

DIŞİ KÖPEKLERDE ÖSTRUS SIRASINDA VAGİNAL SİTOLOJİYE DAYALI ASİDOFİLİK İNDEKS (Aİ) VE SERUM PROGESTERON SEVİYELERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Cengiz Sergen KONUK*

İsmail KIRŞAN *

Kutlay GÜRBULAK**

Çağatay TEK*

Adem ŞENÜNVER*

Determination of Ovulation Time Using The Eosinophilic index (EI) of Vaginal Cytology and Serum Progesterone Levels in the Bitch

Summary: In this study, cross-bred, pubertal, seven bitches were used. The bitches were bled every day and vaginal smears were taken after the sign of proestrus until the first day of diestrus. The ovulation time (day 0) was accepted as the progesterone level in sera reached 5 ng/ml. The smears and sera taken 5 days before and 5 days after the ovulation time were evaluated.

The concentration of progesterone in blood sera were measured by radioimmunoassay (RIA). The smears on cotton-swabs were stained with Papanicolaou stain and the eosinophilic index (EI) were determined.

The results of this study showed that the highest EI ($70\pm3.8\%$) was determined a day after the ovulation time. The EI value decreased dramatically at day 3 ($40\pm7.7\%$) and the decrease lasted by day 5. The highest EI values were determined a day before the ovulation, at ovulation and a day after the ovulation. The progesterone level in sera was 0.7 ± 0.2 ng/ml 5 days before the ovulation and increased by day 5 after the ovulation and reached at 16 ± 4.2 ng/ml.

This study has indicated that the EI value obtained from the cotton-swabs smears should be considered for prediction of ovulation in bitches.

Key Words: Ovulation, vaginal cytology, eosinophilic index, progesterone, bitch

* İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 34851, Avcılar, İstanbul

** Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kars

Özet: Çalışmada pubertaya ulaşmış yedi adet melez dişi köpek kullanıldı. Köpeklerden proöstrus belirtilerinin başlamasından diöstrusun ilk gününe kadar hergün kan ve vaginal smear örnekleri toplanarak incelendi. Kan örneklerinde progesteron seviyesinin 5.0 ng/ml'ye ulaşması ovulasyon zamanı (0. Gün) olarak kabul edildi. Bundan 5 gün önce ve sonrasında alınan kan ve smear örnekleri değerlendirildi.

Kan serumundaki progesteron hormon konsantrasyonları RIA yöntemi ile belirlendi. Pamuklu çubuk tekniği kullanılarak alınan vaginal smear örnekleri Papanicolaou boyama tekniği ile boyandı ve incelenen örneklerde asidofilik index (Aİ) saptandı.

Çalışmada en yüksek Aİ 70 ± 3.8 ile ovulasyondan sonra 1. günde saptandı. Aİ 3. günde (40 ± 7.7) hızla düştü ve bu düşme 5. güne kadar sürdü. En yüksek Aİ değerleri ovulasyondan bir gün önce, ovulasyon anında ve ovulasyondan bir gün sonra saptandı. Serum progesteron seviyeleri ise ovulasyondan 5 gün önce 0.7 ± 0.2 olarak bulundu ve giderek artarak ovulasyondan 5 gün sonra 16 ± 4.2 ng/ml'ye ulaştı.

Dişi köpeklerde pamuklu çubuk yöntemi ile alınan vaginal smear örneklerinde saptanan asidofilik indeksin, ovulasyon zamanını tahmin etmede yararlı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Ovulasyon, vaginal sitoloji, asidofilik index, progesteron, köpek

Giriş

Dişi köpeklerde östrus siklusunun belirlenmesi amacıyla değişik metotlar ortaya konmuştur. Dış östrus belirtileri, östrus ve çiftleşme zamanının tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak fertler arasında farklılıklar bulunması ve gözleme dayalı olması nedeniyle ovulasyon zamanı ve fertil periyodun belirlenmesinde fazla güvenilir değildir (4). Günümüzde vaginal sitoloji ve hormon ölçümleri köpeklerde ovulasyon zamanı ve fertil periodun belirlenmesi amacıyla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (1,2,3,6,8,9,13,18).

