

Wistar Ratlarda Gebe Kısarak Serum Gonadotrophini (PMSG) ve İnsan Korionik Gonadotrophini (HCG) İle Uyarılan Follüküler Gelişimin Vaginal Smear Bulguları Üzerine Etkileri

Bayazıt MUSAL* Güneş ERDOĞAN** Bilginer TUNA***

Geliş Tarihi: 02.01.2003
Kabul Tarihi: 17.03.2003

Özet: Bu çalışmada 25 erişkin dişi Wistar ratta siklus dönemlerine bakılmaksızın farklı doz ve aralıklarla gebe kısarak serum gonadotropini (PMSG) ve İnsan korionik gonadotropini (HCG) ile süperfolliküstasyon ve süperovulasyon gerçekleştirildi. Ratlar dört deneme ve bir kontrol grubu olmak üzere beş gruba ayrılarak 0. saatten başlayarak sırasıyla I., II., III., IV. Gruplar ve Kontrol grubuna şu uygulamalar yapıldı: Grup I: 40 IU PMSG, 24. saatte 20 IU HCG; Grup II: 20 IU PMSG, 24. saatte 20 IU HCG; Grup III: 40 IU PMSG, 48. saatte 20 IU HCG; Grup IV: 20 IU PMSG, 48. saatte 20 IU HCG; Kontrol: Yalnız 4 IU PMSG. Bütün hayvanlarda 0. saatten başlayarak 12 saat ara ile 72. saate kadar vaginal smear örnekleri alınarak seksüel siklusların seyri ve vagina epitelinin egzozjen gonadotropinlere duyarlılığı incelendi. Alınan smearlarda bazal/parabazal, intermedier, süperfisiyel ve keratinize süperfisiyel hücreler sayılarak yüzdeleri belirlendi. Çalışmada süperovulasyon dozlarında uygulanan PMSG'nin neden olduğu hiperöstrojenik etkinin vagina epitelinde, normal östrusta beklenenden daha hızlı değişimlere yol açtığı ve özellikle proöstrus aşamasının kontrol grubunda olduğundan daha hızlı şekillendiği görüldü. Ratlarda ovulasyonun göstergesi olarak sayılan kornifiye hücrelerin sayısındaki artışın PMSG ve HCG uygulamalarıyla uyum içerisinde şekillenmediği, bunun yerine tüm smearlarda 12 ila 60 saatlik bir döneme yayıldığı görüldü. Bu olgunun PMSG'nin uzun serum yarılanma ömrü nedeniyle şekillendiği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Rat, vaginal smear, süperovulasyon, PMSG, HCG.

Effects of Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG) and Human Chorionic Gonadotrophin (HCG) Induced Follicular Growth on Vaginal Smear Findings in Wistar Rats

Summary: In this study Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG) and Human Chorionic Gonadotrophin (HCG) were used to induce superfolliculation and superovulation on 25 adult Wistar rats without regarding the stage of sexual cycles. Rats were divided to a total of five groups as four trial and one control group and the following injections were given beginning on hour 0: Group I: 20 IU HCG 24 h. after 40 IU PMSG; Group II: 20 IU HCG 24 h. after 20 IU PMSG; Group III: 20 IU HCG 48 h. after 40 IU PMSG; Group IV: 20 IU HCG 48 h. after 20 IU PMSG; Control: Only 4 IU PMSG. Vaginal smears were taken with an interval of 12 hours, between 0 – 72 hours, from all of the animals in order to determine the progression of sexual cycle and the sensitivity of vaginal epithelium to exogenous gonadotrophins. The percentages of basal/parabasal, intermediate, superficial and cornified cells were determined by counting. It was observed that superovulatory doses of PMSG caused a more rapid progression than seen in normal cycles and the initiation of proestrus stage were faster than observed in the control group, owing to the hyperstrogenic effect on vaginal epithelium. It was observed that the rise in the percentage of cornified cells which is an indicator of ovulation were not in accordance with the injections of PMSG and HCG on the contrary it was distributed within a period of 12 to 60 hours. It was concluded that this effect was caused as a result of long serum half-life of PMSG.

Key Words: Rat, vaginal smear, süperovulation, PMSG, HCG.

* Yard. Doç. Dr.; ADÜ Vet. Fak. Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın-Türkiye.

