

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEDİ GRANÜLOZA HÜCRE KÜLTÜRÜNDE,
FSH VE LH HORMONLARININ STEROİDOJENİK AKTİVİTE
ÜZERİNE ETKİLERİ

Özkan ŞİMŞEK
Veteriner Hekim

FİZYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şevket ARIKAN

2011-KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEDİ GRANÜLOZA HÜCRE KÜLTÜRÜNDE,
FSH VE LH HORMONLARININ STEROİDOJENİK AKTİVİTE
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Özkan ŞİMŞEK
Veteriner Hekim**

**FİZYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şevket ARIKAN**

**Bu proje Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi'nce desteklenmiştir. Proje no: 2010/03**

2011-KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16 / 06 / 2011

Prof. Dr. A. Arzu YİĞİT
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Nazmi ÇETİN
Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Prof. Dr. Şevket ARIKAN
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	V
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller	VIII
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ	5
1. 1. Dişi Kedilerde Reprodüktif Özellikler	5
1.1.1. Puberta	5
1.1.2. Östrus Siklusu	5
1.1.3. Östrus Siklusunun Evreleri	7
1.1.3.1. Proöstrus	7
1.1.3.2. Östrus	7
1.1.3.3. Postöstrus	9
1.1.3.4. Diöstrus	9
1.1.3.5. Anöstrus	10
1.1.4. Kedilerde Östrus Evresinin Belirlenmesi	11
1.1.4.1. Seksüel Davranışların Gözlemlenmesi	11
1.1.4.2. Vajinal Sitoloji	12
1.2. Ovaryumun Genel Yapısı ve Fonksiyonu	13
1.2.1. Foliküler Dönem	15
1.2.1.1. Ovaryum Folikülünün Yapısı ve Fonksiyonu	15
1.2.1.2. Folikülogenezis	16
1.2.1.2.1. Primordial Foliküller	16
1.2.1.2.2. Sekonder Foliküller	16
1.2.1.2.3. Antral Foliküller	17
1.2.2. Luteal Dönem	18

1.3. Steroid Hormon Sentezinde Kolesterolün Rolü	20
1.4. Foliküler Gelişimin Hormonal Kontrolü	22
1.5. Östrojen ve Progesteron Sentezi	23
1.6. Çalışmanın Amacı	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Araç ve Gereçler	28
2.1.1. Hayvan Materyali	28
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	29
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
2.2. Yöntem	31
2.2.1. Süperfolikülasyon Oluşturma	31
2.2.2. Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu	31
2.2.3. Hücrelerin Canlılık Oranı ve Sayımı	32
2.2.4. Hücrelerin İnkübasyonu	33
2.2.5. İnkübasyon Sırasında Hücrelere Uygulanan Muameleler	33
2.2.6. Kültür Sonrası Granüloza Hücrelerinin Boyanması	34
2.2.7. Hormon Analizi	35
2.2.7.1. Progesteron Analizi	35
2.2.7.2. Östradiol Analizi	36
2.2.8. İstatistiksel Analiz	36
3. BULGULAR	37
3.1. Hücre Boyaması	37
3.2. Hormon Analiz Bulguları	42
3.2.1. Kolesterolün Bazal Stereoidogenezis Üzerine Etkisi	42
3.2.2. Folikül Uyarıcı Hormonun Stereoidogenezis Üzerine Etkisi	44
3.2.3. Luteinleştirici Hormonun Stereoidogenezis Üzerine Etkisi	48
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR	57
EKLER	66
ÖZGEÇMİŞ	67

ÖNSÖZ

Kediler dışında birçok hayvan türünde granüloza hücrelerindeki stereoidogenezis mekanizması, in-vitro olarak araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Tarafımızdan yapılan taramalar sonucunda kedilerde bu güne kadar oluşturulmuş herhangi bir granüloza hücre kültürü protokolüne rastlanılmamıştır. Bu yüzden mevcut çalışmada öncelikle kedilerde granüloza hücre kültürü protokolünün geliştirilmesi planlanmıştır. Bununla birlikte kedi granüloza hücre kültüründe, gonadotropinlerin hücresel stereoidogenezis üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Doktora eğitimim süresince hiçbir konuda bilgisini esirgemeyen, tezimin her aşamasında yapıcı eleştirileri ve olumlu yönlendirmeleriyle bana destek olan, danışman hocam Prof. Dr. Şevket ARIKAN'a, kedi operasyonlarının yapılmasında emeği geçen Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hakan KALENDER'e, istatistiksel değerlerin analiz edilmesinde yardımını esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mehmet BAŞALAN'a, her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Arzu YİĞİT ve Yrd. Doç. Dr. Nurgül ATMACA'ya, gösterdikleri fedakârlık, sabır ve teşviklerinden dolayı aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

CYP17A1	17 α -hydroxylase
DHEA	Dehidroepiandrosterone
dk	Dakika
E2	Östradiol
ECG	Equine chorionic gonodotropin
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	Gonodotropin Salgılatıcı hormon
HDL	High-density lipoprotein
i.m.	Intra muscular
LDL	Low-density lipoprotein
LH	Luteinleştirici hormon
lt	Litre
ml	Mililitre
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ng	Nanogram
P4	Progesteron
PBS	Phosphate buffered saline
pg	Pikogram
PGF2 α	Prostaglandin F2 α

pmol	Pikomol
PMSG	Pregnant mare serum gonodotropin
PR	Progesteron reseptörü
SAS	Statistical analysis software
sn	Saniye
StAR	Steroidojenik akut regülatör
22R-HC	22R-hydroxycholesterol
3 β -HSD	3 β -hydroxysteroid dehydrogenase
%	Yüzde işareti
°C	Santigrad derece

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1	Kedide östrus siklusu	6
Şekil 1.2	Foliküler dönemde, östradiol miktarı ile östrus davranışları arasındaki ilişki	8
Şekil 1.3	Kedilerde ovaryum döngüsü	10
Şekil 1.4	A ve B, östrustaki kediler tarafından gösterilen tipik duruş pozisyonu. C, çiftleşme sırasında erkek kedinin dişiye ensesinden tutma pozisyonu. D, dişi kedinin çiftleşme sonrası yuvarlanma hareketi	11
Şekil 1.5	Kedi vajinal sitolojisi	12
Şekil 1.6	Dişi kedilerdeki üreme organları	13
Şekil 1.7	Östrus siklusunun evreleri	14
Şekil 1.8	Olgun bir folikülün şematik, morfolojik ve histolojik görüntüsü	15
Şekil 1.9	Folikül gelişimi; corpus luteum ve foliküler atreziyanın şematik gösterimi	17
Şekil 1.10	Hipotalamus, hipofiz ve ovaryum arasındaki nöroendokrin ilişkiler	19
Şekil 1.11	Gonadal steroid hormonların kimyasal yapısı ve sentezlenme yolları	21
Şekil 1.12	Kedilerde östrus siklusu boyunca hormonal değişiklikler	23
Şekil 1.13	Östradiol sentezinin mekanizması	25

Şekil 2.1	İnkübasyon öncesi trypan blue ile granüloza hücre sayımı (x200)	32
Şekil 3.1	İnkübasyon öncesi boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)	37
Şekil 3.2	İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti kontrol grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)	38
Şekil 3.3	İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti FSH (100 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)	38
Şekil 3.4	İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti LH (100 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)	39
Şekil 3.5	İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti FSH (10 ng/ml) + LH (10 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)	39
Şekil 3.6	İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti 22R-HC (10 µg/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)	40
Şekil 3.7	İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti 22R-HC (10 µg/ml) + FSH (100 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)	40
Şekil 3.8.	İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti 22R-HC (10 µg/ml) + LH (100 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)	41
Şekil 3.9	İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti 22R-HC(10 µg/ml) + FSH(10 ng/ml) + LH(10 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)	41

