Turk J Vet Anim Sci
27 (2003) 45-50
© TÜBİTAK

Araştırma Makalesi

Testosteron İçin Enzimimmunassay Tekniğinin Geliştirilmesi*

Bülent GÜVEN
Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

Semin ÖZSAR
Kadir Has Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul - TÜRKİYE

Nalan MARAŞLI, Şaban MARAŞLI, Ayla ÖZCAN
Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 26.07.2001

Özet: Bu çalışmada, plazmada testosteron tayini için çift antikorlu enzimimmunassay yöntemi geliştirildi.

Testosteron 3-O-CMO, horseradish peroksidaz enzimi ile 'mixed anhydride' yöntemi kullanılarak işaretlendi ve konjugat sephadex G-25 kolon kromatografisinden geçirilerek saflaştırıldı. Testosteron antikoru, tavşanlar Testosteron-3-O-CMO-BSA ile immunize edilerek üretildi.

Testosteron antiserumunun çeşitli steroidler ile çapraz reaksiyon oranları %<0.01 olarak bulundu. Standart eğri 0-20 ng/ml (0-200 pg/delik) arasında olup testin hassasiyeti ise 2,5 pg/delik olarak tespit edildi. Testin kantitatif verimi % 98,8 ve deneylerarası varyasyon katsayısı %12,6 olarak bulundu.

Bu çalışmada geliştirilen enzimimmunassay, testosteronun rutin tayini için ekonomik bir yöntemdir. Çok az laboratuvar cihazı gerektirdiğinden özellikle hayvancılık konusunda araştırma yapanlar için kullanışlı ve alternatif bir yöntemdir.

Anahtar Sözcükler: Testosteron, enzimimmunassay

Development of an Enzyme Immunoassay for the Determination of Testosterone

Abstract: In this study, a double antibody enzyme immunoassay for the direct determination of testosterone in plasma was developed.

Testosterone 3-O-CMO was conjugated with horseradish peroxidase by the mixed anhydride method, and the conjugate purified by column chromatography (sephadex G-25). Testosterone antibody was obtained by immunization of rabbits against Testosterone-3-O-CMO-BSA.

Cross reactions of the antiserum against some steroids were found to be <0.01%. The detection limit of the assay was 2.5 pg/well and the working range of the standard curve was 0-20 ng/ml (0-200 pg/well). The recovery was found to be 98.8% after the addition of known amounts of testosterone to plasma samples. The inter-assay coefficient of variation was 12.6%.

The described EIA offers a very economical alternative for the routine estimation of testosterone levels. Only minimal laboratory equipment is required and therefore the assay should be especially useful for research in animal science.

Key Words: Testosterone, enzyme immunoassay

Giriş

Testosteron analizi hayvancılıkta puberta öncesi testisin steroidogenic aktivitesinin tespiti, puberta sonrası seksüel gelişmenin izlenmesi, seksüel gelişmeye beslenmenin etkisi ve çiftleşme aktivitesi üzerine mevsimsel değişikliklerin etkisini araştırmak maksadıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, atlarda granulosa hücresi tümörlerinin ve kriptorşizm teşhisinde, köpeklerde leydig hücrelerinin salgı yapma durumunun kontrolünde ve fertilite kontrolünde, kedilerde leydig hücre fonksiyonunu değerlendirmede testosteron analizlerinden faydalanılmaktadır.

* Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiş (97 VF 014) ve Kafkas Üniversitesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapılmıştır.

Testosteronun doping amacıyla kullanılmasında illegal kullanımları tespit için testosteron analizleri rutin olarak yapılmaktadır (1-7).

Hayvancılıkta verimin artırılması için kullanılan seleksiyon ve melezleme gibi geleneksel yöntemler yaygın olarak kullanılmakla birlikte hormon, enzim, metabolitler gibi biyokimyasal parametrelerin de beraber çalışıldığı araştırmalar daha verimli olmaktadır. Bu nedenle hayvancılıkta özellikle hormon tayinleri üretimin (süt, et, yapağı) ve üremenin geliştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (8).

Hayvancılık konusunda hormon düzeylerini içeren araştırma yapmak hormon kitlerinin ithal edilmesi nedeniyle pahalıya mal olmakta bu da gelişmiş ülkelerde çalışan araştırıcıları araştırma yapma konusunda kısıtlamakta ayrıca gen kaynağı olarak kullanılacak ülkeye özgü ırkların temel fizyolojik verileri bile elde edilememektedir. Bu sebepler nedeniyle araştırma kurumlarının daha fazla araştırma yapabilmesi ve rutin analizlerde kullanmak üzere kendi test sistemlerini geliştirmesi büyük önem kazanmaktadır.

