

## İMMATÜRE DIŞI KOBAYDA SERUM GONADOTROPİNİ İLE OVULASYON OLUŞTURULMASI

Uz. Ecz. Nur Banoğlu (x)

Dr. Hasan Gacar (xx)

Dr. İrfan Erdemli (xxx)

Dr. Hasan Cüce (xxx)

Dr. Nazan Perekli (xxxx)

### ÖZET :

*Çalışmamızda 24 günlük dişi kobaylara değişik dozlarda serum gonadotropini uygulanarak ovulasyon oluşumu incelendi. Tuba uterinalar içindeki ovumlar mikroskop altında sayılarak, uterus ve ovaryum ağırlık farklılıkları saptanarak ovulasyon oluşumu belirlendi. İlaçsız kontrol grubunda ovulasyon görülmedi. PMS uygulanan gruplarda ise uygulanan doza bağlı olarak artan sayıda ovum ile karakterize ovulasyon görüldü. Ovulasyon ile ilgili çalışmalarda denek olarak çeşitli hayvanlar yanında kobayın da kullanılabileceği sonucuna varıldı.*

### GİRİŞ ve AMAÇ :

Çeşitli yayınlarda siçan, fare, tavşan, maymun, hamster, domuz, koyun, kuzu, tavuk, civciv, bıldırcın, güvercin, kurbağa, gibi değişik cins hayvanlarda ilaçla veya mekanik yöntemlerle superovulasyon meydana getirildiği bildirilmektedir. (1,2,3). Reprodüktif fizyolojisi insana en yakın labratuvar memelilerinden biri olduğu halde kobayda bu tür çalışmaların, yok denecek kadar az oluşu araştırmamızın temelini oluşturdu. Ovulasyon ve inhibisyonu konusundaki çalışmalarda kobaydan yararlanabilme derecesini ve etkili serum gonadotropini (PMS) dozunu saptamaya çalıştık.

(x) : Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Uzmanı

(xx) : Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı profesörü ve başkanı

(xxx) : Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Bilim Dalı Y. doçenti

(xxxx) : Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Bilim Dalı doktoru

## GEREÇ ve YÖNTEM :

Çalışmamızda ağırlıkları 90-230 gram arasında değişen 31 adet 24 günlük immatüre dişi kobay kullanıldı. Deneklerin doğdukları gün bir kabul edilerek, saptandı. Numaralandırılarak, anne sütüne ilaveten suni yem, çeşme suyu ve C vitamininden zengin sebzelerle beslendiler. Ayrıca C vitamini uygulaması yapılmadı. Işık periyodu (ortalama 10-12 saat karanlık, 14-12 saat aydınlık) doğal mevsim şartları ile sağlandı. Bakım odalarının ısısının ortalama 20-26°C arasında olmasına dikkat edildi.

Kobaylar 24. günün sabahı saat 8.<sup>00</sup> da ac karnına Ohaus hayvan terazisinin tartıldıktan sonra ilk enjeksiyonlara başlandı. Bu işlem saat 8.30 a kadar tamamlandı.

Denekler şu şekilde gruplandı:

I. GRUP : İLAÇSIZ KONTROL GRUBU : Ağırlık ortalaması 142.4 ± 4.98 (121-170) olan 10 kobaydan oluşan bu gruba sadece serum fizyolojik uygulandı.

II. GRUP : Ağırlık ortalaması 137.3 ± 6.91 (115.5-150.4) olan 5 kobaydan oluşan bu gruba 30 ünite serum gonadotropini (PMS) uygulandı.

