



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2014; 28 (1): 01 - 04
<http://www.fusabil.org>

Östrüs Siklusunun Farklı Dönemlerindeki Dişi Köpeklerde Kan Progesteron ve 17β-Östradiol Seviyelerinin RIA ve ECLIA Yöntemleriyle Karşılaştırılması*

Burhan YÜCEL
Oktay YILMAZ
Mehmet UÇAR

Afyon Kocatepe
Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Doğum ve Jinekoloji
Anabilim Dalı,
Afyonkarahisar, TÜRKİYE

Bu çalışmada, seksüel siklusun değişik dönemlerindeki köpeklerin serum örneklerinde radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle ölçülen progesteron (P₄) ve 17β-östradiol (E₂) düzeylerinin elektrokemiluminesans immunoassay (ECLIA) yöntemiyle karşılaştırılması ve ECLIA yönteminin köpeklerde P₄ ve E₂ düzeylerinin belirlenmesindeki doğruluğunun tespit edilmesi amaçlandı. Çalışmada çeşitli ırklardan, 10-30 kg canlı ağırlığında, 25 adet dişi köpek kullanıldı. Seksüel siklusların tespiti için vaginal sitoloji kullanıldı. RIA ve ECLIA yöntemlerine göre elde edilen serum P₄ ve E₂ düzeyleri arasındaki korelasyon karşılaştırıldı.

Köpeklerin %60'ının anöstrüste (n=15), %16'sının proöstrüste (n=4), %16'sının östrüste (n=4) ve %8'inin (n=2) diöstrüste oldukları belirlendi. Sunulan çalışmada her bir hayvana ait serum örneğinin RIA ve ECLIA yöntemleri ile belirlenen serum P₄ (ng/mL, P<0.001; r=0.998) ve E₂ (pg/mL, P<0.001; r=0.998) değerlerinin birbirine benzer olduğu ve istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, köpeklerde P₄ ve E₂ ölçümlerinde ECLIA'nın da RIA gibi doğru sonuç veren bir metod olduğu ve test süresinin kısa olması nedeniyle daha etkili bir şekilde kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Progesteron, 17β-östradiol, RIA, ECLIA, dişi köpek.

Comparison of Blood Progesterone and 17β-Estradiol Concentrations in Bitches at Different Stages of Oestrous Cycle by RIA and ECLIA Methods

In the present study, it was aimed to compare the serum progesterone (P₄) and 17β-estradiol (E₂) levels detected by radioimmunoassay (RIA) and electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) and to investigate the accuracy of ECLIA method to measure serum P₄ and E₂ levels in 25 bitches. This study was carried out on 25 bitches of different breeds weighing 10-30 kg, at various phases of sexual cycle. The vaginal cytology was used to determine the phases of oestrous cycles. The correlation between the levels of P₄ and E₂ detected by RIA and ECLIA was analyzed statistically.

The percentage of animals in anoestrus (n=15), prooestrus (n=4), estrous (n=4) or dioestrus (n=2) were 60%, 16%, 16% and 8%, respectively. In the present study, it was observed that the serum P₄ (P<0.001; r=0.998) and E₂ (P<0.001; r=0.998) levels detected by RIA and ECLIA were similar and statistically significant.

In conclusion, it is suggested that ECLIA is as reliable method as RIA method for measuring P₄ and E₂ in bitches, and ECLIA method is more practical than RIA due to its shorter testing time.

Key Words: Progesterone, 17β-estradiol, RIA, ECLIA, bitch.

Geliş Tarihi : 15.07.2013
Kabul Tarihi : 06.12.2013

Yazışma Adresi Correspondence

Mehmet UÇAR
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Doğum ve Jinekoloji
Anabilim Dalı,
Afyonkarahisar - TÜRKİYE

mucar@aku.edu.tr

Giriş

Köpeklerde progesteron (P₄) ve östrojen (E₂) gibi steroid hormon düzeylerinin tespiti seksüel siklusun dönemi hakkında güvenilir bilgi vermektedir. Bu hormonların tespitinde, sıklıkla radioimmunoassay (RIA) metodu kullanılmakla (1) birlikte günümüzde elektrokemiluminesans immunoassay (ECLIA) yöntemi de kullanılmaya başlanmıştır (2).