Şekil 3.10	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal progesteron düzeyi üzerine kolesterolün etkisi.	43
Şekil 3.11	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal östradiol düzeyi üzerine kolesterolün etkisi.	43
Şekil 3.12	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal progesteron düzeyi üzerine FSH 'ın doza bağlı etkisi.	46
Şekil 3.13	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal östradiol düzeyi üzerine FSH 'ın doza bağlı etkisi.	46
Şekil 3.14	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen progesteron düzeyi üzerine FSH 'ın LH ve 22R-HC ile kombine kullanımının etkisi.	47
Şekil 3.15	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen östradiol düzeyi üzerine FSH 'ın, LH ve 22R-HC ile kombine kullanımının etkisi.	47
Şekil 3.16	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal progesteron düzeyi üzerine LH 'ın doza bağlı etkisi.	50
Şekil 3.17	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal östradiol düzeyi üzerine LH 'ın doza bağlı etkisi.	50
Şekil 3.18	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen progesteron düzeyi üzerine LH 'ın, FSH ve 22R-HC ile kombine kullanımının etkisi.	51
Şekil 3.19	Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen östradiol düzeyi üzerine FSH 'ın, LH ve 22R-HC ile kombine kullanımının etkisi.	51

**KEDİ GRANÜLOZA HÜCRE KÜLTÜRÜNDE,
FSH VE LH HORMONLARININ STEROİDOJENİK AKTİVİTE
ÜZERİNE ETKİLERİ**

ÖZET

Bu çalışmada, kedi granüloza hücre kültüründe, 22(R)-hidroksikolesterol (22R-HC), folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH)'un progesteron ve östradiol sentezi üzerine etkileri araştırıldı.

Çalışmada toplam 18 adet dişi kedi kullanıldı. Kediler altışarlı 3 gruba ayrıldı. Birinci gruptaki kedilerden elde edilen granuloza hücreleri, bazal progesteron ve östradiol düzeylerinin belirlenmesi ile kolesterolün (10 ng/ml) progesteron ve östradiol sentezi üzerine etkisinin incelenmesinde kullanıldı. İkinci gruptaki kediler, FSH (10 ve 100 ng/ml) ile FSH ve kolesterolün (10 ng/ml) kombine kullanımının; üçüncü gruptaki kediler ise, LH (10 ve 100 ng/ml) ile LH ve kolesterolün kombine uygulanmasının bazal progesteron ve östradiol sentezi üzerine etkisinin incelenmesinde kullanıldı.

PMSG hormon uygulamasını takiben 5. günde kedilerden ovariohisterektomi operasyonu ile ovaryumlar alınarak steril şartlar altında laboratuara getirildi. Laminar flow içerisinde foliküller ikiye ayrılıp, granüloza hücreleri folikül duvarından toplandıktan sonra % 5 fetal calf serum (FCS) ile kaplanmış 24 kuyucuklu pleytte 5 gün süre ile inkübe edildi. Kültür mediumu olarak, 10^{-7} M androstenedione, % 0.1 ITS ve % 0.1 bovine serum albumin içeren Dulbecco's Modified Eagle's mediumu (DMEM) / HAM F-12 kullanıldı. Kültürün 1. ve 3. günlerinde hücrelere 22R-HC (10 ng/ml), FSH (10 ve 100 ng/ml), LH (10 ve 100 ng/ml), FSH (10 ng/ml) + LH (10 ng/ml), 22R-HC (10 ng/ml) + FSH (10 ve 100 ng/ml), 22R-HC (10 ng/ml) + LH (10 ve 100 ng/ml), 22R-HC (10 ng/ml) + FSH (10 ng/ml) + LH (10 ng/ml) uygulamaları yapıldı. Üçüncü ve beşinci günlerde ise uygulamaların yapıldığı kuyucuklardaki mediumlar toplanarak, hücrelerin sentezledikleri progesteron ve östradiol düzeyleri ölçüldü.

Kolesterolün uygulandığı gruplarda, progesteron sentezinde kültürün 3. ve 5. günlerinde, östradiol sentezinde ise sadece kültürün 5. gününde önemli bir artış gözlemlendi ($p<0.001$). Kolesterol uygulanan gruplarda bazal progesteron miktarında kültürün 3. gününde 9.1 kat ve 5. gününde ise 13.5 kat artış belirlendi. Bazal östradiol miktarında ise kültürün 3. gününde önemli bir artış bulunmamasına rağmen, 5. gününde 4.7 kat artış tespit edildi. Folikül uyarıcı hormonun her iki dozunda da progesteron sentezinde önemli bir fark bulunmamasına rağmen östradiol miktarındaki fark önemli bulundu ($p<0.001$). Luteinleştirici hormon uygulanan gruplarda bazal progesteron ve östradiol miktarında kültür süresince istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Östradiol miktarında ise sadece LH`ın yüksek doz (100 ng/ml) uygulandığı gruplarda kültürün 5. gününde, meydana gelen artış önemli bulundu ( $p<0.05$ ). Kültürde FSH ve LH`ın 22R-HC ile kombine kullanımının hem östradiol hem de progesteron miktarını önemli miktarda arttırdığı tespit edildi ($p<0.001$). Kültür sonunda, granüloza hücreleri 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) aktivitesi yönünden boyandı. Boyama sonucunda yüksek doz (100 ng/ml) FSH`ın 22R-HC (10 ng/ml) ile kombine uygulandığı grupta 3β -HSD enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak mevcut çalışma ile kedilere özel bir granüloza hücre kültürü protokolü geliştirildi. Bu protokolün, kedi granüloza hücre stereoidogenezi üzerine daha detaylı çalışmaların yapılmasına ve folikül içerisindeki etkin mekanizmaların ortaya konulmasına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Kedi, Hücre kültürü, Granüloza hücresi, FSH, Östradiol, Progesteron, LH, 22R-HC, 3β -HSD

EFFECT OF FSH AND LH ON STEROIDOGENIC ACTIVITY IN CAT GRANULOSA CELL CULTURE

SUMMARY

The objectives of this study were to examine the effects of 22R-hydroxycholesterol (22R-HC), Follicle stimulating hormone (FSH) and Luteinizing hormone (LH) on oestradiol and progesterone production by cat granulosa cells.

In this project, 18 female cats were used. The cats were assigned into three groups each having six animals. The first group was used to determine basal level of the progesterone and oestradiol, and in addition to the investigation of cholesterol (10 ng/ml) effects on basal level of the steroid synthesis. The second group was used to determine effect of FSH (10 ve 100 ng/ml) and FSH plus cholesterol (10 ng/ml) on basal level of the steroid synthesis. The remaining group was used for investigation effect of LH (10 ve 100 ng/ml) and LH plus cholesterol (10 ng/ml) on basal level of the progesterone and oestradiol in granulosa cells.

The ovaries are transferred to the laboratory under sterile conditions after collected by laparotomy operation on day 5 following PMSG injection. The follicles were bisected in the laminar flow. Granulosa cells from follicles were collected and cultured for up to 5 days in 24 well plates coated with 5% fetal calf serum (FCS) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) / HAM F-12 : supplemented with 10^{-7} M androstenedione, 0.1 % ITS and 0.1 % bovine serum albumin. The cells were treated with 22R-HC (10 ng/ml), FSH (10 ve 100 ng/ml), LH (10 ve 100 ng/ml), FSH (10 ng/ml) + LH (10 ng/ml), 22R-HC (10 ng/ml) + FSH (10 ve 100 ng/ml), 22R-HC (10 ng/ml) + LH (10 ve 100 ng/ml), 22R-HC (10 ng/ml) + FSH (10 ng/ml) + LH (10 ng/ml) on first and third day. After incubation, used medium was collected on day 3 and 5, and then measured the level of progesterone and oestradiol synthesis.

