

Doğum ve Jinekoloji Kürsüsü
Prof. Dr. M. Zeki Doğaneli
Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü
Prof. Dr. Osman Hassa

KOYUNLARDA GEBELİĞİN ÇEŞİTLİ EVRELERİNDE VAGİNAL SMEAR VE VAGİNAL BİYOPSİ YÖNTEMLERİYLE ÇALIŞMALAR

Mehmet Zeki Doğaneli*

Atila Tanyolaç**

Erol Alaçam***

**Studies by vaginal smears and biopsy techniques during the
different stages of pregnancy in the ewe**

Summary: *Histological changes in the vagina due to the different stages of pregnancy and anestrus were studied. Their usefulness for the diagnosis of pregnancy was assessed. Vaginal smears were collected and vaginal biopsies were done from 82 ewes. Methods of sampling and vaginal biopsies processing are given. The diagnosis of pregnancy by means of vaginal biopsies are found high in numbers. The changes observed by smears during the first month of pregnancy are clear but it is not differentiated from the anestrus during the following months.*

Zusammenfassung: *In der vorliegenden Arbeit wurden zytologische und histologische Veränderungen am Scheidenepithel von 82 Schafen während der verschiedenen Stufen der Trächtigkeit und dem Ruhestadium untersucht.*

Während der Trächtigkeit erhielten wir durch Stückentnahme bessere Ergebnisse als durch zytologische Abstrichuntersuchungen.

Die zytologische Abstrichuntersuchung ermöglicht eine eindeutige Trächtigkeitsdiagnose während des ersten Monats. Im Verlauf der folgenden Monate ist das Zellbild vom Ruhestadium fast nicht zu unterscheiden.

*Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kürsüsü

**Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü

***Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kürsüsü

Özet: *Bu çalışmada, koyunlarda gebeliğin çeşitli evrelerinde ve anöstrüste, vagina epitelinde şekillenen değişimler vaginal smear ve biyopsi yöntemleriyle incelendi. Örnekler 82 adet koyundan alındı. Vaginal biyopsi ile, gebeliğin ikinci ayından başlanarak yüksek oranda doğru bir gebelik tanısı yapılabildi. Vaginal smearlerde ise birinci aydaki bulgularla gebelik tanısı yapılabilmekle beraber, daha ileri dönemlerde tablonun anöstrüsten ayırt edilmesi güçleşmektedir.*

Giriş

Vaginanın hücresel yapısı ve siklik evrelere bağlı olarak bu yapıda şekillenen değişimleri üzerinde çeşitli araştırmacılara değişik çalışmalar yapılmıştır.

İlk kez Cole ve Miller (3) koyunların vagina epitelinde, gebeliğe ve östral siklusun anöstrüs ve östrüs evrelerine bağlı olarak bazı histolojik değişimler oluştuğunu bildirmişlerdir. Daha sonra Radev et al. (9), koyunlarda vaginal biyopsiyi gebelik tanısı yöntemi olarak geliştirmişlerdir.

Richardson (11), 491 adet koyunda biyopsi ile gebeliğin 40. gününden sonra % 97 oranında doğru gebelik tanısı yapılabileceğini bildirmektedir. Araştırmacı, gebe olmayan koyunların ise % 81 oranında bir doğrulukla tanınabildiğini eklemektedir. Aynı araştırmacı (10) 45 koyun üzerinde yaptığı bir diğer çalışmada, gebe hayvanlarda gebeliğin 40. gününden sonra % 91-100 oranında doğrulukla bir tanı yapılabildiğini, yöntemin doğruluk oranının da % 84 olarak saptandığını ileri sürmektedir.

Mitchell (7) 554 koyundan aldığı 863 vaginal biyopsi örneğini inceliyerek, aşımı izlenen ve kayıtları sağlam olan koyunlarda, gebeliğin 40. gününden sonra % 93,1 oranında doğru tanı yapılabileceğini bildirmektedir.

Ghannam ve Bosc (5) 108 koyunda östrüs siklusu, gebelik, anöstrüs ve laktasyon sırasında vaginal smear ve biyopsiler hazırlayarak yaptıkları çalışmalar sonunda, her iki yöntemle de östral siklusun değişik evrelerinin saptanmasının mümkün olduğunu söylemekle birlikte, gebelik ile östral siklusun anöstrüs evrelerinde ve laktasyon sırasında şekillenen vaginal değişimlerin birbirinden ayırt edilmesinin güç olduğunu eklemektedirler. Grant (6) ise koyunlarda anöstrüs ve gebelik sırasında vagina mukozasının histolojik yapısının aynı oldu-

ğunu ileri sürmektedir. Akkayan (1) incklerde yaptığı çalışmada vaginal sitoloji ile gebeliğin saptanmasının mümkün olmadığını bildirmektedir.

