dönemleri (sadece fertil dönemler) bütün sıfat mevsimine yayılmıştır. Yani keçiler sıfat mevsimi boyunca değişik zamanlarda kızgınlık gösterir.

Keçilerde östrus siklusunun uzunluğu ortalama 19-21 gündür. Bununla beraber ilk kızgınlıklarında olan genç dişiler daha kısa siklus gösterebilirler (Phillips ve ark., 1943). Irklar arasında varyasyonlar vardır. Saf kan Pigmi keçilerinde ortalama 24 gün siklus uzunluğu ile

en uzun siklus gözlenmiştir (Jarosz, 1971). Natif Sicilya ırklarında ise 8 günde en kısa siklus izlenmiştir (Corteel, 1977 b) Erk vve arkadaşları (1972) keçilerde ortalama siklus süresini 21 gün, Atabek ise (1936) 10-28 gün olarak bildirmiştir.

Ankara keçilerinde ortalama östrus siklusu süresi; Grobler (1975) tarafından 19 gün, Pretorius (1973) tarafından 20.2 gün, Nikolaevskaya (1979) tarafından 19-21 gün, Asdell (1964) süt keçisinde 17.8 gün, Sahni (1967) Barbari keçisinde 17-22 gün, Prasad (1979 a,b,c) Barbari keçisinde 19.8 gün, Jarosz (1971 ve 1972) Toggenburg keçisinde 17-25 gün, Pigmi keçisinde 13-31 gün, Otchere (1975) WAD'larda 24.0 ± 9.9 gün, Santisteban (1977) Anglo-Nabian'larda 22-23 gün, Carrera (1969) Granada keçilerinde 20.68 ± 1.8 gün, Ricordeau (1975) Fransız Alpine keçilerinde 18-23 gün, Carmenate (1977) Saanen süt keçilerinde 20.60 gün olarak bulunmuştur.

Beş-Sekiz gün gibi çok kısa ve 40 gün gibi çok uzun anormal östrus siklusları da keçilerde görülebilmektedir (Prasad, 1979 b). Bununla beraber bu anormal siklus uzunluklarının keçilerdeki fertilité üzerine etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Muhtemelen bu uzun sikluslar tayin edilememiş veya atlanmış östrusun sonucudur.

Progestin ve bunu takiben $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu ile östrus sinkronizasyonundan sonra kısa sikluslar ve bölünmüş östrus gözlenmiştir (Bosu ve ark., 1978). Sıfat mevsiminin başında tekelerin dişilerin yanına ilk katımında da kısa sikluslar gözlenmiştir (Ott, 1979).

2.5. Östrus Tayini (Östrus İşaretleri) :

Tabi veya suni tohumlama yapıldığında keçilerde östrus tayini önemlidir (Ott, 1982). Keçilerin en güvenilir östrus işareti tekelere gösterdiği cevaptır (Shelton, 1960; Lamont, 1964; Otchere, 1978; Rajkonwar, 1978; Merve, 1977; Ott, 1980 a,b,c; Shelton, 1980). Östrus işaretleri kuyruk sallama, meleme ve tekenin yanında işeme; vulvanın şişmesi ve mukus salgılanmasıdır. Dişi, sadece kızgınlık döneminde tekelerin atlamasına izin verir ve bu dönemde tekenin varlığını aktif olarak arar. Tekenin kokusu, dişilerin kızgınlık göstermesini stimüle eden bir etkidir. Sıfat mevsiminin erken döneminde bir dereceye kadar dişilerde kızgınlık başlamasını sinkronize eder. Bazı nedenlerle (yanma, boynuzun kesilmesi veya herhangi bir tahrip) tekelerin boynuzları tahrip olabilir. Koku salan bezler posterior olarak boynuzların tomurcuklarında yerleştiklerinden, dişi keçiler böyle durumlarda normal boynuzlu tekeleri bunlara tercih ederler. Tekelerin bu kokusunun dişilerdeki östrusu stimüle etmesi, yetiştiriciler tarafından pratik alanda kullanılmaktadır. Bir bez parçası tekenin başına iyice sürtülür ve bir kavanoza konur. Kavanoz ısıtılır ve dişi keçilerin bulunduğu sürünün içinde kapağı açılır. Bunun da kızgın keçiyi bulmada rolü vardır (Smith, 1978).

Tekelerin kuvvetli kokusunun dişilerde östrus davranışlarının başlamasında etkisi olmakla birlikte Shelton ve Marrow (1965), Ankara keçilerinde bu tip kokunun erken sıfat mevsiminde östrusun başlamasında çok az etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Sıfat mevsiminin erken döneminde tek bir tekenin varlığı östrusun başlamasını Ankara keçisinde sinkronize etmektedir (Shelton, 1960). Ott

(1980), süt keçilerinde östrus siklusunun stimüle edilmesinde tekele-
rin varlığının etkisini araştırmıştır. Anöstrusun sonlarında 1 teke-
nin 17 keçilik bir sürüye katılması 16 keçide 5.5 ± 1.3 günde östrus
davranışıyla sonuçlanmıştır. Otuzbeş günlük gözleme döneminde 16 keçi-
den 13 ünde normal östrus siklusunun progesteron profili görülmüştür.
Bunun tersine kontrol grubunda östrus aktivitesi gözlenmemiştir. Sade-
ce 17 keçiden bir tanesinde siklus progesteron modeli görülmüştür. Bu
da açıkça tekelerin varlığının östrusu başlatmada ne denli etkili oldu-
ğunu gösterir. Hatta bu etki kontrol grubunda da araştırılmış; kontrol
grubuna da teke katılmış, 17 kontrolden 15 tanesi tekelerin katımından
 7 ± 1.5 gün sonra kızgınlık davranışı göstermiştir.

Keçilerde östrus tayini en iyi şekilde teke veya onun kokusu kul-
lanılarak yapılır. Vazektomize, kastre edilmiş, penisi bağlanmış teke-
ler ve hermafrodit keçiler arama tekesi olarak kullanılabilir (İlgaz,
1982, Ott, 1982).

Crocker ve ark. (1982), Mant ve ark. (1979) östrus aktivitesini
ve ovulasyonu indüklemeye 105 mg testosteron propionat enjeksiyonu ya-
pılan kastre edilmiş koçlar ve dişi koyunlar aramada kullanmışlar ve
vazektomize koçlar kadar iyi sonuç almışlardır. Testosteron enjeksiyo-
nu yapılan dişilerde erkek cinsel davranışları gözlenmiş, testosteronun
ise hızlı bir şekilde vücuttan atıldığı saptanmıştır.

Dişilerin anöstrus döneminde tekeler libido göstermezler
(Westhuysen, 1976; Cawood, 1979; Merve, 1977). Bunun verimde büyük rolü
vardır. Sinkronizasyonla çok iyi kızgınlık sağlansa bile tekelerin bu
durumu verimi düşürür. Bu verim düşüklüğüne karşılık Ankara keçilerinde
dondurulmuş sperma (Ritar ve Salamon, 1982; Ritar ve Salamon, 1983;
Salamon ve Ritar 1982) ve suni tohumlama (Westhuysen, 1979) ile ilgili

çalışmalar yapılmıştır. Bugüne kadar dondurulmuş boğa sperması ile elde edilen başarı, küçük ruminantlarda elde edilememiştir. Bu konuyla ilgili çalışmalar son yıllarda yoğunlaşmıştır.

2.6. Östrus Sinkronizasyonu :

Suni tohumlamaya yardımcı olmak amacıyla normal sıfat zamanında ve bunun dışındaki dönemde ovulasyon ve kızgınlığı kontrol etmek için bazı yöntemler geliştirilmiştir (Symons, 1974; Saba, 1975; Santisteban, 1977; Serna, 1978; Karagiannidis, 1979; Ott, 1980 a,b).

Sürülerin genetik özelliklerinin geliştirilmesiyle tiftik kalitesi yükselir. Bu nedenle keçilerde suni tohumlama ve östrus sinkronizasyonundaki gelişmeler gittikçe önem kazanmaktadır. Ovaryum fonksiyonunu kontrol için böyle başarılı tekniklerin geliştirilmesi, suni tohumlamanın ekonomik ve genetik yönden iyi bir şekilde yapılmasına olanak sağlar.

Ankara keçisinde ovaryum aktivitesini kontrol için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Marincowitz, 1967 ve 1968; Pretorius, 1971; Moore, 1976; Westhuysen, 1976; Mc Mahon, 1979; Moore, 1973; Wentzel, 1979; Westhuysen, 1979 ve 1980). Bu çalışmalarda östrus sinkronizasyonu için progesteron hormonu ile birlikte PMSG (gebe kısırak serum gonadotropini) ve Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) kullanılmıştır. Progesteron kullanarak Pretorius ve Westhuysen (1971), Ankara keçilerinde anöstrus dönemden östrus döneme geçişte oldukça başarı sağlamışlardır. Hormon muamelesini takiben ovaryum aktivitesi ve ovulasyon olmasına karşılık, gözle gözlenebilen kızgınlık fazla olmamaktadır. Bu durumda sürüye arama tekesi katılarak ovaryum aktivitesi ve ovulasyonun kuvvetlendirilebileceği ileri sürülmüştür.

Ankara keçilerinde 21 gün progesteron muamelesini takiben 400 IU PMSG kullanılmış ve suni tohumlama sonucu % 55-70 gebe kalma oranı elde edilmiştir (Westhuysen, 1976). PMSG enjeksiyonu, ovulasyon oluşmasını ve hızını artırır; fakat bu ovulasyonların bazıları kızgınlıkla birlikte oluşmaz. Anöstrusun geç döneminde sadece progesteron ve bunun gonadotropinlerle muamelesi keçilerin çoğunda gizli ovulasyona neden olmuştur (Pretorius, 1971).

Östrus sinkronizasyonu ve ovulasyon için ikinci bir yöntem, progesteronların dışında, $PGF_{2\alpha}$ ile muameledir. $PGF_{2\alpha}$ daha ziyade sıfat mevsiminde siklus gösteren hayvanlarda, yani fonksiyonel bir corpus luteum bulunan hayvanlarda luteolizise neden olmaktadır.

$PGF_{2\alpha}$ nın keçilerde östrus siklusunun 4. günü gibi erken devresinde uygulandığında etkili olduğu gösterilmiştir (Ott, 1980 a). Bu da göstermektedir ki, keçilerde $PGF_{2\alpha}$ nın luteolitik etkisi, koyun ve sığıra göre siklusun daha erken devresindedir. $PGF_{2\alpha}$ ile, anöstrusun ortasındaki ovaryum aktivitesini indüklemeye, sonundaki indüklemeler kadar başarıyla değildir (Ott, 1980 b).

Sinkronizasyon - suni tohumlama programının en olumlu yönü dondurulmuş sperma ile tohumlama yapılabilmesidir. Böylece teke ile olan sınırlama ortadan kaldırılmış olur (Ritar, 1982). Son zamanlarda bu konu ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır (Ritar, 1982; Ritar, 1983; Salamon, 1982).

2.7. Gebelik Tayini :

Veteriner hekimlik ve hayvancılıkta gebelik tayininin doğru ve ekonomik bir yöntemle yapılabilmesi yetiştiriciliğe büyük ölçüde yardımcı

olmaktadır. Gebeliğin önceden ve mümkün olduğu kadar erken devrede tayin edilebilmesi, çeşitli yöntemler kullanılarak yapılmaktadır (Shelton, 1984).

Küçük ruminantlarda gebelik tayinlerinde yıllardan beri ekonomik ve pratik yöntemler araştırılmaktadır. Bunların hiç birisi sahada yaygın olarak kullanılmamaktadır (Bon Durant, 1980).

Küçük ruminantlarda gebelik tayini, basit, pahalı olmayan, doğru ve hayvanla fazla uğraşmayı gerektirmeyen bir yöntemle yapılmalıdır.

Son yıllarda koyunlarda gebelik tayini için "ultrasound" aleti pazarlanmaya başlanmıştır (Bon Durant, 1980). Altmış ila 120 günlük gebeliklerde bu aletler % 95'e varan doğruluk oranı verebilmektedir. Altmışbeş günlükten az gebeliklerde doğruluk oranı düşük çıkmıştır. Bu sistemde, vücut dokularının ve uterus sıvılarının özelliklerini yansıtan çeşitli sesler yoluyla tanı yapılır (Benjaminson, 1980).

Intra-rektal "Doppler" ve rektal-abdominal palpasyonun gebelik tayini açısından doğruluğu incelenmiştir (Ott, 1982 a). Koyunlarda bu 2 yöntem bir hayli iyi sonuçlar vermiştir (Bon Durant, 1980); fakat henüz keçilerdeki durumu hakkında sadece bir araştırma yapılmıştır (Memon, 1980). Rektal-abdominal palpasyon için keçiler 1 gece aç bırakılır ve pleksiglas çubuk rektumdan sokularak çubukla içeriden, elle dışarıdan (abdominal palpasyon) 2 taraflı gebe uterus yoklanır. Bu tip muayene, sonuçta ölüm ve yavru atma gözlemlendiğinden zararlı görülmüştür. Bu konuda çok fazla pratik yapılması ve tecrübe edinilmesi gerekmektedir.

Intra-rektal Doppler tekniği ise, "Scanopreg" denen bir aletin

rektumdan sokulup fetusun kalb atışlarının dinlenmesine dayanır. Doppler tekniği aynı zamanda fetusun canlı olup olmadığı hakkında da fikir verdiği için daha güvenilirdir.

Ayrıca radyografi güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilir (Robertson, 1983 b). Gebelik döneminin son yarısında bu yöntemle fetal iskeletin ve büyümüş uterusun gözlenmesi ile gebelik saptanabilir.

Diğer bir gebelik tayin yöntemi de sütte (Jain, 1980; Heap, 1981; Montigny, 1982) veya plazmada (Basset, 1969; Challis 1971; Irving, 1972; Thornburn, 1972; Rhind, 1978; Holdsworth, 1979; Shelton, 1984) RIA ile progesteron tayinidir.

Corpus luteum hormonu progesteron gebeliğin devamından sorumludur. Böylece keçilerde tohumlamadan 15-17 gün sonra elde edilen yüksek düzeyde progesteron erken gebelik hakkında fikir veren iyi bir parametredir.

Shemesh ve ark. (1983), erken gebelik tayini için siğirilerde MAP süngeri kullanmışlardır. Tohumlamadan sonra konan sünger 15 gün sonra çıkarıldığında, gebe olmayanlarda plazma progesteron düzeyinde ani bir düşme gözlenmesine karşılık gebe hayvanlarda progesteron düzeyi yüksek kalmaya devam etmiştir.

En yeni olarak üzerinde çalışmalar yapılan gebelik tayini, fertilizasyonu takiben maternal sisteme 1-6 saat zarfında zigottan humoral olarak bir sinyalin geçirildiğinin kanıtlanması yolundadır. Maternal periferik plazmada gebeliğe özgül bir faktörün bulunduğu farelerde, insanda, koyun ve domuzda bildirilmiştir (Robertson, 1983 a). Bu faktör heterolog eritrositlerle, homolog lenfositler arasında oluşan "rozet inhibisyon"u ile tayin edilebilmektedir.

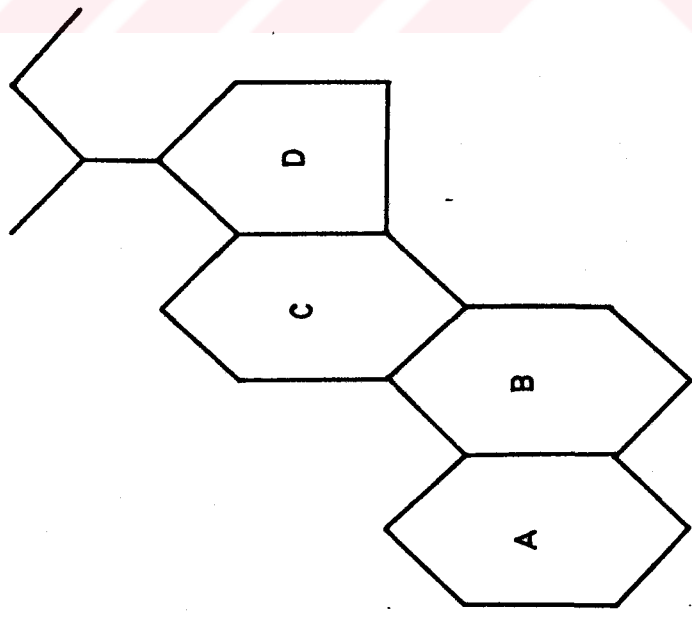
Son zamanlara kadar, gebeliğin erken ve preimplantasyon safhalarındaki tayinleri evcil hayvanlarda "gebeliğin maternal tanımı" şeklindeki çalışmalarla yürütüldü. Embryo maternal sisteme hayvanın gebe olduğunu gösteren bazı luteotropik veya anti-luteolitik sinyaller yollar. Domuzda ve sığırdaki bu sinyalin, muhtemelen, uterusu tutunan blastosit tarafından sentezlenen östron sülfat şeklindeki östrojen olduğu gösterilmiştir (Hattersley, 1980; Hamon, 1981; Heap, 1981; Heap, 1983). Bu faktör şimdi EPF (erken gebelik faktörü, early pregnancy factor) olarak tanımlandı ve halen bunun biyolojik rolü hakkında hiç bir şey bilinmemektedir; sadece orijinine ait bazı bilgiler ortaya çıkmaktadır (Koch, 1983). EPF ile ilgili muhtelif hipotezler ortaya sürülmüştür.

2.8. Steroid hormonlar :

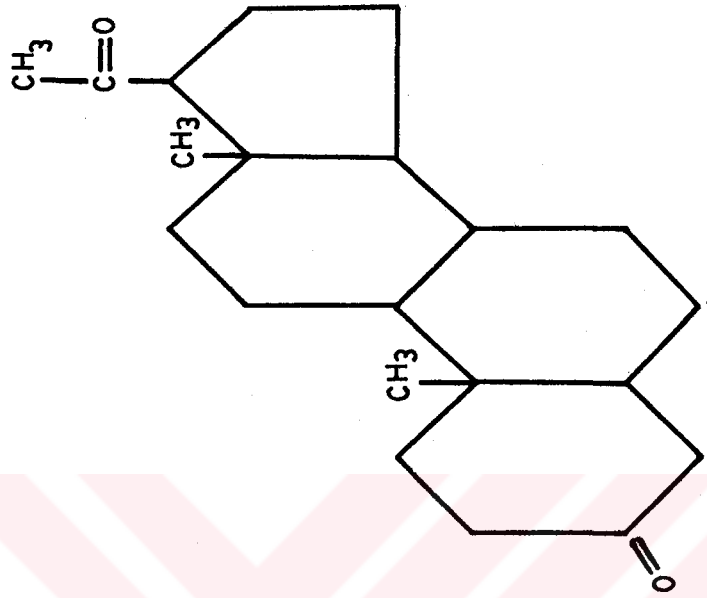
Bu grupta bulunan hormonlar, östrojenler, progesteronlar, androjenler ve adrenal kortikoidlerdir. Steroid adı, siklopentanoperhidrofenantren çekirdeğini kapsayan bir grup bileşiklere verilen addır (RIA kurs notları, 1981). Bu çekirdek bir siklopentan (D) halkasıyla tamamiyle hidrojene olmuş bir fenantren halkasından (A, B, C) oluşmaktadır.

2.8.1. Steroid hormonların kimyasal özellikleri :

Vücuttaki hormonların en büyük ve en önemli kısmını teşkil ederler. Over, testis, adrenal korteks ve plasentanın iç salgılarından oluşurlar. Steroid hormonlar kolesterol, safra asitleri, ergosterol, vitamin D ve kalb glikozidleriyle beraber aynı esas çekirdeği kapsarlar. Bu esas halkanın C atomlarına bağlı gruplarda ve C-17 ye bağlanan zincirdeki farklar çok küçük olduğu halde, bu bileşikler biyolojik fonksiyonları bakımından büyük farklar gösterirler.



Siklopentano - perhidrofenantren halkası



Progesteron : Pregnen-(4)-dion - (3,20)

2.8.2. Corpus luteum hormonu progesteron :

Progesteron hormonunun ana kaynağı, overlerde graaf folikülü yırtılıp ovum ayrıldıktan sonra oluşan corpus luteum'dur. Progesteron ovulasyon günü veya ovulasyondan bir kaç gün sonra salgılanmaya başlar.

C.L.'den başka progesteron gebeliğin son safhasında plasentadan salgılanır. Progesteron adrenokortikal hormonların, testosteronun ve indirekt olarak estradiolün sentezlerinde bir ara üründür. Bundan dolayı progesteron adrenal korteks, testis ve overlerde bulunur.

Progesteronun idrarla atılan esas metaboliti pregnandioldür.

2.8.3. Progesteronun biyosentez ve etki mekanizması :

C.L.'den progesteron salınması, hipofiz bezinden salınan gonadotropik hormonların kontrolü altındadır (Noyan, 1980). Hipotalamusdan, kandaki progesteron düzeyi azaldığında hormon saldıracı faktörler (releasing factors) adenohipofize gelerek tropik hormonların salınmasını sağlarlar. Bunlar FSH (folikül stimule edici hormon), LH (Luteinleştirici hormon) ve LTH (luteotropik hormon, prolaktin) dir. FSH folikül oluşmasını, LH folikülün C.L.'ye dönüşmesini, LTH C.L.'de progesteronun üretimini uyarır (Ersoy, 1979).

Östrus siklusunda, folikül periyodu sırasında, FSH etkisi altında, bir veya bir çok graaf folikülü büyüyüp, artan miktarda folikül hormonu östrojen salgılar. FSH düzeyi yeterince yükseldiğinde LH salgılanması başlar. LH, foliküllerin patlamasına neden olur ve bu şekilde ovulasyon olur. Hayvanlar bu dönemde östrus gösterirler. Bunu luteal periyot izler. Patlayan folikül, luteal hormon progesteronu salgılayan C.L.'ye dönüşür. Eğer yumurta döllenmişse C.L. graviditatis oluşur ve progesteron

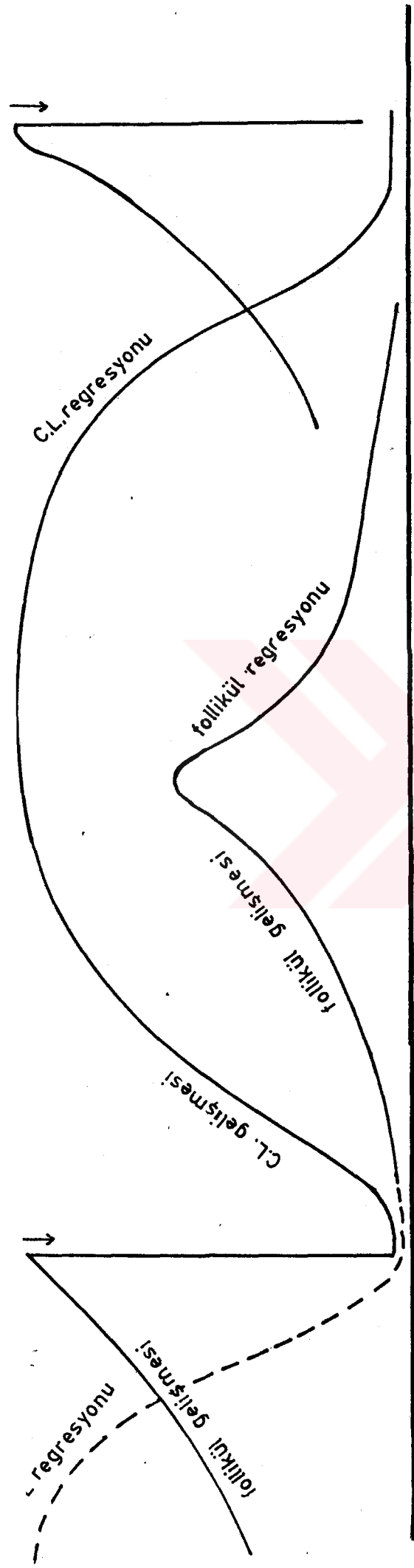
üretimi artar (Şekil 1). Eğer döllenme olmazsa, luteotropik hormon üretimi yavaşladığından, C.L. lizise uğrar (söner). Dolayısıyla plazmada progesteron düzeyi azalır ve geri bildirim (feed-back) sistemi ile hipotalamus uyarılır.