Treatment of cells with 22R-HC resulted in an increase ($p < 0.001$) in progesterone on day 3 and 5 of the culture, and in oestradiol production on day 5. When 22R-HC was used at a concentration of 10 μ g/ml, it resulted in 9.1 and 13.5

fold increase in basal progesterone production on day 3 and 5, and 4.7 fold increase in basal oestradiol production was determined on day 5, respectively. Incubation of cells with both concentrations of FSH (10 ng/ml and 100 ng/ml) resulted in significant stimulations of progesterone ($p < 0.001$) on day 3 and 5 while had no effect on oestradiol production. None of the doses of LH had any effect on oestradiol production on day 3, nor progesterone production on day 3 and 5 by granulosa cells from the follicles. However, on day 5, higher dose of LH (100 ng/ml) resulted in significant stimulation on oestradiol production ($p < 0.05$). With the inclusion of 22R-HC in to the culture system, in the presence of all doses of FSH and LH, progesterone and oestradiol productions were enhanced ($p < 0.001$). At the end of the culture, granulosa cells were stained for 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) activity. The cells which were treated with combination of 22R-HC and higher dose of FSH (100 ng/ml) stained darker for 3β -HSD enzyme activity.

The results of this study demonstrated the development of a culture system for cat granulosa cells. This system will permit the detailed study of the key factors controlling the folliculogenesis and the steroidogenesis of cat granulosa cells.

Keywords: Cat, Cell culture, Granulosa cells, FSH, Ostradiol, Progesterone, LH, 22R-HC, 3β -HSD

1. GİRİŞ

1.1. Dişi Kedilerde Reprodüktif Özellikler

1.1.1. Puberta

Dişi kedilerde puberta yaşı, ırka, günlük ışık alımına, vücut ağırlığına ve kedinin doğduğu döneme göre değişiklik gösterebilir. Kedilerin büyük çoğunluğu ilk östruslarını 2.3-2.5 kg vücut ağırlığına ulaştıklarında, ortalama 6-9 aylıkken gösterirler (Jemmett ve Evans 1997, Johnston ve ark. 2001).

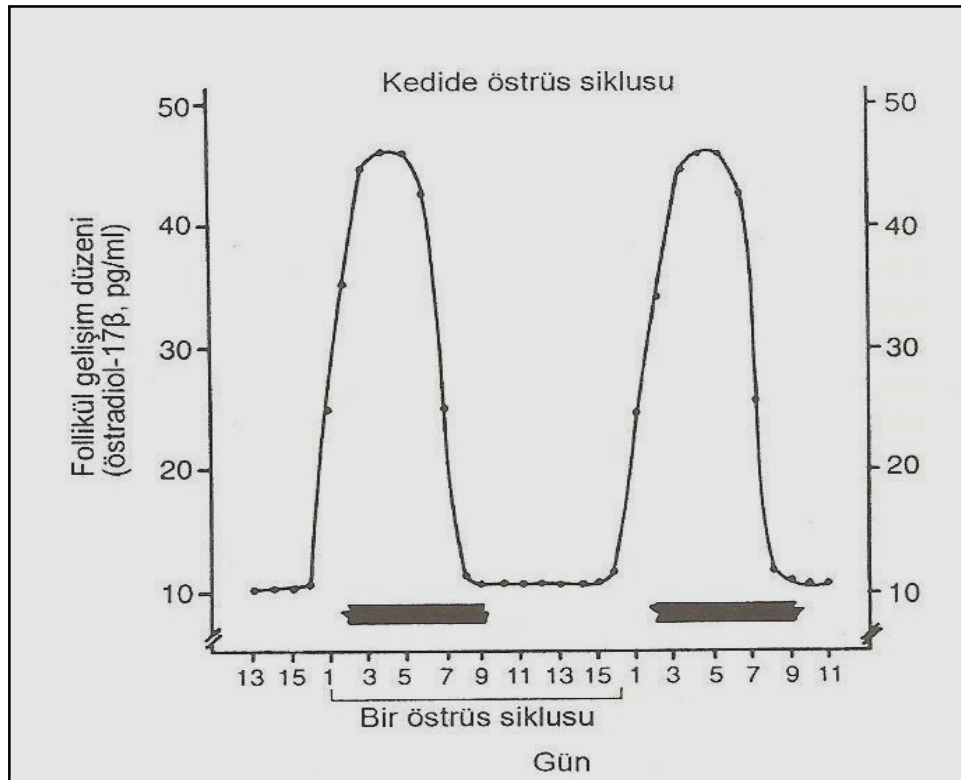
Bununla birlikte, siyam kedisi gibi oryantal ırklar daha erken dönemde (ortalama 3 aylık), iran kedisi gibi uzun tüylü bazı saf ırklar ise daha geç dönemde (ortalama 11-21 aylık) pubertaya girerler. Ekim-Aralık ayları arasında doğan dişi kediler, Ocak ayında başlayacak olan üreme sezonunda seksüel olgunluğa ulaşamayabilirler ve ilk östruslarını bir sonraki üreme sezonunda gösterirler (Christiansen 1984, Johnston ve ark. 2001). Dişi kedilerin reprodüktif yönden aktif oldukları dönem genellikle 14 yaşına kadar devam eder (Scott ve ark. 1970, Çoyan 1994).

1.1.2. Östrus Siklusu

Kediler mevsime bağlı çoklu östrus (poliöstrus) gösteren hayvanlardır. Gebelik veya yalancı gebelik şekillenmedikçe, kedilerde çiftleşme sezonu boyunca östrus siklusu tekrar eder (Şekil 1.1). Seksüel siklusların uyarılmasında artan gün ışığının önemli rolü vardır. Kuzey yarımküredeki kedilerde çiftleşme dönemi Ocak veya Şubat ayında başlar. Östrus aktivitesinin en yüksek olduğu aylar ise Şubat ve Mart aylarıdır. Genel olarak, östrus aktivitesinin ve çiftleşmenin olmadığı dönem ise Eylül ile Ocak ayları arasındaki dönemdir (Feldman ve Nelson 1996).

Yapay ışık ile de normal ovaryum aktivitesi değiştirebilir. Evde beslenen ve günlük 10 saat boyunca 100 watt'lık yapay bir ışığa maruz kalan kedilerin, yıl boyunca östrus siklusu gösterdikleri gözlenmiştir (Shille ve Sojka 1995). Sezon dışında da östrus siklusu, yapay ışığın bu şekilde arttırılması ile uyarılabilir. Bunun için en uygun ışık uygulaması 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık şeklindedir. Bununla birlikte uzun tüylü kedi ırklarının, kısa tüylü ırklara göre fotoperiyoda daha fazla hassas oldukları bildirilmiştir (Banks 1986, Shille ve Sojka 1995).

Kedilerde ve tavşanlarda ovulasyon, diğer evcil hayvanlardan farklı olarak vajinal uyarımla gerçekleşir. Vajinal uyarım çiftleşme ile uyarılabileceği gibi, cam çubuk yardımıyla da yapılabilir. Bununla birlikte görsel ve kokusal uyarımlarla da ovulasyonun gerçekleşebileceği gösterilmiştir (Feldman ve Nelson 1996).



Şekil 1.1. Kedide östrus siklusu (Thompson 2004)

1.1.3. Östrus Siklusunun Evreleri

Kedilerde östrus siklusunun evreleri, Proöstrus, Östrus, Postöstrus, Diöstrus ve Anöstrus olarak beş dönem altında incelenmektedir (Christiansen 1984).

