



T.C.

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Dişi Köpeklerde Seksüel Siklusların Farklı Dönemlerinde İki Farklı
Vaginal Sitoloji Boyama Yöntemi ile Hızlı Progesteron Testinin
Karşılaştırılması**

Veteriner Hekim Birol Can EREN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. İbrahim TAŞAL

BURDUR-2019

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Dişi Köpeklerde Seksüel Siklusların Farklı Dönemlerinde İki Farklı
Vaginal Sitoloji Boyama Yöntemi ile Hızlı Progesteron Testinin
Karşılaştırılması**

Veteriner Hekim Birol Can EREN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. İbrahim TAŞAL

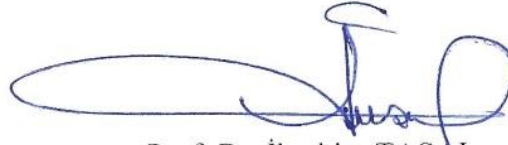
Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0409-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR- 2019

KABUL VE ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Birol Can EREN tarafından *Prof. Dr. İbrahim TAŞAL* yönetiminde hazırlanan '*Dişi Köpeklerde Seksüel Siklusların Farklı Dönemlerinde İki Farklı Vaginal Sitoloji Boyama Yöntemi ile Hızlı Progesteron Testinin Karşılaştırılması*' başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. İbrahim TAŞAL
Burdur MAKÜ Veteriner
Fakültesi
Başkan

Tez Savunma Tarihi
20/02/2019



Doç. Dr. Ali Reha
AÇAOĞLU
Burdur MAKÜ
Veteriner Fakültesi
Jüri



Doç. Dr. Oktay YILMAZ
AKÜ
Veteriner Fakültesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **22.03.2019** Tarih ve **10**... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Doğa
TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TEŞEKKÜR

Mesleki açıdan gelişmemde önemli bir paya sahip olan, başta danışman hocam Prof. Dr. İbrahim TAŞAL olmak üzere emeği geçen bütün hocalarıma, Doç. Dr. A. Reha AĞAOĞLU, Dr. Gökhan BOZKURT, Vet. Hek. M. Muammer SAYGILI, Vet. Hek. Muharrem UYGAN ve Şeref ŞEREF'e, ayrıca bu günlere gelmemde benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.



ETİK BEYAN

Dişi Köpeklerde Seksüel Siklusların Farklı Dönemlerinde İki Farklı Vajinal Sitoloji Boyama Yöntemi ile Hızlı Progesteron Testinin Karşılaştırılması başlıklı tez çalışmamda bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. İbrahim Taşal danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Birol Can EREN

Tarih: 20.02.2019

İmza:



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Köpeklerde Seksüel Sikluslar	3
2.1.1. Proöstrüs	3
2.1.2. Östrüs	3
2.1.3. Diöstrüs	4
2.1.4. Anöstrüs	4
2.2. Vajinal Sitolojinin Yöntemleri ve Uygulama Teknikleri	4
2.2.1. Vajinal Sitolojinin Tarihçesi ve Tanımı	4
2.2.2. Vajinal Smear Örneklerin Alınması	6
2.2.3. Boyama Metodları	7
2.2.3.1. Diff Quik Boyama Metodu	7
2.2.3.2. Papanicolaou Tekniği	8
2.2.4. Vajinal Hücrelerin Sınıflandırılması	9
2.2.4.1. Bazal Hücreler	9
2.2.4.2. Parabazal Hücreler	9
2.2.4.3. İntermediyer Hücreler	9
2.2.4.4. Süperfisiyel Hücreler	10
2.2.4.5. Çekirdeksiz Döküntüler	10
2.2.4.6. Metaöstrus Hücreleri	10
2.2.4.7. Köpük Hücreleri	11
2.2.4.8. Kan Hücreleri	11
2.2.4.9. Tümör Hücreleri	11
2.3. Vajinal Sitoloji ile Öströs Siklusunun Takibi	11
2.3.1. Erken Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler	11
2.3.2. Orta Proöstrüs Döneminde Vajinal Hücreler	12
2.3.3. Geç Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler	12
2.3.4. Östrüs Döneminde Vajinal Hücreler	12
2.3.5. Diöstrüs Döneminde Vajinal Hücreler	13
2.3.6. Anöstrüs Döneminde Vajinal hücreler	13
2.4. Üremenin Kontrolünde Vajinal Sitoloji	14
2.4.1. Vajinal Sitoloji ile Uygun Çiftleşme Zamanının Belirlenmesi	14
2.4.2. Vajinal Sitoloji ile Gebeliğin Saptanması	16
2.4.3. Vajinal Sitoloji ile İstenmeyen Çiftleşme ve Gebeliklerde Uygulanacak Sağaltımın Belirlenmesi	16
2.5. Patolojik Olgularda Vajinal Sitoloji'nin Kullanımı	16

2.5.1.İnfertilite Problemleri	16
2.5.1.1. Uzayan Proöstrüste Vajinal Sitoloji Bulguları	16
2.5.1.2.Uzayan Östrüste Vajinal Sitoloji Bulguları	17
2.5.2.Transmissible Veneral Tümör	17
2.5.3.Piyometra	18
2.5.4.Ovarian Remnat Sendromu	19
2.5.5. Plasental Bölgelerin Subinvolyasyonu	19
2.5.6. Vajinitis	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Hayvan Materyali	21
3.2. Klinik Uygulamalar	21
3.3. Laboratuvar Analizleri	22
3.4. İstatistiksel Analizler	24
4.BULGULAR	25
4.1. Klinik Bulgular	25
4.1.1. Proöstrüs Dönemindeki Klinik Bulgular	25
4.1.2. Östrüs Dönemindeki Klinik Bulgular	25
4.1.3. Diöstrüs Dönemindeki Klinik Bulgular	25
4.2. Laboratuvar Bulgular	25
4.2.1. Vajinal Epitel Hücrelerin Sınıflandırılması	25
4.2.2. Proöstrüs Döneminde Laboratuvar Bulguları	26
4.2.3. Östrüs Döneminde Laboratuvar Bulguları	29
4.2.4. Diöstrüs Döneminde Laboratuvar Bulguları	31
4.2.5. Papanicolaou ve Diff Quick Boyama Tekniği Avantaj ve Dezavantajları	33
4.2.6. Piyometra Laboratuvar Bulguları	33
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
7. KAYNAKLAR	41
8. ÖZGEÇMİŞ	47

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Köpekten vajinal smear alma tekniği	7
Şekil 2.2.	Tümör hücrelerinin sitolojik görünümü	18
Şekil 3.1.	Papanicolaou boyama yöntemi için gerekli malzemeler	23
Şekil 3.2.	Diff Quick boyama yöntemi için gerekli malzemeler	23
Şekil 3.3.	Target Canine Ovulation Kit (Hızlı Progesteron Testi)	24
Şekil 4.1.	A: Bazal-Parabazal hücre, B: İntermediyer hücre, C: Çekirdekli süperfiyel hücre, D: Keratinize süperfisiyel hücre, E: Metaöstrüm hücre	26
Şekil 4.2.	A: Papanicoula Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler, B: Diff Quick Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler	27
Şekil 4.3.	Papanicoula Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler, B: Diff Quick Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler	27
Şekil 4.4.	A: Papanicoula Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler, B: Diff Quick Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler	28
Şekil 4.5.	A: Diff Quick Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Östrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler, B: Papanicoula Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Östrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler	30
Şekil 4.6.	A: Diff Quick Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Diöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler, B: Papanicoula Boyama Yöntemi ile Elde Edilen Diöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler	32
Şekil 4.7.	A: Piyometra ultrasonografik görüntüsü, B: Operasyon sonrası uterusun makroskopik görünümü, C: Papanicolaou boyama yöntemi ile piyometra, D: Diff Quick boyama yöntemi ile piyometra	34
Şekil 4.8.	Hızlı progesteron test kiti sonuç skalası A: Erken proöstrüs, B: Orta proöstrüs, C: Geç proöstrüs, D: Östrüs. E: Diöstrüs, F: Piyometra	34

TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Preovulator LH Dalgalanmasından Sonra ve Önceki Dönemlerde Normal Fertil Köpeklerdeki Klinik Parametreler	15
Tablo 4.1.	Proöstrüs döneminde iki boyama yöntemi ile elde edilen vajinal hücre istatistik verileri	28
Tablo 4.2.	Östrüs döneminde iki boyama yöntemi ile elde edilen vajinal hücre istatistik verileri	30
Tablo 4.3.	Diöstrüs döneminde iki boyama yöntemi ile elde edilen vajinal hücre istatistik verileri	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KEH	Endometrial Hiperplazi
LH	Lüteinleştirici Hormon
NaCl	Sodyum Klorür
OHE	Ovariohisterektomi
OVE	Ovaryektomi
TVT	Transmisible Veneral Tümör



ÖZET

Dişi Köpeklerde Seksüel Siklusların Farklı Dönemlerinde İki Farklı Vajinal Sitoloji Boyama Yöntemi ile Hızlı Progesteron Testinin Karşılaştırılması

Bu çalışmada, dişi köpeklerde seksüel siklusların farklı dönemlerinde iki farklı vajinal sitoloji boyama yönteminin avantajı ve dezavantajı karşılaştırılmış ve belirlenen seksüel dönem ile hızlı progesteron testi sonuçlarının güvenilirliğinin ortaya konulması amaçlandı. Materyal olarak 37 adet dişi köpek kullanılmış olup dişi köpekler seksüel dönemlerine göre (proöstrüs, östrüs, metöstrüs) 10'ar adet olmak üzere üç gruba ayrıldı. Piyometralı farklı dişi köpekten de bir grup oluşturuldu. Çalışmada proöstrüs evresi smear sonucunda her iki boyama yönteminde bol miktarda eritrosit ve nötrofil görüldü. Papanicolaou boyama yöntemi ile 12.3 ± 2.89 parabazal, 52.4 ± 1.67 intermediyer, 27.5 ± 1.23 çekirdekli süperfisiyel ve 7.8 ± 1.07 keratinize süperfisiyel hücreler, diff quick boyama ile 10.5 ± 2.7 parabazal, 52.4 ± 1.28 intermediyer, 28.4 ± 1.43 çekirdekli süperfisiyel, 8.7 ± 1.07 keratinize süperfisiyel hücre görüldü. Östrüs döneminde papanicolaou boyama ile 77.5 ± 0.93 keratinize süperfisiyel, 20.3 ± 1.14 çekirdekli süperfisiyel, 2.2 ± 0.786 intermediyer hücre ve diff quick boyama ile 78.7 ± 1.08 keratinize süperfisiyel, 20 ± 1.06 çekirdekli süperfisiyel, 1.3 ± 0.473 intermediyer hücre gözlemlendi ve her iki boyamada parabazal hücrelere rastlanmadı. Diöstrüs döneminde papanicolaou boyama ile 0.8 ± 0.512 oranında keratinize süperfisiyel, 11.7 ± 1.12 çekirdekli süperfisiyel, 29 ± 1.18 intermediyer, 58.5 ± 1.80 bazal-parabazal hücre, diff quick boyama ile 1.5 ± 0.885 oranında keratinize süperfisiyel, 14 ± 1.29 çekirdekli süperfisiyel, 28.8 ± 1.19 oranında intermediyer, 55.8 ± 1.74 bazal-parabazal hücre ve her iki boyama yönteminde metaöstrüs hücresi görüldü. Aynı zamanda piyometra tanısında çok miktarda bazal ve parabazal tipte hücreler, nötrofil ve bakteriler görüldü. Hızlı progesteron testi ile proöstrüs evresinde C1-C2, östrüs evresinde C4, diöstrüs evresinde C4 ve piyometra olgusunda C2 skalası görüldü. Kullanılan iki farklı boyama yönteminin maliyeti, kullanım kolaylığı, güvenilirlik, hücrelerin görüntü kalitesi gibi kriterler karşılaştırıldı. Vajinal sitoloji sonucunda belirlenen seksüel siklus ile hızlı progesteron testi renk skalası karşılaştırılarak güvenilirliği belirlendi. Piyometralı köpeklerde de aynı işlemler uygulandı. Sonuç olarak bu araştırmada, vajinal sitoloji yönteminde iki farklı boyama metodu kullanılarak güvenilirlik derecesi, avantaj ve dezavantajları kıyaslanmış ve papanicolaou boyama yöntemiyle vajinal hücrelerin ayırt edilmesi diff quick boyama yöntemine göre daha kolay olduğu, ancak klinik ortamda kullanımı ve hızlı sonuç vermesi açısından diff quick boyama yöntemi de tercih edilebileceği görülmüştür. Bununla birlikte vajinal sitoloji ile birlikte hızlı progesteron testi ile progesteron skalasına bakılarak seksüel siklusun dönemlerinin doğru teşhisinin yapılabildiği, piyometra teşhisi için ise vajinal sitolojinin tek başına yeterli olmadığı, vajinal sitoloji ile birlikte progesteron değeri ve ultrasonografi yönteminden faydalanılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Progesteron test kiti, Piyometra, Seksüel siklus, Vajinal sitoloji.

ABSTRACT

The comparison of two different vaginal cytology staining and rapid Progesterone test in Bitch different time of sexual cycle.