Progesteronun esas fonksiyonu, uterusda östrojenler tarafından başlatılan değişimlerin devamını sağlamak ve uterus endometriyumunu döllenmiş yumurtanın (ovum) implantasyonu ve beslenmesi için hazırlamaktır. Kandaki progesteron, yumurtanın döllenmesi için en elverişli zamanda en düşük düzeydedir. Progesteronun kalınlaşmış endometrium üzerindeki bu koruyucu etkisinden başka, myometriyum (uterus kası) ve fallop tüplerinin kontraksiyonunu inhibe edici etkisi de vardır.

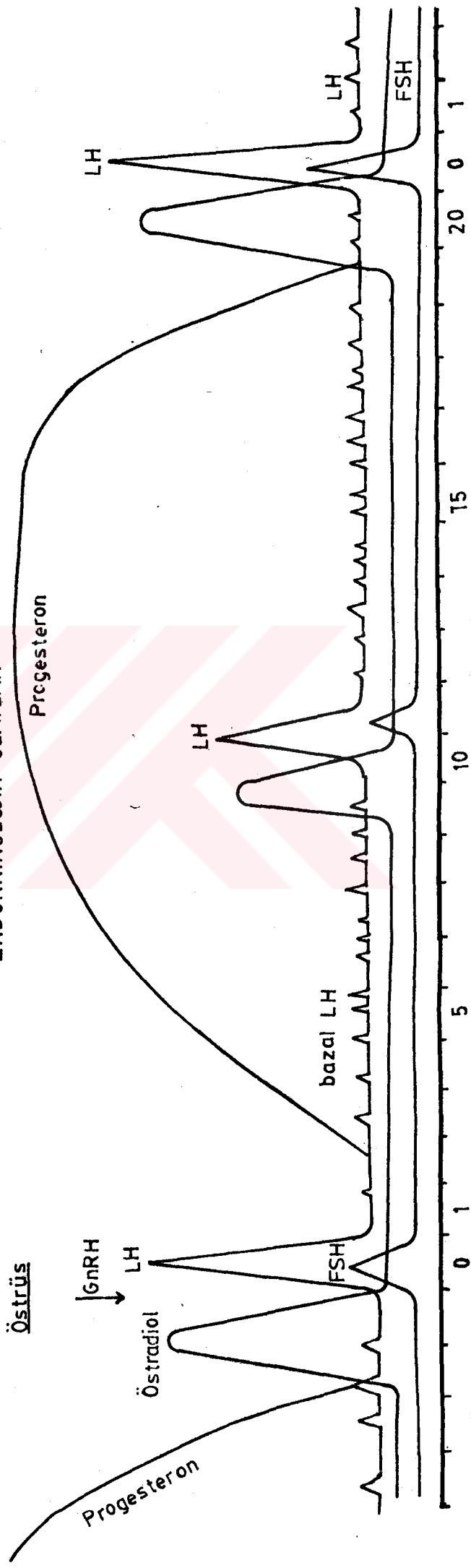
Çiftlik hayvanlarının çeşitli türlerinde östrus siklusunda ve gebelik döneminde, progesteron düzeyleri çalışılmıştır (Basset, 1969; Thornburn, 1969; Challis, 1971; Thornburn, 1972; Inskeep, 1973; Heap, 1976; Rhind, 1978; Otchere, 1978; Quirke, 1979; Wentzel, 1979; Holdsworth, 1979; Sheldrick, 1980; Jain, 1980; Post, 1980; Sheldrick, 1981; Thibier, 1981; Claus, 1983).

Plazmada ve sütte progesteron miktarları C.L.'nin fonksiyonel durumunu yansıtır ve dolaylı olarak da tüm ovaryumun durumunu yansıtır.

Keçi, koyun gibi birbirine yakın türlerde oluşan endokrin fonksiyonlardaki esas farklılıklar hipofiz-ovaryum ilişkisi ile ilgilidir (Linzell ve Heap, 1968). Örneğin Saanen süt keçilerinde luteal faz sırasında tayin edilen progesteron miktarı (Thornburn, 1972), yaklaşık olarak koyunda tayin edilenin (Thornburn ve ark., 1969) iki katıdır. C.L. sayısının luteal progesteron miktarını etkilediği gösterilmiştir.



ENDOKRİNOLOJİK OLAYLAR



Şekil 1 Östrus siklusundaki morfolojik ve endokrinolojik olaylar. (RIA kurs notları)

Keçilerde periferal plazmada progesteron miktarındaki bu yüksekliğin kısmen bu hayvanlarda gözlenen ovulasyon sıklığından oluştuğu kabul edilmektedir.

Ankara keçilerinde gebelik dönemleri ve yavru atmalarda luteal fonksiyon geniş bir şekilde çalışılmıştır (Van Rensburg, 1970; Wentzel, 1975 a; 1975 b; 1975 c; 1979 a; Westhuysen, 1980 a, b). Fakat kızgınlık dönemindeki luteal fonksiyonla ilgili fazla çalışmaya rastlanmamaktadır (Wentzel 1979 b; Westhuysen 1980 a, 1980 b). Luteal fazda düşük progesteron düzeyi olan keçilere oranla, östrus siklusunun 12. gününde nispeten yüksek progesteron düzeyi olan hayvanlarda ovulasyonun olduğu ve östrus süresinin çok kısa oluşu (12 saat) dikkati çekmektedir (Wentzel ve Müller, 1979). Progesteron düzeyinin yüksek oluşu, tohumlama zamanının uygun olmadığını gösterir. Bu durumda döllenme için hiç şans yoktur.

Ankara keçileri, Saanen süt keçilerinden biraz daha fazla, hem adrenal hem de luteal orijinli, progesteron salgılar gözükmektedir (Wentzel, 1979). Gebe 2 koyun ve 2 keçide (119 ve 126 günlük gebe) progesteron yapım bölgeleri çalışılmıştır (Linzell, 1968). Keçilerde progesteronun esas olarak ovaryum kaynaklı olduğu, halbuki koyunlarda ise plasentanın esas kaynak olduğu bulunmuştur. Adrenal salgılanma her ikisinde de % 2. den az bulunmuştur.

Östrusdan önceki -3. günden itibaren gözlenen progesteron düzeyindeki ani düşme, sentetik prostaglandinlerle muamele edilen gebe Ankara keçilerinde progesteron düzeyindeki düşmeye büyük benzerlik göstermektedir (Wentzel, 1978). Bu benzerlik östrus dönemindeki hayvanlarda uterus PG salgılanması ile C.L. nin lizisinin uyarıldığını gösterir.

2.9. Radyoimmunoassay (RIA) :

Hayvan yetiştiriciliğinde bir endokrin bezin fonksiyonel durumu hakkında bilgi edinmek için kanda hormon analizlerinin önemi büyüktür (Edqvist, 1979). Geçmişte, kanda hormon düzeylerini ölçmede kullanılan biyolojik ve kimyasal yöntemler, tek bir örneğin tayini için çok fazla miktarda kan, fazla zaman ve emek gerektiriyordu. Örneğin tek bir örnekte progesteron tayini için 400-500 ml kan plazması gerekirdi (Short, 1958). Bu durum bir hayvandan seri halde kan alınmasını engelliyordu. Radyoassay tekniklerinin gelişmesi ve radyoaktif işaretli izleyicilerin antikorun bağlanma yüzeyleriyle birlikte kullanılması endokrinolojide yeni ufuklar açtı (Berson ve Yalow, 1959). RIA tekniği ilk defa insan plazmasında insülin hormon ölçümünde kullanıldı. O zamandan beri de birçok hormon ve diğer maddelerin ölçümünde uygulanmaktadır (Edqvist, 1972, 1976).

RIA ilk önce peptid hormonların tayininde uygulanmıştır. Çünkü peptid hormonlar büyük moleküller olup, antijenik özellikleri vardır (Basic and Clinical Immunology, 1976). Burada ana sorun hormon için uygun bir antiserum oluşturmak ve antijeni (hormon) radyoaktif izotopla işaretlemektir. Moleküler ağırlığı 1000'in altında olan moleküllerin çoğunun immunolojik özelliği yoktur. Steroid hormonların çoğunun moleküller ağırlığı 300-400 arasındadır ve antijenik özellikleri yoktur (Abraham, 1973; Lader, 1973; Malvano, 1973). RIA'nın uygulanabilmesi için bu hormonların immunojenik yapılması şarttır. Bu işlem küçük moleküler ağırlıklı bir molekülün (steroid) büyük moleküler ağırlıklı (sığır serum albumini, BSA gibi) bir moleküle bağlanması ile başarılıdır (Niswender, 1970). Bu buluş steroid hormonlar için de RIA tekniğinin geliştirilmesini mümkün kıldı.

antikor ile reaksiyona sokulur ve standart çözeltilerin konsantrasyonları yatay eksene, radyoaktivite sayım sonuçları da dikey eksene işaretlenerek standart eğri elde edilir (doz-cevap eğrisi, dose response curve). Bu standart eğri, belirli konsantrasyonlardaki işaretli antijenin antikora bağlanma yarışı sonucu, ne kadar işaretli antijenin (ligand) antikora bağlanabildiğini gösterir. Örneklerin radyoaktivite saygularında (Sintilasyon sayacı) ölçülen aktiviteleri (cpm) standart eğriye uygulanarak bilinmeyen işaretli antijen miktarı hesaplanır.

2.9.1. Steroid-protein konjugatları ve antisteroid-antiserumu :

Steroid hormonların antijenik olmadıkları ifade edilmişti. Steroidlerin taşıyıcı proteinlere bağlanmalarıyla, bu hormonlara karşı özgül antikorlar oluşturulur (Ladve, 1973; Meretey, 1973; Hunter, 1982).

Doğal olarak oluşan steroid hormonlar hidroksil ve/veya keton grupları kapsarlar. Bu gruplar, steroidlerin reaktif grup kapsayan türevlerinin hazırlanmasında ana nokta olarak kullanılır (Edqvist, 1979). Çünkü hidroksil ve keton grupları, taşıyıcı proteinlerle yeterli derecede kuvvetli peptid bağları oluşturamazlar. İmmünizasyon sırasında steroid-protein konjugatı arasındaki bağların in-vivo lizisini önlemede kuvvetli kovalent bağların olması çok önemlidir. Peptid bağları ise biyolojik olarak dayanıklıdır, böyle bağları hazırlamak için, progesteronda olduğu gibi keton grupları kullanılarak, bir o-karboksimetil-oksim türevi hazırlanır. Sonra bu reaktif gruplar ile protein moleküllerinin amino grupları arasında peptid bağları oluşturulur.

Progesterona karşı antikor, farklı steroid-protein konjugatları kullanılarak oluşturulmuştur. Progesteron molekülü BSA'ya 3, 6, 7, 11 ve

20. pozisyonlarda bağlanmış ve en iyi özgül antikorlar 11α - hidroksi-progesteronun BSA'ya bağlanmasıyla elde edilmiştir (Thornycroft, 1970; Kohen, 1975). Bu konjugat tavşan, keçi gibi hayvanlara periyodik olarak (booster injections) enjekte edilerek özgül antikorlar elde edilir.

Antisteroid antiserumu elde edildikten sonra titresini, afinitesi ve özgüllüğü hesaplanır.

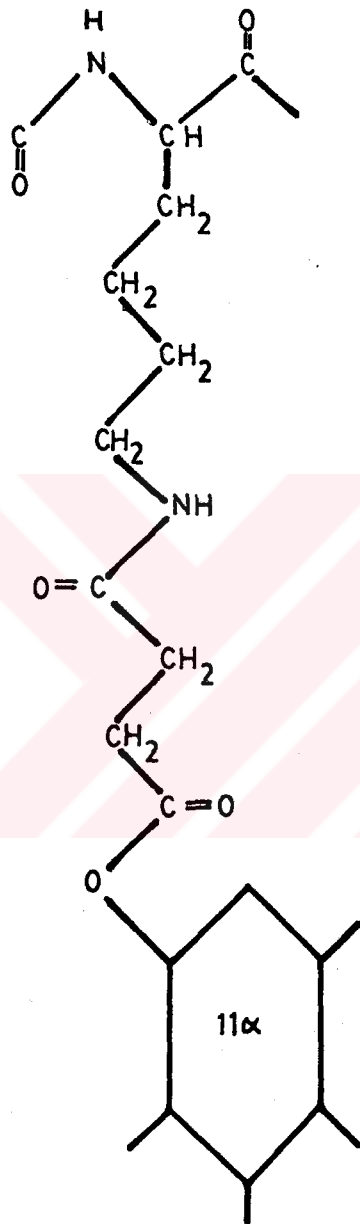
Titre : Radyoaktif işaretli steroidlerin sabit miktarıyla, antiserumun değişik dilüsyonları inkübe edilerek antikor titrasyonu yapılır. Bu şartlar altında işaretli steroidin % 50 sini bağlayan antiserum dilüsyonu optimal titre olarak tanımlanır.

Afinite (bağlanma afinitesi) : Afinite sabiti, antikorum bağlanma yüzeylerinin yarısı doymuş durumdayken bağlanmamış serbest steroid molar konsantrasyonu olarak ifade edilir.

2.9.2. Radyoaktif işaretli antijen :

Radyoimmünojenik deneylerin çoğunda en çok kullanılan radyoizotoplar ^{125}I , ^{131}I ve ^3H dür.

Steroidler genellikle ^3H ile (tritium) işaretlenirler. Tiroid ve proteohormonlar ise ^{125}I veya ^{131}I ile işaretlenirler (Raith, 1975). Steroid moleküllerinin yan zincirlerine tirozin inkorporasyonu ile bu molekülleri de radyoaktif iyotla işaretlemek mümkün olmuştur (Edwards, 1973). 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 (Oflaz, 1982).



Progesteron-11 α -hemisüksinil-BSA

Tritium işaretli hormonlar, tritiumun yarıömrünün (12 yıl) uzun olması nedeniyle daha stabildirler. Diğer taraftan radyoaktif iyot işaretli hormonların spesifik aktivitesi daha yüksektir (S.A. 200-500 mCi/mg).

Spesifik aktivitesi çok daha yüksek olan (en az 10⁹ Ci/mol veya daha yüksek) radyonüklidlerin kullanılması deney duyarlılığını daha da artırmaktadır. Bu spesifik aktiviteyi elde edebilmek için, yarıömrü bir kaç saat olan bir radyonüklide gereksinim vardır. Indium-113 ile ($t = 1.67$ saat, fiziksel yarıömrü), antijenin, sayım zamanına mümkün olduğu kadar en yakın zamanda işaretlenmesi üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Oflaz, 1982). Bu çalışmada, RIA da, radyoiodinasyonun sakıncalarının ortaya çıkardığı sorunların ortadan kaldırılmasında, antijen ve antikor önceden reaksiyona sokulmakta ve sonradan terminal olarak Indium-113 deneyin son safhasında antijene bağlanmaktadır.

2.9.3. Bağlı ve bağlı olmayan fazların ayırımı :

RIA da, antikora bağlanmış ve bağlanmamış antijenlerin ayırımında (seperasyon) çeşitli teknikler kullanılır. Tritium işaretli steroidler için en ideal olarak kullanılan sistem, dekstranla kılıflanmış aktif kömürdür (dextran-coated charcoal). Bu sistemin kullanılması :

- a) Antiserum preparasyonunun saflaştırılmasını gerektirmez,
- b) Deney köründeki (blank) özgül olmayan interferans minimumuna iner,
- c) Hızlı bir yöntem olup, 30 dakikakadan az zaman alır,
- d) Uygulaması kolaydır ve dolayısıyla hata oranı azalır,
- e) Standart eğride % 2 gibi çok az varyasyon katsayısı ile deneye yüksek bir presisyon verir, (RIA kurs notları, 1979 ve 1982).

Hem dextran hem de tampondaki jelatin sonuçların sabit oluşunu, bağlı fazın dayanıklılığını ve deney presisyonunun yüksek oluşunu sağlar. Aktif kömürün afinitesi hidrofobik steroidler için en fazla ve polar steroidler için en azdır. Onun için charcoal yüksek derecede polar steroidler için kullanılamaz. Serbest steroidlerin adsorpsiyonu hemen daima kantitatifdir (% 95-98) ve 20 dakika içerisinde adsorpsiyon olur.

Bağlı steroidin disosiyasyonu aktif kömürün konsantrasyonuna, antiserumun afinite sabitine, steroidin polaritesine, aktif kömür ile inkübasyon zamanına ve ısıya bağlıdır. Yüksek afinitelerde, $0-4^{\circ}\text{C}$ inkübasyonda disosiyasyon oluşmaz.

2.9.4. Radyoaktivite sayımı ve deney sonuçlarının değerlendirilmesi :

Deney sonunda bağlı ve bağlı olmayan fraksiyonlar birbirinden ayrıldıktan sonra sayım yapılır. Tritium B radyasyonu yaydığından sıvı sintilasyon sayacında, sintilatör içerisinde sayılır (L'Anunziata, 1980). Sayım sonuçlarının (cpm, dakikadaki sayım) ifadesinde, doz-cevap eğrileri için çeşitli koordinat sistemleri kullanılır (RIA kurs notları, 1980). Bağlı antijenin serbest oranı (B/S); bağlının total aktiviteye oranı ki bu gerçek (absolute binding) bağlanmadır. (B/T); bağlının, işaretli antijen içermeyen kör tüpündeki bağliya oranı ki bu nisbi bağlanma (relative binding) olup, hemen bütün doz-cevap eğrilerinde en fazla kullanılandır (B/B₀). B/S; B/T; B/B₀ doz-cevap eğrisinin cevap kısmını teşkil eder ve dikey eksene işaretlenir. Doz ise logaritmik veya aritmetik skala üzerinde gösterilir. Logaritmik, lineer bir doz-cevap eğrisi elde etmek için, log'a (doz) karşı logit (B/B₀) cevap, koordinat sistemi en uygun sistemdir.

Doz-cevap eğrisinden bilinmeyen antijen miktarı hesaplanır.

2.9.5. RIA kalite kontrolu (Güvenirlilik kontrolu) :

Çok düşük düzeydeki hormonların RIA ile tayininde, her deney serisi için devamlı ve düzenli bir şekilde kalite kontrolu (quality control) yapılması çok önemlidir (Sokolowski, 1978; Malvano, 1973; RIA kurs notları, 1979, 1981 ve 1982; Rodgers, 1982; Schwarz, 1982; Romero, 1982; Dudley, 1982; Edwards, 1982).

RIA kalite kontrolu 4 şekilde denenir :

- 1- Duyarlılık (sensitivity),
- 2- Özgüllük (specificity),
- 3- Doğruluk (accuracy),
- 4- Presisyon (precision).

Duyarlılık :

Deney duyarlılığı ;

- a) Standart eğrinin eğimine,
- b) İşlemsel kayıplara,
- c) Solvent körüne (blank),
- d) Plazma körüne (blank) bağlı olup, relatif % 100 bağlanmadan önemli derecede farklı elde edilen % bağlanma olarak tanımlanır. Diğer bir deyişle, tayin edilebilen en düşük hormon miktarıdır.

Standart eğrinin duyarlılığı ;

- a) Hormon ölçümü için kullanılan antiserumun afinitesine,
- b) Deneyde kullanılan radyoaktif işaretli antijen ve antikorun miktarına,
- c) İnkübasyon ortamının hacmine,
- d) Deney presisyonuna bağlıdır.

Deney körünü etkileyen faktörler şunlardır :

- a) *Anti-steroid antiserumunun afinitesi. Daha büyük afinite, daha az kör etkisi demektir.*
- b) *Tampon sistemi. Jelatin veya BSA gibi bir proteinin ilavesi kör etkisini azaltır.*
- c) *Ayırma yöntemi. Kör etkisi, steroid hormonlar için, aktif kömür ile ayırma yönteminde en azdır.*
- d) *Teknisyenlerin fizyolojik durumu. Deney yapan kişinin gebe oluşu, elden bulaşmalar olabileceği için, progesteron tayinlerinde kör etkisini artırır.*

İdeal olarak kör değerleri deney duyarlılığından az olmalıdır.

Solvent körünün etkisi, progesteron için, petrol eterli standartlar kullanılarak denenir.

Daha duyarlı deney sistemi, antiserum daha yüksek dilüsyonlarda hazırlanırsa elde edilir ve standart eğrinin eğimi yüksek dilüsyonlarda en idealdır.

Özgüllük : RIA nın özgüllüğü 2 yolla gösterilir :

- 1- *Deneyde kullanılan antikorun özgüllüğüne bağlı olup, özgül antikorun diğer steroidlerle olan çapraz reaksiyonlarıyla denenir.*
- 2- *Seçici solvent kullanılması : Tayin edilmek istenen steroidle çapraz reaksiyon veren steroidler çok veya çok az polar ise, seçici solvent ekstraksiyonu ile bunlar ortamdaki uzaklaştırılır. Progesteronun C-11 konjugatlarına karşı elde edilen antiserum yüksek derecede özgüldür ve diğer steroidlerle (kortikoidler)*

çok az çapraz reaksiyon verir. Bu steroidler progesterondan çok fazla polardırlar. Petrol eter gibi polar olmayan bir solvent kullanılarak daha polar steroidler plazmada kalır ve progesteron yağ seven (lipofilik) faza geçer (Edqvist, 1979). Böylece birçok araştırmacı, kromatografi kullanmaksızın, seçici solvent ekstraksiyonu kullanarak RIA ile duyarlı bir şekilde progesteron tayin etmişlerdir.