İşaretlenmiş antijen veya antikörlerin tespit edilmesi prensibine dayalı olan RIA, yarışmalı bağlanmayı sergilemektedir. Serum örneği içerisinde bulunan işaretlenmiş ve işaretlenmemiş her iki antijen, spesifik antikör üzerindeki bağlanma bölgelerini eş zamanlı olarak tamamlamaya çalışmaktadır (1). Luminesans metotlarından elektrokemiluminesans (ECL) bazı solüsyon türleri veya elektrot yüzeyine bağlanan türleri ile bir elektrot arasındaki elektron transferinin bir sonucu olarak direkt ya da indirekt olarak üretilen kemiluminesans olarak ifade edilebilmektedir (2).

*Bu çalışma Burhan YÜCEL'in aynı başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Küçük hayvan reproduksiyonu ile ilgilenen veteriner hekimler, sıklıkla etkili uygun çiftleşme ve suni tohumlama zamanının belirlenmesi, doğum zamanının tespit edilmesi ve hipolutedizm gibi patolojik durumların belirlenebilmesi için serum P₄ ve E₂ ölçümüne ihtiyaç duymaktadırlar (3, 4). RIA tekniği, pek çok klinisyen ve akademisyen tarafından hormon ölçümlerinde sık olarak kullanılmaktadır. Günümüzde bu tekniğin tehlikeli radyoaktif materyal ile çalışıyor olması, uygulama zamanının uzun sürmesi ve pahalı bir yöntem olması farklı yöntemlerin kullanılmasına yönelmektedir (5, 6). Kemiluminesans yöntemi ile bazı çalışmalar yapılmış olup (6, 7), ECLIA ve RIA yöntemleri ile östrojen ve progesteronun karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle sunulan çalışmada, seksüel siklusun farklı dönemlerindeki köpeklerin serum örneklerinde RIA yöntemiyle ölçülen P₄ ve E₂ düzeyleri ECLIA yöntemiyle karşılaştırılarak, ECLIA yönteminin köpeklerde P₄ ve E₂ düzeylerini doğru tespit edip etmediği araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmanın materyalini, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Hastanesine ovariohisterektomi amacıyla getirilen çeşitli ırklardan, sağlıklı ve en az birbuçuk yaşını dolduran 25 adet dişi köpek oluşturdu. Çalışmada hayvanların kullanılabilmesi için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 17.02.2010 tarih ve 44 sayılı kararı ile onay alındı.

Çalışmadaki köpeklerin östrüs siklusunun evresini belirlemek için vaginal smear yapıldı. Vajinal sitoloji için örnek alınmasını takiben 10 mL'lik steril vakumlu tüplere kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve serum P₄ ve E₂ analizleri yapılcaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Her bir hayvana ait serum P₄ ve E₂ düzeyleri RIA ve ECLIA yöntemleriyle belirlendi. RIA protokolünde P₄ analizleri için immunojen olarak progesteron-11 α -BSA kullanılan liyofilize tavşan antiserumu (P 5289, Sigma), E₂ analizleri için immunojen olarak 17 β -östradiol-6-BSA kullanılan liyofilize tavşan antiserumu (E 2885, Sigma) seçilerek işlemler yaklaşık 2.5 saat içerisinde gerçekleştirildi.

Köpek serumunda P₄ ve E₂ düzeylerinin ECLIA yöntemiyle in vitro kantitatif tayini için Cobas e601 (Roche, Almanya) immünojenik test analizörü kullanıldı. Toplam 18 dakika süren P₄ analizleri için Anti-progesteron-Ab-biyotin (Biyotinli monoklonal anti-progesteron antikor (fare); 0.15 mg/L, fosfat tamponu 25 mmol/L, pH 7.0; koruyucu madde) ve Progesteron-peptid-(Ru(bpy)₃²⁺) (Rutenyum kompleksi ile işaretli bir sentetik peptide bağlanmış progesteron (bitki kaynaklı), 10 ng/mL; fosfat

tamponu) kullanılırken, E₂ analizleri için anti-östradiol-Ab-biyotin (Biyotinli poliklonal anti-östradiol antikor (tavşan); 45 ng/mL, mesterelon 130 ng/mL MES buffer 50 mmol/L, pH 6.0; koruyucu madde) ve Östradiol-peptid-(Ru(bpy)₃²⁺) (Rutenyum kompleksi ile işaretli bir sentetik peptide bağlanmış östradiol, 2.75 ng/mL, MES buffer 50 mmol/L, pH 6.0; koruyucu madde) kullanıldı.