1.1.3.1. Proöstrus

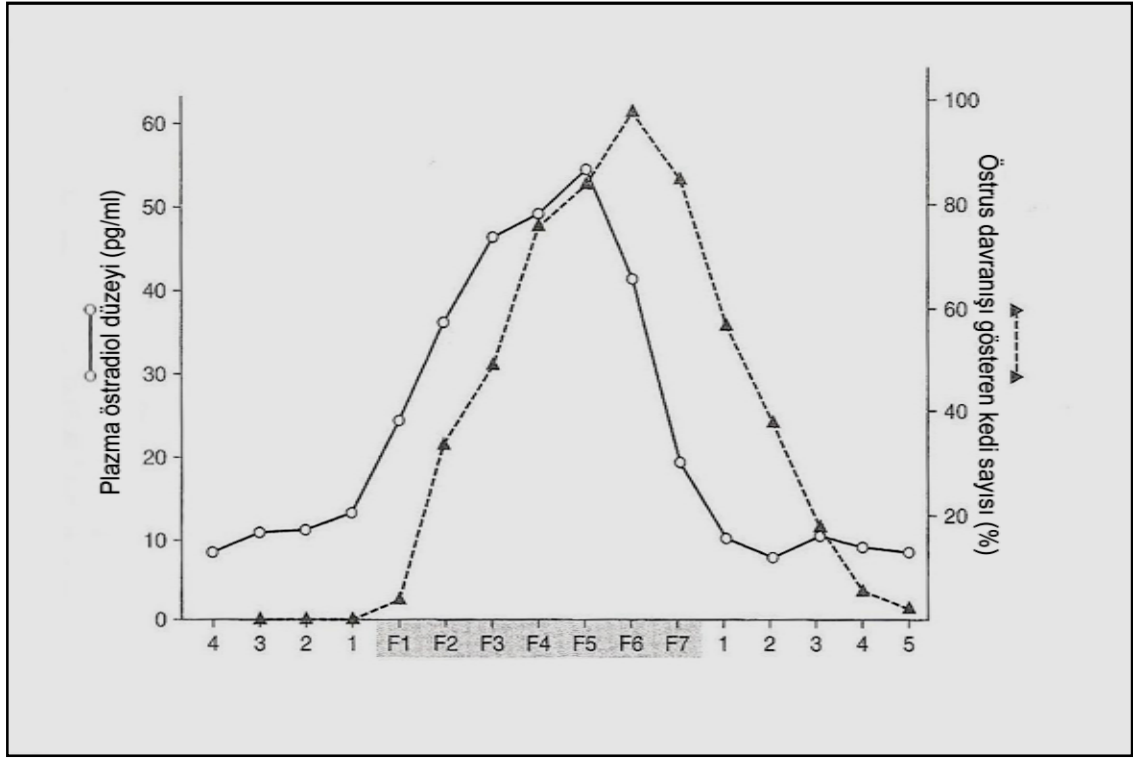
Kedilerin çoğu bu dönemde baş ve boyunlarını değişik objelere sürerler ve sıcakkanlı davranışlarda bulunurlar. Bununla birlikte bu dönemde erkek kedi ile çiftleşmeyi kabul etmezler (Feldman ve Nelson 1996). Bu dönem, ortalama 1-2 gün kadar sürmesinden dolayı çoğunlukla gözlenemeyebilir. Yapılan bir çalışmada, 168 kediden sadece 27'sinde bu dönem gözlenebilmiştir (Shille ve ark. 1979).

Proöstrus boyunca hipofiz bezinden salgılanan folikül uyarıcı hormon (FSH) ovaryumlarda folikül gelişimini uyarır. Foliküller gelişmenin başlaması ile birlikte granüloza hücreleri tarafından sentezlenen östradiolün serumdaki düzeyi artar. Östradiol artışı da vajinal kornifikasyonu ve östrus davranışlarını tetikler (Shille ve ark. 1979). Östrus davranışlarının başlaması ile birlikte foliküllerden 3-7 tanesi dominant olarak gelişir ve diğer gelişme aşamasındaki foliküller ise atrofiye uğrar (Wildt ve ark. 1981).

1.1.3.2. Östrus

Östrus, dişi kedinin çiftleşmek için erkek kediye kabul etmesi ile karakterize olan dönemdir. Bu dönemde kediler proöstrus davranışlarını daha belirgin bir şekilde gösterirler. Buna ek olarak yerde yuvarlanma, bu döneme ait özel ses çıkarma ve sırtlarına dokunulduğunda lordosis adı verilen pozisyon alma da bu döneme ait davranışlardır. Östrus dönemi ortalama 7 gün kadar sürer (Scott 1955, Feldman ve Nelson 1996).

Östrus döneminde, ovaryum üzerindeki foliküllerin çapı ortalama 3.2 mm'ye (2.6-4.1 mm) ulaşır. Foliküler aktivitenin artışı ile östradiol salgısı arasında doğru orantı vardır (Şekil 1.2) (Feldman ve Nelson 1996). Serum östradiol konsantrasyonu bu dönemde 70 pg/ml'nin üzerindedir. Östrus evresindeki kedi, 36 saat içinde 20-36 kez çiftleşebilir. Çiftleşen kedilerde östrus evresi 4-6 gün kadar sürer ve çiftleşmelerin bitiminden 24 saat sonra östrusa özgü tüm belirtiler ortadan kalkar (Shille ve ark. 1979).



Şekil 1.2. Foliküler dönemde, östradiol miktarı ile östrus davranışları arasındaki ilişki (Johnston ve ark. 2002).

1.1.3.3. Postöstrus

Dişi kediler, östrus döneminde çiftleşmez veya çiftleşir fakat ovulasyon oluşmaz ise, 8-10 gün kadar süren ve postöstrus (interöstrus) olarak adlandırılan bir döneme girer (Lofstedt 1982). Bu dönem proöstrusa kadar sürer. Bazı kaynaklar kedilerde, östrustan sonraki evre için metöstrus terimini kullanmaktadır (McDonald 1989).

Postöstrus dönemi ortalama olarak 8-10 gün kadar sürmektedir. Bu dönemde, dişi kediler seksüel davranışlar göstermez ve erkek kedi ile çiftleşmeyi kabul etmezler. Plazma östradiol düzeyi ise 20 pg/ml'nin altındadır. (Chakraborty ve ark. 1982, Van Haaften ve ark. 1994, Graham ve ark. 1996, Onclin ve ark. 2001).

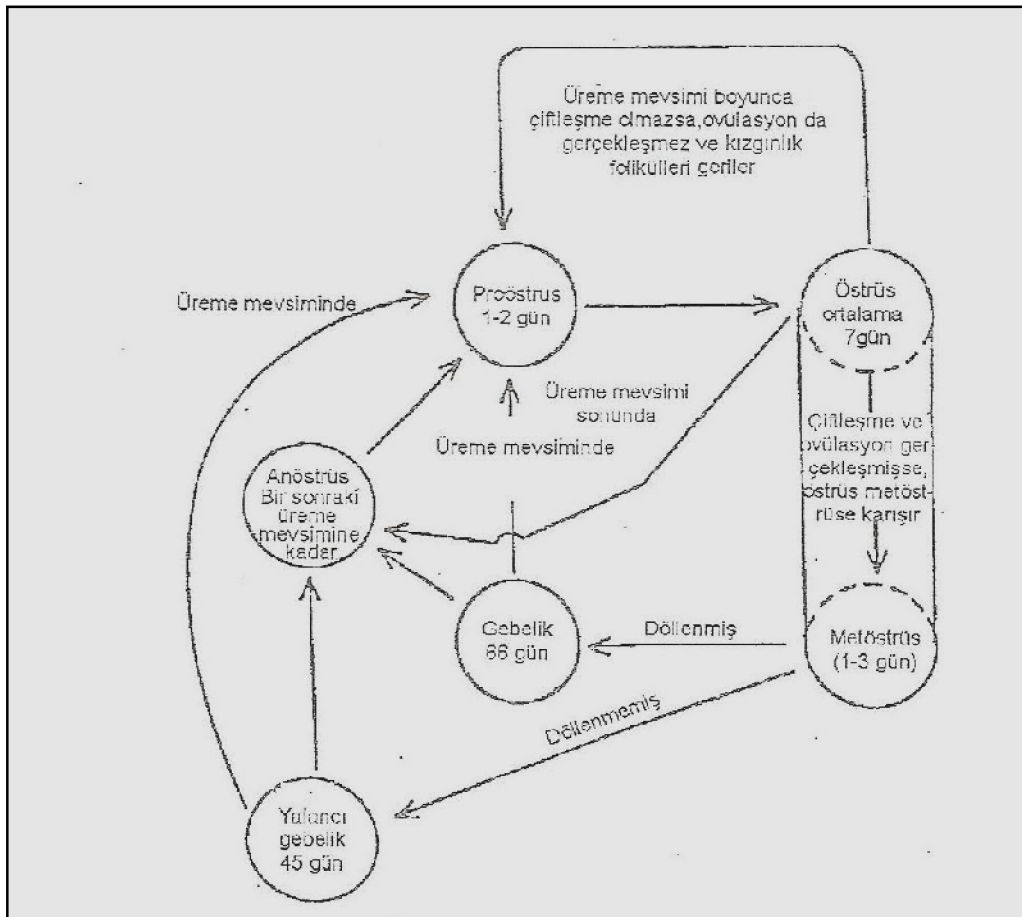
1.1.3.4. Diöstrus

Diöstrus ovulasyonun şekillendiği, östrus sonrası luteal dönemi ifade eder. Bu dönem boyunca corpus luteum aktiftir. Serum progesteron düzeyi ise 1.5–20 ng/ml arasında değişmektedir (Feldman ve Nelson 1996).