Doğruluk : Deneyin doğruluğu için "recovery" deneyleri 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 dikey eksene işaretlenerek bir eğri çizilir. 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 yönlemsel bir hata bulunduğuna işaret eder.

Doğruluk testinin diğer önemli bir kısmı ise "paralelizm" testidir. Standartların logit log transformasyonu ile elde edilen eğri, değişik dilüsyonlarda herhangi bir plazma kullanılarak elde edilen eğri ile paralel olmalıdır.

Presisyon : Bir RIA deneyinin presisyonu, deney sonuçları arasındaki sapmanın ortalama derecesini gösterir; diğer bir deyişle, çift işlenen aynı örnekler arasındaki ortalama farktır. Presisyon deney içi fark (intra-assay variance) ve deneylerarası fark (inter-assay variance) olarak hesaplanır. Genel olarak deneyler arası fark, deney içi farkdan büyüktür.

Deneyler arası fark, aynı örneklerin farklı deney serilerinde tekrarlanmasıyla elde edilir. Deneylerarası farkta, farklılığın büyük oluş nedenleri : farklı standart eğriler; deney çözeltilerinin kimyasal yapısındaki değişimler (saklanma koşullarından dolayı); farklı teknisyenler, aktif kömürdeki, santrifüjdeki ve laboratuvardaki ısı değişimleri; ve farklı inkübasyon süreleridir.

Deney içi fark, aynı deney içerisinde plazma örneklerinin çift çalışılmasıyla hesaplanır. Deney içi fark, pipetlenen radyoaktif maddenin antikoran ve standartların da presisyonuna bağlıdır. Sayım hataları da buna ek olarak gözönünde tutulmalıdır.

Deney tamponuna jelatin veya BSA ilavesi kör etkisini azaltır ve presisyonu artırır. Jelatin, progesteron gibi az polar steroidlerin, deney tamponundaki çözünürlüğünü artırır ve interferans yapan bileşiklerden deneyi korur.

I I I - G E R E Ç L E R v e Y Ö N T E M

3.1. GEREÇLER :

3.1.1. Hayvanlar : Denemede, Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü'nde bulunan 4-5 yaşlarında 25 Ankara keçisi ile Başbakanlık, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (T.A.E.K.) Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü'ndeki 10 Ankara keçisi kullanıldı. Yirmibeş keçiden 20'si daha önceki sıfat mevsimlerinde tohumlanmış ve normal doğum yapmış; fakat diğer 5 keçi önceki sıfat mevsimlerinde gebe kalamamış keçilerdi. Diğer 10 keçi ise 9 yaşından fazla olup, daha önceki sıfat mevsimlerinde başarılı oldukları halde, tiftik kalitesi için önemli olan yaş sınırından dolayı kasaplık olarak ayrılan keçilerdi. 20 fertil keçinin dışındaki bu toplam 15 keçi denemeye kontrol amacıyla alınmıştır. Ayrıca denemede 5 arama tekesi kızgınlık saptamak, 5 teke de tohumlama amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2. Deneylerde kullanılan aletler :

- Soğutucu santrifüj. Beckman, Model TJ-6, 120 tüp kapasiteli
- Derin dondurucu. Bosch, 0°-60°C
- Çalkalayıcı (horizontal). Eberbach
- Vortex. Thermolyne Moximix
- Su banyosu : Nüve, SR 100, 100°C lik
- Vakumlu fırın. Heraus
- Vakum pompası
- Yarı otomatik ve tam otomatik ayarlanabilir Finnpiptetler ve Oxford pipetler (5-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl)

- No. 23 kan iğneleri
- β -Scintilasyon sayacı. ICN

3.1.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler :

- Petrol eter, Merck, kaynama noktası 50° - 70° C
- Metanol, Merck, Darmstadt, Almanya
- Norit A (Aktif kömür), Merck
- Jelatin, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, A.B.D.
- Complete Freund's adjuvant, Difco Lab.
- Dextran T-70, Sigma Chemical Company, St. Louis, A.B.D.
- BSA (Bovine Serum Albumin), Serva Fein Biochemica, Heilderberg, Almanya
- Poly (acrylamide), Aldrich Chemical Company, A.B.D. (M.W. 200.000)
- Sintilatör : 1) Insta-gel,
2) 21 gr POPOP
0.5 gr PPO
300 gr Naftalin
3 lt Dioxan olarak hazırlandı.
- Fosfat tamponu : KH_2PO_4 (2.686 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8.356 g), NaH_2PO_4 (0.352 g), BSA (0.5 g) veya jelatin (0.5 g)
- Saf progesteron, 4 pregnen, 3.20 diol; Testosteron; Estron; Estradiol; Estriol; Cortisone; Hydrocortisone; Aldosterone; 4-pregnen-11 α -ol-3,20 dione Hemisuccinate : BSA (20 mole steroids : 1 mole BSA), Steroloids, Wilton, New Hampshire, A.B.D.

Antijen : Tritium işaretli progesteron, spesifik aktivitesi 80-110 Ci/mmol, 250 μCi , (1,2,6,7- ^3H)-progesterone, toluen solusyonu içinde Amersham International'dan sağlandı.

Antikor : Denejde kullanılan antikor çeşitli kaynaklardan sağlandı ve her biri için optimum antikor titresi bulundu (Serono RIA kit firmasından alınanlar dışında).

- Dr. E. Rattenberger, Tiergesund heitsdienst Isotopen labor, Münih, B. Almanya
- Dr. H.A. Robertson, Animal Research Center, Ottawa, Ortario, Kanada
- Biodata, Serono diagnostics, Italya
- Kendi laboratuvarımızda 2 tavşanda üretilen antiserum

3.1.4. Diğer Sarf malzemeleri :

- 12 x 75 mm cam deney tüpleri (bir defa kullanıldı ve atıldı)
- 100 x 12 mm pyrex ekstraksiyon tüpleri
- 12 x 60 mm, polietilen ağzı kapaklı radyoaktif sayım tüpleri (vial). Bir kere kullanıldı ve atıldı
- Plastik, otomatik pipet uçları. Bir kere kullanıldı ve atıldı.

3.2. YÖNTEM :

3.2.1. Örnek alınması : Orta Anadolu bölgesinde yaşayan Ankara keçileri Kasım ayına kadar anöstrus dönemindedirler. Kasım ayının başlamasıyla birlikte sıfat mevsimi de başlar. Bu nedenle biz, ekim ayının ikinci yarısından itibaren bütün keçilerden kan almaya başladık. Keçilerin kızgınlıkları saptanana kadar haftada 2 kez, jugular vena'dan yaklaşık 3 ml kan alındı. Kızgınlıkları tespit edilenlerden 2. kızgınlıklarının gözlenmesine kadar günlük kan alınmaya başlandı. İkinci kızgınlıklarını

gösteren keçilerin tohumlanmasından sonra ilk 1 hafta her gün ve 26. güne kadar haftada iki kez kan alındı. Sadece 6 keçide 26. güne kadar her gün kan alındı.

Diğer yaşlı 10 keçide ise 2 östrus siklusu boyunca kan alındı.

Alınan kanlar bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ de pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra 2000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi, serum ayrıldı ve test uygulanana kadar serumlar -20°C de derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Kızgınlık İşaretleri ve Kızgınlık Tayini, Kızgınlık Dönemi :

Keçilerde en iyi kızgınlık tayini teke veya onun kokusu kullanılarak yapılır (Lamont, 1964; Cognie ve ark., 1980; Corke, 1980; Knight ve Lynch, 1980; Oldham ve Cognie, 1980; Martin ve ark., 1980; Shelton, 1980; Ott ve ark., 1980 b).

İyi libido gösteren ve penisleri kapanacak şekilde bir bezle bağlanan arama tekeleri sabah saat 8.30 da sürü içine katılarak kızgın keçiler saptandı. Kızgın keçiler aktif olarak tekeyi aramaları, kuyruk sallamaları, melemeleri ve tekenin yanında işemeleri ile belirlendi. Bunun yanında diğer fizyolojik belirtiler olarak vulvanın şişmesi ve mukus salgılanması gözlemlendi.

Gözlemsel kızgınlık işaretlerinin yanında alınan kan örneklerinde düşük progesteron düzeyleri kızgınlık belirlemede diğer bir ölçüm oldu (Wentzel, 1979 b; Ott, 1982 b).

Kızgın olarak saptanan keçiler (2. kızgınlıklarında) anında tohumlandılar. Arama ve tohumlama işleminde her sıfat sezonunda yetiştiricilerin uyguladıkları sistemin aynısı uygulandı. Keçiler günde sadece bir

kez arandı ve tohumlandıktan sonra kızgınlık bitimine kadar 12 saat aralıklarla tohumlamanın tekrarlanması uygulanmadı.

Keçilerin birinci kızgınlıklarında tohumlanmamaları ve ikinci kızgınlık gösterdiklerinde tohumlanmalarıyla, kızgınlık dönemi tayini ve foliküler ve luteal safhada progesteron düzeylerinin saptanması mümkün oldu.

3.2.3. Gebelik Tayini :

Tohumlanan keçilerde gebelik tayini kanda progesteron düzeylerinin saptanmasıyla yapıldı. Tohumlamadan sonra 21. gündeki yüksek progesteron düzeyleri gebelik işareti olarak kabul edildi (Shelton, 1980). Tayin edilen yüksek progesteron düzeylerine göre erken dönemde saptanan gebelik, kızgınlığa geri dönmeme ve doğum sonuçlarına göre doğrulandı.

3.2.4. Kanda Progesteron Ölçümü, Radyoimmunoassay :

Toplanan kan örneklerinde progesteron tayini 2 basamakta gerçekleştirildi :

a) Ekstraksiyon ve solventin uçurulması :

Seçici non-polar bir solvent kullanılarak non-polar progesteronun lipofilik faza geçirilmesi işlemi, 0.2 ml serumun 2 ml petrol eterde 30 dakika ağız kapaklı ekstraksiyon tüpleri kullanılarak çalkalayıcıda çalkalanmasıyla yapıldı. Ekstraksiyon işleminden sonra tüpler -20°C derin dondurucuya konarak alt fazda kalan serum donana kadar bekletildi. Serumun donması temin edildikten sonra üst faz (petrol eter + progesteron) deney tüplerine aktarıldı. Vakum pompasına bağlı vakumlu fırın kullanılarak 60°C de petrol eter 1 saat uçmaya bırakıldı.

Her deney serisinde, düşük progesteron düzeyi (boğa serumu), yüksek progesteron düzeyi (gebe inek serumu) ve normal progesteron düzeyi (keçi serumlarının karıştırılmasıyla oluşturulan havuz) olarak 3 kontrol serum kullanıldı.

Her seferinde her örnekten çift çalışmak suretiyle 50 örnek (toplam 100) işlendi.

Petrol eterin deneye olan etkisini ölçmek amacıyla her deney serisi ile birlikte 2 tane kör tüpüne (blank) sadece petrol eter konup uçurulduktan sonra deneye ilave edildi.

Ekstraksiyon verimi :

Pregesteronun petrol eter ile ekstraksiyonunda yüzde kaç verimle ekstrakte edildiğini anlamak için şu işlemler yapıldı : Deney sonunda bulunan progesteron düzeyleri ekstraksiyon sırasındaki işlemsel kayıplar ve ekstraksiyonun etkisi gözönünde tutularak tekrar hesaplandı.

Ekstraksiyon işlemi ile birlikte 2 deney tüpüne 0.2 ml serum, 0.1 ml ^3H -progesteron kondu. On dakika $+40^{\circ}\text{C}$ de inkübe edildi ve 10 dakika oda ısısında bırakıldıktan sonra üzerine 2 ml petrol eter konup 30 dakika ekstrakte edildi. Serum dondurulduktan sonra üst faz doğrudan bir sayım şişesine aktarıldı ve uçuruldu. Petrol eter tamamen uçtuktan sonra üzerine 1.0 ml tampon solusyonu ve 5 ml sintilatör kondu. Diğer taraftan 2 sayım şişesine 0.1 ml ^3H -progesteron kondu. Bunun üzerine 1.0 ml tampon ve 5 ml sintilatör kondu (Total aktivite). Dört sayım şişesi birer dakika β -sayacında sayıma bırakıldı. Ekstraksiyon verimi şu şekilde hesaplandı :

$$\text{Ekstraksiyon verimi (\% recovery)} = \frac{\text{Petrol eter ekstraksiyonu}}{\text{Total aktivite}} \times 100$$

Yüzde verim elde edildikten sonra, ekstraksiyon işlemi sırasındaki kayıp gözönüne alınarak, ml'deki gerçek ng progesteronu hesaplamak için şu formülden yararlanılarak bir katsayı bulundu ve 0.2 ml de ölçülen progesteron değerleri bu katsayı ile çarpılarak ng progesteron/ml olarak hesaplandı.

$$\frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{1}{V_3} \cdot \frac{1}{E.V.} =$$

- V_1 : Ekstraksiyon için kullanılan solventin hacmi
 V_2 : Uçurmada kullanılan ekstraktın hacmi
 V_3 : Ekstrakte edilen plazma hacmi
 E.V. : Ekstraksiyon verimi (% recovery)

$$\frac{2}{2} \cdot \frac{1}{0.2} \cdot \frac{1}{0.85} = 6$$

b) Deney :

i- Standard hazırlanışı : Deneyde kullanılan standart seri 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 ve 1.0 ng progesteron/ml olarak hazırlandı. Bunları hazırlamak için saf progesterondan 10 mg hassas terazide tartıldı ve 10 ml'lik balon jofede metanol içerisinde çözüldü. Metanolün ısıya bağımlı olarak hacminin değişmesinden dolayı standartlar hazırlanırken soğuk su banyosu içerisinde hazırlandı. Sadece birinci stok solusyon bir süre 37°C lik su banyosuna progesteronun çözünürlüğünü arttırmak gayesiyle konuldu. Birinci solusyon stok solusyonu oldu (10.000.000 ng progesteron/10 ml metanol) ve bundan 0.2 ml (200.000 ng) alınarak diğer bir 10 luk balon jofeye aktarıldı ve yine metanolla 10 ml'ye tamamlandı. Bu ikinci

solüsyondan üçüncü dilüsyon hazırlandı ve bundan (200.000 ng/10 ml) yine 0.2 ml alınarak (4.000 ng) 20 ml'lik balon jofeye aktarıldı (4.000 ng progesteron/20 ml metanol) ve yine metanol ile 20 ml'ye tamamlandı.

Bu standart serinin hazırlandığı esas dilüsyon oldu ve deneyde kullanılan standartlar bu üçüncü dilüsyondan hazırlandı. Sırasıyla, bu dilüsyondan ;

0.05 ng/ml standart için	25 µl
0.1 ng/ml	" " 50 µl
0.2 ng/ml	" " 100 µl
0.5 ng/ml	" " 250 µl
1.0 ng/ml	" " 500 µl

alındı ve 5 tane 20 ml'lik daha önce içlerine birer ml metanol konan şişelere lamda pipetleriyle pipetlerin içi metanolla yıkanmak suretiyle aktarıldı ve kuru azot ile uçuruldu. Uçurulduktan sonra her şişeye 10 ml deney tamponu ilave edildi, ağızları kapanarak on kere çevrilerek karıştırıldı.

Bu standartların her birinden 0.1 ml alınarak deney standart serisi hazırlandı.

ii- Antiserum dilüsyonunun hazırlanması : Antiserum titrasyonu sonucu işaretli progesteron ile % 50 bağlanma veren titre deney için uygun kabul edildi ve bunun BSA tampon içerisinde dilüsyonu hazırlandı. Dr. Rattenberger'den sağlanan antiserum için 20 µl antiserum 50 ml BSA tampon içerisinde çözüldü ve her bir örneğe 0.5 ml ilave edildi.

Dr. H.A. Robertson'dan sağlanan liyofilize antikordan 1 mg tartılıp

1 ml BSA tampon içerisinde çözöldü. Bu 1:305 lik dilusyondan 1:10.000 lik dilüsyon hazırlandı ve her bir tüpe 0.1 ml ilave edildi.

Sercno, biodata firmasından sağlanan Antikor da liyofilize halde olup doğrudan her bir şişeye 12.5 ml bidistile su konarak çözöldü ve her bir tüpe 0.1 ml ilave edildi.

Kendi laboratuvarımızda hazırladığımız antiserum ise, 20 µl antiserum, 60 ml BSA tamponu içerisinde çözölerek hazırlandı.

iii- Antijenin hazırlanması :

Amersham'dan sağlanan 250 µCi ve spesifik aktivitesi 80-110 Ci/mmol olan (1,2,6,7,-³H) progesteron, 1 ml toluen içerisinde geldi. Buna 5 ml metanol ilave edildi ve bu solusyondan 0.1 ml ağzı kapaklı bir erlenmayere konarak kuru azot ile uçuruldu ve üzerine 30 ml BSA tampon eklendi. İyice ve yavaşça karıştırdıktan sonra bundan 0.1 ml alınarak 5 ml sintilatörde likit sayaçta sayıldı. Her seferinde yaklaşık 15.000-18.000 cpm sayım alınmasına dikkat edildi. Bu değer yaklaşık 0.01 µCi/0.1 ml eşdeğerdir. Bu şekilde hazırlanan ³H-progesteron solüsyonu +4°C de bir ay süreyle bozulmadan saklanabildi. Metanol içerisinde kalan ³H-progesteron ise, kullanılmadığı sürece -20°C de saklandı.

iv- Deneyin uygulanması : Deneyde kullanılacak maddelerin hazırlanmasından sonra deney şu şekilde yürütöldü :

Petrol eterleri uçurulan tüpler fırından alındıktan sonra üzerlerine 0.1 ml veya 0.5 ml BSA tampon ilave edildi (Antiserum dilüsyonlarının hazırlanış şekline göre tampon ilavesi de değişik kullanıldı).

Diğer taraftan yine çift olarak total aktivite (T), özgül olmayan bağlanma (Ö.O.B.), % 50 bağlanma (O) ve standart seriler 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ng progesteron için deney tüpleri işaretlendi. Standart tüplere sırasıyla standartlardan 0.1 ml kondu. Diğer taraftan T, O ve Ö.O.B. tüplerine standartlar yerine BSA tampondan 0.1 ml kondu. Bütün tüplere 0.1 ml (0.01 μ Ci) 3 H-progesterondan kondu ve işaretli (ekzojen) ve işaretli (endojen) progesterona antikora eşit bağlanma şansı tanımak için tüpler karıştırıldı. Sonra T ve Ö.O.B. tüpleri hariç bütün tüplere 0.1 ml veya 0.5 ml Antiserum ilave edildi. T ve Ö.O.B. tüplerine antiserum yerine BSA tampon ilave edildi. Her zaman toplam hacmin 0.7 ml olması ideal olarak kabul edildi (Sintilatörde sayım yapıldığından sayım geometrisi açısından bütün tüplerdeki hacmin eşit olması sayım verimliliği bakımından çok önemlidir).

Bütün tüpler vortex'de karıştırıldıktan sonra 37°C lik su banyosuna kondu. İlk 15 dakikadan sonra tüpler tekrar vortex'de karıştırıldı ve tekrar ikinci bir 15 dakika su banyosuna kondu. Toplam 30 dakikalık 30°C lik inkübasyonu takiben tüpler 0°C ile +4°C lik soğuk su banyosuna konarak reaksiyon durduruldu. Soğuk su banyosunda en az bir saat en fazla 24 saat bekletildiler. Soğuk su banyosunun süresi deneyi etkilemedi.

Antikora bağlanmış ve bağlanmamış (işaretli veya işaretli) progesteronları yani bağlı ve bağlı olmayan fazları birbirinden ayırmak için dekstranla kılıfllanmış aktif kömür kullanıldı. Aktif kömür tüplere (T'ler hariç) manyetik karıştırıcıda homojen olarak karıştırılarak ve soğuk olarak 0.5 ml ilave edildi. Tüpler tüplükleriyle 1 dakika elle çalkalandı ve 5 dakika daha soğuk su banyosunda bekletildikten sonra

sırasıyla santrifüj tüplerine (120 örnek kapasiteli) yerleştirildi ve daha önce $+4^{\circ}\text{C}$ ye soğutulmuş soğutucu santrifüjde 2500 rpm de 10 dakika santrifüje edildi.

Santrifüj sonunda aktif kömür serbest antijenleri (progesteron) bağlayarak çöktü üstte kalan antikora bağlı faz küçük sayım tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 2.5 ml sintilatör kondu ve ağızları kapatılarak sintilatörle iyice karışmaları için elle kuvvetli bir şekilde çalkalandılar. Sintilatörle bir süre reaksiyona girmesi için beklendikten sonra likit sayaçta birer dakika radyoaktiviteleri sayıldı. "O" ın "T" ye oranı antikorun % bağlanmasını verir. Bütün sayımların "T" ye oranı gerçek bağlanmadır. RIA değerlendirilmesinde, B/B_0 , yani bütün sayımların "O" a bölünmesi olan nisbi bağlanma (relative binding) kullanıldı. Her sayım sonucu, "O" ın sayım sonucuna bölünerek örneklerin % bağlanmaları hesaplandı. Standart eğriden yararlanılarak örneklerin ng/ml olarak progesteron değerleri hesaplandı. 0.2 ml serumda tayin yapıldığı için ml'deki miktarı hesaplamak için bütün değerler 6 ile çarpıldı (% verim hesaplanıp, işlemsel kayıplar dikkate alınarak 6 katsayısı hesaplandı)

3.2.5. Radyoimmunoassay Kalite Kontrolü :

Deneyde tayin edilen değerler çok düşük düzeyde olduğundan progesteron tayini için kullanılan radyoimmunoassay tekniğinin güvenilirliğinin kontrol edilmesi deneyin özgüllüğü, duyarlılığı, doğruluğu ve presiyonu açısından çok önemlidir. Bu sebeple deneyin geçerli olup olmadığı şu kriterler kullanılarak denendi :

a) Özgüllük (Specificity)

Çapraz reaksiyonlar : Dışarıdan temin edilen antikorların özgüllük testleri denendiği ve progesteron hormonu için özgül olduğu saptandığı için, sadece kendi laboratuvarımızda üretilen anti-progesteron antiserumunun çeşitli steroid türevleri ile çapraz reaksiyon verip vermediği denenerek progesteron için özgül olup olmadığı tayin edildi.

Bu işlem için saf haldeki testosteron, estron, estradiol, estriol, kortizon, hidrokortizon ve aldosterondan, progesteron standartlarının hazırlandığı gibi standart dilüsyonlar hazırlandı. Her bir steroid için progesteron da dahil çapraz reaksiyon eğrileri hazırlandı : her standart nokta yine çift çalışıldı. Standart noktaların hepsi 0.05 ng/ml - 1.0 ng/ml arasında idi. Bütün tüplere sırasıyla uygun standartlar 0.1 ml olacak şekilde pipetlendi. Üzerlerine 0.1 ml ³H-progesteron ve 0.5 ml anti-progesteron antiserumunun optimum titresi ilave edildi. Bundan sonraki işlemler progesteron tayininde yapıldığı şekilde uygulandı.

