



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI DOZLARDAKİ GONADOTROPİNLERİN FARE OVARYUMU  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK DÜZEYDE İNCELENMESİ**

**Güzin PANCAROĞLU**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**Bursa - 2013**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI DOZLARDAKİ GONADOTROPİNLERİN FARE OVARYUMU  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK DÜZEYDE İNCELENMESİ

Güzin PANCAROĞLU

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Hatice ERDOST

Bursa - 2013

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	16
BULGULAR.....	21
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	40
KAYNAKLAR.....	46
TEŞEKKÜR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	55

## ÖZET

### **Farklı Dozlardaki Gonadotropinlerin Fare Ovaryumu Üzerine Etkisinin Histolojik Düzeyde İncelenmesi**

Çalışmamızın amacı 7 haftalık farelere, farklı dozlarda PMSG ve takiben hCG uygulamalarının, ovaryumda folliküler gelişime ve korpus luteum oluşumuna olan etkilerinin, histolojik ve 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 enjeksiyonunu 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. Histolojik incelemeler için alınan ve tespit edilen ovaryumlar rutin histolojik metodlar uygulanarak histolojik yapının incelenmesi için Crossmon'ın üçlü boyama tekniği uygulandı.

Çalışmamızda 3 farklı dozda yapmış olduğumuz uygulamalarda tüm deney gruplarında folliküler gelişimin kontrole oranla daha fazla olduğu görüldü. Gelişen follikül 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 folliküler gelişimin ve ovulasyonun arttığı saptandı.

Sonuç olarak; hazırlanan bu tez çalışmasında 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, en uygun süperovulasyon protokolü olduğuna karar verildi.

**Anahtar kelimeler:** Süperovulasyon, PMSG, hCG, ovaryum, fare

## SUMMARY

### **The Effect of Different Doses of Gonadotrophins on Mouse Ovary by Histological Analysis**

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 histological and istatistical 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 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 gathered and fixed for histological examination and Crossmon's triple staining method was applied for examination of histological structure after routine histological methods.

In our study, administration of three different doses, follicular development in all experiment groups were more than control group. First experiment group had the most developing follicule number, followed by third and second experiment group respectively and at least control group. Corpus luteums were evaluated for ovulation and third experiment group had the most numbers of corpus luteums than followed by second, first and control group respectively. In all procedures, follicular development and ovulation were increased depending on the applied dose of gonadotrophin.

As a result of this thesis; after histological examination, 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.

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

## GİRİŞ

İlk embriyo transferi çalışmaları 1890'larda yapılan tavşan deneyleri ile başlamıştır. 1934 yılında Pincus ve Enzmann (1) ilk in vitro fertilizasyon (IVF) deneyini gerçekleştirmiş ve memeli ovositlerinin canlı dışında da döllenebileceğini göstermiştir. 1949'dan itibaren çiftlik hayvanlarında embriyo transferi çalışmaları yapılmış, böylece hayvanların genetik potansiyellerinin artırılması hedeflenmiştir. Günümüzde bu amaçla IVF dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. 1969'ların sonlarında Edwards ve arkadaşları (2), insan ovositleriyle ilk başarılı IVF' u gerçekleştirdiklerini açıklamışlardır. İlk IVF gebeliği 1976 yılında Steptoe ve Edwards (3) tarafından gerçekleştirilen ektopik gebelik olup 1978 yılında yine aynı araştırmacılar (4) tarafından gerçekleştirilen IVF ile ilk tüp bebek, Cambridge'de Loise Brown adında sağlıklı bir bebek dünyaya gelmiştir. Zamanla IVF tedavisinin Gamete Intrafallopian Transfer (GIFT) (5), Zigot Intrafallopian Transfer (ZIFT) (6), Intra Cytoplasmic Sperm Enjeksiyonu (ICSI) (7) gibi çeşitli modifikasyonları ortaya çıkmış ve bu yöntemler uygun hastalarda kullanıma girmiştir. 1983 de Trounson ve Mohr (8) tarafından ilk kez donör ovosit ve dondurulmuş embriyo kullanılarak gebelik ve doğum elde edilmiş, 1984 de ilk GIFT bebeği (5) ve 1986 da ilk ZIFT bebeği (6) dünyaya gelmiştir. İlk ICSI gebeliği 1992 de Palermo ve arkadaşları (7) tarafından gerçekleştirilmiştir. 1989 yılında ise ilk Türk tüp bebek dünyaya gelmiştir (9, 10).

Canlının oluşumu ve gelişimi, ovum ile sperm tarafından tuba uterinanın ampulla bölgesinde döllenme ile başlayan, birçok farklı süreci içermektedir. Bu süreçte en önemli görevi dişi üreme hücresi olan ovosit ile erkek üreme hücresi olan spermatozoon üstlenmektedir. Bunun yanında başarılı bir döllenme gerçekleştikten sonra gebeliğin sağlıklı şekilde devam edebilmesi için dişi üreme sisteminin de sağlıklı olması ve gelişecek olan embriyoyu desteklemesi gerekmektedir. IVF yönteminin gelişmesiyle birlikte ovosit ve spermatozoonun fizyolojisi, döllenme sürecinde rol alan mekanizmalar ve implantasyon biyolojisi hakkında önemli bilgiler gün yüzüne çıkmıştır (11).

Üreme biyolojisi; jinekoloji, histoloji ve embriyoloji bilimlerinin temel konularını kapsamaktadır. Esas amacı infertilite olgularına bir açıklama getirmek ve infertilite problemi olan çiftlere yardım ederek çocuk sahibi olmalarını sağlamaktır. İnfertilite, çiftlerin gebelikten korunma yöntemi kullanmayarak bir senelik düzenli koitus sonucunda gebeliğin gerçekleşmemesidir (11). Günümüzde çiftlerin yaklaşık % 10-15'i infertilite

problemi yaşamaktadır. Çiftlerde görülen infertilite olgularının % 40'ının erkek kaynaklı, %50'sinin kadın kaynaklı, %10'unun da her iki çifte bağlı olarak geliştiği ya da açıklanamayan olgular olduğu düşünülmektedir (12).

Süperovulasyon, infertilite nedeniyle tedavi görmek isteyen kadınlara yaygın olarak uygulanmaktadır. Amaç, IVF uygulamasında döllenme şansını arttırmak, çok sayıda, iyi kalitede ve olgunlaşmış ovositler elde etmektir. Elde edilen ovosit sayısı ve olgunluğu ne kadar fazla ise embriyo kültürü ve implantasyon başarısı da o oranda artacaktır. Fakat süperovulasyon amaçlı tedavi süreci sorunsuz değildir. Karşılaşılan en önemli problemlerden biri erken Luteinize Hormon (Luteinizing Hormon-LH) artışıdır. Erken LH artışıyla birlikte luteinizasyon görülmekte ve kaliteli, olgun ovosit elde edilme şansı da çok azalmaktadır. Hem bu problemleri aşmak hem de en fazla sayıda döllenebilecek, sağlıklı ovosit elde etmek için değişik doz ve sıklıkta, farklı süperovulasyon protokolleri kullanılmaktadır (13).

Multifolikülasyon ve süperovulasyonu sağlamak amacıyla hipofiz kökenli gonadotropinler; Follikül Stimüle Hormon (Follicule Stimulating Hormone-FSH), LH ve İnsan menopozal Gonadotropini (Human Menopausal Gonadotrophin-HMG), plasental kökenli gonadotropinler; Gebe Kısırak Serum Gonadotropin (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin -PMSG) ve insan koriyonik gonadotropini (Human Chorionic Gonadotrophin-hCG), pituitary extract (hipofiz ekstresi) ve Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (Gonadotrophin Releasing Hormone-GnRH) agonisti ile klomifen sitrat, difenileilen türevleri gibi bazı sentetik preparatlar da kullanılmaktadır (14-16).

PMSG, kompleks bir glukoprotein olup PMSG içeren ticari preparatlar yüksek oranda FSH ve takiben LH etkisi gösterirler. Serum gonadotrophinin FSH aktivitesi ovaryum intersitisyel hücrelerinin gelişmesini, folliküllerin büyümesini ve olgunlaşmasını stimüle eder. LH aktivitesi ise ovulasyonu indükleyerek süperovulasyon oluşturur (17-19). 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 (20).

Vücudun yeterli miktarda FSH ve LH üretememesi büyük ölçüde üreme kapasitesinin azalmasına yol açar. Süperovulasyon protokollerinde FSH içeren preparatın -folligon-enjekte edilmesi, ovositin olgunlaşmasını, takiben LH içeren preparatın -pregynl- uygulaması ile olgunlaşan ovositin ovule olmasını sağlaması nedeniyle oldukça sık kullanılmaktadır (20).

Bu çalışmada iki aylık farelere, farklı dozlarda PMSG ve takiben hCG uygulamalarının, ovaryumda folliküler gelişime ve korpus luteum oluşumuna olan etkilerinin, histolojik ve istatistiksel yöntemler ile belirlenmesi amaçlanmaktadır.



## GENEL BİLGİLER

### Ovaryum

Ovaryum, salgıladığı östrojen ve progesteron hormonlarıyla, dişi genital sisteminin bütün organları üzerinde etkili olan, genital siklusu düzenleyen, çift, badem şeklinde, pembe beyaz görünümde bir organdır (21-23). İnsanda uzunluğu 3 cm, genişliği 1.5 cm ve kalınlığı da yaklaşık 1 cm'dir. Puberteden önce ovaryum yüzeyi düzgün görünümde iken üreme dönemi boyunca tekrarlayan ovulasyonlar nedeniyle düzensiz bir görünüm alır. Puberte döneminde, ovaryumda bir grup primordiyal follikülde "Folliküler Büyüme" olarak adlandırılan süreç başlar. Bu süreç ovositler, granuloza hücreleri, teka hücreleri ve follikülleri çevreleyen stromadaki fibroblast benzeri hücrelerdeki değişimleri kapsar (21). Menopoz sonrası dönemde ovaryumda folliküler büyüme sona erer ve hacim olarak küçülür. Ovaryum gevşek bağ doku içinde ovaryum folliküllerinin bolca bulunduğu kortikal bölge (korteks) ile damardan zengin medullar bölgeden (medulla) meydana gelir (24).

**1- Korteks Bölgesi:** Germinatif epitelin altında, hücreden zengin bağ dokusuna gömülmüş olarak bulunan ovaryum folliküllerinden oluşur. Folliküller etrafında stromada dağılmış olarak düz kas fibrilleri ve intersitisyel hücreler bulunur.

**2- Medulla Bölgesi:** Ovaryumun merkezi kısmında bulunan bu bölge gevşek bağ dokusu, yoğun bir şekilde düzenlenmiş kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirlerden oluşur. Korteks ve medulla arasında belirgin bir sınır bulunmamaktadır (25, 26).

Ovaryumun yüzeyini hormonal değişime bağlı olarak tek katlı kübik, prizmatik ya da yassı epitel hücreleri döşer. Epitel hücrelerinin oluşturduğu bu tabaka "Germinatif Epitel (doğurucu epitel)" adını alır. Germinatif teriminin kullanılması, embriyonal dönemde çoğalarak seks kordonları oluşturmasından ileri gelir. Doğumdan sonra çoğalıp çoğalmadığı tartışmalıdır (24, 25). Epitel geliştirmekte olan canlıda kübik-pirizmatik, erişkin canlıda pirizmatik, yaşlıda ise yassıdır. Bazal membran üzerine oturan bu epitelin altında sıkı bağ doku özelliğinde "Tunika Albuginea" yer alır. Bu bağ doku çeşitli yönlerde farklılaşma yeteneğinde olan hücreler içerir. Bu hücreler hem fibroblast, hem düz kas hücresi özelliği gösterirler ve hormon sentezleyen hücelere farklılaşabilirler. Bunlar ovaryumun parenşim bölümündeki bağ doku içinde yaygın olarak görülen epiteloïd karakterde intersitisyel hücelere dönüşerek östrojen salgırlar (24).

Korteks içerisinde gelişim ve değişim safhalarına bağlı olarak farklı görünümleri olan, stroma ile çevrilmiş hücre toplulukları bulunur. Bunlar değişik gelişim süreci içerisinde olan folliküller ve gelişmesini tamamlayan ya da gerileyen folliküllerin yerinde şekillenen yapılardır (24-26).

### **Follikül Gelişimi**

Ovaryum follikülleri değişen büyüklüktedir, her biri tek ovosit içerir ve korteks stromasına dağılmış olarak bulunurlar.

Histolojik olarak üç tip ovaryum follikülü bulunur;

1- Primordiyal Follikül

2- Büyüyen Follikül

a- Primer Follikül

b- Sekonder Follikül (Antral Follikül)

3- Graaf Follikül (Tersiyer Follikül)

### **Primordiyal Follikül**

İnsanda fetal gelişimin 3. ayında ovaryumda belirir. Primordiyal folliküllerin erken büyüme aşaması gonadotropin uyarımından etkilenmez. Ovaryumda primordiyal folliküller tunika albugineanın hemen altında korteks stroması içinde bulunur. Primordiyal folliküllerde ovosit tek tabaka yassı follikül hücreleriyle sarılmıştır. Follikül hücrelerinin dış bölümü bazal lamina ile sınırlandırılmıştır. Bu aşamada follikül içindeki ovosit yaklaşık 30 µm çapındadır. Eksantrik yerleşmiş nükleusu içinde çok belirgin nükleolusu vardır. Ovosit sitoplazmasında Balbiani cisimciği görülür. Balbiani cisimciği; golgi aygıtı, endoplazmik retikulum (ER), mitokondria ve lizozomların bir araya toplanması sonucu oluşmuş bir yapıdır (27).

### **Büyüyen Follikül**

#### ***Primer Follikül***

Primordiyal follikül büyüyen follikül aşamasına girdiğinde, ovositte, follikül epitel hücrelerinde ve buna eşlik eden stromada da değişiklikler meydana gelir. Başlangıç olarak ovosit hacimce büyür ve onu saran follikül epitel hücreleri çoğalmaya başlayarak kübik bir şekil alırlar. Follikül epitel hücreleri kübik yapıya farklılaştığında follikül “Primer Follikül” olarak adlandırılır. Ovosit büyüdükçe, homojen ve yoğun boyanan, asidofilik ışık kırıcı tabaka olan “Zona Pellusida” (ZP), ovosit ve follikül hücreleri arasında oluşur.

Işık mikroskopunda ilk olarak ovosit 50–80 µm'ye büyüdüğüde belirir. Büyüyen ovosit jel yapısında olan, glikozaminoglikandan ve glikoproteinden zengin ZP'yı salgılar (27). Tek tabaka olan follikül hücreleri mitotik bölünmelerle birlikte çok katlı epitel görüntüsü alır ve buna “Membrana Granulosum” denir. Bu aşamada follikül hücreleri ise “Granuloza Hücreleri” olarak adlandırılır. Bazal lamina follikül hücrelerinin dış kısmıyla stroma arasındaki yerini korur. Folliküler büyüme sırasında granuloza hücreleri arasında çok sayıda gap junction gelişir; çünkü besin ve küçük makro moleküllerin kandan folliküler sıvıya geçmesi ovosit ve follikül gelişimi için çok önemlidir (28).

Granuloza hücrelerinin çoğalmasıyla follikülü çevreleyen stromal hücreler “Teka Follikülü” denen bağ doku yapısını oluştururlar. Teka follikülü daha sonra iki ayrı tabakaya farklılaşarak “Teka İterna” ve “Teka Eksterna” yı meydana getirir (29).

**1-Teka İterna:** Çok iyi damarlanmış iç tarafta bulunan, kübik ve salgı yapan hücrelerdir. Teka internaya ait hücreler steroid hormon üreten hücrelere benzer ultrastrüktürel bir yapı gösterirler, bol miktarda agranüler endoplazmik retikulum, tubular kristaya sahip mitokondriyonlar ve çok sayıda lipid damlacıkları içerir (29). Ayrıca proöstrus, östrus ile erken gerileme döneminde sayıca oldukça fazladır. Hücreler arasında kan ve lenf kapillar ağı vardır. Bu özellik sadece teka internada mevcut olup granuloza hücrelerinde yoktur. Bağ dokudan geliştiği halde hücreleri epiteloïd karakterde olup büyük, oval ya da polygonal biçimli hücreler olarak gelişip östrojen hormonu sentezler (24). Bununla birlikte granuloza hücreleri ile teka tabakası arasında bulunan bazal lamina bu iki tabakayı kesin şekilde ayırır. Böylece bazal lamina, folliküler büyüme sırasında damarsız olan granuloza hücre tabakasını, teka interna tabakasından ayırmış olur. Teka interna hücrelerinde LH reseptörü vardır (29).

Teka interna hücreleri LH'nun etkisi ile androstenedion ve testosteron, granuloza hücreleri FSH'nun etkisi ile östrojen üretir. Artan östrojen miktarı granuloza hücrelerinin proliferasyonunu uyarır. Ayrıca intersitisyel hücreler de östrojen kaynağıdır. Granuloza hücreleri aynı zamanda protein yapıda, FSH'nun negatif feed back etkisine sahip bir hormon olan “Follikülostatin”de salgırlar (24).

**2-Teka Eksterna:** Bağ doku hücrelerinin dış kısmıdır. Esas olarak düz kas hücreleri ve kollajen lif demetlerinden oluşur. Teka tabakaları arasında ve teka eksterna ile çevre stroma arasındaki sınır belirgin değildir. Primer follikül büyüklüğü arttıkça stroma içinde derinlere doğru ilerler (29).

### ***Sekonder Follikül (Antral Follikül)***

Granuloza tabakası 6–12 hücre tabakasına ulaştığında granuloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar belirmeye başlar. Bu aşamada follikül, “Sekonder” veya “Antral Follikül” adını alır. Bu hyaluronik asitten zengin sıvıya “Follikül Sıvısı” denir. Bu sıvı miktarı arttıkça boşluklar birleşir ve tek büyük bir boşluk halini alır ki bu “Antrum” olarak tanımlanır. Antral follikül aşamasından sonra eksantrik olarak yerleşmiş ovosit büyüyemez ve azami 125 µm çapında kalır. Büyüme inhibisyonu ise 2 kDa büyüklüğünde bir peptid olan “Ovosit Olgunlaşma Önleyici” (Oocyte Maturation Inhibitor-OMI) tarafından sağlanır. OMI, granuloza hücreleri tarafından antral sıvıya salınır. OMI yoğunluğu ile antral follikül büyüklüğü arasında doğrudan bir ilişki vardır (30).

Antral follikül ve dolayısı ile antrum büyüdükçe granuloza hücreleri de genişler. Granuloza hücre tabakasının kalınlığı ovositle ilişkide olduğu yer dışında aynıdır. Granuloza hücrelerinin ovositle ilişkide olduğu bölgede hücreler kalınlaşmış tepe şeklinde bir yapı oluşturur ki buna “Kumulus Ooforus” denir. Kumulus ooforus hücreleri ovositi sarar ve ovulasyonda da ovositle birlikte atılan bu hücreler “Korona Radiata” olarak tanımlanır. Korona radiata ovosit mikrovilluslarıyla, gap junction aracılığıyla bağlantı kuran granuloza hücrelerinden oluşur. Folliküllerin olgunlaşması sırasında granuloza hücrelerinin yüzey uzantılarının sayısı artar ve bu serbest antral yüzeydeki LH reseptör sayısı ile yakından ilişkilidir (31).

### ***Graaf Follikül (Tersiyer Follikül)***

Tersiyer ya da graaf follikülü olarak da bilinen olgun folliküller 10 mm veya daha büyük olabilirler. Bu büyüklüğünden dolayı ovaryum yüzeyinde bir çıkıntı olarak gözükürler. Follikül azami büyüklüğüne yaklaştıkça granuloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Granuloza hücre tabakası antrumun genişlemesine bağlı olarak incilir. Granuloza hücreleri arasındaki boşluk büyüdükçe, ovulasyona hazırlık olarak, birbirleriyle olan bağlantıları ve ilişkileri zayıflar. Follikül olgunlaşmasının bu aşamasında teka hücre tabakası belirgin bir özellik kazanır. Teka interna hücrelerinin sitoplazmasında yağ damlacıkları belirir ve hücreler morfolojik olarak steroid üreten hücre görüntüsünde olur. LH, teka interna hücrelerini androjen salgılamak için uyarır. Androjenler, granuloza hücreleri içindeki düz ER’a taşınırlar. FSH’a cevap olarak granuloza hücreleri androjenlerin östrojenlere dönüştürülmesini katalize ederler. Östrojenler de granuloza hücrelerini uyararak çoğalmasını ve böylece follikül büyümesini uyarırlar. FSH ve/veya LH salınımindaki artış ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce adenohipofiz tarafından

uyarılır. LH artışına cevap olarak granuloza hücrelerinde bulunan LH reseptörleri azaltılır ve bundan sonra granuloza hücreleri östrojen üretmezler (31).

Ovosit olgunlaştıkça organellerin de dağılımı değişir. Primordiyal ovositte bulunan Balbiani cisimciğinden kaynaklanan Golgi aygıtı parçaları sitoplazmaya dağılmış olarak görülür. Serbest ribozom, mitokondria, küçük veziküller ve granüllü ER sayısı da artar. Seyrek olarak yağ damlacıkları ve lipokrom pigmenti de görülebilir (29). Memeli dahil birçok türe ait ovositlerde kortikal granüller bulunur. Bunlar plazma membranının (ovolemma) hemen altında yerleşmişlerdir. Kortikal granüller proteaz içerirler ve ovosit sperm tarafından döllendiğinde ekzositoz yoluyla salınırlar. Ovum üzerindeki spermatozoon giriş reseptörlerinin kapanmasını sağlayarak sperm girişini engellerler. Ovosit ile granuloza hücreleri arasında sıkı ilişkiyi sağlayan uzantısal yapılar vardır. Bu uzantılar, plazma membranıyla ilişki halindedir fakat sitoplazmik devamlılık sağlamaz (29). Ovulasyona yakın bir ya da daha fazla olgun follikül gelişimini tamamlayarak ovulasyona hazırlanır. Bu folliküllerdeki ovosit mayoz bölünmenin I. evresini tamamlayarak sekonder ovosit aşamasındadır. Bölünme sürecinde sekonder ovosit ve çok az sitoplazmalı I. polar cisimciği şekillenir. II. mayoz bölünme I. mayoz bölünmenin ardından başlar ve metafaz aşamasında durur. Ovulasyon sonucu fertilizasyon olmadıkça bölünme tamamlanmaz. Fertilizasyon aşamasında sekonder ovositten ovum ve II. polar cisimciği oluşur (24).

