

# FARELERDE DEĞİŞİK DOZLARDAKİ PMSG VE HCG UYGULAMALARININ SÜPEROVULASYON ORANI ÜZERİNE ETKİSİ

Şükrü Küplülü<sup>1</sup>  
Rıfat Salmanoğlu<sup>1</sup>

İbrahim Şeviktürk<sup>2</sup>

Rıfat Vural<sup>1</sup>

Ali Bilgili<sup>3</sup>  
Selim Sekkin<sup>4</sup>

## The effect on superovulation rate of different dose of PMSG and hCG injection in mice

**Summary:** *In this study, the effect of different dose of PMSG and hCG on superfolliculation and superovulation in Swiss albino strain mice, 8-9 weeks old was investigated. One hundred mice were used as material they were allotted to five groups according to dose of PMSG and hCG ( twenty mices / group ). Mice in these groups were injected s.c. with 2.5 i.u. ( group I ), 5 i.u. (group II ), 7.5 i.u. ( group III ), 10 i.u. ( group IV ) PMSG followed 48 hour later by 2.5 i.u., 5 i.u., 7,5 i.u., 10 i.u. hCG s.c. to each groups respectively. Controls ( group V ) were injected twice with 0.2 ml saline solution. After the second injection, females were immediately caged overnight with males of the same strain ( 1 male / 4 female ). Corpora lutea, large follicles and hemorrhagic follicles on ovaries, which all females were killed by cervical dislocation, were counted 16-22 h. after hCG injection by removing their reproductive tract with laparatomie. The mean number of corpus luteum in Group I, II, III and IV were  $2.1 \pm 2.83$ ,  $9.5 \pm 4.24$ ,  $10.1 \pm 6.97$ ,  $2.8 \pm 2.41$ ,  $1.75 \pm 2.7$  respectively, the mean number of unovulated follicle for these groups were  $8.3 \pm 3.60$ ,  $25 \pm 7.65$ ,  $34.7 \pm 8.32$ ,  $36.3 \pm 2.56$ ,  $6.15 \pm 3.5$  respectively, the greatest number of hemorrhagic follicle (  $1.5 \pm 2.58$  ) was obtained from group II which had received 5 i.u. PMSG / 5 i.u hCG.*

*The mean number of corpus luteum and unovulated follicle for animals in control group ( Group V ) were  $1.75 \pm 2.7$  and  $6.15 \pm 3.5$  respectively.*

*In conclusion, although the induction of follicular development with PMSG is well in Swiss albino mice, these results show that the expected superovulation response to exogenous hormones is not carry out. The recommended dose of PMSG / hCG for hormonally induced ovulation at this line mices is 5- 7.5 i.u.*

**Key words :** *superovulation, PMSG, hCG, mice.*

<sup>1</sup> Doç.Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup> Aras.Gör., Adnan Menderes Üniversitesi. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı-Aydın.

<sup>3</sup> Doç.Dr. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı-Ankara.

<sup>4</sup> Aras.Gör., Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı-Aydın.

**Özet:** Bu çalışmada, 8-9 haftalık Swiss albino farelerde PMSG ve hCG'nin farklı dozlarının süperfollikülasyon ve süperovulasyon oranı üzerine etkisi araştırıldı. Materyal olarak, 100 adet fare kullanıldı. Fareler eşit sayıda beş gruba ayrıldı. Grup I'e 2.5 i.u., grup II'ye 5 i.u., grup III'e 7.5 i.u., grup IV'e 10 i.u. PMSG deri altı yolla uygulandı. Bu uygulamayı izleyen 48'inci saatte gruplara sırası ile 2.5, 5, 7.5, 10 i.u. hCG enjeksiyonu yapılarak erkek fare katıldı (1 erkek / 4 dişi). Çalışmada, grup V, kontrol grubu olarak ayrıldı ve bu gruptaki hayvanlara deri altı yolla 0.2 ml serum fizyolojik enjekte edildi. Farelere hCG enjeksiyonundan sonraki 16-22'inci saatler arasında laparotomi yapılarak, ovaryumlardaki follikül, korpus luteum ve hemorajik folliküller mikroskop altında sayıldı. Uygulamalar sonrası, I,II,III,IV ve kontrol gruplarında elde edilen ortalama korpus luteum sayısı sırası ile,  $2.1 \pm 2.83$ ,  $9.5 \pm 4.24$ ,  $10.1 \pm 6.97$ ,  $2.8 \pm 2.41$  ve  $1.75 \pm 2.7$ , ovule olmayan ortalama follikül sayısı ise  $8.3 \pm 3.60$ ,  $25 \pm 7.65$ ,  $34.7 \pm 8.32$ ,  $36.3 \pm 2.56$  ve  $6.15 \pm 3.5$  olarak bulundu. Yüksek oranda hemorajik follikül sayısına  $1.5 \pm 2.58$  ile grup II'de rastlandı.

Sonuç olarak; bu hat farelerde, PMSG-hCG uygulamalarının folliküler gelişmeyi uyarmasına rağmen beklenen süperovulasyon yanıtını vermediği ve değişik amaçlarla yapılacak çalışmalarda 5 veya 7.5 i.u. PMSG ve hCG hormon dozunun tercih edilmesinin daha uygun olacağı kanısına varılmıştır.

