

## Farklı Dozlardaki Gonadotropinlerin Ovaryum Follikül Sayıları Üzerine Etkisi

✉ Güzin PANCAROĞLU<sup>1</sup>, ✉ Tuncay İLHAN<sup>1</sup>, ✉ Hatice ERDOST<sup>1\*</sup>

1 Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü, Bursa, Türkiye.

Received 19.04.2018 Accepted 26.07.2018

### Özet

Çalışmamızın amacı farelere, farklı dozlarda Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) ve takiben Human Chorionic Gonadotropin (hCG) uygulamalarının, ovaryumda gelişmekte olan follikül ve korpus luteum sayılarına olan etkilerinin istatistiksel yöntemler ile belirlenmesidir. Çalışma materyali olarak 7 haftalık 40 adet BALC/c soyu dişi fare kullanıldı. Fareler, rastgele dört gruba ayrılarak, kontrol grubuna, 0,2 ml serum fizyolojik enjekte edildi. Diğer üç gruba subkutan yolla sırasıyla 2,5; 5 ve 7,5 I. U. PMSG hormonu verildi. PMSG enjeksiyonunun izleyen 48'inci saatte, deney gruplarına, PMSG'nin artan dozuna paralel olarak, gruplara sırasıyla 2,5; 5 ve 7,5 I. U. hCG, kontrol grubuna ise 0,2 ml serum fizyolojik subkutan yolla enjekte edildi. Anestezi altında alınan ve tespit edilen ovaryumlara rutin histolojik metodlar uygulanarak; ovaryum foliküllerinin ve korpus luteumların sayılması için Crossmon'ın üçlü boyama tekniği uygulandı. Çalışmamızda 3 farklı dozda yapmış olduğumuz uygulamalarda tüm deney gruplarında foliküler gelişimin kontrole oranla daha fazla olduğu görüldü. Gelişen folikül sayısının I. deney grubunda en çok olduğu sırasıyla III. ve II. deney grubu ile en az kontrol grubunda olduğu saptandı. Ovulasyon açısından korpus luteumlar değerlendirildiğinde en çok III. deney grubu sırasıyla II. ve I. deney grupları bulunurken en az kontrol grubunda olduğu görüldü. Uygulanan protokollerin hepsinde kullanılan gonadotropin dozuna bağlı olarak foliküler gelişimin ve ovulasyonun arttığı saptandı. Sonuç olarak; çalışmada en çok korpus luteum oluşumunun saptandığı III. deney grubunun (7,5 I.U. PMSG ve ardından 7,5 I.U. hCG'nin s.c.enjeksiyonununun) histolojik değerlendirmeler sonucunda, BALC/c soyu dişi fareler için en uygun süperovulasyon protokolü olduğuna karar verildi.

**Anahtar Kelimeler:** Süperovulasyon, PMSG, hCG, ovaryum, fare.

### Abstract

The aim of our study is to determine the effect of PMSG and following hCG administration to seven-week-old mice follicle development and corpus luteum formation by statistically methods. Seven-week-old, fourty BALB/c breed female mice were used in this study. Mice were divided in to four groups randomly, and 0,2 ml buffer saline was injected to control group. PMSG hormone was administrated at doses of 2,5; 5 and 7,5 I.U. respectively to other three groups. hCG was injected 2,5; 5 and 7,5 I.U. subcutaneous doses respectively to the experiment groups after 48 hours later than PMSG administration and 0,2 ml buffer saline was injected subcutaneously to control group. Ovaries were collected and fixed for histological examination and Crossmon's triple staining method was applied for examination of follicle and corpus luteum developments in all experiment groups were more than control group. First experiment group had the most developing follicle number, followed by third and second experiment group respectively and at least control group. When corpus luteums were evaluated in terms of ovulation, it was seen that the third, second and first experiment groups were the most respectively and the control was the least. In all procedures, follicular development and ovulation were increased depending on the applied dose of gonadotropin. As a result of this study; it was decided, third experimental group had the most number of corpus luteum formation (7,5 I.U. PMSG and following 7,5 I.U. hCG subcutaneous administration) was the most appropriate superovulation procedure for BALB/c breed female mice.

**Key Words:** Superovulation, PMSG, hCG, ovarium, mouse.

\* Corresponding author: Hatice Erdost, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü, Bursa, Türkiye. E-mail: edost@uludag.edu.tr Telefon: +902242941262 Fax: +902242941202