** Dr. Araş. Gör.; ADÜ Vet. Fak. Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın-Türkiye.

*** Araş. Gör.; ADÜ Vet. Fak. Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın-Türkiye.

Giriş

Ovaryumların egzojen gonadotropinlerle hiperstimulasyonu ve bu yolla oosit eldesi ratlarda geniş çaplı uygulama ve araştırma alanı bulmuştur. FSH (Folikül Uyarıcı Hormon), PMSG (Gebe Kısırak Serum Gonadotropini) LH (Lüteinizasyon Hormonu) veya HCG (İnsan Koriyonik Gonadotropini) gibi gonadotropinlerle yapılan çalışmalarda ovaryumların aşırı uyarımının hormon dengelerini etkilediği, östrojen ve progesteronun endometrium morfolojisi üzerinde değişimlere yol açtığı bildirilmiştir¹¹. Bu tür değişimlerin in vitro fertilizasyon ve embriyo transferi çalışmalarında başarı oranlarını etkilediği sanılmaktadır. Ratlarda vaginal sitoloji reproduktif çalışmalarda seksüel siklusun aşamalarını belirlemek ve yeni farmakolojik bileşenlerin vagina epiteli üzerine etkilerini araştırmak amacıyla kullanılmaktadır^{3,7}. Normal östrus siklusu uzunluğu ratlarda 4 ila 6 gün olup, proöstrus (12 saat), östrus (12 saat), erken metaöstrus (15 saat), geç metaöstrus (6 saat) ve diöstrus (57 saat) aşamalarından oluşmaktadır. Ovulasyon spontandır ve östrus evresinde görülür. Smearlarda bazal / parabazal, intermedier, süperfisiyel ve keratinize süperfisiyel hücre tipleri görülürken siklus döneminin belirlenmesinde polimorf nötrofiller de önem taşımaktadır^{3,4}. Vagina epiteli ovaryum steroidlerine, özellikle de östrojenlere karşı keratinize epitel hücrelerindeki belirgin bir artışla yanıt vermektedir⁷. Daly ve Kramer1 egzojen gonadotropin uygulamaları ile oluşan vaginal değişimleri inceledikleri bir araştırmada ovaryumların hiperstimulasyonu ile yüksek düzeyde östradiol salgılanması ve değişen östradiol: progesteron oranının erken gebelikte vagina epitelinde mukifikasyon, epitel tabakalarının sayısında azalma ve epitel kalınlığında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı ratlarda seksüel siklus dönemine bakılmaksızın PMSG ve HCG uygulamaları ile uyarılan foliküler gelişmenin vagina epitelinde oluşturduğu değişimlerin izlenmesidir.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada 25 adet erişkin Wistar rat kullanıldı. Denekler çalışmanın başlamasından dört gün önceden başlayarak oda sıcaklığı ayarlı ve havalandırılmalı bir bölmede 5 ayrı kafese eşit sayıda bölünerek, su ve yem ad libitum uygulandı. Ratlara 12 saat gece ve 12 saat gündüz ışık rejimi uygulandı.

Süperovulasyon gruplarındaki ratlara intraperitoneal yolla sırayla şu enjeksiyonlar yapıldı: Grup I: 40 IU PMSG (Folligon ® Intervet), 24. saatte 20 IU HCG (Chorulon ® Intervet); Grup II: 20 IU PMSG, 24. saatte 20 IU HCG; Grup III: 40 IU PMSG, 48. saatte 20 IU HCG; Grup IV: 20 IU PMSG, 48. saatte 20 IU HCG. Kontrol grubunda ise 0. saatte yalnızca 4 IU PMSG uygulandı.

Vaginal smearlar tüm deneklerden 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72. saatlerde, izotonik solüsyonla ıslatılmış ince pamuk eküvyonlarla smear örnekleri alınarak bir damla methylene blue solüsyonu ile direkt olarak boyanarak, lamelle kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi. Epitel hücreleri bazal-parabazal, intermedier, süperfisiyel ve keratinize süperfisiyel hücreler olmak üzere sınıflandırılarak sayılarak smear içerisindeki yüzde değerleri belirlendi. Polimorf nükleer lökositlerin görülme sıklığı ise, hiç (-), veya orta ve yüksek (+) olarak kaydedildi. Smearın makroskopik görünümü ve mukifikasyon bulguları da ayrıca not edildi.

Tüm bulgular istatistik yöntemlerle değerlendirildi. Kontrol grubu ile süperovulasyon grupları One Way Anova ve Dunnett t-test ile, lökositlerin görülme sıklığının gruplar arası karşılaştırılması ise Ki kare testiyle yapıldı⁶.

