

Develerin (*Camelus dromedarius*) perifer kan lökositlerinde alfa-naftil asetat esteraz aktivitesinin belirlenmesi

Mustafa SANDIKÇI, Şadiye KUM, Ülker EREN

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Özet: Bu çalışma, develerde perifer kan lökositlerinin alfa naftil asetat esteraz (ANAE) aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Çalışmada materyal olarak 13 adet erişkin deveden alınan heparinize kan örnekleri kullanıldı. ANAE aktivitesinin belirlenmesi için farklı pH ve sürelerde ANAE boyaması uygulandı. ANAE boyamasına karşı en iyi reaksiyon pH 5.8'de yapılan 3 saatlik boyamalardan elde edildi. Kanda ANAE pozitif T lenfosit oranı % 81.33 olarak tespit edildi. ANAE boyamasına karşı monositlerin diffuz granuler pozitivite gösterdikleri, eritrositlerin ve granulositlerin ise negatif reaksiyon verdiği dikkati çekti.

Anahtar sözcükler: ANAE aktivitesi, deve, lökosit.

Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood leukocytes of camel (*Camelus dromedarius*)

Summary: This study was carried out to determine the alpha naphthyl acetate esterase (ANAE) activity of peripheral blood leukocytes in camels. Heparinized blood samples taken from 13 adult camels were used. ANAE stainings were applied at different pH and durations for the determination of ANAE activity. The best reactions against ANAE were obtained for three hours stainings at pH 5.8. The proportion of ANAE positive T lymphocytes were 81.33 %. There was a diffuse granular positivity against ANAE staining in monocytes. However negative reactions were observed in erythrocytes and granulocytes.

Key words: ANAE activity, camel, leukocytes.

Giriş

Kemik iliğinden timusa gelen prekürsör hücreler bu organın korteksinde bazı lokal kimyasal moleküllerin etkisiyle timositlere differensiyasyon olurlar. Bu hücreler timus medulasına geçerek dolaşım ile sekonder lenfoid organlara giderler (5,6). Basso ve ark (4) insanlarda perifer kan T lenfositlerinin alpha-naphthyl acetate esteraz (ANAE) enzimi taşıdığını ve bu enzimin timus medulasında timosit olgunlaşması sırasında kazanıldığını bildirmişlerdir. B lenfositlerinin ise bu enzime sahip olmadıkları, ANAE enziminin bir T lenfosit markırı olduğu kabul edilmektedir (5,13). ANAE lizozomal bir enzimdir (13,14,27). Zicca ve ark (27) enzimin lizozomların membranlarında bulunduğunu, Aştı ve ark (3) ise enzimin lizozomal içeriğe dahil olduğunu bildirmişlerdir. Monositler, makrofajlar ve retikulum hücrelerinin de ANAE pozitivitesi gösterdiği fakat T lenfositlerinin lokalize granüler pozitivite göstermesine rağmen diğer pozitif hücrelerin diffuz granüler pozitivite gösterdikleri bildirilmiştir (17,20). ANAE enzimi demonstrasyonu metodu perifer kan T lenfositlerinin belirlenmesi için fare (14), sığır (9), insan (8,19), köpek (1,24), kedi (16,26), domuz (16), ve tavuklarda (3,20,22) kullanılmıştır. Araştırmacılar (2,8,10,12,14), ANAE demonstrasyonunda, uygulanan boyanın pH'sı ve inkubasyon süre-

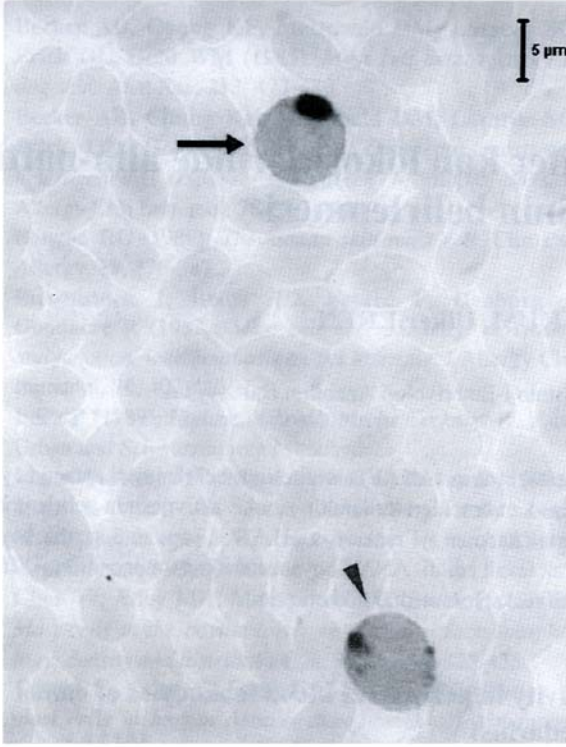
sinin hayvan türüne göre farklı olabileceğini bildirmişlerdir.

T lenfositleri sağlıklı insan ve hayvanların perifer kanında belirli oranlarda bulunurken, bazı neoplastik hastalıklarda bu oran değişmektedir (9,12). ANAE pozitif T lenfositlerinin % 95'inin elektroforez analiz yöntemi ile doğrulandığı (21), ANAE demonstrasyonu metodunun, klinik bilimlerinde kronik ve akut leukaemia'ler gibi kanser olgularında ayırıcı tanı amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (11).

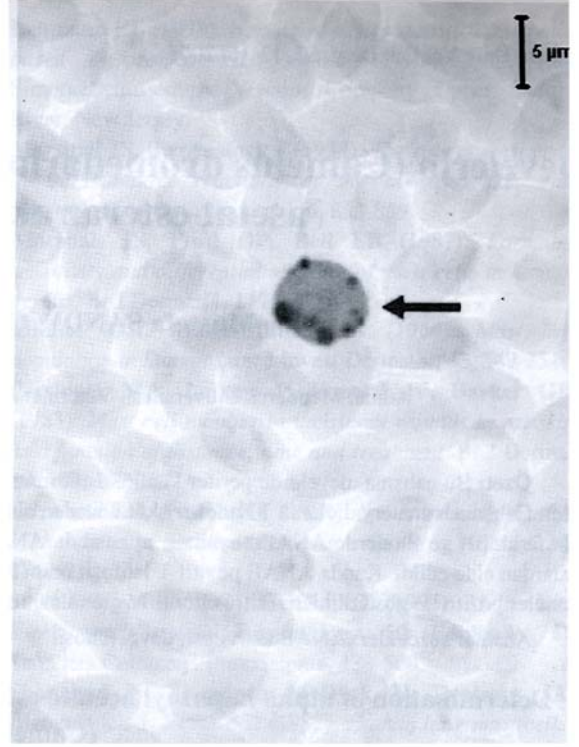
Develerde ANAE demonstrasyonu ile kanda T lenfositlerinin belirlenmesi hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Sunulan çalışma, erişkin develerde ANAE demonstrasyonu yöntemi uygulanarak perifer kan T lenfosit oranının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Metot