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

### Giriş

Son yıllarda biyoteknolojik ve genetik çalışmalar, deney hayvanlarından elde edilen oosit ve embriyolar üzerinde de yoğunlaşmaktadır. Oosit ve embriyo elde etmek amacıyla sıklıkla fare, rat, hamster, kobay gibi deney hayvanlarından faydalanılmaktadır.

Bu alanda biyoteknolojik çalışmalar, folliküler gelişmenin uyarılması, daha fazla embriyo elde edilmesi, embriyoların uzun süre saklanması (cryopreservation), embriyonik kültür, şimerik ve transgenik hayvanların üretilmesi ile mikromanüplasyon üzerinde yoğunlaşmaktadır (5, 24).

Embriyo üzerinde yapılacak deneysel çalışmalarda, mümkün olduğunca fazla sayıda oosit elde edilmesi, çalışmada kullanılan deney hayvanlarından tasarruf sağlamaktadır (35). Yaygın olarak kullanılan beyaz laboratuvar fareleri, 58-109 gün arasında pubertasa ulaşmakta ve seksüel siklusları 4-6 gün sürmekte, ovulasyon ise östrüstan 9-10 saat sonra spontan olarak şekillenmektedir. Gebelik süreleri 20 gün olup, bir batında 5-6 yavru vermektedirler (14).

Pubertas öncesi, farelerde primer follikül içindeki oosit I.mayoz bölünmenin profaz saf-

hasındadır. Pubertasa kadar oosit bu özelliğini korur (15). Follikülogenezis süresince oosit 70-80 µm çapa ulaşana kadar, follikül ve oosit birlikte gelişmelerini sürdürürler. Bu dönemde, oosit 4-8 kat granuloza hücreleri ile çevrilidir. Bu aşamadan itibaren, hormonal kontrol altında folliküler sıvıda artış ve granuloza hücrelerinde proliferasyon gözlenir. Oositlerin mayoz bölünmesi, oosit gelişiminin ikinci yarısından itibaren gonadotropinlerden etkilenmez (3,4).

Yapılan sitogenetik çalışmalar, fare oositlerinin % 30'nun bilinenin tamamen tersine bir pronükleus ve bir polar cisimciğin varlığına rağmen, homolog kromozom çiftine sahip olduğunu ortaya koymuştur (18). Bununla bağlantılı olarak, farelerde hem primer hem de sekonder oositler ovule olabilmektedir (31). Bunun sonucu olarak, hem triploidili (primer follikülden) hem de normal diploidili (sekonder follikülden) konseptus gelişimine rastlanabilir. Spontan ovulasyonlarda triploid kromozom yapısına sahip embriyo oranı % 23.6 iken (20), hormonal uyarı verilmiş hayvanlarda bu oran % 47.8 dir (19).

Rat ve farelerde, korpora lutea'nın şekillenmesinde ve devamlılığında, ovulasyon öncesi salgılanan Follikül uyarıcı hormon (FSH) ve

Luteinleştirici hormon (LH) kadar, prolaktinin de önemli rolü vardır. Çiftleşme veya vaginal uyarı ile birlikte prolaktin salınımını durdurucu faktörler (PIF)'in baskılanması sonucu, aktif duruma geçen prolaktin hormonu, korpora luteanın etkin ve yeterli miktarda progesteron sentezlenmesini sağlar (26).

Farelerde folliküler gelişmeyi uyarmak ve ovulasyonu oluşturmak amacıyla çeşitli ilaçlar ve hormonlar kullanılmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) - insan koriyonik gonadotropini (hCG) kombinasyonu ve klomifen sitrat gibi ilaçlardan oldukça iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir ( 7, 8, 10, 17 ).

PMSG ve hCG'nin birlikte uygulamaları sadece antral follikülleri artırmakla kalmaz aynı zamanda bunların gelişmelerini de hızlandırır. Büyüme aşamasında olan preantral folliküller, bir hormonal uyarı durumunda diğer aşamadaki folliküllere göre daha hızlı gelişirler ( 30 ). Bu gelişme hızı, östrus siklusu döneminden etkilenmez (33). Süperovulasyon amacı ile gonadotropinle uyarılan farelerde oositlerin ovulasyonu, iki aşamalı gerçekleşmektedir. Birincisi, PMSG enjeksiyonunu izleyen 20 saat içinde, ikincisi ise PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra uygulanan hCG'ye yanıt olarak gerçekleşmektedir (36).

Pubertasa yakın farelerde, PMSG-hCG uygulamalarına hayvanların % 95'i süperovulasyon ile yanıt vermektedir ( 29 ). Bu hormonal uygulamalar sonrası elde edilen oosit sayısı, kontrol grubunun yaklaşık üç katıdır. Ancak bu oran, kullanılan fare hattına bağlı olarak değişmektedir ( 22 ).

Sunulan çalışma ile, pubertasa ulaşmış 60 günlük Swiss albino farelerde, deri altı, PMSG ve bunu izleyen 48 saat sonra hCG uygulamalarının süperfollikülasyon ve süperovulasyon oranı üzerine etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Hayvan Seçimi :

Çalışmada materyal olarak toplam 100 adet daha önce çiftleşmemiş, 8-9 haftalık Swiss albino fareler kullanıldı. Bu fareler, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olmak üzere eşit ışık periyodu uygulanan bir ortamda tutuldu. Fareler özel hazırlanmış fare yemi ile beslenerek, önleminde su sürekli bulunduruldu.