### **Ovulasyon**

Graaf follikülündeki ovosit, etrafındaki korona radyata hücreleriyle birlikte likör follikülü içersinde serbest kalır. Follikül duvarı yüzeye doğru inceler. Ovaryumun korteksinde yer alan ve yüzeye dayanan graaf follikülü germinatif epitele basınç yapar. Ovosit, follikül sıvısının basıncı ile etrafındaki korona radyata hücreleriyle birlikte oviduktta atılır (24).

### **Korpus Luteum**

Ovulasyon sonrasında, arta kalan granuloza ve teka hücrelerinden oluşan follikül duvarı follikül katlandıkça kıvrıntılar oluşturur. İlk olarak teka internada bulunan kan damarlarının follikül boşluğuna doğru kanaması “Korpus Hemorajikum” oluşumuna neden olur. Daha sonra stromadaki dokular follikül boşluğuna doğru ilerler. Granuloza ve teka interna hücre tabakasında ciddi morfolojik değişiklikler meydana gelir (32). Granuloza ve teka hücreleri çoğalırlar, farklılaşırlar ve hipertrofiye uğrayarak granuloza lutein hücreleri

ile teka lutein hücrelerini şekillendirirler. Bu büyük oluşum “Korpus Luteum (sarı cisim)”dur (24). Lutein hücrelerin sitoplazmasında bulunan, yağda çözülebilen bu pigment, lipokromdur ve sarımtırak bir renk verir (32). Büyük, poligonal biçimli olarak tanımlanmış iki tip luteal hücre vardır;

**1- Granuloza Lutein Hücreleri;** yaklaşık 30 µm çapında, büyük, granuloza hücrelerinden oluşan merkezi yerleşimli hücrelerdir.

**2- Teka Lutein Hücreleri;** granuloza lutein hücrelerine göre daha ufak, 15 µm çapında, daha yoğun boyanan teka internadan meydana gelen periferik yerleşim gösteren hücrelerdir (24).

Korpus luteumun oluşmaya başlamasıyla teka internada bulunan kan ve lenf damarları granuloza tabakasına doğru hızlı bir şekilde büyür. Korpus luteum içinde geniş bir damar ağı meydana gelir (32). Ovaryum korteksinde yerleşmiş bulunan korpus luteum endokrin bir bez gibi aktivite göstererek progesteron ve az miktarda da oksitosin ve östrojen salgılayarak hipofizden FSH ve LH salgılanmasını önler. Progesteron ovaryumda yeni folliküllerin gelişimini ve ovulasyonu engeller (24). Döllenme olmuş ise bu hormonlar endometriyumun büyüme ve salgı aktivitesini uyararak implantasyon için hazırlanmasını sağlarlar (32). Gebeliğin oluşması ile birlikte plasenta tarafından salgılanan koriyonik gonodotropin hormonu korpus luteumun etkisini artırır, gelişimini devam ettirerek, uterus düz kaslarının kontraksiyonunu engeller ve uterus bezlerinin gelişimini uyarır. Böylece korpus luteum gebelik sonuna kadar varlığını sürdürür. Gebelik korpus luteumuna “Korpus Luteum Verum, Korpus Luteum Pregnansi ya da Korpus Luteum Graviditas” gibi adlar verilir (24). Döllenme ve implantasyon meydana gelmemiş ise korpus luteum sadece 14 gün işlevsel halde kalır ve bu durumda da “Korpus Luteum Periyodikum, Korpus Luteum Spurium yada Menstrüasyon Korpus Luteum”u olarak adlandırılır. İnsanda menstrüasyon kanama şekillenir. hCG ve diğer luteotropinlerin yokluğunda östrojen ve progesteron salgılanması azalır ve ovulasyondan yaklaşık 10–12 gün sonra korpus luteum dejenere olmaya başlar. Korpus luteum, doğumdan ya da ovulasyonla döllenmenin olmadığı durumlarda dejenere olur ve yavaş şekilde geriler. Hücreler yağ damlacıklarıyla dolmaya başlar, boyutları küçülür ve otolize gider. Dejenere olan korpus luteumda hücreler arası hiyalin maddesi birikmesiyle “Korpus Albicans” oluşur (32).

### **Atretik Folliküller**

Ovulasyon gerçekleşikten sonra gelişmekte olan folliküllerde gerileme başlar. Atretik folliküller, gelişimin her döneminde görülebilir. Atretik follikülün görünümü gerileyen

follikülün bulunduğu devreye göre değişir. Primer follikül ve sekonder follikülde oluşan atrezi ile graaf follikülünde oluşan atrezi hacim açısından farklıdır. Ayrıca dejenerasyon primer follikülde ovositten başlar, bunu follikül epitel hücrelerindeki dejenerasyon izler. Sekonder folliküldeki atrezi ise ovosit ve granuloza hücrelerinden başlar. Granuloza hücrelerinde mitozun durması, bazal laminadan granuloza hücrelerinin ayrılması ve ovositin ölümüyle karakterizedir (24).

### **İntersitisyel hücreler**

Ovaryumdaki androjenlerin kaynağı intersitisyel hücrelerdir. Bu hücreler epiteloid kökenli hücreler olarak tanımlanırlar.

Folliküllerde atrezi gerçekleşirken granuloza hücreleri ve ovosit dejenerasyona uğrar. Teka interna hücreleri durumlarını koruyarak intersitisyel hücrelere dönüşürler. Bunun yanında intersitisyel hücreler granuloza hücrelerinden ve primordiyal folliküllerden de köken alabilirler (24).

### **Hipotalamus-Hipofiz ve Ovaryum Hormonlarının Etkileşimleri**

#### ***Hipotalamustan Salgılanan GnRH ve Bu Hormonun LH ve FSH Sekresyonuna Etkileri***

Ön hipofiz hormonlarının çoğu hipotalamustan salgılanan “Serbestleştirici- Releasing - Hormonlar” tarafından kontrol edilir. Bu hormonlar ön hipofize, hipotalamus-hipofizer portal sistem yoluyla taşınırlar. Gonadotropinlerin uyarılmasında, bir serbestleştirici hormon olan GnRH çok önemlidir. Hormonun formülü şu şekildedir:

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

Deneyisel araştırmalara göre, hipotalamusun GnRH salgısı sürekli değildir. Sekresyon, her 1-2 saatte bir gerçekleşir ve 5-25 dakika süreyle devam eder. Hipotalamik GnRH'nun pulsatil atılımı, hipotalamusun pulsatil elektriksel uyarısına bağlıdır. GnRH sürekli uygulandığında ön hipofiz bezinin FSH ve LH salgısı kaybolur. Buna bağlı olarak, GnRH salgılanmasında pulsatil özellik, bilinmeyen nedenlerle hormonun fonksiyonel olması açısından önemlidir. GnRH'nun pulsatil salgısı, aynı şekilde LH sekresyonunun da her 90 dakikada bir intermitent atılımına neden olur (33).

#### ***Östrojen ve Progesteronun LH ve FSH Salgılanmasındaki Azalmaya Karşı Negatif Feedback Etkisi***

Küçük miktarlarda östrojen, FSH ve LH oluşumunda çok güçlü baskılayıcı bir etki gösterir. Ayrıca progesteron varlığında, östrojenin baskılayıcı etkisi iki kat artar. Oysa

progesteronun tek başına inhibisyon etkisi çok azdır. Belirtilen feedback etkiler esas olarak doğrudan ön hipofiz bezi üzerinde düzenlenmektedir. Bu etkilerin hipotalamusun GnRH salgısı üzerinde GnRH pulzasyon frekansını değiştirmek yoluyla azaltıcı etkisi çok daha azdır. Östrojen ve progesteronun feedback etkisine ek olarak, korpus luteum granuloza hücrelerinden, steroid seks hormonlarıyla birlikte salgılanan “inhibin hormonu”dur. İnhibin kadınlarda, ön hipofiz bezinden FSH sekresyonunu, daha küçük ölçüde de LH salınımını inhibe eder. Bu nedenle, inhibin hormonunun dişilerde, siklusun sonuna doğru FSH ve LH azalmasında önemli rolü olduğu kabul edilmektedir (33).

Ön hipofiz bezi ovulasyondan 24-48 saat önce 1 ya da 2 gün süreyle LH salgısını artırır. Deneyle, kadınlara ovaryal siklusun ilk yarısında, son iki-üç günlük süreç içinde kritik hızın üstünde östrojen infüzyonu yapıldığında folliküllerin hızla büyüdüğünü ve ovaryumda östrojen salgısının hızlandığını göstermiştir. Bu dönem içinde, ön hipofizden FSH ve LH sekresyonu başlangıçta hafifçe baskılanır. Daha sonra birden bire LH altı kat, FSH yaklaşık iki kat artar. LH salınımının bu ani ve büyük artışı ovulasyonun gerçekleşmesini sağlar (33).

### ***Hipotalamus-Hipofiz-Ovaryum Ekseninde Feedback Mekanizması***

*1- Ovulasyon Sonrası Ovaryum Hormonlarının Sekresyonu ve Gonadotropinlerin Baskılanması:* Ovulasyon sonrasında korpus luteum, büyük miktarlarda progesteron ve östrojenle, aynı düzeyde inhibin hormonu salgılar. Bu hormonların tümü birlikte, ön hipofiz ve hipotalamus üzerinde negatif feedback etki yaparlar. Bu şekilde FSH ve LH salgısı baskılanır. Menstrüasyondan yaklaşık 3-4 gün önce, bu hormonlar en düşük düzeylerine inerler (33).

*2- Folliküler Büyüme Fazı:* Menstrüasyondan 2 ya da 3 gün önce, korpus luteum gerilemeye başlar ve involusyona gider. Bu sırada östrojen, progesteron ve inhibin hormonları en düşük düzeylerine inerler. Böylece, hipotalamus ve ön hipofiz bu hormonların baskılayıcı etkisinden kurtulur. Bir gün veya daha sonra, menstrüasyonun başlaması ile FSH yeniden salgılanmaya başlar ve hormon düzeyi yaklaşık iki katına ulaşır. Menstrüasyon başladıktan sonra, daha ileriki günlerde LH salgısı da hafifçe artar. Bu hormonların etkisi altında yeni folliküller büyümeye ve östrojen salgısı giderek artmaya başlar. Östrojenin en yüksek düzeye ulaşması menstrüasyonun başlangıcından yaklaşık 12 veya 13 gün sonra gerçekleşir. Folliküllerin büyüdüğü ilk 11-12 gün içinde, özellikle östrojenin ön hipofiz bezi üzerindeki negatif feedback etkisiyle FSH ve LH hafifçe azalır.



Daha sonra her iki hormonun sekresyonu birden artar. LH ve FSH sekresyonunda ovulasyon öncesi pik görülür ve bunu takiben ovulasyon meydana gelir (33).

*3- Ovulasyon Öncesi LH ve FSH Zirvesi Ovulasyona Yol Açar:* Menstrüasyonun başlamasından 11-12 gün sonra FSH ve LH salgısında azalma görülür. Bu sırada, yüksek östrojen düzeyi (ya da folliküllerden progesteron sekresyonunun başlaması) ön hipofiz üzerinde pozitif feedback etki yapar. Bu da LH salgısında daha büyük, FSH salgısında daha küçük ölçüde artışlara neden olur. Ovulasyon öncesi LH ve FSH salgısının aşırı ve ani artışının nedeni ne olursa olsun, ovulasyona ve onun ardından da korpus luteum sekresyonuna yol açar. Böylece hipotalamus, hipofiz ve ovaryumlar üzerindeki hormonal etki ile bir ovulasyondan diğer ovulasyona kadar devam eden siklus dönemi gerçekleşir (33).

### **Gonadotropik Hormonlar ve Ovaryum Üzerindeki Etkileri**

Genital siklus sürecinde ovaryumdaki değişiklikler tamamen, ön hipofiz bezinden salgılanan gonadotropik hormonlar, FSH ve LH'a bağlıdır. Gonadotropik hormonlarla uyarılmayan ovaryum inaktif durumdadır. Bunu, gonadotropik hormonların hemen hiç salgılanmadığı çocukluk döneminde görebiliriz. İnsanda 9-12 yaşlarında hipofiz giderek daha çok FSH ve LH salgılamaya başlar, 11-15 yaşlar arasında hormonal gelişimin başlamasıyla en yüksek düzeye ulaşır. Bu değişim periyoduna "puberte" ve ilk menstrual sıklusa "menarj" adı verilir (33).

FSH ve LH'un molekül ağırlıkları yaklaşık 30.000 I.U./L olan küçük glikoprotein yapıda hormonlardır. Kadınlarda aylık genital siklus sürecinde, FSH ve LH devingen olarak artar ve azalır. Bu dönemsel değişme, siklik over değişimlerine neden olur. FSH ve LH ovaryumdaki hedef hücreleri, hücre membranlarında bulunan son derece spesifik reseptörlere bağlanarak uyarırlar. Aktive olan reseptörler, bu hücrelerde hem sekresyon, hem de büyüme ve proliferasyon hızını arttırırlar. Bu uyarıcı etkilerin hemen hepsi hücre sitoplazmasındaki ikincil haberci siklik AMP (cAMP) sisteminin aktivasyonu sonucu cAMP protein kinaz oluşumuna ve seks hormonlarının sentezini uyarıcı çeşitli anahtar enzimlerin fosforilasyonunun sağlanmasına bağlıdır (33).

Menstrüasyonun başlamasından sonra ilk birkaç gün içinde FSH ve LH konsantrasyonları, hafif ya da orta derecede artış gösterir. Bu dönem içinde FSH'nun artışı LH'a göre biraz daha fazladır. Bu hormonlar özellikle FSH her ay 6 ila 12 primer follikülün büyümesini hızlandırır. Hormonun ilk etkisi granuloza hücrelerinin

proliferasyonunu hızlandırmak ve pek çok granuloza hücre tabakasının oluşumunu ve steroid hormonların salgılanmasını sağlamaktadır. Hızlı büyümeye yol açan etkenler;

-Folikül içine serbestleyen östrojen, granuloza hücrelerinde FSH reseptör sayısının artmasına neden olur. Bu olay pozitif feedback etki yaratır, çünkü granuloza hücrelerinin ön hipofiz bezinden salgılanan FSH'a karşı duyarlılık kazandırır.

-Hipofizden salgılanan FSH ve ovaryumdan sentezlenen östrojenler ile birlikte, granuloza hücrelerinin yüzeyinde, aynı zamanda LH reseptörlerinin yapımı hızlanır. Böylece bu hücrelerde FSH uyarısına ek olarak, LH uyarısında sağlanmış olur ve follikül sekresyonunun daha da hızlanmasına yol açılır.

-Folikülde östrojen salgısının artması, ön hipofizden salgılanan LH'nin yükselmesi ile birlikte folliküler teka hücrelerinin proliferasyonuna neden olacak ve aynı zamanda sekresyonunun artmasına yol açacaktır. Bu nedenle, antral follikül büyümeye başladığında, ileri aşamalarda büyüme çok daha büyük bir hızla gerçekleşir (33).

LH follikül büyümesinin son fazında ve ovulasyon anında gerekli bir hormondur. Bu hormon olmadığında, çok büyük miktarlarda FSH olsa bile, follikül ovulasyon evresine kadar gelişemeyecektir. Ovulasyondan yaklaşık iki gün önce, ön hipofizin LH sekresyon hızı belirgin şekilde yükselir. Bu artış ovulasyondan yaklaşık 16 saat önce, 6 ila 10 katlık bir artış şeklindedir. FSH da aynı süreç içinde 2-3 kat kadar artar. Böylece iki hormon aynı anda birlikte etki ederek ovulasyon öncesi son birkaç gün içinde follikülün hızla büyümesini sağlar. Ayrıca LH granuloza ve teka hücreleri üzerinde de spesifik etkilere sahiptir. Bu hücreler öncelikle daha çok progesteron, daha az östrojen salgılayan hücrelere dönüşür. Bu nedenle, ovulasyondan yaklaşık bir gün önce östrojen sekresyonu azalırken küçük miktarda progesteron salgılanmaya başlar. Bu ortamda follikül hızla büyür, uzun süre aşırı miktarda östrojen salgılandıktan sonra, östrojen sekresyonu azalır. Ovulasyon ön hipofiz bezinden aşırı miktarda LH'nin salgılanması ile başlar. LH öncelikle, hızla başlangıçta progesteronun daha fazla olduğu folliküler steroid hormonların salgılanmasına yol açar. Birkaç saat içinde ovulasyon için gerekli iki önemli olay gelişir (34).

1- Teka eksterna lizozomlardan proteolitik enzimleri salgılamaya başlar. Bu enzimler teka eksternanın çözülmesine ve duvarın zayıflamasına neden olur. Böylece tüm follikül daha fazla büyür.

2- Aynı anda follikül duvarında hızla yeni kan damarları oluşurken folliküler dokuda prostoglandinler salgılanır. Bu iki etki follikülün büyümesi ve eşzamanlı olarak stigmanın dejenerasyonu, follikülün yırtılmasına ve ovumun dışarı atılmasına neden olur (34).

Ovulasyon sonrasında korpus luteum, büyük miktarlarda progesteron ve östrojenle, aynı düzeyde inhibin hormonu salgılar. Bu hormonların tümü birlikte, ön hipofiz ve hipotalamus üzerinde negatif feedback etki yaparlar. Bu şekilde FSH ve LH salgısı baskılanır. Menstrüasyondan 3-4 gün önce, bu hormonlar en düşük düzeylerine inerler. Menstrüasyondan 2 ya da 3 gün önce, korpus luteum gerilemeye başlar ve involusyona gider (32). Menstrual döngünün geç luteal fazı sırasında korpus luteumun kaybolmasına bağlı olarak, Östrojen 2 (Estradiol 2-E2), inhibin A ve progesteron (P) seviyeleri düşer (34, 35).

### **Süperovulasyon Yöntemi**

Multifollikülasyon ve süperovulasyonun temel amacı belirlenen bir zamanda bir hayvandan elde edilen kullanılabilir ovosit ve bunun sonucu olarak daha fazla embriyo elde edebilmektir (36). Reprodüktif biyoteknolojik uygulamalardan birçoğunun ilk aşaması hayvanların süperovulasyona sevk edilmesi ile başlar. Ovum pick up (OPU), *in vitro* embriyo üretimi (IVEP), intrauterin tohumlama (Intra Uterin Insemination-IUI), GIFT, ovosit ya da *in vitro* embriyolarının dondurulması, embriyo transferi, gamet fizyolojisinin araştırılması veya cinsiyet seçim (sexing) çalışmaları, pronuklear DNA mikroenjeksiyonu, intra sitoplazmik sperm injection (ICSI) gibi gamet manipulasyonları için ihtiyaç duyulan çok sayıda ovosit ya da embriyolar süperovulasyonun başarılmasıyla gerçekleştirilebilmektedir. Bu amaçla ekzojen gonadotropinler birçok laboratuvar hayvanı ile evcil hayvanlarda ovulasyonun uyarılmasında başarıyla kullanılmaktadır (37, 38).

Multifollikülasyon ve süperovulasyonu sağlamak amacıyla hipofiz kökenli gonadotropinler FSH, LH ve HMG, plasental kökenli gonadotropinler PMSG ve hCG, hipofiz ekstresi ve GnRH preparatları ile klomifen sitrat, difenililen türevleri gibi bazı sentetik preparatlar kullanılmaktadır (36).

### **Gonadotropinler**

Ovule olan ovositlerin sayısını arttırmak amacıyla, çiftleşmeden önce dişilere gonadotropinler uygulanır. PMSG, FSH gibi etkilidir ve follikülü uyaran doğal hormonu taklit eder. hCG ise LH gibi etkilidir ve ovulasyonu sağlayan doğal hormonu taklit eder (39, 40). hMG, geniş bir şekilde ilk olarak Amerika Birleşik Devletlerinde kullanılmaya başlanmıştır (41, 42). Yirmi seneden fazla olarak IVF uygulamalarında gonadotropinlerin kullanılmasının nedeni fertilizasyon için gerekli olan ovositlerin sayılarının mümkün olduğunca arttırılmak istenmesidir. Kullanılan hMG preparatlarının FSH ve LH biyolojik

etkinlik oranı 1:1'dir. Hormonun saflığı arttıkça biyolojik etkinlik oranını korumak için hCG eklenmesi gereklidir (43). İlk hazırlanan preparatların saflığı çok düşüktü ve preparat içinde bulunan proteinlerin sadece %5'i biyolojik olarak etkindi. Protein saflaştırma tekniklerinin gelişmesiyle birlikte etkinliği daha az olan proteinlerin karışımının en aza indirildiği hMG üretilmeye başlandı ve 1980'lerin başından itibaren monoklonal antikorlarında kullanımıyla idrardan saflaştırılmış FSH elde edildi (44). Günümüzde kullanılan ticari preparatlar sayesinde aşırı duyarlılık durumu daha az meydana gelmekte ve daha ağrısız deri altı uygulamaları yapılabilmektedir. Rekombinant teknolojinin gelişmesiyle birlikte güvenilirlik, saflık ve etkinin giderek arttığı görülmektedir. Daha sonraları rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte büyük miktarlarda rekombinant insan FSH (recFSH)'sı üretilmiştir (45, 46). Bu üretim sırasında glikoprotein hormon olan FSH'nın genel  $\alpha$  ve hormona özel olan  $\beta$  alt ünitelerini kodlayan genler Çin hamsteri ovaryum hücre soyu ile transfeksiyonu yapılarak elde edilmiştir (47). Süperovulasyon (48) ve IVF' de (49, 50) recFSH kullanılarak elde edilen ilk hamilelik 1992'de bildirilmiştir. Rekombinant ürünler, artmış saflık, geniş bir kullanım alanı ve biyolojik etkinliklerinin kararlılıklarıyla tercih edilmektedirler. Şu anda recLH (51, 52) ve rechCG (53, 54) de kullanılmaktadır.