Vaginal biyopsi ile elde edilen sonuçlar literatürde şöyle toplanabilir: Gebe olmayan koyunlarda, vaginanın epitel katları sayıca fazladır. Arthur (2) anöstrüsteki koyunlarda 12 adet hücre katı bulunduğunu bildirmektedir. Yüzlek hücreler yassılaştırmış olup çekirdekleri koyu renklidir. Daha derindeki hücreler ise poligonaldirler ve çekirdekleri açık renkli ve yuvarlaktır. Östrüs evresinde keratinizasyon görülür, yer yer az sayıda lökositlere raslanabilir. Gebelikte, ilk aydan başlayarak doğuma 20 gün kalıncaya kadar vaginanın epitel katı 3-6 sıra hücreden oluşur. Yüzlek hücreler küboidal ve prizmatik olup, sitoplazmaları ve çekirdekleri açık renkli boyanır. Daha derin epitel-ler ise alçak prizmatik yapıdadırlar. Gebeliğin son 20 gününde kübik hücreler, gebe olmayan hayvanlara benzer bir şekilde yassı hücrelerle yer değiştirirler (10, 12).

Vaginal smearlerde ise, gebeliğin 15-18. günlerinde birçok değişik hücre izlenebilir. Bunlar küçük epitel hücreleri, büyük yassı hücreler ve az miktarda keratinize ve kısmi keratinize hücrelerdir. Gebeliğin bu döneminde yapılan smear bulguları östrüs siklusu sırasında izlenenlerle çok yakın benzerlik gösterirler. Gebeliğin 22-83. günlerinde yapılan smearlerde gayet belirgin boyanmış çekirdekleri içeren küçük epitel hücreleri izlenebilir. Siklusun 11-13. günlerinde yapılan smearlerde ise küre biçiminde ya da şekilsiz küçük epitel hücreleri ve birkaç lökosit farkedilebilir. Siklusun 14. gününden son gününe kadar ise bol sayıda lökosit, küçük epitel hücreleri ve SME hücrelerine (swollen mucified epithelial cells) raslanır. Siklusun bu evresinde lökositler predominant hücrelerdir (11, 12).

Vaginal biyopside olumlu bulgulardaki yanılgılar, erken embriyonal veya fetal ölümlere, kalıcı corpus luteum'lara bağlı olarak ya da henüz pubertasa ulaşmamış koyunlarda (kuzularda) ortaya çıkabilir. Gebe koyunlardaki yanıtıcı reaksiyonlar ise özellikle gebeliğin ilk 50 gününde, sekonder bir folliküler aktivite sonucu artan östrojenik stimulusa bağlı olabilir (7).

Bu çalışmada, koyunlarda gebeliğin çeşitli evrelerinde, vagina epitelinde şekillenen değişimler, vaginal smear ve biyopsi yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak incelenerek, gebe olmayan koyunların hücre yapısı ile birlikte değerlendirildi.

Materyal ve Metot

Çalışmada 45 tanesi Karaman, 37 tanesi Merinos ırkından olan 2-5 yaşları arasında 82 koyun kullanıldı. Bu koyunlar doğal aşım la gebe bırakılıp, aşım tarihleri düzgün olarak saptandı. Hayvana aşım yapılan gün (0) olarak kabul edilip 1., 2., 3., 4. ve 5. aylarda vaginal smear ve biyopsi örnekleri alınarak incelendi. Materyal alınmasında koyunlar, ayakta duruş pozisyonunda tutuldular. Gebelik süreleri sonunda doğumlar saptanarak elde edilen bulgular doğrulandı.

Vaginal smearler için örnekler vestibulum vaginanın kraniyalinden, flambe edilmiş bir platin ans yardımı ile alındı. Alınan bu örnek temiz bir lam üzerine yayılarak üstüne bir damla serum fizyolojik ve hemen arkasından bir damla % 0,1 toluidine blue damlatılarak 5 dakika boyanmaya bırakıldı. Boyama sonunda lam hafifçe eğilerek boyanın fazlası akıtıldı ve üzerine bir lamcl kapatıldı. Preparatın çabuk kurumaması için de lamel kenarları vazelinlendi. Böylece preparatların laboratuvarında rahatlıkla incelenebilmesi ve fotoğraflarının çekilmesi sağlandı.