### Gruplandırma ve hormon uygulamaları :

Fareler, beş gruba ayrılarak ve seksüel siklus dönemlerine bakılmaksızın, deri altı yolla, grup I'e 2.5 i.u., grup II'e 5 i.u., grup III'e 7.5 i.u., grup IV'e 10 i.u. PMSG hormonu ( Folligon, 1000 İ.Ü./ vial, Intervet ), kontrol grubu olan grup V'e ise 0.2 ml fizyolojik tuzlu su enjekte edildi.

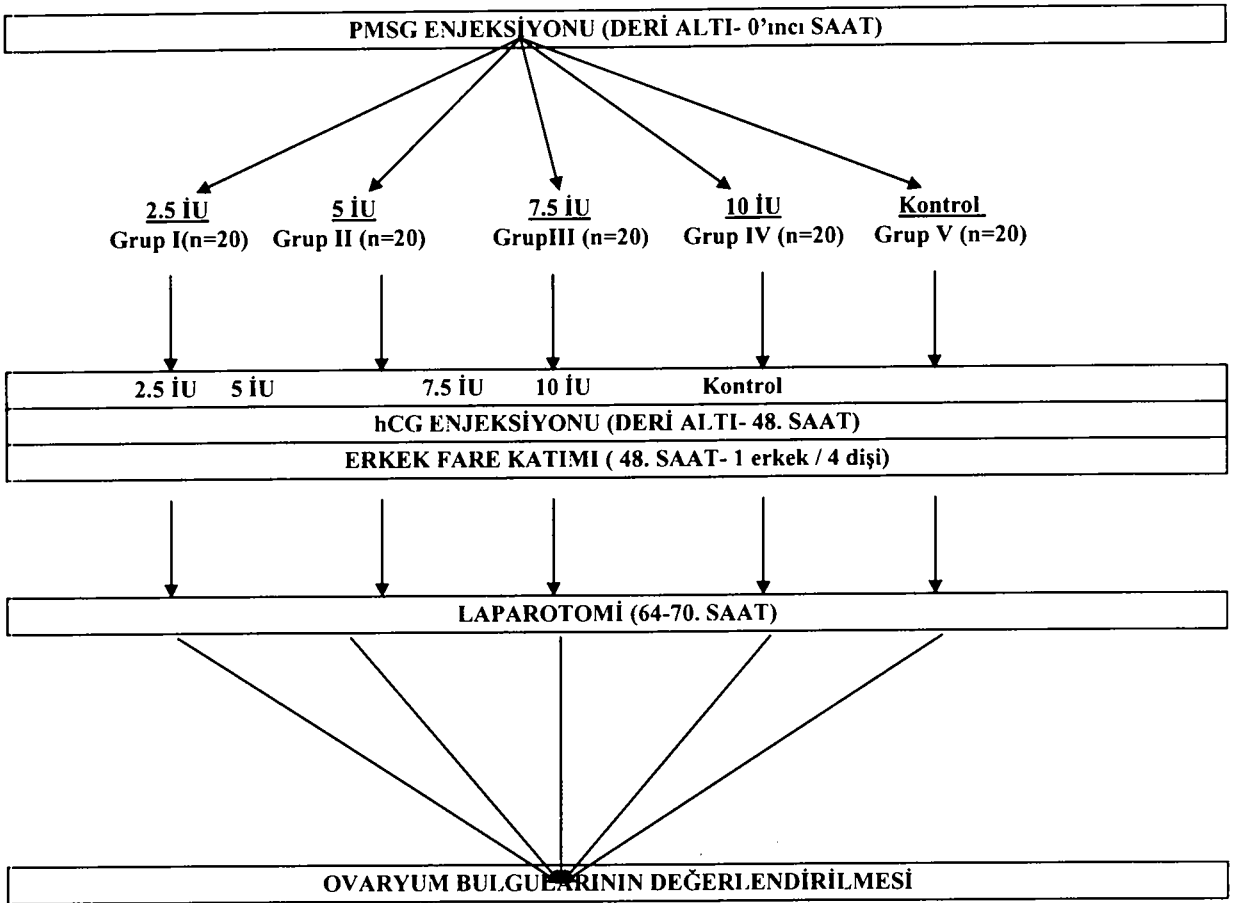
PMSG enjeksiyonunu izleyen 48'inci saatte, uygulama gruplarına, PMSG'nin artan dozuna paralel olarak, I.gruba 2.5 i.u., II. gruba 5 i.u., III. gruba 7.5 i.u., IV. gruba 10 i.u. hCG (Pregnyl, 500İ.Ü /ml, Organon), deri altı yolla enjekte edilirken kontrol grubuna 0.2 ml fizyolojik tuzlu su enjekte edildi.

Tüm çalışma gruplarına hCG uygulamasından hemen sonra erkek fare katıldı (1 erkek / 4 dişi). hCG enjeksiyonunu ve gruplara erkek fare katımını izleyen 16-22'nci saatlerde (çalışmanın başlamasını izleyen 64-70'inci saat), farelere servikal dislokasyon uygulanarak laparotomi yapıldı.