Süperovulasyon protokolüne aşırı cevap veren kadınlarda, ovosit ve embriyo kalitesi üzerine gonadotropin uygulamasının olumsuz bir etkisi bulunmamaktadır (55). Aynı zamanda fertilizasyon ve embriyodaki blastomer sayısının gruplar arasında benzer, gruplardaki embriyoların kalitesi ve yarıklanma kapasitelerinde de fark olmadığı bildirilmiştir (56). Yüksek FSH seviyelerine maruz kalmanın da embriyo gelişimi üzerine doğrudan etkisi yoktur. Pre-antral follikülden elde edilen ovositlerin kültürü yapılırken ortama FSH eklendiğinde yararlı bir etki görülmemiştir (57).

Süperovulasyon protokollerinde sıkça kullanılan hCG hormonunun alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) olmak üzere iki ayrı alt grubu (sub-unit) vardır. Alfa hCG, kanda dolaşan LH ve Tiroid Uyarıcı Hormon (Tiroid Stimulan Hormon-TSH) ile oldukça benzer yapıdadır. Hatta kanda ölçüm değerleri bu benzerlikten ötürü yanlış sonuçlar verebilmektedir (18, 20). hCG hormonunun  $\beta$  alt grubu ise bahsi geçen hormonlarda oldukça ayrı bir yapıya sahiptir ve bu nedenle kanda gebelik testlerinde daha duyarlı bir sonuç vermektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı kanda gebelik testlerinde ölçülen hCG hormonunun  $\beta$  alt grubu veya daha kısa adıyla  $\beta$  hCG'dir (18, 20).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 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 yürütüldü. Çalışma materyali olarak 7 haftalık 40 adet BALB/c soyu dişi fare kullanıldı. 7 haftalık dişi fareler tüm deney boyunca 14 saat aydınlık/10 saat karanlık döngüsüne maruz bırakıldı. Fareler özel hazırlanmış 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, 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 (International Units-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. deney grubu); 5 (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 ve servikal dislokasyondan önce canlı ağırlıkları alınarak 17 ile 20. saatler arası di-etil eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapıldı. Takiben süratle ovaryumlar çevresindeki yağ dokusu temizlenip, tartımları yapılarak Bouin tespit solüsyonuna alındı. Histolojik incelemeler için alınan ve tesbit edilen ovaryumlar rutin histolojik metodlar uygulanarak doku takibi yapıldı. Elde edilen parafin bloklarından 5-6 µm kalınlığında kesitler alınarak histolojik yapının incelenmesi için Crossmon'ın üçlü boyama tekniği (58) uygulandı. Her gruba ait farelerin ovaryumları stereo (Nikon SMZ1000, Japonya) ve araştırma mikroskobu (Nikon Eclipse 80i, Japonya) ile incelendi.

## **Tespit ve Crossmon Üçlü Boyama Tekniğinde Kullanılan Solüsyonlar**

### ***Bouin Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı***

Doymuş Pikrik Asit.....75 ml  
Nötr Formol.....25 ml  
Asetik Asit.....5 ml (Kullanılacağı zaman eklenir.)

### ***Crossmon'ın Üçlü Boyama Tekniği Solüsyonlarının Hazırlanışı***

#### **Weigert Hematoxylin Solüsyonu**

##### *Solüsyon A ;*

Hematoxylin ( Crist).....1 gr  
% 95 alkol.....100 ml

##### *Solüsyon B ;*

Distile su.....99 ml  
Demir-3-Klorür.....1 gr (sıvı ile 4 ml)  
HCL .....1 ml

Solüsyonlar hazırlandıktan sonra erimeleri için bir gece bekletildi.

A ve B solüsyonları eşit miktarda hazırlanıp karıştırıldı.

#### **Metil Alkol (Metil Karbonat) Solüsyonu**

Distile su.....125 ml  
Metil alkol (Metanol).....125 ml  
Sodyum karbonat.....0.5 gr (Kendiliğinden erimesi için bir gece bekletildi).

#### **Asit Fuksin Orange G Solüsyonu**

Asit fuksin.....1.4 gr  
Orange G.....0.6 gr  
Distile su.....400 ml  
Tymol.....0.26 gr  
Asetik asit.....4 ml

#### **Fosfotungistik Asit Solüsyonu**

Fosfotungistik Asit.....3 gr  
Distile su.....100 ml

**Anilin-Blue Solüsyonu**

Anilin-Blue.....2 gr  
Distile su.....100 ml  
Asetik asit.....2 ml

**Asetik Asit Solüsyonu**

Asetik Asit.....2 ml  
Distile su.....100 ml

**Doku Takibi**

Kontrol ve deney gruplarına ait ovaryumlar alınarak, numune bilgilerinin yazıldığı kasetlere yerleştirildi ve önceden hazırladığımız Bouin tespit solüsyonu içine konularak 24 saat bekletildi. Sırasıyla % 70, % 80, % 96, absolü I, absolü II ve ksilol solüsyonlarının her birinde birer saat bekletilerek ksilol II’de 1 gece bırakıldı.

Ertesi güne hazırlık olması açısından vakumlu etüvün sıcaklığı 58 °C’ye ayarlandı. Etüv içerisine erimesi için ksilol-parafin, yumuşak parafin, parafin I ve parafin II kavanozları yerleştirildi. En son ksilolde bekleyen ovaryumlar sırasıyla vakumlu etüv içindeki ksilol-parafin, yumuşak parafin, parafin I kavanozlarına konuldu ve birer saat bekletildi. Parafin II’de 1 saat vakum yapıldı. Blokaj için; blokaj kapları hazırlanarak, kaplar üzerine numune bilgileri yazıldı. Metal kaba parafin tankından biraz parafin dökülüp, ovaryum yerleştirilerek üzeri parafin ile doldurulup +4 °C’ye kaldırıldı.

**Kesit Alma**

Benmarinin sıcaklığı 58 °C’ye ayarlandı. Beher içine distile su doldurularak ısınması için benmariye yerleştirildi. Kesitlerin lama çekilmesi amacıyla distile su ile doldurduğumuz beher içine % 0.1 oranında jelatin konuldu. Mikrotom (Leica RM 2135, Almanya) ve Mikrotom bıçağı (Microtome Blades S35 Type, Feather, Japonya) hazırlanarak, 5-6 µm kalınlıkta kesitler alındı. Kesitler daha iyi açılabilmesi için, siyah bir zemin üzerine yerleştirilmiş, içinde distile su bulunan petri kabına alındı. Kesitler daha sonra fırça yardımıyla benmaride hazır bulunan 58 °C’deki jelatinli distile suya geçirilerek fırça yardımıyla, grup bilgilerinin yazıldığı lamlara çekildi. Alınan kesitler boyanmadan önce kurumaya bırakıldı.

## Crossmon'ın Üçlü Boyama Tekniği

Boyama için hazırlanan lamlar köprü içersine yerleştirildi.

1. Köprü içersindeki lamlar deparafinizasyon işlemleri için önce ksilol I'e (10 dakika) ve daha sonra ksilol II'ye (10 dakika) alındı.
2. Dehidrasyon işlemleri için; sırasıyla -absolü alkol I (3 dakika) ve  
-absolü alkol II'ye geçirilip (3 dakika).  
-%96'lık alkol (3 dakika),  
-%80'lik alkol (3 dakika), ve  
-%70'lik alkol (3 dakika) solüsyonlarından geçirildi.
3. Distile suda çalkalamaya alındı (2x3 dakika).
4. Kesitler sonrasında çekirdek boyaması için Weigert Hematoxylin solüsyonunda bekletildi (8 dakika).
5. Kesitler akarsuda yıkamaya alındı (5 dakika).
6. Metil alkolde 1 dakika bekletildi.
7. Tekrar kesitler akarsuda yıkamaya alındı (5 dakika).
8. Sonra distile suda yıkama yapıldı (2x3 dakika).
9. Sitoplazma boyası için kesitler Asit Fuksin içine alındı (5 saniye daldırıp çıkarılarak).
10. Tekrar distile suda yıkama işlemleri yapıldı (2x3 dakika).
11. Daha sonra kesitler fosfotungstik asit içine alındılar (15 dakika). Ancak pembe rengin kontrolü için mikroskop altında kesitler incelendi.
12. Tekrar distile suda yıkama yapıldı (2x3 dakika).
13. Kesitler daha sonra bağ doku boyaması için Anilin-Blue solüsyonuna alındı (2 dakika).
14. Tekrar distile suda yıkama yapıldı (2x3 dakika).
15. Sonra asetik asit içine alındı (1 dakika).
16. Distile suda yıkama yapıldı (2x3 dakika).
17. Yıkama işlemlerinden sonra kesitler -%96'lık alkol I (3 dakika),  
-%96'lık alkol II (3 dakika) den geçirilip,  
-absollü alkol I (3 dakika) ve  
-absollü alkol II'ye alındı. (3 dakika).



18. Kesitler daha sonra
  - ksilol I (5 dakika),
  - ksilol II (10 dakika),
  - ksilol III'den (15 dakika) geçirildi.
19. Kesitler üzerine entellan (Merck, 1.07961.0100, Almanya) damlatılarak lamel ile kapatıldı.

### **İstatistiksel Analizler**

Deney ve kontrol gruplarına ait farelerin enjeksiyon öncesi (canlı ağırlık I) ve servikal dislokasyon öncesi canlı ağırlıkları (canlı ağırlık II), ovaryum ağırlıkları ile ovaryumlarda gelişmekte olan folliküller ve korpus luteum sayılarının istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı. Tüm veriler SPSS 20.0 programı kullanılarak analiz edilerek enjeksiyon öncesi ve 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 (59).

## BULGULAR

Çalışmamız süresince kontrol ve deney grubunu oluşturan farelerde yaptığımız deneysel uygulamaya bağlı olarak ölüm görülmemiştir.

### Morfolojik ve İstatistiksel Bulgular

#### *Canlı Ağırlık*

Kontrol ve deney grubuna ait hayvanlar çalışmanın başlangıcı (canlı ağırlık I) ve doku alımında (canlı ağırlık II) olmak üzere canlı ağırlıkları tespit edilmiştir. Canlı ağırlıklar istatistiki açıdan değerlendirildiğinde, deney grupları kendi aralarında  $p < 0.05$  düzeyinde önem gösterirken kontrol grubu arasında önem görülmemiştir (Tablo 1, Şekil 1). Ancak canlı ağırlık II değerlerinde kontrol grubu ile I. , II. ve III. deney grupları arasında  $p < 0.05$  düzeyinde önem saptanmıştır (Tablo 1, Şekil 1).

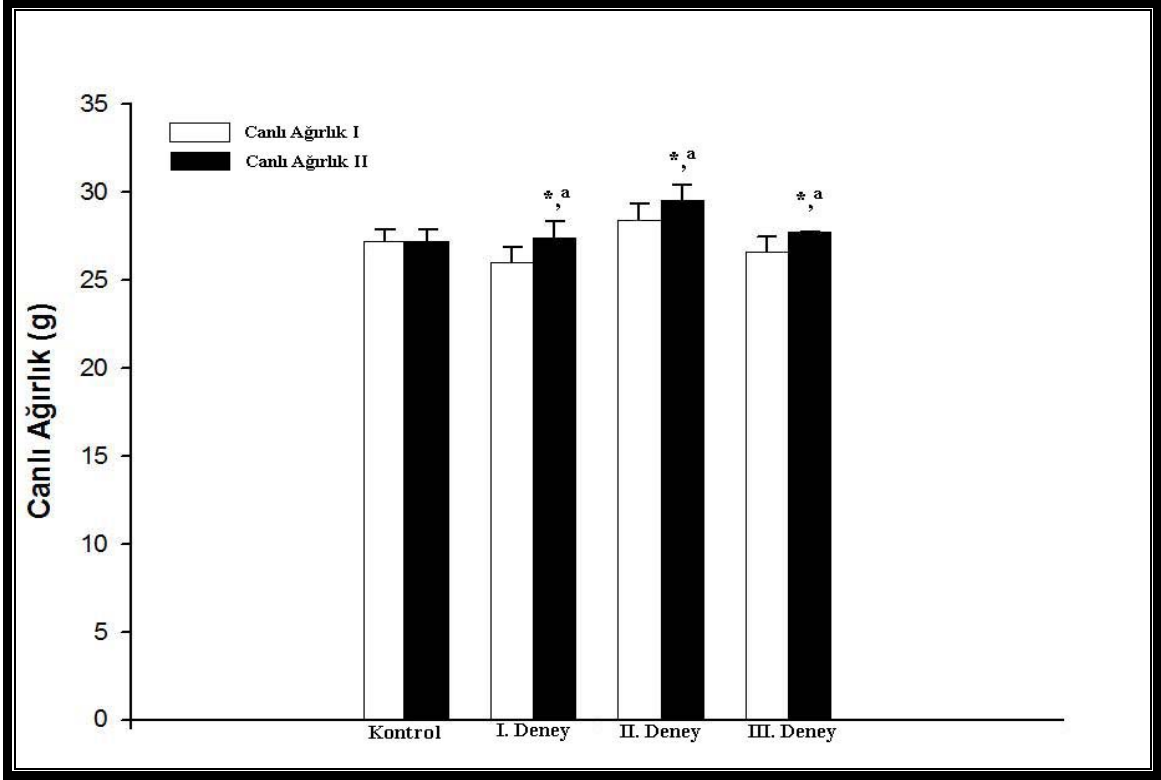
Kontrol ve deney gruplarına ait ovaryumların makroskopik görünümünde de aynı bulgular saptanmıştır. Hazırlanan histolojik preparatların stereo mikroskop (Nikon SMZ1000) görüntüleri şekil 5-8’de gösterilmiştir. Ayrıca preparatların küçük objektif ile ışık mikroskopunda da (Nikon Eclipse 80i) değerlendirmeleri yapılmıştır (Şekil 9-12).

**Tablo 1:** Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin canlı ağırlıkları (g)

	n	<b>Kontrol Grubu</b> $\bar{X} \pm SE$	<b>I. Deney Grubu</b> $\bar{X} \pm SE$	<b>II. Deney Grubu</b> $\bar{X} \pm SE$	<b>III. Deney Grubu</b> $\bar{X} \pm SE$
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*. <sup>a</sup>	29.5±0.90*. <sup>a</sup>	27.7±0.01*. <sup>a</sup>

\* Deney grupları ile kontrol grubu arasında önem,  $p < 0.05$

<sup>a</sup> Deney gruplarında “canlı ağırlık II” değerleri ile “canlı ağırlık I” değerleri arasında önem,  $p < 0.05$



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

\* Deney grupları ile kontrol grubu arasında önem,  $p < 0.05$

<sup>a</sup> Deney gruplarında “canlı ağırlık II” değerleri ile “canlı ağırlık I” değerleri arasında önem,  $p < 0.05$

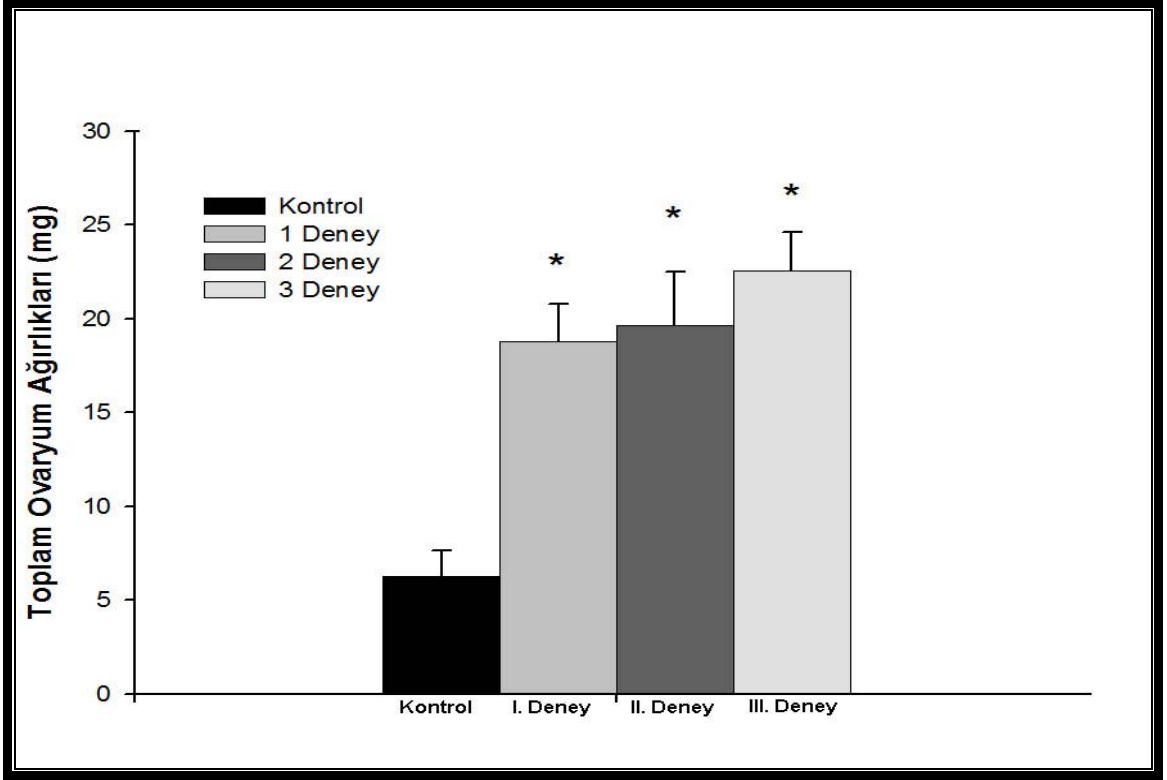
### Ovaryum Ağırlığı

Kontrol ve deney gruplarına ait farelerin ovaryum ağırlıkları Tablo 2 ve Şekil 2’de gösterilmiştir. Deney gruplarında ovaryum ağırlık ortalamaları kontrol grubu değerlerine oranla daha fazla bulunarak  $p < 0.05$  düzeyinde istatistiki önem saptanmıştır.

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

	n	Kontrol Grubu $\bar{X} \pm SE$	I. Deney Grubu $\bar{X} \pm SE$	II. Deney Grubu $\bar{X} \pm SE$	III. Deney Grubu $\bar{X} \pm SE$
Ovaryum Ağırlığı	10	6.25±1.37	18.75±2.04*	19.66±2.85*	22.56±2.02*

\* Deney ile kontrol grupları arasında önem,  $p < 0.05$



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

\* Deney grupları ile kontrol grubu arasında önem,  $p < 0.05$

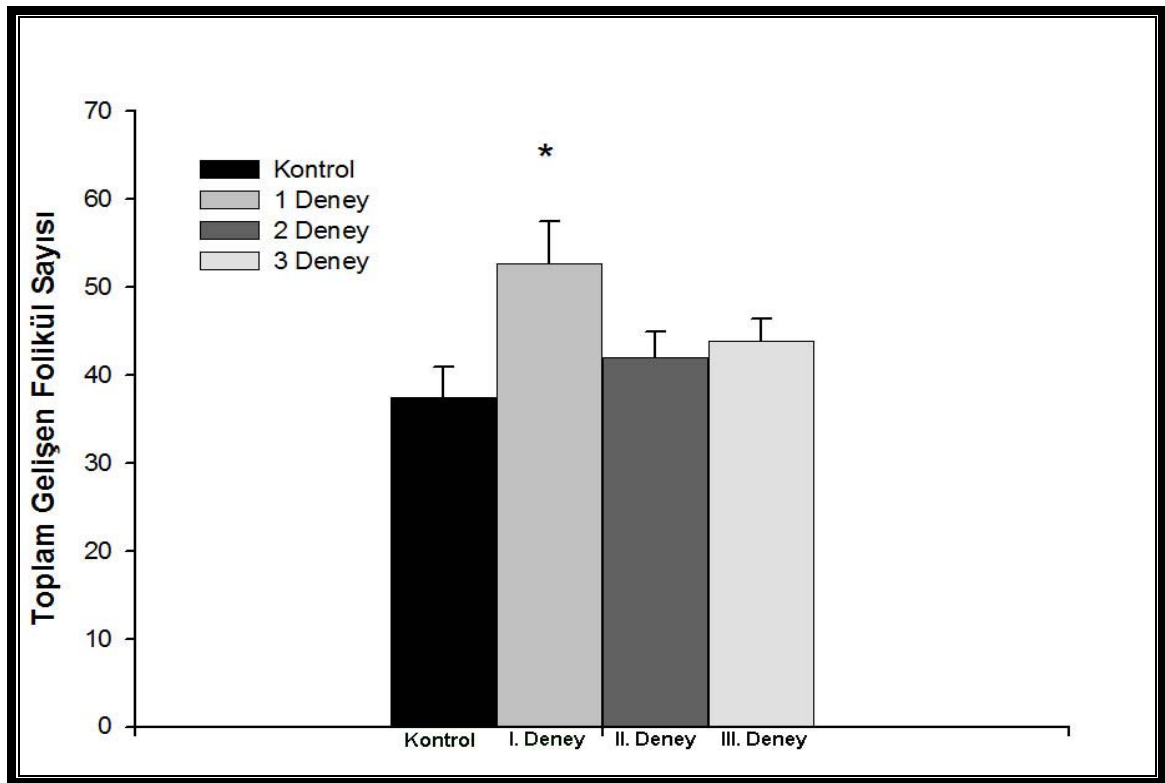
### ***Folikül ve Korpus Luteum Sayıları***

Hazırlanan preparatlarda primer, sekonder ve Graaf follikül ile korpus luteum sayımı yapılarak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde I. deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel önem bulunurken II. ve III. deney grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel önem görülmemiştir (Tablo 3, Şekil 3, 4). Ortalama değerlere bakıldığında I. deney grubunda follikül gelişiminin en fazla olduğu belirlenmiştir.