P₄ analizinde kullanılan testteki ölçüm aralığı 0.095-191 nmol/L (alt ölçüm sınırı; 0.030 ng/mL, ana eğrinin maksimum değeri; 60.00 ng/mL) ve fonksiyonel duyarlılığı ise 0.48 nmol/mL (0.15 ng/mL) değerlerinde değışti. E₂ analizinde kullanılan testteki ölçüm aralığı 18.4-15.781 pmol/L (alt ölçüm sınırı; 5.00 pg/mL, ana eğrinin maksimum değeri; 4300 pg/mL) ve fonksiyonel duyarlılığı ise 0.44 pmol/L (12 pg/mL) değerlerinde değışti.

Her bir hayvandan elde edilen serumların RIA ve ECLIA yöntemlerine göre P₄ ve E₂ analizleri sonucunda elde edilen veriler SPSS 16.0 programında regresyon analiziyle karşılaştırıldı.

Bulgular

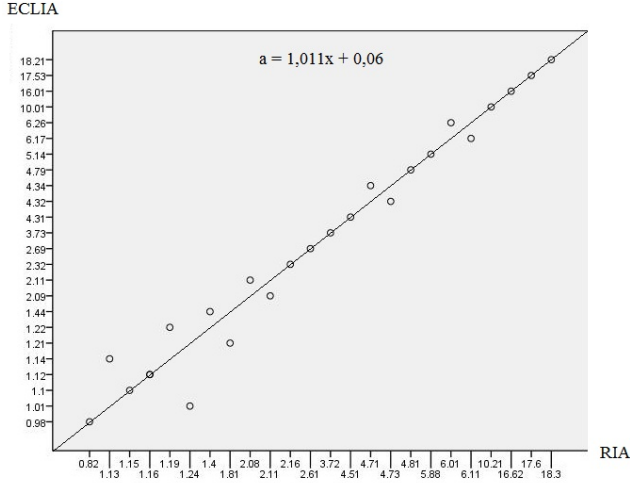
Çalışmada değerlendirilen köpeklerin (n=25) %60'ının anöstrüste (n=15), %16'sının proöstrüste (n=4), %16'sının östrüste (n=4) ve %8'inin (n=2) diöstrüste oldukları belirlendi.

Anöstrüs, proöstrüs, östrüs ve diöstrüs dönemlerinde bulunan köpeklerin RIA ve ECLIA yöntemlerine göre ortalama P₄ ve E₂ değerleri Tablo 1'de verilmektedir.

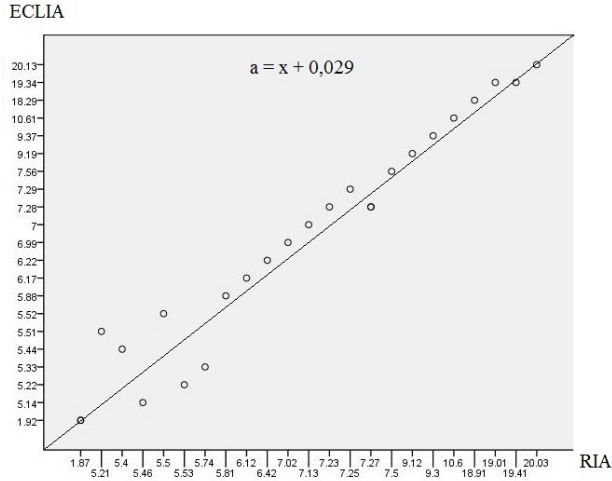
Sunulan çalışmada her bir hayvana ait serum örneğinin RIA ve ECLIA yöntemleri ile belirlenen P₄ (ng/mL) değerlerinin birbirine benzer olduğu ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (P<0.001; r=0.998) (Şekil 1). Aynı zamanda her bir hayvana ait serum örneğindeki E₂ (pg/mL) değerlerinin de birbirine benzer olduğu ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (P<0.001; r=0.998) (Şekil 2).

