

östrus, metöstrus ve anöstrus evreleri için klinik tanı yöntemleriyle beraber değerlendirilmiştir.

Köpeklerde kızgınlık süresinin içinde yer alan proöstrus ve östrus evrelerinde hazırlanan preparatlarda, çoğunluk intermedier ve süper-fisial hücre tipleri ile hücre sayılarında artış gözlenmiştir. Bu süre içinde izlenen eritrositler proöstrus evresi, keratinize epitel hücreleri de östrus evresi için tipik belirtiler olmuştur. Metöstrus evresinde intermedier ve parabasal, anöstrus evresinde ise parabasal ve basal tipli hücreler saptanmıştır.

Vaginal sitolojik bulguların değerlendirilmesiyle, köpeklerde kızgınlık ve kızgınlık siklusu evrelerinin tanısının yapılabileceği ortaya konmuştur.

Giriş

Klinik bakıda köpeklerin kızgınlık siklusu (seksüel siklus) dört evrede, proöstrus, östrus, metöstrus ve anöstrus olarak incelenmektedir. Bunlardan ilk ikisi kızgınlık olarak ta tanımlanabilmekte ve bu süre içinde inaktif olan dölerme organlarının yeni siklusa hazırlanması, folliküllerin oluşumu, ovulasyon, ve fekdasyon gibi olaylar oluşmaktadır. Kızgınlık siklusu ve evrelerinin, özellikle östrus'un klinik belirtiler yanında diğer kimi metodlarla saptanması, ovulasyon anı, en uygun tohumlama zamanı ve tedavi yönüyle çok önemlidir.

Köpeklerde vagina epitelı çok katlı yassı epitel hücrelerden oluşmuştur. Seksüel siklusun çeşitli evrelerinde etkin olan gonadal hormonlar, özellikle östrojen hormonu, bu hücrelerde oldukça belirgin değişimlere yol açar (7). Vagina epitel hücrelerinde oluşan bu değişikliklerin tanısı, vaginadan yapılan sürtme preparatlar yardımıyla yapılabilmekte ve seksüel siklusun hangi evresi olduğu söylenebilmektedir (2, 9, 12, 13, 14).

Köpeklerde vaginanın hücresel yapısı ve seksüel siklusun evrelerine bağlı olarak gösterdiği yapısal değişiklikler, çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bell ve ark. (1) 1972 yılında yaptıkları çalışmada 11 Beagle ırkı köpekte, Wachtel'ın (16) insanlarda kullanılan vaginal smear yöntemini kullanarak köpeklerin vaginal epitel hücrelerinde görülen hücre tiplerini sınıflandırmışlardır. Rick ve Kratzheller (12) ve Kratzheller (11) vaginadan yaptıkları smearlerde epitel hücreleri tiplerine göre ovulasyon anının belirlenebileceğini

göstermişlerdir. Dore (5), metöstrus ve anöstrus evrelerinde vaginal sitolojik değişimleri incelemiş ve parabasal hücre sayısını metöstrusta % 26.6 \pm 10.5, anöstrusta ise % 48.5 \pm 81.0 bulmuştur. Araştırmacı, anöstrusta sitoplazmasız çekirdeklerin gözlemlendiğini de bildirmektedir.

Benzer tekniklerle çalışan bazı araştırmacılar (1, 4, 8, 10, 13, 14, 15) vaginadan yaptıkları sürme preparatların değerlendirilmesi sonucunda aşağıdaki ortak bulgulara rastladıklarını bildirmektedirler.

Proöstrus; çok sayıda intermedier ve süperfisial hücreler ve bunların henüz keratinize olmamış şekilleri yanı sıra, bol miktarda, kanamadan ileri gelen eritrositlere rastlanmıştır. Az sayıda da parabasal ve çekirdeksiz hücreler bulunmuştur. Proöstrus'ta hazırlanan preparat zeminleri oldukça kirli olarak gözlenmiştir (1, 4, 8).