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

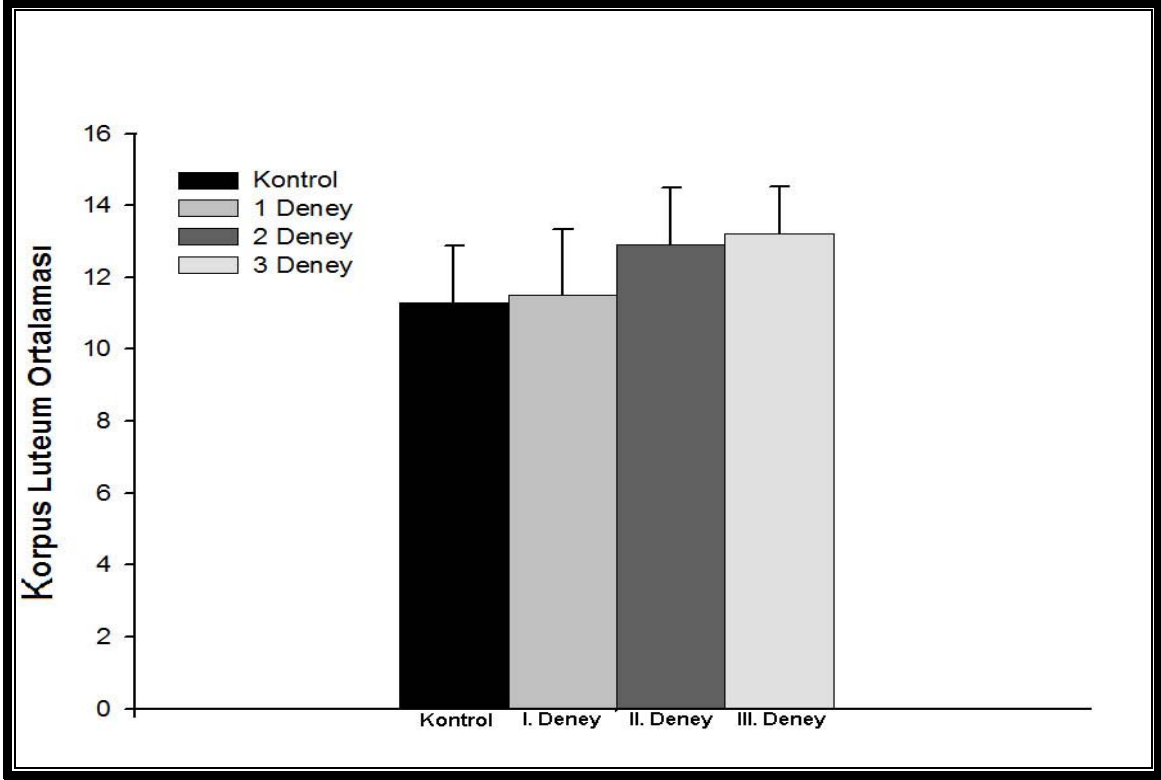
	n	Ortalama Primer Follikül Sayısı $\bar{X} \pm SE$	Ortalama Sekonder Follikül Sayısı $\bar{X} \pm SE$	Ortalama Graaf Follikül Sayısı $\bar{X} \pm SE$	Ortalama Korpus Luteum (KL) Sayısı $\bar{X} \pm SE$	Gelişen Follikül (pri. +sec. +graaf) Sayısı $\bar{X} \pm SE$
<b>Kontrol Grubu</b>	10	20.10±2.63	17.00±2,23	1.00±0.00	11.30±1.56	37.50±3.45
<b>I. Deney Grubu</b>	10	28.70±2.92	21.70±2.78	2.00±0.36	11.50±1.84	52.60±4.83*
<b>II. Deney Grubu</b>	10	26.10±2.40	15.40±2.43	1.25±0.25	12.90±1.60	42.00±2.93
<b>III. Deney Grubu</b>	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,  $p < 0.05$



**Şekil-3:** Kontrol ve deney gruplarına ait toplam gelişen follikül sayısı.

\* I. deney grubu ile kontrol grubu arasında önem,  $p < 0.05$



**Şekil-4:** Kontrol ve deney gruplarına ait korpus luteum ortalaması.

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 follikül sayısının ortalama değeri  $28.70 \pm 2.92$  olduğu, bu grupta maksimum follikül sayısının 44'e kadar çıktığı minimum primer follikül sayısının 10 olduğu gözlemlendi. Toplam sekonder follikül sayısının ortalama değeri  $21.70 \pm 2.78$  olduğu, maksimum sekonder follikül sayısının 37'ye kadar yükseldiği, minimum sekonder follikül 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 follikül sayısının değeri  $52.60 \pm 4.83$  iken, en yüksek gelişen follikül sayısının 75, en düşük 17 olduğu saptandı.

Deri altı yolla 5 I. U. PMSG ve 5 I. U. hCG uygulanan II. deney grubunun toplam primer follikül sayısının ortalama değeri  $26.10 \pm 2.40$  olduğu, bu grupta maksimum primer follikül sayısının 43'e kadar çıktığı, minimum primer follikül sayısının 19 olduğu gözlemlendi. Toplam sekonder follikül sayısının ortalama değerinin  $15.40 \pm 2.43$  olduğu, maksimum sekonder follikül sayısının 28'e kadar yükseldiği, minimum sekonder follikül sayısının 7 olduğu görüldü. Toplam korpus luteum sayısının ortalama değeri  $12.90 \pm 1.60$  iken maksimum korpus luteum sayısının 22, minimum korpus luteum sayısı 5 olarak tespit

edildi. Gelişen follükül sayısının değeri  $42.00 \pm 2.93$  iken, en yüksek gelişen follükül sayısının 52, en düşük 26 olduğu saptandı.

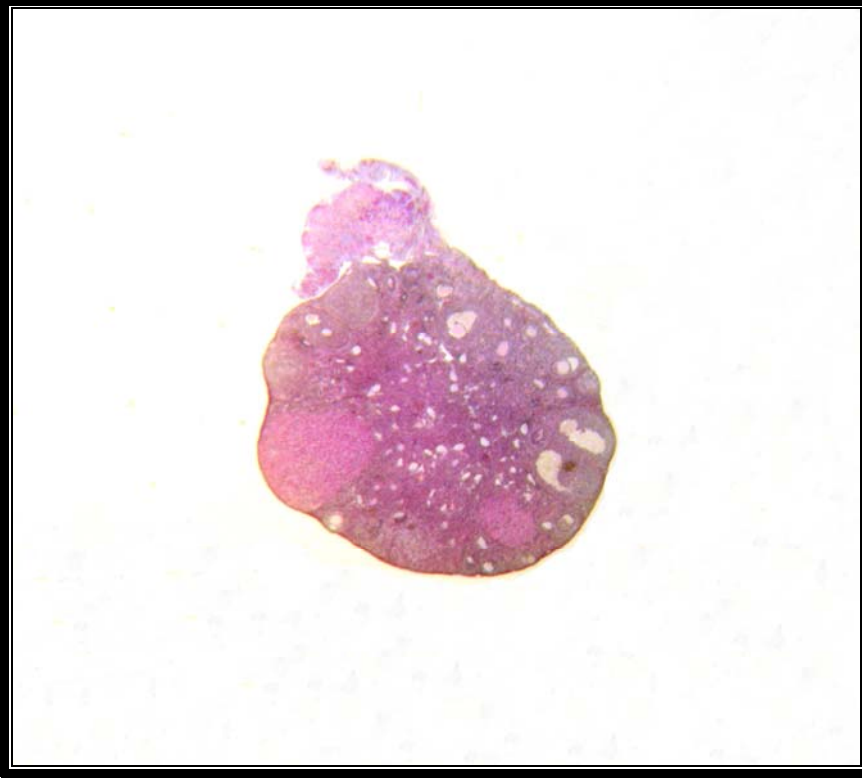
En yüksek dozda PMSG ve hCG hormonlarının 7.5 I. U. uygulandığı III. deney grubunda toplam primer follükül sayısının ortalama değeri  $29.90 \pm 2.36$  olduğu, bu grupta maksimum primer follükül sayısının 43'e kadar çıktığı, minimum primer follükül sayısının 19 olduğu gözlemlendi. Toplam sekonder follükül sayısının ortalama değerinin  $12.60 \pm 1.24$  olduğu, maksimum sekonder follükül sayısının 28'e kadar yükseldiği, minimum sekonder follükül 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 follükül sayısı ortalama değeri  $43.80 \pm 2.51$  olarak belirlendi. Bu grupta, en yüksek gelişen follükül sayısının 52, en düşük 31 olduğu saptandı.

Sadece 0.2 ml serum fizyolojik uygulanan kontrol grubunda, toplam primer follükül sayısının ortalama değeri  $20.10 \pm 2.63$  olduğu, maksimum primer follükül sayısının 36'ya kadar çıktığı, minimum primer follükül sayısının 9 olduğu gözlemlendi. Toplam sekonder follükül sayısının ortalama değerinin  $17.00 \pm 2.23$  olduğu, maksimum sekonder follükül sayısının 29'a kadar yükseldiği, minimum sekonder follükül 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 follüküllerin ortalama değeri  $37.50 \pm 3.45$  olarak bulunurken, en düşük ve en yüksek follükül sayısı 23-57 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı.

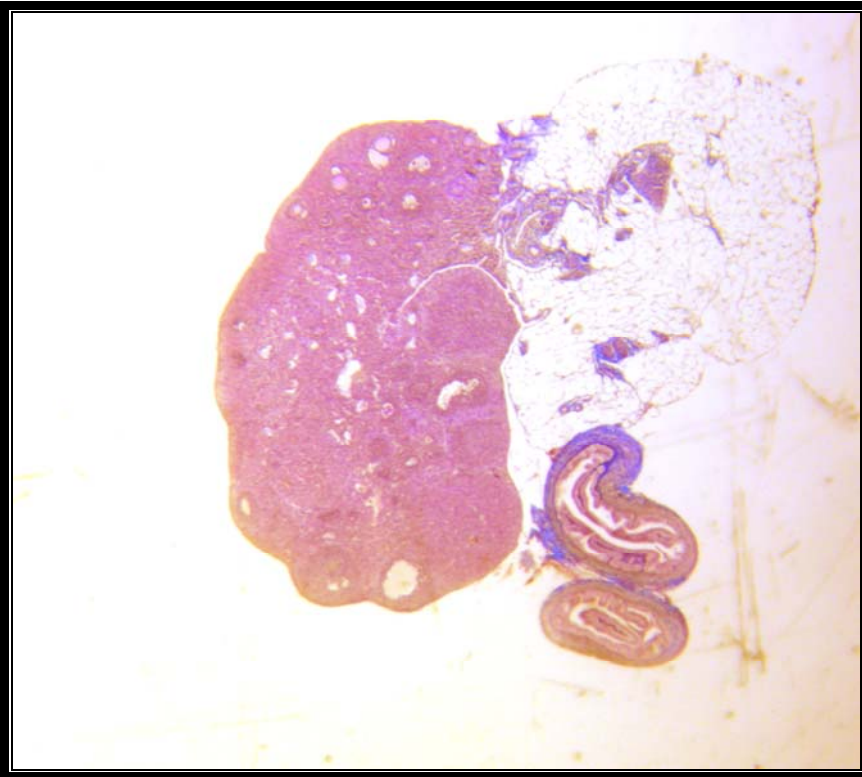
### **Histolojik Bulgular**

Kontrol ve deney gruplarına ait ovaryum kesitleri Crossmonn'ın üçlü boyama yöntemi (58) uygulanarak değerlendirildi.

Ovaryumun korteks bölgesinde germinatif epitelin altında tunika albuginea ile primordiyal ve gelişme döneminde olan follüküller, interstisyel hücreler ve korpus luteum; medulla bölgesinde ise kan damarları ve sinir tellerinin bağ doku içerisindeki yerleşimi kontrol ve deney gruplarında histolojik açıdan incelendi. Deney gruplarında uygulanan PMSG ve hCG hormonlarına bağlı patolojik bir durum gözlenmedi (Şekil 9-12).

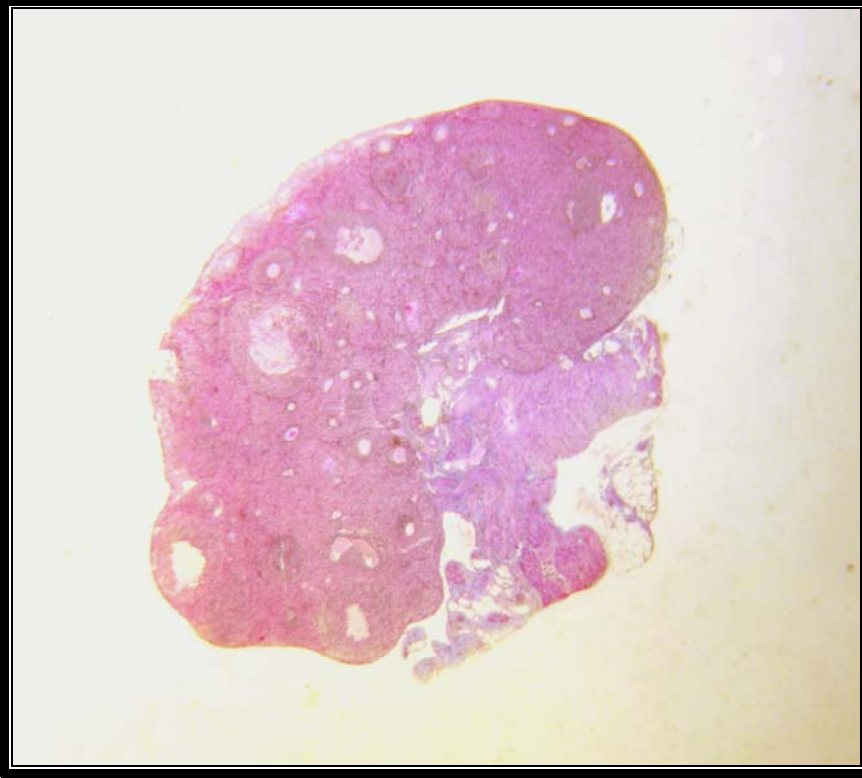


**Şekil-5:** Kontrol grubuna ait ovaryumun genel görünümü, üçlü boyama, stereo mikroskop görüntüsü, X 1,5 obj.

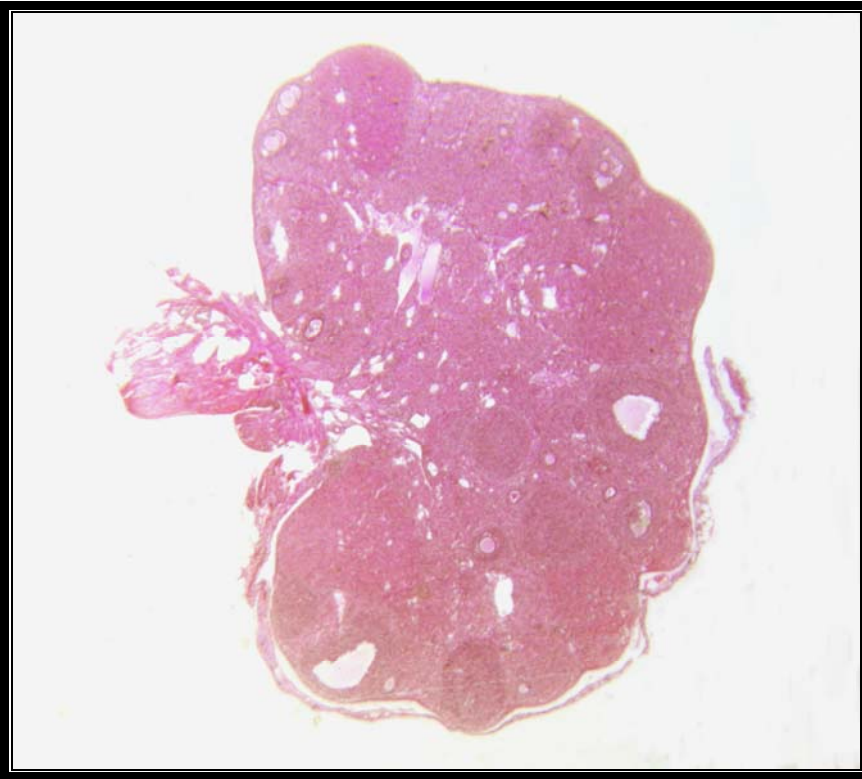


**Şekil-6:** I. deney grubuna ait ovaryumun genel görünümü, üçlü boyama, stereo mikroskop görüntüsü, X 1,5 obj.

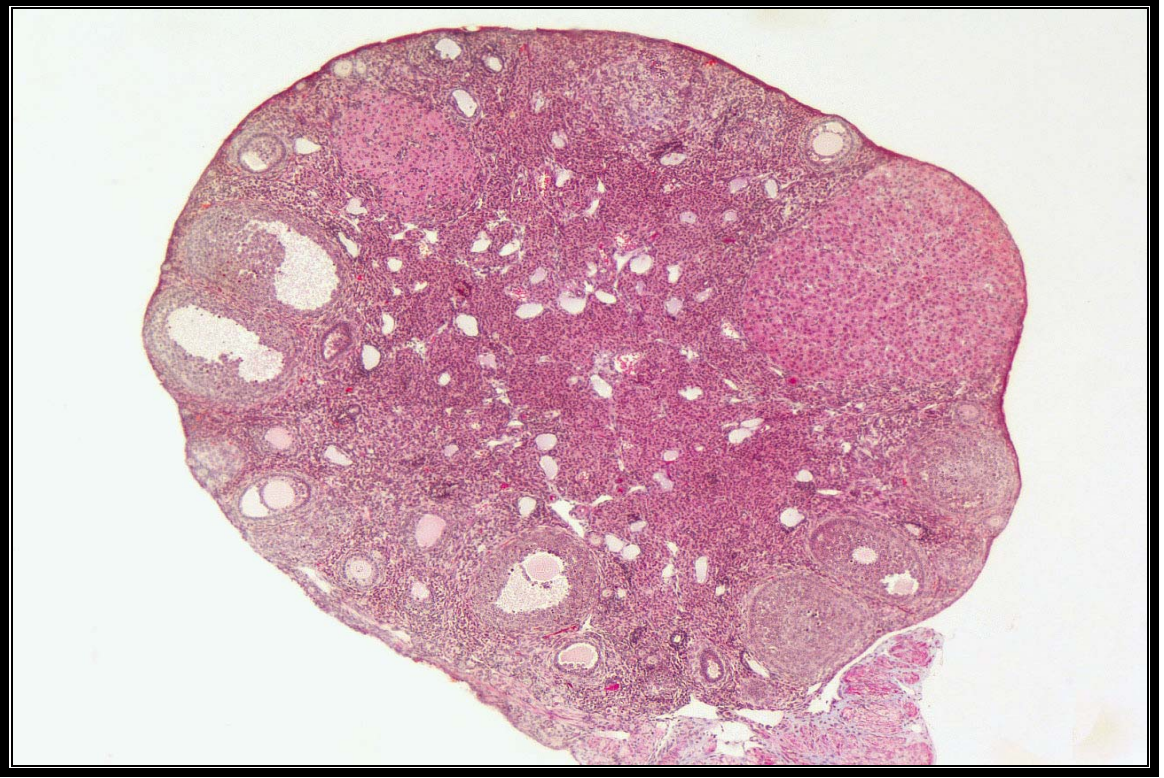




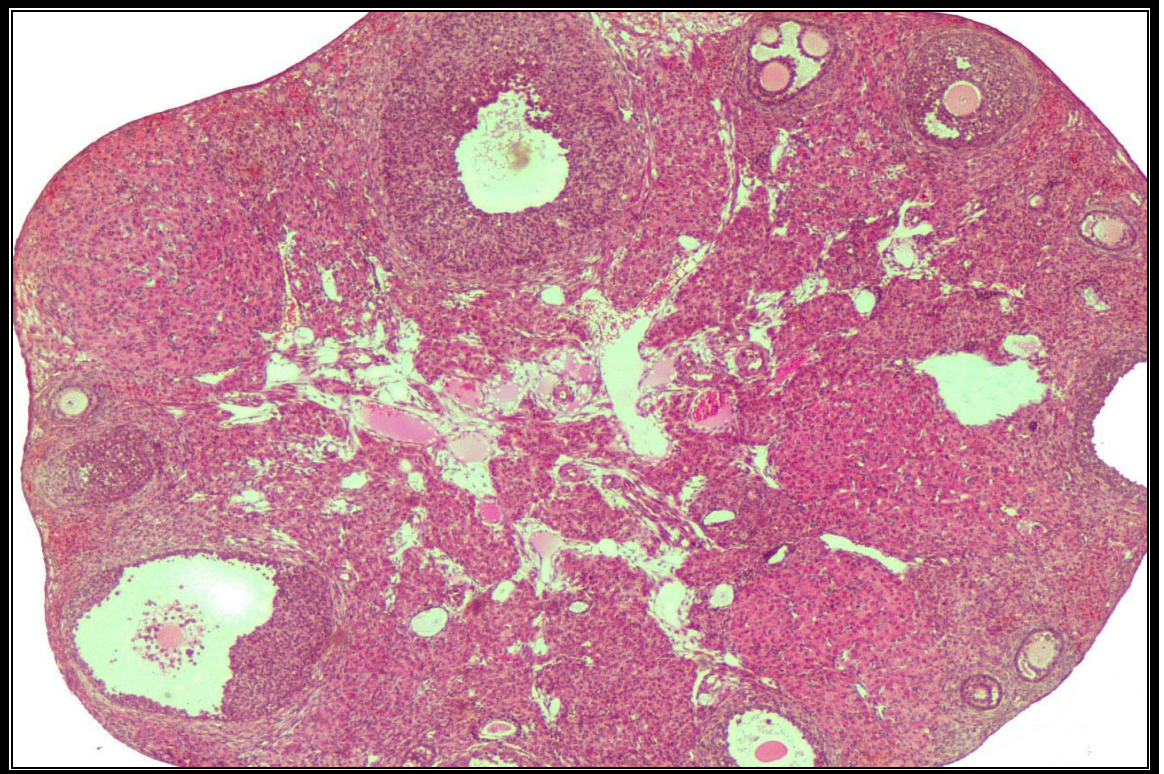
**Şekil-7:** II.deney grubuna ait ovaryumun genel görünümü, üçlü boyama, stereo mikroskop görüntüsü, X 1,5 obj.