Her bir hormon için aynı grafik kağıdında standart eğri çizildi.

Anti-progesteron antiserumunun diğer steroidlerle verdiği çapraz reaksiyon yüzdesi şu şekilde hesaplandı ;

$$\% \text{ çapraz reaksiyon} = \frac{\% 50 \text{ bağlanmada progesteron miktarı}}{\% 50 \text{ bağlanmada diğer steroid miktarı}}$$

Paralellik : Deney özgüllüğü için diğer bir yol da paralellik testidir. Şayet radioimmunoassay immunolojik olarak özgül ise, çeşitli serumlardan hazırlanan seri dilüsyonların değerlerinin progesteron standart eğrisine paralel olması gerekir.

Anti-progesteron antiserumu için paralellik testi şu şekilde uygulandı :

Progesteron standartları 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 ve 1.0 mg olarak metanol içerisinde hazırlandı.

Karışık keçi serumlarının bulunduğu havuzdan sırasıyla 50 µl, 100 µl, 200 µl ve 400 µl alındı. Standartlar ve serumlara 2.0 ml petrol eter kondu, 30 dakika çalkalayıcıda ekstrakte edildi ve uçuruldu. Uçurmadan sonra normal RIA işlemi yapıldı.

Ayrıca özgül olmayan bağlanma ve maksimum yüzde bağlanma için de ikişer tüp deneye ilave edildi.

Standart eğri ve serum dilüsyon eğrisi logit-log grafik kağıdına çizildi. Yüzde bağlanmaların logitlere çevrilmesi için $\text{logit} = \ln B / 100 - B$ formülü kullanıldı (100, en fazla yüzde bağlanmadır).

Seçici solvent : Deney özgüllüğünü artıran diğer bir yolda saflaştırılmış fraksiyonda bulunan bilinen steroidlerin progesterona göre konsantrasyonlarının az olmasıdır. Bu da seçici solvent petrol eter kullanılarak sağlandı.

b) Duyarlılık (Sensitivity) :

Deneyin duyarlılığı standart eğrinin eğimine, işlemsel kayıplara, solvent körüne ve plazma körüne bağlıdır.

Deneyde duyarlılık sıfır noktasındaki bağlanmadan önemli derecede farklı elde edilebilen en az ng progesteron olarak hesaplandı.

Solvent körün etkisi, petrol eterli ve petrol etersiz standartlar

hazırlanarak ve de her testte bir çift petrol eter körü (0 bağlanma olarak) yapılarak denendi.

Plazma körü olarak çok düşük düzeydeki boğa serum progesteronu kullanıldı.

Deneyin duyarlılığı, antiserum titrasyonuna da bağlıdır. Anti-serum daha yüksek dilüsyonlarda hazırlanırsa, daha iyi standart eğriler ve dolayısıyla duyarlı sonuçlar elde edilir. Değişik antiserum dilüsyonlarıyla çeşitli standart eğriler hazırlandı ve en iyi eğimli standart eğri saptandı.

c) Doğruluk :

Deneyin doğruluğu verim (recovery) deneyleri ile yapıldı. İşaretsiz progesteronun bilinen ve artan miktarları (standartlar) metanol içerisinde ekstraksiyon tüplerine kondu ve uçuruldu. Sonra her bir tüpe 0.2 ml boğa serumu kondu. Tüpler karıştırıldı ve 40°C de 15' inkübe edildi, oda ısısında 20 dakika bırakıldı. 2 ml petrol eter ile ekstrakte edildi ve uçuruldu. Bundan sonraki işlemler diğer RIA işlemlerinde olduğu gibi yapıldı. Sonuçta elde edilen değerlerden boğa serumundaki progesteron miktarı çıkarıldı. İlave edilen standart progesterona karşılık ne kadar progesteron elde edildiği hesaplandı. Bununla ilgili grafik çizildi, regresyon çizgisi için eşitlik ve korelasyon katsayısı hesaplandı.

Deneyin doğruluğunu kanıtlayan diğer bir sistem ise daha önce bahsedildiği gibi paralellik testidir.

d) Presisyon (Precision) :

Deney presisyonu, aynı deney içinde aynı örneğin çift çalışılan

değerleri arasındaki fark ve aynı örneğin farklı deney serilerinde bulunan değerleri arasındaki fark olarak; yani deney içi fark (intra-assay variance) ve deneyler arası fark (inter-assay variance) olarak hesaplandı.

Progesteron ölçümü için deney içi varyans pipetlenen radyoaktif progesteronun, anti-progesteron antiserumunun, standartların ve ekstraksiyon işleminin ve likit sayaçta sayım işleminin de presisyonuna bağlıdır. Deneyler arası varyans büyüdüğü zaman bütün bu olasılıklar tek tek kontrol edilerek deneyler yürütüldü.

Bu çalışmada deney içi ve deneyler arası varyans standart sapma formülü kullanılarak serum örneklerinin çift ölçümlerinin tayininden elde edildi.

3.2.6. İmmünizasyon (anti progesteron antiserumu elde edilmesi) :

İmmünizasyon işlemi için 2 ergin dişi tavşan kullanıldı :

a) Antijen hazırlanışı : İki tavşan için 2 mg 11 α -hemisüksinat progesteron : BSA ve 1 mg poliakrilamid 1 ml bidistile su ve emülsiyon yapmak için 1 ml complete Freund's adjuvant ile vortekste beyazlaşana kadar (emülsiyon olana kadar) karıştırıldı. Her enjeksiyon için bu immünojen karışımı anında taze olarak hazırlandı.

b) Enjeksiyon; Hazırlanan antijen emülsiyonundan her bir tavşana 0.25 ml 2 subkutan ve 0.25 ml 2 kas içi enjeksiyon yapıldı. İlk 4 hafta haftalık ve ondan sonra uygun antikor titresi elde edilene kadar aylık enjeksiyonlara aynı şekilde devam edildi.

c) Enjeksiyona başladıktan 2 ay sonra tavşanların kulak venasından yaklaşık 0.5 ml kan alınarak her iki tavşan için de antikor (A/S) titrasyonları yapıldı. Kontrol amacıyla immunize edilmemiş normal tavşanlardan da (NTS) aynı şekilde kulak venasından kan alındı.

Alınan kanlar bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ de pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra santirfüje edilerek serum ayrıldı. Bu serumun dilüsyonları şu şekilde yapıldı. Sırasıyla 3 tavşan için ayrı ayrı, çift çalışmak suretiyle 7 dilüsyon yapıldı. Bütün tüplere 2.5 ml BSA tampon kondu. İlk birinci tüplere 50 μl tavşanlardan elde edilen serum kondu ve vortekste karıştırıldı. (1:100, % 1 lik dilüsyon); bundan 2.5 ml alındı ve 2. tüpe kondu (1:200, % 0.5 lik dilüsyon); bundan 2.5 ml alındı 3. tüpe kondu (1:400, % 0.25 lik dilüsyon); bundan 2.5 ml alındı 4. tüpe kondu (1:800, % 0.125 lik dilüsyon); bundan 2.5 ml alındı ve 5. tüpe kondu (1:1600, % 0.0625 lik dilüsyon); bundan 2.5 ml alındı 6. tüpe kondu (1:3200, % 0.03122 lik dilüsyon); bundan 2.5 ml alındı ve 7. tüpe kondu (1:6400, % 0.01562 lik dilüsyon).

Her bir dilüsyon ve her bir tavşan için ayrı ayrı işaretlenen test tüplerine 0.1 ml ^3H -progesteron bu dilüsyonlardan 0.5 ml ve 0.1 ml BSA tampon kondu. % bağlanmayı ölçmek için ise 2 adet total aktivite tüpü teste ilave edildi. Bunları 0.1 ml ^3H -progesteron ve 0.6 ml BSA tampon kondu.

Bundan sonraki işlemler RIA deneyinde yapıldığı şekilde yapıldı.

Tavşan anti-progesteron antiserumlarının (A/S) çeşitli dilüsyonları için % bağlanmalar şu şekilde hesaplandı :

$$\frac{\text{A/S tüpü cpm } (\bar{x}) - \text{NTS tüpü cpm } (\bar{x})}{\text{Total aktivite cpm } (\bar{x})} \times 100 = \% B$$

% bağlamalara karşı tavşan anti-progesteron antiserum dilüsyonları grafik kağıdına çizildi ve % 50 bağlanma veren ideal dilüsyon (antikor titresi) hesaplandı.

Yüksek titreli antikor elde edilinceye kadar her aylık enjeksiyondan bir hafta sonra kan alındı ve yukarıda anlatıldığı şekilde titrasyon eğrileri çizildi.

3.2.7. Likit Sayacın Sayım Verimliliğinin Hesaplanması :

Deney sonuçlarının sayımında kullanılan likit sayacın sayım verimi internal ve eksternal standardizasyon yöntemi ile bulundu.

2.71×10^6 dpm/ml ^3H -toluen (Packard) internal standardın 10 μl si yaklaşık 18.000 cpm aktivitedeki ^3H -progesterona ilave edilerek progesteron tayinleri için kullanılan cihaz şartlarında sayıldı. Verim hesabı aşağıdaki şekilde yapıldı.

$$\% \text{ verim} = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}} \times 100 = \frac{\text{net cpm (B-A)}}{\text{dpm (Internal Standart)}}$$

$$A = (\text{Numune} - \text{Background})$$

$$B = [(\text{Internal standart} - \text{Numune}) - \text{Background}]$$

$$\% \text{ verim} = \frac{(31255 - 24693)}{27100} \times 100 = 24 \%$$

Verimin ikinci bir kontrolü olarak ağız mühürlü ^3H eksternal standart (Packard) kullanıldı, bu standartın radyoaktif bozunma hızı 221×10^3 dpm dir.

Internal standardizasyondaki cihaz şartlarında bu standart sayılar olarak ortalama 81,612.25 cpm elde edildi (BKG aktivite çıkarıldıktan sonra).

Buna göre,

$$\% \text{ verim} = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}} \times 100$$

$$= \frac{81,612.25}{221 \times 10^3} \times 100$$

$$= 36.93 \%$$

Sonuç olarak ölçümlerimizde cihazın ortalama % 24 - % 37 verimle sayım yaptığı tespit edilmiştir.

I V - B U L G U L A R

Bu çalışmada, Ankara keçilerinde erken gebelik tayini ve östrus siklusundaki fizyolojik olayları saptamada bir parametre olan serumda RIA ile progesteron düzeyleri tayin edildi. Keçilerin siklus dönemlerindeki progesteron profilleri çıkarıldı ve tohumlanan keçilerden 6 tanesinin tohumlamadan sonra 24 güne kadar serum progesteron düzeyleri tayin edilerek gebe olanlar ve olmayanlar arasındaki farkın ve korelasyonun önemi bulundu (Tablo 1).

Ayrıca progesteron tayinlerinde RIA yönteminin keçi serumu için kalite kontrolü çeşitli şekillerde denendi (Tablo 3,4 - Şekil 6,7,8).

4.1. Keçilerin Anöstrus, Östrus, Östrus Siklusu ve Gebelik Dönemlerindeki Progesteron Düzeyleri :

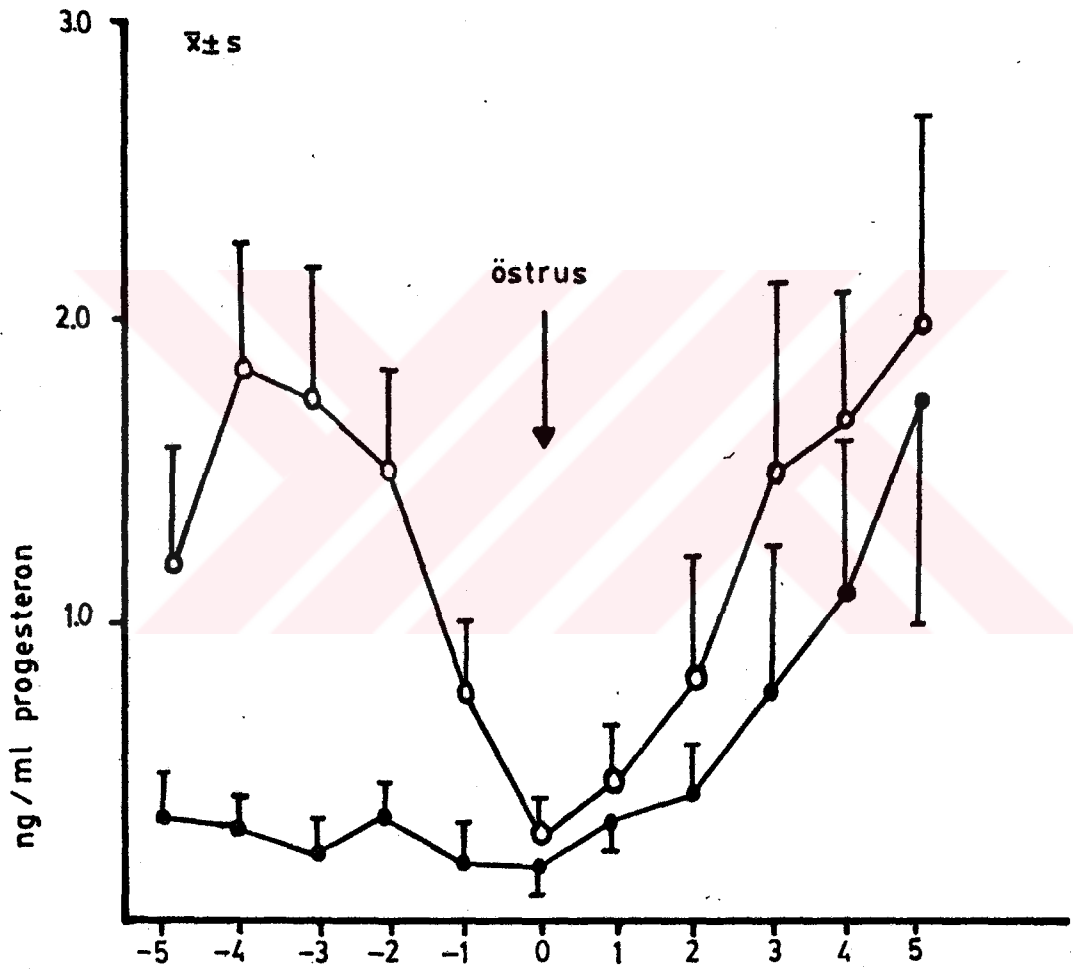
4.1.1. Anöstrus Dönemindeki Progesteron Düzeyleri :

Keçilerin çoğu, Kasım ayında kızgınlık göstermeye başladılar. Bu zamana kadarki progesteron düzeyleri, 20 keçide, çok az bireysel farklılıklarla, 0.35 ± 0.1 ng progesteron/ml civarında bulundu (Şekil 2).

Sadece 2 keçide, gözlenen ilk östrusdan önce, kısa süreli (4-5 gün) yüksek (1.9 ± 0.40 ng/ml) progesteron düzeyleri saptandı (Şekil 2).

Tablo 1 : Tohumlanan ve tohumlanmayan keçilerde progesteron düzeyleri.

Gebelik Günleri	$\bar{x} \pm$ Progesteron (ng/ml)		Korelasyon katsayısı (r)	t	P
	Gebe n=19	Gebe olmayan n=10			
1 - 5	1.05 \pm 0.68 n=77	1.35 \pm 0.85 n=47	% 90	3.0	P < 0.01
6 - 15	2.34 \pm 1.00 n=53	2.20 \pm 0.91 n=76	% 85	3.1	P < 0.01
16 - 21	3.05 \pm 1.00 n=47	1.80 \pm 0.85 n=65	% 32	1.2	P > 0.01
22 - 27	2.74 \pm 1.60 n=40	1.20 \pm 0.70 n=40	% 38	0.9	P > 0.01
28 - 38	3.80 \pm 1.70 n=62	2.80 \pm 0.99 n=70	% 88	2.4	P < 0.01



Şekil:2 Sıfat mevsiminin başlangıcında 2 keçide (○—○) ve 20 keçide (●—●) gözlenen anöstrusdan östrusa geçişteki progesteron düzeyleri.

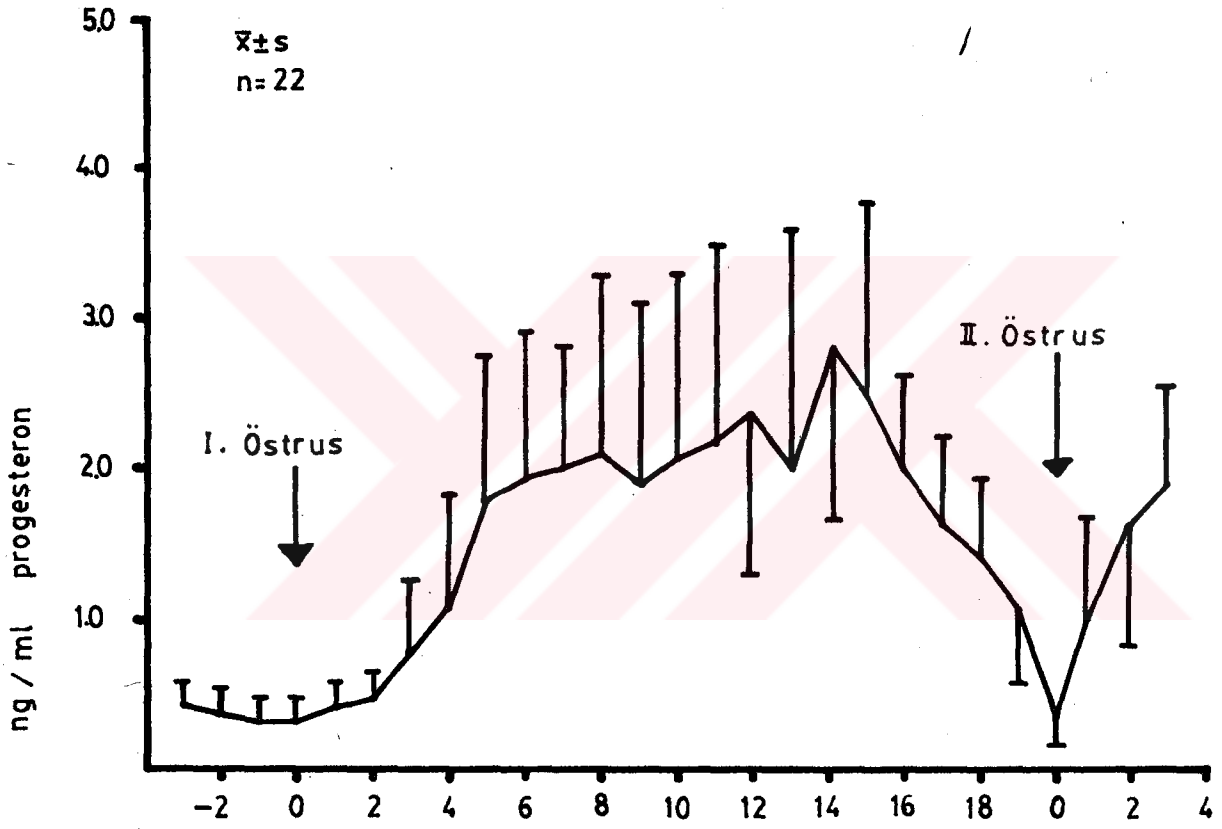
4.1.2. Östrusda Progesteron Düzeyleri :

Kızgınlık gösteren bütün keçilerde gözlenen birinci kızgınlıklarında, progesteron düzeyi 0.2 ± 0.09 ng progesteron/ml olarak saptandı. Keçilerin gözlenen ikinci kızgınlıklarındaki progesteron düzeyi ise 0.45 ± 0.2 ng/ml idi (Şekil 3 ve 4).

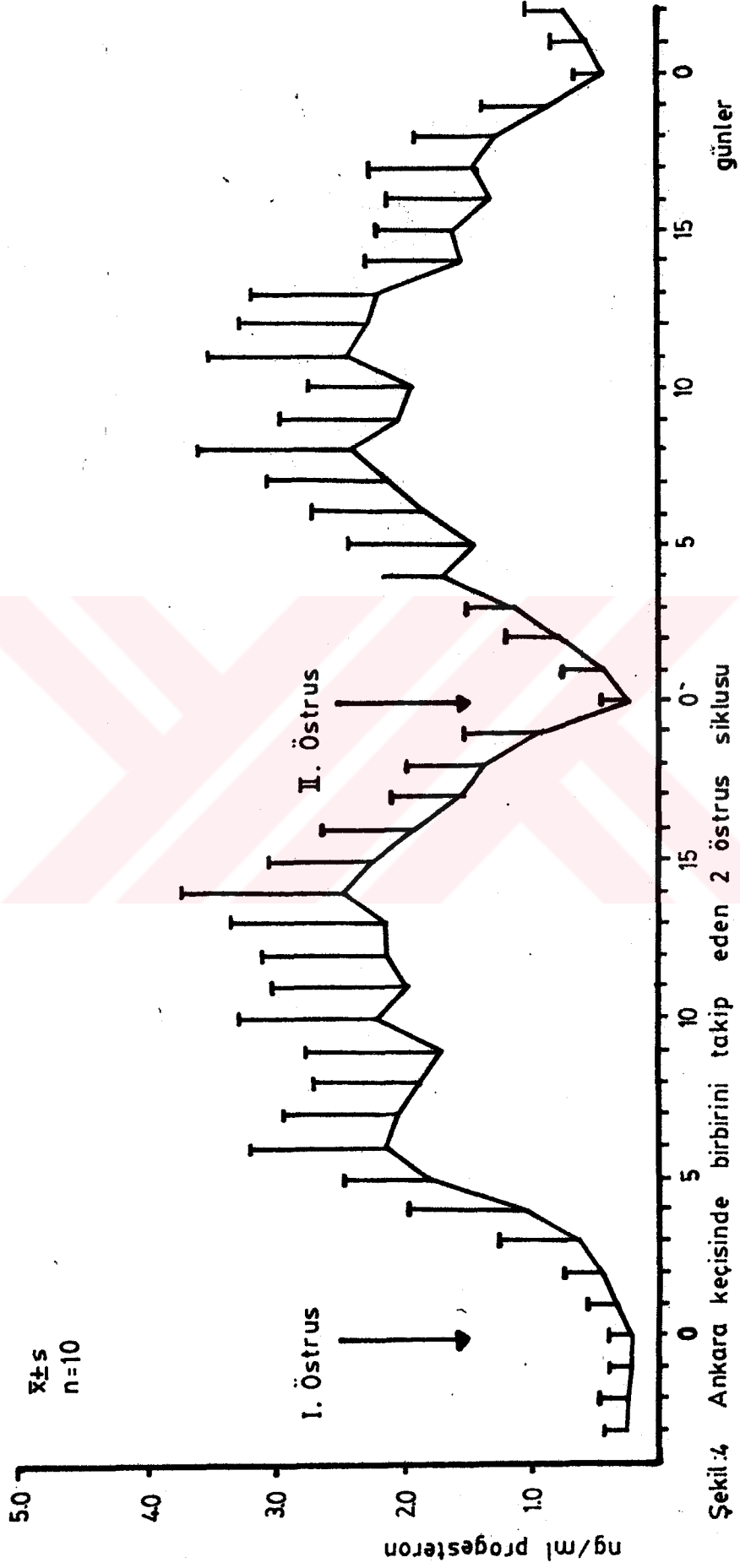
4.1.3. Östrus siklusundaki progesteron Düzeyleri :

Denemedeki 35 keçiden 33 ü normal progesteron profili göstermiştir (Şekil 3). Daha önceki sıfat mevsimlerinde kızgınlık göstermeyen 5 keçiden ikisinde, bireysel küçük standart sapmalarla, sıfat mevsimi boyunca devamlı düşük (0.3 ± 0.2 ng/ml) progesteron düzeyi bulunmuştur.