III. GRUP : Ağırlık ortalaması 156.1 ± 6.19 (110-230) olan 6 kobaydan oluşan bu gruba 50 ünite PMS uygulandı.

IV. GRUP : Ağırlık ortalaması 154.08 ± 7.03 (171) olan 5 kobaydan oluşan bu gruba 100 ünite PMS Uygulandı.

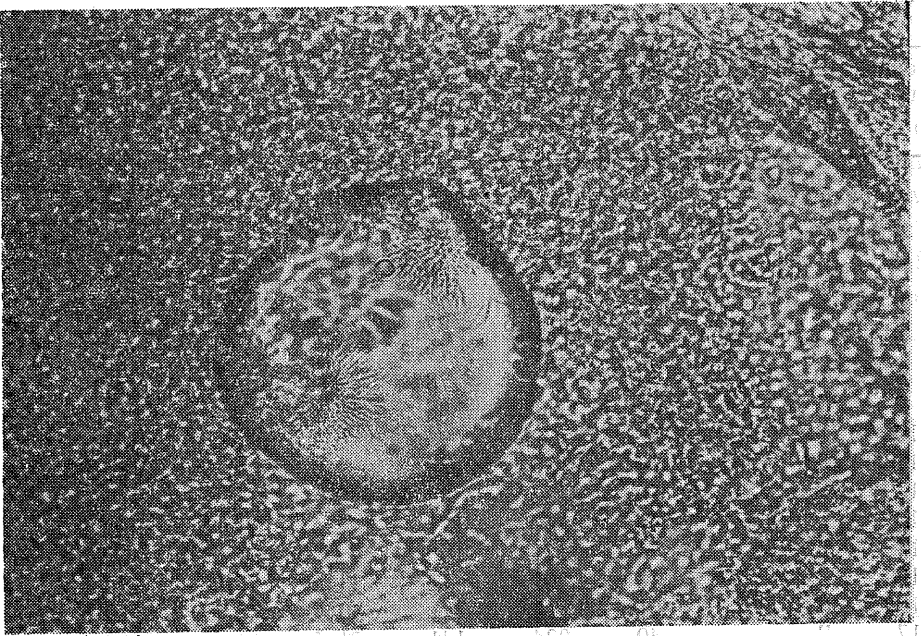
V. GRUP : Ağırlık ortalaması 156.3 ± 16.78 (90-176.8) kobaydan oluşan bu gruba 150 ünite PMS uygulandı.

En küçük doz olarak değişik yayınlarda sıçanlar için ortalama etkili doz olarak belirtilen 30 ünite alındı. Giderek artan dozlarda III, IV, V. gruplara uygulandı. 100 ünitenin maksimum ovulatuvar etkiyi göstermesi 150 ünitenin ovum sayısı açısından 100 üniteye üstünlüğünün olmaması, yüksek dozlara çıkmamıza gereksinim duymadı.

Gerekli PMS dozu 0.1 ml serum fizyolojik içinde eritildi. Tüm uygulamalar gluteal bölgeye deri altı enjeksiyonu yoluyla yapıldı.

Uygulama süresince kobaylar gözlenerek gelişme ve davranış değişimleri ile hormonal aktivitenin dış belirtileri saptandı. Tüm gruplar PMS enjeksiyonuna oranla 72. saate yani 27. gün sabah saat 800 de cerrahi uygulamaya alındı. Bu işlem en geç 830 da tamamlandı.

Eter ile anesteziye edilen kobayların batın orta hattı açılıp genital organlar ortaya çıkarıldı. Uterus, over ve tübalar etrafındaki yağ ve bağ dokusundan mümkün olduğu kadar temizlendikten sonra kesilip çıkarıldılar.



Resim : 1. İki lam arası preparasyonda tek bir ovumun ışık mikroskopunda görünüşü (40x10=400 büyütme).

Bir süzgeç kâğıdı ile hafifçe kurulanıp fazla kan ve doku sıvısı alındıktan sonra Ainsworth marka hassas terazide tartıldılar. Ağırlıkları total gonad ağırlığı olarak nitelendi. Daha sonra uterus uterotubal birleşim yerinden bir bisturi ile kesilip tubalardan ayrıldı. Tartıldı. Overler de tubalardan ayrılarak tartıldılar.

Tuba uterinalar ince iğneler yardımı ile etrafındaki bağ dokusundan temizlenip bir lam üzerine düz bir şekilde yerleştirildi. Üzerine bir başka lam kapatılıp iyice bastırılarak her iki ucundan flasterle birbirine yapıştırıldı. Bu preparat Microstar (seri 10) marka ışık mikroskopunda 40,100 ve 400 büyütmeler altında incelendi. Ovum görülenlerde ovulasyon olduğu saptandı. Ovumlar sayılarak ovum sayısı belirlendi. Belirli bir büyüklük standartlaması yapılamadığından her iki tubadaki irili inceli tüm yumurtalar ovum sayısı kapsamına alındı. Ovum resimleri Olympus Vamox marka mikroskopta Olympus C 35 A kamera ile çekildi.

Ovulasyon tanısında yanılmaya yer bırakmamak için oval ve uterusun seri kesitleri hematoksitlen-eosin ile boyanarak incelendi.