## Giriş

Deneyel çalışmalarda, özellikle üreme tıbbı, genetik ve toksikoloji alanlarında fare, iyi bilinen bir deney hayvanı olup süperovulasyon protokolleri için başarılı bir modeldir.<sup>1</sup> Süperovulasyon, follikül gelişimi ve ovosit salınımı için hormon tedavilerini içerir.<sup>2,3</sup> Follikül gelişimini teşvik etmek için kullanılan hormonlar; FSH, gebe kırsak serum gonadotropin (PMSG) veya insan menopozal gonadotropindir (HMG).<sup>4,5</sup> PMSG/hCG kombinasyonu ile süperovulasyon, farenin siklus döneminin her aşamasında ovulasyonu uyardığı bilinmektedir.<sup>6,7</sup> Yaş ve fare soyları süperovulasyon protokol sonuçlarını etkileyen önemli faktörler arasındadır.<sup>8,10</sup> Genellikle 3-6 haftalık dişilerden maksimum sayıda yumurta elde edilebilmektedir. Fare soyları, süperovulasyon uygulamalarına yüksek seviyede yanıt verenler (30-50 yumurta/fare), düşük seviyede yanıt verenler (<15 yumurta/fare) olmak üzere iki kategoriye ayrılır. C57BL/6J, BALB/cByJ ve SJL/J soyları yüksek seviyede ovulatuvar iken, A/J, C57/L ve 129/J düşük seviyede ovulatuvar soylardır.<sup>11</sup> Çalışmamızda 7 haftalık yaşta çok sayıda yumurta elde edilebilen BALB/c soyu dişi fareler kullanıldı.<sup>12,13</sup>

Multifolikülasyon ve süperovulasyonu sağlamak amacıyla hipofiz kökenli gonadotropinler; Follikül Uyarıcı Hormon (Follicule Stimulating Hormone-FSH), Lüteinleştirici Hormon (Luteinizing Hormone-LH) ve İnsan Menopozal Gonadotropini (Human Menopausal Gonadotrophin-HMG), plasental kökenli gonadotropinler; Gebe Kırsak Serum Gonadotropini (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin-PMSG) ve İnsan Koriyonik Gonadotropini (Human Chorionic Gonadotrophin-hCG), Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (Gonadotrophin Releasing Hormone-GnRH) agonisti ile klomifen sitrat, difenileilen türevleri gibi bazı sentetik preparatlar da kullanılmaktadır.<sup>14-17</sup> PMSG, kompleks bir glukoprotein olup PMSG içeren ticari preparatlar yüksek oranda FSH ve takiben LH etkisi gösterirler. FSH aktivitesi ovaryum intersitisyel hücrelerinin gelişmesini, folliküllerin büyümesini ve olgunlaşmasını stimüle eder. LH aktivitesi ise ovulasyonu indükleyerek süperovulasyon oluşturur.<sup>18,19</sup> LH, diğer bir hipofiz hormonu olan FSH ile birlikte, üreme organlarının faaliyetlerini kontrol altında tutar. hCG içeren ticari preparatlar kadınların ve erkeklerin hipofiz bezinde üretilen, LH ile aynı etkileri gösterir.<sup>20</sup> Vücudun yeterli miktarda FSH ve LH üretememesi büyük ölçüde üreme kapasitesinin azalmasına yol açar. Süperovulasyon protokollerinde FSH içeren preparatın (Folligon®-Intervet, Kanada) enjekte edilmesi, oositin olgunlaşmasını, takiben LH içeren preparatın (Pregnyl-Organon, İngiltere) uygulanması ile olgunlaşan oositin ovule olmasını sağlaması nedeniyle oldukça sık kullanılmaktadır.<sup>20</sup> Bu çalışma farklı hormon dozlarının süperovulasyon pro-

tokollerine olası etkisini göstermek ve kullanılan dozlardan uygun olanını saptamak için hazırlanmıştır. 7 haftalık farelere, farklı dozlarda PMSG takiben hCG uygulamalarının, ovaryumda foliküler gelişime ve korpus luteum oluşumuna olan etkilerinin istatistiki yöntemler aracılığı ile belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## Materyal ve Metot

### Deney Hayvanları ve Bakım Koşulları

Çalışma Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülerek 7 haftalık 40 adet BALB/c soyu dişi fareler kullanıldı. Fareler standart fare yemi ile beslenerek, önlerinde su sürekli bulunduruldu. Çalışmadaki tüm deneysel uygulamalar Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Komitesi tarafından onaylandı (Karar No: 2012- 02/06).