Hormon düzeylerini ölçmek için kullanılan yöntemler immun testlerin temel prensibine dayanır (9). Bu testlerde değişik maddeler izleyici olarak kullanılmıştır. Radyoaktif izotoplar en yaygın olarak kullanılan madde olmakla birlikte enzimler izotoplara alternatif olarak immun testlerde kullanılmaktadır (1,2,8). İzotopların ve kullanılan organik solvanların insan sağlığı ve çevreye olan zararlı etkileri yanında pahalı sayım cihazlarına olan gereksinim nedeniyle radioimmunassay (RIA) yöntemi ekonomik olmamaktadır. İzleyici olarak enzimlerin kullanıldığı enzimimmunassay (EIA) yöntemleri ucuz ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle RIA'ya alternatif olmuştur (10,11).

Testosteronun, plazma, tükrük, kıl ve idrarda analizi için çeşitli immunolojik ve kromatografik yöntemler (12-17) geliştirilmiştir. EIA yönteminin testosteron için geliştirildiği çeşitli araştırmalarda (18-22) ekstraksiyon veya direkt analizler tercih edilmiş ve bu sistemlerde tek veya çift antikor kullanılmıştır. Fakat çift antikorlu EIA yönteminin daha güvenilir olduğu ve beş katı daha az oranda hormona özgül antikor kullanıldığından ekonomik olduğu bildirilmiştir (10,23).

Bu çalışmada; a) Testosterona karşı antikor üretimi ve karakterizasyonu, b) Testosteronun enzimle işaretlenmesi ve saflaştırılması c) Testosteron EIA metodunun kalite kontrolu çalışmalarının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Testosteron'a Karşı Antikor Üretilmesi

Çalışmada 6 aylık, dişi, Yeni Zelanda ırkı 10 adet tavşan kullanıldı. Tavşanların 5'i Testosterone 17β-Hemisuccinate: Bovine Serum Albumin, 5'i de Testosterone 3-(O-Carboxymethyl) Oxime: Bovine Serum Albumin (Testosterone 3-O-CMO-BSA) antijenine karşı immunize edildi. Antijen fosfat tampon içinde çözüldü ve eşit miktardaki Freund's Adjuvant ile emülsifiye edildikten sonra tavşanlara subkutan yolla yaklaşık 20 değişik yerden enjekte edildi. İlk enjeksiyonda Complete Freund's Adjuvant ve 300 µg antijen kullanılırken sonraki enjeksiyonlarda Incomplete Freund's Adjuvant ve 250 µg antijen kullanıldı. Booster enjeksiyonlar 3'er hafta ara ile 12 kez yapıldı ve 3. enjeksiyonu takipeden her enjeksiyondan sonraki 10. günde tavşanların kulak venasından kan alınarak antikor titresi enzimimmunassay (EIA) yöntemi ile tespit edildi.

Testosteron Antiserumunun Özgüllüğünün Tayini

Antiserumun özgüllüğü çeşitli steroid hormonlarla verdiği çapraz reaksiyon oranı ile tespit edildi. Bunun için estrone, estradiol ve progesteron hormonlarının 1 ng - 16 µg arasında standartları hazırlandı ve bu standartlar, enzim işaretli testosteron ve testosteron antiserumu ile reaksiyona sokularak her hormonun testosteron antiserumuna bağlanma oranı enzimimmunassay metodu ile tayin edildi (13).

Testosteronun Horseradish Perosidaz (HRP) ile İşaretlenmesi

İşaretlemede "mixed anhydride" yöntemi (24) kullanılmış olup aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

A Solusyonu:

0,5 mg Testosterone 3-(O-Carboxymethyl) Oxime, 0,5 ml N,N dimethylformamide içinde çözüldü ve buna 6,25 µl methylmorpholine ilave edilerek çözelti önce 0 ºC'ye daha sonra -15 ºC'ye kadar soğutuldu.

B Solusyonu:

5 mg HRP enzimi 500 µl distile suda çözüldü ve 375 µl N,N-dimethylformamide ilave edilerek çözelti 0 ºC'ye soğutuldu.