In this study, we aimed to compare the advantages and disadvantages of two different vaginal cytology staining methods in different stages of sexual cycles in female dogs and to find out the reliability of the results of the determined sexual period and fast progesterone test results. In the study material, 37 female dogs were used, and female dogs were divided into three groups (10 dogs in each group) according to their sexual period (prooestrus, oestrus, metoestrus). A group of different female dogs with pyometra was also formed. As a result of smears performed during the progestus period, both erythrocytes and neutrophils were observed in both staining methods. $12.3 \pm 2.89\%$ parabasals, $52.4 \pm 1.67\%$ intermediates, $27.5 \pm 1.23\%$ superficials and $7.8 \pm 1.07\%$ keratinized superficial cells with papanicolaou staining method; $10.5 \pm 2.7\%$ parabasals, $52.4 \pm 1.28\%$ intermediates, $28.4 \pm 1.43\%$ superficials with nucleus, $8.7 \pm 1.07\%$ keratinized superficial cells were seen by diff quick staining method. Papanicolaou staining method when applied during the oestrus period $77.5 \pm 0.93\%$ keratinized superficials, $20.3 \pm 1.14\%$ superficials with nucleus, $2.2 \pm 0.786\%$ intermediary cells; in the diff quick staining method, $78.7 \pm 1.08\%$ keratinized superficials, $20 \pm 1.06\%$ superficials, $1.3 \pm 0.473\%$ intermediary cells were observed and no parabasic cells were observed in both of the methods. Papanicolaou staining method was applied as diuretic stage with $0.8 \pm 0.512\%$ keratinized superficials, $11.7 \pm 1.12\%$ superficials, $29 \pm 1.18\%$ intermediates, $58.5 \pm 1.80\%$ basal-parabasal cells; In diff quick dyeing, $1.5 \pm 0.885\%$ keratinized superficials, 14% core superficials, $28.8 \pm 1.19\%$ intermediates, $55.8 \pm 1.74\%$ basal-parabasal cells and metoestrus cells were seen in both staining methods. At the same time, a large amount of basal and parabasal type cells, neutrophils and bacteria were seen in smears of group pyometra. The progesterone test kit showed C1-C2 in the proestrous phase, C4 in the estrous stage, C4 in the diestrus stage and C2 scale in the pyometra case. Two different staining methods were compared in terms of cost, ease of use, reliability, image quality of cells. The reliability of the test was determined by comparing the sexual cycle determined by vaginal cytology and rapid progesterone test color scale. The same procedure was applied to dogs with pyometers. As a result of this study; reliability, advantages and disadvantages were compared by using two different staining methods in vaginal cytology method and it was found that the differentiation of vaginal cells with papanicolaou staining method was easier than diff quick painting method, however, diff quick staining method could be preferred because of its rapid results in clinics. In addition, it was concluded that vaginal cytology and progesterone test kit can be used to diagnose the periods of sexual cycle.

Key Words: Progesterone test kit, Pyometra, Sexual cycles, Vaginal cytology.

1. GİRİŞ

Köpekler pubertasa ortalama 6-24. aylarda erişir. Pubertasa erişme yaşını başta ırk, beslenme, stres ve hastalıklar olmak üzere birçok faktör etkilemektedir. Küçük ırklarda ilk kızgınlıklar 6-10 aylık yaşlarda görülmeye başlarken, büyük ırklarda 18-20 aya kadar uzayabilir (Concannon, 2011; Lem, 1983; Shille ve Stabenfeldt, 1980). En ideal reproduktif verimlilik 3-4. sıklıktan itibaren görülmeye başlar. İlk çiftleşme yaşı dişi köpeklerde 11-18 ay, erkek köpeklerde 17-19 aydır. Irka göre değişmekle birlikte en uygun çiftleşme yaşı 2-6 yaş aralığıdır (Concannon, 2011; Johnston ve ark., 2001). Dişi köpekler monoöstrik yapıda, mevsime bağlı olmadan spontan ovulasyon gösteren ve bir batında birden fazla yavru doğurabilen memelilerdir. Sıklık döngü yılda bir veya iki kere tekrarlanmaktadır. İki siklus arasında geçen süre 4-9 ay olup ortalama 7 aydır (Johnston ve ark., 2001). İki siklus arasındaki geçen sürenin dört aydan daha kısa veya 11 aydan daha uzun olması bir infertilite sebebi olarak açıklanmaktadır (Concannon PW, 2011; Johnston ve ark., 2001). Köpeklerde seksüel siklus evreleri ilk olarak 1900 yılında Heape tarafından bulunmuştur (Heape, 1900; Kalkan ve Horoz, 2007). Dişi köpeklerde seksüel siklus proöstrüs, östrüs, diöstrüs ve anöstrüs evreleri olmak üzere dört dönemden oluşur (Haşegan ve ark., 2012). Bazı kaynaklarda ise diöstrüs evresi metöstrüs evresi olarakta kabul edilmektedir (Okkens ve ark., 1992; Haşegan ve ark., 2012).

Vajinal sitoloji, vajina hücrelerinin belirli yöntemlerle toplanarak mikroskopik ortamda incelenmesi olarak tanımlanmaktadır. Vajinal sitolojik muayene, dişi köpeklerde genital kanal organlarında şekillenen fizyolojik olayların teşhisinde önemlidir. Köpeklerde uygulanan vajinal sitoloji östrüs siklusunun, endokrin yapının ve reproduktif patolojik oluşumların değerlendirilmesinde geçerli bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Christiansen, 1984; Concannon, 2011; England, 1992).

Vajinal sitolojik muayenenin yapılabilmesi için vajinal smear alınması gerekir. Vajinal smear alınırken kullanılan yöntem ucuz, basit, kolay kullanılabilir

olmalı ve özellikle hayvanı rahatsız etmemelidir (England, 1992; Kırşan ve ark.,1996).

Dişi köpeklerde seksüel siklusların belirlenmesinde kullanılan vajinal sitoloji uygulama kolaylığı ve maliyet düşüklüğü ile sıkça tercih edilen bir yöntemdir. Bu araştırmada vajinal sitoloji ile dişi köpeklerin seksüel sikluslarının belirlenmesi, Papanicolaou ile Diff quick boyama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlarının araştırılması ve vajinal sitoloji ile belirlenen seksüel siklusların hızlı progesteron test kiti ile karşılaştırılması ve bunlara ilave olarakta ayrıca piyometralı köpeklerde vajinal sitoloji sonuçları ile hızlı progesteron testinin kıyaslanması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Köpeklerde Seksüel Sikluslar

2.1.1. Proöstrüs

Seksüel aktivitenin başladığı dönemdir. Proöstrüs süresi 2-22 gün arasında değişmekte olup ortalama 9 günü kapsar. Bu dönemde Vulvada ödem ve şişme meydana gelir. Bununla birlikte vajinada kanlı bir akıntı gözlenir. Bu kanlı akıntı proöstrüsün başlangıcı olarak kabul edilir. Diapedez tarzı kanlı akıntı, artan östrojen etkisi altında, kökenini subepitelyal damarlardan alır. Bu dönemde dişi köpekler feromon salgılarının etkisiyle erkek köpekler için çekici bir etkiye sahiptir. Ancak bu dönemde dişi köpekler çiftleşmeyi reddederler (Haşegan ve ark., 2012; Johnston ve ark., Pretzer, 2008). Anöstrüs döneminde seksüel reflexler görülmezken, proöstrüs ve erken östrüs döneminde görülmeye başlar. Bu reflexler, vulvanın dorsoline dokunulduğunda vulvanın yukarı doğru hareket etmesini sağlar, vulvanın üst kısmına dokunulduğunda ise kuyruğunu yana doğru çekme hareketi gösterir (Johnston ve ark., 2001, Tural. 2012) .

2.1.2. Östrüs

Dişi köpeğin çiftleşmeyi kabul ettiği dönemi kapsar. 2-24 gün arasında değişkenlik gösterir. Ortalama 9 gün olarak kabul edilir. Köpek ırklarına göre değişim gösterebilir. Östrüsün 8. Günü fertil östrüsün sonu olarak kabul edilir. Bu dönemde, vajinadan saman sarısı şeklinde akıntı meydana gelir (Johnston ve ark., 2001). Östradiol konsantrasyonunun azalması, progesteron konsantrasyonunun artmaya başlamasıyla dişi köpek çiftleşmeyi kabul eder (Johnston ve ark., 2001). Feromon salgısı bu dönemde en yüksek seviyede görülür. Ovulasyon, Luteinleştirici Hormon (LH) pikinden 2-3 gün sonra spontan olarak gelişir (Concannon, 2011).

Çiftlik hayvanlarına kıyasla, dişi köpeklerde ovulasyon öncesi progesteron seviyesi artış göstermeye başlar. Östrüs dönemindeki progesteron artışı dişi köpeklere özgüdür (Arbeiter ve ark., 1991; Johnston ve ark., 2001, Tural, 2012).

Dişi köpeklerde oosit, primer oosit olarak atılır. Ovulasyon sonrası 2-3. günlerinde sekonder oosite döner. Oositler tuba uterina'nın 2/3'lük kısmına gelir. Embriyolar erken blastosist sırasında uterusu inerler (Johnston ve ark., 2001, Tural, 2012).

2.1.3. Diöstrüs (Metöstrüs)

Korpus luteumun (CL) oluştuğu ve gelişmeye başladığı ovulasyon sonrası dönemi olarak adlandırılır. Dişi köpeğin çiftleşmeyi reddetmesiyle başlar (Arbeiter ve ark., 1991; Concannon, 2011). Diöstrüs döneminde etkin olan hormon progesterondur. CL gebelik olsa da olmasa da 45-70. güne kadar progesteron salgılamaya devam eder (Johnston ve ark., 2001). Serum progesteron konsantrasyonu LH piki sırasında hızla artarak 1-2 ng/ml seviyesinde hızla artış gösterir (Tural, 2012). Dişi gebe ise diöstrüs evresi 56-58 gün sürebilir ve bunu laktasyon izler (Pretzer, 2008).

2.1.4. Anöstrüs

Seksüel dinlenme evresi olarak tanımlanan ve proöstrüsün başlangıcına kadar geçen süreyi kapsar. Anöstrüs döneminde östrojen konsantrasyonundaki hafif dalgalanmalar foliküler gelişimin bir sonucudur. Serum progesteron konsantrasyonu bazal seviyenin altında seyreder. Anöstrüs dönemi ortalama 120 gün sürer. Bu süre; ırk, beslenme, mevsim, yaş ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Concannon, 2011; Johnston ve ark., 2001).

2.2. Vajinal Sitoloji Yöntemleri ve Uygulama Teknikleri

2.2.1. Vajinal Sitolojinin Tarihçesi ve Tanımı

Vajinal hücrelerin belirli tekniklerle toplanıp, mikroskopik ortamda incelenmesine vajinal sitoloji adı verilir (Christiansen, 1984; England, 1992; Kırşan ve ark., 1996). Vajinal mukozadaki hücrelerin ovaryum da meydana gelen hormonlardan etkilenme durumu ilk kez 1847'de Pouchet öne sürmüştür.

1928'de Papanicolaou tarafından da vajinal sitoloji muayene yöntemi keşfedilmiştir (Erüenal, 2000). Roszel (1977), optimal çiftleşme zamanını belirlemek amacıyla vajinal sitolojiden yararlanılabileceğini bildirmiştir.

Proöstrüs dönemiminin başlamasıyla birlikte östrojen konsatrasyonunda artma ve bununla birlikte vajina epitelinde poliferasyonlar şekillenmeye başlar. Anöstrüs döneminde kübik ve iki katmanlı olarak bulunan vajina epiteli, östrüs döneminde 30'u aşan çok katlı yapıya dönüşür ve buna bağlı olarak vajina epiteli kalınlaşır. Östrojen konsatrasyonun artmasıyla birlikte bazal membranlardan başlayarak sayılarının yükselişe geçtiği ve birbirlerinin üzerinde birikerek tabakalar oluşturan hücreler, submukozadaki mevcut kan damarlarından ayrılır. Bu ayrılmanın sonucunda hücresel ölüm gerçekleşir. Keratinizasyon, nükleer piknoz ve karyoreksis olarak çekirdekte oluşur. Bütün bu değişimler, çiftleşme esnasında vajina mukozasının korunmasıyla yakından ilgilidir. Hücreler ölmeye devam ettikçe düzensiz şekle ve solgun boya alan hücreler haline gelir. Hormonlar tarafından uyarılan değişimlerin yansması olarak döküntü hücreler uygun bir şekilde toplandığı sürece, mikroskopik inceleme fırsatını sağlar ve siklik evre belirlenerek dişi köpeklerde optimum çiftleşme zamanı tespit edilmektedir (Roszel, 1975).

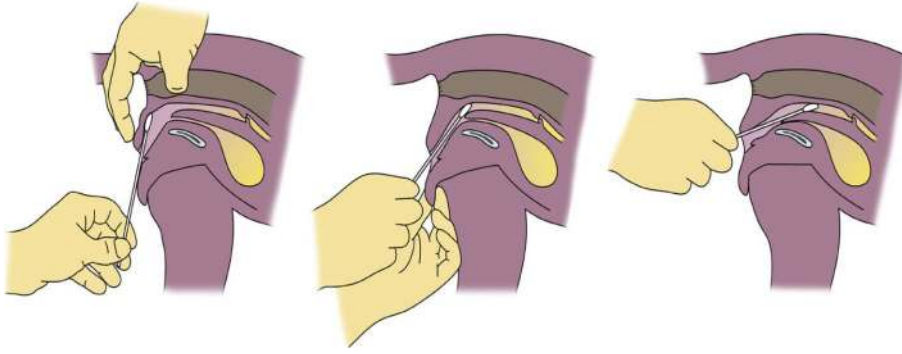
Wright (1990), 11 adet dişi köpek üzerinde yaptığı çalışmada vajinal sitoloji ve plazma progesteron yoğunluğunun, normal şartlarda üremenin kontrolü ve reproduktif sistem hastalıkları bulgusu üzerinde önemli olduğunu bildirmiştir.

Vajinal sitolojinin kullanılmasıyla en uygun çiftleşme süreci tespitinin yanı sıra, anovulasyon, bölünmüş östrüs, vajinadaki kanamaların nedeni, yangı, lenfosarkom, transmissible veneral tümör (TVT), vajinal hiperplazi gibi hastalıkların belirlenebileceği kaydedilmiştir (Baştan ve ark., 2003, Erüenal, 2000; Wehrend ve ark., 2013).

2.2.2. Vajinal Smear Örneklerin Alınması

Vajinal sitolojik muayenenin yapılabilmesi için vajinadan uygun smear örneğinin alınması gerekmektedir. Vajinal smear alınırken kullanılan yöntem ucuz, basit, kolay kullanılabilir olmalı ve özellikle hayvanı rahatsız veya huzursuz etmemelidir. Vajinal smear, genellikle mikrobiyolojik swap aracılığıyla alınır. Swap spekulumla birlikte spatula veya aspirasyon tekniklerinden biri kullanılarak alınabilir. Smear alma işleminde sadece swap kullanılabileceği gibi swap, vajinal spekulum veya vajinoskopa birlikte kullanılabilir. Örnek alınmadan önce kullanılacak olan steril pamuklu çubuğun sodyum klorür (NaCl) ile ıslatılması gereklidir. Swap uzunlukları köpek ırklarına göre değişiklik göstermektedir. Tercih edilecek swap uzunlukları küçük ırk köpekler en az 5-7 cm, iri ırk köpeklerde ise en az 10-12 cm uzunlukta tercih edilmelidir (Beimborn ve ark., 2013, Concannon, 1986; Feldman ve Nelson, 2004). Kullanılacak olan malzemeler, el yardımı ile ayrılan vulva dudakları arasından, dorsale doğru 45 derecelik açıyla, klitoral fossa ve orifisiyum üretra eksternaya temas edilmeden, vajinaya kadar sokularak horizontal olarak vajinada ilerletilir (Şekil 2.1.) (Feldman ve Nelson, 2004). Vajinal smear vajinanın dorsal duvarından alınması gereklidir. Tam olarak yerleştirilen swap, yeterince hücre toplanması için kendi ekseninde 2-3 kez döndürülür. Kontaminasyondan korunup doğrudan vajinaya ulaşabilmesi için spekulum veya vajinoskopdan faydalanılır (Feldman ve Nelson, 2004).