### Deney Planı

Fareler, rastgele dört gruba ayrılarak, tüm deney boyunca 14 saat aydınlık/10 saat karanlık döngüsüne maruz bırakıldı. Östrus döngülerini saptamak amacıyla smear ile proöstrus ve östrus dönemindeki hayvanlar belirlenerek kontrol grubuna, 0.2 ml serum fizyolojik enjekte edildi. Diğer üç gruba subkutan (s.c.) yolla sırasıyla 2.5; 5 ve 7.5 Uluslararası Ünite (I. U.) PMSG (Folligon®-Intervet, Kanada) hormonu (1000 I.U.) verildi. PMSG enjeksiyonunu izleyen 48'inci saatte, deney gruplarına, PMSG'nin artan dozuna paralel olarak, gruplara sırasıyla 2.5 I. U. (I. deney grubu); 5 I. U. (II. deney grubu) ve 7.5 I.U. (III. deney grubu) hCG (Pregnyl-Organon, İngiltere) (1500 I. U./ ml) ; kontrol grubuna ise 0.2 ml serum fizyolojik s.c. yolla enjekte edildi. Deney ve kontrol gruplarından 10'ar farenin hormon enjeksiyonundan önce canlı ağırlıkları ölçüldü (canlı ağırlık I). hCG enjeksiyonunu takiben 17 ile 20. saatlerde servikal dislokasyondan hemen önce canlı ağırlıkları tekrar ölçülerek (canlı ağırlık II) di-etil eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapıldı. Takiben süratle ovaryumlar çevresindeki yağ dokusu temizlenip, tartımları yapılarak Bouin tespit solüsyonuna alınarak tesbit edilen her bir farenin sağ ve sol ovaryumları stereo (Nikon SMZ1000, Japonya) mikroskopta incelendikten sonra, rutin histolojik metodlar uygulanarak doku takibi yapıldı. Her bir grupta ovaryumların tam ortasından geçecek şekilde parafin bloklardan 5-6 mikrometre kalınlığında (Leica RM 2155, U.S.A.) kesitler alındı. Her grupta bu ovaryum doku kesitlerine genel yapının gözlenmesi ve follikül sayımının yapılması için Crossmon'ın üçlü boyama tekniği<sup>21</sup> uygulandı. Araştırma mikroskobunda (Nikon Eclipse 80i,

Japonya), her gruba ait farelerin ovaryumlarından hazırlanan preparatlarda özellikle oosit çekirdeğinin görüldüğü primer, sekonder ve graaf foliküller ile korpus luteum sayıldı.<sup>22,23</sup>

### İstatistiksel Analizler

Deney ve kontrol gruplarına ait farelerin enjeksiyon öncesi (canlı ağırlık I), servikal dislokasyon öncesi canlı ağırlıkları (canlı ağırlık II), ovaryum ağırlıkları ile ovaryumlarda gelişmekte olan foliküller (primer ve sekonder,) graaf folikül ve korpus luteum sayıları istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm veriler SPSS 20.0 programı kullanılarak analiz edilerek enjeksiyon öncesi ve servikal dislokasyon öncesi canlı ağırlıklarının karşılaştırılmasında Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanıldı. Gruplar arası fark olup olmadığının belirlenmesinde Kruskal-Wallis Testi yapılarak fark çıkan gruplarda Mann-Whitney U Testi uygulandı<sup>24</sup>.

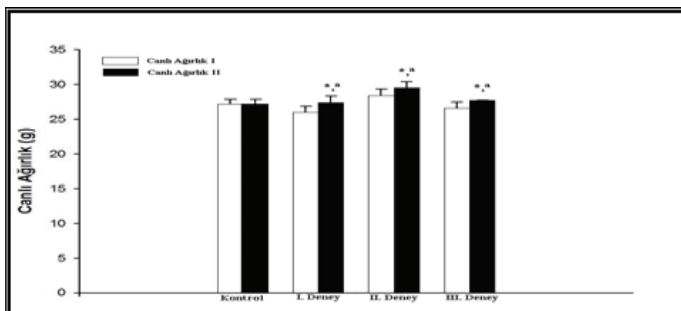
## Bulgular

### Morfolojik ve İstatistiksel Bulgular

#### Canlı Ağırlık

Kontrol ve deney gruplarına ait canlı ağırlık I ve II değerleri istatistiki açıdan değerlendirildiğinde, deney grupları kendi aralarında  $p < 0,05$  düzeyinde önem gösterirken kontrol grubunda önem görülmemiştir (Şekil 1, Tablo1). Ancak canlı ağırlık II değerlerinde kontrol grubu ile I. , II. ve III. deney grupları arasında  $p < 0,05$  düzeyinde önem saptanmıştır (Şekil 1, Tablo1).

Şekil-1: Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin canlı ağırlıkları (g).



\* Deney grupları ile kontrol grubu arasında önem,  $p < 0,05$   
a Deney gruplarında "canlı ağırlık I" değerleri ile "canlı ağırlık II" değerleri arasında önem,  $p < 0,05$

Tablo1: Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin canlı ağırlıkları (g)

	n	Kontrol Grubu ±SE	I. Deney Grubu ±SE	II. Deney Grubu ±SE	III. Deney Grubu ±SE
Canlı Ağırlık I	10	27.2±0.64	26.0±0.85*	28.4±0.92*	26.6±0.89*
Canlı Ağırlık II	10	27.2±0.67	27.4±0.94*,a	29.5±0.90*,a	27.7±0.01*,a

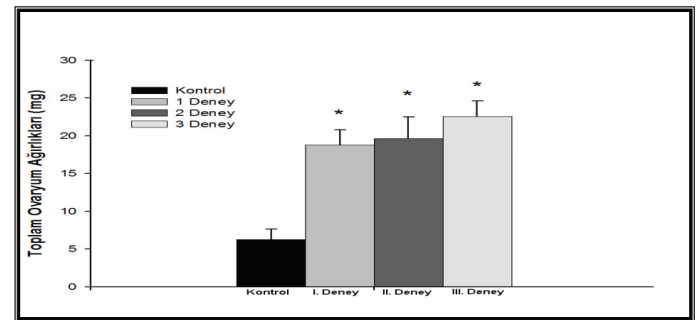
\* Deney grupları ile kontrol grubu arasında önem,  $p < 0,05$   
a Deney gruplarında "canlı ağırlık I" değerleri ile "canlı ağırlık II" değerleri arasında önem,  $p < 0,05$

### Ovaryum Ağırlığı

Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin ovaryum ağırlıkları şekil 2 ve tablo 2'de gösterilmiştir. Deney gruplarında ovaryum ağırlık ortalamaları kontrol grubu değerlerine oranla oldukça fazla bulunmuştur ve gruplar arasında  $p < 0,05$  düzeyinde istatistiki önem saptanmıştır.