Seksüel siklusun değişik dönemlerinde etkin olan ovaryum kaynaklı hormonlardan özellikle östrojen vagina duvarındaki çok katlı yassı epitel hücrelerinde belirgin olarak yapısal değişimlere neden olmaktadır. Vagina epitel hücrelerinde oluşan bu değişimlerin vaginal

smear yöntemi ile tanımlanarak dişi köpeğin seksüel siklusun hangi evresinde olduğu tespit edilmektedir (8,12,14,20). Vaginal sitolojide tricrom boyama metodları keratinize ve keratinize olmamış hücrelerin belirlenmesine olanak tanımaktadır. Yapılan çalışmalar vaginal sitolojide; keratinize hücrelerin toplam hücre sayısına olan oranının (Asidofilik indeks, AI) saptanmasıyla ovulasyonun tespit edilebileceğini göstermiştir (7,13,17,20). Mestre ve ark. (13), tarafından keratinize hücrelerin toplam hücre sayısına olan oranının % 60'ı aştığı anda ovulasyonun gerçekleştiği rapor edilmiştir.

Dişi köpeklerde plasma progesteron ölçümleri östrus siklusunun evrelerinin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılmaktadır. Ovulasyon öncesinde progesteron konsantrasyonunun artması dişi köpeklere özgüdür. Yapılan çalışmalarda plasma progesteron konsantrasyonlarının anöstrus ve proöstrus boyunca 1.0 ng/ml, LH piki anında 2-4 ng/ml ve ovulasyon anında ortalama 5.5 ng/ml (4-10 ng/ml) olarak ölçüldüğü bildirilmektedir (4,5,11,16).

Concannon ve ark. (5), hormonal ölçümler ile ovulasyon zamanının doğrulukla belirlenebildiğini ve RIA ile ölçülen 5.44 ± 0.93 ng/ml serum progesteron konsantrasyonunun ovulasyonun karşılığı olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada dişi köpeklerde vaginal smeardaki asidofilik indeks değişimi ve serum progesteron konsantrasyonları arasındaki ilişkiye dayanılarak ovulasyon zamanının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve metot

Çalışmada pubertaya ulaşmış, canlı ağırlıkları 20-30 kg arasında olan yedi adet melez dişi köpek kullanıldı.

Hemorajik vulva akıntısının görülmesi köpeklerde proöstrusun başladığının klinik göstergesi olarak kabul edildi ve örnekleme buna göre yapıldı.

Proöstrus belirtilerinin başlamasından östrusun sonuna kadar hergün kan ve vaginal smear örnekleri alındı. Holts'un (8) tarif ettiği gibi vaginal smeardaki intermedier hücrelerin toplam epitel hücre sayısına oranının % 10' u geçmesi ve lökositlerin tekrar görülmesi östrus periyodunun bitişi ve diöstrusun başladığının göstergesi olarak kabul edildi.

Kan örnekleri v. cephalica antebrachii'den alındıktan sonra serumları çıkartılarak hormon ölçümlerine kadar -20 C° 'de saklandı. Kan serumundaki progesteron hormonu RIA yöntemi ile belirlendi. Ölçümlerde Coat-A-Count Progesteron (Veterinary Applications of DPC kits) ticari test kitleri kullanıldı (4,10).

Vaginal smear örnekleri pamuklu çubuk vasıtasıyla cranial vaginadan hafif rotasyonlar yaptırılmak suretiyle alındıktan sonra temiz bir lam üzerine yayıldı. Hazırlanan preparatlar %95'lik etanol-eter (1/1) solüsyonunda fiksasyon işlemine tabi tutulduktan sonra Pappanicolaou boyama tekniği ile boyanarak incelendi (15).