Gerekli niteliklere sahip olmayan bir vajinoskop veya spekulum gibi araç kullanılmadan yapılan smear işleminde, travmaya bağlı olarak eritrositler, kontaminasyon sebebi ile idrar kristalleri ve fungal sporların bulunması ile birlikte yanlış tanı veya alınan smearların yanlış bir şekilde yorumlanmasına sebep verebilir (Roszel, 1977). Doğru bir sonuç alabilmek için, alınan örnekler vestibulum ve klitoral fossadan alınmamalıdır (Feldman ve Nelson, 2004). Alınan smear örneği zaman kaybetmeden lam üzerinde kendi etrafında döndürülerek preperat hazırlanır. Çoğunlukla bir lam üzerine yan yana iki tane yayma yapılmalıdır. Her dişi köpeklerden iki adet preperat hazırlanması tercih edilir (Beimborn ve ark., 2013).



Şekil 2.1. Köpekten vajinal smear alma tekniği (Autumn, 2015)

2.2.3. Boyama Metodları

Eksfoliatif vajinal sitoloji için, hücre elde etmede kullanılan tüm tekniklerle beraber smearların boyanması da oldukça önemlidir. Veteriner hekimlerce rutin olarak kullanılmak üzere seçilmiş boyalar, kullanımı kolay, maliyeti düşük, tutarlı sonuç veren, uzun bir süre kolayca depolanabilecek ve kalıcı preparatlar oluşturacak nitelikte olmalıdır (Feldman ve Nelson, 1987). Boyama yöntemi ne olursa olsun, tüm solüsyonlar günlük olarak süzülüp, hafta bir kez yaklaşık 5 ml taze boya ilave edilmelidir. Diğer tüm solüsyonlar da taze olanları ile aynı sıklıkta yenilenmelidir (Roszel, 1975).

Trikrom boyalar hormonal sitoloji için, oldukça yararlıdır. Çünkü epitel hücrelerinin sitoplazmaları, dolaşımdaki östrojenin etkisi altında, maviden turuncuya kadar değişiklik gösterir. Bunun nedeni keratin prekürsörlerinin gelişimidir. Bu yüzden, turuncu sitoplazmalı geniş epitel hücreler, smearın hemen hemen tamamını kapladığında, östrüs kolayca tanınabilir (Concannon, 1986; Roszel, 1975).

2.2.3.1. Diff Quik Boyama Metodu

Rutin kullanım için önerilen önemli bir boyadır. Kullanımı kolay, tutarlı sonuç verir ve uygun maliyetlidir. Kırmızı kan hücrelerini ve vajinal epitel hücrelerini güvenilir olarak boyar. Modifiye bir Giemsa Wright boyasıdır. Lamlar methanol ve iki boyama solüsyonuna daldırılır. Vajinal smearların, bu iki solüsyona, periferik kan smearlarının boyanması için gereken normal süreden daha uzun bir süre

daldırılması önerilir. Diff Quik ile boyanmış lamalar, eğer arzu edilirse günlerce saklanabilir. Kalıcı bir kılıf ile bu süre daha da uzun hale getirilir (Feldman ve Nelson, 1987).

Avantajları :

Basit kullanımlıdır.

Tutarlı sonuçlar verir.

Dezavantajları :

Kullanılan solüsyonlarda fiksator kullanılmayacaksa hızla buharlaşır.

Solüsyonlar sık sık değiştirilmesi gereklidir (Erüna, 2000).

2.2.3.2. Papanicolaou Tekniğı

George N. Papanicolaou'nun bu konuyla ilgili araştırmasında, boyama tekniğinin avantajları ;

1.Epiteliyel hücreler ve eritrositler bu boyama ile daha transparandır. Hücreler, kolay ayırt edilir. Pek çok karsinom benzeri patolojik durumda, vajinal akıntı lam üzerinde kalın bir tabaka oluşturacak biçimde kanla karışık durumdadır. Bu gibi kanla zengin smearlar için, derinlemesine boyandıklarında kolay ayırt edilebildiğini ifade etmiştir.

2.Asidofilik hücrelerin rengi, kırmızıdan turuncuya kadar değişir. Bu da, kesin smear tiplerinin idenfikasyonuna yardım etmektedir. Bazofilik hücreler, yeşil veya mavi boyanırlar.

3.Kana tutunmuş hücreler ve eritrositlerin kolayca tanınmasına izin veren, karakteristik bir, turuncu veya turuncu-yeşil renk aldığını bildirmiştir.

4.Kısmi veya tamamıyla kurumaya bırakılmış smearlar dahi, bu metodla başarılı biçimde boyanabilmişlerdir (Busch ve Schulz, 1993; Christe ve ar., 1972; Erüna, 2000; Papanicolaou, 1972).

2.2.4. Vajinal Hücrelerin Sınıflandırılması

Vajinal sitolojide hücre tipleri vajinal mukozanın çok katlı epitelyum katından başlayarak lümene doğru ‘bazal, parabazal, intermediyer, süperfisiyel hücre’ olarak sınıflandırılır. Süperfisiyel hücrelerin üzerini kaplayan çekirdeksiz materyal ise ‘keratinize’ olarak adlandırılır (Feldmen ve Nelson, 2004). Vajinada proöstrüs ve östrüs sırasında eksfoliatif vajinal epitel hücrelerinde değişim meydana gelir. Bu değişim sadece, dolaşımdaki östrojenin artışına bağlıdır. Östrojen, vajinal duvarda kalınlaşmaya, kan desteğinden yoksun kalan hücrelerde ise dökülmeye yol açar (Christe ve ark., 1984; Feldmen ve Nelson, 2004).

2.2.4.1. Bazal Hücreler

Bazal hücreler vajinal smearda epitelisel hücrelerin gözlemlenmesine sebep olurlar. Bunlar, az sayıda sitoplazmalı, bazofilik boya alan, çekirdeği silindirik ve bazal konumlu küçük hücrelerdir. Vajinal smearda nadiren gözlemlenirler (Christe ve ark., 1984; Roszel, 1977).

2.2.4.2. Parabazal Hücreler

Parabazal hücreler yuvarlak, oval şekilli, büyük ve merkezi yerleşimli çekirdeği olan küçük hücrelerdir. Çekirdeği düşük metabolik aktiviteden ötürü Papanicolaou, Wright boyama yöntemleri ile mavi (bazofilik) boyanırken sitoplazmanın soluk renkli olduğu gözlemlenir (Christe ve ark., 1984; Concannon, 1986; Roszel, 1977).

2.2.4.3. İntermediyer Hücreler

İntermediyer hücreler sitoplazma miktarına bağlı olarak küçük ve büyük intermediyer hücre olarak ikiye ayrılır. Hem küçük hem büyük intermediyer hücreler parabazal hücre çekirdeğine benzer ve parabazal hücrelerin yaklaşık iki katı büyüklüğündedir. Büyük intermediyer hücreler süperfisiyel hücrelerin sitoplazmasıyla benzerlik gösterir ve sitoplazmaları düzensiz, katlanmış ve köşelidir.

Küçük intermediyer hücreler parabazal hücreler ile olgun hücreler arasındaki geçiş hücreleridir. Bu yüzden erken intermediyer hücre olarak adlandırılır. Biçimsel olarak yuvarlak, çoğu kez elipsoid yapıda olan hücrelerdir. Sitoplazması bazofilik olarak boyanır. Östrojen etkisine girmiş hücreler olup, periferleri köşeli, keskin kıvrımlı bazen de düzenlidir. Genişlikleri en çok 40-75 µm'dir (Christe ve ark., 1984; Erüenal, 2000; Evans ve Savage, 1970).

2.2.4.4. Süperfisiyel Hücreler

Vajinal sitolojide görülen en büyük hücreler olup çekirdekli ve çekirdeksiz olarak iki formda görülür. Çekirdek formu küçük piknotik veya solgun, sitoplazması ise asidofilik görünümündedir. Sitoplazmik boyanın yoğunluğu aynı zamanda kornifikasyon ve dejenerasyonun derecesine bağlı olarak değişebilir. Süperfisiyel hücreler köşeli, kıvrımlı, düzensiz şekilli ve çapları 40-75 µm arasındadır (Christe ve ark., 1984; Concannon, 1986; Roszel, 1977; Erüenal, 2000).

2.2.4.5. Çekirdeksiz Döküntüler

Anükleer süperfisiyel hücreler olarak da bilinirler. Anükleer döküntüler, geniş, düzensiz, köşeli hücrelerdir. Aynı zamanda tam kornifiye ya da tam keratinize hücreler olarak da adlandırılabilirler. Çapları 30-60 µm arasında değişir (Christe ve ark., 1984; Concannon, 1986; Roszel, 1977; Feldman ve Nelson, 2004).

2.2.4.6. Metaöstrüs Hücreleri

Metöstrüs hücreleri, sitoplazmasında bir ya da daha fazla nötrofile sahip büyük intermediyer hücrelerdir. Bu hücreler genellikle erken diöstrüs veya vajinitis olgularında, nadiren de erken proöstrüste görülebilir (Christe ve ark., 1984; Roszel, 1977).

2.2.4.7. Köpük Hücreleri

Köpük hücreleri, sitoplazmik vakuollere sahip olan parabazal ve intermediyer hücreler olup, diöstrüs ve anöstrüste görülebilmektedirler. Bu hücelere ‘foam’ hücreleri olarak da adlandırılır (Christe ve ark., 1984; Roszel, 1977).

2.2.4.8. Kan Hücreleri

Eritrositler yuvarlak veya hafifçe tırtıklı, yarı şeffaf, solgun turuncu renkte görülür. Nötrofiller ise koyu renkli multilobüler çekirdekli, düzgün ana hatlı, temiz sitoplazmalı hücrelerdir. Erken ve orta proöstrüste, mukoza lökosit göçünden dolayı kalınlaşır. Hücre blokajından önce smearlarda gözlenen lökositler sıklıkla dejeneredir (Christe ve ark., 1984; Roszel, 1977).

2.2.4.9. Tümör Hücreleri

Tümör hücreleri yaklaşık 14-30 µm çapında, belirgin bir çekirdekçikle birlikte yuvarlaktan ovale değişen, belirgin vakuollü ve düşük bir çekirdek-sitoplazma oranına sahiptir (Christe ve ark., 1984; Erüenal ve ark.,2000).

2.3. Vajinal Sitoloji ile Östrüs Siklusunun Takibi

2.3.1. Erken Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler

Köpeklerde, erken proöstrüs ve anöstrüs döneminde yapılan vajinal smearlar birbiriyle benzerlik gösterebilir. Bu benzerlik proöstrüs döneminde hızlı gelişen endometriyumda şekillenen kanama ile ayırt edilebilir. Bu nedenle vajinal smearda eritrosit, lökosit, çok miktarda parabazal ile intermediyer hücreler az sayıda ise süperfisiyel hücreler görülür. Bu dönemde yapılan vajinal smearların zemini kirli bir görüntü verir (Çiftcier ve Uysal, 2014). Bunun nedeni visköz, servikal ve vajinal sekresyonların bulunmasıdır (Johnston ve ark., 2001; Kırşan ve ark., 1996). Proöstrüs dönemi ilerledikçe, süperfisiyel ve büyük intermediyer hücrelerde artış, parabazal,

küçük intermediyer hücreler, lökosit ve eritrosit sayısında azalma görülebildiği belirtilmiştir (Kustriz, 2012; Pretzer, 2008).

2.3.2. Orta Proöstrüs Döneminde Vajinal Hücreler

Bu dönemde yapılan vajinal sitolojide, ilk kanıt nötrofillerin görülmemesidir. Bu dönemden itibaren nötrofiller, diöstrüse kadar görülmemektedirler. Nötrofillerin görülmemesinin sebebi östrojen konsantrasyonunun etkisiyle kalınlaşan epitel kat bariyerini geçememesidir. Vajinal sitoloji sonucunda, eritrositler görülmeyebilir, parabazal ve küçük intermediyer hücrelerde azalma süperfisiyel ve intermediyer hücrelerde artma görülür. Smear zemininin temiz ya da çok az kirli görülebileceğini ifade etmişlerdir (Çiftcier ve Uysal, 2014; Feldman ve Nelson, 2004).

2.3.3. Geç Proöstrüs Dönemindeki Vajinal Hücreler

Geç proöstrüs döneminde, vajinal smearda nötrofil görülmezken kan hücrelerinin varlığı değişkendir. Çekirdekli süperfisiyel hücreler % 60'ın altına düşmediği bildirilmiştir (Çiftcier ve Uysal, 2014).

2.3.4. Östrüs Döneminde Vajinal Hücreler

Östrüs dönemindeki köpeklerin vajinal smear örneklerinde bol miktarda piknotik çekirdekli süperfisiyel hücreler ile çekirdeksiz süperfisiyel hücreler ve daha az sayıda ise intermediyer hücreler görülmektedir. Eritrositler ise çok az sayıda bulunabileceği gibi hiç görülmediği durumlarda belirtilmiştir (Feldman ve Nelson, 2004). Oettel (1979), östrüs döneminde köpeklerin smear örneklerinden ilk lökositlerin görüldüğü anın en uygun çiftleşme zamanı olduğunu ve lökositlerin ovulasyondan 24-36 saat sonra ortaya çıktığı bildirmiştir. Kırşan ve ark. (1996), östrüs dönemindeki köpeklerde inceledikleri smear örneklerinde başlangıçta temiz bir zemine dağılmış bol miktarda piknotik çekirdekli süperfisiyel hücrelere ve az sayıda ise intermediyer hücrelerin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Östrüsün ortalarında çok miktarda çekirdeksiz süperfisiyel hücre ile karşılaşmışlardır. Östrüsün sonuna doğru ise lökositlerin tekrar ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Proöstrüs boyunca intermediyer ve parabazal hücreler azalırken süperfisiyel vajinal epitel hücreler artmaktadır. Gözlenebilir kızgınlığın başlangıcında ve LH salınımı yükseldiğinde vajinal epitel hücrelerin neredeyse tamamını çekirdekli ve çekirdeksiz süperfisiyel hücreler oluşturmaktadır (Feldman ve Nelson, 2004; Mestre ve ark., 1990; Moxon ve ark., 2010).

