

T. C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
FİZYOLOJİ BİLİM DALI

80680

FARELERDE DOĞAL VE SENKRONİZE  
MENSTRUAL DÖNGÜNÜN EVRELENDİRİLMESİ

TÜRKİYE  
BİLİMSEL VE TEKNİK  
ARAŞTIRMA KURUMU  
KÜTÜPHANESİ

MASTER TEZİ

Belgin BÜYÜKAKILLI  
Fizyoloji Ana Bilim Dalı  
Araştırma Görevlisi

ULUSLARARASI İLİŞKİLER VE  
DOKÜMANLAMA MERKEZİ

80680

ADANA - 1985

Bağcı, Haziran 1985

## İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREK ve YÖNELER.....	27
BULGULAR.....	35
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	48
ÖZET.....	58
KAYNAKLAR.....	59

## G İ R İ Ő

Hücre gelişme ve diferansiyasyonunun incelenmesi, üreme fizyolojisinin irdelenmesi açısından çok önemli bulgular vermektedir.

Hücre gelişme ve diferansiyasyonunun in situ incelenmesi teknolojik bilgilerin yetersizliği nedeniyle istenilen tüm bilgiyi verememektedir. Çünkü vücuttaki organ ve dokuların çoğu, diferansiyasyonlarını tamamlamış ve sadece bozulan harap olan hücrelerin yerine yenisini yapma yani rejenerasyon yeteneğini sürdürmüşlerdir. Dolayısıyla bu hücre ve dokuların ilk evrelerini izlemek olanaksızdır. Hücre ve dokuların geçirdikleri evrelerin in vitro incelenmesi de istenilen tüm bilgiyi verememektedir. Çünkü bu hücre ve dokuların in vitro kültürü sonucunda, bunlar transforme olmakta ve orjinale yakından uzaktan ilişkisi olmayan bir hücre veya doku kitlesi meydana gelebilmektedir.

Hücre gelişme ve diferansiyasyonunun incelenmesinde zigot, oldukça önemli bir materyaldir. Çünkü zigotun bir hücreli evresinden multipl hücre evresine kadar süren gelişimini izlemek olanağı vardır. İn vitro fertilizasyon teknikleri sayesinde fallop tüplerinden alınan dölllenme yeteneği kazanmış ovum, in vitro ortamda, erkekten alınan sperm ile döllenmektedir ve in vitro ortamda tek hücreden multipl hücreye kadar süren gelişme evreleri izlenebilmektedir.

İn vitro fertilizasyonun başarılabilmesi, bir grup ön çalışmaların tamamlanmasını gerektirmektedir. Bu ön çalışmalar spermin alınması, spermin kapasitasyon işlemleri, ovulasyon zamanının ve bu sırada meydana gelen fonksiyonel ve morfolojik değişikliklerin saptanması, ovumun alın-

ması, in vitro ortamda spermle döllendirilmesi, tekrar anne rahmine nakledilmesi gibi basamakları içermektedir.

İn vitro fertilizasyon teknikleri günümüzde dünyanın birçok ülkelerinde uygulanmaktadır. Ülkemizde henüz in vitro fertilizasyon araştırmaları için gerekli bilgi birikimi olmadığından bu konuda çalışmalar yapılamamaktadır. Kaldı ki in vitro çalışmaların ilk olarak insanda uygulanmasından önce, deney hayvanlarında uygulanması bir zorunluluktur. Literatürlerde in vitro çalışmalarda en sık kullanılan materyaller tavşan, hamster, sıçan ve fare olarak bildirilmektedir (5). Biz bu çalışmada materyal olarak fareyi seçtik.

Çalışmada farenin estrous öncesi ve sonrası evrelerini içeren histolojik bir atlas oluşturulması, estrous senkronizasyonu, vazektomili hayvan oluşturulması, ve böylece in vitro fertilizasyon uygulamasına geçmeden önce gerekli ön çalışmaları tamamlayıp, ülkemizde bu konunun gelişimi için atılan adımlara katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

## G E N E L B İ L G İ L E R

Fare embriyolojik araştırmalarda ve dolayısıyla normal memeli embriyolojisininin daha iyi anlaşılmasında son derece yararlı bir hayvan olarak kabul edilmektedir (19). Ayrıca laboratuvar deneylerinde kolaylıkla kullanılabilen bir memeli embriyosunu, öğrenciye tanıştırmak için de oldukça kullanışlı bir hayvandır (18). Fare dünyanın her yerinde kullanılmakta olup, bakımı ve beslenmesi kolaydır. Farelerin bakımı için yapılan binaların yüzü güneşe dönük, içi yazın sıcak ve kuru olmalı, kışın ısıtılmalıdır (16). Oda sıcaklığı 20-25°C arasında bulunmalıdır. Güneş almalı, havası temizlenebilmesi, zemini kuru, içi aydınlık olmalıdır.

Fareler, galvanize saçtan ve sık delikli kalın tel örgüden yapılmış kafeslerde çok kolay bakılır ve üretilirler (16). Fare kafeslerinin ahşaptan, plastikten ve paslanmaz çelikten yapılan çeşitli tipleri de vardır (18).

Farelerin beslenmesi için kırılmış arpa, buğday, ezilmiş yulaf, çimlendirilmiş tahıl taneleri, su veya yağsız sütle ıslatılmış kuru ekmek ile, yazın salata yaprakları, kışın havuç verilebilir (16). Rugh'a göre yavrular olduğu zaman yulaf ezmesiyle desteklenecek çeşitli sıçan, köpek ve fare yiyecekleri de kullanılabilir (18). Bu yiyecek, genellikle vitaminlerle dengelenir. Farelere verilen içme suyu temiz ve taze olmalıdır. Tercihen şişe ile verilmelidir. Su şişeleri sık sık temizlenmelidir. Rugh'a göre, suyu kendi kendine akıtmayacak cam veya paslanmaz çelik bir tüpe sahip olan bir şişe ile su devamlı verilmek zorundadır (18).

### FARELERDE CİNSİYET AYRIMI

Bir dişi fareyle erkek fare arasındaki cinsiyet ayrımı birkaç yolla yapılabilir. Anüs ve genital papilla veya açıklık arasındaki uzaklık, bir erkek farede bir dişi fareden daha büyüktür.(19). Anüs ve klitoriyus arasındaki uzaklık, anüs ve penis arasındaki uzaklığın  $\frac{1}{2} - \frac{2}{3}$ ' si kadardır. Erkek penisi skrotal kese veya vücut boşluğu içine çekilmiş olabilir. Bu durumda fareler arasındaki cinsiyet ayrımında diğer faktörler göz önüne alınır. Genellikle erkekler, aynı yaşlardaki dişilerden daha büyük ve daha ağırdır. İki aylık erkeklerde ortalama 27.8 gram ve 24 aylıkta 34.8 gramdır. Aynı yaşlardaki dişilerde ise ortalama 22.4 gram ve 29.8 gramdır. Bir dişi genellikle bir erkekten daha ince uzundur. Aynı zamanda meme bezleri daha belirgindir. Genellikle erkekler daha hırçın, dişiler ise daha uysaldır (19).

### ERGİN ERKEK FARE

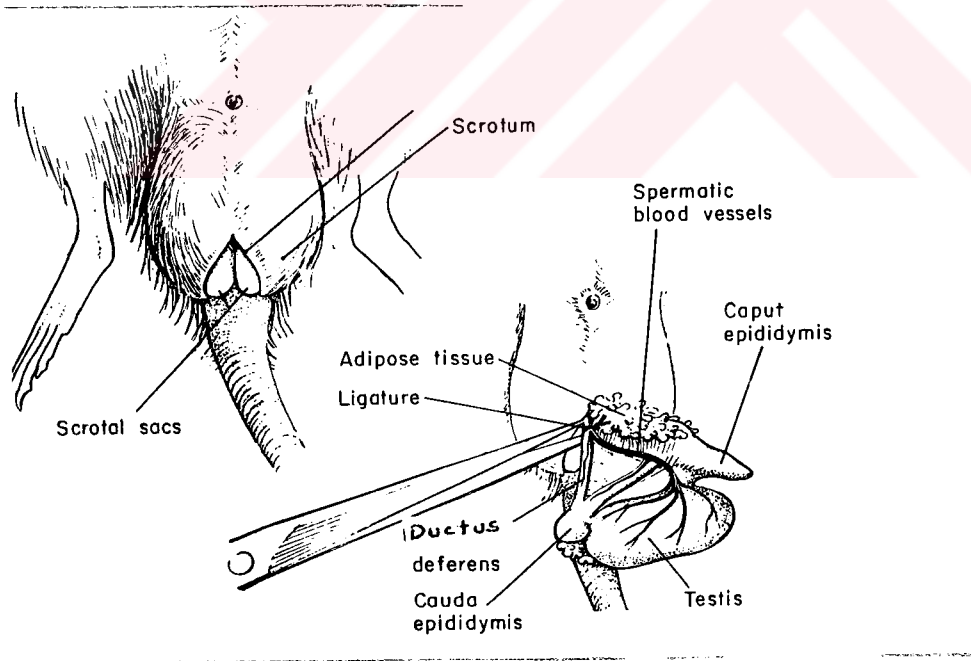
Erkekde genital sistem testisler ve bunu saran skrotal kese, epididismis ve ductus deferens, boşaltıcı kanallar (excretorik kanallar), eklenti bezleri (aksesuar bezler), sidik-meni kanalı (üro-genital) ve penis olmak üzere bir takım organlardan meydana gelmiştir (8, 11, 19 ).

Testisler, bu sistemin ana organlarıdır; fötüsde karın boşluğu içerisinde genital taslak üzerinde ilk gelişme evrelerini tamamladıktan sonra, ayrı ayrı birer organ haline gelirler; uzunca bir zaman karın boşluğu içerisinde kalan bu oluşumlar, doğumu takiben abdominal boşlukta veya dışarda inguinal bölgede sağlı-sollu fakat ortadan birbirine yapışık birer kese içinde ( skrotum ve ekleri) bulunurlar. İki uç, iki yüz ve iki de kenere sahip olup; kenarlarından birisi üzerinde epididismis yer-

leşmiştir (11). Epididismis; caput, corpus ve cauda epididismis olmak üzere üç kısımdan oluşur. Testisleri dıştan kalın ve kuvvetli bir zar kaplamıştır; genellikle beyaz renkli olan bu zara rengine bağlı olarak tunica albuginea adı verilmektedir. Tunica albuginea, epididismis'in testis üzerine oturduğu kenar boyunca testis içerisine doğru uzunlamasına bir bölme göndermiştir; bu bölme mediastinum testis'tir. Mediastinumdan ve tunica albuginea'dan testis'in içerisine doğru uzanmış olan bağ doku trabekülaları (septula), testis parenşimini bir takım loblara ve bölmelere ayırmıştır. Testislerde cytogenik fonksiyonun meydana geldiği ana doku parenşim, gayet ince ve zikzaklı kanallardan ibarettir; bunlar seminiferöz kanallardır. Oldukça uzun olan bu kanallar testis içerisine yerleşebilmek için oldukça sık ve kuvvetli kıvrımlar meydana getirmişlerdir. Parenşimde kanallar arasındaki boşlukları, damar ve sinirlerden zengin gevşek bir bağ doku doldurmuştur (interstistum). Seminiferöz kanallar testisin bir ucunda (caput epididismis'in bulunduğu uç) mediastinum içerisinde ağ oluşturacak şekilde birleşmişlerdir. Bu bölge rete testisdir. Rete testis'den birtakım kanallar çıkar; bunlar ductus efferenslerdir. Ductus efferens'ler zikzaklı seyirleriyle biraraya gelerek caput epididismis'i oluştururlar. Caput epididismis'inde lobcuklar oluşturmuş olan ductus efferensler corpus epididismis'e doğru birleşerek tek bir kanal haline gelirler; bu tek kanal ductus epididismis'dir. Corpus epididismis, ductus epididismis'in meydana getirmiş olduğu bir kütleden ibarettir. Bunun son kısmı bir incelmeye gösterir; bu bölge cauda epididismis'dir. Cauda epididismis, ductus epididismis'in epididismis'i terk ettiği son kısmıdır (8, 11). Kanal buradan itibaren duc-

tus deferrens adını alacaktır. Cauda epididymis'lerden itibaren başlayan ductus deferrens'ler canalis inguinalis'ten karın boşluğuna girdikten sonra, birbirlerine yaklaşıp sağlı-sollu vesicula seminalislerle birleşip uretra'ya açılırlar. Seminal bezler birer boynuz şeklinde sağlı-sollu olup, defferent kanallar uretrayı içerisine alırlar. Uretra'nın altında da prostat vardır. Pélvis'in tabanında median olarak seyreden üro-genital kanal pelvis'den çıkar çıkmaz penis üzerine atlar.