Diöstrus gebe kedilerde 60-65 gün, yalancı gebe (ovulasyon olmuş fakat fertilizasyon ile sonuçlanmamış) kedilerde ise yaklaşık 40-45 gün kadar sürer (Şekil 1.3). Bu dönem luteolizis ile sonlanır ve serum progesteron düzeyi 1.5 ng/ml'ye kadar düşer (Lawler ve ark. 1993, Root ve ark. 1995, Pope 2000).

1.1.3.5. Anöstrus

Anöstrus, gün ışığının azaldığı (Ekim, Kasım, Aralık), ovaryum aktivitesinin olmadığı dönemi ifade eder (Feldman ve Nelson 1996). Bu dönem boyunca plazma östradiol ve progesteron değerleri en düşük seviyelerde olup, kediler çiftleşme davranışı göstermezler (Johnston ve ark. 2001).

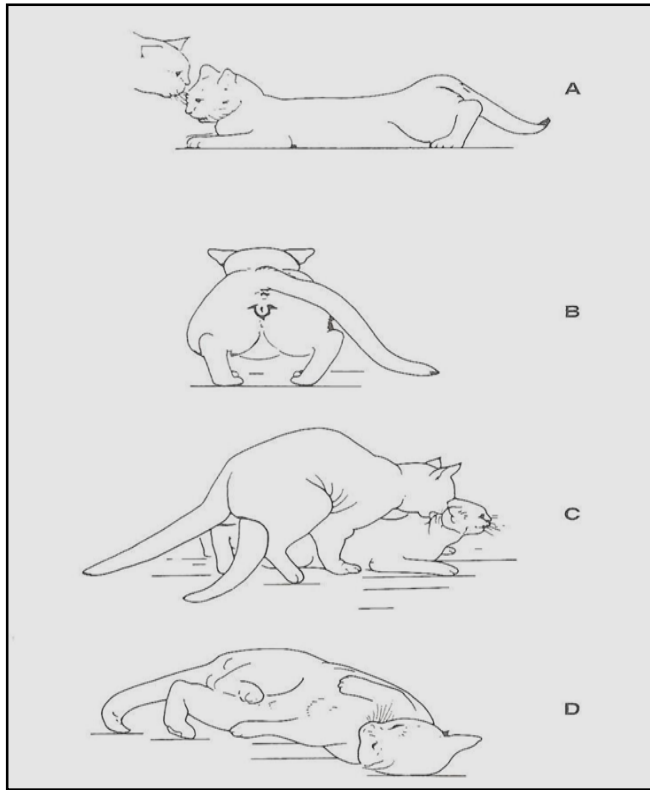


Şekil 1.3. Kedilerde ovaryum döngüsü (McDonald 1989)

1.1.4. Kedilerde Östrus Evresinin Belirlenmesi

1.1.4.1. Seksüel Davranışların Gözlemlenmesi

Seksüel siklusun östrus evresindeki kedilerde, artan östradiol hormonunun etkisiyle çeşitli seksüel davranışlar ortaya çıkar. Bu davranışlar arasında; çeşitli tonlarda miyavlama ve bağırma, çeşitli objelere sürtünme, yerde yuvarlanma, kuyruğu yana ya da yukarıya çekip kıvrırma ve iştah kaybı en belirgin olanlarıdır. Bel bölgesine dokunulduğunda perianal bölgede spazmodik kontraksiyonların şekillendiği ve kedinin lordozis pozisyonu aldığı gözlenir (Şekil 1.4). Fiziksel olarak vulva dudakları genellikle hiperemik ve ödemli olup, bazı durumlarda vajinadan seröz bir sıvının geldiği gözlenir (Lein 1982, Fontbonne ve Malandian 2006).



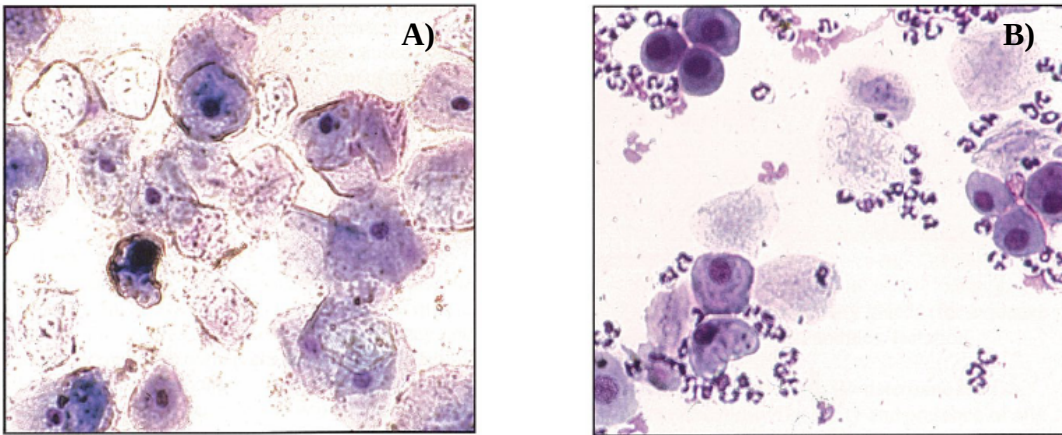
Şekil 1.4. A ve B, östrustaki kediler tarafından gösterilen tipik duruş pozisyonu (lordozis). C, çiftleşme sırasında erkek kedinin dişiye ensesinden tutma pozisyonu. D, dişi kedinin çiftleşme sonrası yuvarlanma hareketi (Scott 1970).

1.1.4.2. Vajinal Sitoloji

Vajina epitelinde oluşan hücresel değişiklikler, seksüel davranışlardan sonra, östrus evresinin en karakteristik klinik bulgusudur. Vajina epitel hücrelerinin morfolojisinde, östrojen hormonunun etkisi ile değişiklikler oluşur (Şekil 1.5). Bu değişiklikler vajinal sitoloji ile ortaya konmaktadır. Vajinal sitoloji, kedilerde siklus evrelerinin belirlenmesine yardımcı olmakla birlikte tek başına yeterli olmayabilir (Christiansen 1984, Johnston ve ark. 2001).

Östrus döneminde keratinize süperfisiyel epitel hücreler yoğunluktadır. Postöstrus dönemde ise lökositlerle birlikte süperfisiyel ve intermediyer hücreler görülmektedir. Anöstrus döneminde başlıca, kenarları düz ve oval sınırlı, koyu renge boyanan parabazal hücreler gözlenir (Verstegen 2004).

Kedilerde vajinal sitoloji uygulaması, köpeklerdeki kadar kullanışlı olmamaktadır. Bilindiği gibi kedilerde ovulasyon provokedir. Bu yüzden vaginal sitoloji için smear alma esnasında ovulasyon şekillenebilir. Bu da östrus siklusunu olumsuz etkileyebilir (Verstegen 2004).