2.3.5. Diöstrüs Döneminde Vajinal Hücreler

Diöstrüs dönemindeki bir köpek ile östrüs dönemi sonlarındaki bir köpekten elde edilen vajinal smear örnekleri birbirinden ayırt edilmelidir. Bu dönemde alınan smearlar, % 80'den fazla süperfisiyel hücre içerirken nötrofil içermezler ve aynı zamanda zemin de temizdir. Östrüs sonundaki 24-48 saatlik periyotta süperfisiyel hücreler yaklaşık olarak % 20 seviyesine düşer ve ortama hakim hücre ise genellikle intermediyer hücrelerdir. LH pikinden sonraki 8-9. günlerde süperfisiyel hücrelerde azalma görülürken parabazal ve intermediyer hücrelerin oranının arttığı, bununla birlikte vajinal epitel hücrelerdeki mikroskopik görünüm genellikle diöstrüsün başladığını gösterdiği bildirilmektedir (Feldman ve Nelson, 2004). Diöstrüs döneminde elde edilen vajinal smearlar anöstrüs ile benzerlik göstermektedirler. Bu dönemde çoğunlukla küçük intermediyer ve parabazal hücreler görülür. Nötrofiller az sayıda görülürken eritrositler ya yok ya da çok az sayıdadır. Metaöstrüs hücreleri erken proöstrüs dönemiyle diöstrüs başlangıcını ayırt etmede referans hücrelerdir (Feldman ve Nelson, 2004; Pretzer, 2008).

2.3.6. Anöstrüs Döneminde Vajinal hücreler

Anöstrüs dönemindeki vajinal smearda görülen yoğun hücreler intermediyer ve parabazal hücrelerdir (Feldman ve Nelson, 2004; Pretzer, 2008).

2.4. Üremenin Kontrolünde Vajinal Sitoloji

2.4.1. Vajinal Sitoloji ile Uygun Çiftleşme Zamanının Belirlenmesi

Vajinal sitoloji, genellikle dişi köpeklerin uygun çiftleşme zamanının belirlenmesinde yardımcı olan metodlardan biridir (Erüenal, 2000). Dişi köpeklerde uygun çiftleşme zamanını tespit etmek için birçok yöntem veya metot kullanılmaktadır. Gözle görülebilen semptomlar incelenebilirken, mikroskopik bulgular veya hormonal veriler de kullanılabilir. Gözlenebilen semptomlar hekimin veya hayvan sahibinin değerlendirilebileceği; vajinal akıntı, vajinal ödem veya ortamda bulunan erkek köpeği kabul etmesidir. Vajinal sitoloji de uygun çiftleşme zamanını saptama yöntemleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Yine kan serum progesteron ve LH hormonu düzeyinin tespiti de bu amaçla kullanılmaktadır. LH plazma düzeyi ovulasyon zamanının tespitinde en uygun yöntemdir (Erüenal, 2000; Tünay ve ark., 2002).

Uygun çiftleşme zamanının tespitinde tek bir semptom ya da muayene yeterli değildir ve tanı bir muayeneden çok komplike muayeneye dayandırılarak konulur. Anterior vajinadan toplanacak sıvı örneğinde, mukus kristalizasyonunun incelenmesi uygun çiftleşme zamanının belirlenmesinde vajinal sitoloji ile beraber kullanılabileceği bildirilmiştir (Erüenal, 2000; Konuk ve ark., 2001).

Günay ve ark. (2004), yaptıkları bir araştırmada elde ettikleri sonuçlarda köpek yetiştiriciliğinde uygulanan proöstrüs kanamasından sonraki 12-14. günlerdeki çiftleşmeler ile istenilen oranda gebelik elde edilebilmesinin mümkün olmayacağını bildirmişlerdir. Vajinal sitolojide süperfisiyel hücre oranının % 80'lere çıkmasının ardından uygulanan progesteron ölçümü ile daha başarılı sonuçlar alınabileceğini belirtmişlerdir. Vajinal sitoloji, siklusu izleyebilmenin yanında gereksiz hormon analizi yapmaya ve çiftleşme amaçlı hayvan nakline engel olma açısından yarar sağlandığını kaydetmişlerdir. Bununla birlikte araştırmanın sonucunda vajinal sitoloji eşliğinde hızlı progesteron analizleri ile uygun çiftleşme gününü belirleyerek gebelik oranını arttırmanın mümkün olabileceğini ifade etmişlerdir.

Tablo 2.1. Preovulatör LH dalgalanmasından önce ve sonraki dönemlerde normal fertil köpeklerdeki klinik parametreler (England, 1994).

Parametre	LH dalgası öncesi 7 gün	LH dalgalanma sı sırasında	LH dalgalanma sı sonrası 4- 5. günler	LH dalgalanma sı sonrası 8- 11. günler
Vajinal sitoloji komifikasyon indeksi	%30-%100	%80-%100	%80-%100	%0-%80
Smearda lökosit	Az	Az yada yok	Az yada yok	Çok
Vulvada ödem	Artarak devam eder	En üst noktadadır	Gözle görülür bir azalma	Vulva yumuşak ama hala geniş
Vajinal mukozal katlar	Pürüzsüz, yuvarlak, beyaz, ödemli	Beyaz, hafif büzülme ve kırıktır	Beyaz, iri kıvrımlı	Beyaz, pembemsi, lekeli, düzdür
Serum progesteron miktarı	< 0.5 ng / ml	0.9–3,0 ng/ml	3.5–12 ng/ml	8–25 ng/ml
Vajinal smearda eritrosit	Var	Var	Var/Yok	Var/Yok
Üreme	İnfertil	Ovulasyon öncesi fertil periyod piki	Ovulasyon sonrası 2- 3.gün, fertil periyod	İnfertilite

2.4.2. Vajinal Sitoloji ile Gebeliğin Saptanması

Gebelikte intermediyer hücrelerin görülmesi karekteristiktir. Gebelik ya da yalancı gebelikteki vajinal smearda lökosit invazyonları tipiktir (Erüenal, 2000).

2.4.3. Vajinal Sitoloji ile İstenmeyen Çiftleşmenin Belirlenmesi

İstenmeyen çiftleşmelerden şüphelenildiğinde, vajinal smear yapılarak köpeğin hangi seksüel dönemde olduğu tespit edilir. Smearda, spermatozoaların olup olmamasına göre dişi köpeğin çiftleşip çiftleşmediği görülebilir. Vajinal smearda spermatozoaların görülmemesi hayvanın çiftleşmediğini göstermez (Erüenal, 2000).

2.5. Patolojik Olgularda Vajinal Sitoloji'nin Kullanımı

2.5.1. İnfertilite Problemleri

2.5.1.1. Uzayan Proöstrüste Vajinal Sitoloji Bulguları

Dişi köpeklerde ortalama östrüs süresi 9 gün olarak kabul edilir. Herhangi bir infertilite sorunu olmayan dişiler 21. güne kadar çiftleşebilir. Östrüs döneminin 21 günden uzun sürmesi uzun süreli östrüs olarak tanımlanır. Uzun süreli östrüs döneminde dişinin sürekli çiftleşme isteği, vajinal mukozada hiperemi, hafif kanlı veya saman renginde akıntı görülür (Baştan ve Aslan, 1999).

Baştan ve Aslan (1999), uzun süreli östrüs gösteren 22 adet farklı ırklardan oluşan çalışmalarında, vajinal sitolojiyi kullanarak tanıyı güçlendirmişlerdir. Smearda süperfisiyel hücreler %80-90 oranında olduğunu bildirmişlerdir.

Feldman ve Nelson (2004), dişi köpeklerde progesteron konsantrasyonunun düşük östrojen konsantrasyonun yüksek olması uzayan östrüs döneminde ovulasyonun gerçekleşmediği tanısına varmışlardır.

Çiftçier ve ark. (2014), vajinal smear bulgularında proöstrüs kanamasının 24. gününde intermediyer, çekirdeksiz epiteller, az miktarda nötrofil ve eritrosit

gördüklerini, 28. günde yaptıkları vajinal smearda da aynı hücrelerin görüldüğünü fakat hücre sayılarının arttığını, 34. gününde nötrofil görülmediğini, kan hücrelerinin sayısının değişken ve zeminin temiz olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulguların proöstrüs dönemini tanımladığını ifade etmişlerdir.

2.5.1.2. Uzayan Östrüste Vajinal Sitoloji Bulguları

Dişi köpeklerde östrüs dönemi ortalama 9 gündür. Herhangi bir infertilite problemi olmayan dişi köpekler 21. güne kadar çiftleşmeyi kabul edebilmektedirler (Baştan ve Aslan, 1999).

Feldman ve Nelson (2004), uzun süreli östrüslerde ovulasyonun olmadığını, bunu nedeninin progesteron konsantrasyonlarının olması gereken miktara göre düşük, serum östrojen konsantrasyonunun ise yüksek olması olarak belirlemişlerdir.

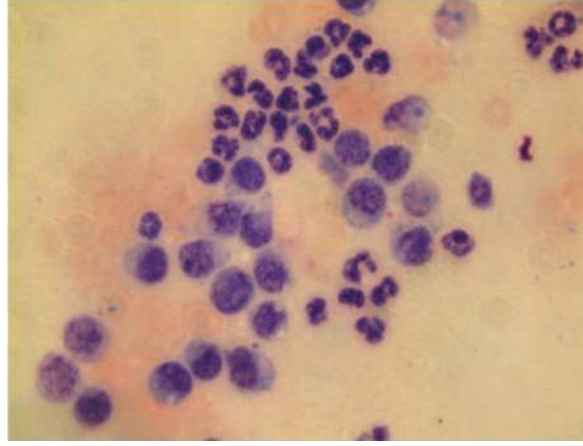
Uzun süreli östrüslerde çiftleşme isteği, vulvada ödem, ve açık renkli akıntı bulunduğu, vajinal sitolojide ise süperfisiyel hücrelerin %80-90 seviyesinde görüldüğü bildirilmiştir (Baştan ve Aslan, 1999, Okkens ve ark.,1992).

2.5.2. Transmissible Veneral Tümör

Transmissible venereal tümör (TVT); her iki cinsiyetteki köpeklerin genellikle dış genital organların mukozalarını, nadiren ise iç genital organları etkileyen bir tümördür (Çizmeci ve ark., 2012; Eze ve ark., 2007).

Dış genital organlarda bulunan TVT genellikle karnabahar şeklinde, hiperemik, dokunulduğunda kanayabilen bir yapıdadır (Nak ve ark., 2001; Çizmeci ve ark., 2012). TVT'nin sitolojik muayenesi sonucunda, hiperkromatik görünümlü, büyük çekirdekli, intrasitoplazmik vakuoller içeren, nötrofil, eritrosit ve bakterilerin görüldüğü bildirilmiştir (Şekil 2.2.) (Özyurtlu ve ark., 2008).

Çizmeci ve ark. (2012), TVT' li köpekte yaptıkları vajinal sitolojide yuvarlak veya oval şekilli, vakuollü ve büyük çekirdekli hücreleri görmüşlerdir.



Şekil 2.2. Tümör hücrelerinin sitolojik görünümü (Çizmeci ve ark., 2012).

2.5.3. Piyometra

Uterusun uzun süre progesteron etkisinde kalması sonucunda oluşan patolojik değişiklikler olarak tanımlanır. Genellikle 8-10 yaşları arasında görülen bu hastalık yaş ilerledikçe hastalığa yakalanma insidansı artar (Nak, 1999).

Piyometra ile ilişkili klinik semptomlar östrüs döneminin tamamlanmasından 1-3 ay içerisinde ortaya çıkar. Serviks açık ise serosanguinöz akıntı görülebilir. Kapalı serviksli vakalarda vajinal akıntı görülmez. Vajinal smearda, ortama hakim hücreler bazal-parabazal hücrelerdir. Dejenere olmayan nötrofiller tipiktir (Dennis ve ark., 2012). Piyometralı köpeklerin vajinal sitoloji muayenesinde bol miktarda nötrofil, bakteri, vakuollü endometriyal hücreler, trofoblastik hücreler ve bazal-parabazal hücreler görülür (Feldman ve Nelson 1987; Nak, 2001). Nak ve ark., (2001), piyometralı köpeklerde yaptıkları vajinal smearda ortama hakim hücrenin parabazal hücre olduğunu gözlemlemişlerdir. Açık serviksli olgularda yüksek oranda nötrofil ve bakteri bulunduğunu bildirmişlerdir.

Vajinal sitoloji piyometranın teşhisinde tek başına yeterli olmayacağı bunun nedeninin ise smear da görülen bakteri ve nötrofillerin hastalıklı olmayan köpeklerde de görülebileceği ifade edilmiştir (Nak ve ark., 2001; Demirel, 2011). Açık serviksli piyometrada vajinal mukoza kanlı, mukopurulent akıntı görülebilir. Vajinal sitoloji de

vakuollü endometriyal hücre, nötrofil ve eritrositlere rastlanılmaktadır (Demirel, 2011).

2.5.4. Ovaryan Remnant Sendromu

Ovaryan remnant sendromu, ovaryektomi (OVE) veya ovaryohisterektomi (OHE) operasyonu sırasında ovaryum da parça kalması sonucunda ortaya çıkan bir komplikasyondur. Dişi köpeklerin, operasyon sonrası proöstrüs ve östrüs belirtileri gösterdiği, uterusun tam olarak alınmaması sonucunda ise kistik endometriyal hiperplazi ve piyometra kompleksi gelişebildiği kaydedilmiştir (Sontaş ve ark., 2010).

Dişi köpeklerde östrüs belirtilerinin görülmesi, vajinada kanama vajinal epitel dokunun parke taşı görünümü, vajinal sitolojik inceleme sonucunda kornifiye olmuş süperfisiyel hücrelerin varlığı ve serum progesteron seviyesi 3-8 ng/ml civarında olması tanıyı güçlendirdiği ifade edilmiştir (Ball ve ark ark., 2010; Sangstar ve ark., 2005). Sitolojik örnekler dişi köpeğin proöstrüs ve östrüs döneminde yapılması gereklidir. Mikroskopik incelemede süperfisiyel ve intermediyer hücrelerin görülmesi tanı için yeterli olduğu bildirilmiştir (Sontaş ve ark., 2010).