Ergin erkek farelerde kısırlaştırma işleminde kullanılan yöntemlerden birisi vazektomi operasyonudur.(3, 21). Erkeklerde vazektomi operasyonu, diğer seksüel fonksiyonlarda kayıp olmaksızın kısırlık oluşturulabilir (14). Bu yöntemde ductus deferrens'e birbirine yakın sıkıca iki ligatür konur ve konan bu iki ligatür ortasından ductus deferrens kesilir (21). Diğer ductus deferrens'e de aynı işlem uygulanır.



Şekil 1, Skrotuma ensizyon.

Şekil 2. Duktus deferense ligatür konulması.



## ERGİN DIŐİ FARE

Dişİ farenin üreme sistemi; bir çift ovaryumu, oviductları, uterus, bir serviks, vajina, klitoral bez ve klitoryus'u kapsamaktadır( 8,19).

Ovaryumlar

Yuvarlak ovaryumlar yaklaşık 2 mm çapında olup, böbreklerin hemen altında herbiri periovaryan boşlukla birbirinden ayrılmış saydam ovaryan kapsüllerin (tunika albuginea) içinde uzanırlar ( 8,19). Ovaryumlar dorsal vücut duvarından ligamentlerle asılıdır. Asıcı ligamentler düz kas lifleriyle sarılı olup, bu düz kas lifleri ovaryum örtüsü içine uzanır. Diğer ligamentler her ovaryumu anterior uterin boynuza bağlar. Bu ligamentler, uterin boynuzu ve oviduct infundibulumu yerini doldurur. Bu ligamentler wollfian cisimciklerinin kalıntısı olan epoöphoron'u da kapsamaktadır. Infundibular kas ovaryum hilusuna bağlıdır. Her uterin boynuzu serbest dorsal ligamentle (mezometrium) desteklenmekte olup, mezometrium biraz yağ içermektedir ( 19).

Periovaryan boşluk, uterin tüpün infundibulumuna ulaşmanın yanı sıra ovaryan kapsülün ligamentum ovari propriuma bağlandığı ve mezotubarium bölümlerinin kaynaştığı alanda, 1-1.5 mm. uzunluğunda dar bir tünele benzer pasaj aracılığıyla periton boşluğuyla ilişkilidir. Anatomik özelliklerinden ayrı olarak bu pasaj, periovaryan boşluk ve peritoneal kavite arasındaki sıvı değişiminde rol aldığı görülmekte ve dolayısıyla düşünmeye değer fonksiyonel bir öneme sahip olduğu sanılmaktadır (8).

Olgun bir fare ovaryumu, içte medullar kısma (zona vaskuloza ve stroma) ve daha periferde korteks kısmına sahiptir. Kortexte gelişmekte olan follikül görülebilir (19). Henüz tunika albugiea altında bulunan

küçük primer folliküller, oositleri ve primer folliküllerin etrafını saran follikül hücrelerini kapsamaktadır. Ön hipofiz bezinden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle bir grup primordial follikül hücreleri kendi granuloza hücrelerinde mitotik bölünmeye uğrayarak büyümek için stimüle edilir (4). Bu follikül hücreleri ilk önce squamöz yapıdadır. Oosit nükleusu, kromatin granüllere ve belirgin bir nükleusa sahip vasküler bir oluşumdur. Follikül büyürken etrafını saran follikül hücreleri küboidal yapıya dönüşür, sonra tabaka tabaka olur ve en sonunda zona pellusida adı verilen saydam, nonsellüler follikül hücre sekresyonu ile oositten ayrılır. Bu olay fertilizasyon sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Her büyüyen follikülü saran oluşum, stromadaki bağ dokusu lifleri olup, bu oluşumun tamamına teka follikülü adı verilmektedir. Follikül büyümeye devam ettikçe, artık zengin bir kan desteğine ve oldukça gevşek düzenlenmiş hücrelere sahip olan teka interna ve lifleri konsantrik olarak dizilmiş daha yoğun teka externa oluşumları arasında bir ayırım yapılabilir (19).

Follikül büyümeye devam eder, çünkü kandan temel besin maddeleri (vitaminler) ve steroid hormonlar alınır, fakat çoğu enzimler, antijenler, antikorlar ve protein hormonları kandan sağlanamaz. Hücreler arasında küçük ve düzensiz boşluklar görülür ve bu boşluklar birleşerek antrumu oluşturur. Antrum, folliküler sıvı veya likör follikülü ile doldurulmaktadır. Antrumun örtücü tabakası, stratifiye follikül hücrelerini kapsamakta olup bu hücreler granülerdir ve bundan ötürü granuloza hücreleri adı verilmektedir. Granuloza hücreleri, büyüyen oositi ve kümülüs oöphorus'u oluşturmak için zona pellusida'yı sarar; protein ve hya-

luronik asit içeren matrix, spermatozoan'dan gelen hyaluronidaz enzimiyle eritilir. Zona pellucida, gelişen ovum etrafında toplanır. Görevi, ovumu besin taşıyan kümülüs hücrelerinden daha fazla ayırmaktır. Zona, zayıf asidik bir mukoprotein materyaldir (19). Çünkü preokside, tripsin, kemotripsin, pronaz enzimleri zona'yı parçalama eğilimindedirler. Follikül hücrelerinin bir ürünü olan zona, saydam, dayanıklı, elastiki ikincil bir membrandır. Zona pellucida ("zona") görünüşte homojen değildir, bazı bölgeler diğerlerinden daha yoğun boyanırlar. Granuloza hücresinden gelen bazı hücresel yumrular, zona'nın yoğunlaşması nedeniyle geri çekilir, fakat vitellin membranla olan bağlantı devam ettirilir. Zona radiata'dan gelen protoplazmik uzantılar, zona pellucida'ya penetre olur ve zona, membranı arasından ovuma besin sevkeder. Zona, blastulasyon sırasında atılır (19). Zona pellucida, normal bir yarıklanma örüntüsünün sürdürülmesine yardım eder ve birbirine yakın olarak yerleşmiş ovumların füzyonunu önler. Zona pellucida, pronaz enzimiyle parçalanarak gelişmenin herhangi bir evresinde uzaklaştırılabilir. Pronaz enzimi kümülüs hücrelerini de ayırır.

Zona pellucida çevresindeki kümülüs hücreleri, radyal olarak uzamış hücreler halinde düzenlenir ve bu hücreler çoğunlukla tübülüye benzer stoplazmik yapılarla ovuma bağlanır ve bu oluşumun tamamına zona radiata denir. Radyal olarak düzenlenmiş hücrelerin, spermatozoa'nın ovulasyon sonucu atılmış ovuma yönelmesine yardım etmesi olasılığı vardır (19). Radyal olarak düzenlenmiş hücrelerin, başlangıçta spermatozoon'u yakalamak için yapışkan bir hedef de oluşturulabildiği bildirilmiştir (19). Başarılı bir sperm penetrasyonu için bozulmamış bir kümülüs'ün ge-

rekli olduğu sanılmaktadır. Antrum, hacmini arttırdıkça, bütün follikül büyür ve ovumu periovaryal boşluğa atmak için ovaryumun yüzeyine doğru hareket eder. Büyüyen ovum ve etrafını çeviren hücrelere beraberce graft follikül adı verilir. Bunun ortalema çapı 500 mikronun üzerindedir. Çoğu kez olgun ovum ve kümülüs hücreleri, ovulasyondan önce ve ovaryumdan atılmadan önce, hacmi artmış antrum içinde serbestçe yüzerken görülebilir. Bir graft follikül ovaryum yüzeyinden bir çıkıntı şeklinde çıplak gözle görülebilir.

### Oviduktlar

Oviduktlar, periovaryal boşluklardan uterin boynuzuna uzanan tüplerdir (19). Bunlar transport tünelleri olarak tanımlanır. Bu transport tünelleri boyunca fertilize edici spermatozoon bir yönde ve fertilizan ovum diğer yönde hareket eder. Her biri, periovaryal boşluk içinde silyalı ve fimbriyalı bir infundibulumda başlar. Infundibulumun silyalı epiteli salınır ve bazik (pH 8.05), ovidukkal sıvıda bir akım oluşur. Bu ovidukkal sıvı, serbest bırakılmış ovumu infundibulum içine, buradan bulbosa ve ince duvarlı ampulla içine sürükler. Ampullanın bizzat kendisi çok silyalı değildir; ampulla estrous sırasında dilate olarak büyümüş bir kese haline geldiğinden dolayı, ovumlar burada fertilizasyon için toplanabilir. Ampulla; basit, zayıf, silyasız epitelle örtülmüş oviduktun, sıkı bir ilmek yapmış tüpüyle devam eder. Oviduktun ikinci ilmeği, ovum transport ederken her 12-16 sn. de bir peristaltik kontraksiyonlar gösterir. İmek yapmış bu tüp, uterusun sefalik ucundan dış merkezli ve içine projekte olacak tarzda, bir uterin boynuzuyla birleşir. Oviduktun tamamı düz kas lifleriyle örtülmüştür. Bu düz kas

liflerinde oluşan kısım, ovumu uterusu sürüklemeye yardım eder. Oviduktun spesifik bir müsküler kontraksiyon örüntüsü olduğu sanılmaktadır (19). Bu spesifik müsküler kontraksiyon örüntüsü, ovumlar aşağıya doğru yönelirken, bunları yönlendirmeye yardım eder. Keza, ovumların üstünde oviduktun glandüler hücrelerinden depo edilmiş, dıştaki zona pelusida'yı kaplayan bir müköz tabaka vardır. Bu müköz, implantasyon sırasında ovumların uterin boynuzuna yapışmasına yardım edebilir (19). Yapışma, esas saldırıdan birkaç saat önce oluşabilir.

### Uterus

Uterus, iki tane boynuzu, bir kaudal kısma ve bir de bölünmemiş korpus uteriye sahiptir (19). Diğer bir deyişle, çok kısa saplı "Y" şeklinde bir oluşumdur. Uterus dokusunun büyük kısmı msklerdir, uterus daha dışta longitudinal bir düz kas lifleri tabakasına ve daha ite sirküler düz kas lifi tabakasına sahiptir. Uterus kıvrımlarının örtücü tabakası, sayısız spiral tübüler uterin bezlerine sahip basit prizmatik epiteldir. Lamina propria, lenfosit kümeleri gibi büyük yuvarlak çekirdeklere sahip, küçük polihedral hücreler içermektedir. Endometriyum, gebe olmayan hayvanlarda lamina propria, örtücü epitel, uterin bezleri ve birçok kan damarları içeren gerçek bir mkozal tabakadır. Endometriyumun küçük polihedral hücreleri, gebelik sırasında plasentanın büyük desidual hücrelerine dönüşür. Uterin lumen sıvısı, çevredeki peritoneal sıvıdan biraz daha alkalidir.

Endometriyumun periferesindeki myometriyum, kompaktsirkler kaslar, kan ve lenf damarlarıyla çevrili gevşek bir bağ dokusu tabakası ve son olarak longitudinal kaslar içerir. Uterusun en dıştaki örtücü tabakası,

uterin boynuzları geniş ligamentlere bağlayan gerçek bir membrandır.

Bunların kaudal uçlarındaki iki boynuz, sadece longitudinal kas ve konnektif doku içeren bir septumla ayrılmıştır. Küboidal hücrelerle örtülmüş bu bölgede implantasyon için gerekli doku elementleri bulunmaz. Her iki tarafta tuzak gibi bir boşluk oluşturmak için vajinal duvarlarla kaynaşmış olan korpus uterinin middorsal ve midventral duvarı, kısa vajina içine uzanır. Uterusun vajinaya açılması, çok katlı yassı epitelle örtülü serviks üzerinden gerçekleşir.

Uterus maximum büyüklüğüne 2.5-5 aylıkken ulaşır. 5 aylıkken RNA/DNA oranı maximumdur. RNA içeriği, uterusun sıvı içeriği ve sentez edilmiş protein miktarıyla ilişkilidir. Bir gebe uterusundaki DNA içeriği, gebeliğin 15. gününden itibaren artar ve sonra 1400-1700 mikrogram düzeyinde kalır (19). İlk gebelik, uterusun en son olgunlaşmasına neden olur.

#### Vajina, Klitoryus ve Klitoral Bezler

Vajina, döngüsel değişikliklere uğrayan stratifiye squamöz epitelle örtülüdür (9, 19). Vajinanın muköz membranı, bezlerde bulunmaz; lamina propria vasküler ve fibrözdür; ince musküler tabaka, hem sirküler ve hemde longitudinal lifcikler içerir. Vajina, dorsoventralde yassılaştırmıştır. Vajinanın exterior'a açılımı, klitoryusa anterior ve erkeğin penisine homolog olan fakat erektil doku içermeyen vulvadır. Dorsalde uretraya ve lateralde iki klitoral beze açılan küçük bir klitoral fossa vardır. Klitoral bezler, herbirinin tek bir kıl follikülü içermesi ve yağsız bir sekresyon oluşturması dışında, erkeğin sünnet derisi bezlerine eşdeğerdir (19).