Östrus; bu evre için bazı araştırmacılar (7, 10) geç proöstrus ve erken östrus deyimlerini kullanarak östrusa geçiş süresini tanımlamışlardır.

Erken östrus'ta süperfisial hücreler ve intermedier hücreler genel görünümü oluştururlar. Piknotik çekirdekli hücreler yanında oldukça fazla miktarda hücrede keratinizasyon gözlenmiş, eritrosit sayısı azalmıştır (1, 8, 10, 11).

Östrus'ta, çok miktarda keratinize olmuş süperfisial hücre tipi görülmüş, çekirdeksiz hücre sayısı artmıştır. Eritrosit ya çok az, ya da hiç görülmez. Östrus sonuna doğru süperfisial hücreler yanında intermedier ve parabasal hücrelere rastlanır. Eritrositler kaybolmuştur. Östrus'ta yapılan frotilerin zemini oldukça açık ve berraklaşmıştır (1, 8, 13, 14).

Metöstrus; epitel hücreleri, süperfisial, intermedier ve parabasal tiplerinde olmak üzere karışık görünüm almışlardır. Metöstrus evresinde ilk defa nötrofil granüositlere rastlanır. Nötrofil granüositler parabasal hücreler üzerinde veya etrafında yığılmış olarak gözlenir. Hazırlanan frotilerin tabanı koyu renkli ve tekrar kirli görünüm almıştır (1, 4, 8).

Anöstrus; bu evredeki bulgular köpekler arasında oldukça farklı olmakla (13) beraber, parabasal, basal ve intermedier hücreler görüntüye hakimdir. Nötrofil granüositler görülebilirler. Süperfisial hücreler kaybolmuştur. Vaginadan yapılan frotilerin tabanında mukoz akıntı ve artıkların neden olduğu kirli bir görüntü izlenir (1, 8, 13, 14, 15).

Bu çalışma, köpeklerde seksüel siklusun çeşitli evrelerinde vagina epitel hücrelerinde oluşan değişikliklerin çeşitli boyama teknikleri kullanılarak vaginal smear yöntemiyle saptanması amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma, Hava Kuvvetleri Muhabere Taburuna (Etimesgut) bağlı, köpek üretim ve eğitim merkezi (KÜVEM) yetiştirmesi 30 adet Alman Çoban ve 10 adet Sivas-Kangal ırkı dişi köpek üzerinde yürütülmüştür. Köpeklerin bakım ve beslenmeleri işletme koşullarında tutularak sağlanmış, kızgınlık sikluslarını etkileyebilecek herhangi bir girişimde bulunulmamıştır.

Köpekler çalışma başlangıcında hem dış bakı (klinik tanı), hem de kayıtlara göre değerlendirilerek anöstrus veya proöstrus evrelerinde bulunup bulunmadıkları ortaya konmuştur.

Kızgınlık siklusunun anöstrus evresinde oldukları saptanan köpeklerden haftada bir veya iki kez vaginal smear yöntemiyle örnekler alınmış ve bu örnekler klinik tanı yöntemleriyle paralel değerlendirilmiştir. Klinik belirtilerle proöstrus evresine girdiği saptanan köpeklerden ise, her gün vaginal smear örnekleri alınmış ve yine klinik belirtilerle birlikte bu uygulama östrus evresi bitimine kadar izlenmiştir. Metöstrus evresinde ise, önceleri haftada iki kez, sonraları bir kez olmak üzere vaginal sitolojik bulgular değerlendirilmiştir.

Proöstrus evresi, vulvadan ilk kanamanın görülmesi; kanamanın kesilmesi ve dişi köpeğin erkeği kabul etmeye başlama zamanı da östrusun başlangıcı olarak ele alınmıştır (8). Metöstrus evresi ise, dişi köpeğin çiftleşme isteğinin kaybolması, yani erkek köpekleri kabul etmediği gün ile köpekler arasında değişmekle birlikte, 60-105 günlük gebelik ve laktasyon süresini kapsamıştır (4).