Verilerin değerlendirilmesi varyans analizi metodu ile yapıldı. Muamele ortalamalarının farkına ait önem kontrolleri ise lsd metodu ile yapıldı.

#### BULGULAR :

PMS injeksiyonunu takibedin üç gün süresince kobaylarda iştah artışı, dış genital organlarda gelişme, memelerde vaskülarizasyon artışı saptandı.

Tablo 1. Tüm deneklerin verileri

denek no	PMS dozu ünite	ovulasyon	ovum sayısı	gonad ağırlıkları mg				deney başl. vücut ağırlığı
				total	uterus	ovaryum		
						sağ	sol	
1	Kontrol	—	—	160	97.5	5	5	170
2	"	—	—	148.3	92.5	6	6.5	157.1
3	"	—	—	141	74	7.5	9	150
4	"	—	—	148.5	90.4	6	6	149.2
5	"	—	—	164	99	10	8	148.1
6	"	—	—	160.5	97.9	4.5	5	142.2
7	"	—	—	135	79.3	4.5	4.5	136
8	"	—	—	145	78	3	3	129
9	"	—	—	135.5	88.5	3	3	121.4
10	"	—	—	132	93	6	6	121
11	30	+	14	125	75	9.9	9	150.4
12	"	+	10	124.5	84.5	9.5	7	145.2
13	"	+	14	200	131	12.5	12	142.9
14	"	+	14	161	105	7.5	5.5	132.5
15	"	+	18	101	12	11.5	11.5	115.5
16	50	+	61	314	221	20.5	18	230
17	"	+	40	224	131	21.5	21	200.3
18	"	+	10	193	115	19	19	138
19	"	+	42	198	117	20.5	20	135.8
20	"	+	34	233	177	12	13.5	122.5
21	"	+	1	138	78	8.5	7.5	110
22	100	+	110	230.5	135.5	20	18.5	171
23	"	+	128	277	201	19.5	17	170.1
24	"	+	123	148.5	94	13	8.5	147.2
25	"	+	75	234	149	15	13.5	146.3
26	"	+	76	327.5	214	26	20	176.8
27	150	+	88	327.5	214	26	20	176.8
28	"	+	108	281	163	28	25	175.5
29	"	+	106	333	240.5	24.5	25	174.4
30	"	+	100	259	149	24	18	164.8
31	"	—	—	178	118	11	10.5	90

Tablo 2: Grupların ortalama verileri ve standart hataları

gruplar	n	ovum sayısı	ovulasyon yüzdesi	uterus ağırlığı mg	uterus ağırlığı mg	deney başl. vücut ağırlığı
I. Grup	10	0	0	5.5±0.66	89.01±2.83	142.41±4.98
II. Grup	5	14.0±1.26	%100	10.2±0.91	99.4 ±9.57	137.3 ±6.19
III. Grup	6	31.3±9.07	%100	17.0±2.21	139.83±20.9	156.1 ±19.5
IV. Grup	5	101.2±12.1	%100	19.7±3.12	159.0 ±22.0	154.08±7.03
V. Grup	5	80.4±20.4	%80	22.9±3.04	176.9 ±22.2	156.3 ±16.7
"	4	100.5±4.05	%100			

## 1- PMS nin OVULASYON OLUŞUMUNA VE OVUM SAYISINA ETKİLERİ

PMS uygulanmayan kontrol grubunda ovulasyon oluşmadığı, 30 Ü PMS uygulanan grupta ovulasyon oluştuğu, fakat ovumların çok ince olduğu görüldü. 50 Ü PMS uygulanan grubun tümünde ovulasyon oluştu. Ovumlar genellikle ince olmakla beraber aralarında normallere de rastlanıyordu. 100 Ü PMS uygulanan grupta yüzde yüz oranında ovulasyon oluştuğu, ovumların nisbeten ince olmakla beraber III. gruba oranla normal boydakilerin fazla olduğu görüldü. 150 Ü PMS uygulanan grubun ovulasyon oluşum oranı yüzde seksen olarak saptandı. Tüm grubu ovum sayısı ortalaması 80.4, ovulasyon oluşan 4 deneklik bölümünki ise 100.5 olarak belirlendi.