Reaksiyon:

A solusyonuna 6,25 ml iso-butylchloroformate ilave edilerek karışım 3 dakika -15 ºC'de inkübe edildi. Daha sonra B solusyonu A solusyonuna ilave edildi ve pH 8,0'e 1 N NaOH ile ayarlandı. Karışım 1 saat -15 ºC'de ve 2 saat 0 ºC'de karıştırıldı ve daha sonra reaksiyon 10 mg $NaHCO_3$ ile durduruldu.

Testosteron-HRP Konjugat'ının Saflaştırılması

İşaretleme sonucu elde edilen karışım önce dialize edildi daha sonra kolon kromatografisinden geçirilerek saflaştırıldı. Dializ işlemi için porları, moleküler ağırlığı 12.000'den küçük olan maddelerin geçebildiği, selüloz dializ tüpü kullanıldı. Dializ 24 saat süre ile PBS (40mM Na_2HPO_4, 0,14 M NaCl, 0,2g, pH 7,2) tampona karşı yapıldı ve her 6 saatte bir PBS tamponu değiştirilerek dializ banyosu tazelendi. Dialize edilen kojugat daha sonra kolon kromatografisinde (kolon ebadı: 1,5 x 85 cm, kolon dolgu maddesi: sephadex G-25, akış hızı: 0,5 ml / dk) saflaştırıldı. Toplanan her bir fraksiyonun 0,5 µl si 100 µl substrat (%0,01 tetrametilbenzidin, %0,004 hidrojen peroksit, 100 mM sodyum asetat, pH5,5) ile 1 dk inkübe edildi ve reaksiyon 50 µl 4N H_2SO_4 ile durduruldu ve renk yoğunluğu fotometrede (450 nm) okundu. Saf konjugatın bulunduğu fraksiyonlar biraraya getirildi ve 50 µl'lik porsiyonlara ayrılarak -20 ºC de saklandı.

Mikrotitrasyon Plaklarının IgG ile Kaplanması

Önceki çalışmamızda (25) ürettiğimiz ve affinite kolonundan geçirilerek saflaştırılan anti-tavşan IgG-keçi IgG plakları kaplamada kullanıldı. 100 µg anti-tavşan IgG-keçi IgG 10 ml karbonat tamponu (50 mM $NaHCO_3$, pH 9,6) ile sulandırıldı ve mikrotitrasyon plağının her deliğine 100 µl pipetlendi (1 µg/delik), daha sonra plak +4 ºC'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu plak içeriği boşaltıldı ve özgül olmayan bağlanmayı azaltmak için plağa 300 µl/delik, deney tamponu (40 mM Na_2HPO_4, 0,14 M NaCl 0,2g, %0,1 BSA, pH 7,2) konuldu ve plak 60 dakika oda ısısında inkübe edildi. İkinci inkübasyondan sonra plak 4 kere yıkama solusyonu ile yıkandı, kurutuldu ve test yapılana kadar -20 ºC'de saklandı.

Testosteron-HRP Konjugatı ve Antikorun Uygun Titresinin Tespiti

Anti-tavşan IgG-keçi IgG ile kaplı plaklara yukardan aşağıya bir sıra 10 µl PBS tampon, bir sıra testosteron standartından (1 ng/1 ml PBS) 10 µl pipetlendi. Konjugatın, 1:1000 ile 1:32000 arasındaki dilusyonlarından yukardan aşağıya, testosteron antiserumunun ise 1:1000 ile 1:128000 arasındaki dilusyonlarından soldan sağa olmak üzere plağa 100'er µl pipetlendi. Plak 37 ºC'de 2 saat ve +4 ºC'de 18 saat inkube edildi, inkübasyon sonrası plak 4 kez yıkama solusyonu (%0,05 Tween 80) ile yıkandı ve her deliğe 150 µl substrat ilave edildi, plak 40 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra substrat reaksiyonu 50 µl 4N H_2SO_4 ile durduruldu. Plakta oluşan renk yoğunluğu fotometrede (450 nm) okundu.

Testosteron Standartlarının Hazırlanması

Testosteron standartının hazırlanacağı steroid ihtiva etmeyen plazmayı elde etmek için, 10 ml plazma 0,5 mg aktif kömür ile oda ısısında 30 dk karıştırıldı ve karışım 12000 g'de 60 dk santrifüje edildi. Santrifüj sonunda steroid ihtiva etmeyen plazma kısmı ayrılarak standart hazırlanmasında kullanıldı.