Vaginal biyopsi örnekleri ise, vaginal smear için örnek alınmasından hemen sonra, vaginanın ventralinde orificium urethrae externa'nın ön kısmından, "Dohlman-PFAO"nun broncho-oesophagoscopy biyopsi pensi kullanılarak alındı. Araç kuru ve temiz olarak ağız kapalı biçimde vaginaya sokulup, biyopsi yapılacak yere kadar itildi ve ağız açıldı. Bir miktar vagina dokusu tutulup, aletin kulpu sıkılarak ağzının kapanması ve arasına giren dokunun kesilmesi sağlandı. Hafifçe çekilmek suretiyle de bu parça dışarı alındı. Alınan parça % 10 nötral formolde tespit edildi. Parafin bloklarından elde edilen 5-6 mikronluk kesitlere trikrom, PAS boyamaları uygulandı.

Tartışma

Gebelik sırasında hormonal düzeylerin değişmesine bağlı olarak vaginanın yapısında bir takım farklılıklar görülür. Gerek vaginal biyopsi gerekse vaginal smear yöntemleriyle bu değişimleri izleyerek, bazı hayvan türlerinde gebeliğin saptanması mümkün olabilmektedir.

Mitchell (7), Radev et al. (9), Richardson (10, 11). koyunlarda gebeliğin 40. gününden, Done ve Heard (4), Morton ve Rankin (8) ise domuzlarda 3-4. haftasından başlayarak vaginal sitoloji yardımı ile gebeliğin yüksek bir doğrulukla bilinebileceğini ileri sürmektedir.

ler. Buna karşılık Akkayan (1) yaptığı çalışma sonucunda vaginal biyopsi yöntemi ile gebeliğin ineklerde sağlıklı bir biçimde saptanmadığını bildirmektedir.

Ghannam ve Bosc (5) ve Grant (6) koyunlarda gebelik ve anöstrüs sırasında vaginanın histolojik yapısının birbirine çok benzediğini ve birbirinden ayırt etmenin çok güç olduğunu bildirmekte iseler de, Cole ve Miller (3) vaginanın hücrel yapısına bakılarak bu hayvanlarda gebeliğin anöstrüsten kolaylıkla ayırt edilebileceğini iddia etmektedirler.

Biz de bulgularımız sonucunda bu yöntemlerle gebelik tanısının koyunlar için geçerli olabileceği kanısına vardık.

Richardson (10), gebeliğin ilk 20 gününde vaginanın histolojik yapısının diöstrüse benzerlik gösterdiğini, bu dönemden sonra poligonal ve skuamöz hücrelerin sayısında hemen bir azalma görüldüğünü, epitel katta birden fazla hücre tipine raslanırken esas olarak tek tip hücreye dönüşüm olduğunu bildirmektedir. Gebeliğin 20. gününden sonra predominant hücrelerin küresel çekirdekli küçük küboidal hücrelerden oluştuğunu ve genel görünümün birörneklik gösterdiğini ileri süren araştırmacı, gebeliğin 80. gününde poligonal ve skuamöz hücrelerin tamamen kaybolduğunu ve yerlerini küboidal hücrelerin aldığını eklemektedir. Araştırmacıya göre epitel kat anöstrüste çok katlı iken gebelik sırasında incelenerek 3-4 kat hücreye azalmaktadır. Buna karşılık Scröder'in (12) Stieve'den aktardığına göre, gebelik sırasında vagina epitelyumu göze çarpan bir biçimde kalınlaşma göstermektedir. Bu kalınlaşmada, epitel katın ortalarında 50-60 mikronluk hücrelerin de payı bulunmaktadır. Bizim bulgularımızda gebe olmayan anöstrüdeki koyunlarda tipik nonkeratinize, çok katlı yassı epitel sahaya hakim iken, genellikle gebelik sırasında epitel kat incelmekte ve hatta gebeliğin son dönemlerine doğru en ince tabloyu göstermektedir. Daha gebeliğin ilk aylarında epitel katın kalınlığında bir azalma görülmekle birlikte, asıl değişiklik epitel hücrelerinin şeklinde ortaya çıkmaktadır. Yüzeydeki yassı hücrelerin yerini küboidal hücreler alırken, ikinci ayda bunların yanında prizmatik olanlarla da karşılaşıldı. Üçüncü aya doğru prizmatik hücreler gittikçe artarken aralarında çok sayıda lökositler, özellikle de lenfositler dikkati çekti. Üçüncü aydan sonra yüzlek hücrelerin prizmatik görünümünün küboidale ve son dönemlere doğru da, arada yassı hücreleri de içeren bir tabloya dönüştüğü saptandı.