Her smear örneğinin asidofilik index'i (Aİ) şu formül yoluyla bulundu;

$$Aİ = \frac{\text{Keratinize olmuş süperfisiyel hücrelerin sayısı} \times 100}{\text{Toplam epitel hücre sayısı}}$$

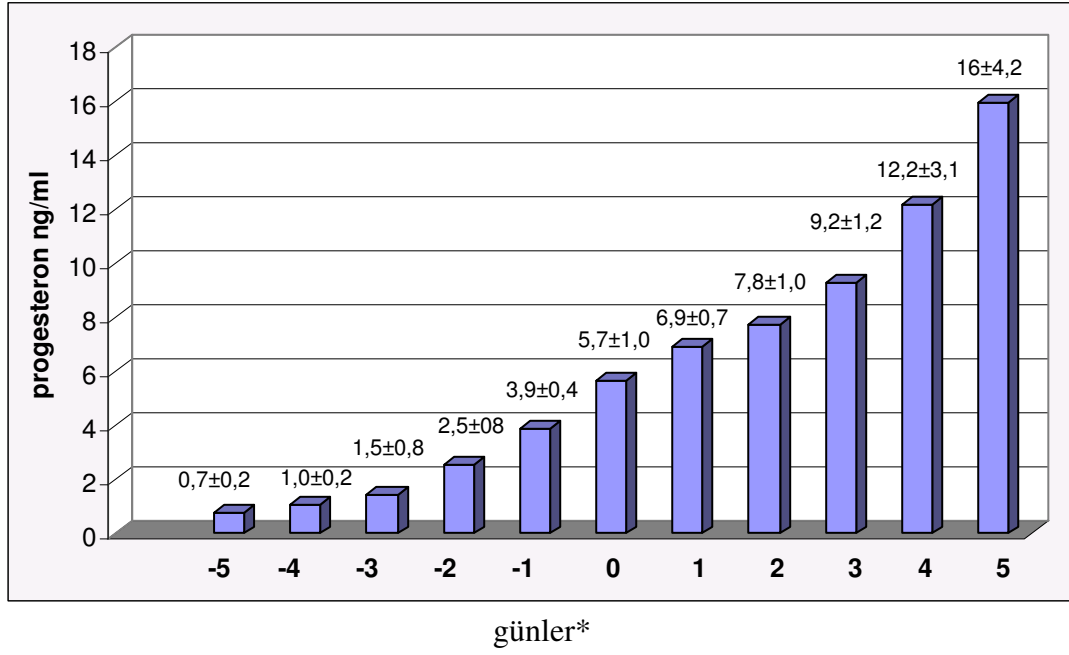
Alınan kan örneklerinde serum progesteron seviyesinin $>5.0\text{ ng/ml}$ 'ye ulaşması ovulasyon zamanı (0.gün) olarak kabul edildi (4,5,11,16). Bundan 5 gün öncesi ve 5 gün sonrasına kadar olan zaman aralığındaki örnekler değerlendirmeye alındı.