Tablo 3 : PMS uygulanan grupların ovum sayılarının istatistiksel analizi

gruplar ve ovum sayıları	II. grup	III. grup	V. grup
IV. grup, 101.2	87.2 <sup>x</sup>	69.87 <sup>x</sup>	0.7
V. Grup, 100.5	86.5 <sup>x</sup>	69.17 <sup>x</sup>	
III. Grup, 31.33	17.33		
II. Grup, 14			

x = önemli lsd=25.26 dan büyük değerler önemlidir.

Bulgularımızdan anlaşılacağı gibi 27 günlük dişi koyunda spontan ovulasyon görülmemektedir. Değişik yayınlarda sığan için ortalama ovuluar doz olarak belirtilen 30 Ü PMS ile ovulasyon oluşmakta, fakat ovum sayısı ve gelişimi yetersiz olmaktadır. PMS dozu yükseldikçe ovum sayısı ve ovulasyon oluşumu insidensi artmakta, 100 ünite ile maksimum ovuluar etki sağlanmakta, dozu daha fazla yükselmekte ovum sayısı artmamakta, aksine azalmaya başlamaktadır.

Oluşturulan immatüre ovulasyonda ayrıca, gelişmemiş ve şekil olarak anormal ovum yapım ve salınımının arttığı saptanmıştır.

## 2- PMS nin OVARYUM GELİŞİMİNE ETKİSİ

Kontrol grubunda 5.5 mg olduğu saptanan ovaryum ağırlığının PMS uygulanan gruplarda artarak, II. grupta 10.2 mg, III. grupta 17 mg, IV. grupta 19.7 mg, V. grupta 22.9 mg olduğu görüldü.

Tablo 4 : Grupların ovaryum ağırlık farklılıklarının istatistiksel analizi

Gruplar ve ovaryum ağırlığı	I. grup	II. grup	III. grup	IV. grup
V. grup, 22.9 mg	17.4 <sup>x</sup>	12.7 <sup>x</sup>	5.9 <sup>x</sup>	3.2
IV. grup, 19.7 mg	14.2 <sup>x</sup>	9.2 <sup>x</sup>	2.7	
III. grup, 17 mg	11.5 <sup>x</sup>	6.8 <sup>x</sup>		
II. grup, 10.2 mg	4.7			
I. grup, 5.5 mg				

x = önemli lsd = 5.62 den büyük olanlar önemlidir.

Bulgularımız göstermiştir ki PMS, ovaryumların ağırlığını doza bağlı olarak artırmaktadır. 30 ünite kontrollere oranla önemsiz derecede foliküler matürasyon sağlarken, 50 ünite ile etkin uyarı sağlanmış, doz arttıkça, ovaryum ağırlığı da artmıştır.

### 3- PMS nin UTERUS AĞIRLIĞINA ETKİSİ

Kontrol grubun uterus ağırlığı ortalaması 89.01 mg, II. grubunki 99.4 mg, III. grubunki 139.83 mg, IV. grubunki, 159.8 mg, V. grubunki ise 176.9 mg olarak saptanmıştır.

Tablo 5 : Grupların uterus ağırlık farklılıklarının istatistiksel analizi

gruplar ve uterus ağı.	I. grup	II. grup	III. grup	IV. grup
V. grup, 176.9 mg	78.89 <sup>x</sup>	77.4 <sup>x</sup>	37.07	17.9
IV. grup, 159 mg	60.99 <sup>x</sup>	59.6 <sup>x</sup>	19.17	
III. grup, 139.83	41.82 <sup>x</sup>	40.43 <sup>x</sup>		
II. grup, 99.4 mg	1.39			
I. grup, 89.01 mg				

x = önemli

lsd = 40.20 den büyük değerler önemlidir.

Görüldüğü gibi 30 Ü PMS, kontrollere oranla uterus ağırlığında bir değişiklik yapmamıştır. Doz yükseldikçe önemli derecede ağırlık artışları saptanmış, 50 üniteye oranla 100 ve 150 ünitenin önemli derecede üstünlüğü olmadığı görülmüştür.

### TARTIŞMA :

Çalışmamızda 24 günlük immatüre dişi koyalara PMS uygulandığında ovulasyon oluştuğu, ovaryum ve uterus ağırlıklarında artma olduğu saptandı.

Kontrol grubunda 27. gün spontan ovulasyon görülmedi. Mills ve Reed (4) ile Kalaycı (5,6) da bu bulgumuzu desteklemektedirler.