Vaginal smearlerde ise araştırmacılar (11, 12), gebeliğin ilk döneminde küçük epitel hücreleri, büyük yassı hücreler ve az miktarda keratinize ve kısmi keratinize hücreler içerdiklerini, 1-3. aylarda çekirdekleri iyi boyanmış küçük epitel hücrelerinin karakteristik olduğunu bildirmektedirler. Bizim vaginal smear bulgularımıza göre, gebe olmayan koyunlarda nonkeratinize yassı epitel hücreleri tabloya hakim idi. Gebeliğin ilk aylarında küboidal ya da küçük epitel hücreleri, ikinci aydan sonra iri ya da şişmiş epitel hücreleri (SME) ve yer yer lökositler (özellikle lenfositler), 3. aydan sonra da iri hücrelerin yanısıra küboidal hücrelerle de karşılaşıldı.

Vaginal biyopsi çalışmalarını sırasında rasladığımız önemli bir bulgu da lamina epithelialis'in en yüzlek katındaki hücrelerde glikojenin saptanması idi. Bu durum, gebe olmayan, anöstrüsteki koyunlarda görülmez iken, gebeliğin ilk aylarında hafif bir reaksiyon, son dönemlerinde ise belirgin bir reaksiyonla (PAS +) izlendi. Ancak, az sayıdaki bazı olgularda gebelik durumuna karşın PAS (-) bir sonuç a da karşılaşıldı. Literatürde (12) vagina epitelinde değişik miktarda glikojen bulunduğu, fötusda ve yeni doğanlarda bu miktarın daha fazla olduğu bildirilmektedir. Literatürde, siklusa bağlı bir glikojen varlığına değinen çalışmaya raslayamadık.

Mitchell (7) yaptığı ön çalışmalar sırasında uretranın vaginaya açıldığı deliğin hemen anteriyöründen aldığı biyopsi örnekleri sonucunda 2 koyunda peritonitise bağlı olarak ölüm şekillendiğini bildirmektedir. Bizim çalışmalarımızda aynı bölgeden birer aylık aralarla birkaç kez örnek alındığı halde hiçbir istenmeyen durumla karşılaşılmadı.

Alınan biyopsi örneklerinin işlenmesi sırasında, lamina epithelialis'ten verev kesit alınırsa epitel kat çok fazla katlılık gösterebilir. Bu durumda, tipik sagittal kesitler dikkate alınarak yanılığa düşme önlenir.

Sonuç olarak, *vaginal biyopside*: epitel katın incelenmesi ve hücrelerdeki morfolojik değişimlerin izlenmesi ile gebeliğin, ikinci aydan başlanarak yüksek bir doğrulukla saptanması mümkün olabilmektedir. *Vaginal smearlerde ise*: birinci aydaki bulgularla gebelik tanısı yapılabilmekle birlikte, daha ileri dönemlerde tablonun anöstrüsten ayırt edilmesi güçleşmektedir.

Literatür

- 1- **Akkayan, C.** (1970): *Gebe ineklerin vaginal sitolojisi üzerinde incelemeler.* A.Ü. Vet. Fak. Derg., XVII, 4, 403-418.
- 2- **Arthur, G. H.** (1975): *Veterinary Reproduction and Obstetrics.* 4 th Ed., Bailliere-Tindall, London, 616.
- 3- **Cole, H. H., R. F. Miller** (1935): *Changes in the reproductive organs of the ewe with some data bearing on their control.* Am. J. Anat. 57,39-97.
- 4- **Done, D. T., T. K. Heard** (1968): *Early pregnancy diagnosis in the sow by vaginal biopsy.* Vet. Rec., 82, 64.
- 5- **Ghannam, S. A. M., M. J. Bosc** (1972): *Examination of vaginal epithelium of the sheep and its use in pregnancy diagnosis.* Am. J. Vet. Res., 33, 6, 1175.
- 6- **Grant, N.** (1933): *Studies on the physiology of reproduction in the ewe* Rrans Roy. Soc., Edinburg. 58, 16.
- 7- **Mitchell, D.** (1972): *Vaginal biopsy as a method for diagnosing pregnancy in the ewe.* Vet. Rec., 91, 7, 161.
- 8- **Morton, D. B., J. E. F. Rankin** (1969): *The histology of the vaginal epithelium of the sow in oestrus and its use in pregnancy diagnosis.* Vet. Rec., 84, 658.
- 9- **Radev, G., A. Thodorov, D. Danov** (1961): *Methodo histovaginale pour constater la grossesse chez lez brebis.* Proc. IV th Int. Cong. Anim. Reprod., The Hauge, 4, 883.
- 10- **Richardson, C.** (1972): *Diagnosis of pregnancy in the ewe by vaginal biopsy.* Br. Vet. J., 128, 6, 316.
- 11- **Richardson, C.** (1972): *Pregnancy diagnosis in the ewe: A review.* Vet. Rec., 90, 264.
- 12- **Schröder, N.** (1930): *Weibliche Genitalorgane.* In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.* Herausgeg. von W. v. Möllendorff. Bd. VII, Teil 1, Berlin: Springer, 516.