Standartlar 10 mg/10 ml ethanol içindeki stok testosteron solusyonundan, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 ng/ml olacak şekilde alınarak hazırlandı. Stok solusyondan uygun miktarlar alınarak tüpe kondu, ethanol vakumlu fırında 55 ºC'de evapore edildi ve her bir standarta steroid ihtiva etmeyen plazma konarak standartlar hazırlandı ve standartlar test yapılana kadar -20 ºC'de saklandı.

Testin Yapılışı

Anti-tavşan IgG-keçi IgG kaplı plak, testosteron standartları, testosteron-HRP konjugatı, testosteron antiserumu oda ısısına gelinceye kadar beklendi. Standartlar 10 µl/delik, konjugat 100 µl/delik, antikor 100 µl/delik olarak plağa pipetlendi. Plak 37 ºC'de 2 saat ve +4 ºC'de 18 saat inkube edildi, inkübasyon sonrası plak 4 kez yıkama solusyonu ile yıkandı ve her deliğe 150 µl substrat ilave edildi, plak 40 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra substrat reaksiyonu 50 µl 4N H_2SO_4 ile durduruldu. Renk yoğunluğu fotometrede (450 nm) (Tecan, Spectra III) okundu.

Kantitatif Verim

Testin doğruluğu kantitatif verim (recovery) deneyi ve bir plazma numunesinin çeşitli deney serilerinde analizi yapılarak araştırıldı. Kantitatif verim için herhangi bir plazma numunesine 0,5-15,0 ng/ml arasındaki testosteron standartları ilave edildi. Plazmalar 30 dakika 37 ºC'de inkübe edildikten sonra enzimimmunassay

metodu ile analiz edildi. Numunelere eklenen testosteron miktarı ile test sonunda ölçülen miktar karşılaştırılarak kantitatif verim yüzdesi hesaplandı ve regresyon analizi yapıldı. Testin doğruluğunu ölçmek için bir plazma numunesi farklı günlerde yapılan EIA testlerinde analiz edildi ve deneyler arası varyasyon katsayısı yüzde olarak hesaplandı.

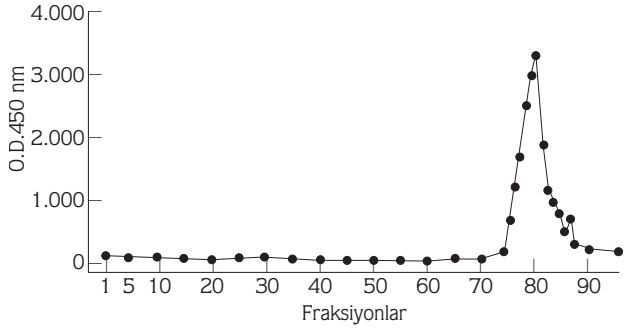
Bulgular

Testosteron HRP ile işaretlendikten sonra konjugat sephadex G-25 kolon kromatografisinden geçirildi ve toplanan fraksiyonlarda saf HRP-Testosteron konjugatının bulunduğu 79 ve 80. fraksiyonlar toplanarak testte kullanıldı (Şekil.1).

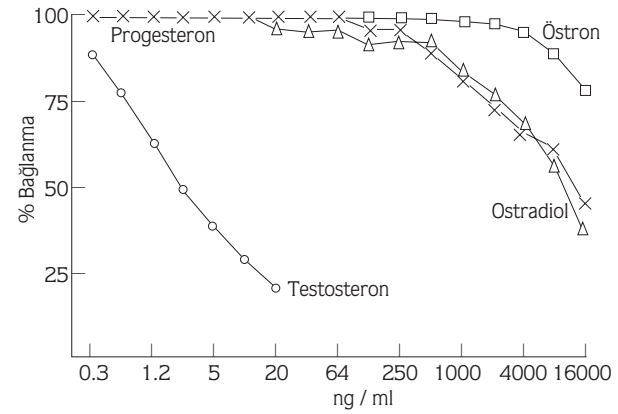
Antiserumun özgüllüğü, titre tespiti ve çapraz reaksiyon testiyle saptandı. Antiserumun ve konjugatın test için uygun titresi, optik dansitenin 1.000 'e en yakın olduğu ve '0' ile '10' pg standart arasında en yüksek farkın bulunduğu titreler tespit edilerek bulundu. HRP-testosteron konjugatının 1: 4000, antiserumun 1:16000 dilusyonunun EIA için uygun olduğu bulundu ve testte kullanıldı. Testosteron antiserumu'nun çapraz reaksiyon oranı östradiol ile %0,016, progesteron ile %0,012, östron ile %0,001 olarak bulunmuş olup çapraz reaksiyonlar Şekil 2'de gösterilmiştir.