### Meme Bezleri

Fare, üç tanesi torasik ve iki tanesi inguino-abdominal olmak üzere beş çift meme bezine sahiptir (8,19). Dişi farede bu meme bezleri estrousa bağlı olarak değişikliklere uğrar (12). Yaşam döngüsünün değişik evrelerinde farenin meme bezlerinde görülen değişikliklerle ilgili ayrıntılı araştırmalar Turner ve Gomez (1933), Cole (1933), Gardner ve Strong (1935) ve Fekete tarafından yapılmıştır (12). Bezler erkekte gelişmemiştir (19).

### ESTROUS DÖNGÜSÜ

Farelerde estrous döngüsünün süresi 5-5.5 gündür (9,17). Bu sürenin 4.5-5 gün de olabileceği bildirilmektedir (19). Estrous döngüsündeki değişiklikler diurnal ışık döngüsüyle ilişkilidir ve deneysel olarak değiştirilebilir (19). Diurnal yanıt, gözlerle M.S.S. ile ve/veya anterior hipofiz beziyle kontrol edilebilir,

Matürasyon ve estrous evreleri, vajinal simir analizleriyle saptanabilir (9, 17, 18, 19). Estrous döngüsünde görülen başlıca normal evreler; diestrus, proestrus, early estrus, estrus, post estrusdan oluşmaktadır.

### Estrous döngüsü sırasında vajinada gözlenen değişiklikler

Diestrusta vajinal epitel, 3-7 sıra hücreli bir malpighian tabakası içermekte olup lökositlerle şiddetli olarak infiltre edilmiştir (9). Yani vajinal simirde hemen hemen yalnız lökosit görülmektedir (19). Bu evrenin sonuna doğru epitel proliferasyona başlar ve lökositosis bitirken çift tabakalı görünüm oluşur. Diestrusun süresi 2-4 gündür (19). Proestrus evresinde vajinada bir stratum granulosum gelişir ve bu, est-

rous yaklaşıkça bir stratum korneuma dönüşür (9). Proestrusta vajinal simirde, yaklaşık eşit sayılarda hem lökositler ve hem de çekirdekli epitel hücreleri görülebilir (19). Vajina yüzeyinde kalan kornifiye hücreler dağıtılır ve deskuamasyon östrusun ikinci yarısı ve postestrus boyunca devam eder. Böylece epitelin yüksekliği düzenli bir biçimde azaltılır (9), Proestrusun süresi 1-1.5 gündür. Daha sonraki early estrus evresinde vajinal simirde, bazıları belirgin çekirdekli olan oldukça fazla miktarda epitel hücreleri görülmektedir. Süre 1-3 gündür. Estrous evresinde ise, büyük squamöz tipte çekirdeksiz epitel hücrelerine rastlanmaktadır. Süre 1-3 gündür. Postestrous, hemen hemen eşit sayılarda lökosit ve epitel hücreleri iğermesiyle karakterizedir, fakat epitel hücreleri büyük ve kıvrılmıştır ve yarı şeffaf çekirdeklidir (19). Vajinal duvarda oluşan değişiklikler döngüsü, lökositlerin dönüşüyle yinelenir.

Estrous döngüsü sırasında uterusdaki değişiklikler

Diestrus sırasında fare uterusu küçük, avasküler olup, dar ve uzun bir lümeneye sahiptir (9). Lumeni basit prizmatik epitelle döşenmiştir. Mitozlar geç diestrusta ve erken proestrustaki farenin endometrial bezlerinde çok sık oluşur (9).

Proestrus sırasında uterin boynuzlar suya benzer ve pıhtılaşmayan bir sıvıyla dolar ve bunları döşeyen prizmatik epitel hücreler küboidal yapıya dönüşür.

Estrus, kavum uteri epitelinde oluşan dejenerasyon olayıyla belirginleşir, Bunlar; bazal membran kaybını, vakuolar dejenerasyonu ve lökosit invasyonunu içermektedir. Uterus dökülmesi oluşmaz ve dejenerasyon onarma olayıyla ilgili değildir; mitoz ya hiç görülmez veya çok az



oluşur. Stromada ve küçük bezlerde dejeneratif değişiklikler görülmez.

Post estrus evresinde, dejenerasyon ve rejenerasyon birarada oluşur ve uterus hızla diestrusun tipik koşullarına döner.

#### Servixdeki değişiklikler

Görüldüğü kadarıyla farede estrous döngüsü sırasında servixin yapısında herhangi bir belirgin değişim oluşmaz (9).

#### Ovaryum ve oviduktlardaki değişiklikler

Farenin oviduktları diğer üreme sistemlerinde bol miktarda bulunan periyodik lökositlerden etkilenmez. Bununla beraber uterin tüpleri, ~~post~~estrus ve erken diestrus sırasında epitelde dejeneratif değişiklikler gösterirler (9). Proestrus evresinde folliküller likör follikülü ile büyümüştür ( 300 M). Biraz mitoz görülür. Estrus evresinde folliküller 550 M çapındadır. Ovulasyon: ovidukt büyümüştür. Germinal epitelyum ve follikül hücrelerinde mitoz görülür. Plazma progesteronu maximumdur (19). Erken postestrusta korporalutea, oviduktta ovum görülür, bazı folliküller ise atresi olur. Geç postestrusta korpora lutea büyür, ovum uterusu hareket eder. Germinal epitelde biraz aktivite gözlenir. Diestrus evresinde ise folliküller gelecek ovulasyon için hızla büyümeye başlar.

#### Menstrual döngü sırasındaki hormonal değişiklikler

Dişinin cinsel yönden aktif olduğu yıllarda her ay tekrarlayan ritmik değişiklikler vardır (13). Gerçek menstruasyon döngüsü yalnız kadınlarda ve maymunlarda meydana gelir. İlk menstrual döngü puberte çağında başlar (2). Puberteden önce ovumlar küçük folliküller şeklinde overlerde gömülmüşlerdir. Menstrual döngü tamamen hipofiz ön lobu tarafından salgılanan gonadotropik hormonlarca düzenlenir. Gonadotropik hormonlarla uya-

rılmayan ovaryumlar hiçbir faaliyet göstermezler (13). Bu hormonlar follikül stimulating hormon (FSH) ve luteinizing hormon (LH)'dir. Puberteden önce bu hormonlar yeteri kadar salgılanmadıklarından gerek overlerde ve gerekse testislerde bir değişme görülmez (2, 13). Puberteden itibaren hipofiz ön lobu tarafından çok miktarda salgılanan FSH az miktarda LH ile beraber overlerde follikülün olgunlaşmasını uyarır (2, 6,13). Dişilerde FSH, her döngüde bir, bazen iki veya daha fazla follikülü de aynı anda uyarabilir. Uyarılan follikül gelişme ve büyümeye başlar. Bu suretle primordial follikül büyür ve olgun bir follikül haline dönüşür. Bu olgun follikül "graft follikül" dür. Bundan sonra, olgunlaşan bu folliküldeki teka interna ve granuloza hücreleri tarafından estrojenler salgılanır. Estrojenlerin ve özellikle estradiolün etkisiyle endometriyum kalınlaşır ve damardan zengin bir hal alır. Bu esnada kana geçen estrojenler FSH salgısı üzerine kuvvetli inhibitör bir etki yaparak bunun salgısını azaltırlar. Bundan sonra LH salgısı artar. LH olgunlaşmış follikül üzerine etki yaparak onun çatlamasını ve ovumun follikülden dışarı çıkmasını sağlar. Böylece ovulasyon olayı meydana gelmiş olur. Sonra oluşan korpus luteum progesteron hormonu salgılar. Progesteron endometriyumun sekretuar ve fertilize olan ovumun nidasyonunu sağlayacak ve bunu koruyacak bir duruma hazırlar. Ovum fertilize olmazsa korpus luteum küçülür, progesteron salgısı azalır ve ovulasyondan sonra uterus epiteli yıkılır.

Farelerde overlerde meydana gelen değişmelerle beraber vajende de östrojenik hormonların meydana getirdiği değişmeler olur. Graft follikülü olgunlaşmaya başlamadan önce vajinal sıyrıkta lökosit, az miktarda

mukus ve nükleusları bulunmayan karakteristik yassı hücreler görülür. Graft follikülü maximum hacmine eriştiği zaman ve en fazla hormon salgılamaya başladığı en vajinal simirde lökositler görülmez, fakat mukus ve nükleussuz birçok hücreler görülür. Fertilizasyon oluşmazsa bütün dokular estrustan önceki (proestrus) duruma dönerler, fakat menstruasyon oluşmaz. Overleri çıkarılmış farelere estradiol şırınga edilirse değişimler meydana gelir. Bundan dolayı vajinal simir yöntemi estrojenik hormonların tayininde de değerli bir yöntemdir (2).

Overlerden salgılanan hormonlar meme bezlerinin gelişmesini sağlar. Estrojenler, kanalların ve progesterin ise lobüllerin gelişmesini uyarır (2).

Gebelik oluşunca korpus luteum küçülmez, büyümeye devam eder ve daha fazla progesteron salgılar. Progesteron ovulasyonu önler ve menstruasyon döngüsü kesilir (2).

#### HCG'in biyolojik etkisi

Plasentadan bir gonadotropin hormon salgılanır. Ancak plasenta tarafından salgılanan gonadotropik hormon, biyolojik etkisi yönünden hipofizinin salgıladığı gonadotropik hormondan farklıdır. Bu luteinizing hormone (LH) benzer (2). Bu hormonun en önemli görevi, menstruel döngünün sonunda normal olarak oluşan korpus luteum gerilemesini önleyerek progesteron ve östrojenin daha fazla miktarlarda salgılanmasını sağlamaktadır. Bu aşırı miktarda salgılanan hormonlar endometriyumun gelişmeye devam etmesini ve menstriumda olandan daha fazla besleyici maddenin depolanmasını sağlar. Sonuç olarak normal cinsel döngü sırasında oluşan endometriuma ait decidua hücreleri aktif hale geçer ve blasto-

sitin yuvalanmasından hemen sonra besleyici decidual hücreler halini alır (13).

#### OVULASYON

Ovulasyon, olgun ovumun follikülden periovaryal boşluğa atılmasıdır. Bu olay 30-45 dakika sürer. Genişleyen antrum içindeki sıvı yani likör follikülü, follikülün yarıma zamanı yaklaştıkça daha visköz olur. Preovulasyon değişiklikler sırasında, ovumun nükleer membranı kaybolur ve dağılmış kromatin granülleri küçük, yoğun kromozomlar halinde biraraya toplanır. Birbirinden farklı birçok hayvan hücrelerindeki bir ovumun, çoğunlukla sentriollere veya astral çizgilere sahip olmadığı görülmektedir. Yinede bir içcik oluşur ve henüz biraraya gelmiş kromozomlar (tetraploid) ekvatoryal plak boyunca iki sıra halinde dizilirler. Sonra kromozom çiftleri bölünür ve herbir çiftin iki üyesi zıt içcik kutuplarına doğru hareket ederler. Bir kutup, kromozomlarıyla birlikte birinci polar cisim oluşturur. Birinci polar cisim her zaman görülemediğinden, bunun ya perivitellin boşluğa kaçtığı veya parçalandığı veya sitoliz olduğu sanılmaktadır. Geride kalan diploid sayıdaki kromozomlar ikinci polar cisim verecek olan diğer bölünmeye hazırlanır. İkinci polar cisim içciği, ovulasyon anına kadar şekillenir ve fertilizasyona kadar metafazda kalır (19).

Hem olgun follikül çevresinde ve hem de ovaryum medullasında kanla dolmuş geniş damarlar görülür. Her ovumun, granuloza hücrelerinden, gerilmiş tunika albuginea'dan ve daha fazla yassılaştırmış germinal epitelten geçerek kopması zorunludur. Periovaryal boşluk, hücrelerle, sıvılarla ve ovumla doldurulmuş olur. Kopma bölgesinin karşısındaki teka

interna ve granuloza hücreleri, sıvı basıncındaki azalma ve follikül kollapsı nedeniyle kıvrımlar içine atılabilir. Kısa bir sürede tek bir ovaryumdan infundibulum bölgesinde birikmek üzere yaklaşık 10 tane ova atılabilir (19). Birçok infundibulum silyası, olgun ovumu fertilizasyonun olduğu ovidukt ampullasına transport eder. Likör follikülünün kalınlığının az olması nedeniyle ova bir yığınla birlikte sürüklenir.

Normal bir dişi farede estrusun başlama zamanı, karanlığın başlamasından 4-6 saat sonradır. Ovulasyon, estrusun başlamasından 2-3 saat sonra oluşur. Böylece her iki olay da diurnal ışık döngüsüyle ilişkilidir ve diurnal ışık döngüsünün değiştirilmesiyle estrusun ve dolayısıyla ovulasyonun başlama zamanı değiştirilebilir. Genellikle ovulasyon, gece yarısında ve bazan normal koşullar altında saat 2.00 ile 4.00 arasında oluşur. İkinci oosit metafazda bazan 6 saat kalır ve sonra 12 saat süren anafaz evresine ve sadece 0.2 saat süren telofaza girer. İkinci polar cismin ayrılması fertilizasyon zamanına bağlıdır. Son bölünmenin yaklaştığını gösteren ilk işaret kromatinin yoğunlaşmasıdır. Kromatin, ovulasyonun olduğu gece normal karanlığın ilk saatlarında görülebilir.