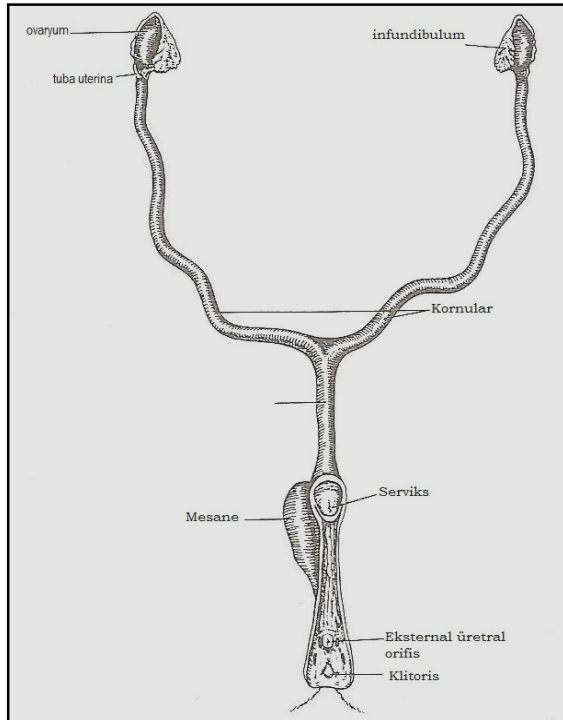


Şekil 1.5. Kedi vajinal sitolojisi. A) Östrus dönemindeki vajina epitel hücrelerinin morfolojisi. Hücrelerin çoğunluğu keratinize, süperfisiyel çekirdeksiz hücrelerden veya piknotik, çekirdekli hücrelerden oluşmaktadır. B) Postöstrus dönemdeki vajinal sitoloji görüntüsü. Bu dönemde lökositlerle birlikte süperfisiyel ve intermediyer hücreler çoğunluktadır (Verstegen 2004).

1.2. Ovaryumun Genel Yapısı ve Fonksiyonu

Yetişkin dişi bir kedide ovaryumlar oval olup, yaklaşık 1.0 x 0.3 x 0.5 cm ebatlarında ve 220 mg ağırlığındadır (Şekil 1.6). Anatomik olarak böbreklerin dorsal abdomino-caudal bölgesine yerleşmişlerdir (Root 1995). Asıcı ovaryum bağlarıyla (mezoovaryum, mezosalpinks, mezometriyum) peritonal boşlukta asılı bir şekilde durmaktadır (Shille ve ark. 1979).

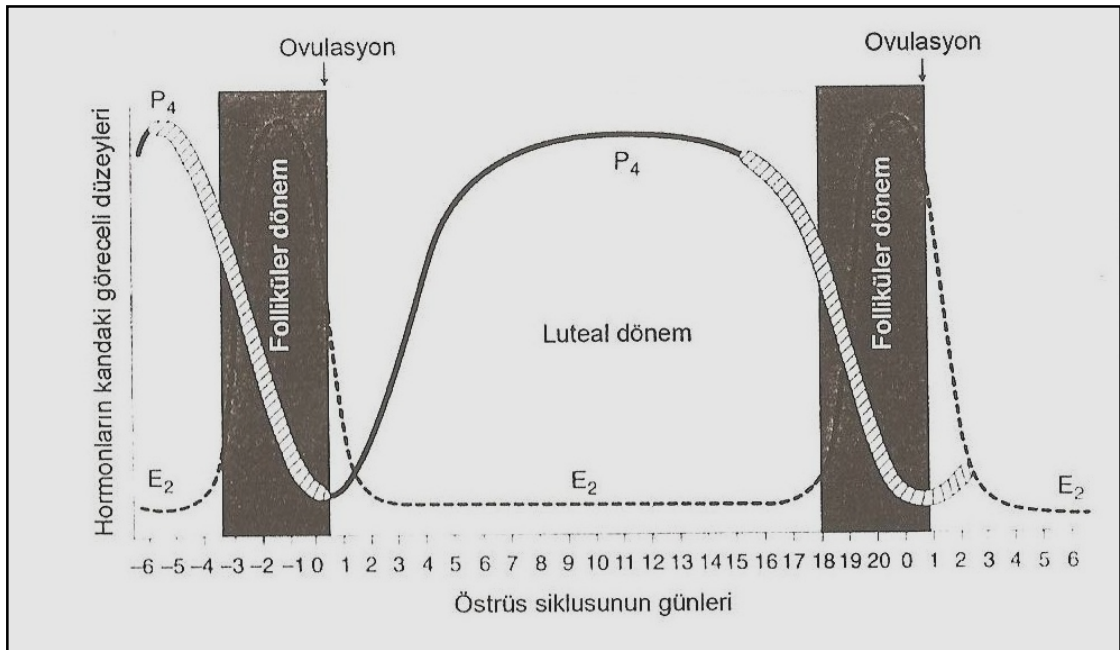
Ovaryum, iğ şeklindeki fibroblast benzeri hücreleri içeren stroma ve dağınık düz kas hücre demetlerinden oluşur. Ovaryum stromasının morfolojik yapısı korteks, medulla ve hilus olarak üç kısma ayrılır. Medulla, foliküllerin bulunmadığı ovaryumun merkez bölgesidir. Korteks, folikülogenezisin şekillendiği ve etrafı fibröz tunika albuginea ile çevrilmiş olan kısımdır. Ovaryumun medulla kısmı kortekse göre oldukça fazla kan damarı içermektedir. Hilus ise sinir ve kan damarlarının ovaryuma girdiği, ovaryumun mezovaryuma bağlandığı bölgedir (Ojeda 2000, Young ve Heath 2000).



Şekil 1.6. Dişi kedilerdeki üreme organları (Johnston ve ark. 2001).

Ovaryum, üreme ile ilgili fizyolojik fonksiyonları kontrol eden farklılaşmış birçok hücre tipini içermektedir. Ovaryum üzerinde bulunan foliküler yapıların herbiri, oositin etrafını saran özelleşmiş hücrelerden oluşmaktadır. Herbir folikül ovüle olabilecek, sağlıklı bir oosit geliştirmeyi hedefler. Foliküller beyin, iskelet ve kardiovasküler sistemin normal fonksiyonları içinde gerekli olan steroidleri üreterek dişi üreme sisteminde önemli rol oynarlar (Sarah ve Teresa 2006).

Ovaryum üzerinde meydana gelen değişimler, iki önemli dönem altında toplanmaktadır. Bunlardan ilki foliküler, ikincisi ise luteal dönem olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.7). Foliküler dönem proöstrus ve östrus dönemlerini, luteal dönem ise diöstrus dönemini kapsamaktadır. Foliküler dönem yaklaşık olarak östrus siklusunun % 20'sinde, luteal dönem ise % 80'inde aktiftir (Senger 2003).



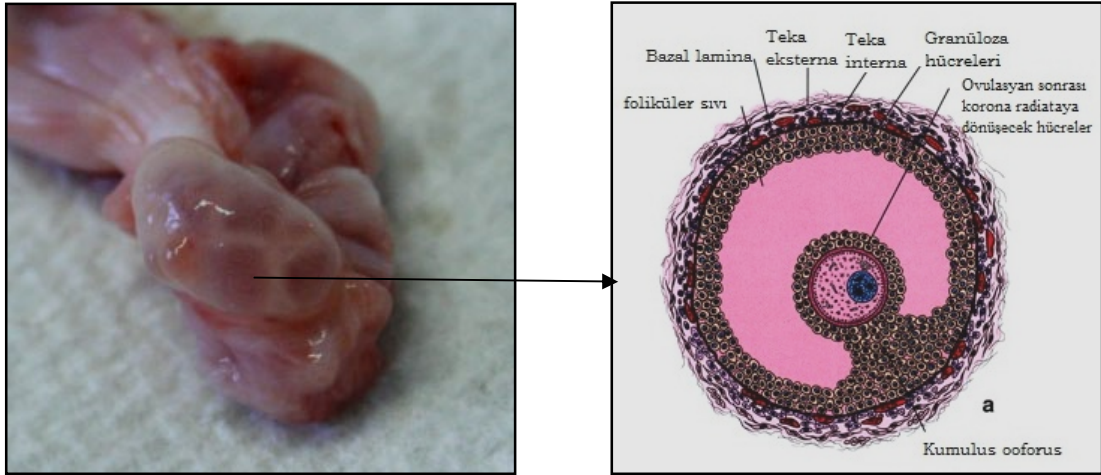
Şekil 1.7. Östrus siklusunun evreleri (Senger 2003).