2.5.5. Plasental Bölgelerin Subinvolusyonu

Dişi köpeklerde doğumdan sonrası 6. haftaya kadar vajinal kanlı akıntıya rastlanabilir. Plasental bölgelerin invaginasyonlarında meydana gelen gecikmeye bağlı olarak, serosanguinöz- hemorajik vajinal akıntı 15 hafta veya daha fazla devam etmesine plasental bölgelerin subinvolusyonu adı verilmektedir. Üç yaşın altındaki köpeklerde ilk doğumun ardından daha sık rastlanmaktadır. Vajinal sitolojide eritrosit, nötrofil ve parabazal hücrelerin beraber görülmesi, eritrositlerle birlikte trofoblast benzeri hücrelerin görülmesi, metritis ve vajinitisten ayırt edilmesini sağlamaktadır (Feldman ve Nelson, 2004).

2.5.6. Vajinitis

Köpeklerde vajinitis genellikle bakteriyel enfeksiyon kaynaklı bir olgu olup en belirgin semptomları arasında anormal vajinal akıntı, vulvayı yalama, sık idrar yapma ve erkeği cezbetme görülür (Elisabeth ve ark., 2010). Vajinal sitolojide çoğunlukla bakteri ve nötrofiller görülür. Nötrofil sayısındaki artış vajinitisten şüphelendirir. Sağlıklı ve akut vajinitisli köpeklerin vajinal smearlarında makrofaj ve lenfositler görülmezken kronik vajinitis olgularında bu hücreler mevcuttur (Erüenal, 2000).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Bu araştırmanın materyalini, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Hastalıkları Küçük Hayvan Kliniği ve Antalya ilinde bulunan 37 adet dişi köpek oluşturmuştur. Yaşları 2-4 arasında bulunan Doberman ırkı dişi köpekler, seksüel dönemlerine göre (proöstrüs, östrüs, diöstrüs) 10 adet olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Yaşları 8-11 arasında bulunan farklı ırklardan oluşan piyometralı 7 adet dişi köpekten ayrı bir grup oluşturulmuştur.

3.2. Klinik Uygulamalar

Kliniğe getirilen dişi köpeklerden anamnez, ırk, vajinal kanamanın kaçınıcı günü olduğu kayıt altına alındı. Dişi köpeklerin rutin jinekolojik muayeneleri yapılarak, infertilite problemleri olan (piyometra hariç) hayvanlar çalışmaya alınmamıştır.

Çalışmaya alınan dişi köpeklerden vajinal sitoloji için iki adet NaCl ile ıslatılan steril pamuk çubuk kullanılarak vajinanın dorsal duvarından örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden iki adet sürme preparat hazırlanıp Papanicolaou ve diff quick boyama yöntemi ile boyanıp mikroskop üzerinde incelenmiştir. Her iki boyama yönteminde hücreler görüntülenip 100 hücre sayılarak hangi seksüel dönemde olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda kullanılan iki farklı boyama yönteminin maliyet, kullanım kolaylığı, güvenilirlik gibi kriterler karşılaştırılmıştır.

Piyometralı köpeklerden alınan vajinal örneklerden iki adet sürme preparat hazırlanıp Papanicolaou ve Diff quick boyama yöntemi ile boyanarak mikroskop üzerinde incelenip güvenilirlik, kullanım kolaylığı kriterleri karşılaştırılmıştır.

Vajinal örnek alınan her dişi köpekten kan alınarak hızlı progesteron test (Canine Target Progesteron Test®) uygulanarak progesteron skalası belirlenmiştir.

3.3. Laboratuvar Analizleri

Her dişi köpekten 5 ml miktarında kan alınarak EDTA'lı steril tüplere konuldu. Alınan kanlar 3.000 devirde 15 dk santifüj edilerek plazma elde edildi. Alınan plazma örnekleri bekletilmeden progesteron değerlerine bakıldı. Hızlı progesteron testi için plazma damlatılarak elde edilen skala ile iki farklı boyama yöntemi kullanılarak elde edilen seksüel dönemlerle karşılaştırıldı ve hangi yöntemin daha güvenilir olduğu belirlendi

Papanicolaou boyama yönteminin yapılışı (şekil 3.1.);

- | | |
|---|-------|
| 1) Eter- Etanol 1-1 tespit | 20 dk |
| 2) %80 Alkol'e daldırma | |
| 3) %70 Alkol'e daldırma | |
| 4) %50 Alkol'e daldırma | |
| 5) Distile su ile yıkama | |
| 6) Hematoksilen solüsyonu daldırma | 8 dk |
| 7) Distile su ile yıkama | |
| 8) %0.91 lik amonyum (3ml) + %70 Alkol (97ml) | 8 dk |
| 9) %70 Alkol'e daldırma | |
| 10) %80 Alkol'e daldırma | |
| 11) %96 Alkol'e daldırma | |
| 12) Orange-G 2 solüsyonu daldırma | 6 dk |
| 13) %96 Alkol ile yıkama | |
| 14) 3b, polychrom solüsyonuna daldırma | 6 dk |
| 15) %86 Alkol'e daldırma | |
| 16) Absolut Alkol'e daldırma | |
| 17) Ksilol'e daldırma | |
| 18) Havada kurutma | |



Şekil 3.1. Papanicolaou boyama yöntemi için gerekli malzemeler.

Diff Quick boyama yöntemi (Şekil 3.2.);

- 1) Hazırlanan vajinal smear preparatları ilk önce fiksasyonu yapıldıktan sonra
- 2) DIFF II Solution A'ya daldırılarak 10 saniye
- 3) DIFF II Solution B'ye daldırılarak 10 saniye
- 4) DIFF II Solution C'ye daldırılarak 10 saniye
- 5) Distile su ile yıkama
- 6) Havada kurutma



Şekil 3.2. Diff quick boyama yöntemi için gerekli malzemeler.

Hızlı Progesteron Test Kitinin (Target Canine Ovulation Kit®) hazırlanması ve uygulanması (Şekil 3.3.);

- 1) Elde edilen plazmadan numune kabına 2 damla damlat
- 2) 2 damla sample wash ekle emilmesini bekle tekrar bu işlemi tekrarla
- 3) 1damla enzim ekle 1 dakika bekle
- 4) 10 damla wash solüsyonu ekle
- 5) A ve B solüsyonları çizgiye kadar çek Mix bottle içinde karıştır.
- 6) Karışımdan 2 damla mix bottle den ekle
- 7) 9 dakika sonra skalaya bak

Hızlı Progesteron Test Kitinin (Target Canine Ovulation Kit®) yorumlanması;

- C1 renk skasında progesteron seviyesi 0-1 ng/ml
- C2 renk skasında progesteron seviyesi 1-2.5 ng/ml
- C3 renk skalasında progesteron seviyesi 2.5-8 ng/ml
- C4 renk skalasında progesteron seviyesi >8 ng/ml dir.



Şekil 3.3. Target Canine Ovulation Kit (Hızlı progesteron testi).

3.4. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonunda; Papanicolaou ve Diff quick boyama yöntemi ile elde edilen vajinal epitel hücre oranları değerlendirildi. İstatistiksel analiz için Ki-Kare (Minitap 15) test yöntemi kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

4.1.1. Proöstrüs Dönemindeki Klinik Bulgular

Köpekler için proöstrüs; seksüel siklusun başlama evresidir. Kanlı vajinal akıntı proöstrüs evresinin birinci günü kabul edildi. Proöstrüs evresinde vulvada ödem, şişkinlik ve kanlı vajinal akıntı izlenmiştir.

4.1.2. Östrüs Dönemindeki Klinik Bulgular

Östrüs; Proöstrüs evresindeki kanlı akıntı daha açık renkli pembemsi-sarımsı (saman rengi) halde görüldü. Vulva ödemi azalmış ve yumuşamış olarak gözlemlendi.

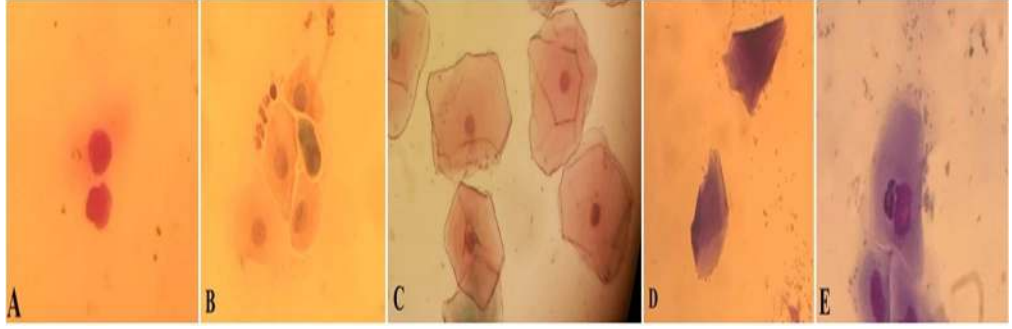
4.1.3. Diöstrüs Dönemindeki Klinik Bulgular

Diöstrüs evresinde; Kanlı bir akıntı görülmemiş olup hafif sümüksü şeffaf bir akıntı tespit edilmiştir. Vulvada ödem ve şişkinlik görülmemiştir.

4.2. Laboratuvar Bulgular

4.2.1 Vajinal Epitel Hücrelerin Sınıflandırılması

Vajinal hücreler; bazal, parabazal, intermediyer ve süperfisiyel hücre olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 4.1.).



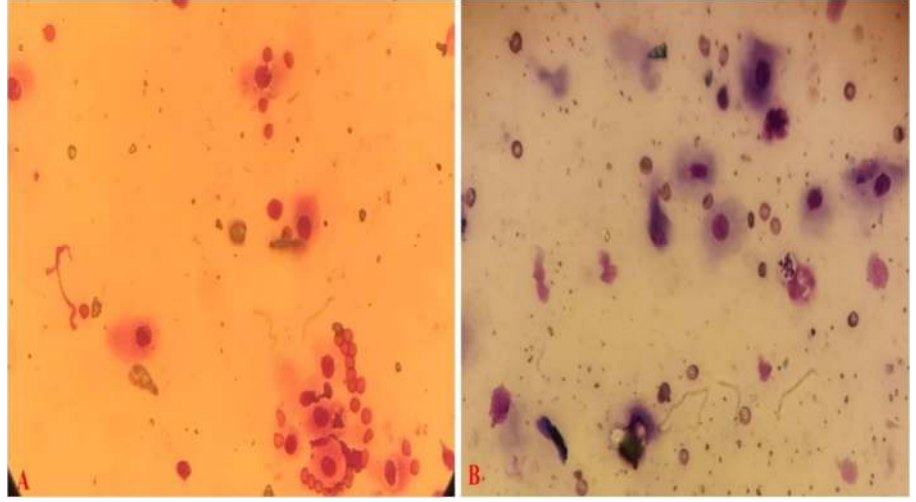
Şekil 4.1. A: Bazal-Parabazal hücre, B: İntermediyer hücre, C: Çekirdekli süperfisiyel hücre, D: Keratinize süperfisiyel hücre, E: Metaöstrüm hücre.

4.2.2. Proöstrüs Döneminde Laboratuvar Bulguları

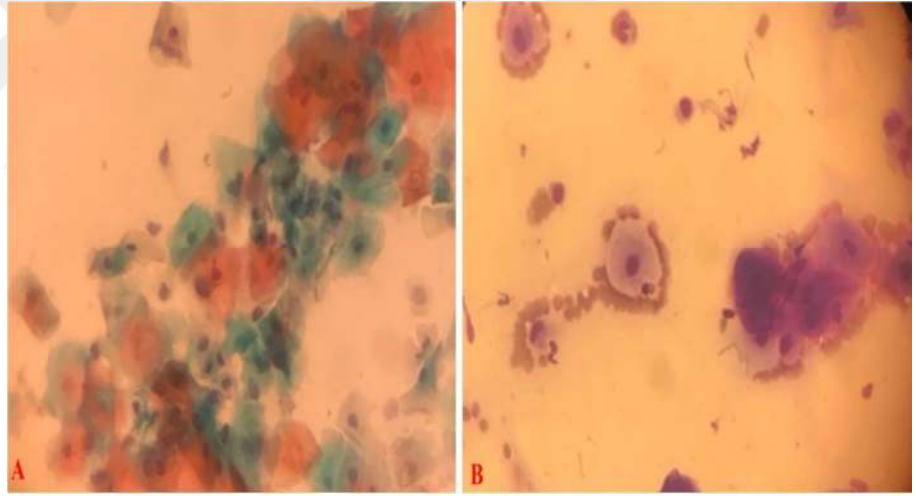
Çalışmaya alınan her dişi köpekten vajinal kanamanın görülmeye başladığı 2-4. günden sonra vajinal smear alınarak Papanicolaou ve diff quick boyama tekniği ile boyama yapıldı. Vajinal smear sonucunda her iki boyama yönteminde zeminin kirli olduğu tespit edildi ve bol miktarda eritrosit ve nötrofil görüldü. Papanicolaou boyama yöntemi ile vajinal hücreler; %12.3 $\pm$ 2.89 parabazal, %52.4 $\pm$ 1.67 intermediyer, %27.5 $\pm$ 1.23 çekirdekli süperfisiyel ve %7.8 $\pm$ 1.07 keratinize süperfisiyel hücreler görüldü. Diff quick boyama yöntemi ile vajinal hücreler; %10.5 $\pm$ 2.7 parabazal, %52.4 $\pm$ 1.28 intermediyer, %28.4 $\pm$ 1.43 çekirdekli süperfisiyel, %8.7 $\pm$ 1.07 keratinize süperfisiyel hücre görüldü. Vajinal sitoloji sonucunda dişi köpeklerin proöstrüs döneminde olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.) (Şekil 4.3.) (Şekil 4.4.).

İki boyama arasında elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi sonucunda bu iki boyama yöntemi arasında proöstrüs döneminde istatistiki yönden önemli bir farklılığın olmadığı ($p>0.05$) belirlendi (Tablo 4.1.).