Gelişmekte Olan Folikül ve Korpus Luteum Sayıları Deney gruplarında uygulanan PMSG ve hCG hormonlarına bağlı patolojik bir durum gözlenmemiş olup deneysel uygulamaya bağlı olarak ölüm de görülmemiştir. Kontrol ve deney gruplarına ait ovaryumların makroskopik görünümü stereo mikroskop (Nikon SMZ1000) şekil 3'de gösterilmiştir. Crossmann'ın üçlü boyama yöntemi(1937) uygulanan, kontrol ve deney gruplarına ait ovaryum kesitlerinde ise primer, sekonder, graaf folikül ve korpus luteum sayılarak tablo 3'de gösterilmiştir.

Şekil-2: Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin toplam ovaryum ağırlıkları (mg)



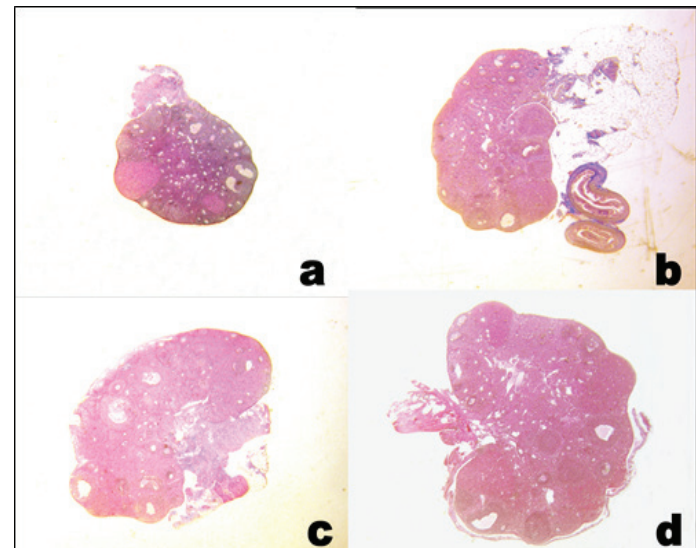
\*Deney grupları ile kontrol grubu arasında önem,  $p < 0,05$

Tablo-2 : Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin toplam ovaryum ağırlıkları (mg)

	n	Kontrol Grubu ±SE	I. Deney Grubu ±SE	II. Deney Grubu ±SE	III. Deney Grubu ±SE
Ovaryum Ağırlığı	10	6.25±1.37	18.75±2.04*	19.66±2.85*	22.56±2.02*

\*Deney grupları ile kontrol grubu arasında önem,  $p < 0,05$

Şekil-3: a) Kontrol b) I. deney c) II. deney d) III. deney grubuna ait ovaryumların genel görünümü, üçlü boyama, stereo mikroskop, X 1.5 obj.



Tablo-3: Kontrol ve deney gruplarına ait ortalama folikül, korpus luteum ve gelişen folikül sayısı.

	N	Primer Folikül Sayısı±SE	Sekonder Folikül Sayısı±SE	Graaf Folikül Sayısı±SE	Korpus Luteum Sayısı±SE	Gelişen Folikül Sayısı ±SE
Kontrol Grubu	10	20,10±2,63	17,00±2,23	1,00±0,00	11,30±1,56	37,50±3,45
I. Deney Grubu	10	28,70±2,92	21,70±2,78	2,00±0,36	11,50±1,84	52,60±4,83*
II. Deney Grubu	10	26,10±2,40	15,40±2,43	1,25±0,25	12,90±1,60	42,00±2,93
III. Deney Grubu	10	29,90±2,36	12,60±1,24	1,85±0,55	13,20±1,33	43,80±2,51

\* I. deney grubu ile kontrol arasında önem,  $p < 0,05$

### Kontrol Grubu Bulguları

Sadece 0,2 ml serum fizyolojik uygulanan kontrol grubunda, toplam primer folikül sayısının ortalama değeri  $20,10 \pm 2,63$  olduğu, maksimum primer folikül sayısının 36'ya kadar çıktığı, minimum primer folikül sayısının 9 olduğu gözlemlendi. Toplam sekonder folikül sayısının ortalama değerinin  $17,00 \pm 2,23$  olduğu, maksimum sekonder folikül sayısının 29'a kadar yükseldiği, minimum sekonder folikül sayısının 8 olduğu görüldü. Toplam korpus luteum sayısının ortalama median değeri  $11,30 \pm 1,56$  iken maksimum korpus luteum sayısı 20, minimum korpus luteum sayısı 4 olarak tespit edildi. Gelişmekte olan foliküllerin ortalama değeri  $37,50 \pm 3,45$  olarak bulunurken, en düşük ve en yüksek folikül sayısı 23-57 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı.