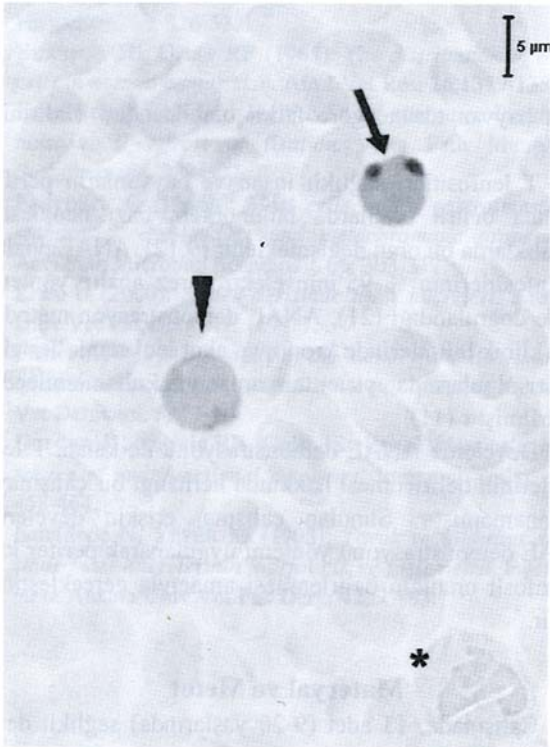
Çalışmada, 13 adet (9-20 yaşlarında) sağlıklı deve (*Camelus dromedarius*) den alınan heparinize (Liquemine, Roche) kan örnekleri materyal olarak kullanıldı. Alınan kan örneklerinden frotiler hazırlanarak oda sıcaklığında kurutuldu ve glutaraldehid-aseton tespit sıvısında -20 °C da 3 dakika tespit edildikten sonra distile suyla yıkandı. Tespit edilen frotilerde ANAE demonstrasyonu için,



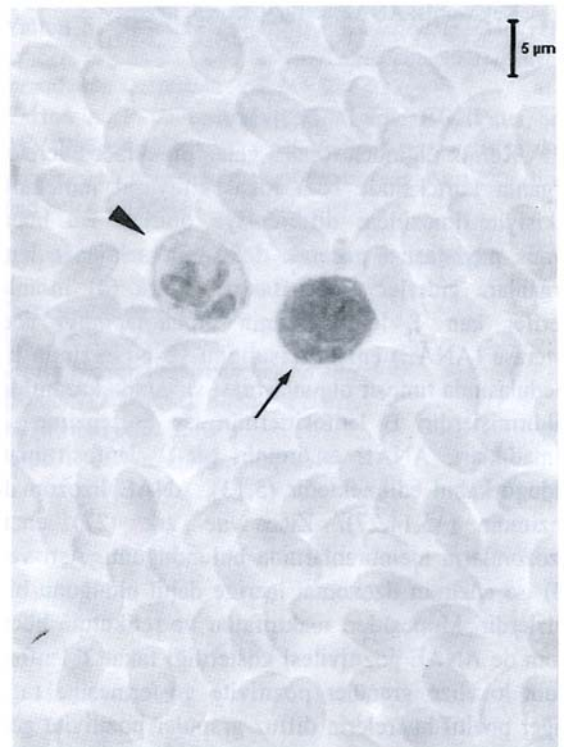
Şekil 1. Erişkin devenin perifer kanında ANAE boyaması. Bir (ok) ya da birkaç (okbaşı) granüle sahip ANAE pozitif T lenfositler, Bar: 5 µm.
Figure 1. ANAE demonstration in peripheral blood of adult camel. ANAE positive T lymphocytes including one (arrow) or a few (arrowhead) granules, Bar: 5 µm.



Şekil 3. Erişkin devenin perifer kanında ANAE boyaması. ok: 7-8 adet küçük granül içeren ANAE pozitif lenfosit, Bar: 5 µm.
Figure 3. ANAE demonstration in peripheral blood of adult camel. arrow: ANAE positive T lymphocyte including 5-6 small granules, Bar: 5 µm.



Şekil 2. Erişkin devenin perifer kanında ANAE boyaması. ok: ANAE pozitif T lenfosit, okbaşı: ANAE negatif lenfosit, * : ANAE negatif nötrofil granülosit, Bar: 5 µm.
Figure 2. ANAE demonstration in peripheral blood of adult camel. arrow: ANAE positive T lymphocytes, arrowhead: ANAE negative lymphocytes, * : ANAE negatif neutrophil granulocyte, Bar: 5 µm.



Şekil 4. Erişkin devenin perifer kanında ANAE boyaması. ok: diffuz granüler pozitive gösteren bir monosit, okbaşı: ANAE negatif bir eozinofil granülosit, Bar: 5 µm.
Figure 4. ANAE demonstration in peripheral blood of adult camel. arrow: diffuse granular positive monocyte, arrowhead: ANAE negative eosinophil granulocyte, Bar: 5 µm.

0.067 M fosfat tamponunun (pH 5.0) 40 ml'sine 2.4 ml heksazotize edilen pararosaniline (Sigma) solusyonu ve 0.4 ml asetonda eritilen 10 mg alpha naphthyl acetate (Sigma) eklenerek hazırlanan inkubasyon solusyonu kullanıldı (14). İnkubasyon solusyonları 2N NaOH ile 5.0, 5.4, 5.8, 6.2, 6.4, 6.8 ve 7.2 olmak üzere 7 değişik pH'da ayarlandı. Frotilere oda sıcaklığında her pH için 3 ve 6 saatlik boyamalar uygulandı (2,12). İnkubasyondan sonra frotilere methylene blue ile çekirdek boyaması uygulandı. Her frotide 5 değişik alanda olmak üzere toplam 500 lenfosit sayılarak ANAE pozitif lenfosit oranı belirlendi (2,12) ve Leica DC-200 camera ile resimleri çekildi.

Bulgular

Develerden alınan perifer kan T lenfositlerinde ANAE boyamasına karşı en iyi reaksiyon pH 5.8'de, 3 saatlik boyamadan elde edildi. ANAE enzimi demonstrasyonunda pozitif lenfositlerin büyük çoğunluğunda sayıları 1-2 arasında değişen kahverengi, iri granüller gözlenirken (Şekil 1, 2 oklar), diğer pozitif lenfositlerin 3-8 arasında değişen küçük granüllere sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 1 okbaşı, Şekil 3 ok). Yapılan mikroskopik incelemeler sırasında ANAE negatif lenfositlerin varlığı da dikkati çekti (Şekil 2 okbaşı). ANAE demonstrasyonu'nda 13 deveye ait perifer kan örneklerinde ANAE pozitif T lenfosit oranları Tablo 1'de verildi. Sözkonusu oran ortalama % 81.33 olarak tespit edildi.