Bulgular

Hücrelerin yüzde değerleri tablo II'de sunulmaktadır. Sıfırıncı saatte bazal/parabazal, intermedier hücreler arasında gruplar arasında belirgin farklılıklar görülmezken, süperfisiyel hücre sayılarının Grup III'de (% 37,2) kontrol grubuna (% 3,6) göre; keratinize süperfisiyel hücre sayılarının Grup I'de (% 36,8) kontrol grubuna (% 79,8) göre belirgin derecede farklı olduğu görüldü ($p < 0.05$). Grup II (% 78,4) ve IV'de (% 79,6) ise keratinize süperfisiyel hücrelerin kontrol grubuna benzer şekilde tabloya hakim olduğu belirlendi.

Onikinci saatte Grup I'de bazal/parabazal ve intermedier hücrelerin tamamen ortadan kalktığı buna karşın çekirdekli ve çekirdeksiz süperfisiyel hücre sayılarının sırasıyla % 74,6 ve % 25,4'e yükseldiği gözlemlendi. Grup II ve III'de 0. saate göre fazla bir değişim olmazken, Grup IV ve kontrol grubunda tablonun bazal/parabazal hücrelere doğru kaydığı belirlendi.

Yirmidördüncü saatte kontrol grubunda çekirdekli süperfisiyel hücrelerde artış görülürken,

keratinize hücrelerin Grup III'de (% 76,2) kontrol grubuna (% 23) göre belirgin ölçüde yükseldiği belirlendi ($p<0.05$).

Tablo I. Tüm gruplardan alınan smearlarda vagina epiteli hücrelerinin ortalama yüzde değerleri

Table I. Mean percentages of cell types of vaginal epithelium in all groups

Saatler		0	12	24	36	48	60	72	
Hücre tipi	Bazal / Parabazal h. (%)	G I	32,8	0	22	38	20	24,4	36
		G II	5,2	13,2	26,4	23,8	43,8	30	13,6
		G III	12	10	17	32,8	64,8	35,8	53,2
		G IV	11,2	51	39,2	43,8	43,6	5,8	35
		K	16	35,4	49	41,2	28,2	13,4	22,6
	İntermedier h. (%)	G I	5,6	0	2,2	0	0	16	11,4
		G II	0,6	1	3,4	12,8	7,8	0,6	0,2
		G III	0	5	0,2	3,4	8,4	0	16,2
		G IV	1,2	4,6	13,4	2	2,6	4,2	10,8
		K	0,6	3,6	15	11	8,2	0	8
	Süperfişiyel h. (%)	G I	24,8	25,4	20,4	7	24	22	17
		G II	15,8	4,8	7,6	11,6	11,4	6,4	4,6
		G III	37,2**	26	6,6	15	9,6	9	10,6
		G IV	8	10,4	9,6	6,8	6,2	16,4	10,8
		K	3,6	14,8	13	14,4	18,4	13,4	8,6
	Keratinize süperfişiyel h. (%)	G I	36,8*	74,6	55,4	55	56	37,6	35,6
		G II	78,4	81	62,6	51,8	37	63	81,6
		G III	50,8	59	76,2*	48,8	17,2	55,2	20
		G IV	79,6	34	37,8	47,4	47,6	75	43,4
		K	79,8	46,2	23	33,4	45,2	77,2	60,8

Otuzaltıncı saatte Grup III'de keratinize hücre sayısının % 48,8'e düştüğü diğer gruplarda hücre sayılarında önemli değişimler şekillenmediği gözlemlendi.

Kırksekizinci saatte Grup III'de keratinize hücre sayısı % 17,2'ye düşerken bazal/parabazal hücre sayısı % 64,8'e yükseldiği ve bu artışın kontrol grubuna (% 28,2) göre belirgin derecede farklı olduğu görüldü ($p<0.05$).

Altmışıncı saatte Grup I'de intermedier hücrelerin sayısında (% 16) kontrol grubuna (% 0) göre belirgin bir yükselme, keratinize süperfişiyel hücrelerde ise kontrol grubuna göre belirgin bir düşüş (Grup I: % 37,6; Kontrol: % 77,2) gözlemlendi ($p<0.05$). Grup IV'de ise keratinize hücrelerin kontrol grubuna benzer şekilde % 75'e yükseldiği diğer gruplarda da yükselme (Grup II: % 63; Grup III: % 55,2) görüldü.