Normal bir östrus siklus süresi 2.0 gün olarak saptanmıştır. Bu süre zarfında en fazla bulunan progesteron düzeyi 2.85 ± 1.1 ng/ml olarak elde edilmiştir. Keçilerin sıfat mevsiminde ilk birinci östrus siklusundaki progesteron, östrusdaki 0.2 ± 0.09 ng/ml'den yavaş bir şekilde 1. günde 0.4 ± 0.2 ng'a, ikinci günde 0.47 ± 0.2 ng, 3. günde 0.75 ± 0.45 ng, 4. günde ise 1.0 ng'ın üstüne çıkarak 1.1 ± 0.65 ng'a ulaşmıştır. İkinci östrus gözükmesinden önce -3. güne kadar 1.5 ng/ml'in üstünde kalmaya devam etmiş ve -3. günden itibaren, ani bir düşme kaydederek -2. günde 1.5 ± 0.5 ng, -1. günde 1.15 ± 0.5 ng ve nihayet östrus günü 0. günde 0.45 ± 0.1 ng/ml olarak saptanmıştır. İkinci kızgınlıklarında, gözlenebilir kızgınlık gösteren bütün keçiler (yaşlı 10 keçi hariç) tohumlanmışlardır. Daha önceki sıfat mevsimlerinde gözle izlenebilir kızgınlık göstermeyen 5 keçiden 3 ünde normal bir östrus progesteron profili gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3). Yaşlı 10 keçi ile genç keçilerin östrus siklusunun çeşitli evrelerindeki progesteron düzeyleri arasındaki korelasyon önemli bulunmuştur (Tablo 2).



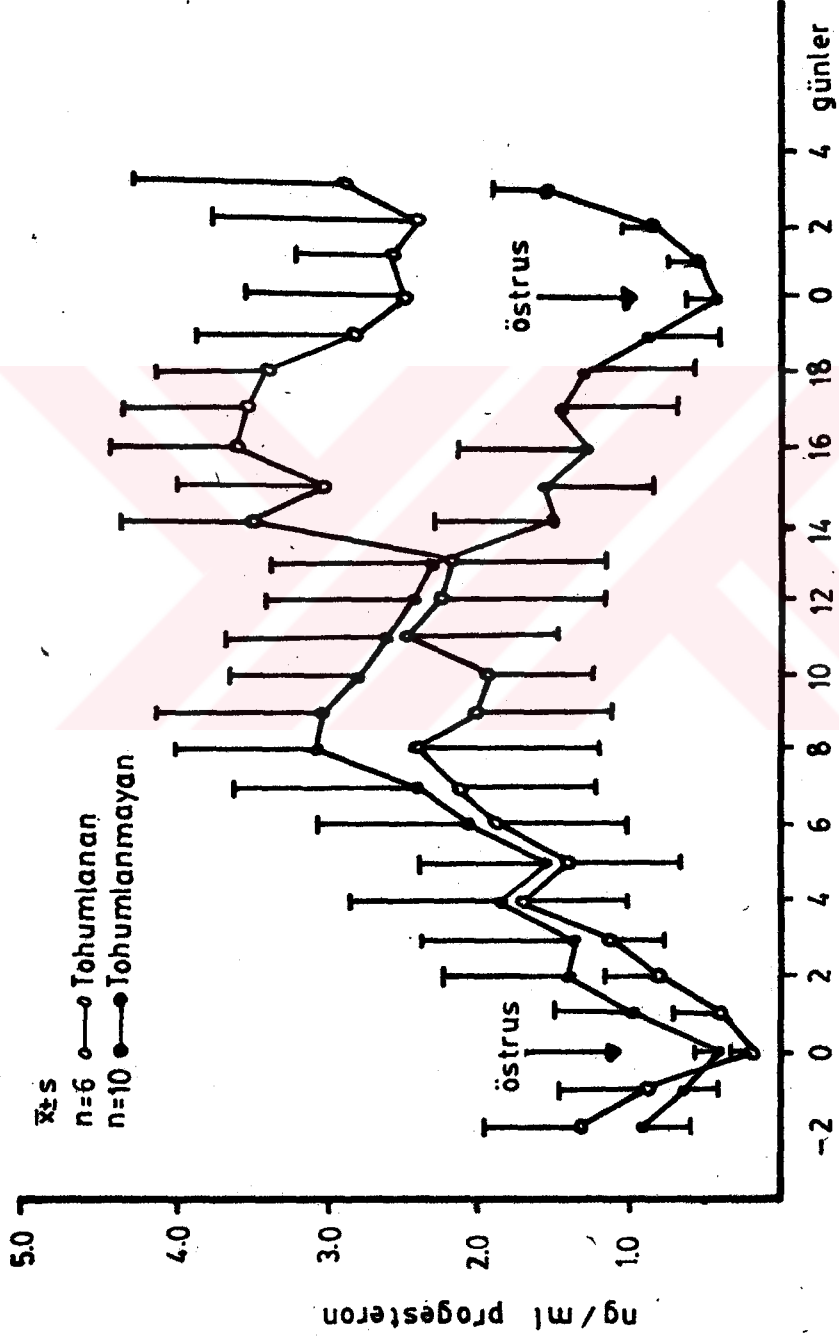
Şekil:3 Ankara keçisinde normal östrus siklusu progesteron modeli



Şekil:4 Ankara keçisinde birbirini takip eden 2 östrus siklusu

Tablo 2 : Genç ve yaşlı keçilerde siklusun çeşitli dönemlerinde progesteron düzeyleri.

Siklus Dönemleri (gün)	$\bar{x} \pm$ Progesteron (ng/ml)		Korelasyon katsayısı (r)	t $(\frac{\bar{x}-s}{s})$	P
	Yaşlı keçiler n=10 9 yaş	Genç keçiler n=22 4-5 yaş			
Proöstrus (15-19)	1.35 \pm 0.58 n=50	1.70 \pm 0.91 n=73	% 87	3.0	P < 0.01
Östrus (0)	0.56 \pm 0.07 n=10	0.47 \pm 0.14 n=18	% 47	4.7	P < 0.01
Postöstrus (1-5)	1.35 \pm 0.85 n=47	1.05 \pm 0.68 n=77	% 90	3.0	P < 0.01
Metöstrus (6-14)	2.50 \pm 0.91 n = 82	2.15 \pm 1.05 n=167	% 69	2.35	P < 0.01



Şekil:5 Tohumlanan ve tohumlanmayan keçilerde progesteron düzeyleri

4.1.4. Gebelik Dönemi Progesteron Düzeyleri :

Keçilerin tohumlanmasından sonra ilk 20 günde gebe olup olmadıklarının tayininde progesteron hormonu kullanılmıştır. Tohumlamadan sonra (2. kızgınlıklarında) 6 keçinin, gebeliğin ilk 24 gününe kadarki günlük progesteron düzeyleri ve 10 (yaşlı) kontrol keçinin de 2. kızgınlıkları Şekil 5 de gösterilmiştir. Siklusun 21. gününde 10 keçinin ortalama progesteron düzeyinin 0.5 ± 0.15 ng/ml olmasına karşılık gebe olduğu saptanan 6 keçide bu tarihte 2.4 ± 1.1 ng/ml progesteron düzeyi elde edildi. Diğer gebe keçilerde ise (haftada 2 kez, gebelik tayini için, örnek alınan 20 keçiden 18 tanesi) bu dönemde progesteron 3.0 ± 1.5 ng/ml olarak bulundu.

Bu 20 keçiden 2 tanesinde 21. günde progesteron miktarı 0.5 ± 0.15 ng/ml olarak bulundu. Bu dönemde bu keçiler tohumlandı zannedildiğinden, tekrar kızgınlık için aranmadılar. Dolayısıyla gebe kalmadılar.

Türkiye'de yetiştirilen Ankara keçilerinde, çevreye iyi uyum sağladıkları için, gebelik döneminde (iyi beslenme şartlarında) yavru atmaya çok nadir rastlandığından, doğumla tasdiklenen erken gebelik tayininin doğruluğu % 100 olarak elde edildi.

Ankara keçilerinin erken gebelik tayininde $1.5 - 2.0$ ng/ml progesteron sınır olarak ele alınmıştır. Gebe olanlar ve olmayanlar için (tohumlamadan sonra) 21. gündeki progesteron değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($t = 11.2$, $p < 0.01$), korelasyon ise önemsiz bulunmuştur (Tablo 1).

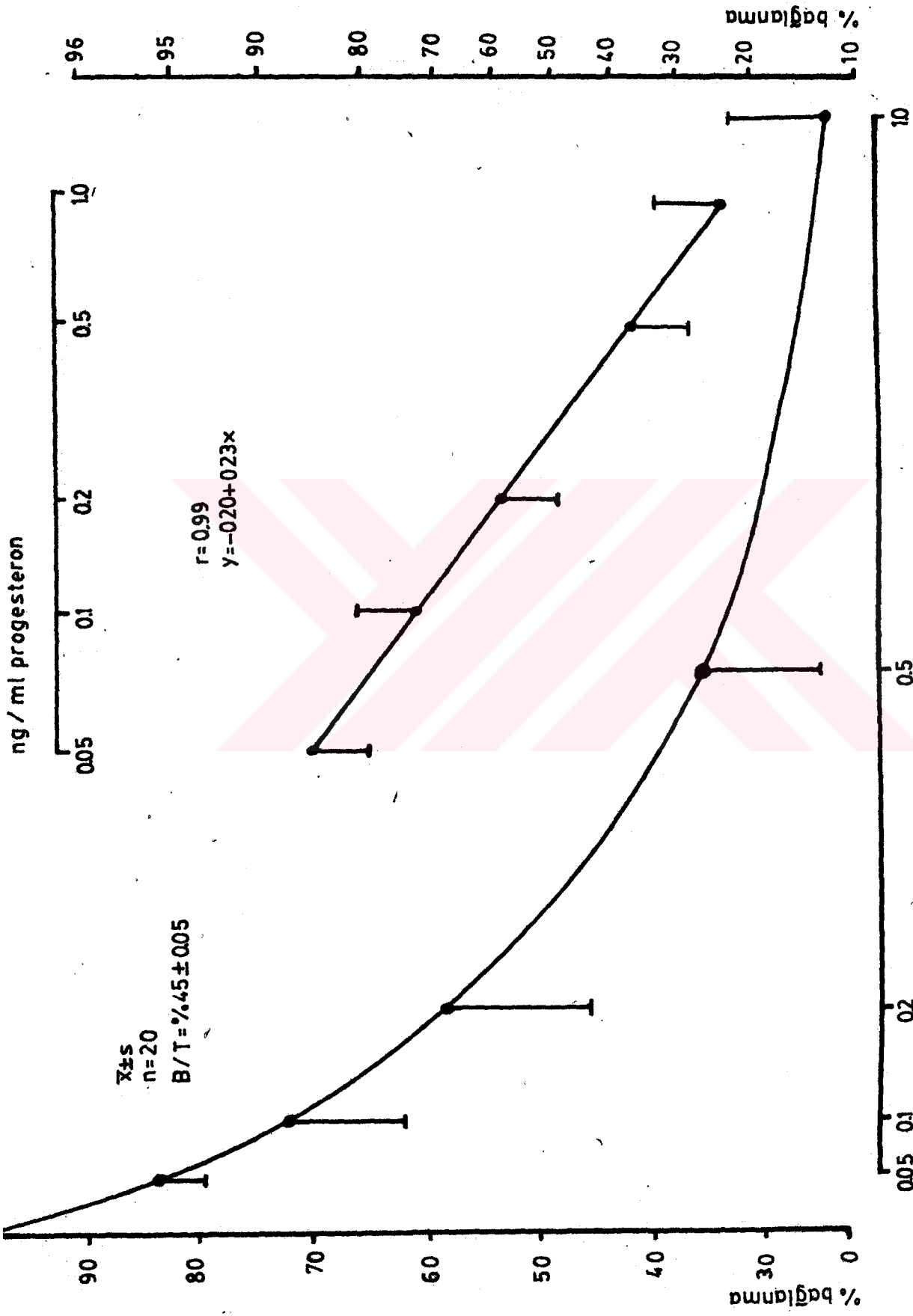
4.2. RIA Kalite Kontrolü ve Tavşanlarda Elde Edilen Anti-Progesteron Antiserumunun Geçerliliğinin Kontrolü :

RIA kalite kontrolü için gerekli çalışmalar çeşitli şekillerde denendi; ayrıca, kendi laboratuvarımızda ürettiğimiz anti-progesteron antiserumunun özgülüğü ve çalışma dilüsyonları da denendi.

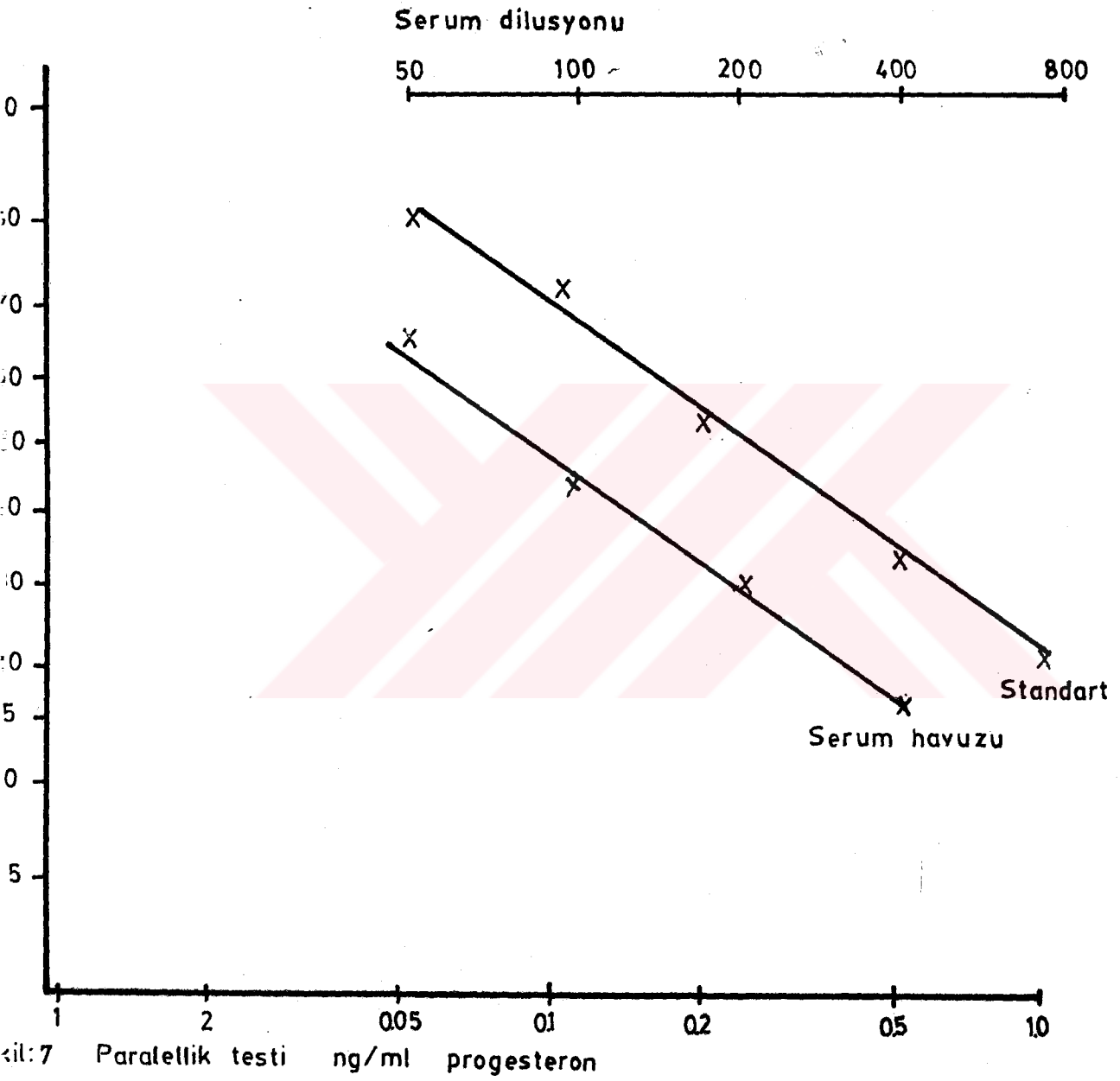
Deney duyarlılığı : Deney duyarlılığını denemek için yapılan çalışmalarda duyarlılık 10-30 pg/ml (% 90-95 bağlanma) olarak bulundu.

Her deney serisi için elde edilen standart eğrilerin eğimi uygun çıkmıştır (Şekil 6). 0.05 ng progesteron için % 85 ± 0.05 , 0.1 ng progesteron için % 73 ± 0.1 , 0.2 ng progesteron için % 58 ± 0.15 , 0.5 ng progesteron için % 36 ± 0.1 ve 1.0 ng progesteron için ise % 24 ± 0.07 bağlanmalar elde edilmiştir. Antijen (³H-progesteron) ve antikorun (anti-progesteron antikor) en fazla bağlanması (maksimum binding) % 45 ± 0.05 olarak bulunmuştur. Her bir standart eğri için logit-log çevirme, HP-41C programlanabilir küçük bilgisayar kullanılarak yapılmıştır. Lineer ve logaritmik standart eğrilerin aynı sonuçları hesaplamadaki farklılıkları istatistiksel olarak önemsiz, korelasyon ise önemli bulunmuştur ($p > 0.01$, $r = 0.89$).

Parellilik testi : Yirmibeş keçinin serumlarının karıştırılmasıyla elde edilen keçi serum havuzunun 50 µl si için % 72, 100 µl si için % 55, 200 µl si için % 33 ve 400 µl si için % 22 bağlanma elde edilmiştir. Elde edilen bu lineer eğri, standart eğriye paralel bulunmuştur (Şekil 7).



Şekil:6 RIA standart eğrileri

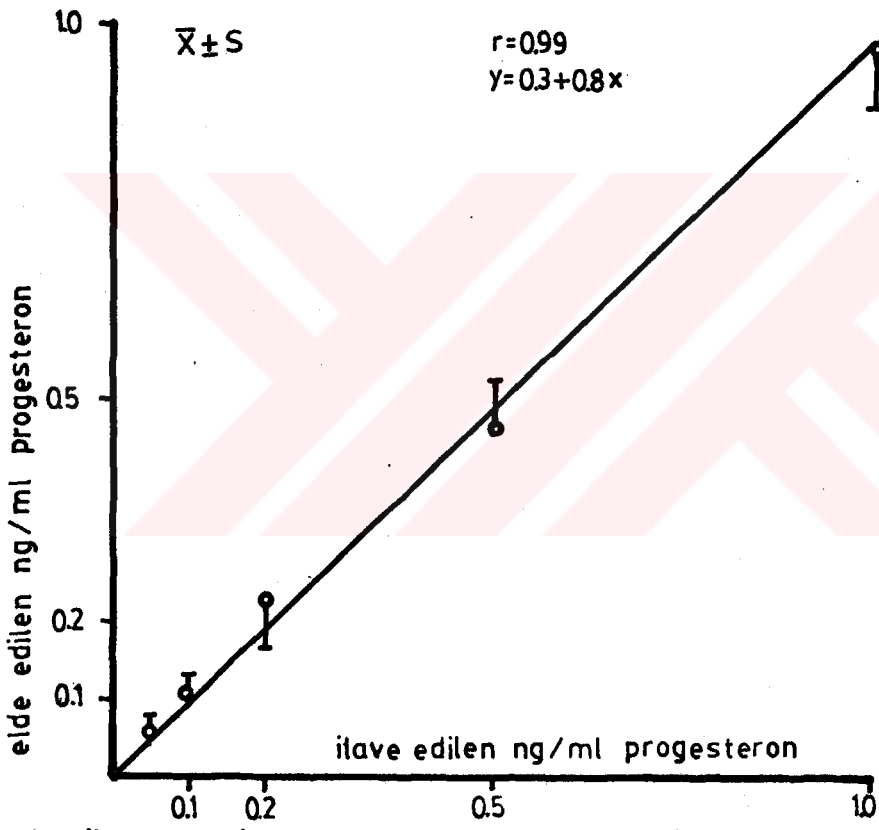


Doğruluk : 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 ve 1.0 ng/ml progesteron standartlarının (yatay eksen) boğa serumuna eklenmesi sonucu elde edilen progesteron düzeyleri (boğa serum progesteronu her bir elde edilen miktardan çıkartılarak) dikey eksene işaretlenerek elde edilen eğrinin regresyon katsayısı 0.99 ve doğrunun denklemi ise $y = 0.8 + 0.3x$ olarak elde edildi (Şekil 8).

Solvent körü : Standartlara petrol eter eklenerek yapılan çalışmalarda, petrol eterin interferens etkisi ihmal edilebilir bulundu. Petrol eterli ve petrol etersiz standartların sonuçları arasındaki farkın istatistiksel yönden önemsiz olduğu saptandı ($p > 0.01$). Ayrıca her deney serisinde, petrol eter körü (blank) olarak çalışılan örneklerle "0" bağlanmalar arasındaki farklar da istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0.01$). Bununla beraber her deney serisinde petrol eter körü devamlı bir şekilde kullanıldı.

Presisyon : Deneylerarası fark ve deneyiçi fark Tablo-3 ve 4 de gösterilmiştir. Deneyiçi farklılık deneylerarası farklılıktan daha küçük olarak elde edilmiştir.

Ekstraksiyon verimi : Yirmi ayrı testte yapılan ekstraksiyon verimi $\% 85 \pm 0.05$ olarak bulunmuştur. Varyasyon katsayısı ise $\% 5$ olarak elde edilmiştir. Standart eğriden, ekstrakte edilen 0.2 ml serum örneklerine karşı okunan progesteron düzeyleri mililitreye çevrilmek için 6 ile çarpıldı (Ekstraksiyon verimi gözönünde tutularak). Böylelikle sadece ekstrakte edilen progesteron saptandı.