ANAE boyamasına karşı monositlerin diffuz granuler pozitivite gösterdikleri (Şekil 4, ok), eritrositlerin, granulositlerin (Şekil 2 yıldız, Şekil 4 okbaşı) ve plateletlerin ise negatif reaksiyon verdiği dikkati çekti.

Tablo 1. Develerin perifer kan lenfositlerinde ANAE demonstrasyonu

Table 1. ANAE demonstration in peripheral blood lymphocytes of camels

Hayvan no	ANAE pozitif Lenfosit (%)
1	83.0
2	82.0
3	80.0
4	81.0
5	72.0
6	89.0
7	79.4
8	89.4
9	88.0
10	70.0
11	86.8
12	80.0
13	76.8
Mean ± SD	81.33 ± 6.08

Tartışma ve Sonuç

Farklı hayvan türlerinde (2,8) ve insanda (10) perifer kan lökositlerinin ANAE boyamasına karşı gösterdikleri boyanma özelliklerinin, uygulanan boyanın pH'sı ve boyama süresine bağlı olarak değişiklikler gösterdiği ileri sürülmüştür. Knowles ve ark (10) ile Muller ve ark (15), insanların perifer kanında ANAE demontsrasyonuna karşı en iyi sonucu pH 5.8'de 3 saatlik boyamadan elde ettiklerini, Higgy ve ark (8) ise pH 8.0'da 30 dakikada boyamanın gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Osbaldiston ve Sullivan (18) köpeklerde pH 6.5'de 90 dakika, domuzlarda pH 6.4'de 2 saat, Maiti ve ark da (12) tavuklarda 7.2'de 16 saatte, en iyi sonucu aldıklarına dikkati çekmişlerdir. Aştı ve ark (2) ise perifer kanda en iyi reaksiyonun tavuk, köpek, koyun ve keçide pH 5.8, at ve sığırdada pH 6.2, rat ve kedide pH 6.4'de yapılan 3 saatlik boyamalardan elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada deve perifer kanında ANAE boyamasına karşı en iyi reaksiyon pH 5.8'de 3 saatlik boyamadan elde edildi ve bu hayvanlarda perifer kan ANAE pozitif T lenfosit oranı % 81.33 olarak tespit edildi. Yapılan literatür taramalarında develerin perifer kan ve lenfoid organlarında ANAE demonstrasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Wernery ve ark (23) ise develerde T/B lenfosit oranının 5/1 olduğunu bildirmişlerdir. Bu oran insanlarda % 85 (15), sığırlarda % 63 (25), kangal köpeklerinde % 82 (1), tavuklarda % 56 (3, 12) olarak bildirilmiştir.

İnsan ve hayvanların perifer kan T lenfositlerinde ANAE pozitivitesinin çoğunlukla 1-2 adet lokalize granül şeklinde gözlemlendiği, B lenfositlerinin negatif reaksiyon verdiği, monositlerde ise diffuz boyanma gözlemlendiği bildirilmiştir (4, 9, 14). Bu çalışmada da develerde ANAE pozitif lenfositlerin çoğunda 1-2 adet spesifik kahverengi granül gözlenirken az sayıda lenfositin 3-8 adet küçük granüle sahip olduğu, monositlerin ise diffuz granüler pozitivite gösterdiği tespit edildi.

Grossi ve ark (7) T lenfositlerinin ya IgM yada IgG reseptörüne sahip olduğunu, IgM reseptörüne sahip T lenfositlerin B hücre proliferasyonu ve differensiyasyonuna yardımcı olduklarını, IgG reseptörlü T hücrelerinin ise muhtemelen supresör etki yaptıklarını, ANAE pozitivitesi veren lenfositlerin de IgM reseptörlü T lenfositler olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu bilgiler ışığında, perifer kanda ANAE negatif olarak belirlenen lenfositlerin hepsinin B lenfosit olarak değerlendirilemeyeceği, çünkü bu negatif hücrelerin bazılarının IgG reseptörüne sahip T lenfositler olabileceği düşünülebilir.

ANAE boyamasına karşı nötrofil granulositlerde insan (8, 10), domuz (18), sığır (25) ve kedide (18) negatif, kobay, rat, keçi ve koyunda (18) pozitif reaksiyon görüldüğü, eozinofil granulositlerde ise insan (8,10) sığır (25), kedi, rat, koyun ve keçide (18) negatif, köpeklerde (18) ise pozitif reaksiyonun görüldüğü bildirilmiştir. Aştı ve

ark (2) ise ANAE demonstrasyonunda nötrofil granüositlerin kedi, köpek ve atlarda negatif, rat, koyun, keçi ve sığırlarda pozitif, eozinofil granulositlerin ise rat, tavuk, kedi, köpek, at, sığır, koyun ve keçide pozitif reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise granüositlerde ANAE pozitivitesi tespit edilmemiştir.