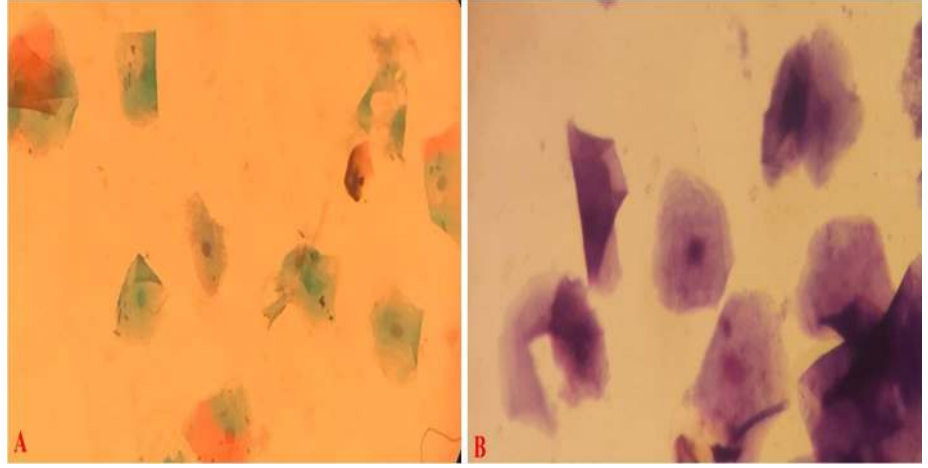
Dişi köpeklerden alınan kan ile hızlı progesteron testine bakılarak progesteron skalası belirlendi. Progesteron miktarının 8 köpekte C1 (0-1 ng/ml), 2 köpekte C2 (1-2.5 ng/ml) çıkması dişi köpeklerin proöstrüs de olduğunu gösterdi. Vajinal sitoloji ile hızlı progesteron testinin güvenilirliği tespit edildi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.2. A: Papanicolaou boyama yöntemi ile elde edilen proöstrüs dönemindeki vajinal hücreler, B: Diff quick boyama yöntemi ile elde edilen proöstrüs dönemindeki vajinal hücreler.



Şekil 4.3. A: Papanicolaou boyama yöntemi ile elde edilen proöstrüs dönemindeki vajinal hücreler, B: Diff quick boyama yöntemi ile elde edilen proöstrüs dönemindeki vajinal hücreler.



Şekil 4.4. A: Papanicolaou boyama yöntemi ile elde edilen proöstrüs dönemindeki vajinal hücreler, B: Diff quick boyama yöntemi ile elde edilen proöstrüs dönemindeki vajinal hücreler.

Tablo 4.1. Proöstrüs döneminde iki boyama yöntemi ile elde edilen vajinal hücre istatistik verileri.

Proöstrüs	Papanicolaou Boyama	Diff Quick Boyama	P Değeri
Nötrofil	+	+	
Eritrosit	+	+	
Keratinize Süperfisiyel Hücre	$\%7.8 \pm 1.07$	$\%8.7 \pm 1.07$	$p>0.05$
Çekirdekli Süperfisiyel Hücre	$\%27.5 \pm 1.23$	$\%28.4 \pm 1.43$	$p>0.05$
İntermediyer Hücre	$\%52.4 \pm 1.67$	$\%52.4 \pm 1.28$	$p>0.05$
Bazal-Parabazal Hücre	$\%12.3 \pm 2.89$	$\%10.5 \pm 2.7$	$p>0.05$

4.2.3. Östrüs Döneminde Laboratuvar Bulguları

Çalışmaya alınan her dişi köpekten vajinal kanamanın görülmeye başladığı 10-16. günleri arasında vajinal smear alınarak Papanicolaou ve diff quick boyama tekniği ile boyama yapıldı. Vajinal smear sonucunda her iki boyama yönteminde zemin temiz olup, çok az miktarda eritrosit görülmüş, nötrofil görülmemiştir.

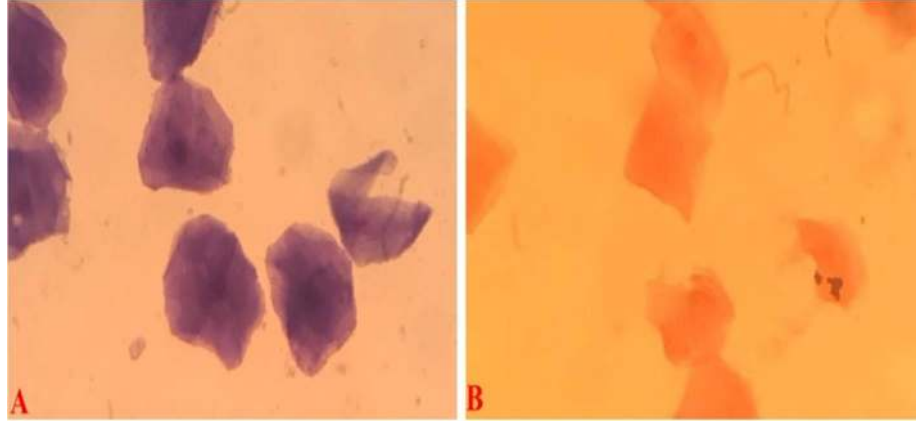
Papanicolaou boyama yöntemi ile 77.5 ± 0.93 keratinize süperfisiyel, 20.3 ± 1.14 çekirdekli süperfisiyel, 2.2 ± 0.786 intermediyer hücre görülmüş olup parabazal hücrelere rastlanmamıştır (Şekil 4.5.).

Diff quick boyama yöntemi ile 78.7 ± 1.08 keratinize süperfisiyel, 20 ± 1.06 çekirdekli süperfisiyel, 1.3 ± 0.473 intermediyer hücre görülmüş olup parabazal hücrelere rastlanmamıştır (Şekil 4.5.).

İki boyama arasında östrüs döneminde elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi sonucunda bu iki boyama yöntemi arasında istatistiki yönden önemli bir farklılığın olmadığı ($p>0.05$) belirlendi (Tablo 4.2.).

Vajinal sitoloji sonucunda dişi köpeklerin östrüs döneminde olduğu tespit edilerek hızlı progesteron testine bakıldı. Progesteron miktarının C4 (>8 ng/ml) çıkması dişi köpeğin östrüste olduğunu gösterdi. Vajinal sitoloji ile hızlı progesteron testinin güvenilirliği tespit edildi (Şekil 4.8.).

Östrüs ve diöstrüs evrelerinde progesteron seviyesi 8 ng/ml den yüksek olduğu için hızlı progesteron testinin bu dönemlerde kullanılması tek başına tanı için yeterli olmadığı görüldü.



Şekil 4.5. A: Diff quick boyama yöntemi ile elde edilen östrüs dönemindeki vajinal hücreler, B: Papanicolaou boyama yöntemi ile elde edilen östrüs dönemindeki vajinal hücreler.

Tablo 4.2. Östrüs döneminde iki boyama yöntemi ile elde edilen vajinal hücre istatistik verileri.

Östrüs		Papanicolaou Boyama	Diff Quick Boyama	P Değeri
Nötrofil		-	-	
Eritrosit		+, -	+, -	
Keratinize Hücre	Süperfisiyel	$\%77.5 \pm 0.93$	$\%78.7 \pm 1.08$	$p > 0.05$
Çekirdekli Hücre	Süperfisiyel	$\%20.3 \pm 1.14$	$\%20 \pm 1.06$	$p > 0.05$
İntermediyer Hücre		$\%2.2 \pm 0.786$	$\%1.3 \pm 0.473$	$p > 0.05$
Bazal-Parabazal Hücre		-	-	-

4.2.4. Diöstrüs Döneminde Laboratuvar Bulguları

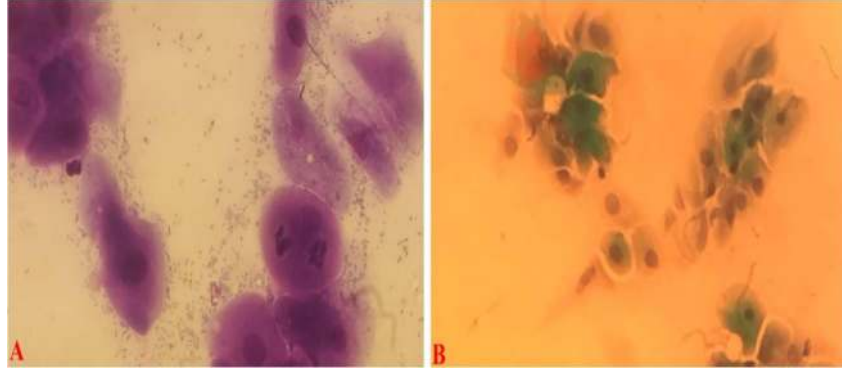
Çalışmaya alınan her dişi köpekten vajinal kanamanın görülmeye başladığı 25-40 günleri arasında vajinal smear alınarak Papanicolaou ve diff quick boyama tekniği ile boyama yapıldı. Vajinal smear sonucunda her iki boyama yönteminde bol miktarda nötrofil görülürken eritrosit görülmemiştir.

Papanicolaou boyama yöntemi ile 0.8 ± 0.512 oranında keratinize süperfisiyel hücre, 11.7 ± 1.12 çekirdekli süperfisiyel hücre, 29 ± 1.18 intermediyer hücre, 58.5 ± 1.80 bazal-parabazal hücre ve diöstrüs hücresi görüldü (Şekil 4.6.).

Diff quick boyama yöntemi ile 1.5 ± 0.885 oranında keratinize süperfisiyel hücre, 14 ± 1.29 çekirdekli süperfisiyel hücre, 28.8 ± 1.19 oranında intermediyer hücre, 55.8 ± 1.74 bazal-parabazal hücre ve diöstrüs hücresi belirlendi (Şekil 4.6.).

İki boyama arasında diöstrüs döneminde elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi sonucunda bu iki boyama yöntemi arasında istatistiki yönden önemli bir farklılığın olmadığı ($p>0.05$) belirlendi (Tablo 4.3.).

Vajinal sitoloji sonucunda dişi köpeklerin diöstrüs döneminde olduğu tespit edilerek hızlı progesteron testine bakıldı. Progesteron miktarının C4 (>8 ng/ml) çıkması dişi köpeğin diöstrüs evresinde olduğunu gösterdi (Şekil 4.8.). Vajinal sitoloji ile hızlı progesteron testinin güvenilirliği tespit edildi.



Şekil 4.6. A: Diff quick boyama yöntemi ile elde edilen diöstrüs dönemindeki vajinal hücreler, B: Papanicolaou boyama yöntemi ile elde edilen diöstrüs dönemindeki vajinal hücreler.

Tablo 4.3. Diöstrüs döneminde iki boyama yöntemi ile elde edilen vajinal hücre istatistik verileri.

Diöstrüs	Papanicolaou Boyama	Diff Quick Boyama	P Değeri
Nötrofil	+	+	
Eritrosit	-	-	
Keratinize Süperfisiyel Hücre	$\%0.8 \pm 0.512$	$\%1.5 \pm 0.885$	$p > 0.05$
Çekirdekli Süperfisiyel Hücre	$\%11.7 \pm 1.12$	$\%11.8 \pm 1.29$	$p > 0.05$
İntermediyer Hücre	$\%29 \pm 1.18$	$\%28.8 \pm 1.19$	$p > 0.05$
Bazal-Parabazal Hücre	$\%58.5 \pm 1.80$	$\%55.8 \pm 1.74$	$p > 0.05$

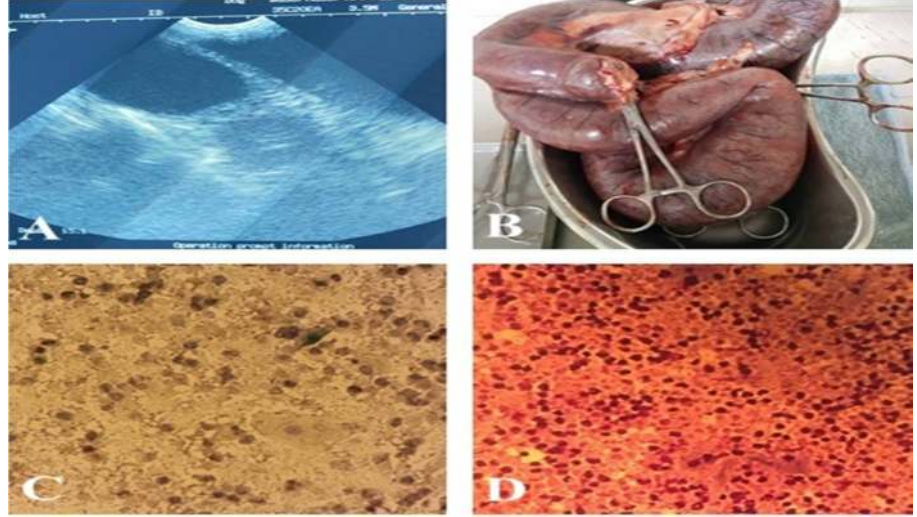
4.2.5. Papanicolaou ve Diff Quick Boyama Tekniği Avantaj ve Dezavantajları

Vajinal sitoloji için kullanılan Papanicolaou ve diff quick boyama tekniği avantaj ve dezavantajları karşılaştırıldı. Papanicolaou boyama tekniğinde epiteliyel hücreler ve eritrositler çok net görüldü. Papanicolaou boyama ile vajinal hücreler kolaylıkla birbirinden ayırt edildi. Asidofilik hücreler açık kırmızıdan turuncuya kadar değiştiği, bazofilik hücreler ise mavi veya yeşil boyandığı görüldü. Diff quick boyama tekniği ile nötrofiller ve eritrositler net olarak belirlendi. Diff quick boyama ile vajinal hücrelerin hepsi mavi renkle boyandığı için hücre ayrımları Papanicolaou ile boyanan hücrelere göre daha zor ayırt edildi. Diff quick boyama yöntemi kolay, pratik, tutarlı ve hızlı sonuç veren güvenilir bir boyama tekniği olduğu tespit edildi. Diff quick boyamada solüsyonların sık sık yenilenmesi dezavantaj olarak belirlendi. Papanicolaou boyama tekniğinin yapımı zor, klinik ortamda diff quick boyama tekniğine göre pratik olmayan ama hücrelerin birbirinden kolay ayrılmasını sağlayan, tutarlı sonuç veren güvenilir bir teknik olduğu saptandı.