Vaginal Smear örneklerinin alınması ve hazırlanması: Ayakta duruş pozisyonunda tutulan köpeklerden flambe edilmiş öze veya sterilize edilmiş sıvaplar yardımıyla örnekler alınmıştır. Bunun için, vagina spekulumla açılmış ve bir öze veya serum fizyolojikle nemlendirilmiş sıvap vestibulum vaginanın kranialinde craio-caudal yönde dorsal duvara hafifçe sürtülmüştür. Alınan örnekler toluidine blue ile ve Giemsa boyama teknikleriyle boyanmıştır. Toluidine blue boyası ile boyamada, örnekler lâm üzerinde bir damla serum fizyolojik

yardımıyla yayılmış, üzerine toluidine blue damlatılarak (3) lâm lâmel arasında kurutulmadan mikroskopta bakılmıştır.

Giemsa metoduyla boyamada ise, preparat kurutulduktan sonra Giemsa boyama tekniği izlenmiştir. Giemsa ile boyanmış preparatlar Eukitt* kullanılarak bir lâmelle kapatılmış, böylece uzun süre bozulmadan kalmaları sağlanmıştır.

Giemsa ile hazırlanan her evreden preparatların mikroskopta çeşitli büyütmeler kullanılarak resimleri çekilmiştir.

Bulgular

Kızgınlık siklusunun çeşitli evrelerinde değişik düzeylerde seyreden hormonların etkisiyle oluşan vagina epitel hücrelerindeki değişiklikler, vaginal smear yöntemiyle saptanmıştır.

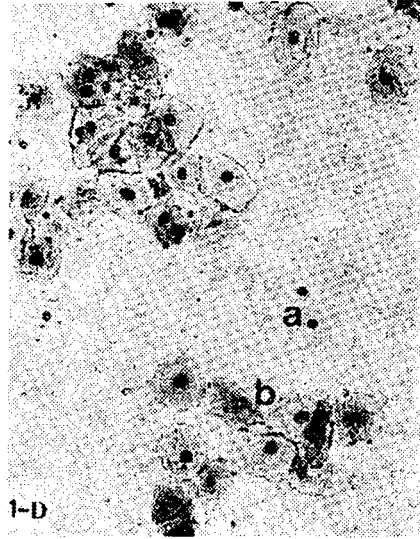
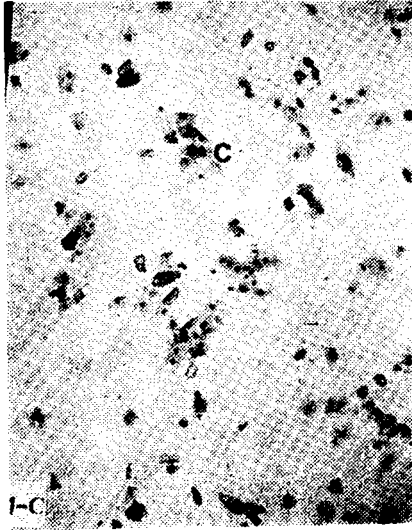
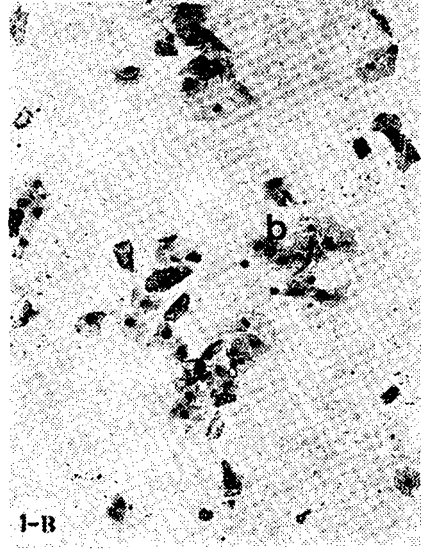
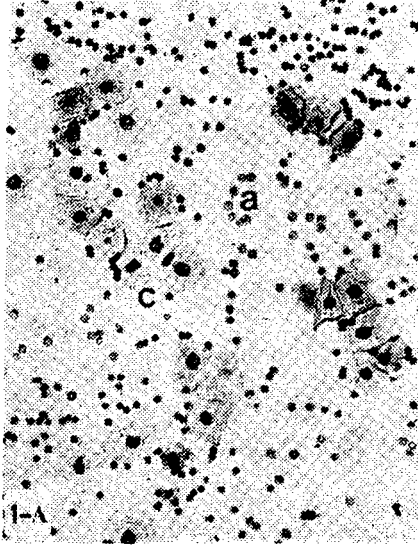
Siklusun proöstrus, östrus, metöstrus ve anöstrus evreleri süresince saptanan vaginal sitolojik değişiklikler Şekil 1, 2, 3 ve 4 de gösterilmiştir.