Tablo 1. Seksüel siklusun farklı dönemlerinde RIA ve ECLIA yöntemleriyle elde edilen ortalama progesteron ve 17 β -östradiol değerleri (\pm SEM).

	Progesteron (ng/mL)		17 β -östradiol (pg/mL)	
	RIA	ECLIA	RIA	ECLIA
Anöstrüs	3.04 \pm 0.43	2.89 \pm 0.40	6.26 \pm 0.21	6.20 \pm 0.22
Proöstrüs	1.14 \pm 0.11	1.20 \pm 0.09	19.34 \pm 0.25	19.28 \pm 0.37
Östrüs	15.68 \pm 1.85	15.44 \pm 1.86	9.06 \pm 0.69	9.11 \pm 0.68
Diöstrüs	3.68 \pm 2.43	3.59 \pm 2.58	4.45 \pm 2.57	4.46 \pm 2.53



Şekil 1. RIA ve ECLIA yöntemleri ile aynı örnekte ölçülen progesteron (ng/mL) değerleri. $a = \text{RIA}$ ($P < 0.001$; $r = 0.998$)



Şekil 2. RIA ve ECLIA yöntemleri ile aynı örnekte ölçülen 17β-östradiol (pg/mL) değerleri. $a = \text{RIA}$ ($P < 0.001$; $r = 0.998$)

Tartışma

Köpeklerde kan P_4 ve/veya E_2 düzeylerinin tespiti, seksüel siklus tespiti ile ovaryum kökenli tümörler gibi patolojik olguların tespitinde kullanılan bir muayene yöntemidir. Kullanılan hormon analiz yönteminin kısa sürede en doğru ve ekonomik şekilde sonuç vermesi, teşhis için oldukça önemli bir kriterdir (4-6).

Anöstrüste, E_2 konsantrasyonunun 8-15 pg/mL arasında değiştiği (8), pik değerinin 17.2-97.7 pg/mL olduğu (9), diöstrüs döneminde ise bazal seviyelerde bulunduğu belirtilmektedir (10-12). Sunulan çalışmada vaginal sitoloji ile anöstrüs ve diöstrüs dönemlerinde olduğu belirlenen köpeklerin E_2 düzeylerinin RIA ve ECLIA yöntemlerine göre sırasıyla 6.26 pg/mL ve 6.20 pg/mL ile 4.45 pg/mL ve 4.46 pg/mL olduğu belirlendi. Çalışmada elde edilen değerler diğer bildirimlerle (8-12) uyumlu bulundu.

Plazma E_2 konsantrasyonunun erken folliküler evrede dereceli olarak arttığı (13), östrüsün dördüncü gününde ise proöstrüsten daha düşük bir düzeyde (18 pg/mL) seyrettiği ifade edilmektedir. Ortalama E_2 konsantrasyonunun LH piki sırasında 44 ± 9.2 pg/mL olduğu, sonra hızlı bir şekilde azalarak östrüsün sonunda (8.7 ± 1.1 pg/mL) bazal seviyeye ulaştığı bildirilmektedir (14). Sunulan çalışmada E_2 düzeylerinin RIA ve ECLIA yöntemlerine göre sırasıyla proöstrüs dönemlerinde 19.34 pg/mL ve 19.28 pg/mL, östrüsde 9.06 pg/mL ve 9.11 pg/mL olduğu belirlendi. Sözü edilen dönemlerde gözlenen E_2 düzeylerinin diğer çalışmalarla (13, 14) uyumlu olduğu gözlemlendi.

Ortalama plazma P_4 konsantrasyonunun proöstrüsün son 12-48 saatinde bazal seviyede (< 0.5 ng/mL) olduğu bildirilirken, proöstrüsün sonunda veya östrüsün başlangıcında yükseldiği aktarılmaktadır (8, 15-17). Sunulan çalışmada P_4 düzeyleri proöstrüs döneminde RIA'de 1.14 ng/mL, ECLIA'de 1.20 ng/mL olduğu belirlendi. Araştırmada vaginal sitoloji verilerine göre proöstrüs döneminde olduğu belirlenen köpeklerin kan P_4 düzeylerinin 0.5 ng/mL'den yüksek çıkması, araştırmacıların (8, 15-17) da bildirdiği şekilde köpeklerin geç proöstrüs döneminde olmasından kaynaklanabilir.