### I. Deney Grubu Bulguları

Foliküler gelişmeyi uyarmak ve ovulasyon oluşturmak amacıyla 2.5 I. U. PMSG ve 48. saatte 2.5 I. U. hCG uygulanan I. deney grubuna ait 10 adet farenin ovaryumlarının mikroskopik incelenmesinde, toplam primer folikül sayısının ortalama değeri  $28,70 \pm 2,92$  olduğu, bu grupta maksimum folikül sayısının 44'e kadar çıktığı minimum primer folikül sayısının 10 olduğu gözlemlendi. Toplam sekonder folikül sayısının ortalama değeri  $21,70 \pm 2,78$  olduğu, maksimum sekonder folikül sayısının 37'ye kadar yükseldiği, minimum sekonder folikül sayısının 5 olduğu görüldü. Toplam korpus luteum sayısının ortalama değeri  $11,50 \pm 1,84$  iken maksimum korpus luteum sayısı 24, minimum korpus luteum sayısı 5 olarak tespit edildi. Gelişen folikül sayısının değeri  $52,60 \pm 4,83$  iken, en yüksek gelişen folikül sayısının 75, en düşük 17 olduğu saptandı.

### II. Deney Grubu Bulguları

Deri altı yolla 5 I. U. PMSG ve 5 I. U. hCG uygulanan II. deney grubunun toplam primer folikül sayısının ortalama değeri  $26,10 \pm 2,40$  olduğu, bu grupta maksimum primer folikül sayısının 43'e kadar çıktığı, minimum primer folikül sayısının 19 olduğu gözlemlendi. Toplam sekonder folikül sayısının ortalama değerinin  $15,40 \pm 2,43$  olduğu, maksimum sekonder folikül sayısının 28'e kadar yükseldiği, minimum sekonder folikül sayısının 7 olduğu görüldü. Toplam korpus luteum sayısının ortalama değeri  $12,90 \pm 1,60$  iken maksimum korpus luteum sayısı 22, minimum korpus luteum sayısı 10 olarak tespit edildi. Gelişen folikül sayısı ortalama değeri  $42,00 \pm 2,93$  iken, en yüksek gelişen folikül sayısının 52, en düşük 26 olduğu saptandı.

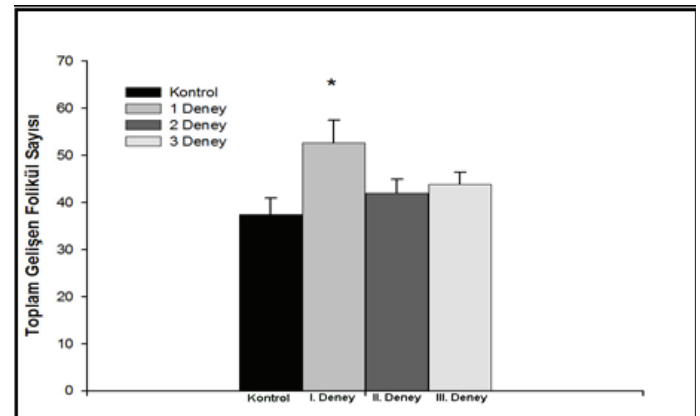
En yüksek dozda PMSG ve hCG hormonlarının 7.5 I. U. uygulandığı III. deney grubunda toplam primer folikül sayısının ortalama değeri  $29,90 \pm 2,36$  olduğu, bu grupta maksimum primer folikül sayısının 43'e kadar çıktığı, minimum primer folikül sayısının 19 olduğu gözlemlendi. Toplam sekonder folikül sayısının ortalama değerinin  $12,60 \pm 1,24$  olduğu, maksimum sekonder folikül sayısının 28'e kadar yükseldiği, minimum sekonder folikül sayısının 7 olduğu görüldü. Toplam korpus luteum sayısının ortalama değeri  $13,20 \pm 1,33$  iken maksimum korpus luteum sayısının 22, minimum korpus luteum sayısı 10 olarak tespit edildi. Gelişen folikül sayısı ortalama değeri  $43,80 \pm 2,51$  olarak belirlendi. Bu grupta, en yüksek gelişen folikül sayısının 52, en düşük 31 olduğu saptandı.

### III. Deney Grubu Bulguları

İncelenen preparatlarda gelişmekte olan folikül (primer, sekonder, graaf folikül) ve korpus luteum sayımları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde I. deney grubu ile kontrol arasında istatistiksel önem bulunurken II. ve III. deney grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel önem görülmemiştir (Şekil 4-5). Ortalama değerlere bakıldığında I. deney grubunda folikül gelişiminin en fazla olduğu belirlenmiştir.

Şekil-4: Kontrol ve deney gruplarına ait toplam gelişen folikül sayısı.