### Ovaryum bulgularının değerlendirilmesi :

Laparotomi sonucu her gruba ait farelerin ovaryumları, faz kontrast stereo mikroskop ( Nikon, HFX ) altında incelemeye alındı. Ovaryumlardaki follikül, korpus luteum ve hemorajik folliküller sayılarak süperfollikülasyon ve süperovulasyon yanıtları değerlendirildi.

Uygulamalar şekil I'de özetlenmiştir.



Şekil I. Gruplara göre uygulama şeması

Fig I. Diagramatic representation of treatment procedure.

### Bulgular

Pubertasa ulaşmış, toplam 100 adet farede artan dozlarda PMSG - hCG uygulamalarını ve erkek fare katımını izleyen 16-22'nci saatler arasında yapılan ovaryum incelemelerinden

elde edilen süperfollikülasyon, korpus luteum ve hemorajik follikül bulguları tablo I'de özetlenmiştir.

Tablo I . Fare ovaryumlarında uygulama ve kontrol gruplarında gözlenen ortalama follikül, korpus luteum ve hemorajik follikül sayısı.

Table I. The mean number of follicle, corpus luteum and haemorrhagic follicle obtained on mice ovaries in treatment and control groups.

Gruplar	Ortalama Follikül Sayısı * (min / max)	Ortalama korpus luteum Sayısı * (min / max)	Ortalama Hemorajik Follikül Sayısı * (min / max)
Grup I ( n=20) 2.5 İ.Ü. PMSG / 2.5 İ.Ü. hCG	8.3 ± 3.60 ( 0 / 14 )	2.1 ± 2.83 ( 0 / 11 )	1.1 ± 2.2 ( 0 / 8 )
Grup II ( n=20) 5 İ.Ü. PMSG / 5 İ.Ü. hCG	25.0 ± 7.65 ( 15 / 38 )	9.5 ± 4.24 ( 0 / 21 )	1.5 ± 2.58 ( 0 / 7 )
Grup III ( n=20) 7.5 İ.Ü. PMSG / 7.5 İ.Ü. hCG	34.7 ± 8.32 ( 0 / 40 )	10.1 ± 6.97 ( 0 / 31 )	0.1 ± 0.36 ( 0 / 1 )
Grup IV ( n=20) 10 İ.Ü. PMSG / 10 İ.Ü. hCG	36.3 ± 2.56 ( 32 / 41 )	2.8 ± 2.41 ( 0 / 10 )	0.1 ± 0.36 ( 0 / 1 )
Grup V ( n=20) Kontrol	6.15 ± 3.5 ( 0 / 9 )	1.75 ± 1.5 ( 0 / 4 )	0.0 ± 0.0 ( 0 / 0 )

\* X ± SD

Foliküler gelişmeyi uyarmak ve ovulasyonu oluşturmak amacıyla 2.5 i.u. PMSG ve 48. saatte 2.5 i.u. hCG uygulanan ve çiftleştirilen grup I'e ait 20 adet farenin ovaryumlarının mikroskopik incelemesinde, ortalama follikül sayısının  $8.3 \pm 3.60$  olduğu, bu grupta maksimum follikül sayısının 14 adede kadar çıktığı belirlenirken, bir olguda folliküler gelişme gözlenemedi. Ortalama korpus luteum sayısı  $2.1 \pm 2.83$ , maksimum korpus luteum sayısı 11, minimum korpus luteum sayısı 0 olarak tesbit edildi. Bu grupta hemorajik follikül sayısı ise, ortalama  $1.1 \pm 2.2$  olarak bulunurken, bireylere göre bu sayının 0-8 adet arasında değiştiği belirlendi.

Deri altı yolla 5 i.u. PMSG ve 5 i.u. hCG uygulanan grup II'de ortalama follikül sayısı  $25.0 \pm 7.65$  olarak tesbit edildi. Bu grupta folliküler gelişmenin en az 15, en çok 38 adet arasında dağılım gösterdiği belirlendi. Ortalama korpus luteum sayısının  $9.5 \pm 4.24$  olduğu ve bu sayının grup içinde 0 ile 21 arasında değiştiği gözlemlendi. Hemorajik follikül sayısı ise ortalama  $1.5 \pm 2.58$  olarak saptanırken, bu sayının 0-7 arasında değişkenlik gösterdiği tesbit edildi.

PMSG ve hCG hormonlarının 7.5 i.u. uygulandığı grup III'de gelişen follikül sayısı ortalama  $34.7 \pm 8.32$  olarak belirlendi. Bu grupta, bir kısım farede elde edilen follikül sayısı 40 adedi bulmasına rağmen, uygulamaya yanıt vermeyen hayvanlar da gözlemlendi. Bu çalışma grubunda, ortalama korpus luteum sayısı  $10.1 \pm 6.97$  bulunurken, bu sayının 0-31 adet arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. Hemorajik follikül sayısı ise ortalama  $0.1 \pm 0.36$  bulundu.