Ovaryan follikülünün kırılması farede gözlenebilir bir kanamayla ilişkili değildir. Follikül duvarında sadece küçük bir aralık kalmaktadır. Fakat sıvı kaybını izleyen gerilim kaybı, korpus luteum adı verilen küçülmiş ve görevini yitirmiş olan follikülün oluşmasından yaklaşık 2 saat sonra, zararı onarmak için çevredeki kan kapillerini uyarır. Teka interna hücreleri, geride kalan granuloza hücreleri ile beraber follikül içine projekte olur. Bunlar orjinal antrumu zapteden radyal olarak düzenlenmiş trabekülayı oluşturmak için derhal kapiller ile sarılır. Daha sonra hücre-

reler sarımtarak bir lutein maddesiyle doldurulur. Bu değişiklikler, kapillerlerin büyümesinde olduğu gibi, hem teka interna ve hem de granuloza tabakalarında aktif hücre proliferasyonunu gerektirir. Granuloza hücrelerinden lutein hücrelerine transformasyon basamak basamaktır. Eozinofilik stoplazmaya sahip lutein hücreleri, büyük ve polihedral iken; siyah boyanan çekirdeğe ve bazofilik stoplazmaya sahip granuloza hücreleri küçüktür.

Korpus luteum, ovumun salıvermiş bir follükülün yerine ortaya çıkar (19). Bir ovaryumda, böyle çok sayıda lutein kütlelerinin varlığı, daha sonraki ovülasyonu inhibe etmez ve bunlar olgun follüküle sahip bir ovaryumda görülebilir. Aktif olarak sekresyon yapan korpora luteanın varlığı, serbest blastositlerin devamlı olarak beslenmesi için gereklidir ve korpora lutea ovumun dejenerasyonunu önler. Bununla beraber, estrous yaklaştıkça korpora luteanın yağ ve lipoid içeriği artar ve lipid granülleri kabalaşır. Diğer bir deyişle, ovulasyondan sonra, önceki korpus luteumdan gelen çok az lipid vardır. Fertilizasyon olmazsa, korpora lutea geride sadece fibröz ve yağ dokusu bırakarak 10-12 gün içinde dejenere olmaya başlar. Dejenerasyon, çoğunlukla ovumun bizzat kendisinde başlar ve çevre hücrelere ve dokulara yayılır. Ovum ve çekirdeği biçimsiz konfigürasyonlar gösterebilir. Zona pellusida henüz oluşmuşsa yok olan follükül etrafında bir halka olarak kalır. Vitellin membran ovumdan kendi kendine ortaya çıkar; zona pellucida çevredeki follükül hücrelerinden gelir. Kümülüs oöforus; follükül hücreleri, asidik mukopolisakkarid, bir intersellüler matfix, hyaluronik asit ve protein içermektedir. Korona radyata, kümülüs hücrelerinin en içteki tabakasıdır.

### Superovulasyon

Puberte öncesi ve sonrası fareler, gonadotropik hormonlarla muamele edilmeleri sonucu, çok sayıda yumurtaların ovulasyonu ile sonuçlanacak biçimde yanıt oluşturabilirler. Bu olaya superovulasyon adı verilmektedir (15).

Bu konuyla ilgili literatür taramasında, en eski tarihli olarak Runner ve arkadaşlarının 1953 yılında yaptıkları bir araştırmayı içeren literatüre ulaşabildik (20). Bu literatürde süperovülasyon konusunda yapılan ilk araştırmaların Smith ve Engle tarafından 1927 yılında yapıldığına değinilmektedir. Runner ve arkadaşları farelere 1 I.U. PMS (pregnant mare's serum)'yi bir follükül stimüle edici hormon olarak deri altına zerk etmişler ve 35 saat sonra aynı hayvanlara intraperitoneal olarak 2 I.U. HCG (human koryonik gonadotropin) zerk etmişlerdir. Araştırmanın sonucunda zerk işleminden 12-16 saat sonra ovulasyonların meydana geldiği gözlenmiştir. Daha sonraki yıllarda da bu konuyla ilgili araştırmalar devam etmiş olup, en yeni literatür olarak Ackerman ve arkadaşlarının 1984 yılında yaptıkları araştırmayı içeren bir literatür elimizde bulunmaktadır (1). Ackerman ve arkadaşları, estrouslarını rastgele seçtikleri dişi farelerde süperovülasyon oluşturmak için, 5 I.U. PMS'yi intraperitoneal enjeksiyonlarla vermişler ve bu enjeksiyondan 48 saat sonra 5 I.U. HCG' enjekte etmişlerdir.

### ÇİFTLEŞME

Dişi fare, diğer birçok memelilerde olduğu gibi (antropoidler ve insanlar dışında) sadece ovumun olduğu veya fertilizasyon için hazırlandığı estrous sırasında çiftleşir (19). Estrous genellikle gece ya-



rısı başladığından; çiftleşme yaklaşık olarak gece saat 2.00'de en yaygındır. Bununla beraber, çiftleşme bazı durumlarda sabahın erken saatlerinde veya akşamın geç saatlerinde oluşabilir. Bu nedenle embriyonik veya fertilizasyon yaşını hesaplamadaki zaman değişkenliği azaltılabilir. Fertilizasyonla sonuçlanan akşam çiftleşmeleri büyük bir olasılıkla bir sonraki ovulasyona kadar dişi genital sisteminde spermatozoa kalmasına bağlıdır ve fertilizasyonla sonuçlanan sabah çiftleşmeleri, ovumun ovidukt ampullasında bulunmasına bağlıdır. Pratikte, sabah saat 8.00'den 8.45'e kadar çiftleştirme işlemi yapılmasının en uygun olduğu sanılmaktadır (19). Çünkü, bu andaki çiftleşmelerle, 6-8 saat önce ovule olmuş olgun ovumları yakalamak mümkün olabilir. Gece çiftleşmeleri ise 2 saat veya daha az bir süre yerine, 16 saatlik bir zaman aralığı verir.

Genellikle bir erkek fare, beş veya altı dişi fare bulunan bir kafese koyulur ve 45 dakika sonra buradan alınır (19). Başarıyla sonuçlanan bir çiftleşmenin kanıtı bir vajinal plak oluşumudur (19). Vajinal plak, erkeğin veziküller ve pıhtılaştırıcı bezlerinden gelen sekresyonları içermektedir (17,19). Bu sekresyonlar, dişinin vajinal orifisini tıkayarak bir sıvı pıhtısı oluşumuna neden olurlar.

Plak, vazektomize erkek farelerle de oluşturulabilir (19). Vajinal plak, genellikle mekaniksel baskının vajinal mukozayı ve uterin ligamentlerini tahrip edebildiği orandadır. Bu kısa süreli çiftleştirme deneyleri, ortalama %6.98 vajinal plak elde edildiğini ve bunun %92.4'nin gebelikle sonuçlandığını göstermiştir. Cinsel yönden denenmiş erkek farelerin, estrousun değişik evrelerinde bulunan dişi fare gruplarıyla rastgele çiftleştirilmesi sonucunda ortalama %8.5 oranında bir plak oluş-



şumu başarılabilir. Erkek farelerin ve dişi farelerin cinsel yönden denenmediği, fakat cinsel yönden olgun (10 haftalık) oldukları durumlarda, plak oluşma yüzdesi ortalama %3.5 kadar düşük olabilir. Kuramsal olarak, cinsel yönden olgun bir grup dişinin sadece yaklaşık %10 kadarı çiftleşme zamanında estrousta bulunabilir, böylece erkeği kabul eder. Vajinaya giren spermatozoa, dakikalar içinde ovidukt ampullasına ulaşabilir, fakat spermatozoalar fertilize etme yeteneklerini koruduklarından dolayı, çiftleşme ile ovumun fertilizasyonu arasından sekiz saat kadar bir zaman geçebilir (19).

Çiftleşme, dişi genitalinin erkek tarafından aktif olarak temasını ve alt omurga kemiğine doğru bir yayılmayla dışide oluşan direnç kaybını içerir. Bir ejakulatta 60.000.000 spermin depo edilebildiği bildirilmiştir (19). Normal koşullar altında çiftleşme, ovulasyondan 5 saat önce oluşur, fakat çiftleşme, ovulasyonu izleyen 8 saat içinde de olabilir.

Tahminen sadece 100 veya biraz daha fazla spermatozoa, döllemeye hazır ovumu dölmek amacıyla ovidukt ampullasına ulaşmayı başarmaktadır (19).

Spermatozoanın ampullaya ilerlemesine, ovidukt duvarının peristaltik kas hareketleri yardım etmektedir. Sperm, servixten ampullaya 15 dakika içinde geçebilir.

#### FERTİLİZASYON

Spermatozoanın, zona pellusida içine penetrasyonu, fertilizasyon işlemini oluşturan bir grup olayın ilkinin oluşturmaktadır (7). Daha sonra spermatozoan vitellusa girer, dişi ve erkek pronükleusları

birleşerek tek bir birim oluştururlar ( 7). Ovum birinci yarıklanmaya uğradığı an, fertilizasyon işlemi tamamlanır. Tüm işlem, ovumun döllenme yeteneğini 15 saat kadar koruyabildiği ovidukt ampullasında meydana gelir (19). Aktivasyon olayı, durdurulmuş ikinci mayotik bölünmesini tamamlaması için ovumu stimüle eder. İkinci mayotik bölünmede durdurulmuş ovum, haploid sayıda kromozoma sahiptir ve singamy işlemi normal diploid sayıda kromozom oluşmasını sağlar. İkinci polar cisim oluşumu, 2 saat kadar uzun sürebilir.

Ovum, biraz yapışkan bir sekresyonla çevrili olduğundan, spermatozoanlar birerada kümelemeye çalışırlar, fakat görüldüğü kadarıyla kümelenme fertilizasyon olayını engellemez. Bununla beraber, kümülüs öoforus hücrelerinin ve zona pellusidianın, fertilizasyondan önce oluşan bir grup değişikliklere uğraması zorunludur. Zona pellusidia, gerçekte homojen fakat farklı yoğunluklara sahip düzensiz bölgeyle tabakalanmış ve hem içteki ve hem de dıştaki yüzeyleri pürüzlü bir matridir. Zona pellusidia, ampullada iken büyük bir olasılıkla hyalurinidaz enziminin etkisiyle birkaç saat sonra parçalanır. Kümülüs hücreleri, zonada gömülü halde bulunan uzantılara sahiptir. Korona hücreleri, zona kanalikuliden stoplazmik uzantılarını geri çeker. Esas olarak bu uzantılar veya yumruların, ovum yüzeyi ile yumru şeklinde bağlantıları vardır ve gelişmesi sırasında ovuma besin taşıdığı sanılmaktadır (19). Ovum kortexinden uzanan mikrovilluslar da zona'ya girer. Hem follikül hücrelerinden ve hem de mikrovilluslardan gelen bu uzantılar birinci polar cismin atılması ve perivitellin boşluğun belirginleşmesi sonucu geri çekilir. Birinci polar cismin atılma noktasında ve sperm başının giriş yerinin ken-

rında çok sayıda mikrovillus olduğu görülür. Spermin kümülüs ve zane pel-lusidia içinden geçmesi, yaklaşık 1 saat kadar bir süre alır.

Yüzeyle paralel olarak uzanmış olan ikinci polar cismin oluşumu için gerekli olan içcik, 90 derece döndüğünden dolayı, içciğin bir kutbu yüzeye yakın ve diğer kutbu ovumun içindedir. Polar cisim biraz stoplaz-maya sahiptir.

Bir dişi, vazektomili bir erkekle çiftleştirildikten 1.5-4.5 saat sonra periovaryal boşluğa, ampullaya, ovidukta veya uterusu semenin 2.8 gauge'luk bir iğneyle enjekte edilmesi sonucu yapay olarak döllenirilebilir (19).

Ovidukt ampullasında bulunan aktif bir spermatozoan, fertilizasyon yeteneğini 8 saat korur ve genellikle tek bir dişinin tüm ovumları çiftleşmeden 6 saat sonra fertilize edilmektedir. Gecikme, kümülüs hücrelerinin kaçınılmaz olan olgunlaşmaları nedeniyledir. Bazı sperm-ovum birleşmesi çiftleşmeden 15 dakika sonra meydana gelmektedir. Sıçanlarda olduğu gibi farelerde sperm kapasitasyonunun gerekli olduğu konusunda bir kanıt yoktur (19).