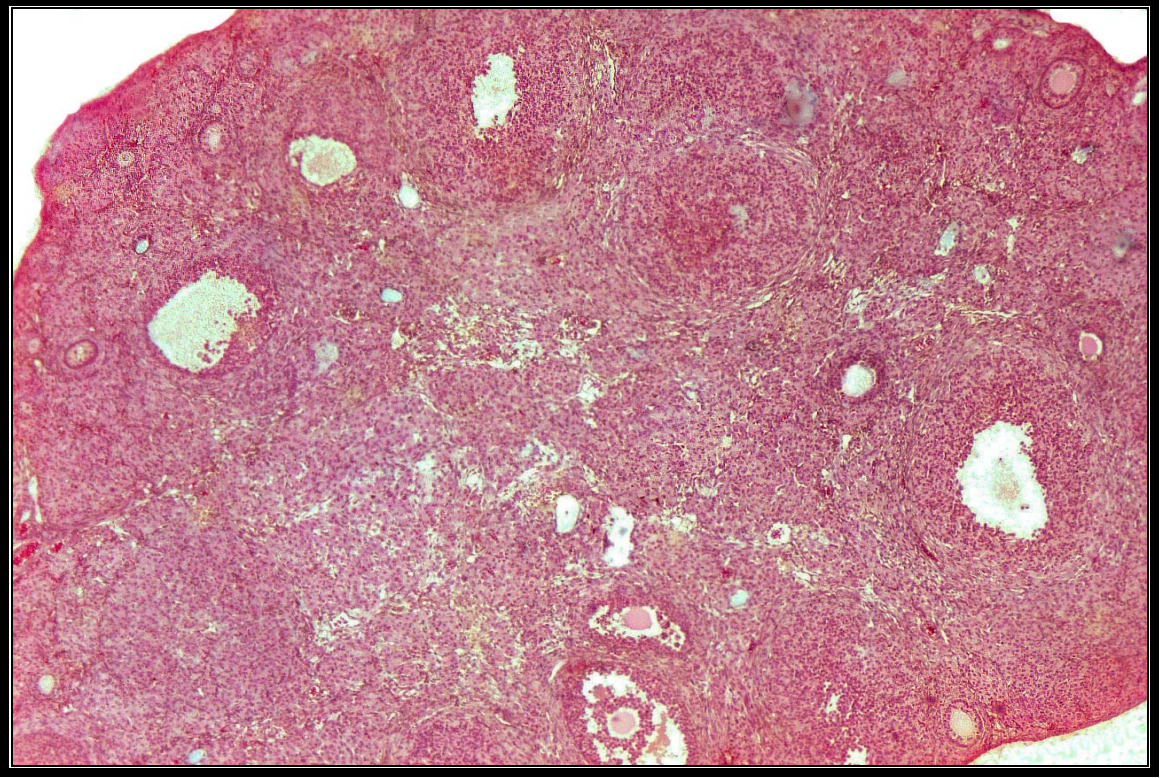
**Şekil-8:** III.deney grubuna ait ovaryumun genel görünümü, üçlü boyama, stereo mikroskop görüntüsü, X 1,5 obj.



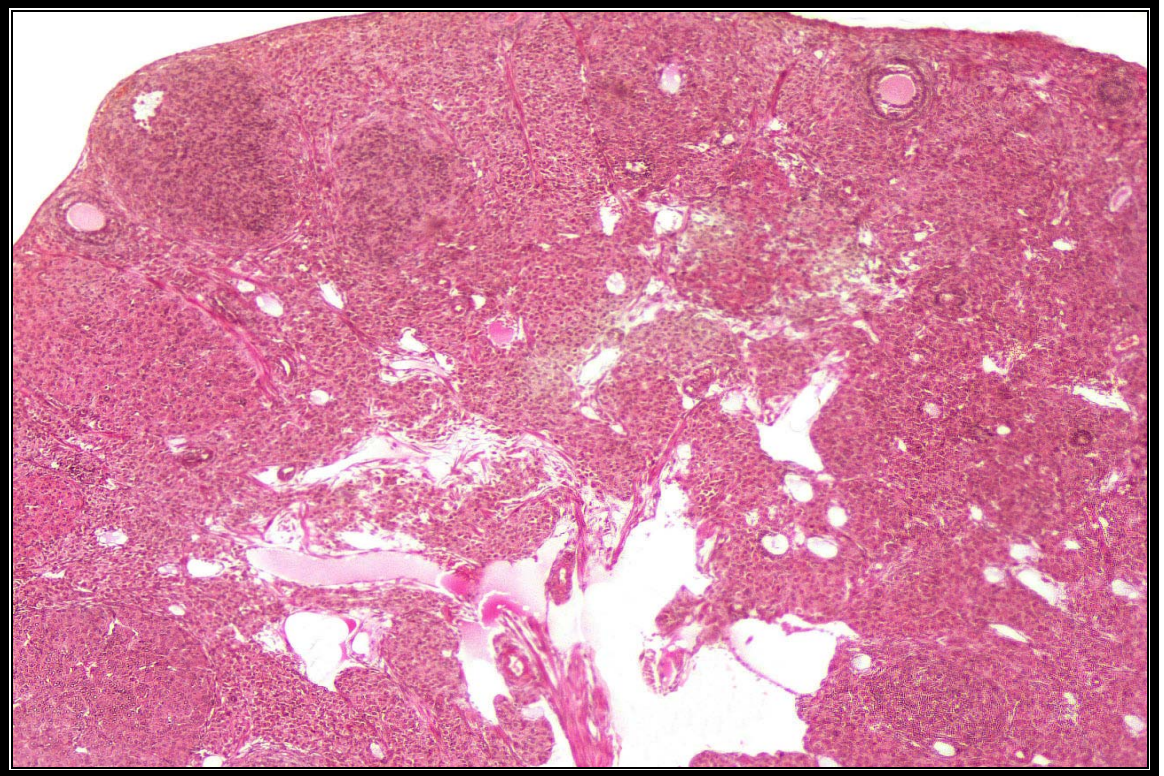
**Şekil-9:** Kontrol grubuna ait ovaryumun genel görünümü. Üçlü boyama, X 4 obj.



**Şekil-10:** I. deney grubuna ait ovaryumun genel görünümü. Üçlü boyama, X 4 obj.

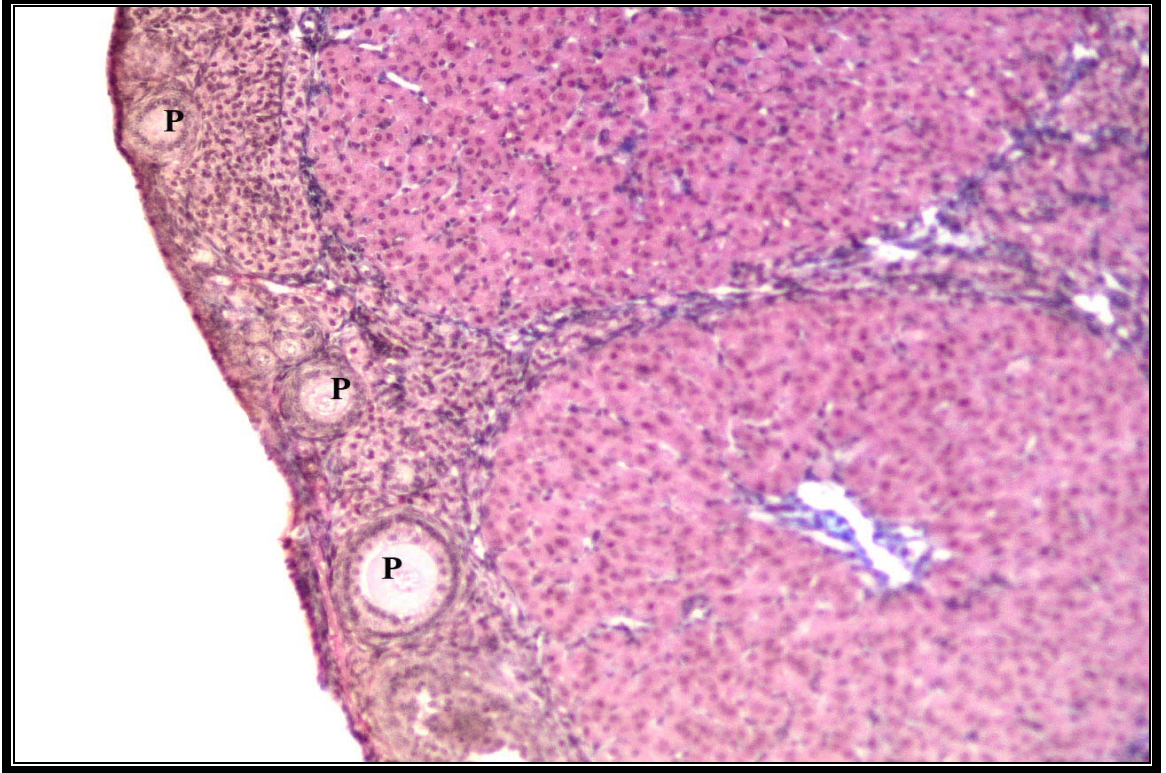


Şekil-11: II. deney grubuna ait ovaryumun genel görünümü. Üçlü boyama, X 4 obj.

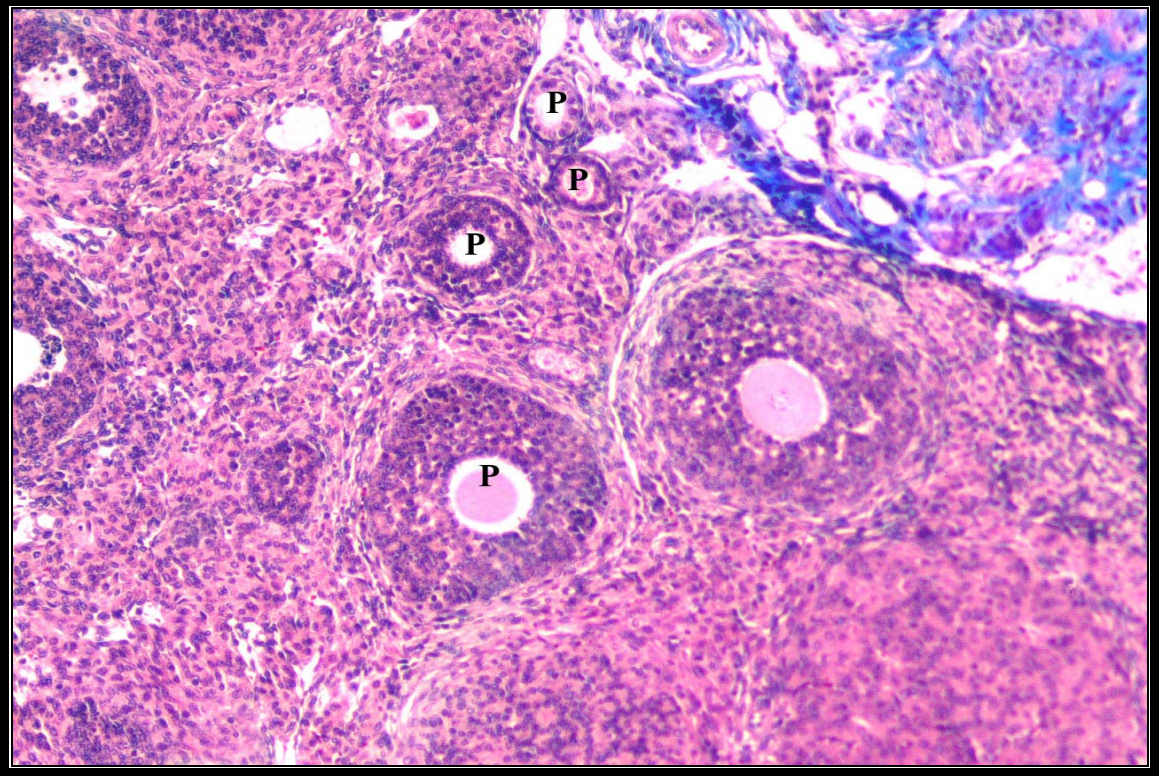


Şekil-12: III. deney grubuna ait ovaryumun genel görünümü. Üçlü boyama, X 4 obj.

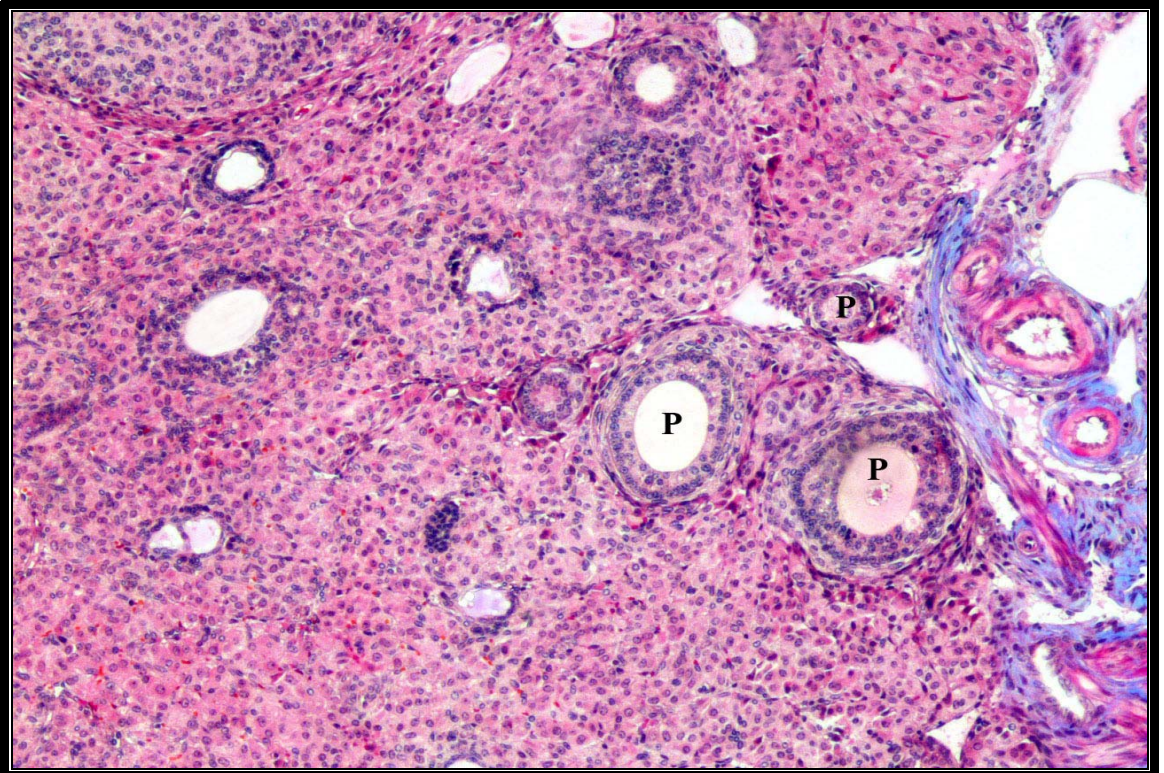
Kontrol ve deney gruplarını primer follikül yönünden değerlendirdiğimizde en az kontrol grubu olmak üzere sırasıyla, II, I, ve III. deney grubunda arttığı saptanmıştır. (Şekil 13-16)



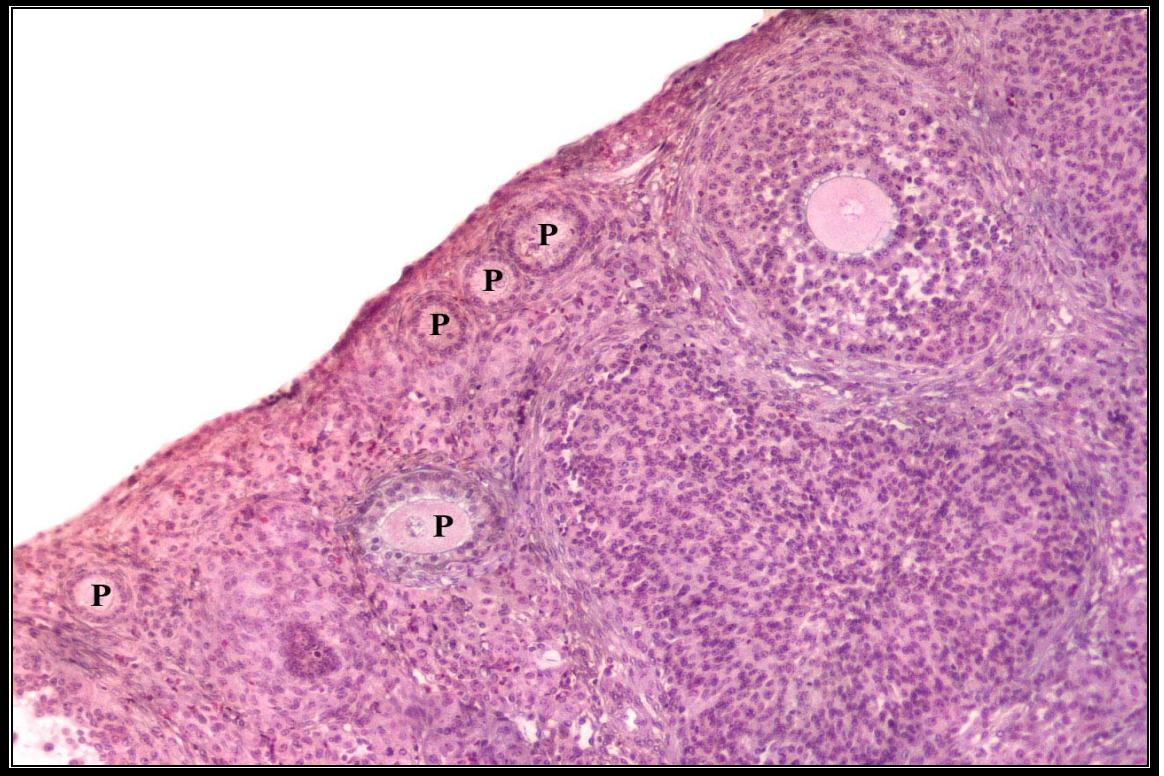
**Şekil-13:** Kontrol grubuna ait primer folliküllerin genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( P ), Primer follikül.



**Şekil-14:** I. deney grubuna ait primer follüküllerin genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( P ), Primer follükül.

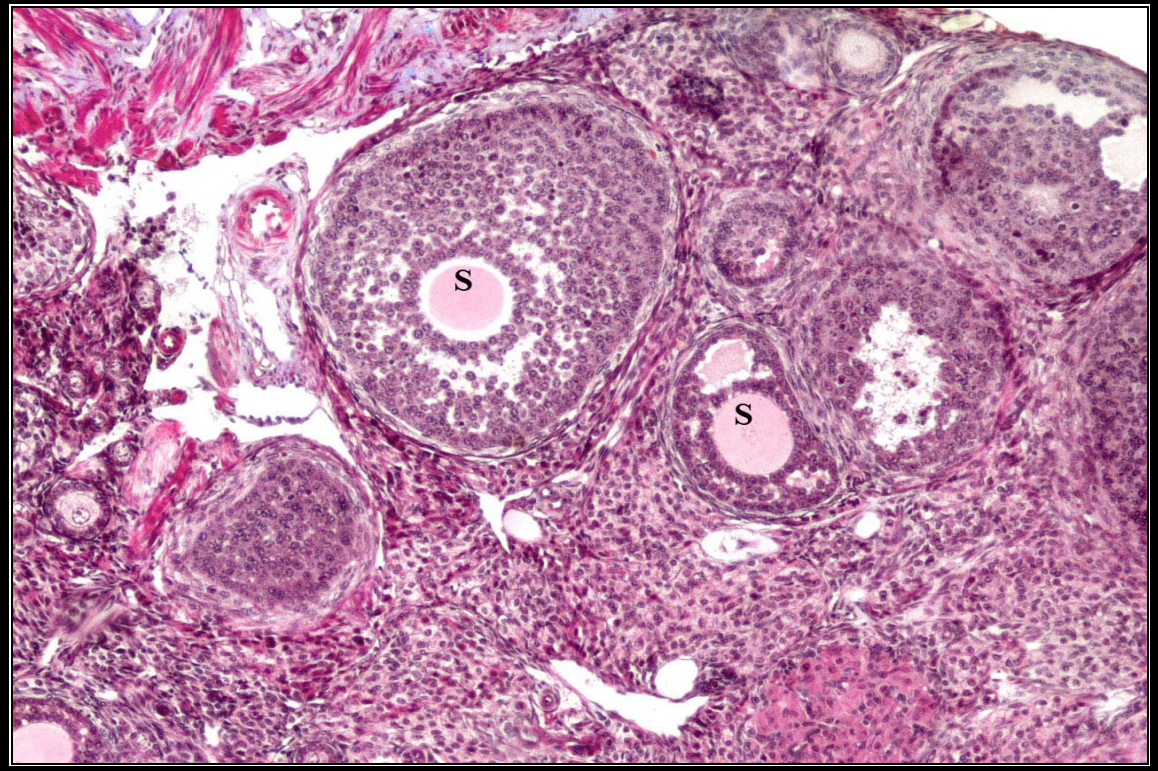


**Şekil-15:** II. deney grubuna ait primer follüküllerin genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( P ), Primer follükül.

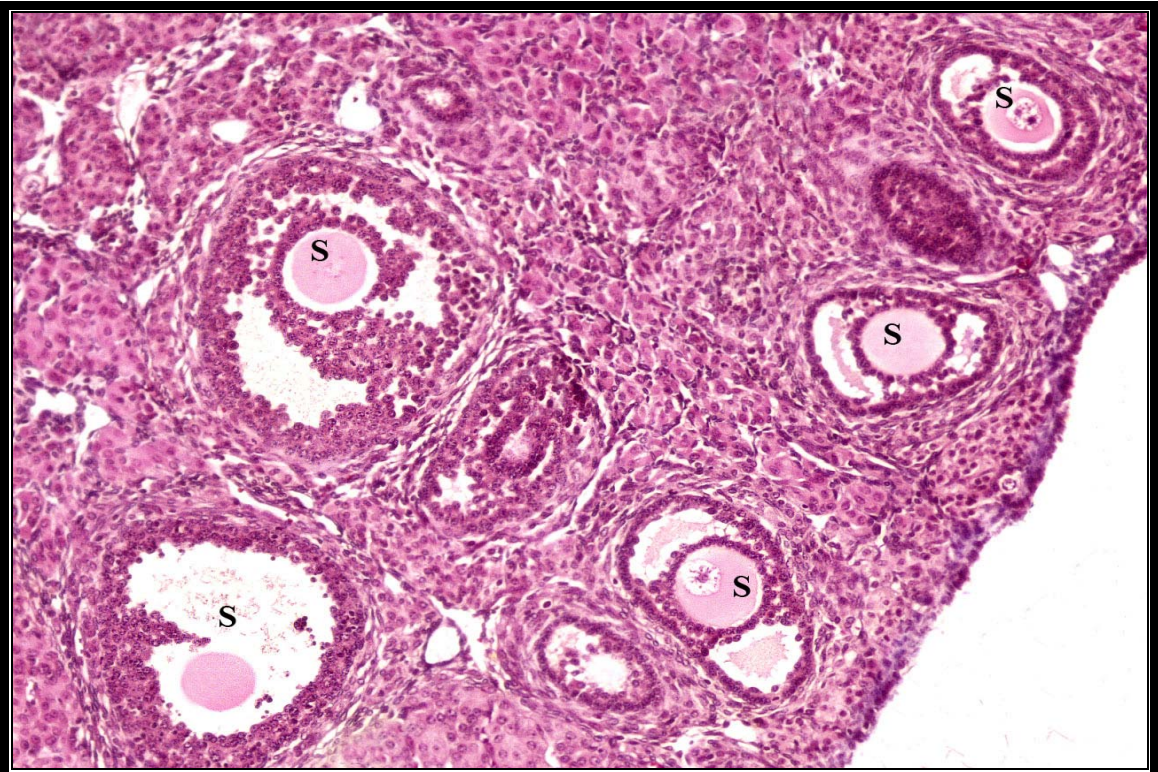


**Şekil-16:** III. deney grubu na ait primer follüküllerin genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( P ), Primer follükül.