En yüksek dozda PMSG ve hCG hormonu uygulanan ( 10 i.u. PMSG- 10 i.u. hCG ) grup IV'de belirlenen ortalama follikül sayısı  $36.3 \pm 2.56$  olarak bulunurken en düşük ve en yüksek follikül sayısı ise 32-41 arasında değişim gösterdi. Ortalama korpus luteum sayısının  $2.8 \pm 2.41$  bulunduğu ve değişim sınırlarının ise 0-10 arasında olduğu gözlemlendi. Hemorajik follikül sayısı ortalama  $0.1 \pm 0.36$  olarak tesbit edildi. Bu sayı 0-1 arasında değişkenlik gösterdi.

Sadece serum fizyolojik uygulaması yapılan kontrol grubunda, ortalama follikül sayısı  $6.15 \pm 3.5$  olarak en düşük ve en yüksek follikül sayısı 0-9 arasında değişkenlik gösterdi. Ortalama korpus luteum sayısı  $1.75 \pm 1.5$  olarak saptanırken, en düşük ve en yüksek değerler 0-4 arasında bulundu. Bu grupta hemorajik follikül olgusuna rastlanılamamıştır.

### Tartışma ve Sonuç

Farelerde süperovulasyon amacı ile yapılan hormon uygulamaları sonrası ovule olan oosit sayısı, kullanılan fare hattına, hayvanın yaşına ve uygulanan PMSG'nin dozuna bağlıdır (9,27,28,29).

Pakrasi (32), 4 haftalık değişik fare hatlarına (BALB/CByJ, SWISS, BALB outbred), 2.5 i.u. PMSG ve 48 saat sonra 2.5 i.u. hCG uygulamıştır. Bu uygulamalar sonrası elde edilen ortalama embriyo sayısı fare hatlarına göre sırası ile  $7.02 \pm 0.31$ ,  $17.40 \pm 2.35$  ve  $27.49 \pm 4.94$  olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar, elde edilen oosit sayısı farklılıklarını dişilerdeki endojen hormon konsantrasyonundaki farklılığa ve ovaryumun duyarlılığına bağlanabileceğini vurgulamışlardır. Beaumont ve Smith (1), 6-8 haftalık LACA hattı olgun farelere diöstruslarının I'inci günü periton içi yolla 3 i.u. PMSG ve 48 saat sonra 3 i.u. hCG uyguladıkları 22 adet fareyi 15 adet kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Kontrol grubunda ortalama 12.93 korpora lutea elde edilirken, uygulama grubunda bu oran ortalama 44.18 olarak bulunmuştur. Ayrıca uygulama grubundaki farelerin yarısında 40'dan fazla oosit saptamışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar oosit retensiyonunu folliküllerin ovulasyonu ile luteinizasyonun başlama zamanı arasındaki uyum eksikliğine bağlamışlardır. Sunulan çalışmada ise, 2.5 i.u. PMSG ve 2.5 i.u. hCG uygulanan grup I'de ortalama korpus luteum sayısı  $2.1 \pm 2.83$  ve ortalama follikül sayısı  $8.3 \pm 3.60$  bulunmuştur. Çalışmanın kontrol grubu bulgularından farklılık göstermeyen bu değerler, yukarıda belirtilen benzer çalışmaların sonuçlarından oldukça düşük bulunmuştur. Türkiye'de üretilen bu hat farelerde belirtilen dozların folliküler gelişmeyi uyarmada yetersiz kaldığı ve bu farklılığın kul-

lanılan fare hattı ile ilişkili olduğu kanısına varıldı.

Speirs ve Kaufman (35), 8-12 haftalık LT/Sv hattı farelere 5 i.u. PMSG ve 48 saat sonra 5 i.u. hCG uygulamış ve bir grubu ise kontrol olarak tutmuştur. Bu çalışmada kontrol grubunun ovulasyon oranı  $10.00 \pm 0.64$  belirlenirken uygulama grubunun ovulasyon oranı  $16.25 \pm 2.28$  olarak gözlenmiştir. Lehtonen ve Kankondi (22), deri altı yolla 5 i.u. PMSG ve 48 saat sonra benzer dozda hCG uyguladığı farelerden ortalama  $31.6 \pm 7.4$  (18-44 / hayvan başına) ova elde etmişlerdir. Kanayama ve ark.(17), östrus siklusu dönemi dikkate alınmaksızın, 8-9 haftalık- ddy hattı farelere başlangıç dozu olarak 5 İ.Ü. hCG uygulamasını takiben 4 saat aralıklarla 5 kez  $0.025\mu\text{g}$  LH-RH analogu uygulamışlar ve hayvan başına ortalama  $24.1 \pm 1.9$  ovum elde etmişlerdir. Sunulan çalışmada, 5 i.u. PMSG ve 5 i.u. hCG uygulanan grupta ortalama korpus luteum sayısı  $9.5 \pm 4.24$  ve ovule olamayan follikül sayısı  $25.0 \pm 7.65$  olarak saptanmıştır. Bu değerler, Speirs ve Kaufman'ın (35), 8-12 haftalık LT/Sv hattı farelerden elde ettiği sonuçlara yakınlık göstermiştir.