Ovumun döleyici sperm tarafından aktivasyonu, penetrasyondan 1-2 saat sonra oluşan spermatozoan başının büyümesinden önce başlar. Bu işlem meydana gelirken, başın kromatin elementleri kısa bir süre kaybolur. Başın şişmesi posterior uçtan başlar ve arteriora doğru ilerler. Sonuçta oluşan pronükleusun hacmi, orjinal hacmin birkaç yüz katıdır ve genellikle dişi pronükleus hacminin iki veya üç katı kadardır. Her iki pronükleus da çift duvara ve her zaman aynı biçimde olan saf granüllere sahiptir. Penetrasyon olayı ile erkek pronükleusunun oluşumu arasındaki

süre, diğer kemirgenlerle kıyaslandığında farelerde kısadır fakat penetrasyon ile birinci yarıklanma arasında geçen süre diğer kemirgenlere göre daha uzundur.

Fertilizasyondan sonra zona pellusidia, ovuma yaklaşık olarak 114 mikronluk bir sap vermek için genişler. Çünkü ovum, yaklaşık olarak %15 kadar küçülmeye başlamıştır ve ovum ile zona pellusidia arasında perivitelin boşluk diye adlandırılan bir boşluk görülmeye başlamıştır. Bazan bu boşlukta birinci polar cisim görülebilir. Sonra ovum stoplazmasının köpürme hareketi başlar.

Çiftleşme olayından 6 saat önce hem erkek ve hem dişi pronükleusları görülebilir. Nükleus, çıkıntılı bir nükleolusa sahiptir. Her iki pronükleus, füzyona uğramadan önce DNA sentez ederler. Bunlar RNA içermezler ve belirgin asidofilik nükleouluslara sahiptirler. Her bir pronükleus, ovumun merkezinde karşılaşmak için birbirine doğru ilerlerler. Fertilizasyonun, pronükleuslar hemen hemen temas halindeyken ve birinci yarıklanma işiği oluştuğunda tamamlandığı düşünülmektedir. Birinci yarıklanmadan önce, pronükleus membranları yok olur, ayrı ayrı kromozomlar oluşur ve longitudinal biçimde dizilirler (19).

## G E R E Ç v e Y Ö N T E M L E R

### Deney hayvanları

Ortalama, 25-30 gram ağırlığındaki 50 tane genç erişkin (3-4 aylık) dişi beyaz fındık faresi (*Mus musculus var. albinus*) ve ortalama 25-30 gram ağırlığındaki bir tanesi vazektomi yapılmış 3 tane genç erişkin erkek beyaz fındık faresi (*Mus musculus var. albinus*) bu araştırma için kullanılmıştır.

### Ortamın hazırlanması

Çalışmada kullanılacak fareler, galvanize saçtan ve sık delikli kalın tel örgüden yapılmış geniş kafeslerde bakılmıştır. Bu kafesler 25.5 cm eninde, 14.5 cm derinliğinde ve 45 cm yüksekliğindedir. İçme suyu üstten sarıtılan cam borulu birşişe ile ad libido olarak verilmiştir. Farelerin beslenmesi için hazır palet yem kullanılmıştır. Ayrıca kuru ekmeke, marul ve yaklaşık haftada birkez olmak üzere, içinde bir tane B vitamini tableti eritilmiş; lamet mama verilmiştir. Hayvanların bulunduğu odanın sıcaklığı 20-25°C arasında olup, 06.00-18.00 arasında karanlık, 18.00-06.00 arasında ise aydınlık olmak üzere 12 saat ışıkta, 12 saat karanlıkta tutulmuşlardır.

### Dişi farelerin estrus döngülerinin doğal senkronizasyonu

Bu amaçla, yukarıda değinildiği gibi 50 tane ergin dişi fare 15 gün süreyle ve diurnal ışık döngüsünde bir odada tutulduktan sonra, maturasyon ve estrus döngüsünün evrelerine bağlı olarak oluşan varyasyonları izlemek için her dişi fareden 5 gün boyunca vajinal simir alınmıştır. Bu işlem hergün aynı saatlerde (9.00 ile 12.00 arasında) yapılmıştır.

tır.

### Vajinal simir hazırlama yöntemi

1. Vajinal simir alma yöntemi.- Vajinal simirler normal kapiller pipet aracılığıyla alınmıştır. Bu pipetlerin ağız kısımları yakılarak düzgün bir biçimde inceltilmiştir. Birkaç damla %0.9'luk NaCl solüsyonu pipete çekilmiş, vajinaya sokulmuş ve sonra pipet geri çekilmiştir. Pipetteki sıvı, lama transfer edilmiştir.

2. Tesbit işlemi.- Lamaların tesbiti için saf alkolde (%96'lık) 3 gün bırakılmıştır.

3. Boyama işlemi.- Alkolden çıkarılan lamalar, hücre tiplerinin ve nükleolusların saptanması için papanicolau boya setinden geçirilmiştir. Kullanılan papanicolau boya seti sırasıyla şu basamaklardan oluşmaktadır:

% 95'lik alkol

Harris Hematoxylen

Çeşme suyu

%95'lik alkol

Orange G-6

%95'lik alkol

EA-36 (papanicolau)

%95'lik alkol

%95'lik alkol

Xylol + alkol karışımı (1/1 oranında)

Xylol

Xylol

Lamaların lamelle kapatma işlemi.

### Vazektomi işlemi

Ergin erkek farenin kısırlaştırma işlemlerinde vazektomi yöntemi kullanılmıştır.

a. Anestezi.- Operasyon öncesi anestezi uygulaması için, fare bir kavanoz içine koyulmuş ve etere batırılmış pamukla inhalasyon yaptırılarak anestezi edilmiştir. Operasyon sırasındaki anestezi uygulaması için, kartondan yapılmış maske içerisine konan eterli pamuk, farede genel anestezinin oluşmasını sağlamıştır.

b. Tutma ve bağlama.- Anestezi uygulanmış hayvan, masa üzerine sırt üstü yatırılmış, arka bacaklar birbirinden ayrılmış olarak tutulmuştur.

c. Aletler.- Traş makinası, yuvarlak bistüri, makas, şırınga, ameliyat iğnesi, ipek iplik, örtüler, örtü pensleri.

d. Sterilizasyon.- Kullanılacak aletler ve örtüler, otoklavda (1.5 atmosferde 20 dakika) sterilize edilmiş ve ellerin dezenfeksiyonu yapılmıştır.

e. Teknik.- İnguinal bölgedeki kıllar traş edilmiş ve tendürdiyot ile dezenfekte edilmiştir. Operasyon bölgesi örtülerle sınırlandırılmıştır. Sonra sol elin baş ve işaret parmağı ile tesbit edilen deride 1 cm uzunluğunda bir ensizyon yapılmıştır. Derinin altındaki dokular duktus deferensler göze çarpıncaya kadar kesilmiştir. Duktus deferens ucu küt makas ile çevresindeki dokulardan ayırt edilmiş ve makas üzerine alınmıştır. Duktus deferens, 0.5 cm'lik ara ile konan ligatürler ortasından kesilmiştir. Aynı işlem diğer duktus deferense de uygulanmıştır. İşlem tamamlandıktan sonra operasyon yarası içerisine antibiyotik tozlardan

rifadin serpilmiştir. Deriye ipek iplik ile ayrı dikiş konmuş, üzerine koruyucu dikiş uygulanmıştır ve en son olarak hayvana parenteral antibiyotik yapılmıştır. Operasyon sırasında hayvana hemostazi gerektiren herhangi bir kanama olmamıştır.

f. Operasyon sonrası bakım.- Ameliyat işlemi bittikten sonra hayvan tek başına, dezenfekte edilmiş bir kafese yerleştirilip, oda sıcaklığı yaklaşık 22 °C olan bir odaya koyulmuştur ve 6 gün boyunca hergün dikişleri, idrar ve dışkı yapıp yapmadığı ve yaranın enfekte olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ayrıca 6 gün süreyle içerisinde B vitamini ve rifadin eritilmiş olan lamet mama verilmiştir. 6. günün sonunda operasyon yarasının kaynadığı görülüp dikişler alınmıştır.

#### FARMAKOLOJİK SENKRONİZASYON

##### Kullanılan döngü sayısı

Birbirini izleyen iki estrous döngüsü kullanılmıştır.

##### Deney hayvanları

Ortalama 25-30 gram ağırlığındaki 36 tane genç erişkin (3-4 aylık) dişi beyaz fındık faresi (*mus musculus var. albinus*) kullanılmıştır.

##### Farmakolojik ajanlar

###### a. FSH/LH çözeltisi

FSH/LH ..... 75 I.U.

Serum fizyolojik ..... 25 ml.

FSH/LH arı halde temin edilemediğinden farmakolojik preparat (pergonal 500, I.F. Serono-Rome) kullanılmıştır. Serum fizyolojik ise ajirojen ve steril olup, hazırlanan çözelti beklenilmeden kullanılmış ve kalan kısım atılmıştır.



## b. HCG çözeltilisi

HCG .....1500 I.U.

Serum fizyolojik ..... 500 ml.

HCG arı halde temin edilemediğinden farmakolojik preparat (pregnyl, NV, Organon, Holland) kullanılmıştır. Serum fizyolojik ise apirojen ve steril olup, hazırlanan çözeltili bekletilmeden kullanılmış ve kalan kısım atılmıştır.

Yöntem

## 1. Zerk işlemleri:

a. Birinci döngüde 36 tane dişi fareye, hayvan başına 1 ml. FSH/LH çözeltilisi (3 I.U. FSH + LH ), intraperitoneal yoldan verilmiştir.

b. İkinci döngüde (birinci enjeksiyondan 5 gün sonra), hayvan başına 1 ml. FSH/LH çözeltilisi (3 I.U. FSH + LH) intraperitoneal yoldan zerk edilmiştir.

c. İkinci döngüde yapılan FSH/LH zerkinden 48 saat sonra hayvan başına 1 ml. HCG çözeltilisi ( 3 I.U. HCG) intraperitoneal yoldan verilmiştir.

## 2. Çiftleştirme işlemi:

HCG enjeksiyonundan sonra her kafeste 7 tane dişi fare olmak üzere, 14 tane dişi fare iki ayrı kafese yerleştirilmiş ve bu kafeslere, her birinde 45 dakika bırakılmak üzere bir tane vazektomi uygulanmış erkek fare koyulmuştur. Diğer 14 tane dişi fare ise içlerinde birer tane vazektomi yapılmamış erkek fare bulunan iki ayrı kafese paylaştırılmıştır.

### 3. Histolojik preparatların hazırlanması:

a. Vajinal simir alma.- Birinci döngü sırasında farelere herhangi bir müdahale yapılmamıştır. İkinci döngüde yapılan FSH/LH zerkinden sırasıyla 2, 6, 12, 18, 24, 32, 40, 44 saat sonrasında birer tane dişi fareden vajinal simir yukarıda anlatıldığı biçimde alınmış ve vajinal simir preparatları hazırlanmıştır. HCG zerkinden sonra ikişer saat arayla, bir tanesi normal erkekle, diğeri vazektomili erkekle bırakılmış olan iki tane dişi fareden vajinal simir yukarıda anlatıldığı biçimde alınmış ve vajinal simir preparatları hazırlanmıştır.

b. İç genitallerin çıkarılması.- İkinci döngüdeki FSH/LH zerkinden sonra sırasıyla 2, 6, 12, 18, 24, 32, 40 ve 44 saat sonrasında vajinal simiri alınan birer fare eterle inhalasyon yapılarak öldürülmüş, kesilmiş ve iç genitalleri çıkarılmıştır. Aynı şekilde, HCG zerkinden sonra ikişer saat arayla vajinal simirleri alınan iki dişi fare eterle inhalasyon yaptırılarak öldürülmüş, kesilmiş ve iç genitalleri çıkarılmıştır.

#### c. Preparatların hazırlanması.-

Tesbit işlemi.- Çıkarılan iç genitallerin herbiri içinde %10 formalin bulunan ayrı ayrı şişelerde 30 gün bekletilmiştir.

Doku takibi.- Formalin solüsyonundan çıkarılan parçalar doku takibine alınmıştır. Doku takibi şu basamakları içermektedir.

Çeşme suyunda yıkama

%70'lik alkol

%80'lik alkol

%90'lik alkol

%95'lik alkol

%99.9'luk alkol

Xylol

Sıvı parafin

Blok yapılması.- Doku takibinden sonra parçalar, önceden hazırlanmış blok kalıplarına koyulmuştur. Üzerine, parçayı tamamen örtecek kadar parafin dökülmüş ve donması beklenmiştir.

Bloklardan kesit yapılması.- Parafin bloklarından kesit yapılması için mikrotomda 5 mikron kalınlığında kesitler yapılmış ve lama alınmıştır.

Lamların kurutulması.- Suyu kuruyan lamlar, 56°C'lik etüv içerisinde kurutulmuştur. Burada parçaların lama tamamen yapışması için iki saat bırakılmıştır.