Develerin perifer kan lökositlerinde ANAE boyamasına karşı en iyi reaksiyonun pH 5.8 de yapılan 3 saatlik boyamalardan elde edilebileceği ve T lenfositlerinin spesifik olarak belirlenebileceği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Aştı RN, Kurtdede N, Ergün L (1993): *Kangal köpeklerinin perifer kan T lenfositleri üzerinde ışık ve elektron mikroskopik çalışmalar*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **40**, 560-576.
2. Aştı RN, Alabay B, Kurtdede N, Altunay H, Ergün L (1996): *Farklı hayvan türlerinin perifer kan lökositlerinde alfa naftil asetat esterase aktivitesinin belirlenmesi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **43**,129-133.
3. Aştı RN, Kurtdede N, Özen A (1999): *Light and electron microscopic studies on alpha naphthyl acetate esterase activity of peripheral blood T lymphocytes in chicken*. Dtsch Tierarztl Wschr, **106**, 397-399.
4. Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A and Zanesco L (1980): *Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes*. Br J Haematol, **44**, 577-582.
5. Beya MF, Miyasaka M, Dudler L, Ezaki T, Trnka Z (1986): *Studies on the differentiation of T lymphocytes in sheep: I. Two monoklonal antibodies that recognize all ovine T lymphocytes*. Immunol, **57**, 115-121.
6. Glick B (1985): *The ontogeny and microenvironment of the avian thymus and bursa Fabricius: contribution of specialized cells to the avian immuno response*. Adv in Vet Sci and Comp Med, **30**, 67-90.
7. Grossi CE, Webb SR, Zicca A, Lydyard PM, Moretta L, Mingari MC, Cooper MD (1978): *Morphological and histochemical analyses of two human T cell subpopulations bearing receptors for IgM or IgG*. J Exp Med, **147**, 1405-1417.
8. Higgy KE, Burns GF, Hayhoe FG (1977): *Discrimination of B,T and null lymphocytes by esterase cytochemistry*. Scand J Haematol, **18**, 437-448.
9. Kajikawa DVM, Koyama H, Yushikawa T, Tsubaki S (1983): *Use of alpha naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle*. Am J Vet Res, **44**, 1549-1552.
10. Knowles DM, Hoffman T Ferrarini M and Kunkel HG (1978): *The demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes usefulness as a T cell marker*. Cell Immun, **35**, 112-123.
11. Kulenkampff J, Janossy G, Greaves MF (1977): *Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T lymphocytes*. Br J Haematol, **36**, 231-240.
12. Maiti NK, Saini SS, Sharma SN (1990): *Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes*. Vet Res Commun, **14**, 207-210.
13. Miyasaka M, Heron I, Dudler L, Cahil RNP, Forni L, Knaak T and Trnka Z (1983): *Studies on the differentiation of T lymphocytes in the sheep. I. Reconstitution of sheep T lymphocyte differentiation antigen by a monoclonal antibody T-80*. Immunology, **49**, 545-552.
14. Mueller J, Brun del Re G, Buerki H, Keller HU, Hess MW and Cottier H (1975): *Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes*. Eur J Immunol, **5**, 270-274.
15. Muller J, Keller HU, Durig P, Haggmann J, Cornioley DM, Reinhard J, Ruchti C, Hess MW and Cottier H (1981): *Nonspecific esterase in human lymphocytes*. Int Arch Allergy. Appl Immunol, **64**, 410-421.
16. Nakase Y, Kabayashi K (1984): *Cytochemical studies of leukocytes of some animal species: 3. Esterase stain*. Bull Azabu Univ Vet Med, **5**, 1-10.
17. Odend'hal S, Player EC (1979): *Histochemical localization of T cell in tissue sections*. Avian Dis, **23**, 886-895.
18. Osbaldiston GW, Sullivan RJ (1978): *Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leukocytes*. Am J Vet Res, **39**, 683-685.
19. Pangalis GA, Valdman SR, Rappaport H (1978): *Cytochemical findings in human nonneoplastic blood and tonsillar B and T lymphocytes*. Am Soc Clin Pathol, **69**, 314-318.
20. Pruthi AK, Gupta RKP, Sadana JR (1987): *Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes monocytes of chickens*. J Vet Med A, **34**, 390-392.
21. Ranki A, Totterman TH, Hayry P (1976): *Identification of Mouse T and B lymphocytes from cytocentrifuged cell smears*. Clin Exp Immunol, **26**, 632-640.
22. Sandıkçı M (2000): *Proportion of T lymphocytes in peripheral blood of the hydrocortisone acetate-treated chickens at post hatching period*. Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg, **25**, 39-43.
23. Wernery U, Fowler ME, Wernery R (1999): *Color Atlas of Camelid Hematology*. Blackwell wissenschafts, Verlag, Berlin, Vienna.
24. Wulff JD, Sale GE, Deeg HJ, Storb R (1981): *Nonspecific acid esterase activity as marker for canine T lymphocytes*. Exp Hematol, **9**, 865-870.
25. Yang TJ, Jantzen PA and Williams LF (1979): *Acid alpha naphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes*. Immunology, **38**, 85-93.
26. Yörük M, Aştı RN, Kurtdede N, Ağaoğlu Z, Altunay H (1998): *Light and electron microscopic studies on alpha naphthyl acetate esterase activity of the peripheral blood T lymphocytes in van cats*. Anat Histol Embryol, **27**, 289-292.
27. Zicca A, Leprini A, Codoni A, Franzi AT, Ferrarini M, Grossi CE (1981): *Ultrastructural localization of alpha naphthyl acid esterase in human TM lymphocytes*. Am J Pathol, **105**, 40-46.

Geliş tarihi: 03.03.2004 / Kabul tarihi: 07.05.2004

Yazışma adresi:

Yard. Doç. Dr. Mustafa Sandıkçı
Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Işıklı / Aydın

Kedilerde vaginal smear yöntemi ile siklus dönemlerinin saptanması ve ovaryumlar üzerindeki yapılar arasındaki ilişkinin araştırılması

Abuzer K. ZONTURLU¹, Cihan KAÇAR², Nil MARAL³, Selim ASLAN⁴

¹ Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa; ²Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kars; ³Pets and Vets Kliniği, Cinnah Caddesi 40/3 Çankaya, 06110, Ankara; ⁴Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Özet: Bu çalışma, kedilerde vaginal smear yöntemiyle seksüel siklus dönemlerinde görülen hücrelerin, ovaryum üzerindeki yapıların ve uterustaki değişikliklerin karşılaştırılması amacıyla planlanmıştır. Çalışmada, yaşları 7 ay ile 8 yaş arasında değişen ve ağırlıkları 1.5-5 kg olan toplam 83 adet dişi kedi kullanıldı. Vaginal smear örnekleri genel anestezi altında alındı. Ovaryumlar üzerindeki yapılar ovariohisterektomi operasyonundan sonra incelendi. Elde edilen vaginal smearlerin siklus dönemlerine göre dağılımı %13.25 proöstrus (n=11), %34.93 östrus (n=29), %31.32 metaöstrus (n=26) ve %20.48 anöstrus (n=17) olarak saptandı. Siklusun östrus döneminde bazal, yukarı süperfisyal ve keratinize hücrelerin yüzdeleri sırasıyla %0.5, %39.44, %26.17 olarak bulundu. Buna karşın bu oranlar anöstrus döneminde %32.64, %2.17 ve %1.70 olarak belirlendi. Asidofilik indeks oranı en yüksek olarak (%93.45) östrusta, en düşük anöstrusta (%24.70) görüldü ve istatistiksel yönden bu fark önemli bulundu ($p<0.001$). Kedi başına düşen 0.5-1.5 mm çapında follikül oranı en çok siklusun proöstrus evresinde saptandı. 2-3 mm çapta follikül, proöstrus ve anöstrusta bulunmadı. Büyük folliküller en yüksek oranda (%29.5) östruste bulundu. Uterusun kalınlığı bakımından istatistiksel açıdan proöstrus, metaöstrus ve anöstrus evreleri arasında önemli ($p<0.05$) farklılıklar vardı. Vaginal smear örneklerinde proöstrus evresi hariç eritrosit sayıları düşük olarak saptandı. Sonuç olarak kedilerde vaginal sitoloji yöntemi ile siklusun östrus ve anöstrus dönemlerinin kolaylıkla belirlenebileceği buna karşılık Proöstrus ve Metaöstrus dönemlerinin birbirinden kolayca ayıramayacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Kedi, ovaryum yapıları, vaginal sitoloji