1.2.1. Foliküler Dönem

Foliküler dönem, corpus luteumun lize olmasından sonra başlar ve ovulasyona kadar sürer. Bu dönem de foliküler ovaryum yapısı hakim olup, östradiol hormonu baskındır. Foliküler dönemde, primer foliküller gelişerek östradiol üreten dominant foliküllere dönüşürler (Senger 2003).

1.2.1.1. Ovaryum Folikülünün Yapısı ve Fonksiyonu

Foliküller, üreme sezonunda ovaryum üzerinde gelişen fonksiyonel yapılardır. Herbir folikül, etrafı somatik granüloza hücreleri ile çevrilmiş oosit ve dıştaki teka hücre katmanından oluşmaktadır (Şekil 1.8). Folikülün iki önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Birincisi ovule olabilecek sağlıklı bir oosit geliştirmek, diğeri ise iskelet ve kardiovasküler sistemin normal fonksiyonları için de gerekli olan steroid hormonları üretmektir (Sarah ve Teresa 2006).



Şekil 1.8. Olgun bir folikülün şematik, morfolojik ve histolojik görüntüsü (Aerts ve Bols 2008).

1.2.1.2. Folikülogenezis

Folikülogenezis, ovaryum üzerinde bulunan primordial foliküllerin olgunlaşma sürecidir (Şekil 1.9). Her bir primordial folikül, etrafı granüloza hücreleri ile çevrilmiş bir adet oosit içerir. Oositin büyümesi ve etrafındaki hücrelerin farklılaşması ile birlikte folikülün yapısı değişmektedir. Bu değişim kedi, köpek ve tavşanlarda fetal gelişimin 3. veya 4. haftasında başlamaktadır (Peters ve McNatty 1980). Kedilerdeki folikülün yapısı, diğer memeli türlerindeki foliküler yapı ile büyük benzerlik göstermektedir (Sarah ve Teresa 2006).

1.2.1.2.1. Primordial Foliküller

Primordial foliküller, içerisinde 20-30 µm çaplarında bir adet oosit içeren en küçük foliküllerdir. Yapılan çalışmalarla primordial foliküllerin üç kategoriye ayrılarak incelenmesi gerektiği ortaya konmuştur (Sarah ve Teresa 2006).

Bunlardan ilki, B sınıfı olarak adlandırılmakta olup, oosit çevresinde, 1 ile 8 kat arasında yassı veya skuamöz pre-granüloza hücreleri içeren primordial foliküllerdir. İkincisi, B/C sınıfı olarak adlandırılan, oositi tek bir tabaka halinde saran, skuamöz ve kübik granüloza hücrelerini içeren geçici primordial foliküllerdir. Üçüncüsü ise, C sınıfı olarak adlandırılmakta olup, tek tabaka halinde kübik granüloza hücreleri ve 30-50 µm çaplarında bir adet oosit içeren foliküllerdir (Sarah ve Teresa 2006).

1.2.1.2.2. Sekonder Foliküller

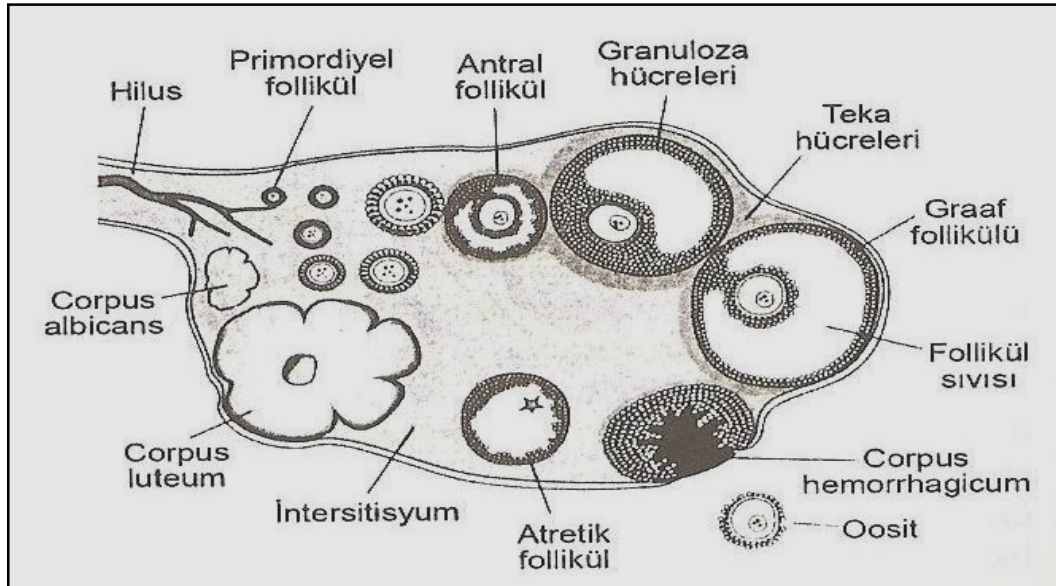
Sekonder foliküllerin büyüklüğü, içerdiği çok katlı granüloza hücrelerinden dolayı 100-400 µm arasında değişmektedir. Bu foliküller, 40-75 µm çaplarında oositler içermektedirler. Sekonder foliküller, en az iki granüloza hücre tabakası ve granüloza

hücre katmanının tabanında yerleşik olarak bulunan bir kat teka hücrelerinden oluşmaktadır (Sarah ve Teressa 2006).

1.2.1.2.3. Antral Foliküller

Küçük antral foliküller, sekonder foliküller ile aynı büyüklükte (100-400 μm) olabileceği gibi, foliküler sıvının toplanması sonrasında çapları 1000 μm 'ye kadar ulaşabilir. Antral foliküller, 2-3 tabakadan oluşan teka hücreleri ile çevrilmiştir (Sarah ve Teressa 2006).

Büyük antral foliküllerin çapları 2-3 mm aralığında olup, intakt müral, kumulus granuloza, teka hücre tabakaları, antral boşluk ve bir oositten oluşmaktadır. Antral foliküllerdeki oositlerin çapları 85-100 μm arasında değişmekte olup, ovaryum periferine yakın olan korteks bölgesinde konumlanmışlardır (Sarah ve Teressa 2006).



Şekil 1.9. Folikül gelişimi; corpus luteum ve foliküler atreziyanın şematik gösterimi (Thompson 2004).

1.2.2. Luteal Dönem

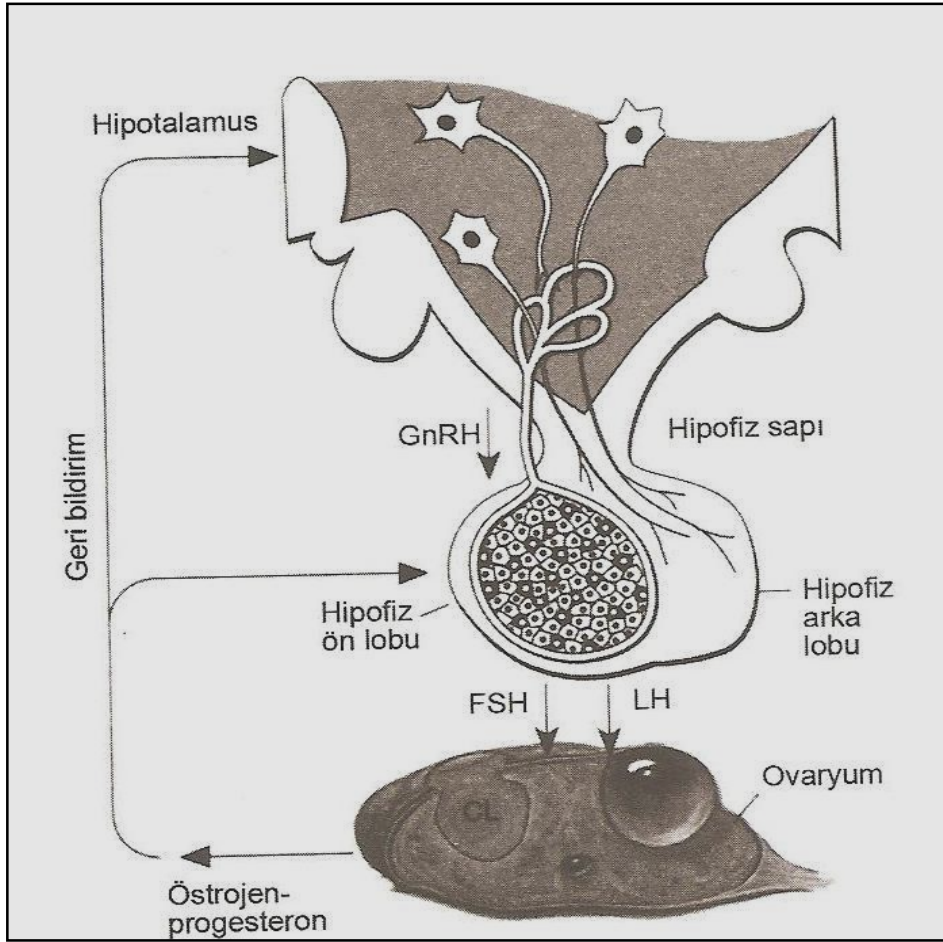
Luteal dönem, ovulasyonun gerçekleşmesinden corpus luteumun regresyonuna kadar olan dönemi ifade eder. Luteal dönemde, ovaryum üzerindeki dominant yapı corpus luteum, dominant etkili hormon ise progesterondur. Bu dönemde, corpus luteum tarafından salgılanan progesteron etkindir. Bununla birlikte, foliküller gelişmeye ve regrese olmaya devam ederler, fakat foliküler dönemdeki kadar yüksek düzeyde östradiol üretmezler (Senger 2003).