Kesitlerin parafinden kurtarılması.- Etüvden çıkarılan lamlar dışarıda bir süre soğumaya bırakıldıktan sonra içerisinde saf xylol bulunan şalelerde 15 dakika bırakılmıştır.

Kesitlerin xylolden kurtarılması.- Saf xylol içerisinde parafinden kurtarılmış olan preparatlar xylolden kurtarılmak üzere sıra ile %96, %90 ve %80'lik alkollerden geçirilmiştir. Preparatlar her alkol soğutusunda 3 dakika bırakılmıştır.

Kesitlerin boyanması.- Hemotoxylene-eosin boya seti kullanılmıştır. Bu boya seti sırasıyla şu basamakları içermektedir.

Xylol

Xylol

Xylol+ alkol (1:1)

Absolü alkol

%85'lik alkol

%70'lik alkol

Akar suda yıkama

Distile su

Hemotoxylen

Akar suda yıkama

%0.001 HCl + %70'lik alkol

Akar suda yıkama

0.001 Lityum karbonat

Akar suda yıkama

%50'lik alkol

Eosine

Akar suda yıkama

%70'lik alkol

%85'lik alkol

Xylol + alkol (1:1)

Xylol

Xylol

Kapatma

## B U L G U L A R

Diurnal ışık döngüsünde 15 gün süreyle bir arada tutulmuş inbred, aynı yaşlarda ve herhangi bir dış müdahale yapılmamış 50 dişi farede vajinal simir yoluyla saptanan estral döngü evreleri tablo 1 de verilmiştir.

TABLO 1

Birlikte tutulan dişi farelerin estrous döngüsündeki dağılımları

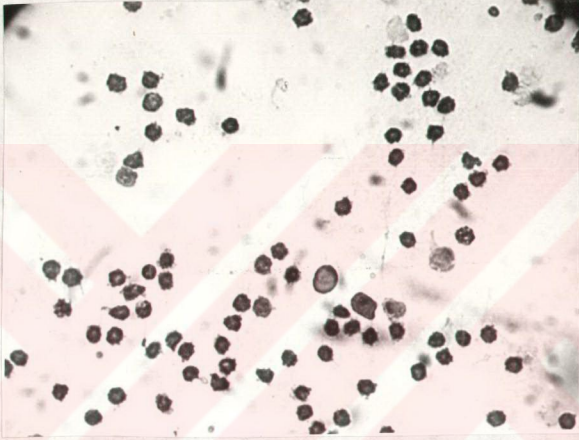
GÜNLER	E V R E L E R						
	Diestrus	Pro Estrus	Early Estrus	Estrus	Post Estrus	Toplam Fare Sayısı	
1	n <sup>X</sup>	31	6	6	3	-	46
	% <sup>XX</sup>	67.5	13	13	6.5	-	
2	n	20	7	3	4	1	35
	%	57	20	8.5	11.5	3	
3	n	25	11	3	2	2	43
	%	58	25.6	7	4.7	4.7	
4	n	16	15	14	3	-	48
	%	33.3	31.2	29.2	6.3	-	
5	n	8	16	7	8	6	45
	%	17.8	35.5	15.5	17.8	13.4	
N <sup>XXX</sup>		100	55	33	20	9	217

X Herbir evredeki fare sayısı (günlük)

XX Herbir evredeki fare sayısının toplam fare sayısına oranı

XXX Estrus döngüsü boyunca herbir evredeki toplam fare sayısı.

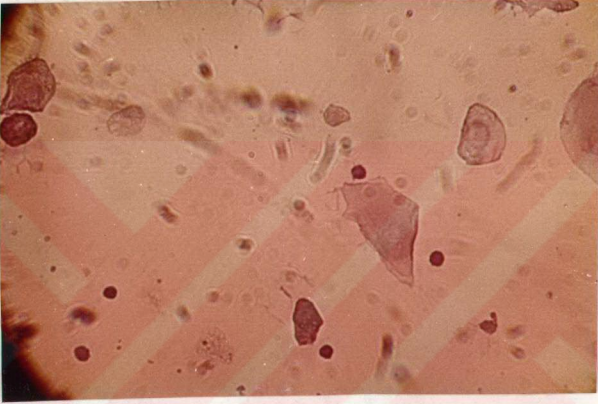
Doğal estrous döngüsünün diestrus evresine ait vajinal simir rne-  
đi resim 1 de sunulmuştur.



Resim 1. Diği farede doğal estrous döngüsünün diestrus evresine ait  
vajinal simir. Boya: Papanicolau. X 250.

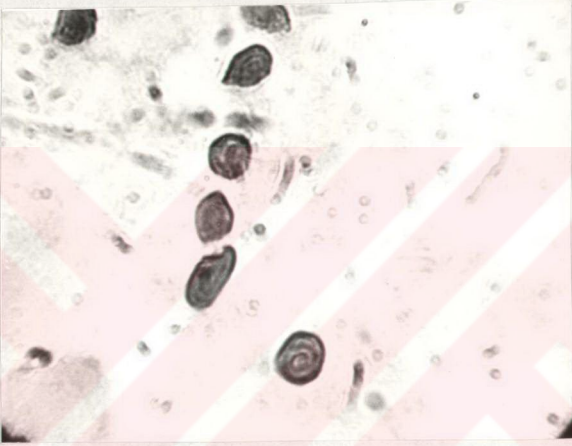


Doğal estrous döngüsünün pro-estrus evresine ait vajinal simir  
rneği resim 2 de sunulmuştur.



Resim 2. Diği farede doğal estrous döngüsünün pro-estrus evresine ait  
vajinal simir. Boya: Papanicolau. X 250. Film: Kodak, Koda  
color VR 100 ASA'lık.

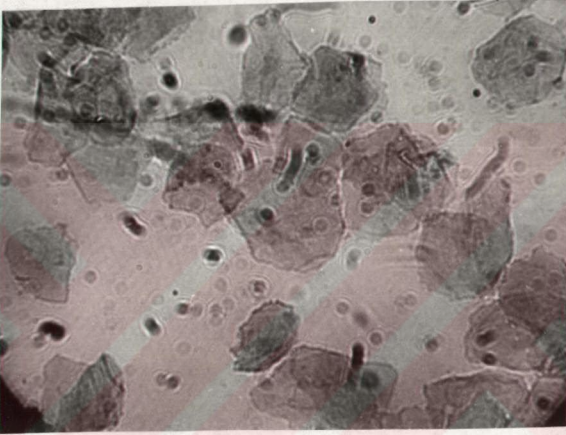
Doğal estrous döngüsünün early estrus evresine ait vajinal simir rneği resim 3 de sunulmuştur.



Resim 3. Dişi farede doğal estrous döngüsünün early estrus evresine ait vajinal simir. Boya: Papanicolau. X 250.

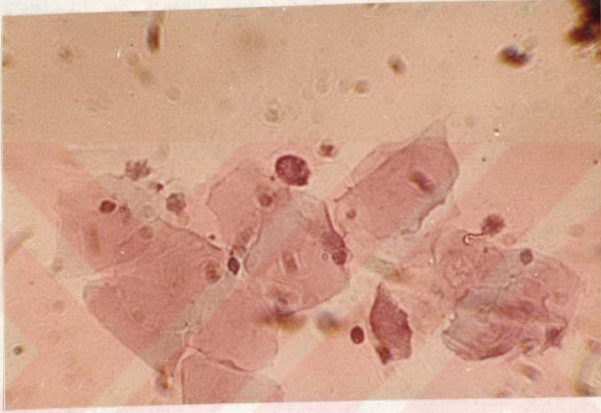


Doğal estrous döngüsünün estrus evresine ait vajinal simir  
rneği resim 4 de sunulmuştur.



Resim 4. Dişi farede doğal estrous döngüsünün estrus evresine ait  
vajinal simir. Boya: Papanicolau. X 250.

Doğal estrous döngüsünün post estrus evresine ait vajinal simir  
örneği resim 5 de sunulmuştur.



Resim 5. Dişi farede doğal estrous döngüsünün post estrus evresine ait  
vajinal simir. Boya: Papemicolau. X 250. Film: Kodak, Koda  
color VR 100 ASA'lık.

Farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulanmış aynı yaşlardaki 36 dişi farede vajinal simir yoluyla saptanan estral döngü evreleri tablo 2 de verilmiştir.

TABLO 2

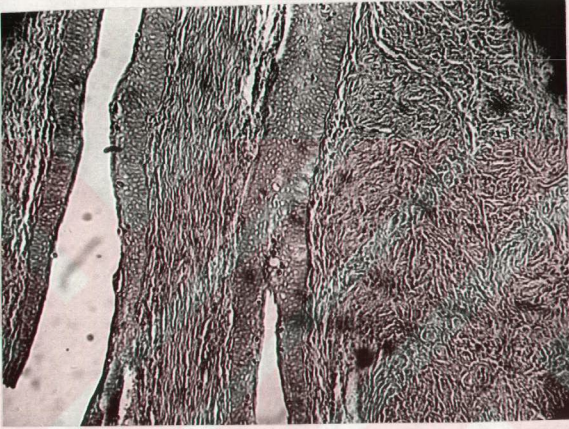
Farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulanmış dişi farelerin estrous döngüsündeki dağılımları.

GÜNLER	EVRELER						Toplam Fare Sayısı
	Diestrus	Pro-estrus	Early Estrus	Estrus	Post Estrus		
1	X n	-	-	-	36	-	36
	XX %	-	-	-	100	-	
2	n	-	-	-	36	-	36
	%	-	-	-	100	-	
3	n	-	-	-	36	-	36
	%	-	-	-	100	-	
N <sup>XXX</sup>	-	-	-	108	-	108	

- X Herbir evredeki fare sayısı (günlük)  
 XX Herbir evredeki fare sayısının toplam fare sayısına oranı  
 XXX Estrous döngüsü boyunca her bir evredeki toplam fare sayısı

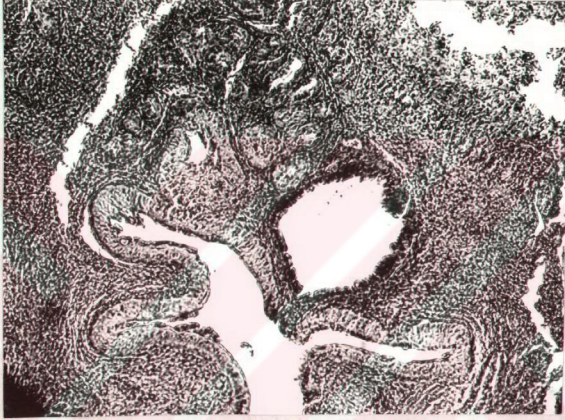


Farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulanmış farelerden çıkarılmış vajinadan hazırlanan histolojik preparat örneği resim 6 da sunulmuştur.



Resim 6. Dişi farede farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulandıktan sonra çıkarılmış vajinadan hazırlanan histolojik preparat.  
Boya: Hematoxilen eozin. X 63

Farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulanmış farelerden çıkarılmış ekto servixten hazırlanan histolojik preparat örneği resim 7 de sunulmuştur.

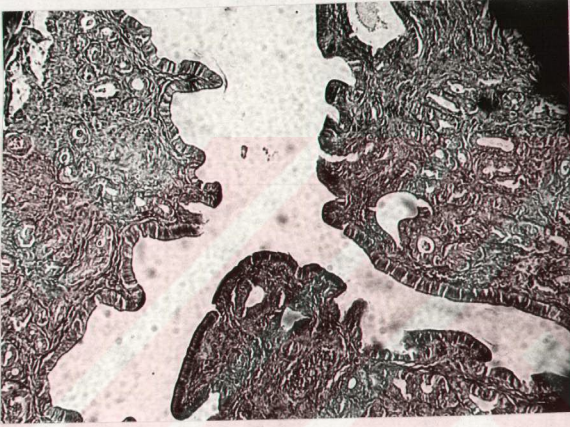


Resim 7. Dişi farede farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulandıktan sonra çıkarılmış ekto servixten hazırlanan histolojik preparat.

Boya: Hematoxylen eozin. X 63.



Farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulanmış farelerden çıkarılmış erken post estrus evresinde bulunan uterustan hazırlanmış histolojik preparat örneği resim 8 de sunulmuştur.



Resim 8. Dişi farede farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulandıktan sonra çıkarılmış erken post estrus evresinde bulunan uterusa ait histolojik preparat. Boya: Hematoxylen eozin. X 63.

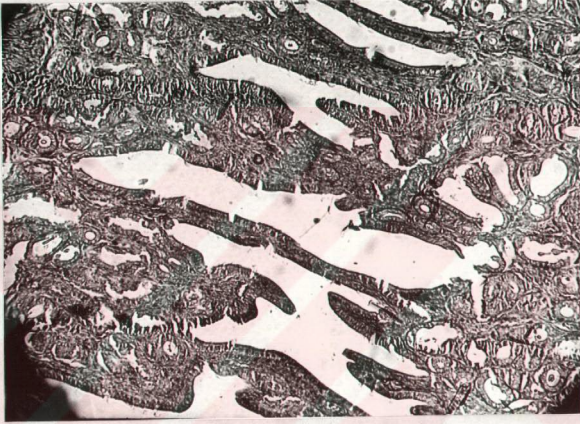
Farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulanmış farelerden çıkarılmış geç post estrus evresinde bulunan uterustan hazırlanmış histolojik preparat örneği resim 9 da sunulmuştur.