Determination of sexual cycle stages by vaginal cytology and its relationship with ovarian structures in the queen

Summary: This study was designed to determine sexual cycle stages by vaginal cytology and to evaluate the relationship between vaginal smear results and structures on ovaries. A total of 83 queens weighing 1.5-5 kg, at ages between 7 months- 8 years were used. Vaginal smear samples were collected under general anaesthesia. Ovaries were examined following ovariohysterectomy operation. Vaginal smear results reveal that 11, 29, 26 and 17 animals were at proestrous, estrous, metestrous and anestrous stages, respectively. Percentages of basal, upper superficial and cornified cells were 0.5 %, 39.44 % and 26.17 % at estrous period, respectively. Same percentages in anestrous period were 32.64 %, 2.17 % and 1.7 %. Acidophylic index were highest (93.45 %) in estrous and lowest (24.7 %) in anestrous and statistically different between these stages ($p<0.001$). Follicles 0.5-1.5 mm in diameter were abundant in proestrous. Follicles 2-3 mm in diameter were observed in 29.5 % of estrous queens and none of proestrous and anestrous cats. There were significant differences ($p<0.05$) in uterine thickness between proestrous, metestrous and anestrous stages. Erythrocyte numbers were low in vaginal smears except for proestrous. In conclusion, estrous, metestrous and anestrous stages of sexual cycle can easily be determined by vaginal cytology in the queen and information can be obtained on ovarian structures.

Key words: Ovarian structures, queen, uterus, vaginal cytology

Giriş

Dişi kediler mevsimsel poliöstrik hayvanlardır. Ocak-Şubat aylarında uzamaya başlayan gün ışığı süresi siklus aktivite dönemini başlatmakta, sonbaharda azalan ışık etkisiyle de fizyolojik anöstrus (AÖ) dönemine geçiş şekillenmektedir. Sonbaharın sonu ve kış ayları da yapay ışık uygulamaları ile seksüel yönden aktif dönemler haline gelmekte, bu durum ev içinde beslenen kedilerde belirginleşmektedir (1).

Dişi kedilerde folliküler dönem ortalama 7.4 gün sürmekte olup süreç ırka bağlı olarak 3-16 gün arasında

farklılıklar gösterebilmekte, çiftleşme bu süreyi kısaltmaktadır. Steril çiftleşmeyi takiben ovulasyon şekillendiği takdirde ortalama 7 gün, ovulasyon şekillenmez ise 7.6 gün olarak gerçekleşmektedir (5,7,9).

Ovulasyon, çiftleşme, serviks uteri ve vaginanın mekanik uyarımı, vulva ve sırt bölgesine uygulanan masajlar ve eksojen gonadotropin uygulamaları sonucu şekillenir. Ovulasyon, söz konusu uyarımlardan 25-32 saat sonra şekillenmektedir. LH salınımının düzeyi ile süresi, kopulasyon ya da uyarımların sıklığı ve oluştuğu zaman dilimiyle ilgilidir (5,12).

Ovulasyonun oluşmadığı durumlarda kediler 2-10 gün süreyle östrus beldeklere (Ö) gösterirken, folliküller bu sürenin sonunda atreziye uğrarlar. Progesteron salınımı olmadığından endometrium transformasyonu şekillenmez ve 8-9 günlük kısa bir dinlenme döneminden sonra (interöstrus) yeni bir folliküler döneme girilir. Anovulatorik siklusun süresi ortalama 16 gündür. Östrus (Ö) 14-30 günlük aralıklarla tekrar ederken, persistent follikül olgularında kızgınlığın kesilmeden sürdüğü dik-kati çeker (2,8).

Kedilerde siklusun proöstrus (PÖ) ve östrusta oluşan folliküler döneminde açıkça fark edilen bağırma, miyavlama, yuvarlanma, sürtünme gibi davranışlar ile dış bakıda belirlenebilen vulvada kıvrım oluşumu ve az miktarda açık renkli müköz akıntı söz konusudur.

Östrus (Ö) döneminin saptanması amacıyla vaginal sitoloji, köpeklerde olduğu gibi kedilerde de başvuru muayene yöntemlerinden biridir (4). Siklusun izlenmesi, hormon uygulamalarına yön verme gibi durumlarda vaginal sitoloji önemli bir başvuru yöntemidir. Östrojen kedilerde vaginal mukusta identifikasyona neden olur. Östrojen aktivitesinin en duyarlı ve tutarlı belirtisi vaginal smear örneğinin zeminindeki temiz görüntüdür. Vagina epiteline ait hücreler debris yani selüler veya non-selüler döküntülerin azalıp ortadan kalkması ile daha kolay gözlenir hale gelir (6).

Kedilerde proöstrus döneminde intermediar hücre oranında artış olurken tüm süperfisyal hücreler %60 civarında bulunmakta, lökosit oranı metaöstrus (MÖ) dönemindeki kadar görülmektedir (11). Asidofilik indeksi (Aİ) ise %30 civarında olmaktadır. Östrus döneminde süperfisyal hücrelerin yanısıra piknotik çekirdekli veya çekirdeklerini tamamen yitirmiş keratinize süperfisyal hücreler yaklaşık %80 oranında bulunmaktadır (11). Çekirdeksiz süperfisyal hücrelerin oranı, folliküler dönemin ilk gününde %10'dan daha fazla artış göstermektedir. Çekirdekli süperfisyal hücrelerin oranı ise %20-30 arasında sabit kalırken, intermediar ve parabazal hücrelerin oranı düşmektedir. Eritrositlerin görülmesi ender iken, bazen erken folliküler dönemde rastlanmaktadır (6).

Metaöstrus döneminde bazal, parabazal, intermediar, aşağı ve yukarı süperfisyal ve yaklaşık %7.3 oranında keratinize süperfisyal hücrelerine rastlanmaktadır. Bu dönemde asidofilik hücrelere rastlanırken her preperatta lökositte rastlamak mümkün olmamaktadır. Anöstrus döneminde intermediar hücrelerde artış görülürken, keratinize süperfisyal ve parabazal hücre oranları nerdeyse aynı kalmaktadır (11).

Bu çalışmada kedilerde vaginal sitoloji yöntemiyle kedilerde seksüel siklus dönemlerinin saptanması ve bu bulguların ovaryum bulguları ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırma amacıyla Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne, ovariohisterektomi (OHE) operasyonu amacıyla getirilen toplam 83 adet dişi kedi kullanılmıştır. Materyal olarak seçilen kediler, değişik ırklara mensup olup, yaşları 7 ay ile 8 yaş ve ağırlıkları , 1.5 ile 5 kg arasında değişmiştir.