Şekil 1'de de izleneceği gibi, proöstrus evresinde giderek artan sayıda epitel hücresi gözlenmiştir. Bol sayıda eritrosite rastlanması, bu evrenin tipik görüntüsünü oluşturmuştur. Preparatlarda yer alan hücre tipleri, çokluk intermedier ve süperfisial olmakla beraber, başlangıçta az sayıda da parabasal olmuştur.

Östrus evresi başlangıcında az miktarda eritrosite rastlanmış, ancak evre sonuna doğru tamamen kaybolmuştur. Epitel hücreleri çok sayıda süperfisial, az sayıda intermedier tiplerinden oluşmuştur. Keratinize olmuş, poligonal şekilli süperfisial hücreler yanında, bu hücrelerin piknotik çekirdekli ve çekirdeksiz olanlarına da rastlanmıştır (Şekil 2).

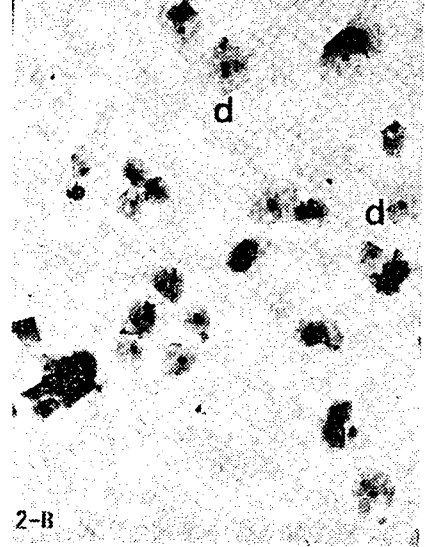
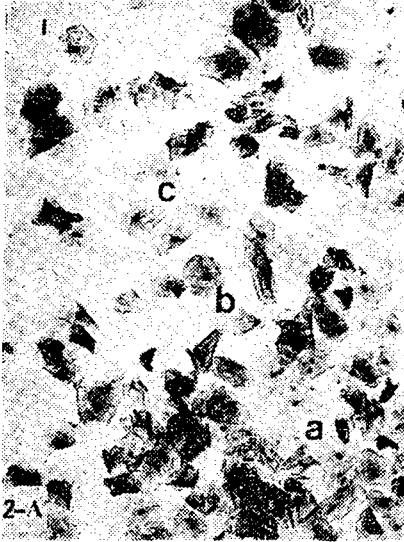
Metöstrus ve anöstrus süresince proöstrus ve östrus evrelerinde oldukça bol sayıda gözükten epitel hücreleri sayısı giderek azalmıştır. Metöstrusta, çok az sayıda süperfisial, daha çok intermedier ve parabasal hücrelere rastlanmasına karşılık; anöstrusta, parabasal ve basal hücreler görülmüş, süperfisial hücre tipine rastlanmamıştır. Metöstrus başlangıcında görülmeye başlayan lökosit sayısındaki artış anöstrusta durmuş, ancak, proöstrus'a kadar gözlenmiştir. (Şekil 3, 4).