Şekil:8 Kantitatif verim (recovery)

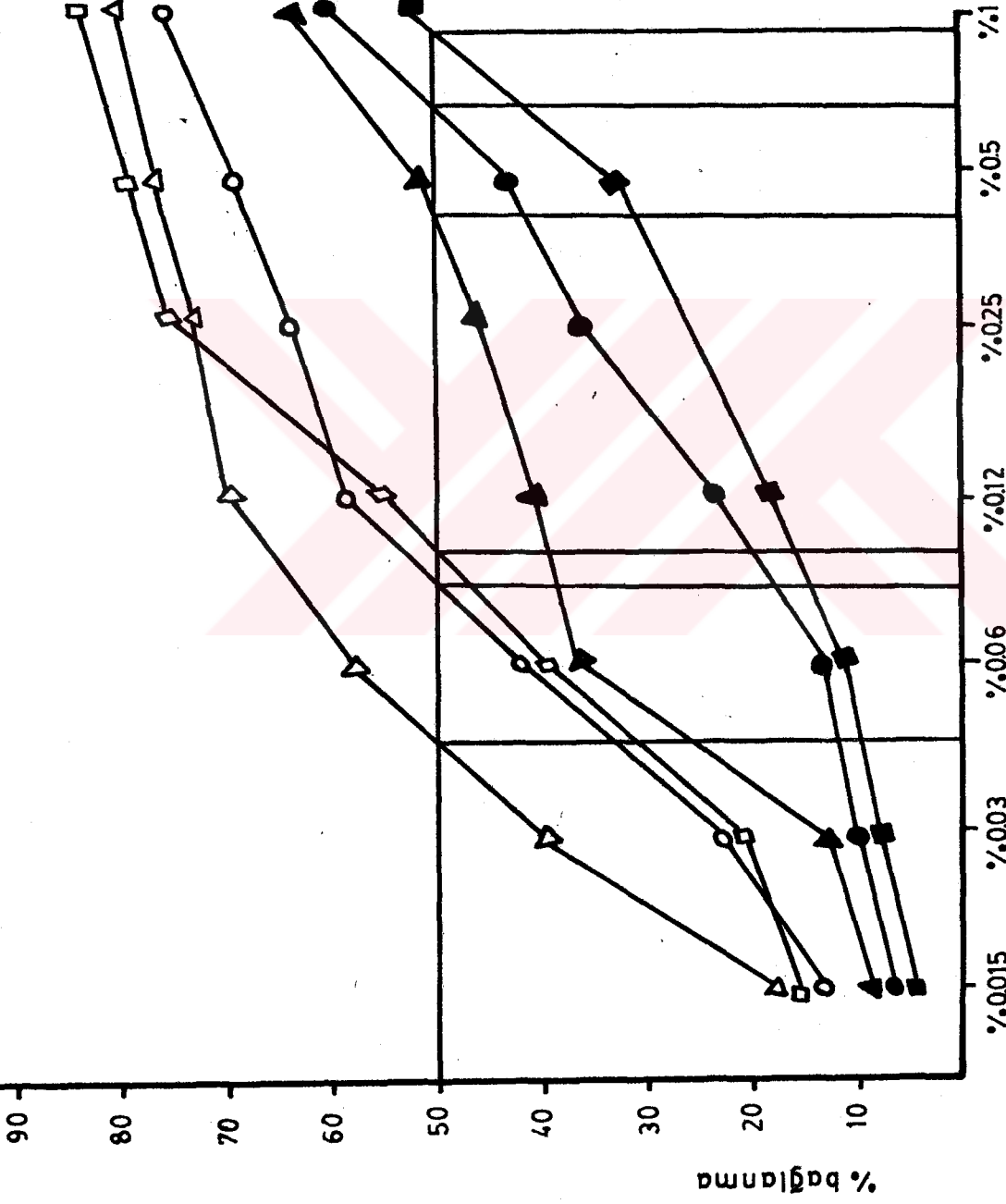
Tablo 3 : Deneylemelerarası fark (inter assay precision).

Boğa serumu (Düşük düzey)	Keçi serum havuzu (orta düzey)	Gebe inek serumu (yüksek düzey)
$n = 18$	$n = 19$	$n = 23$
$\bar{x} = 0.054 \text{ ng/ml}$	$\bar{x} = 1.52 \text{ ng/ml}$	$\bar{x} = 4.57 \text{ ng/ml}$
$S = 0.010$	$S = 0.21$	$S = 0.40$
$v = \% 18$	$v = \% 13$	$v = \% 8$

Tablo 4 : Deneyiçi fark (intraassay precision).

Keçi serum havuzu (düşük düzey)	Keçi serum havuzu (orta düzey)	Keçi serum havuzu (yüksek düzey)
$n = 10$	$n = 10$	$n = 10$
$\bar{x} = 0.05 \text{ ng/ml}$	$\bar{x} = 1.7 \text{ ng/ml}$	$\bar{x} = 4.0 \text{ ng/ml}$
$S = 0.001$	$S = 0.1$	$S = 0.2$
$v = \% 2$	$v = \% 5.8$	$v = \% 5$

Deney özgülülüğü : Deneyin özgülülüğü antiserumun özgülülüğü demek olduğundan, kendi laboratuvarımızda tavşanlarda, 11 α -hemisüksinat hidroksi progesterona karşı ürettiğimiz antiserumun titresi (Şekil 9) ve diğer steroidlerle olan çapraz reaksiyonları denendi (Şekil 10,11). Her aylık enjeksiyondan bir hafta sonra 2 tavşandan elde edilen anti-progesteron antiserum titrasyon eğrileri Şekil 9 da gösterilmektedir. Tavşan 1 den elde edilen anti-progesteron antiserumu daha iyi bir afinite göstermiştir (Şekil 12). 1:3200 ve 1:6400 dilüsyonlarda elde edilen standart eğriler afinitenin yüksek olduğuna işaret etmektedir. Tavşan 2 de ise 1:400 ve 1:800 lük dilüsyonlar en iyi eğimi vermiştir (Şekil 13). Tavşan 1 in 1:6400 lük, tavşan 2 nin ise 1:800 lük dilüsyonları kullanılarak çeşitli steroid türevleriyle elde edilen standart eğriler Şekil 13 ve 14 de; Tablo 5 de ise anti-progesteron antiserumunun bu steroidlerle olan çapraz reaksiyonların % si olarak gösterilmiştir.

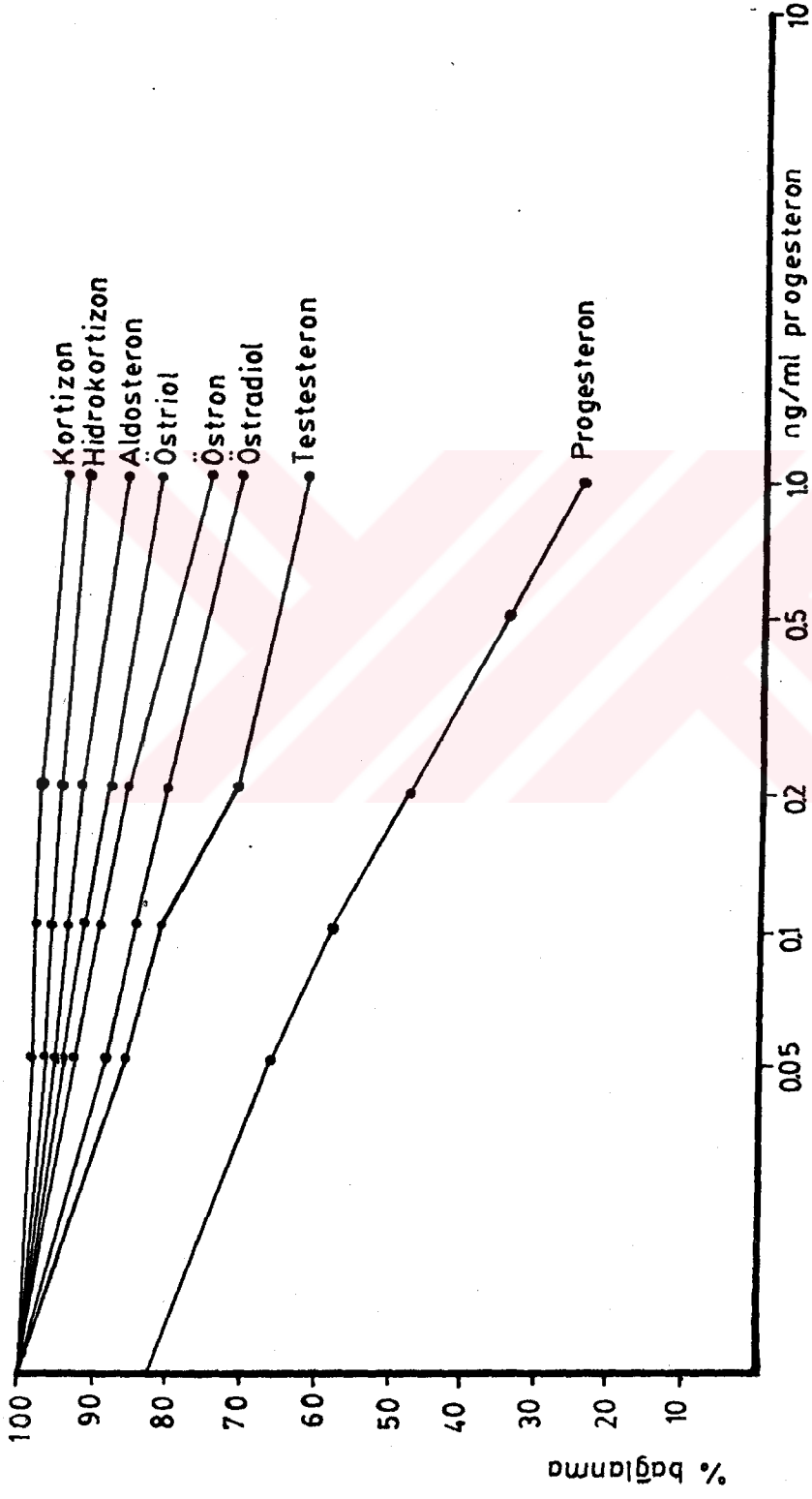


Şekil:9 Antikor titrasyon eğrisi (semi-log) Antiserum dilüsyonu

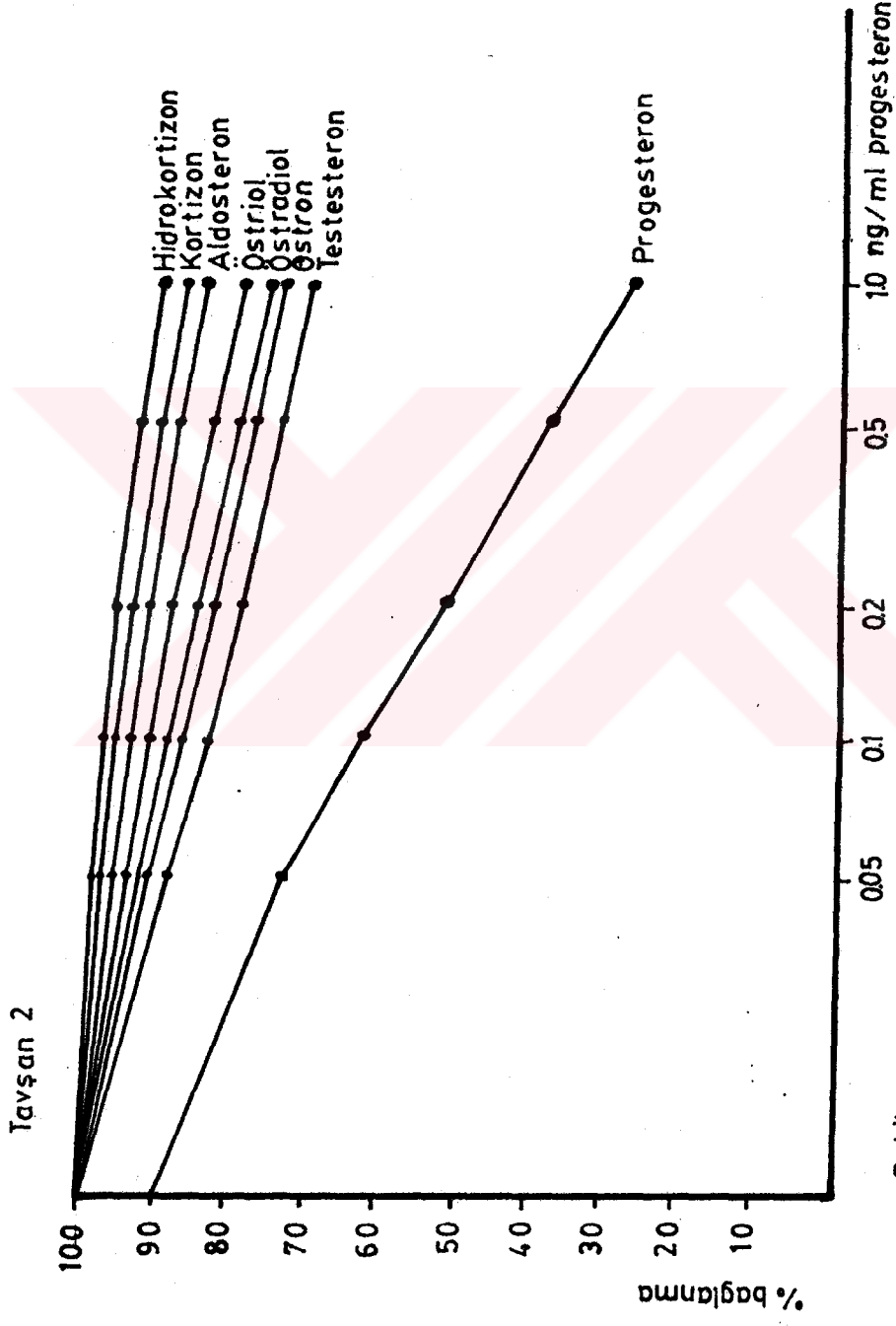
Tavşan 1:(□) 2.ay, (○) 3.ay, (△) 4.ay.

Tavşan 2:(■) 2.ay, (●) 3.ay, (▲) 4.ay.

Tavşan : 1



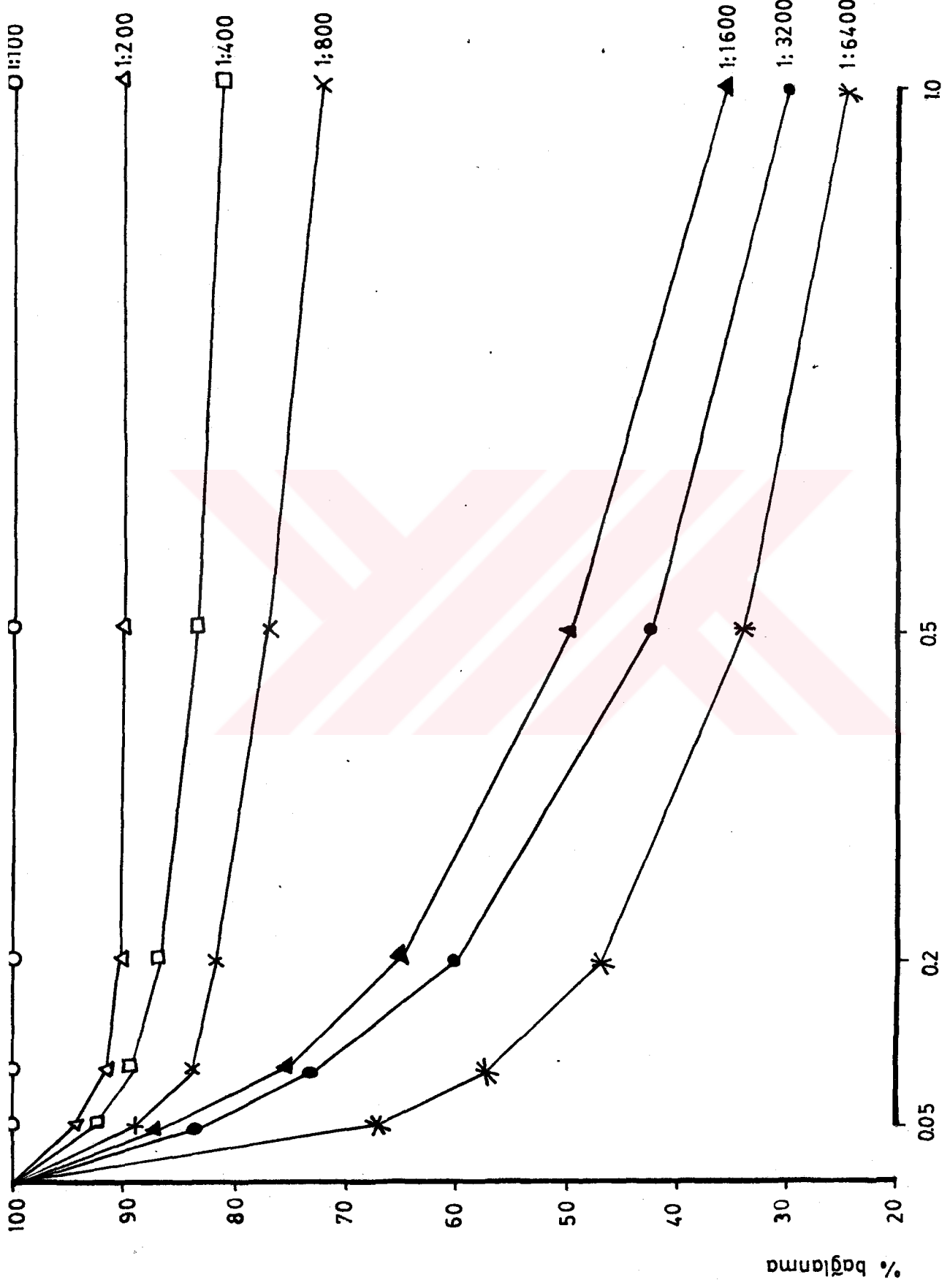
Sekil:10 Antikor çapraz reaksiyonları (1:6400)



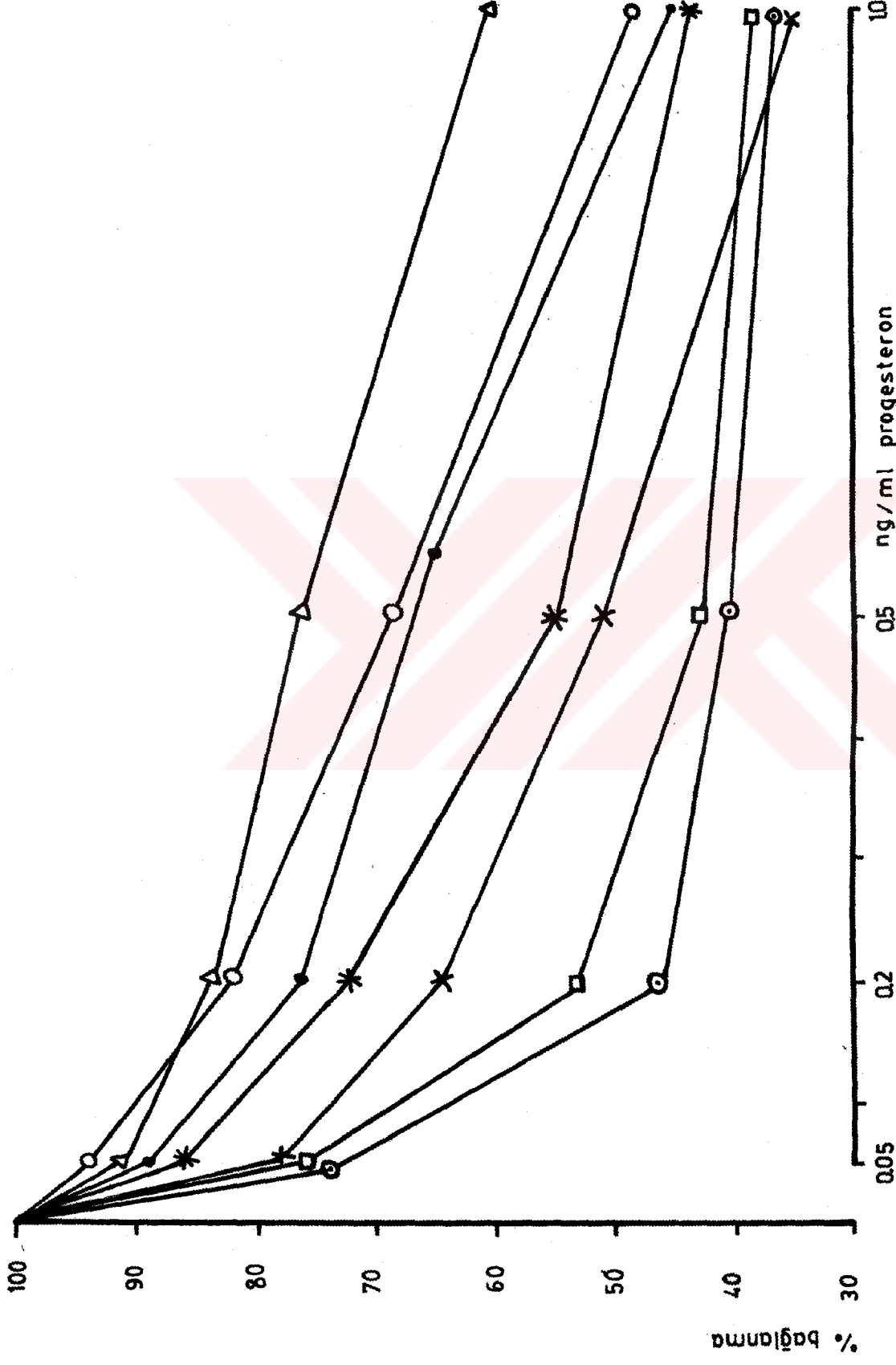
Şekil:11 Antikor capraz reaksiyonları (1:800)

Tablo 5 : Antiprogesteron antikorunun diğ er bazı steroidlerle ç apraz reaksiyonları.

Steroidler	% ç apraz reaksiyon	
	Tavş an 1 (1:6400)	Tavş an 2 (1:800)
Progesteron	% 100	% 100
Estron	% 0.2	% 0.5
Estradiol	% 0.6	% 0.9
Estriol	% 0.09	% 0.26
Testosteron	% 0.9	% 0.7
Kortizon	< % 0.001	% 0.01
Hidrokortizon	< % 0.001	% 0.05
Aldosteron	% 0.001	% 0.02



Şekil:12 Tavsan 1 çeşitli antikor dilüsyonlarındaki standart eğriler



Şekil:13 Çesitli antikor dilüsyonlarındaki standart eğriler : Tavşan 2

1:100 (Δ-Δ), 1:200 (●-●), 1:400 (✱-✱), 1:800 (○-○), 1:1600 (□-□), 1:3200 (○-○), 1:6400 (✱-✱)

V - T A R T I Ő M A

Anöstrusun son döneminde elde edilen düşük progesteron düzeyleri (< 0.5 ng), fonksiyonel bir corpus luteum (C.L.) olmadığını göstermektedir (Şekil 3,4). Thornburn ve Schneider (1972) ve Irving ve Jones'un (1972) da belirttiği gibi, bu durum aynı zamanda ovaryumla ilgili (ovarian cyclicity) bir siklusun olmadığına da işaret etmektedir. Diğer taraftan bu sonuçlar, keçilerde progesteronun tek kaynağının ovaryum (C.L.) olduğunu bildiren Linzell ve Heap'in (1968), Heap ve Linzell'in (1975) çalışmalarına uygunluk göstermektedir ve Ankara keçilerinde adrenal progesteron salgılanmasının az olduğunu da kanıtlamaktadır.