Testosteron standartlarının (0,5-15,0 ng/ml arasındaki) plazmaya eklenmesi sonucu elde edilen testosteron düzeyleri dikey eksene işaretlendi ve elde edilen eğrinin regresyon fonksiyonu y = - 0,32'e (-01 + 1,162x), regresyon katsayısı r^2= 98,8 olarak bulundu (Şekil 3).

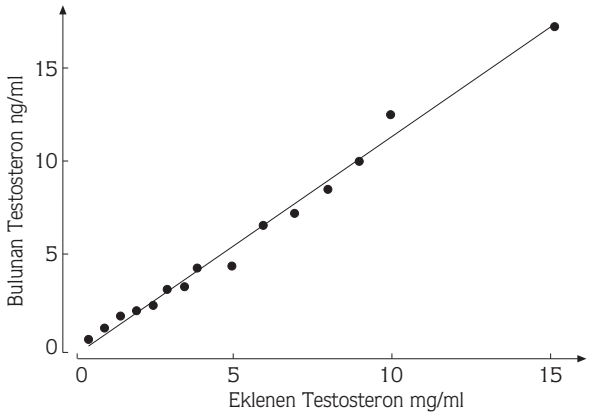
Steroid ihtiva etmeyen plazmada hazırlanan testosteron standartları, bu çalışmada üretilen antiserum ve HRP-Testosteron konjugatı kullanılarak EIA ile analiz edildi, test sonucu bulunan standart eğri Şekil 4'de gösterilmiştir. EIA metodunun hassasiyeti, standart



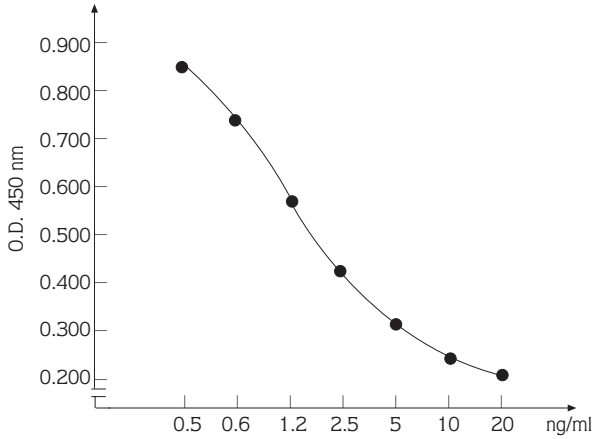
Şekil 1. Testosteron – HRP konjugatının kolon kromatografisinden saflaştırılması.
(kolon ebadı: 1,5 x 85 cm, kolon dolgu maddesi: sephadex G-25, akış hızı: 0,5 ml/dk)



Şekil 2. Testosteron antiserumunun çapraz reaksiyonları.



Şekil 3. Kantitatif verim testinin regresyonu.
y = - 0.32 e (-01 + 1.162x), r2= 98.8



Şekil 4. Testosteron standart eğrisi.

eğride '0' dan sonra tayin edilebilen en düşük miktar olan 0,25 ng/ml (25 pg/delik) olarak bulundu. Herhangi bir plazma numunesi 8 ayrı günde yapılan EIA testi ile analiz edildi (6,24±0,7 ng/ml, n= 8) ve deneyler arası varyasyon katsayısı % 12,6 olarak bulundu.