Yetmişikinci saatte alınan son smearlarda kontrol grubundaki keratinize hücrelerin oranı % 60,8 ve çekirdekli süperfişiyel hücrelerin oranı % 8,6'ya düşerken bazal/parabazal ve intermedier hücrelerin oranlarında yükselme görüldü ve sırasıyla % 22,6 ve % 8 olduğu belirlendi. Grup IV'de de benzer değişimler izlenirken, Grup I'de bir önceki saate göre önemli değişimler gözlenmedi. Grup III'de bazal/parabazal, Grup II'de keratinize hücrelerin sayısında artış (% 81,6) belirlendi.

Kontrol ve süperovulasyon gruplarında lökosit saptanan smearların oranı Tablo I'de verilmiştir. Tüm denekler sıfırıncı saatte seksüel siklusun farklı evrelerinde bulunmaktaydılar. Onikinci saatte I., II., III., ve IV. ve kontrol gruplarındaki deneklerin sırasıyla 0,3,1,4 ve 3'ünde lökosit tespit edilirken Grup I ve III'de diğer gruplara göre düşüş olduğu belirlendi. Yirmidördüncü saatte lökosit frekansının arttığı görüldü. Otuzaltı, 48 ve 60. saatlerde kontrol grubunda lökosit görülen hayvan sayısı sadece 1 olurken bu dönemde Grup I, II ve III'de 48. saatte yükselme, Grup IV'de ise 36. saatte diğer gruplara paralel bir artış gözlenirken 48 ve 60 saatlerde düşüş görüldü. Tüm gruplarda 72. saatte benzer sayıda smarda lökosit bulunduğu tespit edildi.

Tablo II. Tüm gruplarda alınan smearlarda lökosit belirlenen ratların sayısı

Table II. Frequency of leucocytes on smears of all groups

	0. saat	12. saat	24. saat	36. saat	48. saat	60. saat	72. saat
Grup I	2	0	4	3	4	3	2
Grup II	2	3	3	2	5	3	2
Grup III	2	1	3	4	5	3	3
Grup IV	3	4	5	5	2	2	2
Kontrol	2	3	4	1	1	1	3
	11	11	19	15	17	12	12
	($\chi^2=0,64$)	($\chi^2=10,8$)	($\chi^2=4,08$)	($\chi^2=10,2$)	($\chi^2=14,6$)	($\chi^2=2,69$)	($\chi^2=0,96$)

Tartışma ve Sonuç

Doğal sikluslarda proöstrus başlangıcında intermedier hücrelerin baskın hale gelirken östrojenik etkinin bu hücrelerde prekornifikasyon oluşturduğu bildirilmektedir. Bu durumda intermedier hücrelerin sitoplazması eozinofilik hale gelmekte ve nukleus büzüşmektedir⁹. Çalışmada intermedier hücrelere tüm saatlerde alınan sme-

arlarda diğer hücre tiplerine göre çok daha az oranda rastlandığı dikkati çekti. Kontrol grubundaki intermedier hücre sayılarında 24. saatte belirgin olmayan bir yükselme (% 15) ve benzer bir artışa Grup IV'de 24. saatte (% 13,4) ve Grup II'de 36. saatte (% 12,8) rastlandığı görülse de bunun normal sikluslarda rastlanan özellikte olmadığı belirlendi. 40 IU PMSG uygulanan Grup I ve Grup III'de ise intermedier hücre sayılarında hiçbir artışa rastlanmadı. Bu durum doğal sikluslarda yaklaşık 12 saat süren proöstrus aşamasının 12'şer saat ara ile alınan smearlarda fark edilemeyecek kadar hızlı bir şekilde gerçekleştiği ve hiperöstrojenik etkinin oluşturduğu prekornifikasyon etkisinin baskın olduğu izlenimini uyandırmaktadır.

Kramer ve arkadaşları⁵ egzojen gonadotropinlerle hiperstimülasyon uygulanan ratlarda, kontrol grubuna göre çiftleşmeyi izleyen ilk 2,5 – 4,5 günler arasında östradiol seviyelerinin belirgin ölçüde yüksek olduğunu belirtmektedirler. Endometrium östradiol etkisi altına girdiğinde stromanın vaskularizasyonu artmakta, salgı bezlerinde luminal dilatasyon görülmekte, yüzey ve bez epitel dokularının kalınlığı artmakta ve tüm hücrelerde mitotik indeks artmaktadır⁵. Benzer etkiler vagina epiteli üzerinde de görülmektedir. Süperovulasyon uygulanan hayvanlarda mitotik indeksteki artışın ilk 4.5 günde şekillendiği bundan sonra kontrol gruplarına göre endometriumun yüzey epitelinde ve mitotik indeksin azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir^{1,5}. Çalışmada özellikle süperovulasyon gruplarında tüm tipteki hücre sayılarının düşük olduğu dikkati çeken bulgular arasındaydı. Bu durumun yukarıda sayılan araştırmacıların bulgularıyla benzerlik gösterdiği, diğer bir deyişle hiperöstrojenik etkiden kaynaklanabileceği sanılmaktadır.