Yetişkin koyalarda, zamanlama iyi yapılabilirse tek bir doz pürifiye LH veya FSH veyahut gonadotropin injeksiyonu ile süperovulasyon oluşturulabileceğini bildiren Reed ve Hunslow (7), küçük labratuvar memelileri içinde reproduktif fonksiyonlar açısından insana en çok benzeyeni kobaydır, çünkü onun uzun bir östrus siklusu, spontan ovulasyonu, ve aktif sekresyon yapan bir korpus luteumu vardır demektedirler.

İlk kez 1932 de Loeb'in yetişkin koyalara ön hipofizini günlük aşımalar şeklinde uygulayarak immatüre koyalarda ovulasyon oluşturmayı başardığı bildirilmektedir. Daha sonra immatüre sıçanların gonadotropine en hassas deney hayvanı olduğunun belirlenmesi çalışmaların sıçanda yoğunlaşmasına neden

olmuş, ancak yetişkin kobaylarda çalışmalar az da olsa sürdürülmüştür. Çeşitli yayınlarda LH, FSH, PMS, kobay ve koyun ön hipofiz homojenatları ile yetişkin kobaylarda ovulasyon oluşturma mümkün olduğu bildirilmektedir (4,7,8,9).

Yetişkin kobaylarda gonadotropinlerle yapılan çalışmaların yanında son zamanlarda median preoptik area, median bazal hipotalamus ve regia arkuatının elektriki stimülasyonu ile kobay ve sıçanlarda gonadotropin salgılanması sonucu ovulasyon ve östrus olduğu bildirilmektedir (10,11). Quinn (11), elektriki stimülasyonda zamanlamanın iyi yapılmasını, siklusun erken devrelerinde uyarı eşliğinin düşük, ilerlemiş devrelerinde ise yüksek olduğunu bildirmektedir. Donovan ve Lockhart (9), erişkin kobayda gonadotropinlerle superovulasyonun beklenen spontan ovulasyondan en erken sekiz gün önce oluşturulabileceğine, daha erken mümkün olmadığına dikkat çekmektedirler.

Ying ve Meyer (12), 21 günlük dişi sıçanlara bir üniteden başlayarak 80 üniteye kadar, 14 değişik dozda PMS uygulamışlar, 1 üniteye, cevap alamazken, iki üniteye 4.5 ovum ile karakterize minimal cevabı aldıklarını, doz arttıkça ovum sayısının da arttığını bildirmektedirler. 40 Ü PMS ile maksimum cevabı aldıklarını, 40 ve 80 Ü arasında ovulasyonun inhibe olduğunu fakat ovaryum ağırlığının doza bağlı bir şekilde artmaya devam ederek kistik folikül oluştuğunu belirtmektedirler. Bu durum bizim çalışmalarımızda açıkça görülmemekle beraber 150 Ü PMS nin oluşturduğu ovulasyondaki ovum sayısı 100 üniteden fazla olmaması, aksine az da olsa düşüş göstermiştir.

Park ve Zarrow (13), 30 Ü PMS uyguladıkları 24 günlük sıçanlarda 48. saatte ovulasyon görülmediğini, ancak 72. saatte yüzde 83 oranında, ortalama 46 ovum salınımı ile sonuçlanan bir ovulasyon görüldüğünü ki PMS ile sıçanlarda ovulasyon oluşumunun en erken 48-72 saatler arasında görüldüğünü bildirmektedirler.

Mills ve Reed (4), kobayda da aynı süreye gereksinim olduğunu bildirmektedirler. Biz de ön çalışmalarımızda 48. saatte ovulasyon oluşmadığını görerek, 72. saatte cerrahi girişimde bulduk. Maia (14,15), kobayda ovumların salıverildikten sonra yaklaşık bir gün boyunca tuba uterinaların ampullarında kaldığını bildirmektedir. Böylece 72. saatte lameller arası preparasyonda kolayca görülüp sayılması mümkün olmaktadır.