Tartışma

Çalışmada antikor üretmek için Testosterone 17β-Hemisuccinate: Bovine Serum Albumin, ve Testosterone 3-(O-Carboxymethyl) Oxime: Bovine Serum Albumin olmak üzere iki farklı antijen kullanılmış olup sadece bir tavşanda Testosterone 3-(O-Carboxymethyl) Oxime: Bovine Serum Albumin antijenine karşı EIA testinde kullanılabilecek kalitede antikor üremiştir. Diğer tavşanların bazıları bu antijenlere cevap vermesine rağmen elde edilen antiserumlar immun testlerde kullanılacak özelliğe sahip değillerdi. Hormonlar için immun testlerde 10^{-12} düzeyinde analiz yapıldığından kullanılacak antiserumun yüksek affiniteye ve özgüllüğe sahip olması gerekmektedir (13). Düşük affiniteli antiserumlar immun testlerde hormon düzeylerinin tespitinde yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmadaki EIA testinde kullanılan antiserum 2,5 pg/delik (0,25 ng/ml) gibi düşük testosteron düzeyini "0" değerinden ayırırken, çalışmada üretilen diğer antiserumda bu miktar 200 pg/delik (20 ng/ml) gibi yüksek bir düzeydeydi. Testosteron için EIA tekniklerinin geliştirildiği çeşitli araştırmalarda testin hassasiyeti 0,5 pg/delik (18), 5 pg/delik (19), 1 pg/delik (20,21), olarak tespit edilmiş olup çalışmamızda bu değer 2,5 pg/ml olarak bulunmuştur. Bu da testin, fizyolojik değerleri ayırt edebilecek bir hassasiyete sahip olduğunu göstermektedir. Kantitatif verim testinde regresyonun % 98,8 deneyler arası varyasyonun % 12,6 oranında olması ve kullanılan antiserumun bazı steroidlerle düşük oranda çapraz reaksiyon vermesi testin testosteron analizinde güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

Hormon testlerinin kullanılabilirliği, kolay ve ucuz olmasına görede değerlendirilir (2,8). Radioimmunassay (RIA) güvenilir bir test olmakla birlikte radyasyon tehlikesi ve kullanılan aletlerin çok pahalı olması nedeniyle RIA ile çalışmak sınırlı sayıdaki araştırma merkezlerinde mümkün olmaktadır. Bu çalışmada sunulan testosteron için EIA metodu RIA'nın problemlerini gidermekle birlikte pratiklik, güvenirlik gibi kriterlere de sahiptir.

Hayvancılık alanında yapılacak araştırmalar, analiz edilecek numune sayısının fazla olması ve kitlerin ithal edilmesi nedeniyle pahalıya mal olmakta veya yapılamamaktadır. Bunun yanında ülkemizde hayvancılık alanındaki bazı çalışmalarda beşeri kitler kullanıldığından sonuçların güvenirliği tartışmalı durumdadır. İthal edilen 96 örneklik bir EIA kitinin maliyeti yaklaşık 500 USA doları iken bu çalışmada geliştirilen 96 örneklik EIA testinin maliyeti yaklaşık 4 USA dolarıdır. Aradaki fark karşılaştırıldığında bu testlerin ülkemizde üretilmesinin önemi daha belirgin olmaktadır. Bu çalışmada kullanılan antikor üretimi, hormonların enzimle işaretlenmesi ve saflaştırılması, üretilen antikor ve konjugatın karakterizasyonu gibi yöntemlerin tüm steroid hormonlar için aynı olduğu göz önüne alındığında özellikle hayvancılık alanında çalışan araştırıcıların kendi test sistemlerini kurması hem ekonomik hem de daha çok sayıda kaliteli araştırma yapması bakımından büyük önem göstermektedir.

Kaynaklar

1. Edqvist, L.E., Haggström, A., Kindhal, H., Stabenfeldt, G.H.: Radioisotopic Techniques for the Study of Reproductive Physiology in Domestic Animals. 1976; IAEA-SM-205/3: 513-524.
2. Karg, H., Claus, R., Hoffmann, B., Schallenberger, E., Schams, D.: Present Status and Future Possibilities of Radioimmunoassay in Animal Production. 1976; IAEA-SM-205/3: 487-511.
3. Edqvist, L.E., Stabenfeldt, G.H.: Clinical Reproductive Endocrinology. In Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Fourth Edition. Academic Press, Inc. 1989; 650-677.
4. Sutama, I.K., Edey, T.N.: Postpubertal Sexual Development in Merino Rams after Differential Feeding through Puberty. Theriogenology. 1986; 25 (4): 601-607.
5. Dufour, J.J., Fahmy, M.H., Minvielle, F.: Seasonal Changes in Breeding Activity, Testicular Size, Testosterone Concentration and Seminal Characteristics in Rams with Long or Short Breeding Season. J. Anim. Sci. 1984; 58 (2): 416-422.
6. Özsar, S., Güven, B., Çelebi, M., Kalkandelen, G., Van de Wiel D.F.M.: Testosterone and LH Concentrations in the Male Angora Goat during Puberty. Anim. Reprod. Sci. 1990; 23: 319-326.
7. Muduuli, D.S., Sanford, L.M., Palmer, W.M., Howland, B.E.: Secretory Patterns and Circadian and Seasonal Changes in Luteinizing Hormone, Follicle Stimulating Hormone Prolactin and Testosterone in the Male Pygmy Goat. J. Anim. Sci. 1979; 49 (2): 543-552.