* Eukitt Fa. O. Kindler, Stuttgart.



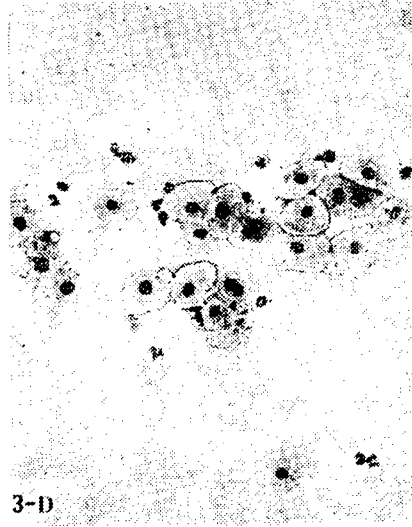
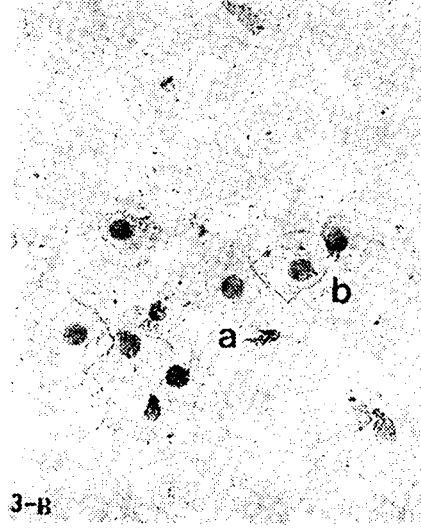
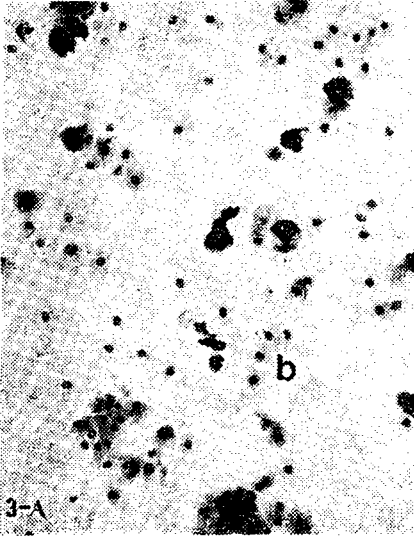
Şekil 1 Proöstrus (1-A, x 250; 1-B, x 150; 1-C, x 100; 1-D, x 250)

- | | |
|----------------------|--------------------|
| a) Eritrosit | (Erythrozyten) |
| b) İntermedier hücre | (Intermediärzelle) |
| c) Süperfisial hücre | (Superfizialzelle) |