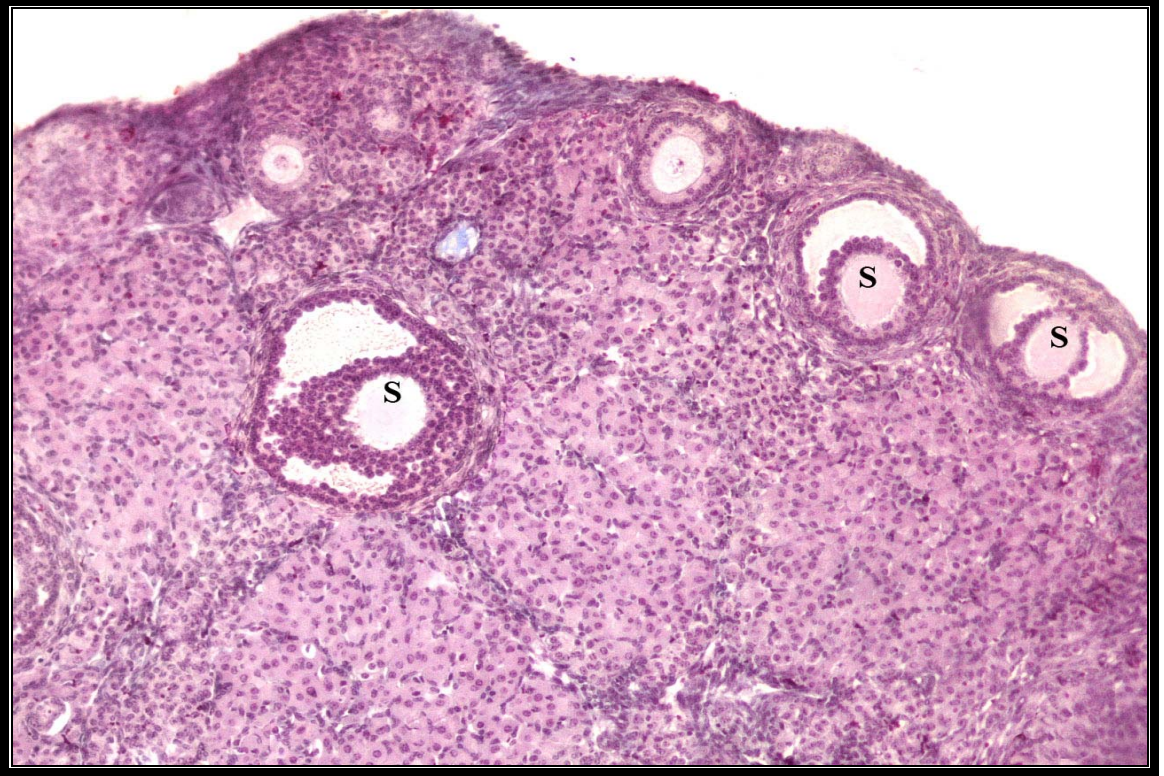
Preparatlar sekonder follikül yönünden değerlendirildiğinde sırasıyla III., II., kontrol ve I. deney grubunda artış gösterdiği görüldü (Şekil 17-20).



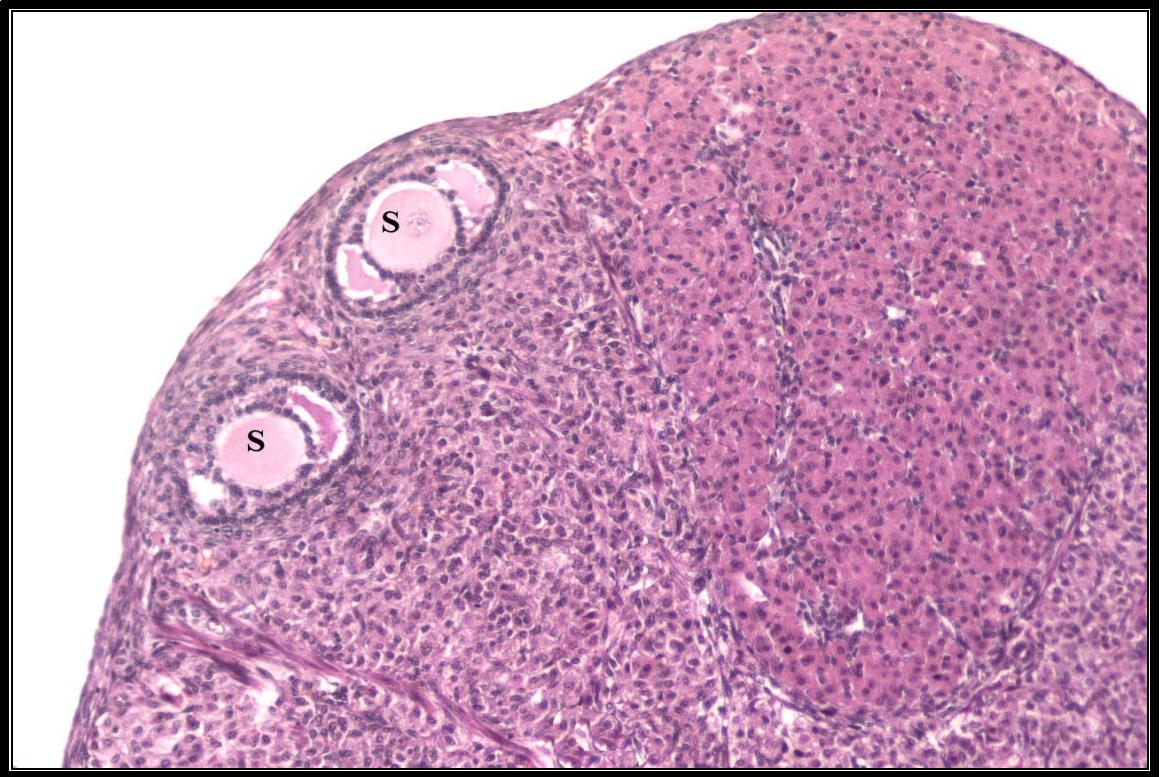
Şekil-17: Kontrol grubuna ait sekonder folliküllerin genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( S ) Sekonder follikül.



Şekil-18: I. deney grubuna ait sekonder folliküllerin genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( S ) Sekonder follikül.



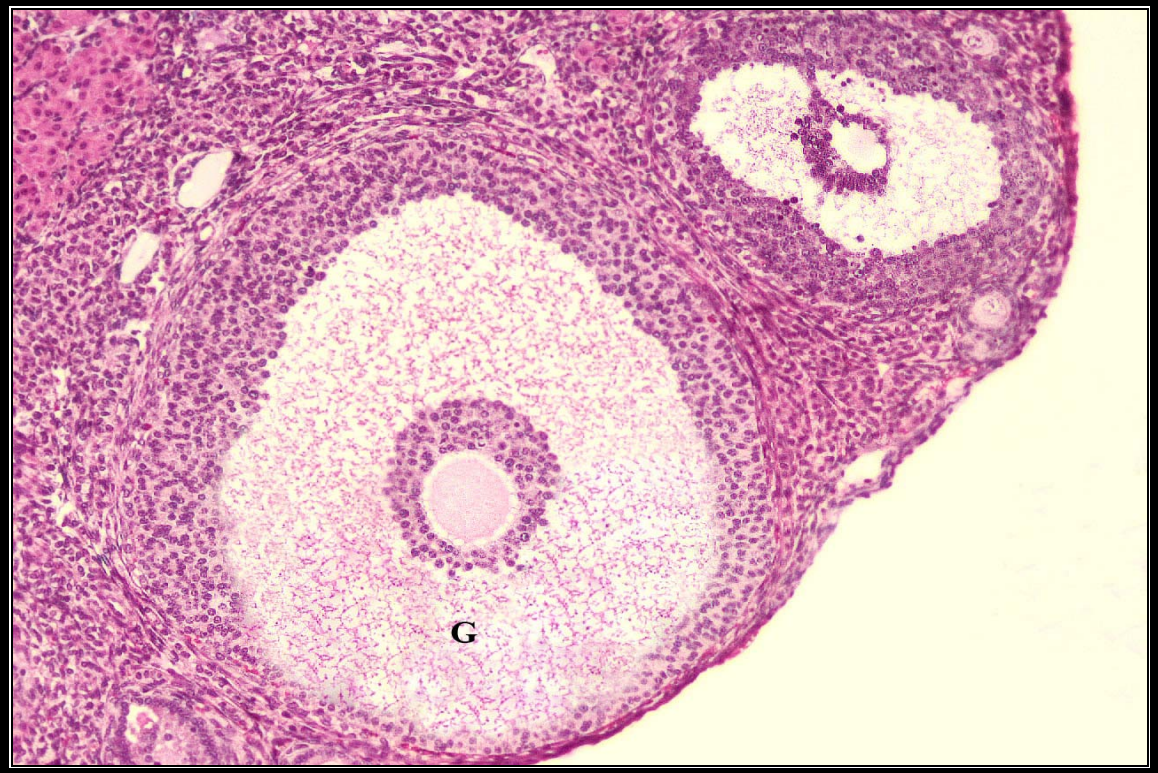
**Şekil-19:** II. deney grubuna ait sekonder follüküllerin genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( S ) Sekonder follükül.



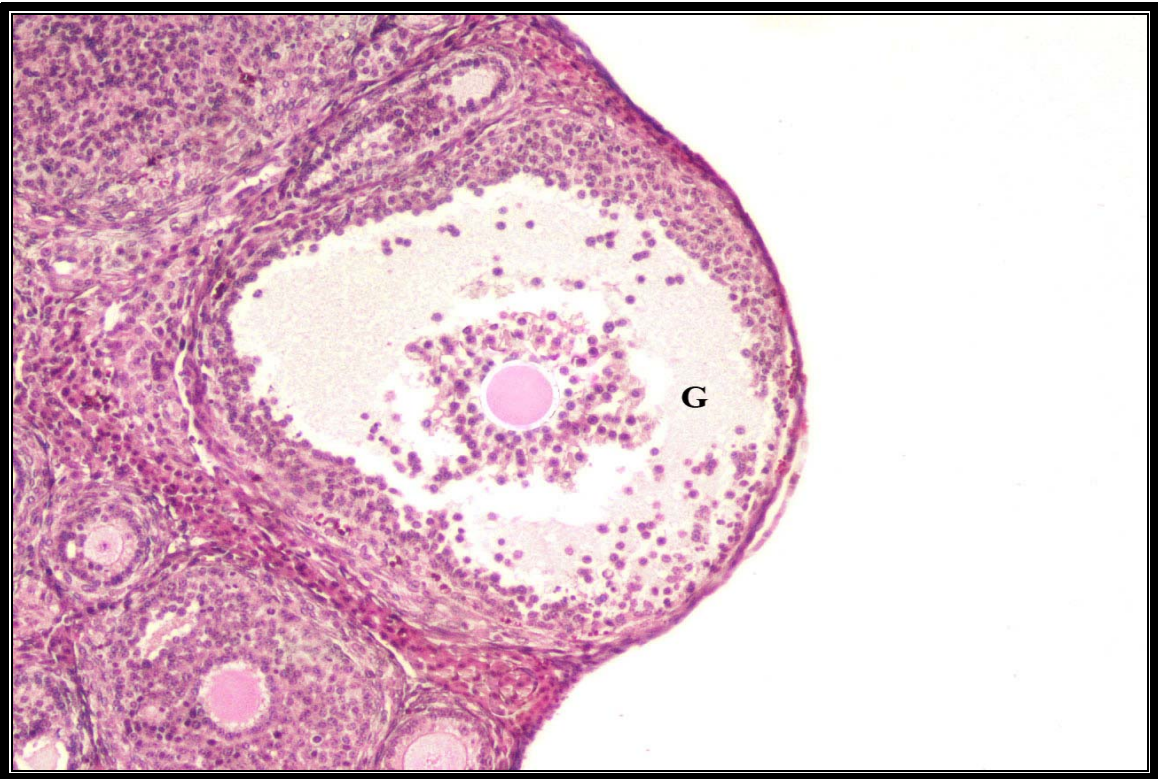
**Şekil-20:** III. deney grubuna ait sekonder follüküllerin genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( S ) Sekonder follükül.



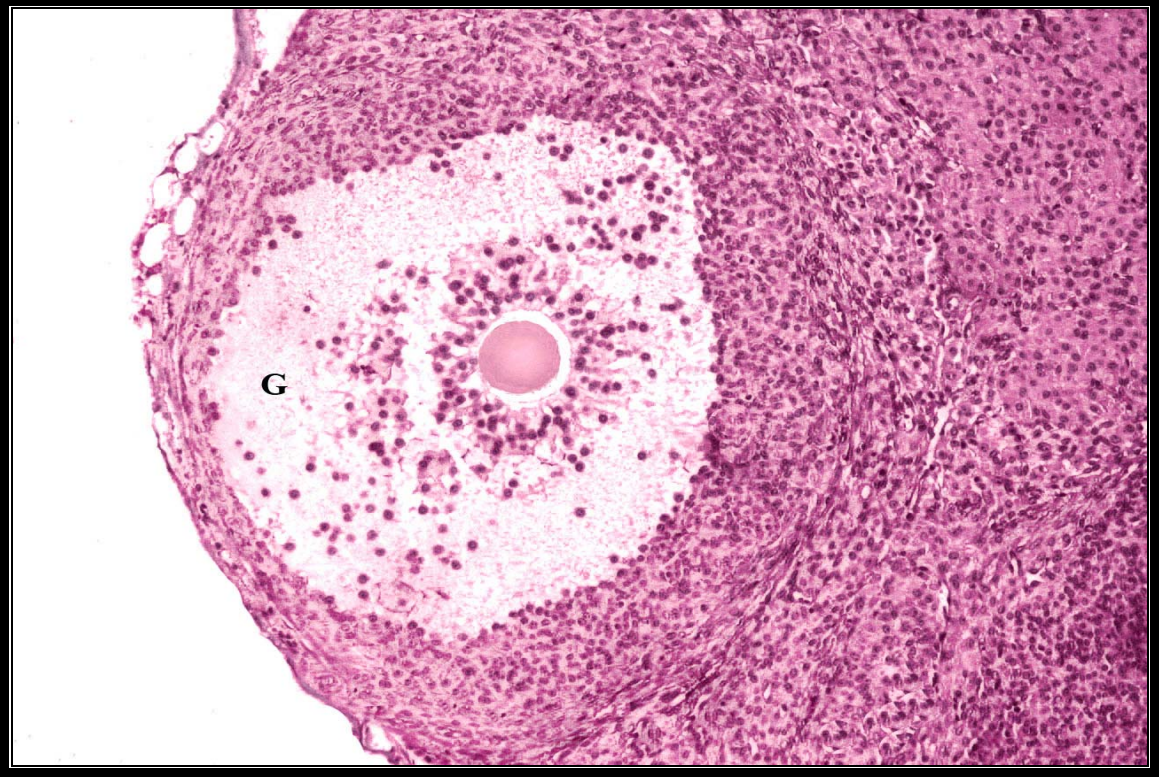
Graaf follikülü ise en az kontrol grubunda olmak üzere sırasıyla artan miktarlarda olmak üzere II., III. ve I. Deney grubunda görüldü (Şekil 21-24).



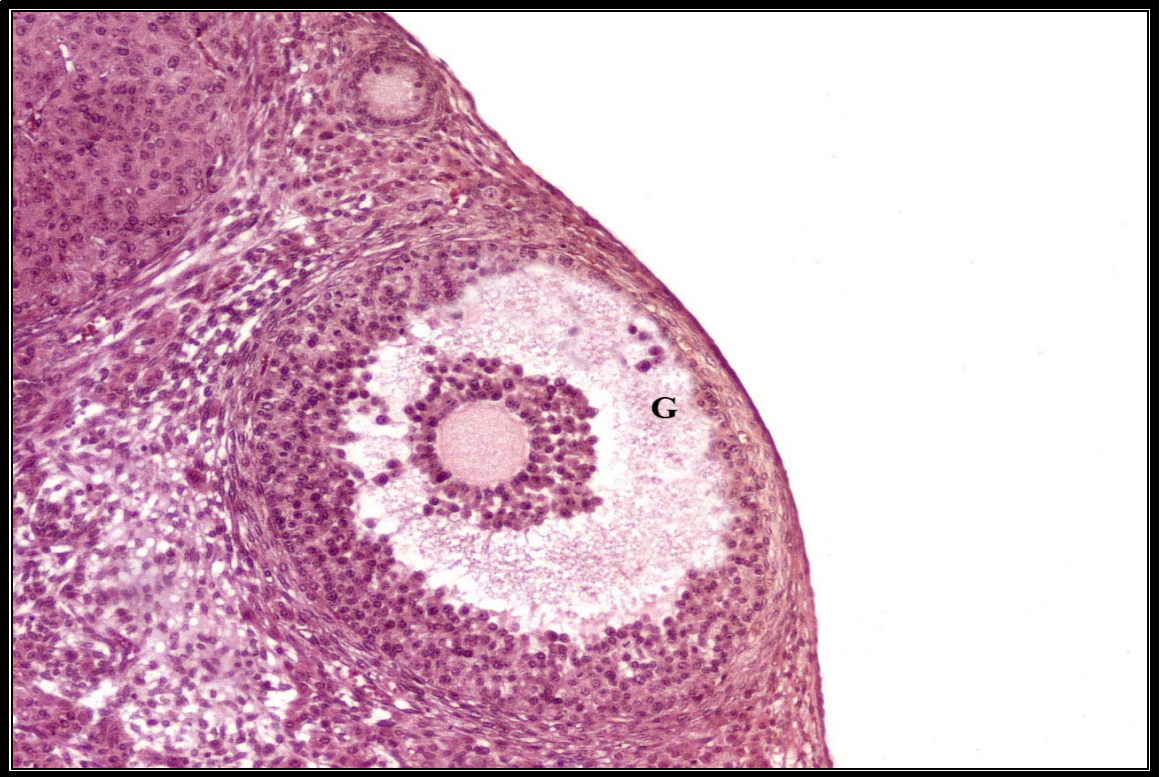
Şekil-21: Kontrol grubuna ait graaf follikülün genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( G ) Graaf follikül.



Şekil-22: I. deney grubuna ait graaf follikülün genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj. ( G ) Graaf follikül.

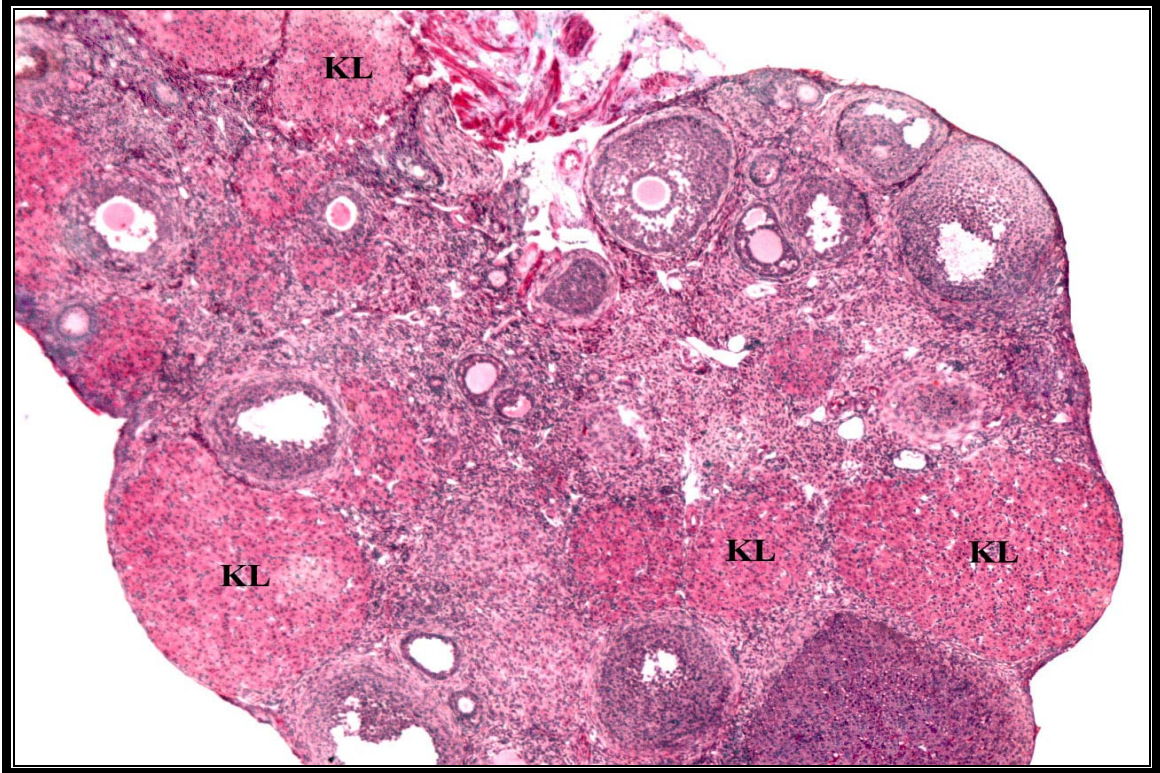


Şekil-23: II.deney grubuna ait graaf follükülün genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj.  
( G ) Graaf follükül.