Cosby ve ark.(6), pubertas aşamasındaki 100 adet B6D2-F1 hatlı fareyi ellilerli iki ayrı gruba ayırarak, deri altı yolla, bir gruba 5 i.u., diğer gruba ise 8 i.u. PMSG uygulamış ve PMSG uygulamasını izleyen 48'inci saat gruplara benzer dozlarda hCG enjekte etmişler ve gruplara 1/1 oranında erkek fare katarak son enjeksiyonu izleyen 48'inci saatte fareleri otopsiye almışlardır. Yapılan otopsi sonrası 5 i.u. PMSG-5 i.u. hCG uygulanan grupta elde edilen embriyo sayısı 28.0 iken diğer grupta elde edilen embriyo sayısı 36.9 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar, ovulasyon oranının, çalışmada kullanılan fare hatlarına ve ilacın dozuna bağlı olduğunu vurgulamaktadırlar. Sunulan çalışmada, 7.5 i.u. PMSG ve 7.5 i.u. hCG uygulanan grup III'ten elde edilen ortalama korpus luteum sayısı  $10.1 \pm 6.97$  ve ovule olamayan follikül sayısı  $34.7 \pm 8.32$  olarak belirlenmiştir. Bu grupta elde edilen ortalama korpus luteum sayısı Cosby ve arkadaşlarının (6) elde ettiği sonuçlardan oldukça düşük bulunmuştur. Uygula-

nan PMSG'nin folliküler gelişmeyi diğer çalışmalarla paralel düzeyde uyarmasına rağmen saptanan ovulasyon eksikliğinin ise fare ovaryumlarının LH'ya yeterli yanıt vermemesine bağlandı.

Redina ve ark (34), 10 İ.Ü. PMSG ve 48 saat sonra 10 i.u. hCG uyguladıkları farklı hatta sahip olgun farelerden (DD, ICR, C57B2/6Jycgn, CBA) elde ettikleri oosit sayısı sırası ile  $42.0 \pm 1.5$ ,  $26.4 \pm 3.3$ ,  $7.9 \pm 1.0$  ve  $5.5 \pm 1.2$  olarak bulunmuştur. Ertzeid ve Storeng (10), farelerde gonadotropinlerin, embriyoların implantasyon öncesi ve sonrası gelişmelerine etkisini incelemek amacı ile 7BL/6J/Bam hattı 32 adet fareye 10 i.u. PMSG ve bunu izleyen 48 saat sonra hCG uygulamışlar ve hayvanların gebeliklerinin 2'inci günü 16.2 embriyo elde etmişlerdir. Sunulan çalışmada, 10 i.u. PMSG ve 10 i.u. hCG uygulanan grup IV'den elde edilen ortalama korpus luteum sayısı  $2.8 \pm 2.41$  ve ovule olamayan follikül sayısı ise  $36.3 \pm 2.56$  olarak gözlenmiştir. Çalışmada elde edilen korpus luteum sayısı, kontrol grubu değerlerine ( $1.75 \pm 1.5$ ) ve Redina ve ark. (34)'nın CBA hattı farelerden elde ettiği sonuçlara ( $5.5 \pm 1.2$ ) yakın bulunmuştur.

Uygun koşullarda pubertasa yakın farelerden hormonal uyarı ile ortalama 80 ovum elde edilirken (13), seksüel olgunluğa erişmiş farelerde bu sayı 30-40 adettir (2,12). Seksüel olgunluğa erişmiş farelerden elde edilen ovum sayısının düşük olması değişik nedenlere bağlanmaktadır. Bu nedenler, (i) olgun fare ovaryumunda gonadotropik hormonlara yanıt verme yeteneğine sahip olan büyük follikül sayısının düşük olması (16) ve (ii) araştırmacıların normal östrus siklusundaki endojen değişimler ile gonadotropin uygulama zamanlarının senkronize edilememesi (25) olarak açıklanmaktadır.

Neal ve Challoner (29), farelerde PMSG-hCG uygulamalarına yanıt oranı açısından sağ ve sol ovaryum arasında belirgin bir farklılığın bulunmadığını açıklamışlardır.

Evans ve Armstrong (11), pubertasa yakın Sprague Dawley hattı ratlara deri altı yolla 4, 8,16,24 ve 40 i.u. PMSG uygulamış ve elde ettikleri oosit sayılarını sırası ile  $8.2 \pm 0.3$ , 26.8

$\pm 2.8$ ,  $50.7 \pm 7.8$ ,  $38.7 \pm 4.3$  ve  $30.5 \pm 6.9$  olarak belirlemişlerdir. Bu bulgular doğrultusunda araştırmacılar PMSG'nin belli dozları folliküler gelişme ile birlikte LH benzeri etki gösterirken, yüksek dozlarının ise ovulasyonu geciktirerek follikül içindeki oositlerin yaşlanmasına neden olduğunu açıklamışlardır.

Farklı fare hatlarının değişken ovulasyon oranına sahip olması, genetik açıdan FSH konsantrasyonundaki ve ovaryumun gonadotropinlere duyarlılıklarına bağlanmaktadır (23). Parantral uygulanan gonadotropinlerden, fare hatlarına bağlı olarak farklı yanıtların alınması ise ovaryumların duyarlılığına; diğer bir deyimle ovaryumlardaki gonadotropin reseptörlerinin sayısına bağlanmaktadır (21). Fare hatları üzerinde, canlı ağırlığın ve doğan yavru ağırlığının artırılması amacı ile yapılan seleksiyon çalışmaları parantral uygulanan hormonlara ovaryumun duyarlılığını azaltır (23).