Resim 9. Dişi farede farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulandıktan sonra çıkarılmış geç post estrus evresinde bulunan uterusu ait histolojik preparat. Boya: Hematoxylen eozin. X 63.



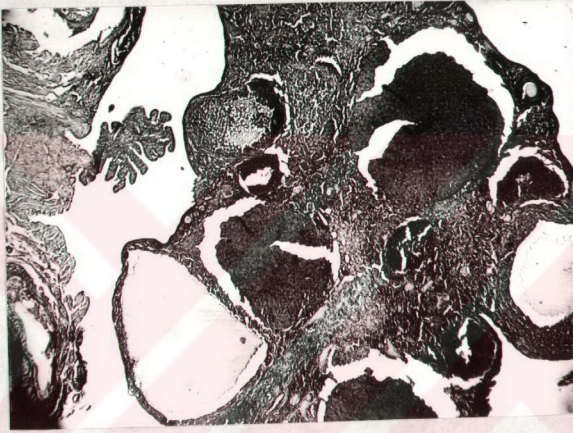
Farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulanmış farelerden çıkarılmış geç pro-estrus evresinde bulunan uterustan hazırlanmış histolojik preparat örneği resim 10 da sunulmuştur.



Resim 10. Dişi farede farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulandıktan sonra çıkarılmış geç pro-estrus evresinde bulunan uterusu ait histolojik preparat. Boya: Hemstoxiylen eozin. X 63.



Farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulanmış farelerden çıkarılmış ovaryum ve ovidukt fimbriasından hazırlanmış histolojik preparat örneği resim 11 de sunulmuştur.



Resim 11. Dişi farede farmakolojik senkronizasyon yöntemi uygulandıktan sonra çıkarılmış ovaryum ve ovidukt fimbriasına ait histolojik preparat. Boya: Hematoxylen eozin. X 63.

## T A R T I Ő M A v e S O N U Ğ

Ana ereğimiz olan in vitro fertilizasyona giden yolun başında yer alan deney hayvanlarındaki in vitro fertilizasyon uygulamasının ilk basamağı, seğilen deney hayvanındaki temel üreme sisteminin makroskobik ve mikroskobik anatomisi ile fizyolojisinin aydınlatılması ve gerekli becerinin kazanılmasıdır. Bu amaca yönelik çalışmamızda karşılaştığımız ilk sorun, kullanılacak deney hayvanının seğimidir.

Bu çalışmadan primatları kullanmak, amacımıza çok daha uygun olmasına karşın, içinde bulunduğumuz koşullar buna olanak vermemektedir. Literatürde in vitro çalışmalarda en sık kullanılan materyaller; tavşan, hamster, sıçan ve fare olarak bildirilmiştir (5). Biz bu çalışmada materyal olarak fareyi seçtik.

Fare, içinde bulunduğumuz laboratuvar koşullarında gerek bakımı ve gerekse beslenmesi daha uygun olan bir deney hayvanı olup, çiftleştirilmesi ve elde tutulması da diğer laboratuvar hayvanlarına kıyasla daha kolaydır. Fare, kısa bir gestasyon periyoduna (18-21 gün) ve uzun bir üreme aktivitesine (2-14 aylık) sahiptir ve her doğumda yaklaşık 10 yavru olmak üzere üreme aktivitesi boyunca toplam 100 yavru verebilmektedir (19). Ayrıca soylar veya türler arasında, ya doğal veya yapay olarak, daha sağlıklı, daha büyük ve araştırmalara daha dirençli hibrid yavrular üretmek amacıyla çaprazlama yapılabilir (19). Farelerin siyah ve beyaz gibi birbirine zıt iki post rengine sahip olması da araştırmalar için diğer büyük bir avantajdır.

Bütün bu veriler, üreme fizyolojisi konusundaki araştırmalarda

kullanılabilecek en uygun hayvan olarak fareyi karşımıza çıkardığından, çalışmamızda model hayvan olarak laboratuvarımızda inbred üretilmiş albino fareyi seçtik.

İstatiksel değerlendirmede örnek sayısının en az 30 olması gerektiğinden ve histolojik preparatlar hazırlanması aşamasında kullandığımız deney şeması en az 36 hayvan içerdiğinden, deney sırasında oluşabilecek çeşitli hataları da göz önüne alarak çalışmamızda 50 fare kullandık. Gerçekten de bu çalışmalar esnasında 14 hayvanı (%28) çeşitli nedenlerle kaybettik. Bu bulgu, ülkemiz koşullarında farelerle yapılacak deneylerde seçilecek fare sayısının, istatistiksel değerlendirmede gerekli olandan en az %28 fazla olması gerektiğini göstermektedir.

Kullanılan fareler, galvanize saçtan ve sık delikli tel örgüden yapılmış olan geniş kafeslerde tutulmuştur. Çünkü bu kafeslerin temizlenmesi ve dezenfekte edilmesi kolaydır. Ayrıca araştırmamızın bir basamağı, fareleri doğal senkronizasyon için bir arada tutulmasını gerektirdiğinden, kafeslerin geniş olması çalışmanın kolay yürütülmesi açısından avantaj sağlamıştır.

Farelerin bulunduğu odanın sıcaklığı, gerek sağlığı ve gerekse fizyolojik işlergelerini yürütebilme açısından önemli bir faktör olup, ideal sıcaklık 20-25 °C olarak bildirilmiştir (16). Bu nedenle çalışmamız boyunca farelerin bulunduğu odanın sıcaklığının 20-25°C arasında tutulmasına özen gösterilmiştir.

Farelerin bulunduğu odanın, otomatik bir saat aracılığıyla 06.00-18.00 saatleri arasında karanlık, 18.00-06.00 saatleri arasında ise aydınlık olması sağlanmıştır. Çünkü estrous döngüsündeki değişikliklerin

diurnal ışık döngüsüyle ilişkili olduğu ve deneysel olarak değiştirilebileceği bildirilmektedir (19).

Yurtlarda birlikte yaşayan kadınların menstrual döngülerinde senkronizasyon oluştuğuna dair deliller vardır (10). Bu çalışmada, dişi farelerin estrous döngülerinin doğal senkronizasyonu amacıyla 50 tane dişi fare 4 ayrı kafese paylaştırılmış ve aynı odada 15 gün süreyle bir arada tutulmuşlardır. Daha sonra estral senkronizasyonun olup olmadığını anlamak, maturasyon ve estrous döngüsünün evrelerine bağlı olarak meydana gelen varyasyonları izlemek için her dişi fareden 5 gün boyunca, kolaylık açısından ucu yakılarak inceltilmiş olan bir pipet kullanarak vajinal simir alınmıştır. Vajinal simir preparatlarının mikroskopta incelenerek değerlendirilmesi sonucu elde edilen tablo 1, farelerin bir arada tutulmasının estrous döngülerinde doğal senkronizasyon oluşturmadığını göstermiştir. Bu çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuca dayanarak, en azından fareler için üç veya daha az döngü boyunca ortak yaşamının, menstrual senkronizasyona sebep olmadığını söyleyebiliriz. Bir kez senkronizasyondan sonra, bu eş ritmin devam edip etmediğini araştırmayı ise başka çalışmamıza bıraktık. Çevre koşullarının bu senkronizasyondaki önemi ışık ve koku ritmiyle etkilenebilir. Bir grup dişi farenin bir süre ortak yaşamının estral döngüyü suprese ettiği ve daha sonra bunlara erkek fare idrarı koklatıldığında, estrous döngüsünün tekrar döndüğü bildirilmiştir (10). Bizim çalışmamız sırasında popülasyonumuzda erkek fare bulunmamaktaydı. Deney hayvanlarının bulunduğu blokta da erkek hayvanlar uzaklaştırıldığından, bu yolla gelecek bütün stimuluslar ortadan kaldırılmıştı. Literatürde belirtilen supresyonu biz gözlemedik.

bu çelişkinin, iki çalışma arasındaki süre farkına bağlı olduğu inancındayız.

Vajinal simir preparatlarının mikroskopik incelenmesinde estrous döngüsüne ait 5 farklı evre gözlenmiştir.

Diestrous (resim 1): Bu evrede vajinal simirde hemen hemen yalnız lökosit, tektük de küçük çekirdekli polygonal epitel bulunmaktadır. Ayrıca biraz da mukus gözlenmiştir. Diestrus evresindeki, lökositler biraz parçalanmış olup, bunun nedeni hayvandan simir alındıktan sonra hemen alkol tesbitine koyulmasından olabilir. Bu evrenin sonuçları literatürle uyusmaktadır (19).

Pro-estrus (resim 2): Vajinal simirde yaklaşık eşit sayılarda hem lökosit ve hem de çekirdekli epitel hücreleri gözlenmiştir. Epitel hücreleri küçük, polygonal olup çekirdekleri oldukça belirgindir. Sonuç literatürle uyusmaktadır (19),

Early estrus (resim 3): Vajinal simirde bazıları belirgin çekirdekli olan oldukça fazla sayıda epitel hücreleri gözlenmiştir. Sonuç literatürle uyusmaktadır (19).

Estrus (resim 4): Bu evre, büyük squamöz tipte epitel hücreleriyle karakterizedir. Ancak bu epitel hücreleri çekirdeksiz olup, simirde tektük lökosit gözlenmiştir. Literatürde ise bu evrede hiç lökosit gözlenmediği bildirilmiştir (19).

Post estrus (resim 5): Bu evrede hemen hemen eşit sayılarda lökosit ve epitel hücreleri içerdiği ve epitel hücrelerinin büyük ve kıvrılmış, çekirdeklerinin ise yarı şeffaf olduğu göze çarpmıştır. Sonuçlar literatürle uyusmaktadır (19).

Farelerin estrous döngülerinde farmakolojik senkronizasyon oluşturmak amacıyla, hayvanlarda aynı anda süperovülasyon meydana getiren iki çeşit hormon zerkinden yararlanılmıştır. Estrous döngülerinde süperovülasyon yoluyla farmakolojik senkronizasyon oluşturma çalışmalarında farelere enjekte edilen FSH/LH ve HCG miktarı oldukça değişkenlik göstermektedir ( 1, 15,20). Bu çalışmada 25 ml'lik serum fizyolojikte eritilmiş 75 I.U.'lik FSH/LH ve 500 ml'lik serum fizyolojikte eritilmiş 1500 I.U.'lik HCG çözeltileri kullanılmıştır. Çalışmada iki döngü kullanılmıştır. Çünkü çalışmamızda kullanmak için seçtiğimiz fareler, rastgele estrous döngülerine sahipti. Bu nedenle, birinci döngüde hayvan başına 1 ml FSH/LH (3 I.U. FSH + LH) çözeltisi verilerek, rastgele estrous döngüsüne sahip hayvanların, bu ilk enjeksiyonla kısmen aynı estrous döngüsüne gelmeleri amaçlanmıştır. İkinci döngüde ise hayvan başına 1 ml FSH/LH çözeltisi (3 I.U. FSH + LH) ve bundan 48 saat sonra da hayvan başına 1 ml içinde 3 I.U. HCG zerk edilerek hayvanların aynı evreye gelmeleri sağlanmıştır. FSH ve LH, hipofiz' ön lobu tarafından salgılanan gonadotropik hormonlar olup; FSH overlerde follikülün olgunlaşmasını uyarır. LH ise olgunlaşmış follikül üzerine etki yaparak, onun çatlamasını ve ovumun follikülden dışarı çıkmasını sağlar ( 2). Böylece ovulasyon olayı meydana gelmiş olur. FSH/LH çözeltisi zerki, farelerin o anda buldukları evre üzerine etki yaparak, bir süre sonra hepsinin ovulasyon evresine gelmeleri sağlanmıştır.

HCG ise, plasentadan salgılanan bir gonadotropik hormon olup, biyolojik etkisi yönünden hipofizin salgıladığı gonadotropik hormondan farklıdır ( 2). Bu hormonun en önemli görevi, estrous döngüsünün



sonunda normal olarak oluşan korpus luteum gerilemesini önleyerek progesteron ve östrojenin daha fazla miktarda salgılanmasını sağlamaktır (13).

Farelerde farmakolojik senkronizasyon oluşup oluşmadığını anlamak amacıyla vajinal simir alınmıştır. Simirlerin mikroskopta incelenmesinden sonra sonuçların tablo 2'de değerlendirilmesi, senkronizasyonun oluştuğunu göstermiştir. Sonuçta 36 farenin %100'ü estrous evresinde bulunmuştur.