Bulgular

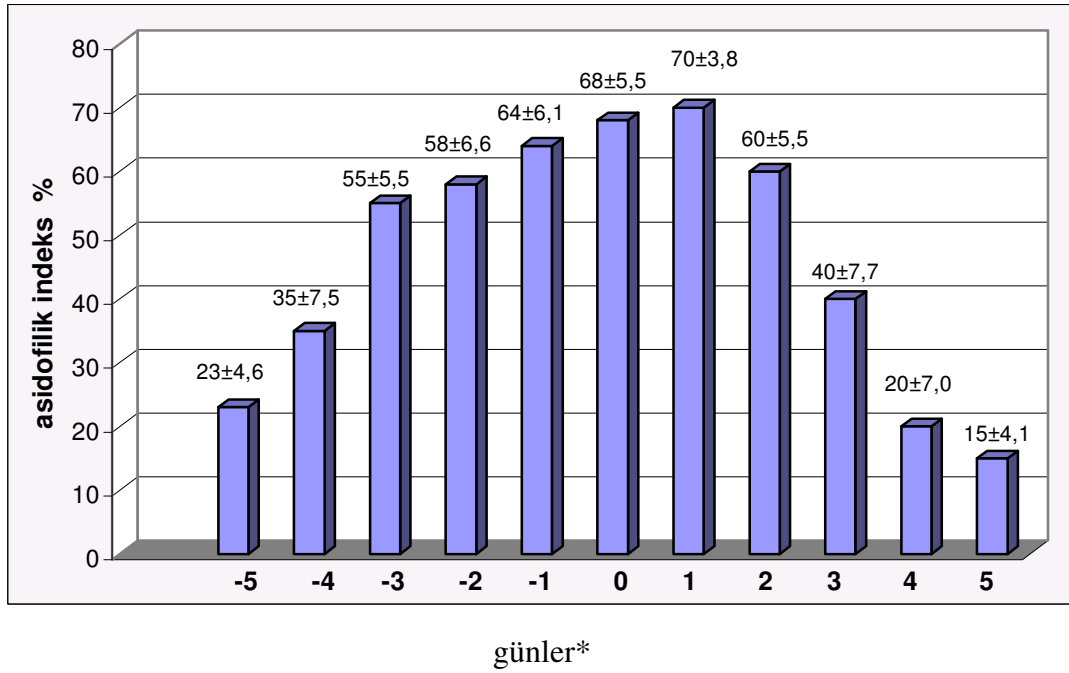
Çalışmada serum progesteron seviyelerinin 5.0 ng/ml saptandığı gün ovulasyonun olduğu gün olarak kabul edildi. Serum progesteron seviyeleri -5. günde 0.7 ± 0.2 olarak bulundu ve giderek artarak 5. günde $16 \pm 4.2\text{ ng/ml}$ 'ye ulaştı (Şekil 1). Buna göre tahmin edilen ovulasyon günü 0. gün olmak üzere bundan 5 gün öcesi ve sonrası günlerdeki serum progesteron seviyeleri ve vaginal smear örneklerindeki asidofilik index değişimi şekil 1 ve şekil 2'de verilmiştir.

Bu kritere göre 0. güne karşılık gelen Aİ değeri $\%68 \pm 5,4$ olarak tespit edildi. Bir gün sonra $\%70 \pm 3,8$ ile maksimum değerine ulaşan Aİ 3. günde ($\%40 \pm 7,7$) hızla düştü ve bu düşme 5. güne kadar sürdü, 5. günde ise Aİ $\%15 \pm 4,1$ olarak tespit edildi.

Şekil 1: Serum progesteron seviyeleri (n=7)



Şekil 2: Vaginal smear örneklerindeki Aİ değişimi (n=7)



(*): Tahmin edilen ovulasyondan 5 gün öncesi ve 5 gün sonrası günler

Tartışma ve sonuç

Dişi köpeklerde plasma progesteron ölçümleri ve vaginal sitoloji ile fertil periyod ve ovulasyon zamanının tayin edilmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır (3,4,11,13,14,16,20,21).

Dişi köpeklerde plasma progesteron konsantrasyonlarının anöstrus ve proöstrus boyunca 1.0 ng/ml, LH piki anında 2-4 ng/ml, ve ovulasyon anında ortalama 5.5 ng/ml olarak ölçüldüğü bildirilmektedir (3-5,11,16). Yapılan çalışmalar progesteron konsantrasyonunun ölçülmesi ile ovulasyon zamanının tespit edilebileceğini göstermiştir. Concannon ve ark. (5), RIA ile ölçülen 5.44 ± 0.93 ng/ml, Bouchard ve ark. (3), ise 4.9 ± 1.0 ng/ml serum progesteron konsantrasyonunun ovulasyonun karşılığı olduğunu bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada örneklemelerin başında basal seviyelerde ölçülen serum progesteron değerleri 2 ng/ml seviyesinin üstüne çıktığında Aİ $58 \pm 6,6$ olarak tespit edildi. Ortalama progesteron seviyesi $6.9 \pm 0,7$ ng/ml olarak ölçülen günlerde Aİ ortalama $70 \pm 3,8$ ile en yüksek değerine ulaşmıştır. Ölçülen bu progesteron konsantrasyonları diğer çalışmalarda (3-5,11,16) bildirilen değerlerle paralellik göstermektedir.