8. Van de Wiel, D.F.M., Koops, W., Vos, E.: Enzyme and Radioimmunoassay Techniques for Hormone Determination in Livestock. Proceedings of a Symp. Nuclear and Related Techniques in Animal Production and Health, Vienna IAEA.1986; 17-21 March, 243-253.

9. Pratt, J.J.: Steroid Immunoassay in Clinical Chemistry. Clin. Chem.1978; 24 (11):1-22.

10. Meyer, H.H.D.: Possible Ways of Techniques and their Application in Animal Production. Procedings of a symp., Nuclear and Related Techniques in Animal Production and Health, IAEA, Vienna. 1986; 17-21 March, 255-262.

11. Tijssen, P.: Practice and Theory of Enzymeimmunoassay. Elsevier, Amsterdam. 1985; 15.

12. Pratt, J.J., Wiegman, T., Lappöhn, R.E., Woldring, M.G.: Estimation of Plasma Testosterone without Extraction and Chromatography. Clinica Chimica Acta. 1975; 59: 337-346.

13. Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction. International Atomic Energy Agency., Vienna., 1984.

14. Venturelli, E., Cavalleri, A., Secreto, G.: Methods for Urinary Testosterone Analysis. J. Chromatogr. B. Biomed Appl. 1995; 15: 363-380.

15. Legrand, C., Dousset, B., Tronel, H., Belleville, F., Nabet, P.: Measurement of Plasma Testosterone by Gas Chromatography-negative-ion Mass Spectrometry Using Pentafluoropropionic Derivatives. J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 1995; 663/2: 187-192.

16. Tschop, M., Behre, HM., Nieschlag, E., Dressendorfer, R.A., Strasburger, CJ.: A Time-Resolved Fluorescence Immunoassay for the Measurement of Testosterone in Saliva: Monitoring of Testosterone Replacement Therapy with Testosterone Buciclate. Clin. Chem. Lab. Med. 1998; 36 (4): 223-230.

17. Erkoç, F.Ü., Özsar, S., Güven, B., Kalkandelen, G., Uğrar, E.: High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Steroid Hormones. J. Chromatogr. Sci. 1989; 27: 86-90.

18. Sengupta, J., Dhar, T.K., Ali, E.: Sandwich Immunoassay of Small Molecules, Effects of Heterology and Development of a Highly Sensitive and Specific Enzyme Immunoassay for Testosterone, J. Immunol. Meth. 1992; 147: 181-188.

19. Elder, P.A., Lewis, J.G.: An Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Plasma Testosterone. J. Steroid Biochem. 1985; 22: 635-638.

20. Marcus, G.J., Durnford, R.: A Simple Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Testosterone. Steroid. 1985; 46: 975-986.

21. Tarun, K.D., Esahak, A.: Direct Microtitre Plate Enzyme Imunnoassay of Testosterone in Unextracted Serum. J. Immunol.l Meth. 1992; 147: 167-172.

22. Esahak, A., Judhajit, S., Tarun, K.D.: Sandwich Immunoassay of Small Molecules. I. Investigation with Testosterone as Model Hapten. J. Immunol. Meth. 1992; 147: 173-179.

23. Meyer, H.H.D., Güven, B.: Improvement of Microtitration Plate Enzymeimmunoassay for Steroid Determination by a Second Antibody Technique. J. Steroid Biochem. 1986; 25: Suppl. 139.

24. Meyer, H.H.D., Güven B., Karg, H.: Enzymimmuntests (EIA) auf Mikrotitrationsplatten zur progesteronbestimmung in Magermilchproben. Wien. Tierarztl. Monatsschr. 1986; 73: 86-94.

25. Güven, B., Özsar, S., Şaban, E., Çelebi, M., Meyer, H.H.D.: Plasma FSH and LH concentrations during the estrus cycle of prolific Sakız sheep. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 1996; 2 (2): 185-192.