Redina ve ark (34), süperovulasyon amacı ile siklusun proöstrus, östrus ve metaöstrus dönemlerinde PMSG enjeksiyonu yapılan farelerden, diöstrus dönemine göre daha fazla oranda canlı embriyo elde edildiğini açıklamaktadırlar.

Periton içi enjekte edilen PMSG / hCG kombinasyonlarından, derialtı enjekte edilen hormon kombinasyonlarına göre daha fazla oranda oosit elde edilmesine rağmen, elde edilen oositlerin birçoğunun dejener yapıda olması, sıklıkla triploidi olguları ile karşılaşılması ve daha az oranda canlı embriyo elde edilmesi nedeni ile deri altı uygulamalar tercih edilmektedir (22).

Sunulan çalışmada, 8-9 haftalık Swiss albino farelerde ovulasyonu uyarmak amacı ile PMSG ve hCG'nin artan dozlarının uygulanması sonucu elde edilen ovulasyon oranı diğer araştırmacılara ve fare hatlarına göre düşük bulunmuştur.

Tablo I'in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi, bu hat farelerde en yüksek ovulasyon oranı, 5 i.u. PMSG/5 i.u. hCG ve 7.5 i.u. PMSG / 7.5 i.u. hCG uygulanan grup II ve III'den elde edilmiştir. Ancak Ovule olamayan follikül sayısı III'üncü grupta (7.5 i.u. PMSG / 7.5 i.u. hCG) daha yüksek bulundu. 2.5 i.u. PMSG / 2.5

i.u. hCG ve 10 i.u. PMSG / 10 i.u. hCG uygulanan grup I ve IV'de elde edilen ovulasyon oranı diğer uygulama gruplarına göre oldukça düşüktü. Dökmeci ve ark.(8), 5 aylık aynı ırk ve hatta sahip farelerde 2.5 ve 5  $\mu$ gr/gr clomiphene citrate uygulamışlar ve sırası ile elde ettikleri korpus luteum sayısı  $6.0 \pm 1.30$  ve  $5.10 \pm 1.25$ , kontrol grubunda ise bu oran  $10.40 \pm 1.39$  olarak belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada follikülün dejenerasyonunu belirleyen hemorajik folliküllere yüksek oranda II'inci grupta rastlanırken kontrol grubundaki farelerde hemorajik follikül gözlenmedi.

Çalışmada uygulama grubunda ovulasyon oranının düşük ve follikül retensiyonunun yüksek olmasının muhtemel nedenleri olarak, araştırmacıların da belirttiği gibi; (i) kullanılan fare hattı ovaryumlarının dışardan uygulanan hormonlara özellikle hCG'ye yanıtın yetersiz olması, (ii) farelerin seksüel siklusu ile hormon uygulamalarının senkronize olamaması, (iii) uygulama esnasında gelişme aşamasında olan follikül sayısının yetersizliği, (iv) folliküllerin, ovulasyon ile luteinizasyonun başlama zamanı arasındaki uyumsuzluğu, (v) çalışmada pubertas aşamasını geçmiş farelerin kullanılması ve (vi) uygulama sonrası çiftleşme amacı ile sürüye katılan erkek fare sayısının düşüklüğü (1 erkek / 4 dişi) gözönünde bulundurulmalıdır.

Çalışmada uygulama grubunda gözlenen hemorajik folliküllerin şekillenme nedeni olarak, kullanılan PMSG'nin toksik etkisinin rol oynadığı kanısı kuvvetlidir.

Sonuç olarak; bu çalışmada pubertasa ulaşmış, 60 günlük Swiss albino farelerin, süperfollikülasyon ve süperovulasyon amacı ile deri altı yolla PMSG ve hCG uygulamalarının özellikle süperovulasyonun oluşturulmasında istenen yeterli yanıtı vermediği, bu amaçla çalışacaklar için bu ırk farelerde PMSG ve hCG'nin 5 i.u.veya 7.5 i.u. dozlarını tercih etmelerinin daha uygun olacağı kanısına varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Beaumont, H.M. and Smith, A.F. (1975) Embryonic mortality during the pre- and post-implantation periods of pregnancy in mature mice after superovulation. *J Reprod Fert* 45: 437-448.