Devamlı kan almanın anöstrusun sonunda progesteron düzeylerini etkilemediği, Thibier (1981)'nin de belirttiği gibi devamlı düşük progesteron düzeyleriyle gösterildi. Fakat devamlı kan alınan keçilerin bütün sürüye oranla daha çabuk kızgınlık göstermeleri de dikkati çekti. Bu durum üzerinde daha fazla çalışma yapılmasını gerektirmektedir.

Deney sonuçları keçilerin kasım ayına kadar kızgınlık göstermediklerini ve sıfat mevsiminin değişik zamanlarında kızgınlık gösterdiklerini ortaya koymuştur. Bu da Ankara keçilerinde kızgınlığın, mevsime ve dolayısıyla gün ışığına ve soğuğa bağlı olduğunu (Badawy ve ark. (1972), Pretorius (1973), Örkiz (1980), Ilgaz (1982) bir kez daha göstermektedir.

Denemedeki keçilerden sadece ikisinde kızgınlık davranışları gözlenmediği halde, anöstrusun geç dönemlerinde, progesteron düzeyinde çok

kısa süreli (2-3 gün) bir yükselme (> 1.5 ng) saptandı. Bu durum bize östrusdan 6-8 gün önce gizli bir ovulasyon olduğu kanısını verdi. Progesteron düzeyinde gözlenen bu kısa yükselme, sıfat mevsiminin başlangıcında oluşan kısa sikluslar olduğunu doğrulamaktadır. Bu durum keçilerde, Shelton (1960), Corteel (1975), Thornburn (1972), Ricordeau ve Bouillon (1975) ve Thibier ve ark. (1981) tarafından da saptanmıştır. Böyle kısa sikluslar post partum dönemde sığırlarda da bildirilmiştir (Donaldson ve ark. 1970, Corah ve ark. 1974). Normal siklus aktivitesinden önce saptanan bu yüksek progesteron düzeyi Corah ve ark. (1974) ve Webb ve ark. (1979)'in sığırlarda da belirttikleri gibi, normal siklus aktivitesinin başlangıcı hakkında önceden bir fikir verebilmektedir.

Şekil 2 de gösterildiği gibi anöstrusun son döneminde progesteron düzeyleri >1 ng olan keçilerde ($n = 2$), ilk gözlenen kızgınlığı takiben daha hızlı bir progesteron yükselmesi olmasına karşılık (4. günde 1.75 ± 1.07 ng), bu dönemde progesteron düzeyi <1 ng olanlarda ($n = 20$) daha yavaş bir yükselme (4. günde 1.1 ± 0.65 ng) saptanmıştır. Fakat aradaki bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P > 0.01$). Bu 2 keçide kızgınlığı takiben progesteron düzeyindeki bu ani yükselme, daha önce, kısa ömürlü olsa da, fonksiyonel bir C.L. 'nin ve gizli ovulasyonun oluşmasına bağlıyabiliriz (Glatzel, 1983).

Keçiler, diğer ruminantlardan, örneğin koyunlardakinin (Shelton ve Marrow, 1965) tersine, anöstrusu izleyen ilk normal östrus siklusu başında, sakin kızgınlıktan ziyade aktif kızgınlık gösterirler (Shelton, 1960 ve 1980). Bu durum, bizim çalışmalarımızda da doğrulanmıştır. İkiyüz hayvanlık Ankara keçisi sürüsünde sadece 5 keçi daha önce kızgınlık göstermedikleri gerekçesiyle ayrılmışlardır. Bizim denemeye aldığımız bu

5 keçiden 3 ünde, kızgınlık aktivitesi gözlenemediği halde, normal kızgınlık siklusu progesteron modeli saptanmıştır. Bu durum, bütün sürüye oranla çok azdır.

Edgerton ve Hafs (1979)'ın sığırlardaki sonuçlarının tersine iki östrus siklusu progesteron düzeyleri arasındaki fark (Şekil 4) istatistiksel olarak önemli bulunmamış ($p > 0.01$) ve Thibier ve arkadaşlarının (1981), Fransız Alp (French Alpine) keçilerinde buldukları sonuçlar ile uygunluk göstermiştir.

Ankara keçilerinde saptadığımız kızgınlık süresi (20.0 ± 1.5 gün), bu türde diğer araştırmacılar tarafından bildirilen sürelerle benzerdir (Badawy ve ark., 1972; Pretorius, 1973; Moore ve Eppleston, 1979; Wentzel, 1979 b; Ilgaz, 1982).

Tohumlamadan hemen sonra alınan kan örneklerinde serum progesteron düzeyi (0.45 ± 0.2 ng) keçilerin uygun zamanda tohumlandığını göstermektedir. Sadece bir keçi (No. 13-8) 3. kez kızgınlık gösterdi ve 3. kızgınlığında bir daha tohumlandı. Bu keçinin 2. tohumlanma sırasındaki progesteron düzeyi 0.95 ng/ml olarak bulundu. Bu keçide kızgınlığın görülmesinden yaklaşık 2 gün sonra ovulasyonun olduğu kanısına vardık. Çünkü kızgınlık saptanmasından sonraki 2. günde progesteron düzeyi 0.48 ng olarak bulundu. 3. kızgınlığında tohumlanan bu keçide tohumlamadan sonraki progesteron düzeyi (0.45 ng), tohumlamanın uygun zamanda yapıldığını gösterdi.

Keçilerde, koyunlara kıyasla luteal progesteron düzeylerinin daha yüksek oluşu, muhtemelen, genellikle bu türde gözlenen ovulasyon sıklığındandır (Wentzel, 1979 b).

Östrus siklusunun çeşitli evrelerinde progesteron modelleri Wentzel (1979 b) ve Ott'un (1982 b) çalışmalarındakine benzer bulunmuştur. Yaşlı (> 9 yaş) ve genç (4-5 yaş) keçilerin proöstrus, östrus, postöstrus ve metöstrusdaki progesteron düzeyleri arasındaki korelasyon önemli bulunmuştur. Bu da 9 yaşından büyük keçilerin dölerme fonksiyonlarında bir düşüklük olmadığı halde, sadece tiftik kalitesi gözönünde tutularak sürüden çıkarıldıklarını göstermektedir (Örkiz, 1980).

Birden fazla yavrulama elde edilmek istendiğinde, fertil döllenmenin sıfat mevsiminin en aktif dönemine kadar geciktirilmesi faydalıdır (Westhuysen, 1975 ve 1976). Nitekim bizim çalıştığımız keçilerde (ilk kızgınlıklarında tohumlanmayan) ikizlik oranı, bütün sürüye oranla, daha fazla bulunmuştur. Bununla beraber bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerekir. Shelton ve Morrow (1965), sıfat zamanında, 2. kızgınlıklarında tohumlanan keçilerde % 20 daha fazla ikizlik elde edildiğini bildirmişlerdir.

Tohumlamanın 21. gününde, gebe keçilerin serum progesteron düzeyleri, gebe olmayanlarınkinin aşağı yukarı 6 katı fazla bulundu (Şekil 5). Bu da diğer ruminantlarda olduğu gibi (Heap ve ark., 1976; Pennington, 1976; Karg, 1976; Claus ve ark. 1983) Ankara keçilerinde de (Thornburn ve Schneider, 1972) erken gebelik tayinine olanak tanımaktadır. Biz çalışmalarımızda tohumlamadan sonraki 21. günde progesteron tayinleri ile % 100 doğru gebelik tanısı elde ettik.

RIA'nın, hormon tayininde veteriner hekimlik ve hayvancılık alanına sokulmasıyla (Donaldson ve ark., 1970; Edqvist ve ark., 1970; Shemesh ve ark., 1971; Robertson ve Sarda, 1971; Sprague ve ark., 1971; Garverick ve ark., 1971; Edqvist, 1972; Hoffman, 1972; Karg, 1976) ekonomik yönden büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Deneylelerimizde progesteron tayinlerinde RIA tekniğinin çeşitli şekillerde kalite kontrolu denendi ve deneyler sonucu deney duyarlılığı, özgüllüğü, doğruluğu ve presisyonu Karg ve ark. (1976), Sokolowski (1978), Edqvist (1979), Hartman (1982), Marsehner (1982), Albertini (1982), Hazra (1982), Romero (1982), Sufi (1982) çalışmalarıyla uygunluk göstermiştir (Şekil 6,7,8 - Tablo 3,4).

Deneyde kullanılan çeşitli antikokların, diğer steroidlerle farklı oranlarda çapraz reaksiyon vermelerinin nedeni bilinmemektedir (Edqvist, 1979). Robertson ve Rattenberger'den temin edilen antikoklar yeterli sonuçlar vermiştir. Bizim laboratuvarımızda elde ettiğimiz anti-serumun çapraz reaksiyonları düşük çıkmış (Şekil 10,11 - Tablo 4) ve eğimi yeterli olan standartlar elde edilebilmiştir (Şekil 12 ve 13).

Petrol-eter ekstraksiyonunun uygulanması ile kortikosteroidlerin çoğu plazmada, sulu fazda kalır. Bundan başka 1/3 ünden daha az 17 α -hidroksiprogesteron ekstrakte edilip petrol-etere geçer. 11 α -hidroksi progesteronun çapraz reaksiyonu önemli değildir. Çünkü memelilerin kanında bu steroidin önemli konsantrasyonlarda oluştuğu bilinmemektedir (Edqvist, 1979).

Deneyde kullanılan antiserumun özgüllüğü, petrol-eter ekstraksiyonu ile birlikte daha ileriki saflaştırma işlemlerine gerek kalmadan, deneyin yüksek derecedeki özgüllüğüne yardım etti.

Antiserumun dilüsyonu artırılırsa, deneyin duyarlılığı da artar. (Şekil 12,13). Antiserum dilüsyonu için sınırlayıcı faktör, işaretli progesteronun spesifik aktivitesidir. Bu çalışmada elde edilen duyarlılık yeterli bulunmuştur.

Ekstraksiyon verimi (recovery) için önemli bir nokta, radyoaktif progesteronun serum örneği ile birlikte inkübe edilmesidir (Edqvist ve Castellanos, 1979). Eğer bu ön dengeleme basamağı ihmal edilirse, genellikle daha yüksek ekstraksiyon verimi elde edilir (Abraham, 1974). Deneylerimizdeki ekstraksiyon verimleri literatürlerde bildirilenlerle uyumlu çıkmıştır.

Bu çalışmada elde edilen presisyon diğer RIA teknikleri için verilen presisyonlarla uygunluk gösterdi (Abraham ve ark., 1971; Thorncroft, 1972; Edqvist ve Johansson, 1972).

S O N U Ç

Tiftik Ankara keçisinin en önemli ürünüdür. Yetiştirmede en çok dikkat edilecek unsur budur. Üretim ve kalite, sonuç olarak tiftiğin ekonomik değeri yaşa bağlı olmaktadır. Ankara keçisi sürülerinin yaş ortalamasını mümkün olduğu kadar düşük (genç) tutmak çok önemlidir. Genç dişilerden oluşan bir sürünün varlığı, ancak yüksek bir üreme potansiyelinin sürüde devam ettirilebilmesi ile mümkündür. Bu da keçilerin fertilitate ve gebelik kontrolunun güvenilir bir yöntemle erken ve etkin bir şekilde yapılabilmesine bağlıdır. Progesteron hormonu bu konularda yetiştirici ve veteriner hekimlere yardımcı olabilecek en iyi parametrelerden birisidir.

Hormon analizleri için RIA tekniklerinin kullanılması ve RIA'nın geliştirilmesi ve geçerliliğinin kontrol edilmesi, deney sistemlerinin yüksek örnek kapasiteli ve düşük fiatlı olabilmesini, ve de az hacımdaki örneklerin seri halindeki tayinlerini mümkün kılmıştır.

Deney sonuçlarımız, ilk defa memleketimizde, hayvan yetiştiriciliğinde, dölerme hormonu progesteronun östrus siklusundaki düzeylerini göstermiştir. Ayrıca erken gebelik kontrolunda, tohumlanmadan 21-25 gün sonra tek bir kan örneğinin yeterli olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca tavşanlarda elde ettiğimiz antikorum, progesteron tayini yapan bütün tıp laboratuvarlarına dağıtılabilmesiyle, hiç olmazsa şimdilik, progesteron RIA kitlerine ödenen döviz memleketimizde kalacaktır. Bundan sonraki çalışmalarda, progesteron hormonu özellikle Ankara keçilerinin ve diğer ruminantların fertilitate kontrolu ve erken gebelik tanısında etkin ve duyarlı bir şekilde kullanılabilir.

Ö Z E T

Tiftik endüstrisinde yüksek üreme hızının büyük önemi vardır. Genç hayvanların Ankara keçisi sürülerindeki oranının yüksek oluşu tiftik kalitesi bakımından önemlidir. Bu da fertilitenin yüksek olmasına ve dolayısıyla her yıl elde edilen yavru veriminin yüksek olmasına bağlıdır.

Şimdiye kadar memleketimizde dölerme konusunda davranışsal kızgınlık işaretleri dışında, hormonal parametreleri de içine alan herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada, kızgınlık, kızgınlık siklusu ve gebelikte, Ankara keçilerinde, bu alanda bir çalışma yapılması amaçlanmıştır.

Kanda RIA ile progesteron tayini, keçilerde ovaryum aktivitesini gösteren iyi bir parametredir.

Östrus sırasında ortalama 0.45 ng/ml progesteron elde edildi. Bunu izleyen luteal evrede progesteron düzeyi yavaş yavaş 3.45 ng/ml'e çıktı. -3. güne kadar yüksek düzeyde kalmaya devam etti. Bundan sonra hızla 0.4 ng/ml'e düştü.

Gebelik tayini, doğumla doğrulandı. 1.5 ng/ml progesteron ve daha yukarısı (21. günde) gebelik tayininde elde edildi.

RIA ile progesteron tayinlerinin keçi serumunda geçerliliğinin kontrolünde deney özgüllüğü, duyarlılığı, doğruluğu ve presisyonu gibi çeşitli sistemler denendi ve deney sistemi geçerli kılındı.

S U M M A R Y

A high reproductive rate is of great importance in the mohair (Angora) industry. From the economical standpoint of mohair production and quality it is important and advantageous to have a high proportion of young animals in the flock. This possibility depends largely on a high degree of fertility and large numbers of young animals to replace the older ones, annually.

So far no studies concerning reproductive efficiency of the Angora goat, out of observing the sexual behaviours in the presence of teaser bucks in the breeding season, have been done in Turkey. This study was undertaken to provide information on this area, that is diagnosis of cyclicity, confirmation of oestrus so that mating timing, and confirmation of return or non-return (pregnancy diagnosis) by using progesterone assay in peripheral blood, as well as observing the sexual behaviours of the goats.

Progesterone in blood plasma by radioimmunoassay (RIA) is a reliable and convenient means of monitoring ovarian activity and reproductive cycle in doe.

The mean progesterone value of 0.45 ng/ml was obtained during oestrus. During the subsequent luteal phase the progesterone concentration increased progressively to 3.45 ng/ml, and remained at a high level until day -3 of the typical oestrus cycle. Thereafter the progesterone value fell down rapidly to 0.4 ng on day oestrus.

Pregnancy diagnosis based on the levels of progesterone in serum confirmed by kidding 1.5 ng/ml or more progesterone was used as an indication of pregnancy (within 21 day). The accuracy of pregnancy by progesterone assay was 100 %.

In order to validate progesterone assay for reliability by RIA in goat serum, sensitivity, specificity, accuracy and precision of the assay were studied. And the assay system was controlled.

K A Y N A K L A R

- Abraham G.E., Swerdloff R., Tulchinsky, D. and Odell W.D. (1971). RIA of plasma progesterone. *Journal of Clinical Endocrinology*, 32: 619-624.
- Abraham G.E. (1973). Radioimmunoassay of Steroids in biological materials. IAEA Symposium, Istanbul, Turkey, 10-14 September.
- Abraham G.E. (1974). RIA of steroids in Biological Materials. *Acta Endocrin. No. 183*.
- Ainsworth L. and Shrestha J.N.B. (1983). Effect of type of intravaginal progestagen treatment on estrous response and reproductive performance of ewes. *Theriogenology*, 19(6): 869-875.
- Albertini A., Bolelli, G. (1982). Italian external quality control for protein and steroid hormones. (IAEA, Sm-259). RIA and Related Procedures in Medicine, Symposium, Vienna.
- Armstrong D.T., Evans, G. (1983). Factors Influencing Success of Embryo Transfer in Sheep and Goats. *Theriogenology*, 19(1): 31-42.
- Asdell (1964). *Patterns of Mammalian Reproduction*. 2nd ed. Cornell Univ. Press., Ithaca, New York.
- Atabek (1936). Tiftik keçisi sürüsü üzerinde yapılan suni tohumlama. *Türk Baytarlar Birliği Dergisi*, Şubat-Mart sayısı. Köğ Öğretmeni Basımevi.
- Badawy, A.M., Bashary, A.S., Mohsen M.K. (1972). Post-puberty estrous cycle and gestation period of female Angora goats. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, 20: 27-30.
- Basset J.M., Oxborrow, T.J., Smith I.D., Thornburn G.D. (1969). The concentration of progesterone in the peripheral plasma of the pregnant ewe. *Journal of Endocrinology*, 45: 449-457.
- Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, Tarımsal Yapı ve Üretim, DİE Matbaası, Ankara. (1977, 1979, 1981).
- Batu, S. (1940). Ankara keçisinin tarihi ve menşei hakkında bir tetkik. *Y.Z.E. Dergisi*, 35: 24.
- Benjaminsen E., Karlberg K. (1980). Pregnancy diagnosis in goats by means of an ultrasonic device. *The Brit. Vet. Jour.* 92(9): 501-503.
- Bilge M. (1979). *Fizyolojide Hormonlar Bilgisi ders kitabı*. Güven Kitabevi yayınları, Ankara.

- Bon Durand R.H. (1980). Pregnancy diagnosis in sheep and goats : Field tests with an ultrasound unit. *California Veterinarian*, 1: 26-28.
- Bosu W.T.K., Serna J., Barker C.A.V. (1978). Peripheral plasma levels of progesterone acetate and prostaglandin F_{2α} during the estrous cycle. *Theriogenology*, 9: 371-390.
- Bristol F., Jacobs, K.A., Pawlyshyn V. (1983). Synchronization of estrous in post-partum mares with progesterone and estradiol 17β. *Theriogenology*, 19(6): 779-785.
- Carrera C. and Juarez L. (1969). Duration of estrous cycle in Granada goats. *Anim. Breed. Abstr.* 1970 (38): 1, 3870.
- Carrera C. and Butterworth M.H. (1969). Preliminary study of oestrus cycle in goats. *Anim. Breed. Abstr.* 1968 (38): 4, 3870.
- Carmenate C. (1977). A study of some reproductive parameters in Saanen and Toggenburg goats. *Revista Cubana Reproduction Animal*, 3: 13-19.
- Cawood P.L. (1979). Plan your Angora Management. *Angora Goat and Mohair Journal*, 21(2): 21.
- Cawood P.L. (1980). The importance of production of high quality Angora rams. *Angora Goat and Mohair Journal*, 25(1): 20.
- Challis J.R., Heap R.B., Illingworth D.V. (1971). Concentrations of estrogen and progesterone in the plasma of non-pregnant, pregnant and lactating guinea-pigs. *Journal of Endocrinology*, 51: 333-345.
- Claus R. and Rattenberger E. (1979). Improved method for progesterone determination in milk fat. *Br. Vet. J.* 135: 464-469.
- Claus R., Karg H., Zwiauer D. (1983). Analysis of factors : Influencing reproductive performance of the dairy cow by progesterone assay in milk fat. *British Veterinary Journal*, 139(1): 29-40.
- Corah L.R., Qaraly A.P., Dunn T.G. and Kaltenbach C.C. (1974). Pre-partum and postpartum levels of progesterone and estradiol in beef heifers fed two levels of energy. *Journal of Animal Science*, 39: 380.
- Corteel J.M. (1975). The use of progestagens to control the estrous cycle of dairy goat. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 15: 353-363.
- Corteel J.M. (1977). Management of artificial insemination of dairy seasonal goats through estrous synchronization and early pregnancy diagnosis. *Reproduction in Sheep and Goats Symposium, University of Wisconsin, Madison.*
- Croker K.P., Butler L.G., Johns M.A. and McColm S.C. (1982). Induction of ovulation and cyclic activity in anestrus ewes with dextroprogesterone treated wethers and ewes. *Theriogenology*, 17(3): 349-354.

- Cunningham N.F., Saba N., Millar P.G. (1975). Release of progesterone from silicone rubber implants in vitro, and the effect of the implants on plasma progesterone levels in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 43: 555-558.
- Dhinsa D.S., Hoversland A.S., Metcalfe J. (1971). Reproductive performance in goats treated with progestagen impregnated sponges and gonadotropins. *Journal of Animal Science*, 32: 301-305.
- Donaldson L.E., Basset J.M., Thornburn, G.D. (1970). Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, estrous cycles, pregnancy and lactation and the effects of undernutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. *Journal of Endocrinology*, 48: 599-613.
- Dudley R.A. (1982). RIA data processing on programmable calculators. *IAEA Symposium, RIA and related procedures in Medicine, Vienna*.
- Eddy R.G. (1983). The use of the prostaglandin analogue cloprostenol and the milk progesterone test to control breeding policy in one dairy herd. *The British Veterinary Journal*, 139(2): 104-108.
- Edqvist L.E., Ekman L., Gustafsson B. and Aström G. (1970). Progesterone levels in the bovine peripheral plasma measured by the competitive protein binding technique. *Zbl. Vet. Med. A*. 17: 899-908.
- Edqvist L.E. and Johansson E.D.B. (1972). Radioimmunoassay and competitive protein binding for the measurement of certain steroid hormones in farm animals. *International Atomic Energy Agency, Vienna*. 245-258.
- Edqvist L.E. and Castellanos R. (1979). Evaluation of RIA technique for the measurement of progesterone. *National Center of Animal Health, Havana, Cuba and Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden*.
- Edgerton L.H., Hafs H.D. (1979). Serum LH, prolactin, glucocorticoid and progestin in dairy cows from calving to gestation. *Journal of Dairy Science*, 56: 451.
- Edwards P.R., Ekins R. (1982). Development of a microcomputer RIA data processing program, for distribution by WHO. *IAEA Symposium, RIA and Related Procedures in Medicine, Vienna, 21-25 June 1982*.
- Erk H., Doğanelli M.Z., Akkayan C. (1972). Veteriner Doğum Bilgisi ve Jinekoloji. A.Ü. Veteriner Fak. Yayınları : 275. A.Ü. Basımevi, Ankara - 1972.
- Ersoy E., Bayşu N., Ertürk K., Üstüdal M. (1979). *Biyokimya, A.Ü. Vet. Fak. Yayınları : 358, Ders kitabı : 256, A.Ü. Basımevi, Ankara, 1979*.
- Fraser A.F. (1975). Internationally increased lamb production. *Veterinary Medical Review, No. 1/2: 148-160*.