Yun ve arkadaşları¹² süperovulatör dozlarında uygulanan PMSG'nin ratlarda oosit kalitesi, ovulasyon sayısı ve steroid değerleri üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. PMSG'nin içerdiği siyalik asit nedeniyle serum yarılanma ömrü uzun olup bu şekilde LH benzeri etkinlik gösterdiği bildirilmektedir¹⁰. Diğer bazı araştırmalarda ise PMSG ile uyarılan süperfollikülasyonun ardından LH veya LH etkili bir hormonun uygulanması tercih edilmektedir^{1,2,5,11}. Bu araştırmada¹² 28 günlük prepubertal dönemdeki ratlara 4, 20 ve 40 IU dozlarında PMSG uygulanmış, kontrol grubundaki (4 IU) ratların 60 ila 72 saat aralıklarında ovulasyon gösterdiği belirlenirken, süperovulatör gruplardaki (20 ve 40 IU) ratların 24 ila 72. saat-

ler arasında ovulasyon gösterdiği belirlenmiştir. Süperovulasyon gruplarındaki ratlarda erken ovulasyon yüzdelerinin doza bağımlı olduğu ve 40 IU dozda PMSG uygulanan ratların % 60'ının ilk 36 saatte 20 IU grubundakilerin % 60'ının ise ilk 48 saatte ovule olduğu belirtilmiştir.

Ratlarda ovulasyon östrus evresinde spontan olarak gerçekleşmektedir. Östrus evresine geçişte en önemli bulgu süperfisiyel hücrelerin giderek artan keratinizasyonudur. Çalışmada keratinizasyonun maksimum olduğu saatler I., II. ve III. Gruplar için ilk 24 saat, IV. grup ve Kontrol grubu için ise 60. saatlerdir. I. grupta 0. saatte 40 IU PMSG uygulamasını takiben hızla keratinizasyon gerçekleşmiş ve 24. saatten itibaren keratinize hücrelerin yüzdesi giderek azalmıştır. Normal folliküler gelişmenin uyarıldığı Kontrol grubunda ise keratinizasyon kademeli olarak artmış ve 60. saatte % 77,2 düzeyine ulaşabilmiştir. 20 IU PMSG ve 48 saat sonra 20 IU HCG uygulanan Grup IV'de de benzer bir durum görülmektedir. Grup IV'de keratinizasyon HCG uygulamasından 12 saat sonra yani 60. saatte alınan smeaarda görülmektedir. HCG uygulaması bu grupta var olan folliküllerin gelişimini ve ovulasyonunu hızlandırıcı bir etki göstermesi ile mümkün olabilir. Bu bulgular yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla kısmen paralellik göstermektedir. 40 IU PMSG uygulaması ile hiperstimüle edilen III. grupta da keratinizasyonun 24. saatte şekillendiği görülmüş bu grupta 48. saatte HCG uygulamasından sonra 60. saatte keratinizasyonun tekrar artmasının PMSG'nin anılan uzun etkisinden kaynaklandığı ve HCG'nin bu etkiye katkıda bulunabileceği düşünülmektedir¹⁰. Keza 20 IU PMSG uygulanan ve 24. saatte HCG uygulanan II. grupta da 72. saatte tekrar belirgin bir keratinizasyon görülmektedir.

Doğal sikluslarda progesteron etkisi altındaki vaginal smeaarda, genellikle kalın mukus tabakası görülmekte, ve kendisini kaplayan hücrelerin sayıca azaldığı dikkati çekmektedir⁹. Çalışmada keratinizasyonu izleyen saatlerde beklendiği üzere başta bazal/parabazal hücrelerin oranının arttığı, ancak bu durumun düzensiz olduğu dikkati çekmiştir. Özellikle ovulasyondan hemen sonraki saatlerde alınan smearlarda hücre sayılarının az olduğu ve hücre tiplerinin tanınmasını güçleştiren yoğun hücre döküntüsünün varlığı dikkati çekmiştir. Bunun yanısıra bu smearlarda doğal sikluslarda luteal dönemde ve gebelik dönemlerindeki benzer şekilde belirgin bir mukusun varlığı belirlenmiştir.