2. **Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham, D.G. (1971)** *The culture of mouse embryos in vitro*. 86-116. In: J.C. Daniel (Ed.): *Methods in Mammalian Embriology*. Freeman, San Francisco.
3. **Carroll, J., Whittingham, D.G. and Wood, M.J. (1991)** Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. *J Reprod Fert* 93: 71-79.
4. **Carroll, J., Whittingham, D.G. and Wood, M.J., Telfer, E. and Gosden, R.G. (1990)** Extra ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fert* 90: 321-327.
5. **Cheong, H.T., Kanagawa, H. (1993)** Assesment of cytoplasmic effect on the development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated zygotes. *Theriogenology* 39: 451-461.
6. **Cosby, N.C., Chou, K. and Dukelow, W.C. (1989)** Embryo production in B6D2-F1 mice using two superovulating regimens. *Lab Anim Sci* 39: 249-250.
7. **Döcke, F. (1969)** Ovulation-inducing action of clomiphene citrate in the rat. *J Reprod Fert* 18: 135-137.
8. **Dökmeci, F., Teksen, F., Bilgili, A., Izgür, H., Sayli, B.S., Kurtay, G. (1996)** Effects of clomiphene citrate on ovulation, implantation, fetal growth and chromosomes in mice. *Türk J Med Sci* 26: 1-5.
9. **Edwards, R.G., Wilson, E.D. and Fowler, R.E. (1963)** Genetic and hormonal influences on ovulation and implantation in adult mice treated with gonadotrophin. *J Endocr* 26: 389-399.
10. **Ertzeid, G. and Storeng, R. (1992)** Adverse effects of gonadotrophine treatment on pre- and postimplantation development in mice. *J Reprod Fert* 96: 649-655.
11. **Evans, G. and Armstrong, D.T. (1984)** Reduction in fertilisation rate *in vitro* of oocytes from immature rats induced to superovulate. *J Reprod Fert* 70: 131-135.
12. **Fowler, R.E. and Edwards, R.G. (1957)** Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J Endocr* 15: 374-384.
13. **Gates, A.H. (1971)** *Maximizing yield and developmental uniformity of eggs*. 64-75. In: J.C. Daniel (Ed.): *Methods in Mammalian Embriology*. Freeman, San Francisco.
14. **Hafez, E.S.E. (1970)** Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. *Lea & Febiger*, 299-316.
15. **Heller, D.H., Cahill, D.M. and Schultz, R.M. (1981)** Biochemical studies of mammalian oogenesis: metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Devl Biol* 84: 455-464.
16. **Jones, E.C. and Krohn, P.L. (1961)** The relationship between age, number of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice. *J Endocr* 21: 469-495.
17. **Kanayama, K., Endo, T. and Sakuma, Y. (1992)** Superovulation inducement by administration of LH-RH preparation in mice. *Anim Reprod Sci* 29: 319-322.
18. **Kaufman, M.H. (1983)** *Early Mammalian Development : Parthogenetic Studies*. Cambridge University Press, Cambridge.
19. **Kaufman, M.H. and Howlett, S.K. (1986)** The ovulation and activation of primary and secondary oocyte in LT/Sv strain mice. *Gamete Res* 9: 255-264.
20. **Kaufman M.H. and Speirs, S. (1987)** The post-implantation development of spontaneous digynic triploid embryos fertilised *in vitro*. *Development* 101: 383-391.
21. **Land, R.B. and Falconer, D.S. (1969)** Genetic studies of ovulation rate in the mouse. *Genet Res* 13: 25.
22. **Lehtonen, E. and Kankondi R. (1987)** Rate of gonadotrophin-induced abnormalities in mouse ova is related to the site of hormone administration. *J Reprod Fert* 80: 613-617.
23. **Lubritz, D.L., Eisen, E.J. and Robison, O.W (1991)** Effect of selection for litter size and body weight on hormone-induced ovulation rate in mice. *J Anim Sci* 69: 4299-4305
24. **Mazni, O.B., Takahashi, Y., Valdez, C.A., Hishinuma, M. and Kanagawa, H. (1989)** Effects of various cryoprotectants on the survival of mouse embryos cryopreserved by the quick freezing method. *Jpn J Vet Res* 37: 29-39.
25. **McLaren, A. and Michie, D. (1959)** Superpregnancy in the mouse. I. Implantation and foetal mortality after induced superovulation in females of different ages. *J exp Biol* 36 : 281-300
26. **Nalbandov, A.V. (1976)** Reproductive physiology of mammals and birds. Third edition, *Freeman- San Francisco*.
27. **Neal, P. and Baker, T.G. (1974a)** Response of mouse ovaries *in vivo* and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. II. Effect of age. *J Reprod Fert* 37, 399-404.
28. **Neal, P. and Baker, T.G. (1974b)** Response of mouse ovaries *in vivo* and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. III. Effect of age. *J Reprod Fert* 39, 411-414.
29. **Neal, P. and Challoner, S. (1975)** The development of the mouse ovary and its response to exogenous gonadotrophins. *J Reprod Fert* 45: 449-454.
30. **Numazawa, A. and Kawashima, S. (1982)** Morphometric studies on ovarian follicles and corpora lutea during the oestrus cycle in the mouse. *J Reprod Fert* 64 : 275-283.
31. **O' Neill, G.T. , Kaufman, M.H. (1987)** Ovulation and fertilisation of primary and secondary oocyte in LT/Sv strain mice. *Gamete Res* 18:27-36.
32. **Pakrasi, P.L. (1991)** Pre-implantation embryo development in BALB/C ByJ mice. *Indian J exp Biol*. 29: 1091-1094.
33. **Pedersen, T. (1970)** Follicle kinetics in the ovary of the cycle mouse. *Acta Endocrinologica* 64 : 304-323.
34. **Redina, O.E., Amstislavsky, S.Ya., Maksimovsky, L.F. (1994)** Induction of superovulation in DD mice at different stages of the oestrus cycle. *JReprod Fert* 102: 263-267.
35. **Speirs, S. and Kaufman, M.H. (1988)** Effect of exogenous hormones on the ovulation of primary and secondary oocytes in LT/Sv strain mice. *Gamete Res* 21: 179-184.
36. **Stern, S. and Schuetz, W. (1970)** Asynchrony of ovulation and mating in mice treated with gonadotropins. *J Reprod Fert* 23: 257-261.