Çalışmada $5,7 \pm 1,0$ ng/ml serum progesteron değerinin tespit edilen ve ovulasyona karşılık geldiği varsayılan 0. günde asidofilik indeks $68 \pm 5,5$ olarak saptanmıştır. Aİ birgün sonra maksimum değere ($70 \pm 3,8$) ulaşmış ve sonraki günlerde hızla azalmıştır.

Birçok araştırmacı vaginal sitolojide; keratinize hücrelerin toplam hücre sayısına olan oranının (Aİ) saptanmasıyla ovulasyonun tespit edilebileceği bildirilmektedir (7,13,17,20). Mestre ve ark. (13), keratinize hücrelerin toplam hücre sayısına olan oranının % 60'ı aştığı anda ovulasyonun gerçekleştiğini rapor etmiştir. Bouchard ve ark. (3), Aİ %80'i geçmesinden sonra ovulasyonun olduğunu bildirmektedir. Wright (19,20), ovulasyon anında ve östrus periyodunun büyük bir kısmı boyunca asidofilik indeksi %100 seviyesinde tespit ettiklerini bildirmiştir. Östrus boyunca ve ovulasyonda tespit edilen Aİ yüzdesi Mestre ve ark. ile Bouchard ve ark. bulguları ile benzerlik göstermektedir. Wright (20,21) ve Holts (8) 'un Aİ yüzdelere göre ise daha düşük değerler saptanmıştır.

Çalışmada tespit edilen Aİ değerleri cotton swab tekniği kullanılarak alınmış vaginal smear örneklerindeki keratinize süperfisiyel hücrelerinin, toplam epitel hücre sayısına olan oranıdır. Bazı araştırmacıların da bildirdiği gibi smear hazırlamada kullanılan tekniğin süperfisiyel hücrelerin yüzdesi ve pik yaptığı nokta üzerine bazı etkileri olabilmektedir (8,12).

Pipet yöntemi ile örnekleme yapıldığında östrus anında süperficial hücrelerin oranı %100 olarak görülürken, intermediyer hücrelere rastlanılmamaktadır. Swab ya da spatül tekniği kullanıldığında ise toplama esnasında swabın epitel hücrelerini aşındırmasından dolayı intermediyer hücreler daha yüksek oranda görülmektedir. Bu da asidofilik indeks değerlerinin daha düşük olmasına neden olmaktadır.

Çalışmada Aİ ovulasyondan önceki 5. günden itibaren artmış ve ovulasyondan sonra 1. günde $70 \pm 3,8$ ile en üst seviyesine ulaşmıştır. En yüksek Aİ değerleri ovulasyona yakın günlerde (-2 ve 2. günler) saptanmıştır. Buna dayanarak Aİ değerinin %60'dan fazla çıkması, sonraki günlerde alınan örneklerde bu artışın sürmesi veya benzer değerlerin alınması tohumlama uygulamaları (optimal tohumlama zamanı) için önemli bir kriter gibi görülmektedir. Aİ değerinin keskin bir şekilde düşmesi ovulasyonun birkaç gün önce gerçekleşmiş olabileceğinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilebilir (Şekil 2).

Sonuç olarak dişi köpeklerde serum progesteron seviyeleri ve vaginal smear yöntemi ile tespit edilen asidofilik indeks değerlerinin fertil period ve ovulasyon zamanının izlenmesi amacıyla kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Literatür