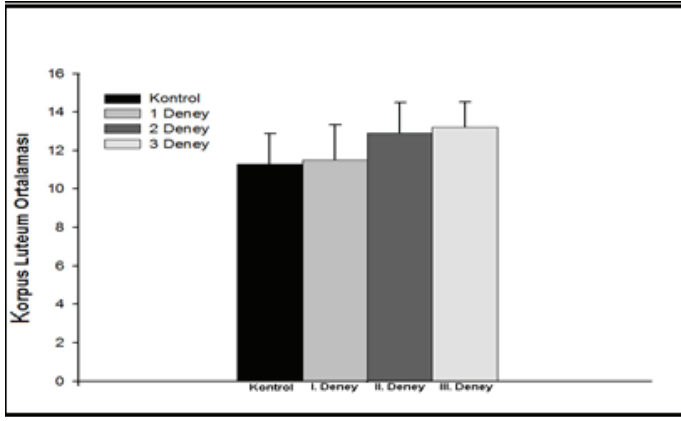
Şekil-4: Kontrol ve deney gruplarına ait toplam gelişen folikül sayısı.



I. Deney grubu ile kontrol grubu arasında önem,  $p < 0,05$



Şekil-5 Kontrol ve deney gruplarına ait korpus luteum ortalaması.



## Tartışma ve Sonuç

Ovaryumdaki foliküllerin gelişmesi, memelilerde üreme fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde vazgeçilmez öneme sahiptir. Foliküllerin gelişmesi sırasında bir yandan döllenme yeteneği olan bir ovum üretilirken, diğer yandan da üreme sistemine ait diğer organlarda eş zamanlı değişim ve gelişmeler sağlanır.<sup>25</sup> IVF uygulamalarının hız kazanmasıyla birlikte ovaryumun hormonal yönden uyarılması Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYTE)'in vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Ovaryumun uyarılması ile foliküller gelişimin arttırılması hedeflenmektedir. Ayrıca hem in vivo hem de in vitro olarak elde edilen fazla sayıdaki oositlerin döllenme şansı da yüksek olacaktır.<sup>26,27</sup> Yardımcı üreme tekniklerinde süperovulasyon, nesli tükenmekte olan türlerin korunması, transgenesis, nükleer transfer, üreme amaçlı klonlama rejeneratif tıpta, embriyonik kök hücre üretiminde ve klonlamanın korunmasında oldukça önemlidir.<sup>27</sup> Deneysel çalışmalarda, özellikle üreme tıbbi, genetik ve toksikoloji alanlarında fare, iyi bilinen bir deney hayvanı olup süperovulasyon protokolleri için başarılı bir modeldir.<sup>1</sup> Süperovulasyon, folikül gelişimi ve oosit salınımı için hormon tedavilerini içerir.<sup>2,3</sup> Folikül gelişimini teşvik etmek için kullanılan hormonlar; FSH, PMSG veya HMG.4,5 PMSG/hCG kombinasyonu ile süperovulasyon, farenin siklus döneminin her aşamasında ovulasyonu uyardığı bilinmektedir.<sup>6,7</sup> Yaş ve fare soyları süperovulasyon protokol sonuçlarını etkileyen önemli faktörler arasındadır.<sup>8-10</sup> Genellikle 3-6 haftalık dişilerden maksimum sayıda yumurta elde edilebilmektedir. Fare soyları, süperovulasyon uygulamalarına yüksek seviyede yanıt verenler (30-50 yumurta/fare), düşük seviyede yanıt verenler (<15 yumurta/fare) olmak üzere iki kategoriye ayrılır. C57BL/6J, BALB/cByJ ve SJL/J soyları yüksek seviyede ovulatuvar iken, A/J, C57/L ve 129/J düşük seviyede ovulatuvar soylardır.<sup>11</sup> Çalışmamızda 7 haftalık yaşta çok sayıda yumurta elde edilebilen BALB/c soyu dişi fareler kullanıldı.<sup>12,13</sup> Süperovulasyon uygulaması ile birden fazla ovulasyonun

gerçekleşmesi hedeflenir. Bu uygulama sayesinde hastaların büyük çoğunluğuna birden çok embriyo aktarılabilir, ayrıca artan embriyolar süperovulasyon uygulaması yapılmadan tekrar hamilelik elde etmek için dondurularak saklama imkânı da sağlamaktadır.<sup>28,29</sup> Bununla birlikte bu yöntem, oosit olgunlaşmasında, IVF'de, embriyo kültüründe, IVF tedavisi uygulanmış kadına embriyoların aktarılmasında ve implantasyon süreçlerinde yardımcıdır.<sup>30</sup> Bu avantajlarından dolayı IVF'in ilk dönemlerinden beri süperovulasyon uygulaması yöntemi çok önemli bir yer tutmaktadır.<sup>31,32</sup> Çalışmamızda 3 farklı dozda yapmış olduğumuz uygulamalarda tüm deney gruplarında foliküler gelişimin kontrole oranla daha fazla olduğu görüldü.