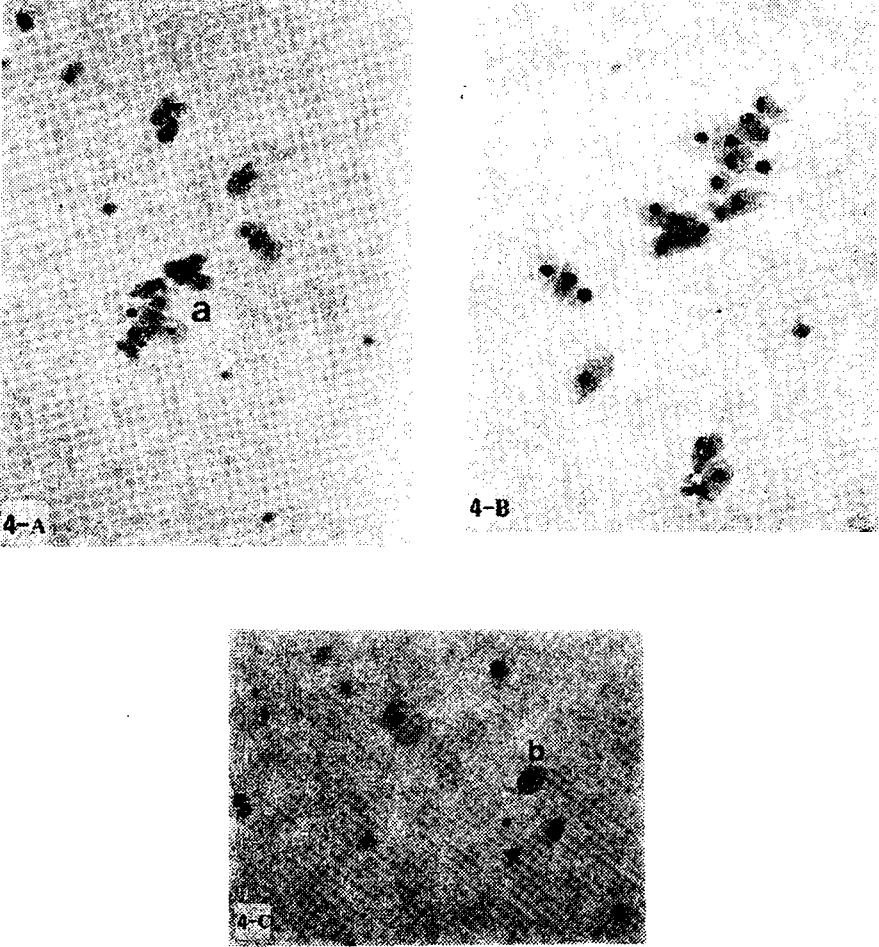
Şekil 2. Östrus (2-A, x 150; 2-B, x 150; 2-C, x 250; 2-D, x 100)

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| a) Süperfisial hücre | (Superfizialzelle) |
| b) İntermedier hücre | (Intermediärzelle) |
| c) Çekirdeksiz hücre | (Kernlose Zelle) |
| d) Piknotik çekirdekli hücre | (Zelle mit pyknotischem Kern) |



Şekil 3. Metöstrus (3-A, x 150; 3-B x 250; 3-C, x 200; 3-D, x 200)

- | | |
|----------------------|--------------------|
| a) Intermediär hücre | (Intermediärzelle) |
| b) Parabasal hücre | (Parabasalzelle) |
| c) Lökosit | (Leukozyten) |



Şekil 4. Anöstrus (4-A, x 100; 4-B, x 150; 4-C, x 200)
 a) Parabasal hücre (Parabasalzelle)
 b) Basal hücre (Basalzelle)

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada, kanamanın başlamasıyla ve diğer klinik muayenelerle saptanan proöstrus evresi başlangıcında yapılan preparatlarda, gözlenen epitel hücrelerindeki artış ve hücre tipleri, araştırmacıların (1, 4, 10, 13, 14, 15) sonuçlarıyla tam bir benzerlik göstermiştir. Ancak, proöstrusta az miktarda nötrofil granulositleride gözlediğini bildiren Günzel ve Koivisto'un (8) bulgusuna rastlanmamıştır.

Özellikle, kan hücrelerinin tanısı, araştırmacıların kullandıkları değişik boyama ve diğer farklı koşullardan ileri gelebilir.

Proöstrus evresinde yapılan preparatlarda en tipik görüntü, hayvandan hayvana değişmekle beraber, bol sayıda gözlenen eritrositler olmuştur. Eritrositler, köpeklerde az veya çok belirgin seyreden proöstrus kanaması nedeniyle vaginada yer almıştır.

Hormonal etki ile proöstrus evresinde uterus ve vaginanın yenilenmesi (13, 14) ve epitel hücrelerinde proliferasyonlar görülmesi (6), özellikle proöstrus evresinde yapılan smearlardaki hücre sayısı artışlarının nedeni sayılabilir.