- 1- **Arthur,G.H., Noakes,D.E., Pearson,H. (1986):** Infertility in the bitch and cat. In “Veterinary Reproduction and Obstetrics (Theriogenology)”. Pg. 401-416, Baillier-Tindall-London
- 2- **Aslan,S., Erünel,N., Kılıçoğlu,Ç., Fındık,M., Baştan,A., Kaymaz,M., Topaçoğlu, S. (1995):** Einsatz der Papanicolau-Farbemethode zur vaginalzytologischen Untersuchung bei der Hündin. Ankara Üniv.Vet.Fak.Derg. 42 (4) 431-439
- 3- **Bouchard,G.F., Solorzano,N., Concannon,P.W., Youngquist,R.S., Bierschwal,C.J. (1991):** Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology and elisa for progesterone. Theriogenology 35 (3) 603-611.
- 4- **Concannon,P.W., Hansel,W., Visek,W.J. (1975):** The ovarian cycle of the bitch: Plasma estrogen, LH and progesterone. Biology of Reproduction 13, 112-121

- 5- **Concannon,P., Hansel,W., McEntee,K. (1977):** Change in LH, progesterone and sexual behavior and associated with preovulatory luteinization in the bitch. Biol. Reprod. 17, 604-613.
- 6- **Dinç, D.A. (1997):** Karnivorlarda infertilite. In: Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Syf. 319-344. Ed: Alaçam, E., Birinci Baskı, Medisan Yay. Ankara
- 7- **Forsberg,C.L. (1994):** Accurate monitoring of the oestrus cycle of the bitch for artificial insemination. W.S.A.V.A.X1X. World Congres Durhan. 601-604.
- 8- **Holts,P.A. (1986):** Vaginal cytology in the bitch. In “Current Therapy in Theriogenology”. W.B. Saunders Co., Philadelphia
- 9- **İzgür,H., Tekin,N., Özyurt,M. (1986):** Köpeklerde vaginal smear yöntemi ile kızgınlık siklusu evrelerinin tanısı üzerine çalışmalar. A.Ü. Vet.Fak. Derg. 33 (2): 198-209
- 10- **Kıl,F., Kılıçarslan,M.R., Horoz,H. (1999):** Köpeklerde proöstrusta uygulanan progesteronun plasma hormon seviyeleri (progesteron, östrogen,LH) ve kan parametreleri üzerine etkisi. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg 25 (1) 1-5
- 11- **Laiblin,C. (1991):** Estrus detection in the bitch with a progesterone rapid test (EIA)- a sensible suplement to vaginal cytology. Tierärztl. Prax. 19 (2) 197-199
- 12- **Linde,C., Karlsson,I. (1984):** The correlation between the vaginal cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. J.Small Anim. Pract. 25: 77-82
- 13- **Mestre,J., Wanke,M., Sucheyre,S. (1990):** Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinising hormone and oestradiol-17 β during oastrus in the bitch. Journal of Small Animal Practice 31, 568-570.
- 14- **Olson,P.N., Husted,P.W. (1986):** Breeding management for optimal reproductive efficiency in the bitch and stud dog. In “Current Therapy in Theriogenology”. W.B. Saunders Co., Philadelphia
- 15- **Papanicolau,G.N. (1942):** A new procedure for staining vaginal smear. Science, 95, 2469: 438-439
- 16- **Phemister,R.D., Holts,P.A., Spano,J.S., Hoopwood,M.L. (1973):** Time of ovulation in the beagle bitch. Biology of Reproduction 8, 74-82

- 17- **Schutte,A.P. (1967):** Canine vaginal cytology. II. Cyclic changes. J. Small Anim. Pract. 8 (6) 307-311.
- 18- **Tekin,N., İzgür,H., Özyurt,M., (1986):** Köpeklerde vaginal smear yöntemiyle kızgınlık siklusu evrelerinin tanısı üzerinde çalışmalar. Ankara Üniv.Vet.Fak.Derg. 33 (2) 198-209
- 19- **Van Haaften,B., Dieleman,S.J., Okkens,A.C., Willemse,A.H. (1989):** Timing the mating of dogs on the basis of blood progesterone concentration. Vet. Rec. 125 (21) 524-526
- 20- **Wright,P.J. (1990):** Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. Journal of Small Animal Practice. 31, 335-340
- 21- **Wright,P.J. (1991):** Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. Aust. Vet. J. 68 (1) 10-13