Lehtonen ve Kankondi<sup>33</sup> gonadotropinlerin intraperitoneal uygulamalarının, subkutan uygulamaya göre anormal yumurta oranını arttırdığı bildirmişlerdir. Bu bulgular ışığında çalışmamızda s.c. uygulama tercih edilmiş olup anormal yumurta görünümü de saptanmamıştır.

Barnes ve arkadaşları<sup>34</sup> hipofizektomi yapılmış kadınlara dışardan verilen FSH ile folikül gelişimini sağlayarak ovulasyon öncesi aşamaya kadar uyarılabildiğini göstermişlerdir. Stern ve Schuetz<sup>35</sup>, süperovulasyon amacı ile gonadotropinle uyarılan farelerde oositlerin ovulasyonunu, iki aşamalı olarak gerçekleştirdikleri protokoller ile değerlendirmişlerdir. Birinci aşamada 5 I.U. PMSG enjeksiyonunu izleyen 20 saat içinde, ikincisi ise 48 saat sonra uygulanan hCG'ye yanıt araştırılmıştır. Farelere enjekte edilen 5 I.U. PMSG enjeksiyonuyla (20 saat içinde) %77,9 oranında ovulasyon meydana gelmiş ve bu hayvanlardan yumurta kanalında ortalama 8,56 oosit elde edilmiştir. Serum fizyolojik enjekte edilen kontrol grubunda bu oran % 5,5 olup ortalama 7,64 oosit elde edilmiştir. PMSG ve 48 saat sonra uygulanan hCG ile çiftleşme oranlarına bakıldığında serum fizyolojik verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, göze çarpan bir artış olmuştur. Sadece PMSG enjekte edilen hayvanlardaki çiftleşme davranışı salin verilen kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda özellikle korpus luteumu, ovule olan oosit olarak düşünüp değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama korpus luteum sayısının  $13,20 \pm 1,33$  değeri ile III. deney grubunda, sonra  $12,90 \pm 1,60$  değeriyle II. deney grubunda,  $11,50 \pm 1,84$  değeri ile I. deney grubunda ve son olarak  $11,30 \pm 1,56$  değeriyle kontrol grubunda saptadık. Bu da bize süperovulasyon amaçlı olarak belli dozlarda arttırdığımız PMSG hormonunun tedaviye olumlu yönde cevap verdiğini ve artan dozların oosit oluşumuna pozitif etki sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Puberteye yakın fareler ile yapılan çalışmalarda, PMSG ve hCG uygulamalarına hayvanların % 95'inin süperovulasyon ile yanıt verdiğini bildirilmiştir.<sup>36,37</sup> Çalışmamızda kullanılan fareler puberte döneminde olup PMSG ve hCG

uygulanan deney grubundaki farelerin tümü süperovulasyona pozitif cevap vermiştir.

Araştırmamızda kullanılan hayvanlar rastgele olarak kontrol ve deney gruplarına ayrılmıştır. Aynı bakım-besleme koşullarında canlı ağırlık artışları 2 günlük kısa bir süre içerisinde özellikle deney gruplarında kontrol grubundan daha fazla bulunmuştur. Aynı şekilde ovaryum ağırlıkları da bu artışa paralellik göstermektedir. Çalışmamızda da 7 haftalık puberte dönemindeki farelerde, kontrol ve deney grupları, ovaryum ağırlıklarına göre kıyaslandığında, deney gruplarında istatistik olarak da önem gösteren belirgin bir artış saptanmıştır. Çalışmamızdaki bulgulara paralel olarak Neal ve Challoner<sup>37</sup> uygulanan gonadotropinlere bağlı olarak antral foliküllerin ve eş zamanlı olarak ovaryum ağırlığının kademeli olarak arttığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada en çok korpus luteum oluşumunun saptandığı 3. deney grubunun (7,5 I.U. PMSG ve ardından 7,5 I.U. hCG'nin s.c. enjeksiyonunun) histolojik değerlendirmeler sonucunda, en uygun süperovulasyon protokolü olduğuna karar verilmiştir.

## Teşekkür

Bu araştırma Uludağ Üniversitesi-Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No HDP(V) 2012/37).