- Garverick H.A., Erb R.E., Niswender G.D., Callahan C.J. (1971). Reproductive steroids in the bovine III. Changes during the oestrus cycle. *J. Anim. Sci.* 32: 946-956.
- Glatzel P. (1983). Kişisel görüşme, Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü, Ankara.
- Glatzel P., Kılıçoğlu Ç., Alaçam E., İzgür H., Özsar S., Güven B. (1983). PGF_{2α} ve progesteron süngeri kullanılarak sinkronize edilmiş Saanen süt keçilerinde serum progesteron düzeyleri (baskıda).
- Grobler M.C. (1975). Angora goats in South Africa. *Veterinary Medical Review*, No. 1-2: 86-105.
- Hamon M., Fleet, R., Holdsworth R.S., Heap B. (1981). The time of detection of oestrone sulphate in milk and the diagnosis of pregnancy in cows. *The British Veterinary Journal*, 137: 71-77.
- Hartman D.J., Cotisson A., Guilloux L., Ville G. (1982). A rapid RIA method for circulating serum antigens and antibodies using PEG and Dab Separation method, *IAEA Symposium, Vienna, 21-25 June*.
- Hattersley J.P., Hilary M., Matthews J.G., Wrathall J., Saba N. (1980). Estimation of oestrone sulphate in the serum of pregnant sows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 58: 7-12.
- Hazra D.K., Shukla A.K., Ram Singh (1982). Comparison of manuel and automatic (IAEA) data processing in RIA with special reference to precision profile, *IAEA Symposium, 21-25 June, Vienna*.
- Heap R.B. and Linzell J.L. (1975). Arterial concentration, ovarian secretion and uptake of progesterone in goats during the reproductive cycle. *Journal of Endocrinol.*, 36: 389.
- Heap R.B., Holdsworth R.J., Gadsby J.E., Laing J.A. and Walters J.A. (1976). Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. *The British Veterinary Journal*, 132: 445-463.
- Heap R.B. (1981). Method for monitoring pregnancy in milk producing domestic animals. *Referativnyi Zhurnal*, No. 7943682 : 401.
- Heap R.B., Hamon M., Fleet I.R. (1983). Factors affecting oestrone sulphate concentrations in milk. *The British Veterinary Journal*, 139(1): 79-88.
- Hoffmann B., Günzler O., Hamburger R. and Schmidt W. (1976). Milk progesterone as a pramaeter for fertility control in cattle, methodological approach and present status of application in Germany. *The British Vet. Journal*, 132: 469-475.
- Holdworth R.S. and Davies J. (1979). Measurement of progesterone in goats milk : an early pregnancy test. *Veterinary Record*, 105: 535.

- Hunter W.M. (1982). Recent advances in radioimmunoassay and related procedures. *International Atomic Energy Symposium, Vienna, 21-25 June.*
- Ilgaz B. (1982). Ankara keçilerinde kızgınlık ve kızgınlık siklusu tayini. Uzmanlık tezi, A.Ü. Veteriner Fakültesi, Ankara.
- Inskoop E.K. (1973). Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals. *Journal of Animal Science, 36: 1149-1156.*
- Irving G., Jones E. (1972). Progesterone concentration in the peripheral plasma of pregnant goats. *Journal of Endocrinology, 53: 447.*
- İmeryüz F. (1969). Tiftiklerimizin sınıflandırılması. *Modern Hayvancılık ve Ekonomi. Oğun Kardeşler Matbaası, Ankara.*
- Jain G.C., Arora R.C., Pandey R.S. (1980). Milk progesterone content and pregnancy diagnosis in goats. *Zbl. Vet. Med., 27: 103-108.*
- Jarosz S.J., Deans R.J. and Dukelow W.R. (1971). The reproductive cycle of the African Pygmy and Taggenburg goat. *Journal of Reprod. and Fert., 24: 119-123.*
- Jarosz S.J., Deans R.J. and Dukelow W.R. (1972). The oestrous cycle of African Dwarf and Taggenburg goats. *Animal Breeding Abstracts, (43): 1, 135.*
- Kakusya G.R.E. (1980). Reproductive hormone patterns in female pygmy goats. *Dissertation Abstracts International, 8: 3504.*
- Karagiannidis A., Tsakalof P., Margaritis J. (1979). Synchronization of oestrous in goats with $PGF_{2\alpha}$ and MAP. *Animal Breeding Abstracts 30: 117.*
- Karg H. (1981). Physiological impact on fertility in cattle, with special emphasis on assessment of the reproductive function by progesterone assay. *Livestock Production Science, 8: 233-246.*
- Karg H., Claus R., Hoffmann B., Schallenberger E., Schams S.D. (1976). Present status and future possibilities of RIA in animal production. *International Atomic Energy Agency Symposium on "Nuclear Techniques in Animal Production and Health", Vienna.*
- Kinser A.R., Gibson M.F., Vincent D.L., Scheffrahn N.S., Kesler D.J. (1983). Ovarian responses of seasonally anoestrus ewes administered progesterone, PMS, HCG and (or) Gn RH. *Theriogenology, 19(3): 449-464.*
- Knight T.W. and Lynch P.R. (1980). The pheromone from rams that stimulates ovulation in the ewe. *Animal Production in Australia, Symposium, 74-76.*

- Koch E., Morton H., Ellendorf (1983). Early pregnancy factor : Biology and practical application. *The British Veterinary Journal*, 39: 52-58.
- Kohen F., Baminger S., Lindner H.R. (1975). Preparation of antigenic steroid-protein conjugates. *Steroid Immunoassay*. Alpha Omega Publ. Ltd. Cardiff. 11-32.
- Lader S., Hum B.A.L., Court G. (1973). A comparative assessment of immunisation procedures for RIA. *IAEA Symposium, Istanbul, 10-14 September*.
- Laing J.A. (1976). Progesterone assays of milk and the control of infertility. *The British Veterinary Journal*, 132: 534-537.
- Lamont J.L. (1964). Influence of vasectomised bucks on the reproductive performance of Angora does. *South Africa, Journal of Agricultural Science*, 7: 305-310.
- Linzell J.L. and Heap R.B. (1968). A comparison of progesterone metabolism in the pregnant sheep and goat - Sources of production and an estimation of uptake by some target organs. *Journal of Endocrinology*, 41: 433-438.
- Marincowitz G. (1967). Induction of estrous in Angora goat does in late anestrus by sex-controlling hormones. *S. Afr. J. Agric. Sci.*, 10: 926-936.
- Marincowitz G. and Van Tonder E.M. (1968). Effect of intravaginal MAP-Impregnated sponges and PMS on Merino ewes during the breeding season. *S. Afr. J. Agric. Sci.*, 11: 523-530.
- Marincowitz G. (1971 a). Reproduction in Angora does : relation between the periodicity and length of oestrus and reproductivity. *Agricultural Research*, 1: 58.
- Marincowitz G. (1971 b). Interrelationship of reproduction, production and behaviour in Angora goat females. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 1: 73-76.
- Mc Mahon G.R., Shearman R.P., Shult D.A., Smith I.D. (1979). Prostaglandin F_{2α} - induced prolactin release and luteolysis in the goat *Australian Journal of Biological Sciences*, 32: 109-114.
- Mallvano R., Rolleri E. and Rosa O. (1973). Standardization and control of steroid RIA. *IAEA Symposium, Istanbul 10-14 September*,
- Marsehmer I., Wood W.G., Scriba P.C. (1982). The Munich-model as external quality control educational programme. *IAEA Symposium, Vienna, 21-25 June. RIA and Related Procedures in Medicine*.
- Memon M.A., Ott R.S. (1980). Methods of pregnancy diagnosis in sheep and goats. *Cornell Veterinarian*, 70(3): 226-231.

- Meretey K. and Kocsar L.T. (1973). Some problems of specific antibody production and control in RIA techniques. IAEA Symposium, Istanbul, 10-14 September.
- Merve J.H.P. (1977). Low sexual urge and fertility in young Angora rams. *Angora Goat and Mohair Journal*, 18(1): 23-28.
- Montigny G. de, Millerioux P., Jeanguyot N., Humblot P., Thibier M. (1982). Milk fat progesterone concentrations in goats and early pregnancy diagnosis. *Theriogenology*, 17: 423-431.
- Moore N.W. (1976). The control of oestrus and ovulation in the goat. Australian Society for Reproductive Biology, 8th Annual Conference.
- Moore N.W., Eppleston J. (1973). The control of oestrus, ovulation and fertility in relation to artificial insemination in the Angora goat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30(5): 965-972.
- Nikolaevskaya (1979). Breeding Angora goats abroad. *Animal Breeding Abstract*. (47): 9, 4907.
- Niswender G. (1979). RIA kurs notları, Havana, Cuba.
- Noyan A. (1980). Fizyoloji ders kitabı, Anadolu Üniversitesi Yayınları, No: 2.
- Oflaz G. (1982, Ekim). Kısa yarı ömürlü radyonüklidlerin RIA da kullanılması. Doktora tezi, A.Ü. Tıp Fak. Nükleer Tıp Bilim Dalı, Ankara.
- Oğunbıyı P.O., Molokwu E.C.I. (1980). Oestrus synchronization and controlled breeding in goats using prostaglandin F_{2α}. *Theriogenology*, 13(4): 257-261.
- Oldham C.M. (1980). Stimulation of ovulation in seasonally or lactationally anovular ewes by rams. *Animal Production in Australia Symposium*, 73-74.
- Orchere E.O., Nimo M.C. (1975). Observation on the reproductive behaviour in the West African Dwarf goat. *Anim. Breed. Abstr.* (47): 5, 2364.
- Otchere E.O., Nimo M.C. (1978). Observations on the reproductive behaviour in the West African Dwarf goat. *Animal Breeding Abstracts*, (48): 6, 3235.
- Outram E.H.G. (1979). People producing mohair. *Angora Goat and Mohair Journal*, 21(1): 7-11.
- Ott, R.S. (1980 a). Breeding techniques for dairy goats. *Int. Goat and Sheep Res.*, 1(1): 1-5.
- Ott R.S., Nelson, D.R., Hixon J.E. (1980 b). Fertility of goats following synchronization of oestrus with PGF_{2α}. *Theriogenology*, 13(5): 341-345.

- Ott R.S., Nelson D.R., Hixon J.E. (1980 c). Effect of presence of the male on initiation of oestrus cycle activity of goats. *Theriogenology*, 13(2): 183-190.
- Ott R.S., Nelson, D.R., Hixon J.E. (1980 d). Peripheral serum progesterone and LH concentrations of goats during synchronization of oestrus and ovulation with PGF_{2α}. *American Journal of Veterinary Research*, 41(9): 1432-1434.
- Ott R.S., Braun W.F., Lock T.F., Memon M.A., Stowater J.L. (1982 a). A comparison of intrarectal doppler and rectal abdominal palpation for pregnancy testing in goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 178(7): 730-731.
- Ott R.S. (1982 b). Dairy goat reproduction. *Continuing Education*, 4(4): 166-172.
- Örkiz M. (1980). Ankara keçisi yetiştirme ve tiftik pazarlaması. *Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 62, Deneme Çift. Med. Basım Servisi, Ankara.*
- Post T.B. (1980). The use of RIA and related procedures to improve reproduction of domestic animals. 4th Research Coordinated Meeting on "The Use of RIA and Related Procedures to Improve Reproduction Performance of Domestic Animals". 5-9 Temmuz, Ithaca, N.Y.
- Prasad S.P., Bhattacharya N.K. (1979 a). Oestrus cycle and behaviour in different seasons in Barbari nannies. *Indian Journal of Animal Sciences*, 49(12): 1058-1062.
- Prasad S.P. (1979 b). A note on the occurrence of short oestrous cycles and possible association of ovarian activity in Barbari nannies. *Indian Journal of Animal Sciences*, 49(10): 854-856.
- Pretorius P.S., Westhuysen J.M. (1971). Induction of breeding activity in anoestrus Angora goat doe. *Agroanimalia*, 3: 27-30.
- Pretorius P.S. (1973). Cyclic reproductive activity in the Angora goat. *Agroanimalia*, 5: 55-58.
- Quirke J.F., Hanrahan J.P., Gosling J.P. (1979). Plasma progesterone levels throughout the oestrus cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fert.*, 55: 37-44.
- Radioimmunoassay kurs notları : 1) Interregional training course on the use of RIA and related techniques in animal diseases and production research, Centro Nacional de Salud Animal, Havana, Cuba, 23 April - 18 May, 1979. (IAEA and FAO).
- 2) Interregional advanced training course on the use of radioisotopes and radiation in animal production research, Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü, 1-30 June, Ankara, Turkey (IAEA and FAO).

- 3) Radioimmunoassay techniques, Tiergesundheitsdienst, W.Germany, 28 September - 19 December 1981.
- 4) FAO/IAEA Interregional RIA training course, Cornell University, Ithaca, New York, June 20 - July 15, 1982.
- Rajkonwar C.K., Borgohain B.N. (1978). A note the incidence and signs of oestrus in local does. *Indian Journal of Animal Sciences*, 10: 758-759.
 - Rattenberger E. (1981 ve 1982). Kişisel görüşme, Münih, B.Almanya
 - Rensburg Van S.J. (1971). Reproductive physiology and endocrinology of normal and habitually aborting Angora goats. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 38: 1-62.
 - Richardson G.F., Archbald, L.F., Galton D.M., Godke R.A. (1983). Effect of gonadotropin releasing hormone and prostaglandin F_{2α} on reproduction in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 19(6): 763-770.
 - Ricordeau G., Bouillon J. (1975). Observations on the duration of oestrus cycle and the conception rate at the beginning of the breeding season in the goat. *Animal Breeding Abstracts*, 44: 7, 3259.
 - Rhind S.M., Chesworth J.M., Robinson J.J. (1978). A seasonal difference in ovine peripheral plasma prolactin and progesterone concentrations in early pregnancy and in the relationship between the two hormones. *J. Reprod. Fert.*, 52: 79-81.
 - Ritar A.J. and Salamon S. (1982). Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35: 305-312.
 - Ritar A.J. and Salamon S. (1983). Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 36: 49-59.
 - Robertson H.A. and Sarda J.R. (1971). A very early pregnancy test for animals : its application to the cow, ewe and sow. *J. Endocrinol.* 49: 407-419.
 - Robertson H.A. (1977). Reproduction in the ewe and the goat. Page 495 in *Reproduction in Domestic Animals*, 3rd ed. H.H. Cole and P.T. Cupps, eds., Academic Press, New York.
 - Robertson H.A. (1983 a). Comparative studies on embryonic and fetal endocrinology as affecting early embryonic loss. *Research Coordination Meeting, Vienna, 25-29 April, 1983.*
 - Robertson H.A. (1983 b). Özel görüşme, Vienna.

- Rodgers R.P.C. (1982). Automated assay data processing and quality control. IAEA Symposium, Vienna, 21-25 June, RIA and Related Procedures in Medicine.
- Romero C., Miranda C., Altieri E. (1982). Quality control in the potency determination of hGH extracts. IAEA Symposium, Vienna, 21-25 June, RIA and Related Procedures in Medicine.
- Saba N., Cunningham N.I., Symons A.M., Millar P.G. (1975). The effect of progesterone implants on ovulation and plasma levels of LH, FSH and progesterone in anestrus ewes. *J. Reprod. Fert.* 44: 59-68.
- Sahni K.L. and Roy A. (1976). A study on the sexual activity of the Barbari goat and conception rate through artificial insemination. *Indian Journal of Vet. Sci.* 37: 269-276.
- Salamon S. and Ritar A.J. (1982). Deep freezing of Angora goat semen : Effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 35: 29-5-303.
- Santisteban M., Morales M., Naus A. (1977). Artificial insemination and the oestrus cycle in goats. Symposium in Malaya (Spain), 3-7 October 1977.
- Schwarz (1982). Strategy and organization of intralaboratory radioimmunoassay quality control. Radioimmunoassay and related procedures in Medicine (IAEA-Sm-259). Symposium Vienna.
- Serna J.A., Bosu W.T.K., Barker C.A.V. (1978). Sequential administration of crolone and PGF_{2α} for oestrus synchronization in goats. *Theriogenology* 9: 177-185.
- Sheldrick E.L., Ricketts A.P., Flint A.P. (1980). Placental production of progesterone in ovariectomized goats treated with a synthetic progestagen to maintain pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 60: 339-348.
- Sheldrick E.L., Ricketts A.P., Flint A.P. (1981). Placental production of 5 β-pregnane-3α, 20α diol in goats. *J. of Endocrinology*, 90: 151-158.
- Shelton 1960. The influence of the presence of a male goat on the initiation of oestrus cycling and ovulation of Angora does. *J. Anim. Sci.* 19: 368-374.
- Shelton M. and Marrow T. (1965). A study of the mechanism of male stimulation in Ang. Goats. Texas Agricultural Experiment Station, PR-2340, Texas A and M University, College Station, Texas, pp. 20-21.
- Shelton M. (1980). Goats : Influence of various exteroceptive factors on initiation of oestrus and ovulation. *International Goat and Sheep* 1(2): 156-162.
- Shelton M., Thompson P., Fleeger J.L., Bartlett D. (1981). Potential methods for pregnancy diagnosis in the goat Ang. and Mohair. *Jr.* 23(1): 73-74.

- Shemesh M., Lindner H.R. ve Ayalon N. (1971). Competitive protein binding assay of progesterone in bovine plasma during oestrus cycle. *J. Reprod. Fert.* 26: 167-174.
- Shemesh M., Ayalon N., Lavi S., Mileguir F., Shore, L.S., Toby, D. (1983). A new approach to the use of progesterone levels for pregnancy determination. *The British Veterinary Journal* 139: 41-48.
- Short R.V. (1958). Progesterone in blood II. Progesterone in the peripheral blood of pregnant cows. *J. Endocr.* 16: 426-428.
- Sokolowski, G. (1978). Quality control in medical laboratories. *Malinckrodt handbook*. Frankfurt, W. Germany.
- Sprague E.A., Hopwood M.L., Niswender G.D., Wiltbank J.N. (1971). Progesterone and LH levels in peripheral blood of cycling cows. *J. Anim. Sci.* 33: 99-103.
- Sufi S.B., Jeffcoate S.L., Hall P.E. Goncharov N. (1982). Assay Reagent Programme in Research in Human Reproduction (IAEA-SM-259). *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*. Symposium, Vienna.
- Symons A.M., Cunningham N.F., Saba N., Millar P.G. (1974). Circulating progesterone levels in anestrus sheep with silicone rubber progesterone implants. *Jour. Reproduction Fert.* 41: 475-477.
- T.C. Tarım Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü, Veteriner Çalışmaları ve Hayvancılık İstatistikleri 1967-70.
- Thibier M., Pothelet O., Jeanguyot N., Montigny G. de (1981). Estrus behaviour, progesterone in preipheral plasma and milk in dairy goats at onset of breeding reason. *Journal of Dairy Sci.* 64: 513-519.
- Thornburn G.D., Basset J.M., Smith I.D. (1969). Progesterone concentrations in the peripheral plasma of sheep during the estrus cycle. *Jour. Endocrinol.* 45: 459-469.
- Thornburn G.D., Schneider W. (1972). The progesterone concentration in the plasma of the goat during the estrus cycle and pregnancy. *Jour. Endocrinol.* 52: 23-36.
- Thorncyroft I.H., Tillson S.A., Abrham G.E., Scaramuzzi R.J., Caldwell B.V. (1970). Preparation and purification of antibodies to steroids, *Immunologic Methods in Steroid Determination*. 63-86.
- Trounson A. (1983). Comparative Embryo transfer in Australia. *Theriogenology* 19(1): 17-30.
- Webb R.G., Lamming G.E., Haynes N.B., Haffs H.D. and Manns J.G. (1977). Response of cyclic and post partum sucklet cows to injections of synthetic LH-RH. *Jour. Reprod. Fert.* 50: 203.

- Wentzel D., Morgenthal J.C. and Van Niekerk C.H. (1975 a). The habitually aborting Angora Adrenal function. *Agroanimalia* 7: 27-34.
- Wentzel D., Morgenthal J.C. and Van Niekerk C.H. (1975 b). The habitually aborting Angora doe V. Plasma oestrogen concentration in normal and aborter does with special reference to the effect of energy deficiency. *Agroanimalia* 7: 35-40.
- Wentzel D., Viljoen K.S. (1975 c). The habitually aborting Angora doe VI. Induction of aborting by administration of exogenous estrogens. *Agroanimalia* 7: 41-44.
- Wentzel D., Morgenthal J.C. and Van Niekerk C.H. (1975 d). The habitually aborting Angora doe. II. Luteal function in normal and aborter does. *Agroanimalia* 7: 15-22.
- Wentzel D. (1978). Influence of cold on the Angora goat. *Angora Goat and Mohair Journal* 20(2): 35-39.
- Wentzel P., Müller P. (1979 a). Induction of breeding activity in anestrus Angora goats. *Agroanimalia* 11: 61-79.
- Wentzel D., Botha L., Viljoen K.S. (1979 b). Progesterone levels in the peripheral plasma of cycling Angora goat doe. *Agroanimalia* 11: 27-28.
- Westhuysen J.M. (1974). Factors influencing the breeding potential of Angora goats. *The Angora Goat and Mohair Jour.* 16: 25-32.
- Westhuysen J.M. (1976). Induction of breeding activity in anestrus Angora does. *Agroanimalia* 8: 165-166.
- Westhuysen J.M. (1978). Controlled breeding and artificial insemination in the Angora goat. *The Angora and Mohair Jour.* 21: 41-45.
- Westhuysen J.M. (1979). The control of ovarian function in cycling and anestrus. *Angora Goat Does. Agroanimalia* 11(2): 23-25.
- Westhuysen J.M. (1979). Factors affecting the reproductive efficiency of Angora goats., in South Africa. *Angora and Mohair Jour.* 21(2): 7-13.
- Westhuysen J.M. (1980). Perinatal Mortality in the Angora goat. *The Angora goat and Mohair Jour.* 22(1): 19-23.
- Yalow R.S. and Berson S.A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature (Lond.)* 184: 1648-1649.
- L'Anunziata M. (1980). *Radiotracers in Agricultural Chemistry*, International Atomic Energy Agency, Academic Press.