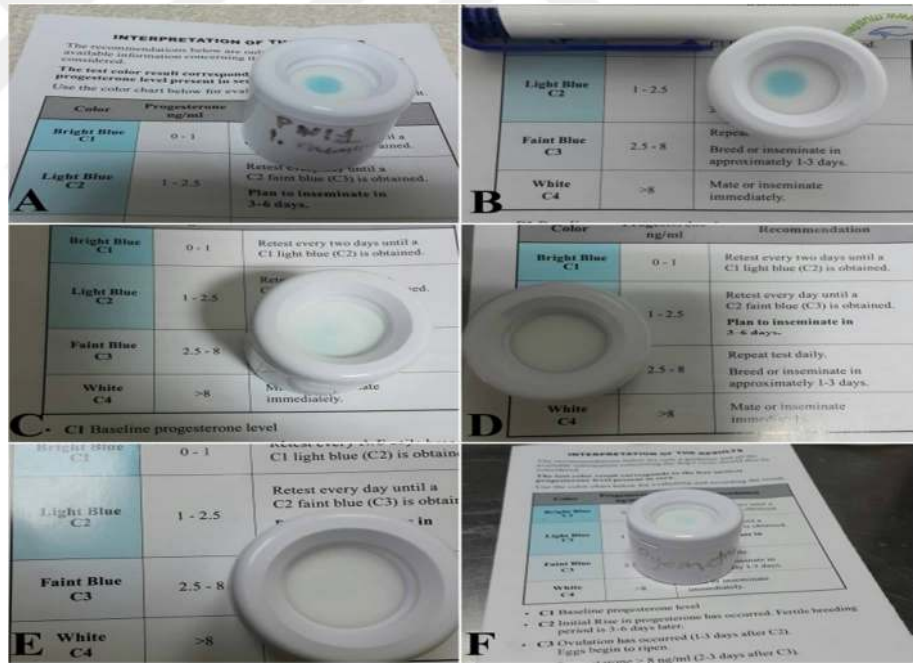
4.2.6. Piyometra Laboratuvar Bulguları

Çalışmaya alınan her piyometralı köpekten alınan smear, Papanicolaou ve diff quick boyama tekniği ile boyandı. Vajinal smear sonucunda çok miktarda bazal ve parabazal tipte hücreler gözlemlendi. Nötrofil yoğunluğu yangının varlığını doğruladı (Şekil 4.7.).

Açık piyometralı vakalarda bol miktarda nötrofil görüldü. Açık piyometra olguları vajinal sitoloji ile vajinitisten ayırt edildi. Kapalı piyometralı vakalarda ise çok az veya hiç nötrofil görülmedi. Kapalı piyometra vakalarında teşhis için vajinal sitoloji tek başına yeterli olmadığı tespit edildi. Piyometra vakalı köpeklere hızlı progesteron testi yapıldı. Progesteron miktarının C2 (1-2.5 ng/ml) çıkması dişi köpeğin piyometra olabileceğini doğruladı. Elde edilen sonuçlara göre vajinal sitoloji ile hızlı progesteron testinin güvenilirliği tespit edildi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. A:Piyometra ultrasonografik görüntüsü, B: Operasyon sonrası uterusun makroskobik görünümü, C:Papanicolaou boyama yöntemi ile piyometra, D: Diff Quick boyama yöntemi ile piyometra.



Şekil 4.8. Hızlı progesteron test kiti sonuç skalası A: Erken proöstrüs, B: proöstrüs, C: Erken östrüs, D: Östrüs, E: Diöstrüs, F: Piyometra.

5. TARTIŞMA

Vajinal sitoloji hücre tipleri yaygın olarak kullanılan sınıflandırmada, vajinal mukozanın çok katlı epitelyum katının en derin tabakasından başlayarak lümene doğru ‘bazal, parabazal, intermediyer, süperfisiyel hücre’ olarak sınıflandırılır. Süperfisiyel hücrelerin üzerini kaplayan çekirdeksiz materyal ise ‘squame, kornifiye ve keratinize’ olarak adlandırılır (Feldman ve Nelson, 1987).

Kırşan ve ark. (1996), erken proöstrüste bulunan köpeklerde alınan vajinal smear örneklerinin anöstrüste bulunan köpeklerdeki vajinal smear örneklerine benzerlik gösterdiğini, ayırt edici tek noktanın proöstrüs evresinde hızlı gelişen, endometriumda şekillenen kanamanın olduğu, bu nedenle vajinal smearda değişen sayıda eritrosit, lökosit, çok miktarda parabazal ile intermediyer hücrelerin olduğunu az sayıda da süperfisiyel hücreler içerdiğini kaydetmişlerdir. Sunulan bu çalışmada 10 dişi köpeğin 7 tanesi erken proöstrüs evresinde olduğu ve bu evrede bol miktarda bakteri, nötrofil ve eritrositler belirlendi. Orta derecede parabazal ve intermediyer hücre az sayıda ise süperfisiyel hücrelere rastlanmış olup, elde edilen bu veriler Kırşan ve ark. (1996), değerleri ile benzerlik göstermektedir.

Feldman ve Nelson (2004), orta dönem proöstrüsta süperfisiyel-intermediyer hücreler (en az % 40-60) ile büyük intermediyer hücreler, parabazal ve küçük intermediyer hücrelerin yerini aldığını, eritrositlerin görülmeyebileceğini ve smear zeminlerinin temiz ya da çok az kirli olabileceğini kaydetmişlerdir. Sunulan bu çalışmada ise 10 dişi köpeğin 2 tanesi orta dönem proöstrüs evresinde olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre süperfisiyel- intermediyer hücre yoğunluğu, erken proöstrüs evresindeki vajinal hücre yoğunluğuna göre artış göstermiş olup, parabazal hücre sayısında azalma gözlemlenmiştir. Zemin erken proöstrüs evresine göre daha temiz bulunmuş, nötrofil ve eritrosit yoğunluğunda azalma görülmüştür. Bu sonuçlar Feldman ve Nelson (2004)’un verileri ile uyum göstermektedir.

Kustritz (2012), geç proöstrüste vajinal hücrelerin % 80’inden fazlasının piknotik nükleuslu veya anükleer süperfisiyel hücreler olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmada ise 10 köpekten 1 tanesi geç proöstrüs evresinde olduğu gözlemlendi. Bu

evrede intermediyer-parabazal hücre yerini çekirdekli süperfisiyel ve çekirdeksiz süperfisiyel hücrelere bırakmış olup nötrofil çok az veya hiç görülmemiştir. Bu sonuçlar Kustritz (2012)'in verileriyle benzerlik göstermektedir.

Kırşan ve ark. (1996), östrüs döneminde inceledikleri köpeklerin smear örneklerinde başlangıçta temiz bir zemine dağılmış bol miktarda piknotik çekirdekli süperfisiyel hücrelere ve az sayıda ise intermediyer hücrelerin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Östrüsün ortalarında çok miktarda çekirdeksiz süperfisiyel hücre ile karşılaşmışlardır. Östrüsün sonuna doğru ise lökositlerin tekrar ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Arbeiter ve ark. (1991), ise östrüs döneminde 24 adet köpekte östrojen pikinden sonra en az 3 gün içinde maksimum vajinal keratinizasyonun şekillendiğini ve östrüsdeki 17 köpekte ise plazma progesteron konsantrasyonunun $>5.44 \pm 0.93$ ng/ml olduğunda ovulasyonun gerçekleştiğini kaydetmişlerdir. Sunulan bu çalışmada östrüs dönemindeki 10 adet köpekte yapılan vajinal smear sonucunda; zeminin temiz olup bazı preperatlarda az sayıda eritrosit tespit edilmiştir. Papanicolaou boyama yöntemi ile $\%77.5 \pm 0.93$ keratinize süperfisiyel, $\%20.3 \pm 1.14$ çekirdekli süperfisiyel, $\%2.2 \pm 0.786$ intermediyer hücre görülmüş olup, parabazal hücrelere rastlanmamıştır. Diff quick boyama yöntemi ile $\%78.7 \pm 1.08$ keratinize süperfisiyel, $\%20 \pm 1.06$ çekirdekli süperfisiyel, $\%1.3 \pm 0.473$ intermediyer hücre görülmüş olup, parabazal hücrelere rastlanmamıştır. Hızlı progesteron test ile belirlenen skalada progesteron seviyesi C4 (>8 ng/ml) olarak saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar Kırşan ve ark. (1996), ile Arbeiter ve ark. (1991), verileriyle paralellik göstermektedir.

Feldman ve Nelson (2004), diöstrüs döneminde nötrofillerin az sayıda görüldüğünü, eritrositlerin ise yok ya da çok az miktarda bulunduğunu ifade etmiştir. Ortama hakim hücre tipini küçük intermediyer hücrelerin ve parabazal hücrelerin oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Johnston ve ark. (2001), vajinal sitoloji yöntemi ile yaptıkları bir çalışmada diöstrüs başlangıcında, vajinal smeardaki parabazal ve intermediyer hücre oranında artış, süperfisiyel hücre oranında ise ani bir düşme meydana geldiğini bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışma sonunda bol oranda intermediyer ve parabazal hücreler ve nötrofil gözlemlendi. Bu sonuçlar Feldman ve

Nelson (2004) ile Johnston ve ark. (2001)' nın çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

Feldman ve Nelson (1987), diff quick boyama yönteminin pratikte rutin kullanılan, kullanımı kolay ve ucuz bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca diff quick boyama yönteminin kırmızı kan hücrelerini ve vajinal epitel hücrelerini güvenilir olarak boyadığını aynı zamanda hızlı ve tutarlı sonuçlar verdiğini kaydetmişlerdir. Concannon (1986), diff quick boyama yönteminin çabuk ve tutarlı sonuç vermesi nedeniyle kullanım alanı genişken, fiksatörün hızlı buharlaşması ve solüsyonun sıkça değiştirilmesi gerektiği için pratik değerinin azaldığını ifade etmiştir. Sunulan bu çalışma sonunda da diff quick boyama yönteminin; kullanımının kolay, pratik, güvenilir, ucuz, tutarlı sonuç veren, vajinal hücreleri ve kırmızı kan hücrelerini güvenilir olarak boyadığı tespit edilmiştir. Konuyla ilgili yapılan çalışma Feldman ve Nelson (1987) ile Concannon (1986)'un çalışmaları ile uyum göstermektedir.

Papanicolaou (1942), Papanicolaou boyama yöntemi ile epitel hücreler ve eritrositler daha şeffaf gözleendiğini, bu boyama yöntemi ile asidofilik hücrelerin renginin, kırmızıdan turuncuya kadar değiştiğini, bazofilik hücreler ise yeşil veya mavi boyandığını, güvenilir ve tutarlı sonuç verdiğini tespit etmiştir. Sunulan bu çalışma sonunda Papanicolaou boyama yönteminin kullanımı kolay, ucuz, tutarlı, güvenilir, klinik ortamında çok pratik olmayan ancak vajinal hücrelerinin boyanması ve hücrelerin birbirinden ayırt edilmesinde diff quick boyama yöntemine göre daha güvenilir olduğu görülmüştür. Konuyla ilgili yapılan çalışma Papanicolaou (1942)'un sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Himemstra ve ark. (2001), yaptıkları bir çalışmada vajinal sitolojinin en uygun çiftleşme süresini belirlemek için progesteron konsantrasyonlarına göre güvenilirliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada toplam 35 dişi köpekte vajinal sitoloji ile plazma progesteron konsantrasyonları belirlenerek çiftleşme için en uygun zamanı tespit edinceye kadar haftada 3 kez örnekler almışlardır. Sonuç olarak tek başına vajinal sitoloji uygulamasının dişi köpekler de uygun çiftleşme süresinin belirlenmesinde faydalı olmadığını belirtmişlerdir. Wright (1990), yaptığı bir

çalışmada vajinal sitoloji ve progesteron düzeyi birlikte değerlendirdiği 9 köpekten 7 tanesi gebe kalmıştır. Araştırma sonucunda vajinal sitoloji bulguları ve progesteron düzeyinin birlikte değerlendirilmesinin köpeklerde uygun çiftleşme zamanının saptanmasındaki önemli olduğunu ifade etmiştir. Fay ve ark (2003) ise uygun çiftleşme zamanını belirlemek için vulva ödemi, vulva akıntısı, erkeği kabul etme, vajinal sitoloji, vajinoskopi ve progesteron bulgularının etkinliğini karşılaştırdıkları bir çalışmada, bu yöntemlerin tek başına yeterli olmadığını belirlemişlerdir. Güvenilir bir sonuç için en az iki yöntemin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini kaydetmişlerdir. Sunulan bu çalışmada vajinal sitoloji ile seksüel dönemlerin ayrımı yapılmış ancak vajinal sitoloji ile progesteron seviyesinin aynı anda bakılmasının seksüel dönemlerin belirlenmesini kolaylaştıracağı ve güvenilirliğini de artırdığı saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda yukarıda bahsedilen Wright (1990), Himemstra (2001) ve Fay (2003) çalışmaları desteklemektedir.

Feldman ve Nelson (2004), yaptıkları çalışmada değişik dönemlere göre progesteron konsantrasyonlarını belirlemişler, proöstrüs döneminde serum progesteron miktarını $1,7 \pm 0,3$ ng/ml, östrüs döneminde <2 ng/ml, LH piki sırasında >2 ng/ml, ovulasyon sırasında 4-10 ng/ml ve diöstrüs döneminde 15-90 ng/ml olarak bildirmişlerdir. Johnston ve ark. (1991) ise doğal sıkluslarda serum progesteron seviyesini ovulasyon sırasında 4-10 ng/ml, erken diöstrüs döneminde 25-30 ng/ml, diöstrüsün 2-3. haftaları arasında en yüksek düzey olan 36-40 ng/ml olduğunu tespit etmişlerdir. Mestre ve ark. (1990), yaptıkları diğer bir araştırmada progesteron konsantrasyonunu proöstrüsün başlangıcında 0.2 ng/ml, sonlarına doğru 0.6 ng/ml seviyesinde olduğunu, Lh piki sonrası 20-25. günde ise 47 ± 3.1 ng/ml ulaştığını ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışma sonunda da yukarıda konuyla ilgili bahsedilen çalışmalar ile paralellik göstermekle birlikte sunulan bu çalışmada ayrıca hızlı progesteron testi kullanılarak proöstrüs evresinde C1-C2, östrüs evresinde C3, ovulasyon sırasında C4 ve diöstrüs döneminde C4 düzeyinde olduğu tespit edilmiştir.