Çalışmada, vaginadan alınan smearlar hem toluidine blue boyası ile ve hem de Giemsa boyama metodu ile boyanmıştır. Ancak, toluidine blue boyama'da eritrosit ve diğer kan hücrelerinin tanısı ya çok zor, ya da hiç yapılamamıştır. Buna karşın, Giemsa boyama metodu ile kan hücreleri çok daha belirgin tanımlanabilmiştir. Bu durum, toluidine blue boyası ile boyamada hem fizyolojik suyun, hem de boyanın sulu ortamının eritrositler ve diğer kan hücrelerinin görülmesine engel olmasıyla açıklanabilir.

Geç proöstrus veya erken östrus evresi diye de tanımlanan geçiş süresi preparatlarında çok miktarda eritrosite rastlanmıştır. Östrus süresince epitel hücrelerinde gözlenen büyüme, keratinizasyon, piknotik çekirdekli ve çekirdeksiz hücre tipleri, önceki ve sonraki evrelere göre değişik olan bulguları oluşturmuştur. Başlangıçta gittikçe azalan, sonraları hiç gözükmeyen eritrositlerin varlığı kanamayla ilgilidir. Yapılan preparatlarda, östrus evresi başlangıcında belirlenen eritrositler, kanamadan bir veya iki gün sonrasına kadar vaginada kalabilen kan hücrelerinden ileri gelebilir.

Östrus süresince belirlenen tipik vaginal smear bulguları, köpeklerde dış belirtilerle kesin olarak ayrımı yapılan bu sürenin tanımı için yeterli olmuştur.

Örtrus'u tanımlayan vaginal sitolojik araştırmalarda (1, 4, 8, 10, 13, 14, 15) belirlenen hücre tipleri bu çalışmada elde edilen bulgularla çok yakın bir benzerlik göstermiştir.

Genel olarak, metöstrus ve anöstrus evrelerini vaginal smear yöntemiyle tanımlayan araştırmalarda (1, 4, 5, 8, 10-15) ileri sürülen bulgular birbirlerine benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar, metöstrus başlangıcında çoğunluk intermedier ve parabasal ve gittikçe

azalan sayıda süperfisial tipte epitel hücrelerine rastlamışlardır. Yine, metöstrus başlangıcında tipik bir belirti olarak tanımlanan lökositlerin görülmesi (8) ve epitel hücreleri sayısındaki azalma, bu araştırmada da gözlenmiştir.

Ancak, kimi araştırmacıların (5, 11, 12) tanım ve bulguları, diğer araştırmacıların (1, 4, 8, 13, 14, 15) ve bu çalışma sonuçlarına benzerlik göstermemektedir. Nitekim, Dore (5), metöstrus ve anöstrusta hücre sayımı yapmış, parabasal hücrelerinin sayısının yükselmesiyle metöstrustan, anöstrusa geçişi tanımlamıştır. Benzer bir çalışma ise, ovulasyon anının epitel hücreleri tiplerine göre belirlenebilmesinin ortaya konmasıdır (11, 12).

Hem bu çalışmanın ve hem de araştırmacıların sonuçları arasındaki farklı tanım ve bulgular, özellikle değişik metod ve farklı araştırmacıardan kaynaklanmış olabilir.

Bu çalışmada, elde edilen vaginal sitolojik bulgularla metöstrus-anöstrus evrelerinin tanısının yapılabileceği ortaya konulmuştur. Ancak, metöstrus ve anöstrus evreleri arasındaki belirgin ve tipik bulgular saptanamamıştır. Sözkonusu durum, yukarda da açıklandığı gibi değişik yöntemlerin izlenmesi, bu evrelerde sürenin köpekler arasında farklı ve uzun sürmesi nedeniyle ve araştırmacıların farklı yargıya sahip olmalarından ileri gelebilir.