Polimorf nükleer lökositler ratların doğal sikluslarında östrus evresi dışında her dönemde smearlarda yer almakta, en sık olarak metöstrus döneminde rastlanmaktadır. Çalışmadaki bütün gruplarda bulunan ratların smearları nötrofil lökosit görülen ve görülmeyenler olarak sınıflandırılmış ve buna göre lökosit görülen ratların oranları saatler içerisinde kendi aralarında karşılaştırılarak egzozen gonadotropinlerin bir etkisi olup olmadığı değerlendirilmiştir. Genel olarak keratinize hücrelerin oranının yükseldiği smearlarda pnn lökosit frekansının azalma eğilimi gösterdiği, östrusta olduğu belirlenen hayvanlarda ise çoğunlukla ortadan kalktığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak ratlarda egzozen gonadotropin uygulamaları ile doğal sikluslardakine benzer bir folliküler gelişmenin uyarılabildiği ve bunun vagina epitelinin durumundan izlenebildiği gözlemlenmiştir. Bu hayvanlarda oluşturulan süperfollikülyasyondan kaynaklanan hiperöstrojenik etkinin vagina epitelinde hızlı değişimlere yol açtığı ve özellikle proöstrus aşamasında, intermedier hücrelerin görülmesiyle karakterize geçiş döneminin normalden daha hızlı şekillendiği görülmüştür. Kornifiye hücre oranlarının tüm smearlarda 12 ila 60 saatlik dönemde normalin üzerinde seyretmesinin ovulasyonların geniş bir döneme yayıldığı izlenimini vermektedir. Bu durum PMSG'nin uzun serum yarılanma ömrü nedeniyle primer FSH benzeri etkisinin yanısıra LH benzeri etkinlik gösterdiği görüşünü desteklemektedir. PMSG ve HCG uygulamalarının süperovulasyon ve lüteinizasyon üzerine etkilerinin daha iyi izlenebilmesi için vaginal sitolojinin yanısıra serum steroid hormonlarındaki değişimlerin izlenmesi ile de önemli bulgular elde edileceği görüşü oluşmuştur.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan hormon preparatlarını sağlayan Intervet Veteriner İlaçları A.Ş.'ye teşekkürü bir borç biliriz.

Kaynaklar

- DALY TJ, KRAMER B. Alterations in rat vaginal histology by exogenous gonadotrophins. *J Anat* 1998; 193:469-72.
- DEKEL N, SHALGI R. Fertilization in vitro of rat oocytes undergoing maturation in response to a GnRH analogue. *J Reprod Fert* 1987; 80: 531 – 535.
- HAFEZ E S E. Laboratory Animals. In: HAFEZ ESE, ed. *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea and Febiger 363 – 378, 1987.
- HAVENAAR R, MEIJER J C, MORTON D B. Biology and husbandry of laboratory animals. In: VAN ZUTPHEN LEM ed. *Principles of laboratory animal science*. Amsterdam: Elsevier 17 – 75, 1993.
- KRAMER B, STEIN BA, VAN DER WALT LA. Exogenous gonadotrophins – serum oestrogen and progesterone and the effect on endometrial morphology in the rat. *J Anat* 1990; 173: 177 – 186.
- KUTSAL A, ALPAN O, ARPACIK R. İstatistik Uygulamalar. Ankara. Bizim Büro Basımevi, 1990.
- MONTES GS, LUQUE EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smear in the rat. *Acta. Anat* 1988; 133: 192-199.
- RACOWSKY C. Origin and production of oocytes. In PEDERSEN RA, MCLAREN A, FIRST NL eds. *Animal Applications of Research in Mammalian Development*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 45, 1991.
- SCHABERG ES. Artificial intelligence in automated classification of rat vaginal smear cells. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 1992; 14 (6): 446 – 450.
- SCHAMS D, MENZER C, SCHALLENBERGER E, HOFFMAN B, HAHN R Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: SREENAN JM ed. *Control of Reproduction in the cow*. The Hague: Martinus Nijhoff 122 – 143, 1978.
- STEIN BA, KRAMER B, DE WET G, VAN DER WALT LA. Dose dependent effects of exogenous gonadotrophins on the endometrium of the rat. *S. Afr. Med. J.* 1993; 83: 122 – 125.
- YUN YW, HO YUEN B, MOON YS. Effects of superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotrophin on oocyte quality and ovulatory and steroid hormone responses in rats. *Gamete Research* 1987; 16: 109 – 120.