Kobayda puberte oluşumunu inceleyen Mills ve Reed, pubertenin hayvanın yaşından, yani kaç günlük olduğundan ziyade vücut ağırlığına bağlı olduğunu belirtmektedirler. (4) Bu sonuç bizim bulgularımızdaki küçük bir ayrıntıya ışık tutmaktadır. 150 Ü PMS uygulanan bir denekte ovulasyon oluşmazken, 50 Ü PMS uygulanan bir denekte de 1 ovum salındığını saptadık. Bu iki denegin vücut ağırlıkları 90 ve 110 gramdır. Bu iki veri ile genelleme yapmak istememekle birlikte pubertede olduğu gibi immatüre kobayların PMS ye cevabında da vücut ağırlığının önemli olduğunu söylemekte yarar görmekteyiz.

## SUMMARY :

### INDUCTION OF OVULATION IN THE IMMATURE GUINEA -PIG BY PREGNANT MARE SERUM GONADOTROPIN

We investigated the ovulation induced by different doses pregnant mare serum gonadotropin in 24 days old immature female guinea-pig. Ovulation determined by counting the eggs in the tuba uterina under the light microscope and by weighing uterus and ovarium. The ovulation was not seen in the control group. But in PMS treated groups the seen ovulation was depending on the amount of treated dose. As result we concluded that the studies concerning ovulation, the guinea-pig can also be used as other animals.

## TEŞEKKÜR :

Deneylerin laboratuvar aşamasında büyük yardımlarını gördüğüm, başta Yılmaz Yiğit olmak üzere tüm bilim dalmız teknik personeline ve kesitlerimin yapılmasında emeği geçen Histoloji bilim dalı teknisyeni Hüseyin Yazdıncı'ne şükranlarımı sunarım.

## KAYNAKLAR :

- 1- Bell, E.T., Lunn, S.F.: Studies on gonadotropin-induced ovulation in the immature rat. J. Endocr. 41: 171-177, 1968
- 2- Humphrey, R.R., et. al. : Induction of luteinizing hormone (LH) release and ovulation in rats, hamster and rabbits by synthetic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). Endocrinology. 92:1515-1525, 1973.
- 3- Kraiem, Z., Samuels, L.T.: The influence of FSH and FSH+LH on steroidogenic enzymes in the immature mouse ovary. Endocrinology. 65:660-668, 1974.
- 4- Mills, P.G., Reed, M.: The onset of first oestrus in the guinea-pig and the guinea-pig and the effects of gonadotrophins and oestradiol in the immature animal. J. Endocr. 50: 329-337, 1971.
- 5- Kalaycı, Ş.: Kobaylarda overlerin doğumdan ergin devreye kadarki morfolojik gelişimi, Atatürk Üniv. Tıp Bül. V:4 Sayı 15, 1972.
- 6- Kalaycı, Ş.: İmmatür dişi kobaylarda insan chorionic gonadotropininin (HCG) ovaryum gelişmesine etkisi. Cilt : 5 Sayı : 17 1972.
- 7- Reed, M., Hunslow, W.F.: Induction of ovulation in the guinea-pig. J. Endocr. 49: 203-211, 1971.
- 8- Das, R.M., Benson, G.K.: Effect of gonadotrophins on the oestrous cycle in the guinea-pig. J. Endocr. 47: 423-430 1970.



- 9- Donovan, 8.T., Lochard, A.N.: The hormonal induction of ovulation or of luteinization in the intact or hypophysectomized guinea-pig. *J. Endocr.* 60: 285-292, 1974.
- 10- Teresawa, E., Sawyer, C.H.: Electrical and electrohistochemical stimulation of the hypothalamo-adenohypophysial system with stainless steel electrodes. *Endocrinology*, 84: 918-925, 1969.
- 11- Quin, D.L.: Comparative aspects of premature ovulation in the guinea-pig and the rat following electrochemical stimulation of the hypothalamus. *Endocrinology*. 95: 926-929, 1974.
- 12- Zarrow, M.X., Brown-Grant, K.: Inhibition of ovulation in the gonadotrophin-treated immature rat by chlorpromazine *J. Endocrinology*, 30: 87-95, 1964.
- 13- Park, R.K., Zarrow, M.X.: Effect of estradiol on pregnant mare's serum (PMS)-induced ovulation in the immature rat. *Fertil. Steril.* 23:769-775, 1972.
- 14- Maia, H., et. al.: Time course of ovum transport in guinea pigs. *Fertil. Steril.* 28: 863-865, 1977.
- 15- Maia, H., et al.: Pharmacologic modification of the time course of ovum transport in guinea pigs. *Fertil. Steril.* 28: 1361, 1363, 1977.