Yapılacak benzer çalışmalarla, bu araştırmada çeşitli nedenlerle uygulanamayan hücre tiplerinin belirlenerek sayılması yanısıra, sıklık evrelerin hormonal düzeylerinin ortaya konması, çok yararlı olacaktır.

Sonuç olarak, köpeklerde vagina epitel hücrelerinde kızgınlık siklusu süresince oluşan değişikliklerin, vaginal smear yöntemiyle saptanmasıyla, kızgınlık siklusu ve evrelerinin tanımı yapılabilmektedir. Bu yöntemin yetiştirme, Sun'i tohumlama, tedavi ve başka amaçlı çalışmalarda kullanılmasıyla büyük yararlar sağlayacağı ortadadır.

Teşekkür

Araştırma bulgularının büyük bir kesimini oluşturan vaginal smear preparatlarının resimlerinin çekilmesinde yardımcı olan, Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı Araş. Gör. Dr. Ziya Özcan'a Teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Bell, E.T., Bailey, J.B., and Christie, D.W. (1973). *Studies on vaginal cytology during the canine estrous cycle*. Res. Vet. Sci., 14: 173-179.
2. Christie, D.W., Bailey, J.B. and Bell, E.T. (1972). *Classification of cell types in vaginal smears during the Canine Estrous Cycle*. Br. Vet. J., 128: 301 - 310.
3. Doğaneli, M.Z., Tanyolaç, A. ve Alaçam, E. (1979). *Koyunlarda gebeliğin çeşitli evrelerinde vaginal smear ve vaginal biyopsi yöntemleriyle çalışmalar*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., Cilt XXVI (3-4): 177 - 183.
4. Böcke, F. (1981). *Veteriner Medizinische Endokrinologie, der Einsatz von Sexualhormonen beim Kleintier*, 702 - 721, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, DDR.
5. Dore, M.A. (1978). *The Role of the vaginal Smear in the Detection of metoestrus and Anoestrus of the Bitch*. J. Small Anim Pract. 19: 561 - 572.
6. Fowler, E.H., Feldman, M.K., and Loeb, W.F. (1971). *Comparison of histologic features of ovarian and uterine tissues with vaginal smear of the bitch*. Am. J. Vet. Res., 32: 327 - 334.
7. Grandenath, I. (1957). *Ein Beitrag zur vaginalen Zyklusdiagnostik beim Rind*. Inaug. Diss., Giessen.
8. Günzel, A.R., Koivisto, P. (1984). *Aktuelles zum Sexualzyklus der Hündin—diagnostische Möglichkeiten durch vaginalzytologische Untersuchungen mittels Testsimplets*. Der Praktische Tierarzt, 2: 161 - 171.
9. Harrop, A.E. (1960). *Reproduction in the dog*. Baillere, Tindall and Cox, London.
10. Klaas, P. (1985). *Canine vaginal cytology during the estrous cycle*. Can. Vet. J., 26: 101 - 104.
11. Kratzheller, K. (1956). *Untersuchungen über das Zellbild von Vaginalabstrichen der Hündin in Faerbeverfahren der Methode Papanicolau*. Vet. Diss., Giessen.
12. Rick, G.W., und Kratzheller, K. (1955). *Zytologie des desquamierenden Vaginalepithels der Hündin und ihre Anwendung für die Zyklusdiagnostik*. Zbl. Vet. Med., 2: 82 - 101.
13. Roszel, J.F. (1975). *Genital cytology of the bitch*. Veterinary scope, 19: 2 - 15.
14. Schutte, A.P. (1967). *Canine Vaginal Cytology. I Technique and Cytological Morphology*. J. Small Anim. Pract., 8: 301 - 317.
15. Sokolowsky, J.H. (1973). *Reproductive features and patterns in the bitch*. Anim. Hosp. Assoc., 9: 71 - 81.
16. Wachtel, E. (1969). *Exfoliative Cytology in gynaecological practice*. 2. ed., London, Butterworth.