Nak ve ark. (2001) açık piyometralı köpeklerde vajinal sitolojinde incelendiği bir çalışmada, bazal-parabazal tipte hücre yoğunluğu gözlenmiş ve nötrofil-lökositler yangının varlığını doğruladığını ifade etmişlerdir. Arora ve ark. (2006) ise piyometralı köpeklerde yaptıkları vajinal smear muayenesinde; vakuollü

endometrial hücreler, vajinal epitel hücreler, nötrofiller ve bakteri gözlemlemişlerdir. Vajinal smearda görülen nötrofillerin vajinitis ve diğer uterus yangılarında da görüldüğünü, bu nedenle vajinal sitolojinin piyometranın tanısında tek başına güvenle kullanılan bir yöntem olmadığını vurgulamışlardır. Sunulan bu çalışmada açık piyometra olgularında da bol miktarda bazal ve parabazal hücre görülmüştür. Nötrofil-lökosit ve bakteri yoğun oranda belirlenmiştir. Kapalı piyometra olgularında vajinal smear belirleyici bir yöntem olmadığı saptanmış olup, vajinal sitoloji yöntemi piyometra tanısında tek başına yeterli sonuç vermediği görülmüştür. Bu nedenle piyometra tanısında vajinal sitoloji ile birlikte hızlı progesteron testi yapılması güvenli sonuç vermiştir. Bu veriler konuyla ilgili yapılan yukarıdaki araştırmalar ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca yapılan çalışmada hızlı progesteron testi kullanılarak köpeklerin progesteron seviyesi C2 (1-2.5 ng/ml) olarak tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Vajinal sitoloji; hastalığın teşhisinde bize ön bilgi vermekte fakat bazı olgularda kesin tanı koyulmasında yeterli olmamaktadır. Tanıya giden yolda vajinal sitolojiye ek olarak ultrasonografi ve hormon değerlerinin ölçümü teşhisi kolaylaştırmaktadır.

Sunulan bu araştırmada, köpeklerde yapılan vajinal sitolojinin birçok kullanım alanı olan, uygulama maliyeti düşük ve sık tercih edilen bir yöntem olduğu görülmüştür. Vajinal sitoloji ile östrüs siklusunun takibi yapılabilmekte, üremenin kontrolü ve patolojik olgularda tanıya götürmede önemli fikir vermektedir.

Vajinal sitoloji yönteminde bu çalışmada iki farklı boyama metodu kullanılarak güvenilirlik derecesi, avantaj ve dezavantajları kıyaslanmış ve Papanicolaou boyama yöntemiyle vajinal hücrelerin ayırt edilmesi Diff quick boyama yöntemine göre daha kolay olduğu, ancak klinik ortamda kullanımı ve hızlı sonuç vermesi açısından Diff quick boyama yöntemi de tercih edilebilecektir.

İki farklı boyama sonucunda ortaya çıkan sonuçlar ile yapılan istatistiksel değerlendirmede önemli bir fark bulunmamış olup her iki boyama yöntemi güvenle kullanılabileceği görülmüştür.

Vajinal sitoloji yapılan köpeklerin, hızlı progesteron testi ile progesteron skalasına bakılarak seksüel siklus ve piyometra olgularında doğru teşhisin yapılabildiği görülmüştür. Sunulan bu çalışmada kullanılan hızlı progesteron testi erken proöstrüs de C1, orta ve geç proöstrüs de C2, östrüs evresinde C3-C4, diöstrüs evresinde C4 ve piyometra tanısında C2 skalasını vermiştir. Bu sonuçlara göre hızlı progesteron testi, seksüel siklus dönemlerinin belirlenmesinde, vajinal sitoloji ile birlikte güvenle kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Arbeiter K, Dobretsberger M, Müller E, Holzmann A** (1991). Indirect detection of ovulation and fertilization in the dog by progesterone level testing. *Zentralbl Veterinarmed A.*, **38**(9), 696–701.
- Arora N, Sandford J, Browninig GF, Sandly JR, Wringht PJ** (2006). A model for cystic endometrial hyperplasia/ pyometra complex in the bitch. *Theriogenology.*, **66**, 1530-1536.
- Autumn P. Davidson, DVM, MS, DACVIM** (2015). Determining canine estrus stage via vaginal cytology, *Theriogenology*, Univesty of California., p: 19-20.
- Bastan A, Çetin Y, Güngör Ö, Basaran D** (2003). Köpeklerde Seksüel Siklus Dönemleri, Gebelik ve Pyometrada Endometrial Sitoloji Bulguları. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, **27**, 923–927.
- Ball RL, Birchard SJ, May LR, Threfall WR, Young GS** (2010). Ovarian Remnant Sydrome in dogs and cats: 21 cases. *J. Am Vet Med Assoc.*, **236**(5), 548-553.
- Baştan A, Aslan S** (1999). Köpeklerde Uzun süreli Östrusun Sağıtımında Megestrol Acetate' in Etkisi. *Tr.J.of Veterinary and Animal Sciences.*, **23** (2), 237-241.
- Beimborn KS, Tarpley HL, Bain PJ, Latimer KS** (2013). The canine estrous cycle staying using vajinal cytological examination.
- Busch W, Schulz J** (1993). Geburtshilife bei Haustieren, *Gustaw Fischer Verlag Jena Stuttgart*, p: 540- 549.
- Christe DW, Bailey JB, Bell ET** (1972). Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle. *British Vet. J.*, **128**, 301–310.
- Christiansen J** (1984). *Cytological Examination of the vaginal smear*, In : Reproduction in the Dog and Cat. Bailliere Tindall, London, p: 20-28.

Concannon PW (1986). *Canine physiology of reproduction*. In: Small animal reproduction and infertility, edition, T.J. Burke, Lea&Febiger, Philadelphia, p: 23–120.

Concannon PW (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.*, **124**, 200-210.

Çiftcier B, Uysal O (2014). Uzamış proöstruslu dişi köpeklerde dölverimi. *Lalahan Hay.Araşt. Enst.Derg.*, **54**(2), 71-76.

Çizmeci SÜ, Köse AM, Aydın İ, Dinç DA, Maden M, Köse Sİ (2012). Transmissible venereal tümörlü dişi köpeklerde otojen aşı uygulaması. *Eurasian J Vet Sci.*, **28**(4), 220-223.

Demirel MA (2011). Pyometralı Köpeklerde Tanı Yöntemleri. *J Fac Vet Med Univ Erciyes.*, **8**(3), 201-209.

Dennis J, Hamm B (2012). Canine Pyometra: Early recognition and diagnosis. *Veterinary Medicine.*, 01 May.

Elisabeth C. Snead, John W. Pharr, Brendon P. Ringwood ,and Jennifer Beckwith (2010). Long- Retained Vaginal Foreign Body Causing Chronic Vaginitis in the Bulldog. *Journal of the American Animal Hospital Association.*, **46** (1), 56-60.

England GCW (1992). Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in the breeding management of bitches. *J. Small Anim. Pract.*, **33**, 577–582.

England GCW (1994). Reproduction in the bitch. *Vet. Pract. Nurse.*, **2**: 26–29.

England G, Concannon PW (2002). Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. *International Veterinary Information Service*, Ithaca, New York.

Erüenal-Maral N (2000). Dişi köpeklerde vaginal sitoloji, vaginoskopi ve hızlı progesteron test yöntemlerinin optimum çiftleşme zamanının saptanması amacıyla kullanılması. *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*

Erünal-Maral N, Fındık M, Aslan S (2000). Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, **107**, 175–180.

Evans MJ, Savage TJ (1970). The Collection of Vaginal smears from Bitches, *Vet. Rec.*, **7**, 593-599.

Eze CA, Anyanwu HC, Kene ROC (2007). Review of canine transmissible venereal tumour (TVT) in dogs. *Nigerian Vet J.*, **28**, 54-70.

Fay J, Mezo T, Solti L, Wolfling A, Abonti- Toth Z (2003). Comparison of different methods used for oestrus examination in the bitch. *Acta Veterinaria Hungarica.*, **51**(3), 385–394.

Feldman CE, Nelson RW (1987). *Vaginal Exfoliative Cytology*. in: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Edition, Pederson D, W.B. Saunders Co, Philadelphia, p: 413-415.

Feldman EC, Nelson RW (2004). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd edition, W.B. Saunders, Philadelphia., p: 486–834.

Feldman EC, Nelson RW (2004). *Ovarian cycle and vaginal cytology*. In: Feldman EC, Nelson RW. Editors, Canine and Feline Endocrinology and Reproduction 3rd edition. USA: Elseiver science, p: 752-773.

Günay A, Günay Ü (2004). Köpeklerde Hızlı Progesteron Kiti Yardımı ile Yapılan Çiftleştirmelerde Gebelik Oranlarının Arttırılması. *Vet. Bil. Derg.*, **20** (3), 69-73.

Haşegan I, Şonea A, Matei M, Vintila L, Ion C, Birtoiu A (2012). Current Relevant Knowledge on Dog Reproductive Physiology-A Review, *Anim Sci Biotechnol.*, **45**, 172-180.

Heape W (1900). The sexual season of mammals and the relationship of “pro-estrus” to menstruation. *Part I. QJ Microbiological Science.*, **44**, 1 – 70.

Himemstra M, Schaefers-Okkens AC, Teske E, Kooistra, H. (2001). The reliability of vaginal cytology in determining the optimal mating time in the bitch. *Tijdschr Diergeneeskde.*, **126**, 685–689.

Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS (2001). *Disorders of the canine vagina, vestibule and vulva*, In: Canine and Feline Theriogenology, Edition, Kersey R, W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA., p: 225-242.

Kalkan C, Horoz H (2007). *Pubertas ve seksüel sikluslar*, Editör: Alaçam E., Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite, Medisal Yayınevi, Ankara, s: 23-41.

Kegler K, Habierski A, Amarilla S, Seehusen F, Baumgartner W (2012). Vaginal Canine Transmissible Veneral Tumour Associated with Intra- tumoral Leishmania.

Kırşan İ, Şenünver A, Kılıçarsan R (1996). Dişi Köpekte vaginal sitolojik muayeneler yardımı ile seksüel siklus dönemlerinin teşhisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.*, **2**, 173-177.

Konuk CS, Kırşan İ, Gürbulak K, Tek Çi Şenünver A (2001). Dişi Köpeklerde Vaginal Sitolojiye Dayalı Asidofilik İndeks (AI) Ve Serum Progesteron Seviyeleri Üzerinde Çalışmalar. *İstanbul Üniv. Fak. Derg.*, **27**(1), 91-97.

Kustritz MVR (2012). Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. *Vet Clin N Am- Small.*, **42**, 423- 437.

Martins MIM, Ferreira de Souza F, Gobello C (2005). The canine transmissible venereal tumor: Etiology, pathology, diagnosis and treatment. Recent Advances in Small Animal Reproduction, (Erişim): www.ivis.org.

Mestre J, Wanke M, Sucheyre S (1990): Ezfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinising hormone and oestradiol-17 Beta during oestrus in the bitch. *Journal of small Animal Practice.*, **31**, 568-570

Moxon R, Copley D, England GCW (2010). Quality assurance of canine vaginal cytology: A preliminary study. *Theriogenology.*, **74**, 479–485.

Mukaratirwa S, Gruys E (2003). Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. *A review. Vet Q.*, **25**, 102-111.

Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA (2006). Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *NIH Public Access.*, **126**, 477-487.

Nak D (2001). Dişi köpeklerde transmissible venereal tumor. *YYU Vet Fak Derg.*, **7**, 152-155.

Nak D, Mısırhoğlu D, Nak Y, Kuzugüden F, Keskin A (2001). Köpeklerde Pyometranın Tanısında Laboratuvar, Ultrasonografi ve Vaginal Sitoloji Bulgularının Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi Üzerine Çalışmalar. *J Fac Vet Med.*, **20**, 1-7.

Oettel M (1979). Reproduktionsbiologie der Hündin. *Mh. Vet. Med.*, **34**, 937-942.

Okkens AC, Bevers MM, Dieleman SJ, Haaften B, Sluijs FJ (1992). Fertility problems in the bitch. *Anim Reprod Sci.*, **28**, 379-387.

Olson PN, Wrigley RH, Husted PW, Richard AB, Nett TM (1989). *Persistent estrus in the bitch*, In: Textbook of Veterinary internal Medicine, Edition, S.J. Ettinger. W.B. Saunders, Philadelphia. p: 1792–1796.

Özyurtlu N, Bademkiran S, Ünver O, Yıldız F, İçen H (2008). Dişi bir köpekte transmissible venereal tümörün abdominal ve subkutan inguinal bölgeye metastazı. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*, **1(2)**, 48-51.

Papanicolaou GN (1942). A New Procedure for Staining Vaginal smear Science, **2496**, p: 438-439.

Pretzer SD (2008). *Abnormalities of the canine estrous cycle*. A review. Canine Breeder Symposium. St. Louis, Missouri.

Pretzer SD (2008). Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review, *Theriogenology.*, **70**, 359-363.

Reddy KCS, Raju KGS, K. S. Rao KS, Rao KBR (2011). Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: breeding tools in Bitches. *Iraqi Journal of Veterinary Science.*, **25**(2), 51-54.

Roszel JF (1975). Genital cytology of the bitch. *Vet. Scope.*, **19**, 2–15.

Roszel JF (1977). Normal canine vaginal cytology. *Vet. Clin. North.*, p: **4**, 667–681.

Sangstar C (2005). Ovarian Remnant Syndrome in a 5- year-old bitch. *Can Vet J.*, **46** (1), 62-64

Shille VM, Stabenfeldt GH (1980). *Clinical reproductive physiology in dogs*. In morrow. Ed: Current Theraphy in Theriogenology. Philadelphia WB, Saunders Co, p:45-52.

Sontaş H, Şenünver A Altun D, Yılmaz ÖT, Ekici H, Arun S (2010). Bir Köpekte Eş Zamanlı Seyreden Ovaryan Remnant Sendromu, Bulaşıcı Veneral Tümör ve Stump Pyometra Olgusu. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **16**(4), 675-680.

Tural M. (2012). *Diöstrustaki ve Anöstrustaki Köpeklerde Östrusun Uyarılması*. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Tünay R, Tekin N, Daşkın A (2002). Köpeklerde Östrus ve en uygun tohumlama zamanının saptanmasında vaginal sekresyonda glukoz içeriğinin kriter olarak değerlendirilmesi. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, **49**(2), 107-112.

Wehrend A, Plato K, Goericke-Pesch S (2013). Exfoliative vaginal cytology in the bitch-Indications, procedure, interpretation, *TierärztlicheI Praxis*. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere.

Wright PJ (1990). Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. *J. Small Anim. Pract.*, **31**, 335–340.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Birol Can EREN

Doğum Yeri ve Yılı: ANTALYA, 1992

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Uyruğu: TC.

Telefon No: 0536 322 05 88

E-posta: erenbirolcan07@gmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim: Yeniköy İlköğretim Okulu

Lise: Mustafa Ayten AYDIN Lisesi, 2010

Lisans: Mehmet Akif ERSOY Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 2015