Anabilim Dalı Kliniği'ne getirilen kedilerin öncelikle genel muayeneleri yapılmış ve ardından rutin genel anestezi protokolü uygulanmıştır (0.02mg/kg Atropin Sülfat; 1-2 mg/kg Xylazine; 10mg/kg Ketamin hidroklorür). Anestezideki dişi kediler, operasyon öncesinde, arkaları hafifçe yukarıya gelecek şekilde tespit edildikten sonra vaginal smear örneği alınmıştır. Smear alma işlemi için, yaklaşık 10 cm uzunluğundaki steril swap kullanılmıştır. Fizyolojik tuzlu su ile nemlendirilen swap, rima vulvadan girilerek, yaklaşık 1 cm kadar cranio-dorsal yönde ilerletilip kendi eksenini etrafında döndürülerek geri çekilmek suretiyle sitolojik örnek elde edilmiştir. Lam üzerine yayılarak, operasyon bitiminde boyanmak üzere tespit edildikten sonra Papanicolaou (10), boyama yöntemi ile boyanmıştır. Elde edilen preparat kaplama medyumu damlatılarak lamel ile kapatılıp hazır hale getirilmiştir. Örnekler mikroskop altında 10x20 ve 10x40 büyütmelemlerde incelenmiş ve farklı sahalarda toplam 100 adet hücre sayılarak değerlendirme yapılarak elde edilen bulgular kaydedilmiştir.

Ovariohisterektomi uygulanan kedilerden alınan ovaryumların taşıdığı fonksiyonel yapılar ile kornu uterilerin durumu makroskopik olarak incelenmiştir. Değerlendirme Reiter'in kriterlerine uygun olarak yapılmıştır (11):

Anöstrus (AÖ); Fonksiyonel yapı (Follikül, korpus luteum) yok, az sayıda korpus albicans bulunabilir. Kornu uteriler; yan taraftan düz veya silindirik ince duvarlı, yaklaşık saman sapı kalınlığındadır.

Proöstrus (PÖ); Küçük folliküller (>1.5 mm) birden 10'a kadar değişebilen sayıda bulunabilir. Kornu uteriler; silindirik, burğu tarzında silindirik, kalın duvarlı, saman sapı ile kurşun kalem kalınlığındadır.

Östrus (Ö); Yaklaşık 8 adet kadar büyük follikül (1.5-2.5 mm) bulunabilir. Ayrıca ovaryumlarda küçük folliküller, hemorajik folliküller ve korpus hemorajikum yer alabilir. Kornu uteriler burğu biçiminde silindirik ve ince kurşun kaleminden daha kalındır.

Metaöstrus (MÖ); Korpora lutea (2-3 mm) kırmızı, kırmızı- kahverengi, sarı-beyaz, kubbemsi yapıda olup, sayısı 0-7 arasında olan küçük folliküller de görülür. Kornu uteriler; burğu tarzında silindirik, saman sapından kurşun kalem kalınlığına kadar değişik boyutlarda görülebilir. Kornu uteriler anılan kriterlere uygun olarak sınıflandırıldıktan sonra ayrıca bir cetvel yardımı ile

uzunluk (cm) ve kalınlık yönünden (mm) ölçümleri yapılmıştır.

Vaginal sitolojik preparatlar hazırlandıktan sonra hücre tiplerinin sınıflandırılmasında çeşitli yazarların (2, 3, 11) ortak kullandıkları yöntem örnek olarak alınmıştır.

Siklus dönemlerindeki asidofilik indeksine ait değerler arasındaki fark Mann-Whitney, ovaryumlardaki follikül çapları Kruskal Wallis, kornu uterilerin uzunlukları ve eni kendi aralarında yapılan karşılaştırmalar Anova testi ile istatistiksel yönden değerlendirilmiştir.

Bulgular

Çalışmada kullanılan kedilerden alınan smear örnekleri ile ovaryum ve uterusların makroskopik değerlendirmelerine ilişkin elde edilen sonuçlar dört tablo halinde özetlenmiştir. Makroskopik incelemeler sonucunda elde edilen verilere göre, toplam 83 kediden 11'inin proöstrus (PÖ), 29'unun östrus (Ö), 26'sının metaöstrus (MÖ) ve 17'sinin anöstrus (AÖ) döneminde olduğu saptanmıştır. Follikül sayısındaki artışın en çok Ö (255 adet follikül), en az ise (46 adet follikül) AÖ döneminde olduğu belirlenmiştir. Hayvan başına düşen

follikül sayısı en az 2.70 ile AÖ döneminde görülürken bu sayı PÖ döneminde 8.36, Ö döneminde ise 8.79 olmuştur. Ö döneminde folliküller %29.5 oranında 2-3 mm büyüklüğünde saptanırken, PÖ ve AÖ döneminde bu büyüklük kategorisindeki folliküllere rastlanmamıştır (Tablo .1).

Hayvan başına düşen korpus hemorajikum sayısı Ö' ta 0.27 ve MÖ'ta 0.92 iken PÖ ve AÖ dönemlerinde korpus hemorajikum saptanmamıştır. Korpus hemorajikumların %100'ünün Ö ve MÖ dönemlerinde ≤ 2 mm büyüklükte olduğu saptanırken, periodik korpus luteumlara yalnızca MÖ döneminde rastlanmıştır (Tablo 2).

Siklus dönmelerine göre kornu uteri uzunluk (cm) ve çaplarının (mm) ölçüm sonuçları tablo 3'te sunulmuştur. Yapılan ölçümler, PÖ, Ö ve MÖ dönemlerinde gerek kornu uteri uzunluğu gerekse kalınlığı bakımından, istatistiksel yönden önemli bir farklılık olmadığını, ancak diğer siklus dönemleri ile AÖ dönemi arasında kornu kalınlıkları açısından önemli sayılan bir farklılık bulunduğunu göstermiştir ($p<0.05$).

Eritrosit ve nötrofil lökositlere kedilerde fazla sayıda rastlanmamıştır. PÖ döneminde vaginal sitolojik

Tablo 1. Siklus dönemlerinde follikül sayısı, yüzdesi ve büyüklükleri.

Table 1. Follicle counts, rate and diameters observed in sexual cycle phases

Siklus dönemi	Hayvan sayısı (n)	Saptanan follikül sayısı (x)	Hayvan başına düşen follikül sayısı X/n	Follikül çapları ve yüzdesi (%)	
				0,5-1,5 mm (%)	2-3 mm (%)
PÖ	11	92	8.36 ^a	92 (100)	-
Ö	29	255	8.79	180 (70.5)	75 (29.5)
MÖ	26	163	6.26	147 (90.2)	16 (9.8)
AÖ	17	46	2.70 ^b	46 (100)	-

^{a,b} $p<0.001$ gruplar arasında fark önemli

Tablo 2. Siklus dönemlerinde korpus hemorajikum ve korpus luteum sayıları ve çapları.