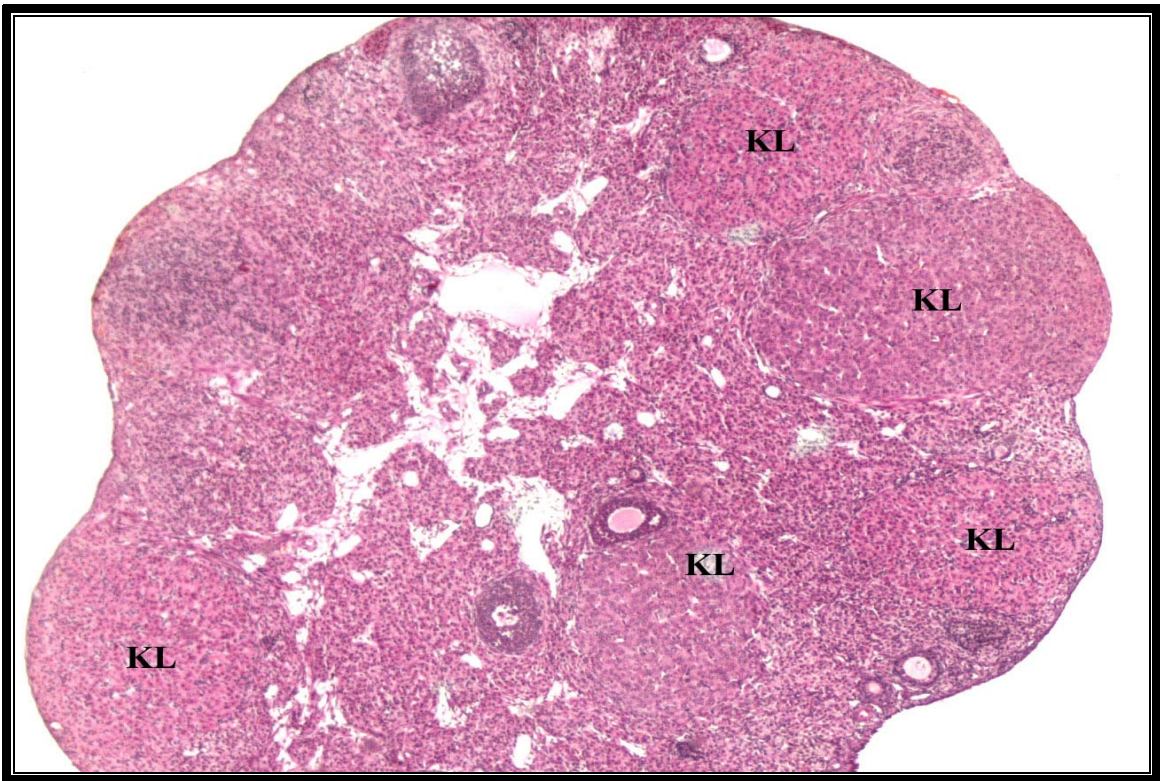


Şekil-24: III.deney grubuna ait graaf follükül genel görünümü. Üçlü boyama, X 10 obj.  
( G ) Graaf follükül.

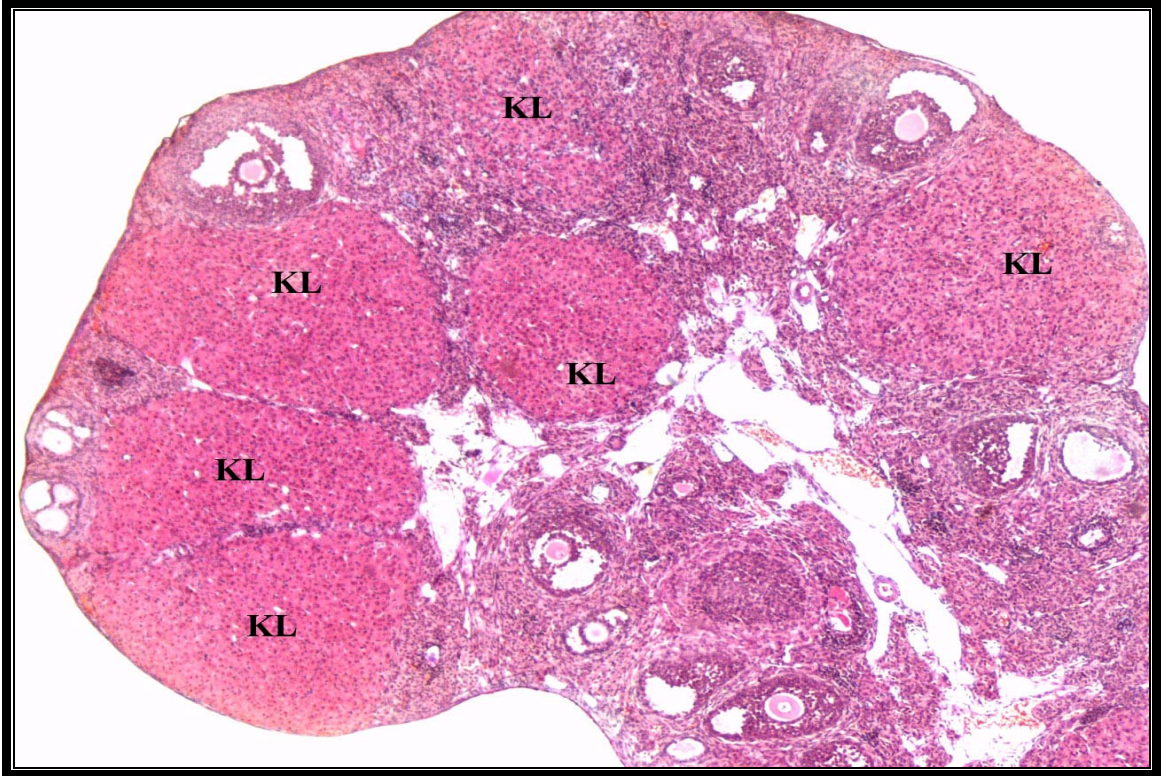
Korpus luteum sayıları en az kontrol grubunda olmak üzere sırasıyla I., II. ve III. deney grubunda arttığı görüldü (Şekil 25-28).



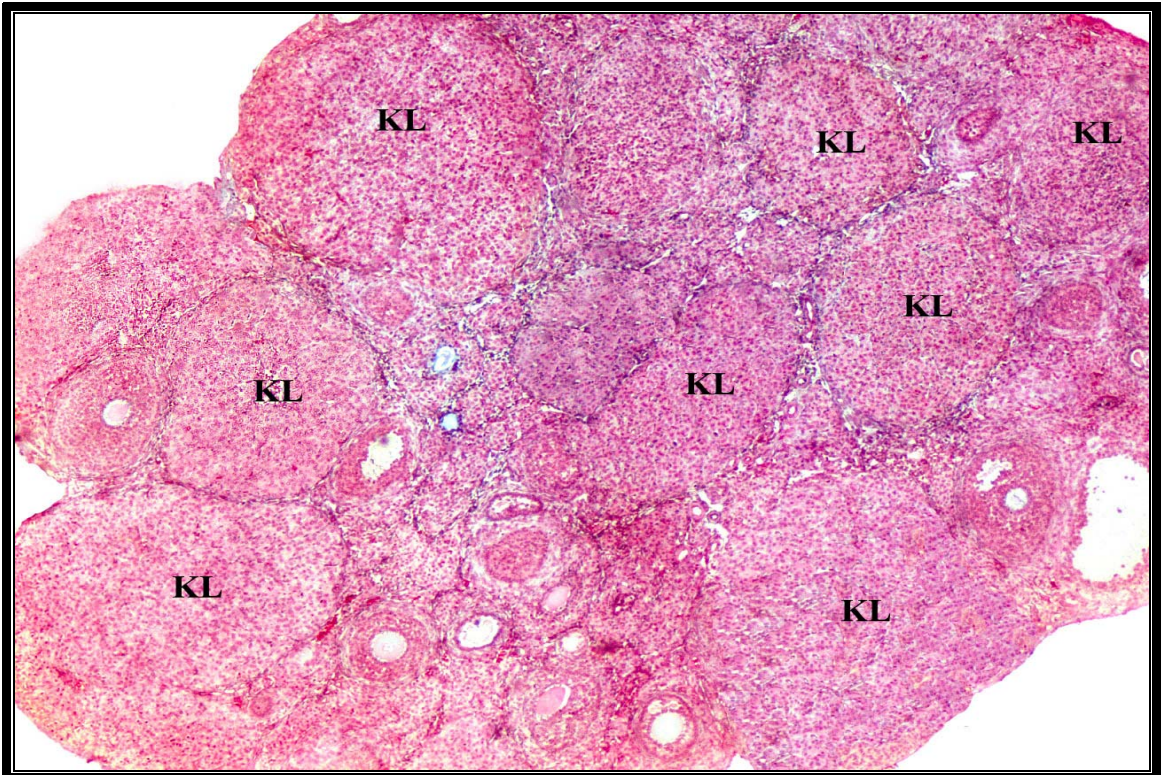
Şekil-25: Kontrol grubuna ait korpus luteumların genel görünümü. Üçlü boyama X4 obj. (KL) Korpus Luteum



Şekil-26: I. deney grubuna ait korpus luteumların genel görünümü. Üçlü boyama X4 obj. (KL) Korpus Luteum



Şekil-27: II. Deney grubuna ait korpus luteumların genel görünümü. Üçlü boyama X4 obj. (KL) Korpus Luteum



Şekil-28: III. Deney grubuna ait korpus luteumların genel görünümü. Üçlü boyama X4 obj. (KL) Korpus Luteum

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Ovaryumdaki folliküllerin gelişmesi, memelilerde üreme fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde vazgeçilmez öneme sahiptir. Folliküllerin gelişmesi sırasında bir yandan döllenme yeteneği olan bir ovosit üretilirken, diğer yandan da üreme sistemine ait diğer organlarda eş zamanlı değişim ve gelişmeler sağlanır (60). IVF uygulamalarının hız kazanmasıyla birlikte ovaryumun hormonal yönden uyarılması Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYTE)'nin vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Ovaryumun uyarılması ile folliküller gelişimin artırılması hedeflenmektedir. Ayrıca hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak elde edilen fazla sayıdaki ovositlerin döllenme şansı da yüksek olacaktır (61, 62). ÜYTE'de süperovulasyon, nesli tükenmekte olan türlerin korunması, transgenезis, nükleer transfer, üreme amaçlı klonlama rejeneratif tıpta ve embriyonik kök hücre üretiminde oldukça önemlidir (62).

Deneyisel çalışmalarda, özellikle üreme, genetik ve birçok araştırma konularında fare, iyi bilinen bir deney hayvanı olup süperovulasyon protokolleri için başarılı bir modeldir (63). Süperovulasyon, follikül gelişimi ve ovosit salınımı için hormon tedavilerini içerir (64, 65). Follikül gelişimini teşvik etmek için kullanılan hormonlar; FSH, PMSG veya HMG'dir (66, 67). PMSG/hCG kombinasyonunun uygulandığı süperovulasyon protokolünün, farenin siklus döneminin her aşamasında folliküler gelişimi ve ovulasyonu uyardığı bilinmektedir (68, 69). Fare soyları ve yaş süperovulasyon protokol sonuçlarını etkileyen önemli faktörler arasındadır (70-72). Genellikle 3-6 haftalık dişilerden maksimum sayıda ovosit elde edilebilmektedir. Fare soyları, süperovulasyon uygulamalarına yüksek seviyede yanıt verenler (30-50 ovosit/fare), düşük seviyede yanıt verenler (<15 ovosit/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 (73). Literatür bilgileri doğrultusunda çalışmamızda 7 haftalık yaşta çok sayıda ovosit elde edilebilen BALB/c soyu dişi fareler kullanıldı.

Süperovulasyon uygulaması ile birden fazla ovosit elde edilmesi hedeflenir. Bu uygulama sayesinde hastaların büyük çoğunluğuna birden çok embriyo aktarılabilir, artan embriyolar süperovulasyon uygulaması yapılmadan tekrar hamilelik elde etmek için dondurularak saklama imkanı da sağlamaktadır (74-77). Bununla birlikte bu yöntem, ovosit olgunlaşmasında, IVF'de, embriyo kültüründe, IVF tedavisi uygulanmış kadına embriyoların aktarılmasında ve implantasyon süreçlerinde yardımcıdır (78). Bu

avantajlarından dolayı IVF'in ilk dönemlerinden beri süperovulasyon uygulaması yöntemi çok önemli bir yer tutmaktadır (79, 80). Çalışmamızda 3 farklı dozda yapmış olduğumuz uygulamaları ile tüm deney gruplarında folliküler gelişimin kontrole oranla daha fazla olduğu görülerek süperovulasyon protokollerinin avantajları birkez daha saptanmıştır.

Lehtonen ve Kankondi (81) gonadotropinlerin intraperitoneal uygulamalarının, subkutan uygulamaya göre anormal ovosit oranını artırdığı bildirilmişlerdir. Bu bulgular ışığında çalışmamızda s.c. uygulama tercih edilmiş olup anormal ovosit görünümü de saptanmamıştır.

Yapılan çalışmalar (79, 80) follikül havuzunda bulunan aktive olmamış folliküllerin aktivasyonunda gonadotropinlerin etkili olabileceğini göstermiştir. İnsan FSH reseptörünün mRNA'sı sadece primer follikül aşamasından sonra olan gelişim aşamalarında görülür (82). Aktive olmuş follikül grubu içinde tek bir baskın follikül seçiminde folliküler fazdaki FSH'nın azalmasının (83) ve LH'nin etkilerinin de çok önemli olduğu bilinmektedir. Erken antral folliküldeki granuloza hücrelerinin sadece FSH'ya cevap vermelerine rağmen olgun folliküllerdeki granuloza hücreleri hem FSH'ya hem de LH'ya cevap verdikleri saptanmıştır. Olgunlaşan follikül LH'ya cevap verebilme özelliği kazandığından dolayı FSH'ya ise bu dönemde daha az bağımlı olduğu bildirilmiştir (84, 85). Çalışmamızda bu bilgiler doğrultusunda uygulanan PMSG enjeksiyonu ile gelişmekte olan folliküllerdeki olgunlaşmayı, devamında hCG enjeksiyonu ile olgunlaşan folliküllerde ovulasyonu arttırmayı hedefledik. Sonuç olarak gelişen follikül 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.

Tarin ve arkadaşları (86) östrus siklusu fazlarını dikkate alınmaksızın yapılan hormon uygulamalarının farelerde ovulasyon oranı ve kalitesi açısından farklılık yaratmadığını bildirmişlerdir. 5 IU PMSG ve 48 saat sonra hCG kullanılan süperovulasyon protokolü ile ovulasyon hCG uygulamasından yaklaşık 11-14 saat sonra gerçekleştiğini saptamışlardır (87, 88). Numazawa ve Kawashima (89) PMSG ve hCG uygulamalarının sadece antral follikülleri artırmakla kalmadığı aynı zamanda bunların gelişmelerini de hızlandırdığı ve büyüme aşamasında olan preantral folliküllerin diğer aşamadaki folliküllere göre daha hızlı gelişim gösterdiğini bildirilmişlerdir. Bu gelişme hızının, östrus siklusu döneminden etkilenmediği Fowler ve Edward (68, 69) tarafından açıklanmıştır. Hazırlanan bu tez çalışmasında farelerin östrus dönemleri dikkate alınmaksızın rastgele seçilmiş deney hayvanlarına uygulanan 3 farklı süperovulasyon protokolü ile gelişmekte ve ovule olan

folliküller değerlendirildi. Uygulanan protokollerin hepsinde de sonuç olarak kontrole oranla folliküler gelişimin ve ovulasyonun arttığı saptandı.

Barnes ve arkadaşları (82) hipofizektomi yapılmış kadınlara dışardan verilen FSH ile follikül gelişimini sağlayarak ovulasyon öncesi aşamaya kadar uyarılabildiğini göstermişlerdir. Stern ve Schuetz (90), süperovulasyon amacı ile gonadotropinle uyarılan farelerde ovositlerin 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 ovosit kanalında ortalama 8.56 ovosit elde edilmiştir. Serum fizyolojik enjekte edilen kontrol grubunda bu oran % 5.5 olup ortalama 7.64 ovosit elde edilmiştir. PMSG ve 48 saat sonra uygulanan hCG ile çiftleşme oranlarına bakıldığında, salınan verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, göze çarpan bir artış olmuştur. Sadece PMSG enjekte edilen hayvanlardaki çiftleşme davranışı serum fizyolojik verilen kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda özellikle korpus luteum, ovule olan ovosit olarak düşünülüp 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 olarakta  $11.30 \pm 1.56$  değeriyle kontrol grubunda saptandı. Bu da bize süperovulasyon amaçlı olarak belli dozlarda arttırdığımız PMSG hormonunun tedaviye olumlu yönde cevap verdiğini ve artan dozların ovosit oluşumuna pozitif etki sağlayabileceğini göstermektedir.

Estradiol ve progesteron konsantrasyonundaki dengesizliklerin bazı ovositlerde dejeneratif değişimler meydana getirecek fertilizasyonun başarısızlığına neden olabileceği; ayrıca 10 I. U. PMSG enjeksiyonunun kümülsüz ovositlerin oluşumu ile sonuçlanabileceği saptanmıştır (91). Çalışmamızda en yüksek dozun uygulandığı III. deney grubu da dahil olmak üzere kullanılan PMSG dozunun ovaryumda gelişmekte olan folliküllerde ve korpus luteumda patolojik bir görünüm oluşturmamıştır.

Neal ve Challoner (92) puberteye yakın fareler ile yaptıkları çalışmada, PMSG ve hCG uygulamalarına hayvanların % 95'inin süperovulasyon ile yanıt verdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan fareler puberte döneminde olup PMSG ve hCG uygulanan deney grubundaki farelerin tümü süperovulasyona pozitif cevap vermişlerdir.

Neal ve Challoner (92) çalışmalarında, 12, 14, 18, 21, 28, 36, 42 ve 48 günlük yaşlardaki farelere tek doz 4 I.U. hCG ya da 3 I.U. PMSG ve 48 saat sonra 2 I.U. hCG uygulaması yapmışlardır. Tek doz hCG uygulaması ile ovulasyon sağlanmış ve 21.

günden 28.güne aşamalı olarak ovosit sayısının arttığı ve sonra sabit kaldığı, PMSG + hCG uygulaması ile 24. ve 28. günler arasında en üst düzeyde indüklendiği görülmüştür. Hayvanların buna yanıtı yaş ve uygulanan süperovulasyon protokolünün etkili olduğu vurgulanmaktadır. PMSG + hCG kombine uygulamasından sonra hayvanların %90'ında 21. günde ovulasyon görülmüştür. Ovaryumdaki folliküler gelişime yanıt yaş ve uygulamaya bağlı değiştiği saptanmıştır. 42 günlüklerde çok sayıda ovulasyon, korpus luteum ve graaf follikülleri bulunurken teka folliküllerin kan damarı yönünden zengin olduğu görülmüştür. 49 günlüklerin ovaryumlarında intersitisyel doku miktarında artış olmakla birlikte korpus luteumlarında da artış saptanmıştır, ancak graaf folliküllerin 42 günlüklere göre daha az olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda korpus luteum sayısının en az olduğu I. deney grubunda en fazla graaf follikülü saptanmıştır. Ancak II. ve III. deney grupları I. deney grubundan daha fazla korpus luteum içermesine karşın daha az graaf follikülü saptanmıştır. Sonuç olarak araştırmamızda kullanılan gonadotropinin dozuna bağlı olarak folliküler gelişim ve ovulasyon hızının etkilendiği görülmüştür.

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. Ayrıca kontrol ve deney grupları, ovaryum ağırlıklarına göre kıyaslandığında, deney gruplarında istatistiki olarak önem gösteren belirgin bir artış saptanmıştır. Çalışmamızdaki bulgulara paralel olarak Neal ve Challoner (92) uygulanan gonadotropinlerin dozuna bağlı olarak antral folliküllerin ve eş zamanlı olarak ovaryum ağırlığının kademeli olarak arttığını bildirmişlerdir.

Rachael Pasco ve arkadaşları (71) Spindy farelerinin diğer sıçan ve fare türleriyle kıyaslandığında uzun östrus döngüleri (11 gün), uzun gebelik süreleri (39 gün) ve ortalama 3 yavru doğurma özelliklerini değiştirmek ve normal ovulasyon oranını 5 kat artırmak için süperovulasyon protokolünü optimize etmeye çalışmışlardır. Bu farelere 9 saat arayla iki kez 5 I. U. Equine chorionik gonadotropin (eCG) ve takiben 20 I. U. hCG uygulanmıştır. Bu protokol ile %100 başarı elde edilmiş ve  $14.7 \pm 1.5$  oranında embriyolar elde etmişlerdir. Histolojik incelemelerinde ovaryumların büyük kısmında korpus luteum ve geç ovule olan folliküller görülmüştür. J. Martin-Coello ve arkadaşları (72), 4 haftalık *Mus musculus*, *Mus spretus* ve *Mus spicilegus* üç ayrı türdeki fareler ile süperovulasyon koşullarını ve *in vitro* ovosit maturasyon ile çok sayıda ovosit toplayıp IVF için ovositlerin kalitesini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Bu üç türe 5 I.U. PMSG ve 48 saat sonrasında 5 I.U.



hCG uygulamasından 14 saat sonra da ovositler toplanmıştır. *Mus musculus* ( $18 \pm 1.3$  ovosit/fare) ve *Mus spretus* ( $12 \pm 0.8$  ovosit/fare) en iyi yanıt veren türler iken *Mus spicilegus* da ovulasyon meydana gelmemiştir. Yine PMSG/LH uygulaması *Mus musculus* ( $19 \pm 1.2$ ) ve *Mus spretus* ( $12 \pm 1.1$ ) da iyi sonuçlar verirken, *Mus spicilegus* ( $5 \pm 0.9$ ) iyi sonuç alınamamıştır. Artan dozlarda uygulanan hormonlara aynı şekilde yine her iki fare türünde olumlu sonuçlar alınırken *Mus spicilegus* da yine ovulasyon görülmemiştir. PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra folliküllerden toplanan ovositler *in vitro* maturasyon ile 3 türde de yüksek ovosit verimi sağlanmıştır (*Mus musculus* ( $23 \pm 0.9$ ); *Mus spretus* ( $17 \pm 1.1$ ) ve *Mus spicilegus* ( $10 \pm 0.9$ )). Süperovulasyon ve *in vitro* maturasyonla elde edilen ovositler IVF ile her 3 türde de yüksek oranda fertilizasyonla sonuçlanmıştır. 48 saat ara ile 5 I.U. PMSG ve 5 I.U. hCG enjekte edilen *Mus musculus* ve *Mus spretus* türü farelerde ovositler hCG'den 14 saat sonra toplandığında, sağlıklı sonuçlar elde edilmiştir (76, 77). Çalışmamızda BALB/c soyu farelerde özellikle III. deney grubunda yüksek oranda korpus luteum dolayısıyla ovulasyon saptanmıştır, ancak fertilizasyon yeteneği değerlendirilmemiştir.