LH pikinden önce 0.5 ng/mL'yi aşarak yükselmeye başlayan progesteron düzeyinin takip eden 15-25. günlerde artışına devam ettiği ve LH piki sonrası 20-25. günlerde 47 ± 3.1 ng/mL'ye ulaştığı belirtilmektedir (16, 18-20). Bu çalışmada östrüste olan köpeklerde P_4 düzeylerinin RIA ve ECLIA ile sırasıyla 15.68 ng/mL ve 15.44 ng/mL olduğu ve diğer dönemlere göre en yüksek P_4 düzeylerinin tespit edildiği gözlemlendi. Köpeklerde, östrüsün P_4 hormonu etkisi altında gerçekleşiyor olması (21) da çalışmada elde edilen bulguları desteklemektedir.

Progesteron pikinin genellikle ovulasyondan sonraki 20-30 günde elde edildiği ifade edilmektedir (22). Sunulan çalışmada RIA ve ECLIA yöntemlerine göre diöstrüs döneminde olduğu belirlenen köpeklerin P_4 düzeylerinin sırasıyla 3.68 ng/mL ve 3.59 ng/mL olduğu belirlendi. Bunun nedeninin ise vaginal sitoloji değerlendirmelerine göre köpeklerin diöstrüste oldukları belirlenmesine rağmen kan örneklerinin alındığı zamanın P_4 düzeyinin yükselmeye veya düşmeye başladığı zaman ile uyum göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Klinik uygulamalarda, P_4 konsantrasyonu hakkında bilgi sahibi olmak, klinik ve endokrinolojik karşılaştırma sonrası kesin bir teşhise olanak sağlayabilmektedir (23). P_4 tespiti için kullanılan yarı kantitatif metotlar kan örneklerinin test edilmesine olanak vermelerine rağmen yeterli oranda doğruluğa ve güvenilirliğe sahip değildirler (24, 25). RIA günümüzde hala önemini koruyan bir kantitatif metottur. Pratikte RIA'ler radioaktif boşa harcama probleminin önlenmesi ve otomasyonun sağlanabilmesi amaçlarıyla sıklıkla analizörler üzerinde non-radio izotopik immunoassaylar ile yer değiştirmektedirler (23).

Sunulan çalışmada her bir hayvana ait serum örneğinin RIA ve ECLIA yöntemleri ile belirlenen P₄ (Şekil 1) ve E₂ (Şekil 2) değerlerinin birbirine benzer ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (P<0.001; r=0.998). Anckaert ve ark. (26) yaptıkları araştırmalarında kan P₄ değerlerini MiniVidas ve ECLIA ile karşılaştırmış ve her ikisi arasında elde ettiği sonuçlar yönünden korelasyon gözlendiğini bildirmişlerdir. Chapwanya ve ark. (6) kemoluminisens assay (Immulit) ve RIA yöntemleriyle köpeklerde kan P₄ düzeylerini karşılaştırdıkları çalışmalarında immulit assay tekniğinin RIA ile benzer sonuçlar verdiğini belirtmektedirler. Bu