Table 2. Corpus haemoragicum, corpus luteum counts and diameters in sexual cycle phases

Siklus dönemi	Hayvan sayısı (n)	Hayvan başına düşen KH sayısı (x/n)	KH büyüklükleri (mm)		Gelişmiş KL sayısı (n)	Periodik KL büyüklüğü (n)	
			≤ 2 (%)	2.5-3		Gelişen gelişmiş	0-2 mm (%)
PÖ	11	-	--	-	-	-	-
Ö	29	8/29=0.27	100	-	-	-	-
MÖ	26	24/26=0.92	100	-	45/26=1.73	24 (53.3)	21 (46.6)
AÖ	17	-	--	-	-	-	-

Tablo 3. Siklus dönemlerinde kornu uterilerin uzunluğu (cm) ve kalınlığı (mm).

Table 3. Mean uterine body length (cm) and thickness (mm) in sexual cycle phases

Siklus dönemleri	Hayvan sayısı (n)	Kornu uterilerin uzunluk ve kalınlıkları	
		Uzunluklar (cm)	Kalınlık (mm)
PÖ	11	6.36±1.81	5.50±3.84
Ö	29	5.93±0.88	5.17±1.89 ^a
MÖ	26	6.01±0.93	5.23±2.98 ^b
AÖ	17	5.90±1.03	3.25±1.29 ^c

^{b,c} $p<0.05$ guruplar arası fark önemli

^{a,c} $p<0.05$ guruplar arası fark önemli

Tablo 4. Vajinal smear örneklerinde eritrosit ve lökosit saptanan hayvan sayısının farklı siklus dönemlerinde toplam hayvan sayısına oranı (%)
Table 4. Proportion of animals in which vaginal smears contain erythrocyte and leukocytes to total number of animals in sexual cycle phases

Siklus dönemleri	Kedi sayısı N	Eritrosit		Lökosit x/n	
		X/n	(%)	x/n	(%)
Proöstrus	11	0/11	-	3/11	27.27
Östrus	29	4/29	13.79	3/29	10.34
Metöstrus	26	2/26	7.69	4/26	15.38
Anöstrus	17	2/17	11.76	5/17	29.41

x/n; eritrosit, lökosit görülen vaka sayısı/ siklus dönemleri

Tablo 5. Kedilerde siklus dönemlerine göre vajinal hücre dağılımı.
Table 5. Vajinal cell distribution in sexual cycle phases

Hücre tipleri	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Anöstrus
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Bazal	117 (10.6)	15 (0.5)	217 (8.34)	555 (32.64)
Parabazal	216 (19.63)	33 (1.13)	581 (22.34)	751 (44.17)
İntermediar	196 (17.81)	167 (5.75)	400 (15.38)	253 (14.88)
Yükarı süperfisyal	159 (14.45)	1144 (39.44)	492 (18.92)	37 (2.17)
Aşağı süperfisyal	203 (18.45)	782 (26.96)	439 (16.88)	75 (4.41)
Keratinize	209 (19.00)	759 (26.17)	453 (17.42)	29 (1.70)
Asidofilik indeksi (%)	65.90 ^a	93.45 ^b	77.11 ^c	24.70 ^d

a,c p>0.05 gruplar arası fark önemsiz

b,c,p<0.05 gruplar arası fark önemli;

a,b,d,p<0.001 Aynı satırlarda farklı harf taşıyan gruplar arası fark önemli

preperatları bakılan 11 kedinin hiçbirinde eritrosit bulunmamıştır. Ö döneminde ise 29 preperattan sadece 4'ünde (%13.79) az miktarda eritrosit ve 3'ünde (%10.34) tek tük nötrofil lökosit gözlenmiştir. MÖ döneminde bakılan preperatların ancak %15.38 oranında nötrofil lökosit saptanabilmiştir (Tablo 4).

Ö döneminde tüm süperfisyal hücre oranı (Yükarı süperfisyal, Aşağı süperfisyal, Keratinize) %92.57 iken bu oran PÖ döneminde %51.90, MÖ döneminde %53.22 ve AÖ döneminde %8.28 olarak bulunmuştur. Bazal ve parabazal hücre oranı ise AÖ döneminde %76.81, MÖ döneminde %30.68, PÖ döneminde %30.23 buna karşılık Ö döneminde %1.63 oranında saptanmıştır (Tablo 5).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada vajinal sitoloji ile kedide seksüel siklus dönemlerinin birbirinden ayrılıp ayrılamayacağını saptanması ve ayrıca seksüel siklus dönemlerine bağlı fonksiyonel yapılarıdaki ve kornu uterideki gelişen farklılıkların ortaya konulması amaçlanmıştır.

Vajinal sitoloji aracılığı ile kedilerde PÖ ve MÖ dönemleri arasında klinik yönden herhangi bir ayırım yapmanın güç olduğu kanısına varılmıştır. Tüm süperfisyal hücre oranı (PÖ=%51.90; MÖ=%53.22) ve bazal, parabazal hücre oranı (PÖ= %30.23; MÖ=%30.68) bakımından bu seksüel siklus dönemleri arasında herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Köpekte PÖ döneminde yoğun olarak rastlanan eritrositlere (6) kedide rastlanmamış, nötrofil lökositlere ise MÖ döneminde çok

ender (tüm preperatların %7.69'u) ve tek tük, bazen seçilemeyecek miktarda saptanmıştır. Diğer dönemlerde de nötrofil lökositlerin görülmesi bu hücrelere bakarak tanı koymayı güçleştirmektedir.

Bazal hücreler, vajinal smear örneklerinde östrus ve erken metöstrus dönemlerinde sınırlı sayıda görülebilir. Parabazal hücreler ise östrus döneminde hemen hiç görülmezlerken, metaöstrusun son dönemlerinde maksimum seviyede bulunurlar. İntermediar hücrelerin sayıları östrusta azalırken erken metöstrusta hızlı artmaya başlar. Keratinize hücrelerin sayısı siklus boyunca görülmesine karşın östrusta maksimum seviyeye ulaşır (4, 13).