## Kaynaklar

- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, et al. Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 14. 2002.
- Gates AH. Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In: Daniel Jr JC.(Eds.), Methods in mammalian embryology. WH Freeman & Co, San Francisco, 1971: 64-76.
- Brooke DA, Orsi NM, Ainscough JFX, et al. Human menopausal and pregnant mare serum gonadotrophins in murine superovulation regimens for transgenic applications. Theriogenology, 2007; 62: 1409-1413.
- Kanter M, Yıldız C, Meral I, et al. Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. Theriogenology, 2004; 61 (2-3): 393-398.
- Narai K, Ishinazaka T, Suzuki K, et al. Optimum dose of LH-RH analogue fertirelin acetate for the induction of superovulation in mice. Exp Anim. 2005; 54(1): 97-99.
- Fowler RE, Edward RG. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. J Endocrinol. 1957; 15: 374-384.
- Edward RG, Fowler RE. Superovulation treatment of adult mice: their subsequent natural fertility and response to further treatment. J Endocrinol. 1960; 21: 147-154.
- McLaren A and Michie D. Superpregnancy in the mouse. In: Implantation and foetal mortality after induced superovulation in females of various ages. J Exp Biol. 1958; 36: 281-300.
- Rachael Pasco A, David K, Gardner B, et al. Superovulation protocol for the spiny Mouse (*Acomys cahirinus*). Reprod Fertil Dev. 2012; 24: 1117-112,.
- Martin-Coello J, Gonzalez R, Crespo C, et al. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). Theriogenology. 2008; 70 (6): 1004- 13.
- Zudova D, Wyrobek AJ, Bishop J, et al. Impaired fertility in Tstock female mice after superovulation. Reproduction. 2004; 128: 573-581.
- Başar M, Türker M, İrez T, et al. Süperovulasyon protokolünde kullanılan GnRH agonistinin oosit olgunluğu ve çapına etkileri, Cerrahpasa Tıp Fak Der. 2008; 39 (2): 41-48.
- Heidar IF, Sadrkhanlou R, Rastegarnia A et al. Effect of different protocol of ovarian stimulation, with gonadotrophin on concentration of ovarian hormones. J Anim Vet Adv. 2009; 8 (12): 2429-31.
- Mc Donald LE. The pituitary gland. In: LE Mc Donald (Ed.), Veterinary Endocrinology and Reproduction, Lea & Febiger, Philadelphia. 1980.
- Yoshimura Y, Hosoi Y, Atlas SI, et al. Effect of the exposure of intro follicular oocytes to clomiphene citrate on prefnancy outcome in the rabbits. Fertil Steril. 1988; 50 (1): 153-158.
- Socie G, Salooja N, Cohen A, et al. Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. Blood. 2003; 101: 3373-3385.
- Chang P, Kenley S, Burns T, et al. Recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) in assisted reproductive technology: results of a clinical trial comparing two doses of rhCG (Ovidrel) to urinary hCG (Profasi) for induction of final follicular maturation in in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil Steril. 2001; 76: 67-74.
- Yavuz Ö. Glikoproteinler ve biyomedikal önemi. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2001; 21: 517-522.
- Hedrick JL. Comparative structural and antigenic properties of zona pellucida glycoproteins. J Reprod Fertil Suppl. 1996; 50: 9-17.
- AI-Shebailly MM. Evaluation of the effects of pregnyl on pituitary-ovarian hormones and biochemical markers of tissue injury in female Swiss albino mice.

- Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1999; 105 (1-2): 155-171.
21. Crossmon CA. Modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec.* 69: 33-38, 1937.
  22. Parrot JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinol.* 1999; 140 (9): 4262-71.
  23. Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod.* 1995; 53: 295-301.
  24. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu U, Biyoistatistik, Özdemir Yayıncılık, Ankara. 1994.
  25. Greenwald GS, Terranova PF, *The Physiology of Reproduction*, Raven Press Ltd, New York. 1988.
  26. Fauser BC and Devroey P. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends Endocrinol Metab.* 2003; 14 (5): 236-42.
  27. Oehninger S, Hodgen GD. Induction of ovulation for assisted reproduction programmes. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1990; 4 (3): 541- 73.
  28. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983, 305 (5936): 707- 9.
  29. Zeilmaker GH, Alberda AT, Van Gent I, et al. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril.* 1984; 42 (2): 293-296.
  30. Fauser BC, Devroey P, Yen SS, et al. Minimal ovarian stimulation for IVF: Appraisal of potential benefits and drawbacks. *Hum Reprod.* 1999; 14 (11): 2681-6.
  31. Flaws JA, Abbud R, Mann RJ, et al. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 1997; 57 (5): 1233- 7.
  32. Meredith S, Kirkpatrick-Keller D, Butcher RL. The effects of food restriction and hypophysectomy on numbers of primordial follicles and concentrations of hormones in rats. *Biol Reprod.* 1986; 35(1): 68-73.
  33. Lehtonen E and Kankondi R. Rate of gonadotrophin-induced abnormalities in mouse ova is related to the site of hormone administration. *J Reprod Fertil.* 1987; 80: 613-617.
  34. Barnes RB, Namnoum AB, Rosenfield RI, et al. The role of LH and FSH in ovarian androgen secretion and ovarian follicular development: clinical studies in a patient with isolated FSH deficiency and multicystic ovaries. *Hum Reprod.* 2002; 17 (1): 88-91.
  35. Stern S, Schuertz W. Asynchrony of ovulation and mating in mice treated with gonadotropins. *J Reprod Fertil.* 1970; 23: 257-261.
  36. Pasco R, Gardner DK, Walker DW, et al. A superovulation protocol for the spiny Mouse (*Acomys cahirinus*). *Reprod Fertil Dev.* 2012; 24 (8): 1117-1122.
  37. Neal P and Challoner S. The development of the mouse ovary and its response to exogenous gonadotrophins. *J Reprod Fertil.* 1975; 45 (3): 449-454.