### Fertilizasyon

Çiftleştirmede kullanılacak erkek fareye vazektomi, literatürde belirttilen şekilde uygulanmıştır (21). Yöntem basit ve uygulaması kolay olup, operasyondan sonra, hayvan 6 gün süren özel bir bakıma alınmıştır. Bu süre içinde yaranın iyileşme sürecini hızlandırmak için gıdaya vitamin ve antibiyotik eklenmiştir. 6. günün sonunda hayvanın operasyon dikişleri alınmıştır. Bu yolla hazırlanan vazektomili erkek, çalışmalarımızın daha sonraki evrelerinde cinsel akta katılan fakat infertil olan birim şeklinde karşımıza çıkmıştır.

HCG enjeksiyonundan hemen sonra farelerin çiftleştirilmesi için bir kısmı vazektomili erkeklerle, diğer kısmı ise vazektomi yapılmamış iki tane erkek fareyle 45 dakika birarada bırakılmıştır. Ancak vazektomili erkeklerle ve vazektomi yapılmamış erkeklerle bir arada bırakılan dişilerde vajinal plak gözlenmemiştir. Başarıyla sonuçlanan bir çiftleşmenin kanıtı dişilerde vajinal plak oluşumudur (9, 19). Plak, vazektomize erkek farelerle veya vazektomize edilmiş erkek farelerle birarada bırakılan dişilerde oluşturulabilir (19). Çalışmamızda, çiftleştirmede kul-

lanılan erkek ve dişi fareler cinsel yönden denenmemiştir, fakat cinsel yönden olgun (3-4 aylık) durumdadırlar. Literatürde hem erkek ve hem de dişi farelerin cinsel yönden denenmediği fakat cinsel yönden olgun (10 haftalık) oldukları durumlarda, plak oluşma yüzdesinin ortalama %3.5 kadar düşük olabildiği bildirilmiştir (19). Vajinal plak ve dolayısıyla çiftleşme olayının oluşmamasının nedeninin bu olabileceği düşünülmektedir.

#### Histolojik preparatların hazırlanması

İkinci FSH/LH zerkinden başlayıp, HCG zerkinden 28 saat sonrasına kadar süren yaklaşık 3 gün boyunca, verilen deney şemasına uygun olarak belirli saatlerde vajinal simiri alınan fare, derhal eterle inhalasyon yaptırılarak öldürülmüş ve iç genitaleri çıkarılmıştır. İç genitaler, pratikte dokuların tesbitinde en çok kullanılan solüsyon olan %10' luk formalinde 30 gün bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, doku takibi, dokulardan blok yapılması, bu bloklardan kesit alınması ve lemlara geçirilmesi, lemlerin boyanması gibi bir grup aşamalardan geçerek vajina, ekto. serviks, uterus, ovidukt fimbriasi ve ovaryuma ait doku preparatları hazırlanmış ve mikroskop altında incelenmiştir. İncelemede bazı preparatlarda formalin pigmentinin çökmüş olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni, dokuların tesbit solüsyonunda uzun süre bırakılmasıdır. Tesbit solüsyonunda normal bırakma süresi (2-4 gün) arasında değişmektedir.

#### Vajinal simirler

İkinci FSH/LH zerkinden HCG zerkini izleyen 28 saat sonrasına kadar süren 3 gün boyunca deney şemasına uygun olarak hayvanlardan 36 grup halinde alınan simirlerin tamamı estrous tablosuna uymaktadır. Bir başka



deyişle, bu hayvanlar vajinal simire göre anılan 3 gün süresi boyunca estrous evresini korumuşlardır. Bu da literatürde verilen 1-3 günlük sürenin son sınırını temsil etmektedir. Bütün deney hayvanlarının normal sınırların üst sınırında kalması düşünölemeyeceğine göre, kanımızca vajinal simir morfolojisi evre dönüşümlerinde fizyolojik değişime aynı hızda ayak uyduramamakta ve geri kalmaktadır. Bu nedenle pratik ve araştırma amacıyla evre tesbütünde vajinal simir ancak genel ve kaba bir gösterge olarak etkili olabilir.

### Vajina

Üç gün boyunca verilen deney şemasına uygun olarak çıkarılan vajinaya ait histolojik preparatların mikroskopta incelenmesi sonucu, bütün preparatlarda vajen histolojisinde anılan süre içerisinde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu preparatlara tipik bir örnek, resim 6'da sunulmuştur. Buna göre vajinal kanala yakın yüzeysel çok katlı yassı epitel ve derindeki elastik liflerden zengin lamina propria ile geniş alanı kaplayan değişik yönlerde seyreden kas demetleri görölmektedir.

### Ekto servix

Servixe ait histolojik preparatların incelenmesinde deney şemasındaki evrelere ait servixlerin anatomik olarak alınamamış olduğu saptanmış olup, mevcut tek servix örneği resim 7'de sunulmuştur. Bu preparatın mikroskobik incelenmesinde kesitin vajene yakın servikal bölgeye ait olduğu görölmüştür. Buna göre luminal yüzeyde mukozayı oluşturan çok katlı yassı epitel ve tek sıralı prizmatik epitelle döşeli bez kesitleri içeren elastik liflerden zengin çok katlı yassı epitel ve lamina propria

seçilmektedir.

### Uterus

Uterustan hazırlanan preparatların mikroskopta incelenmesi sonucu, uterus endometriyumun 3 gün boyunca 3 farklı evrede olduğu gözlenmiştir. Kesimin başladığı ilk gün, uterus endometriyumu erken post estrus dönemde olup, endometrial mukozanın lamina propriasında yer alan bez epitelinde çoğunluğu bazalde yerleşmiş glikojen vakuelleri seçilmektedir (resim 8).

Uterus endometriyumunda ikinci evre olarak geç post estrus görülmüştür. Buna göre endometriyumda kıvrıntılı hal almış bezler bulunmakta olup, daha derinde endometriyuma ait düz kas lifleri seçilmektedir (resim 9).

Uterus endometriyumunda üçüncü evre olarak geç pro-estrus dönem görülmüştür. Endometriyumun kalınlığı artmış, endometriyal bezlerden bazılarının yalancı çok katlı epitel ile döşeli olduğu görülmüştür (resim 10).

Her 3. evreye ait uterus preparatlarının incelenmesinde, desidual hücre reaksiyonu gözlenmemiştir. Gerçekten de fertilizasyon deneyindeki eşleştirmede, vajinal plak tesbit etmeyişimiz, uterusta desidual hücre reaksiyonu gözleyemeyişimiz ile uyusmaktadır. Yani yaptığımız bu çalışmanın sonucuna göre, literatürde de belirtildiği gibi fertilizasyonun kullanılabilir ilk güvenilir işareti vajinal plakin tesbiti olmalıdır (19).

### Ovaryum ve ovidukt fimbriası

Ovaryuma ait histolojik preparatların incelenmesinde 3 gün sü-

ren kesim boyunca, ovaryumlarda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Ovaryuma ve ovidukt fimbriasına ait tipik örnek resim 11'de sunulmuştur. Buna göre, ovaryum içte medulla kısma ve daha periferde kortex kısmına sahip olup, periferdeki kortex kısmında çeşitli maturasyon evreleri gösteren, bir kısmı ise kistik hal olmuş follikül yapıları seçilmektedir. Follikül yapılarının yanı sıra korpus albicanslar da gözlenmiştir.

Estrus, faredeki menstrual döngüde amaçlarımız yönünden ön önemli evreyi oluşturmaktadır. Bunun nedeni ovulasyonun sadece bu dönemde kısıtlı kalmasıdır.



## Ö Z E T

Bu araştırmada farenin estrous öncesi ve sonrası evrelerini içeren histolojik bir atlas oluşturulmasına, estrous senkronizasyonu- na ve vazektomili hayvan oluşturulmasına çalışılmıştır.

Çalışmanın amacı daha sonra yapmayı planladığımız insanlarda in vitro fertilizasyon uygulamasına geçmeden önce, materyal olarak seçtiğimiz faredeki temel üreme sistemine makroskobik ve mikroskobik anatomisi ile fizyolojisini aydınlatılması, gerekli becerinin kazanılması ve böylece in vitro fertilizasyon uygulamasına geçmeden önce gerekli ön çalışmaların tamamlanmasıdır.

Çalışmada, farelerdeki, estrouz döngüsünün doğal senkronizasyonu için 50 tane dişi fare 15 gün süre ile birarada tutulmuş ve sonra bu farelerden alınan vajinal simir örneklerinin değerlendirilmesi sonucu, doğal estrous senkronizasyonunun oluşmadığı gözlenmiştir.

Farelerin estrous döngüleri arasında farmakolojik senkronizasyon oluşturmak amacıyla, iki döngü boyunca FSH/LH ve HCG hormonları, verilen deney şemasına uygun olarak enjekte edilmiş ve sonuçların değerlendirilmesi sonucunda, farelerde senkronizasyonun oluştuğu ve %100'nün estrus evresinde olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızın diğer bir basamağında farmakolojik senkronizasyon oluşturulmuş farelerden çıkarılan vajina, ektoservix, uterus, ovaryum ve ovidukt fimbriasından doku preparatları hazırlanmış ve mikroskopta incelenmiştir.

## K A Y N A K L A R

1. ACKERMAN, S.B., SWANSON, R.J., STOKES, G.K., VEECK, L.L.: Culture of mouse preimplantation fertilization, *Gamete Research* 9:145-152, 1984.
2. ARAS, K.: *Tıbbi Biyokimya Hormonları*, A.Ü. Tıp Fak. Yayınları, Ankara, 1974.
3. ARTUN, B.S.: *Evcil Hayvanlarda Operasyon Bilgisi, Cilt II*, A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara, s. 322-355, 1970.
4. BAKER, T.G.: Electron Microscopy of the primary and secondary oocyte, *Advances in the Biosciences, Schering Symposium on Intrinsic and Extrinsic Factors in Early Mammalian Development Venice*, Ed.: Gerhard Rospe, Oxford, Pergamon Press, Vieweg, 6:7-27, 1970.
5. BRINSTER, R.L., BIGGERS, J.D.: In vitro fertilization of mouse ova within the explanted fallopian tube, *Reprod. Fertility*, 10:277-279, 1965.
6. COHEN, J., DEBACHE, C., MANDELBAUM, J., PIGEAU, F., PLACHOT, M.: Endocrinology of the menstrual cycle with reference to fertilization in vitro, *Human conception in vitro, proceedings of the first Bourn Hall meeting*, Ed.: R.G. Edwards, London, Academic Press, Pt 4, 1982.
7. DICKMANN, Z.: Sperm penetration into and through the zona pellucida of the mammalian egg, preimplantation stages of pregnancy, *A Ciba Foundation Symposium*, Ed. G.E.W. Wolstenholme, London, Churchill, P. 169, 1965.

8. ECKSTEIN, P., ZUCKERMAN, S.: Morphology of the reproductive tract, Marshall's Physiology of Reproduction, Ed. A.S. Parkers, third ed., Chap 2, London, Longmans, 1:43-155, 1956.
9. ECKSTEIN, P., ZUCKERMANN, S.: Changes in the accessory reproductive organs of the non-pregnant female, Marshall's physiology of Reproduction, Ed. A.S. Parkers, third ed., chap 6, London, Longmans, 1:543-654, 1956.
10. EDWARDS, R.G.: Coception in the Human Female, Chap. 3, London, Academic Press, P. 99, 1980.
11. ERENÇİN, Z. : Özel Histoloji, A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara, s. 322-355, 1971.
12. FOLLEY, S.J.: Lactation, Marshall's Physiology of Reproduction, Ed. A.S. Parkers, third ed., Chap. 20, London, Longmans, 2:525-647, 1952.
13. GUYTON, C.A.: Fizyoloji, Cilt 3, Güven Kitabevi, Ankara, s. 459-486, 1978.
14. MAMMOND, J.: Fertility, Marshall's Physiology of Reproduction, Ed., A.S. Parkers, third ed., Chap 21, London, Longmans, 2:648-740, 1952.
15. Mc LAREN, A. : Superpregnancy in the mouse, J.Exp. Biol ., 36: 281-300, 1959.
16. MERDİVENÇİ, A. ; Laboratuvar Hayvanı, Bakımı, Üretimi ve Deney Tekniği, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayınları, İstanbul, s. 58-72, 1971.
17. RUGH, R.: Laboratory Manuel of Vertebrate Embryology, fifth Ed., Minneapolis, Burgess Publishing Company, p. 182-198, 1961.
18. RUGH, R.: Experimental Embryology, third ed., Minneapolis, Burgess Publishing Company, p. 449-466, 1962.

19. RUGH, R.: The mouse, its Reproduction end Development Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1968.
20. RUNNER, M.N., PALM, J.: Transplantation and survival of unfertilized ova of the mouse in relation to postovulatory age, journal Exp. Zool., 124: 303, 1953.
21. WAYNEPORTH, H.B.: Experimental end Surgical Technique in the Ret, London, Academic Press, p. 160-161, 1980.