Reiter (11) yaptığı çalışmada hücre kompozisyonu bakımından PÖ ve MÖ dönemleri arasında kedide vajinal sitoloji aracılığı ile herhangi bir ayırım yapılamayacağını ortaya koymuş ve nötrofil lökositlerin MÖ döneminde hazırlanan preperatların sadece %35 oranında görülebildiğini gözlemlemiştir. PÖ döneminde ise boyanan preperatların ancak %36'sını da az miktarda eritrosite rastlamıştır. Christiansen (4) ise kedilerde PÖ döneminde çekirdekli ve kornifiye hücrelerin değişen oranlarda bulunduğunu bu dönemde lökositlerin görülebildiğini buna karşılık eritrositlere rastlamadığını saptamıştır. Preperatların farklı tekniklerle hazırlanmaları bu oranlar arasında farklılıklar oluşturmaktadır (13). Ö döneminde tüm süperfisyal hücre oranları birlikte (Yükarı süperfisyal, Aşağı süperfisyal, Keratinize) hesaplandığında (%92.57), PÖ, MÖ döneminden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Asidofilik indeks kedide her dönemde değişik oranlarda

saptanırken, Ö dönemindeki asidofilik indeksi AÖ dönemine göre %93.45 oran ile daha yüksek saptanmıştır. Asidofilik indeks oranı bakımından da çoğu kez PÖ ve MÖ arasında istatistiksel yönden bir farklılık olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Buna karşın Ö (%93.45) ile AÖ (%24.70) arasındaki asidofilik indeksi istatistiksel yönden önemli bulunmuştur ($p<0.001$).

PÖ döneminde ovaryumların üzerinde büyük ölçüde 1.0 mm'ye kadar olan küçük folliküller saptanırken Ö döneminde 1.5-2.5 mm'ye kadar ulaşan büyük folliküller, küçük kan follikülleri ve korpora lutealar'ın görüldüğü morfolojik olarak saptanmıştır. AÖ döneminde ise az miktarda küçük follikül ve çoğunlukla herhangi bir yapıya rastlanmamaktadır. MÖ döneminde ise 2-3 mm büyüklüğünde korpora lutea ve küçük folliküller saptanmaktadır (11). Yapılan bu çalışmada da araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara uygun olarak PÖ döneminde ≤ 1.5 mm çapındaki küçük folliküller saptanırken, hayvan başına düşen follikül sayısı Ö döneminde 8.79 ile en fazla olmuştur. Ayrıca 2-3 mm büyüklüğündeki folliküllere en fazla Ö döneminde rastlanmıştır. MÖ döneminde gelişmiş korpora luteaların hayvan başına düşen sayısının 1.73 olması da elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada Ö ve MÖ döneminde kornu uteriler AÖ dönemine göre istatistiksel yönden önemli ölçüde ($p<0.05$) daha kalın saptanmıştır. Yapılan çalışmalar PÖ başında, Ö boyunca ve erken MÖ döneminde uterusun diğer dönemlere göre 1-3 mm daha kalın olmasından dolayı ultrasonografik yöntemlerle saptanmasının kolay olduğu, buna karşılık geç MÖ ve AÖ döneminde uterusun incelmelerinden dolayı daha zor saptanabileceği ortaya konmuştur (5,14). Reiter (11) yaptığı morfolojik bakılarda Ö ve MÖ döneminde kornu uterilerin kalın duvarlı, silindirik yapıda olduklarını buna karşılık AÖ döneminde daha ince duvarlı olduklarını saptamıştır. Aynı yazar AÖ ve PÖ döneminde kornu uterilerin diğer dönemlere çaplarının daha düşük olduğunu belirtmiştir. Sunulan çalışmada, Ö, MÖ ve AÖ dönemlerinde kornu uterilerin, kalınlıkları bakımından istatistiksel açıdan önemli olduğu hesaplanmıştır ($p<0.05$).

Yapılan çalışma sonucunda kedilerde vaginal sitoloji aracılığı ile Ö ve AÖ dönemlerinin hücre kompozisyonuna bakarak belirlenebileceği, hayvan başına düşen en fazla follikül sayısının PÖ ve Ö dönemlerinde olduğu ve AÖ döneminde kornuların çapının diğer dönemlere göre daha az olduğu gözlenmiştir.

Kaynaklar

1. **Alaçam E** (1995): *Dişi kedide reproduktif özellikler ve üremenin denetlenmesi*. Veteriner Cerrahi Derg, **1**, 39-42.
2. **Arbeiter K** (1977): *Genitalerkrankungen der Katze*. Kleintierpraxis, **22**, 139-143.
3. **Aslan S, Erünel N, Kılıçoğlu Ç, Fındık M, Baştan A, Kaymaz M** (1995): *Einsatz der Papanicolaou Färbemethode zur Vaginalzytologischen Untersuchung bei der Hündin*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **42**, 431-439.
4. **Christiansen IBJ** (1984): *Reproduction in the Dog and Cat*. 1st Ed. 225-262. Baillier- Tindall, London.
5. **Concannon PW, Hodgson B, Lein D** (1980): *Reflex LH – release in oestrus cats following single and multiple copulations*. Biol. Reprod, **23**, 111-117.
6. **Feldman EC, Nelson RW** (1996): *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. WB Saunders Company, Philadelphia.
7. **Günzel AR, Klugsimon C, Peukert AI** (1995): *Zum Fortpflanzungsgeschehen der Katze-korrespondierende ovarielle und vaginalzytologische Befunde*. Der prakt Tierarzt, **66**, 727-734.
8. **McDonald LE** (1980): *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia.
9. **Paape SR, Shille VM, Setd H, Stabenfeldt GH** (1975): *Luteal activity in the pseudopregnant cat*. Biol Reprod, **13**, 470-474.
10. **Papanicolaou GN** (1942): *A new procedure for staining vaginal smear*. CSI, **95**, 438-439.
11. **Reiter E** (1982): *Die (smear) Diagnostik und Befunde am inneren Genitale von Katzen mit normalem Zyklusablauf und Gynäkopathien*. Doktora Tezi Veterinärmedizinische Universität Wien.
12. **Shille VM, and Stabenfeldt, GH** (1979): *Luteal function in the domestic cat during pseudopregnancy and afer treatment with Prostaglandin F2 α* . Biol Reprod, **21**, 1217-1223.
13. **Volker H** (1980): *Vaginalzytologische Untersuchungen an der Hauskatze (Felis Domestica) unter besonderer Berücksichtigung der Abgrenzung von anovulatorischem und gravidem Zyklus*. Doktora Tezi Tierärztliche Hochschule Hannover.
14. **Yeager AE, Concannon PW** (1990): *Association between the preovulatory luteinizing hormone surge and the early ultrasonographic detection of pregnancy and foetal hearbeats in beagle dogs*. Theriogenology, **34**, 655-665.

Geliş tarihi: 20.04.2004 / Kabul tarihi: 18.06.2004

Yazışma adresi:

Dr. Abuzer Zonturlu

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

Şanlıurfa

e-mail: azonturlu@harran.edu.tr