çalışma da RIA yöntemiyle elde edilen sonuçların ECLIA yöntemiyle elde edilen sonuçlarla istatistiksel olarak benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Sonuç olarak, ECLIA'in köpeklerde serum P₄ ve E₂ konsantrasyonlarının tespitinde kullanılan RIA yöntemi kadar doğru ve güvenilir bir yöntem olduğu kanısına varıldı. Bununla birlikte, veteriner hekimlerin ve akademisyenlerin bu tür steroid hormonların analizlerinde hem zaman hem de ekonomik yönden fayda sağlamaları nedeniyle ECLIA yönteminin RIA yönteminin yerini alacak bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Tembhare DB. Techniques in Life Sciences: Radioimmunoassay of Hormones. Mumbai: Himalaya Publishing House, 2008.
2. Kulmala S, Suomi J. Current status of modern analytical luminescence methods. *Analytica Chimica Acta* 2003; 500: 21-69.
3. Concannon PW, Powers ME, Holder W. Pregnancy and parturition in the bitch. *Biol Reprod* 1977; 16: 427-431.
4. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. Breeding Management and Artificial Insemination of the bitch. In: Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. (Editors). *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders 2001: 41-65.
5. Hannon W, Atkinson MA, Ball DJ, et al. Assessing the quality of immunoassay systems: Radioimmunoassays and enzyme, fluorescence, and luminescence immunoassay; approved guidelines. *CLSI I/LA23-A* 2004; 24: 1-36.
6. Chapwanya A, Clegg T, Stanley P, Vaughan L. Comparison of the immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology* 2008; 70: 795-799.
7. Kutzler MA, Mohammed HO, Lamb SV, Meyers-Wallen VN. Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in progesterone concentration. *Theriogenology* 2003; 60: 1187-1196.
8. Feldman EC, Nelson RW. Canine female reproduction. In: Pedersen D. (Editor). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2nd Edition, Philadelphia: WB Saunders 1996: 399-475.
9. Christiansen IBJ. Cytological examination of the vaginal smear. In: Christiansen IBJ. (Editor). *Reproduction in The Dog and Cat*. London: Bailliere Tindall 1984: 55-80.
10. Edqvist LE, Johnsson EDB, Kasstrom H, Olsson SE, Richkind M. Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oestrus cycle and pregnancy. *Acta Endocrinol* 1975; 78: 554-564.
11. Hadley JC. Total unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in peripheral blood during pregnancy in the dog. *J Reprod Fertil* 1975; 44: 453-460.
12. Nett TM, Akbar AM, Phemister RD, et al. Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the oestrus cycle and pregnancy in the Beagle bitch. *Proc Soc Exp Biol* 1975; 148: 134-139.
13. de Gier J, Kooistra HS, Djajadiningrat-Laanen SC, Dieleman SJ, Okkens AC. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 β , progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology* 2006; 65: 1346-1359.
14. Onclin K, Murphy B, Verstegen JP. Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology* 2002; 57: 1957-1972.
15. Concannon PW, Hansel W, Visek W. Pregnancy and parturition in the bitch. *Biol Reprod* 1975; 16: 517-526.
16. Tsutsui T. Peripheral plasma gestagen levels during in the estrous cycle and pregnancy in the bitch. *Jpn J Anim Reprod* 1982; 31: 150-156.
17. England GCW, Anderton DJ. Determination of progesterone concentrations in the vaginal fluid of bitches in oestrus. *Vet Rec* 1992; 130: 143-144.
18. Concannon PW, Hansel W. Prostaglandin F₂ α induced luteolysis, hypothermia and abortions in the Beagle bitches. *Prostaglandins* 1977; 13: 533-542.
19. England GCW, Allen WE, Porter DJ. A comparison of radioimmunoassay with quantitative and qualitative enzyme-linked immunoassay for plasma progesterone detection in bitches. *Vet Rec* 1989; 125: 107-108.
20. Mestre J, Wanke M, Sucheyre S. Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol-17 β during oestrus in the bitch. *J Small Anim Prac* 1990; 31: 568-570.
21. Alaçam E. Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. 5. Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi, 2005.
22. Johnston SD. Diagnostic and therapeutic approach to infertility in the bitch. *JAVMA* 1980; 176: 1335-1338.
23. Brugger N, Otzdorff C, Walter B, Hoffmann B, Braun J. Quantitative determination of progesterone (P₄) in canine blood serum using an enzyme-linked fluorescence assay. *Reprod Dom Anim* 2011; 46: 870-873.
24. Laiblin C. Estrus detection in the bitch with a progesterone rapid test (EIA) – a sensible supplement to vaginal cytology. *Tierärztl Prax* 1991; 19: 197-199.
25. Hospes R, Richter BR, Riesenbeck A, Bostedt H. Untersuchungen zur Zuverlässigkeit handelsüblicher Progesterone-Schnelltests in der gynäkologischen Diagnostik beim Hund. *Tierärztl Prax* 2004; 32: 247-251.
26. Anckaert E, Mees M, Schiettecatte J, Smitz J. Clinical validation of a fully automated 17 β -estradiol and progesterone assay (VIDAS) for use in monitoring assisted reproduction treatment. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 824-831.