Özgüven ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (93) outbred BALB/c farelerde ovosit/preembriyo sayısını ve kalitesini iyileştirmek, artan gonadotropinlerin miktarında dışsal uyarının etkisini araştırmışlardır. Ergenlik öncesi dişilerde artan stimülasyon dozları ovosit sayısının artışıyla sonuçlanmıştır. FSH/LH 20 I.U. uyarımla fare başına 55 ovositle maksimuma sayıya ulaşmıştır ancak yüksek stimülasyon dozları daha fazla ovosit artışına neden olamamıştır. Bizim çalışmamızda ise maksimum korpus luteum sayısı, III. deney grubunda 22 olarak saptanmıştır.

Gerçekleştirdiğimiz tez projesinden elde edilen sonuçlar özetle:

- 7 haftalık yaşta çok sayıda ovosit elde edilebilen BALB/c soyu dişi farelere 3 farklı dozda uygulanan süperovulasyon protokolleri ile tüm deney gruplarında folliküler gelişimin kontrole oranla daha fazla olduğu görüldü.
- Subkutan uygulama tercih edilmiş olup anormal ovosit görünümü saptanmadı.
- Gelişen follikül 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 folliküler gelişimin ve ovulasyonun arttığı saptandı.

Sonuç olarak hazırlanan bu tez çalışmasında en çok korpus luteum oluşununun saptandığı III. 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 verildi.

## KAYNAKLAR

1. PINCUS G, ENZMANN EV. Can mammalian eggs undergo normal development *in vitro*? Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 20: 121-122, 1934.
2. EDWARDS RG, BAVISTER BD, STEPTOE PC. Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. Nature, 221: 632-635, 1969.
3. STEPTOE PC and EDWARDS RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. The Lancet, 1 (7965): 880-882, 1976.
4. STEPTOE PC and EDWARDS RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. The Lancet, 2 (8085): 366, 1978.
5. ASCH RH, ELLSWORTH LR, BALMACEDA JP, WONG PC. Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. The Lancet, 2 (8410): 1034-1035, 1984.
6. DEVROEY P, BRAECKMANS P, SMITZ J, VAN WAESBERGHE L, WISANTO A, VAN STEIRTEGHEM A, HEYTENS L, CAMU F. Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. The Lancet, 1 (8493): 1329, 1986.
7. PALERMO G, JORIS H, DEVROY P, VAN STEIRTEGHEM AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. The Lancet, 340 (8810): 17-18, 1992.
8. TROUNSON A, MOHR L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature, 305 (5936): 707-709, 1983.
9. BONGSO A. Handbook on Blastocyst Culture. First edition, National University of Singapore, page 13-21, 1999.
10. GÜRER F. *In Vivo ve In Vitro Koşullarda Ovosit Maturasyonu*. Editör: HASSA H. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları. 1. Baskı, Osmangazi Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, sayfa 229-240, 2003.
11. CIESLAK J, IVAKHNENKO V, WOLF G, SHELEG S, VERLINSKY Y. Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. Fertility Sterility, 71 (2): 308-313, 1999.
12. WURFEL W. How to improve results in assisted reproduction Technology, Medifact publ., Londra, sayfa 51-79, 2003.
13. FAIR T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Animal Reproduction Science, 78 (3-4): 203-216, 2003.
14. Mc DONALD LE. The pituitary gland. In: LE Mc Donald (Ed), Veterinary Endocrinology and Reproduction, Lea & Febiger, Philadelphia, 1980.

15. PINEDA MH, BOWEN RA. Embryo transfer in domestic animals. In: LE Mc Donald (Ed), Veterinary Endocrinology and Reproduction, Lea & Febiger, Philadelphia, 1980.
16. YOSHIMURA Y, HOSOI Y, ATLAS SJ, DHARMARAJAN AM, ADACHI T, WALLACH EE. Effect of the exposure of intro follicular oocytes to clomiphene citrate on prefnancy outcome in the rabbits. Fertility Sterility, 50 (1): 153-158, 1988.
17. GOTTSCHALK A. Glycoproteins, 2nd edition, Elseiver Publishing Company, Amsterdam, 5: 1972.
18. YAVUZ Ö. Glikoproteinler ve biyomedikal önemi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 21: 517-522, 2001.
19. HEDRICK JL. Comparative structural and antigenic properties of zona pellucida glycoproteins. Journal of Reproduction Fertility Supplement, 50: 9-17, 1996.
20. AL-SHEBAILY MM. Evaluation of the effects of pregynl on pituitary-ovarian hormones and biochemical markers of tissue injury in female Swiss albino mice. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 105 (1-2): 155-171, 1999.
21. TEKELİOĞLU M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme, Antıp AŞ yayınları, Ankara, sayfa 215-229, 2002.
22. GÖVSA F. Sistematik Anatomi, Güven Kitapevi, İzmir, 2003.
23. TANYOLAÇ A. Özel Histoloji, Yorum yayıncılık, Ankara, sayfa 144-157, 1999.
24. GİRĞİN A, ALABAY B, LİMAN N, ÖZFİLİZ N, GÜLMEZ N, ÖZCAN Z, YÖRÜK M, ERDOST H, ASLAN Ş, ERGÜN L, ZİK B. Veteriner Özel Histoloji, Editör: ÖZER A, 2. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, sayfa 219-231, 2010.
25. YOUNG B, HEATH JW. Wheater's Functional Histology a Text and Colour Atlas, Copyright Licensing Agency Ltd, London, page 341-348, 2000.
26. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, KELLEY RO. Basic Histology (Temel Histoloji). Çeviren: AYTEKİN Y. Barış Kitabevi, İstanbul, sayfa 423-431, 1998.
27. FAIR T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Animal Reproduction Science, 78 (3-4): 203-216, 2003.
28. HIMELSTEIN-BRAW R, BYSKOV AG, PETERS H, FABER M. Follicular atresia in the infant human ovary. Journal Reproduction Fertility, 46 (1): 55-59, 1976.
29. Mc GEE EA and HSUEH AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocrine Reviews, 21 (2): 200-214, 2000.
30. SYROP CH, WILLHOITE A and VAN VOORHIS BJ. Ovarian volume: a novel outcome predictor for assisted reproduction. Fertility Sterility, 64 (6): 1167-1171, 1995.

- 31.** SCHEFFER GJ, BROEKMANS FJ, DORLAND M, HABBEMA JD, LOOMAN CW. Te VELDE ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertility Sterility*, 72 (5): 845-851, 1999.
- 32.** SYROP CH, DAWSON JD, HUSMAN KJ, SPARKS AE, VAN VOORHIS BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Human Reproduction*, 14 (7): 1752-1756, 1999.
- 33.** GUYTON AC, HALL JE. Textbook of medical physiology (Tıbbi fizyoloji). Çeviren: ÇAVUŞOĞLU HA, 10. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, sayfa 929-939, 2001.
- 34.** HALL JE, SCHOENFELD DA, MARTIN KA, CROWLEY WF JR. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 74 (3): 600-607, 1992.
- 35.** LE NESTOUR E, MARRAOUI J, LAHLOU N, ROGER M, De ZIEGLER D, BOUCHARD P. Role of estradiol in the rise in follicle-stimulating hormone levels during the luteal-follicular transition. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77 (2): 439-442, 1993.
- 36.** SOCIE G, SALOOJA N, COHEN A, ROVELLI A, CARRERAS E, LOCASCIULLI A, KORTHOFF E, WEIS J, LEVY V, TICHELLI A. Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 101: 3373-3385, 2003.
- 37.** STOUFFER RL, ZELINSKI-WOOTEN MB. Overriding follicle selection in controlled ovarian stimulation protocols: Quality vs quantity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2 (32): 1-12, 2004.
- 38.** DELİLBAŞI L. In vitro fertilizasyon laboratuvar yöntemleri, 1. Baskı, Güneş Tıp Kitapevi, Ankara, sayfa 1-125, 2008.
- 39.** BAĞIŞ H, ARAT S, ODAMAN H, SAĞIRKAYA H. Yardımcı Üreme Teknikleri ve Transgenik Hayvan Üretiminde Kullanılan Yöntemler, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, sayfa 16-47, 2005.
- 40.** AUSTIN CR, SHORT RV. *Hormonal Control of Reproduction*, Cambridge University Pres, Second edition, page 91-114, 1986.
- 41.** LAUFER N, De CHERNEY AH, HASELTINE FP, POLAN ML, MEZER HC, DLUGI AM, SWEENEY D, NERO F, NAFTOLIN F. The use of high-dose human menopausal gonadotropin in an *in vitro* fertilization program. *Fertility Sterility*, 40 (6): 734-741, 1983.
- 42.** WORTHAM JW JR, VEECK LL, WITMYER J, SANDOW BA, JONES HW JR. Vital initiation of pregnancy (VIP) using human menopausal gonadotropin and human chorionic gonadotropin ovulation induction: phase II-1981. *Fertility Sterility*, 40 (2): 170-177, 1983.

- 43.** STOKMAN PG, De LEEUW R, VAN DEN WIJNGAARD HA, KLOOSTERBOER HJ, VEMER HM, SANDERS AL. Human chorionic gonadotropin in commercial human menopausal gonadotropin preparations. *Fertility Sterility*, 60 (1): 175-178, 1993.
- 44.** LUNENFELD B. Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Human Reproduction Update*, 10 (6): 453-467, 2004.
- 45.** FAUSER BC. Developments in human recombinant follicle stimulating hormone technology: are we going in the right direction? *Human Reproduction*, 13 Suppl 3: 36-46, 1998.
- 46.** KEENE JL, MATZUK MM, OTANI T, FAUSER BC, GALWAY AB, HSUEH AJ, BOIME I. Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (9): 4769-4775, 1989.
- 47.** KEENE, JL, MATZUK MM, OTANI T, FAUSER B, GALWAY AB, HSUEH AJW, BOIME I. Expression of recombinant human choriogonadotropin in Chinese hamster ovary glycosylation mutants. *The Journal of Biological Chemistry and Molecular Biology*, 264 (9): 4769-4775, 1989.
- 48.** DONDERWINKEL PF, SCHOOT DC, COELINGH BENNINK HJ, FAUSER BC. Pregnancy after induction of ovulation with recombinant human FSH in polycystic ovary syndrome. *The Lancet*, 340 (8825): 983, 1992.
- 49.** DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEM A, MANNAERTS B, COELINGH BENNINK H. First singleton term birth after ovarian superovulation with rhFSH. *The Lancet*, 340 (8827): 1108-1109, 1992.
- 50.** GERMOND M, DESSOLE S, SENN A, LOUMAYE E, HOWLES C, BELTRAMI V. Successful in-vitro fertilisation and embryo transfer after treatment with recombinant human FSH. *The Lancet*, 339 (8802): 1170-1171, 1992.
- 51.** The European Recombinant Human LH Study Group. Recombinant human luteinizing hormone (LH) to support recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced follicular development in LH- and FSH-deficient anovulatory women: a dose-finding study. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 83 (5): 1507-1514, 1998.
- 52.** The European Recombinant Human LH Study Group. Human recombinant luteinizing hormone is as effective as, but safer than, urinary human chorionic gonadotropin in inducing final follicular maturation and ovulation in *in vitro* fertilization procedures: results of a multicenter double-blind study. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 86 (6): 2607-2618, 2001.
- 53.** International Recombinant Human Chorionic Gonadotropin Study Group. Induction of ovulation in World Health Organization group II anovulatory women undergoing follicular stimulation with recombinant human folliclestimulating hormone: a comparison of recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) and urinary hCG. *Fertility Sterility*, 75 (6): 1111-1118, 2001.

- 54.** AL-INANY H, ABOULGHAR MA, MANSOUR RT, PROCTOR M. Recombinant versus urinary gonadotrophins for triggering ovulation in assisted conception. *Human Reproduction*, 20 (8): 2061-2073, 2005.
- 55.** NG EH, LAU EY, YEUNG WS, HO PC. Oocyte and embryo quality in patients with excessive ovarian response during *in vitro* fertilization treatment. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*, 20 (5): 186-191, 2003.
- 56.** ZIEBE S, BANGSBØLL S, SCHMIDT KLT, LOFT A, LINDHARD A, NYBOE ANDERSEN AN. Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Human Reproduction*, 19 (6): 1457-1460, 2004.
- 57.** EPPIG JJ, O'BRIEN MJ, PENDOLA FL, WATANABE S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown *in vitro*: follicle-stimulating hormone and insulin. *Biology Reproduction*, 59 (6): 1445-1453, 1998.
- 58.** CROSSMON CA. Modification of Mallory's Connective Tissue Stain with a Discussion of the Principles Involved. *The Anatomical Record*, 69: 33-38, 1937.
- 59.** SÜMBÜLOĞLU K, SÜMBÜLOĞLU U. *Biyoistatistik*, Özdemir Yayıncılık, Ankara, 1994.
- 60.** GREENWALD GS, TERRANOVA PF. Follicular selection and its control, Raven Press Ltd, In: *The Physiology of Reproduction* (Knobil E. et al. Eds), New York, 1988.
- 61.** FAUSER BC and DEVROEY P. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14 (5): 236-242, 2003.
- 62.** OEHNINGER S and HODGEN GD. Induction of ovulation for assisted reproduction programmes. *Baillieres Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 4 (3): 541-573, 1990.
- 63.** NAGY A, GERTSENSTEIN M, VINTERSTEN K, BEHRINGER T. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 14, 2002.
- 64.** GATES AH. Maximizing yield and developmental uniformity of eggs, In: Daniel Jr JC, editor. *Methods in mammalian embryology*, WH Freeman & Co, San Francisco, page 64-76, 1971.
- 65.** BROOKE DA, ORSI NM, AINSCOUGH JFX, HOLWELL SE, MARKHAM AF, COLETTA PL. Human menopausal and pregnant mare serum gonadotrophins in murine superovulation regimens for transgenic applications. *Theriogenology*, 62: 1409–1413, 2007.
- 66.** KANTER M, YILDIZ C, MERAL I, KOÇ A, TAŞAL I. Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. *Theriogenology*, 61 (2-3): 393–398, 2004.

67. NARAI K, ISHINAZAKA T, SUZUKI K, UCHIYAMA H, SATO K, ASANO R, TSUMAGARI S, YUKAWA M, KANAYAMA K. Optimum dose of LH–RH analogue fertirelin acetate for the induction of superovulation in mice. *Experimental Animals*, 54 (1): 97–99, 2005.
68. FOWLER RE, EDWARD RG. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *Journal of Endocrinology*, 15: 374–384, 1957.
69. EDWARD RG, FOWLER RE. Superovulation treatment of adult mice: their subsequent natural fertility and response to further treatment. *Journal of Endocrinology*, 21: 147–154, 1960.
70. McLAREN A and MICHIE D. Superpregnancy in the mouse. I. Implantation and foetal mortality after induced superovulation in females of various ages. *Journal of Experimental Biology*, 36: 281-300, 1958.
71. RACHAEL PASCO A, DAVID K, GARDNER B, DAVID W, WALKER A and DICKINSON H. A superovulation protocol for the spiny Mouse (*Acomys cahirinus*), *Reproduction, Fertility and Development*, 24: 1117–1122, 2012.
72. MARTIN-COELLO J, GONZALEZ R, CRESPO C, GOMENDIO M, ROLDAN ER. Superovulation and *in vitro* oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology*, 70 (6): 1004-1013, 2008.
73. ZUDOVA D, WYROBEK AJ, BISHOP J, MARCHETTI F. Impaired fertility in T-stock female mice after superovulation. *Reproduction*, 128: 573-581, 2004.
74. BAŞAR M, TÜRKER M, İREZ T, ARDA O. Süperovulasyon Protokolünde Kullanılan GnRH Agonistinin Ovosit Olgunluğu ve Çapına Etkileri, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 39 (2): 41-48, 2008.
75. HEIDARI F, SADRKHANLOU R, RASTEGARNIA A and AHMADI A. Effect of Different Protocol of Ovarian Stimulation, with Gonadotrophin on Concentration of Ovarian Hormones. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8 (12), 2429-2431, 2009.
76. TROUNSON A and MOHR L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305 (5936): 707-709, 1983.
77. ZEILMAKER GH, ALBERDA AT, VAN GENT I, RIJKMANS CM, DROGENDIJK AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertility and Sterility*, 42 (2): 293-296, 1984.
78. FAUSER BC, DEVROEY P, YEN SS, GOSDEN R, CROWLEY WF, BAIRD DT, BOUCHARD P. Minimal ovarian stimulation for IVF: appraisal of potential benefits and drawbacks. *Human Reproduction*, 14 (11): 2681-2686, 1999.
79. FLAWS JA, ABBUD R, MANN RJ, NILSON JH, HIRSHFIELD AN. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*, 57 (5): 1233- 1237, 1997.



- 80.** 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. *Biology of Reproduction*, 35(1): 68-73, 1986.
- 81.** LEHTONEN E and KANKONDI R. Rate of gonadotrophin-induced abnormalities in mouse ova is related to the site of hormone administration. *Journal of Reproduction and Fertility*, 80: 613-617, 1987.
- 82.** BARNES RB, NAMNOUM AB, ROSENFELD RL, LAYMAN LC. 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. *Human Reproduction*, 17 (1): 88-91, 2002.
- 83.** VAN SANTBRINK EJ, HOP WC, VAN DESSEL TJ, De JONG FH, FAUSER BC. Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. *Fertility and Sterility*, 64 (1): 37-43, 1995.
- 84.** FILICORI M, COGNIGNI GE, SAMARA A, MELAPPIONI S, PERRI T, CANTELLI B, PARMEGIANI L, PELUSI G, De ALOYSIO D. The use of LH activity to drive folliculogenesis: exploring uncharted territories in ovulation induction. *Human Reproduction Update*, 8 (6): 543-557, 2002.
- 85.** SULLIVAN MW, STEWART-AKERS A, KRASNOW JS, BERGA SL, ZELEZNIK AJ. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84 (1): 228-232, 1999.
- 86.** TARIN JJ, PEREZ-ALBALA S, CANO A. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects the quality of ovulated oocytes in the Mouse. *Molecular Reproduction and Development*, 61: 398-405, 2002.
- 87.** THRASHER JD, CLARK FI, CLARKE DR. Changes in the vaginal epithelial cell cycle in relation to events of the estrous cycle. *Experimental Cell Research*, 45 (1): 232-236, 1967.
- 88.** STOUFFER RL, ZELINSKI-WOOTEN MB. Overriding follicle selection in controlled ovarian stimulation protocols: Quality vs quantity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2: 1-12, 2004.
- 89.** NUMAZAWA A and KAWASHIMA S. Morphometric studies on ovarian follicles and corpora lutea during the oestrus cycle in the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*, 64 (2): 275-283, 1982.
- 90.** STERN S and SCHUERTZ W. Asynchrony of ovulation and mating in mice treated with gonadotropins. *Journal of Reproduction and Fertility*, 23: 257-261, 1970.
- 91.** REDINA OE, AMSTISLAVSKY SY, MAKSIMOVSKY LF. Induction of superovulation in DD mice at different stages of the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102 (2): 263-267, 1994.

- 92.** NEAL P and CHALLONER S. The development of the mouse ovary and its response to exogenous gonadotrophins. *Journal of Reproduction and Fertility*, 45 (3): 449-454, 1975.
- 93.** OZGUNEN KT, ERDOGAN S, MAZMANOGLU N, PAMUK I, LOGOGLU G, OZGUNEN T. Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB/c mice. *Theriogenology*, 56 (3): 435-45, 2001.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması süresince verdikleri destek ve önerilerle bana rehberlik eden değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice ERDOST'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Bilgi birikimlerinden yararlandığım ve desteklerini her zaman hissettiğim Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nesrin ÖZFİLİZ'e, Sayın Prof. Dr. Berrin ZİK'a ve Sayın Yard. Doç. Dr. Cansel G. ÖZGÜDEN AKKOÇ'a çok teşekkür ederim. Başım her sıkıştığında bana zaman ayıran, katkılarıyla destek olan, çalışmalarımın her aşamasında bana zamanını, enerjisini aktarmaktan hiç kaçınmayan ve zaman zaman yaşadığım umutsuzluklarda umut kapılarını açan Sayın Araş. Gör. Dr. Tuncay İLHAN'a ve Laborant Sayın Nesrin SALÇA AKTAŞ'a, arkadaşlıklarıyla hep yanımda olan Sayın Doktora Öğrencileri Sabire PEKER ve Eser İNCE'ye sabırları, katkıları ve varlıkları için çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve olacaklarını bildiğim, sıkıntılarım sıkıntıları, zorluklarım zorlukları olan, birçok şeyle beraber varlığımı borçlu olduğum canım ailem, annem Muhterem PANCAROĞLU ve babam Necati PANCAROĞLU'na ve çıkarsız sevgilerini her zaman yürekten hissettiren ablalarım Berrin ŞİŞMAN ve Hayriye TOPSAKAL'a ve ağabeylerim Hasan ŞİŞMAN ve İhsan TOPSAKAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ve son olarak bana bu tezi yapmamı sağlatan, hayatımın en vazgeçilmez varlığı olan, son bir yılı ondan uzakta geçirsem de varlığını kalbimden bir an bile ayırmadığım biricik kızım Deniz'ime sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Almanya'nın Berlin şehrinde doğdum. İlkokulu Bursa Atatürk İlkokulu'nda, ortaokul ve liseyi Bursa Kız Lisesi'nde tamamladım. 1997 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazanarak 2001 yılında aynı üniversiteden mezun oldum. 2011 yılında Uludağ Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Bir kız çocuğu annesiyim.