Kedilerde ovulasyon, çiftleşmeden sonra oluşan nöro-hormonal etkileşimler ile meydana gelmektedir. Penisin serviksi uyarması, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) etkisiyle hipofiz ön lobundan luteinleştirici hormon (LH) salınmasına neden olur (Michael 1961). Kedilerde, serum LH düzeyi çiftleşme sayısı ile doğru orantılıdır. Bir kez çiftleşen kedilerin sadece % 50'si, ovulasyonu uyuracak düzeyde LH salgılayabilmektedir (Concannon ve ark. 1980). Serum LH düzeyi, çiftleşme anına kadar düşük seviyelerdedir. Çiftleşmeyle birlikte LH yükselmeye başlar ve 29-40 saat sonra ovulasyon şekillenir (Root ve ark. 1995, Fontbonne ve Malandian 2006).

Bununla birlikte evde beslenen bazı dişi kedilerde, çiftleşmiş olmamasına rağmen, yüksek düzeyde serum progesteron değeri ve aktif corpus luteum tespit edilmiştir. Bu da bazı dişi kedilerde çiftleşme harici uyaranların etkisiyle de ovulasyonun şekillenebileceğini uğrayabileceklerini göstermektedir (Gudermuth ve ark. 1997, Bristol ve Woodruff 2004).

Ovulasyon sonrası folikül içerisindeki teka ve granüloza hücreleri luteinizasyona uğrar. Dolayısıyla luteinizasyon, ovaryum içerisindeki folikül hücrelerinin luteal dokuya dönüşmesi sürecidir. Bu süreç, LH hormonu tarafından yönetilmektedir. Luteal doku, büyük ve küçük luteal hücrelerden meydana gelmektedir. Büyük luteal hücreler granüloza hücrelerinin, küçük luteal hücreler ise teka hücrelerinin farklılaşması ile oluşmaktadırlar. Hem büyük hem de küçük luteal hücreler steroidojenik aktiviteye sahip olup progesteron üretirler (Senger 2003).

Çoğu memelide luteal doku, uterus endometriyumundan salgılan prostaglandin F2 α (PGF2 α) tarafından lize edilir. Corpus luteumun lize olması sonucunda progesteron düzeyi önemli miktarda azalır ve bu durum, hipotalamusu etkileyerek progesteronun GnRH üzerine negatif geri bildirim mekanizmasını ortadan kaldırır (Şekil 1.10). Böylece FSH ve LH sentezini uyaran GnRH üretimi artar ve yeni bir foliküler dönem başlar (Senger 2003).



Şekil 1.10. Hipotalamus, hipofiz ve ovaryum arasındaki nöroendokrin ilişkiler (Thompson 2004).

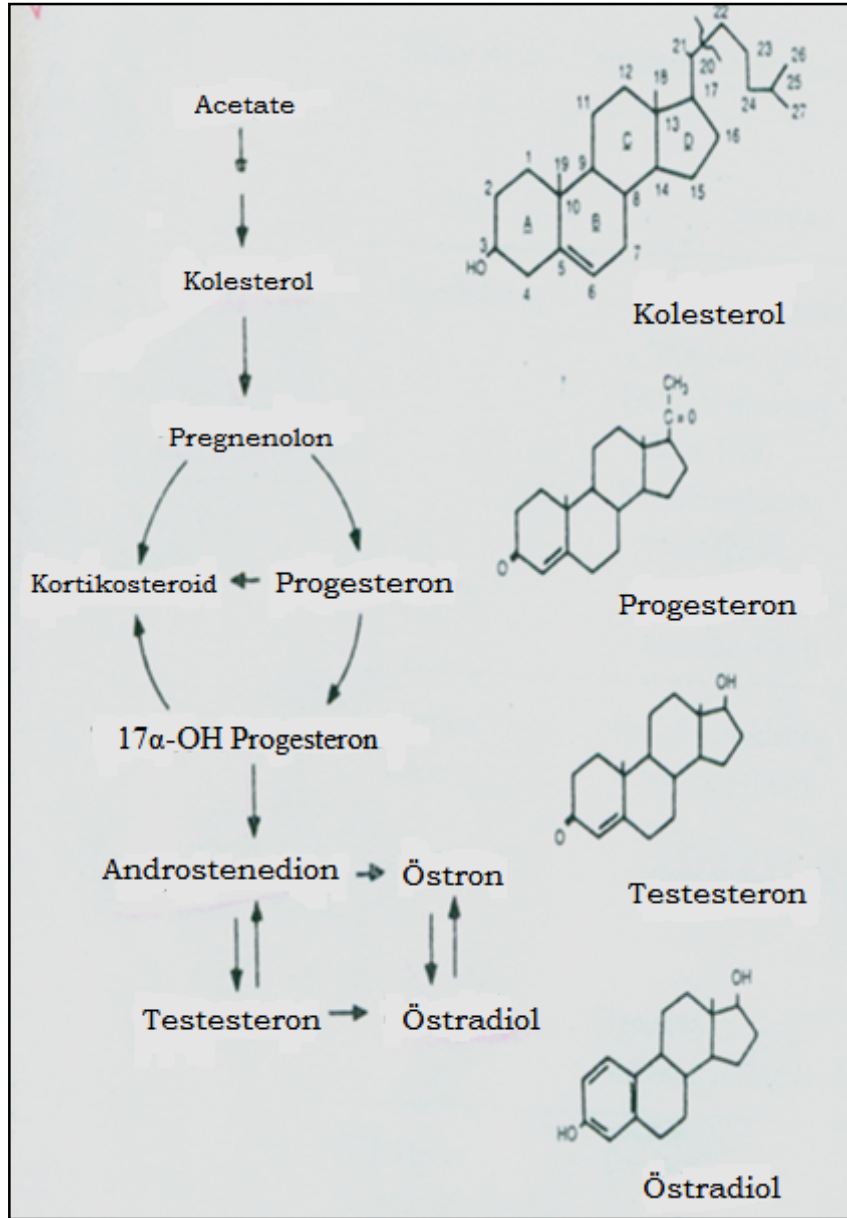
1.3. Steroid Hormon Sentezinde Kolesterolün Rolü

Kolesterol, steroid hormonların (progesteron, östrojen, testesteron) sentezlenmesinde önemli olup, prekürsör görevi görmektedir (Şekil 1.11). Hücreler kolesterolü iki kaynaktan sağlarlar. Bunlar; (1) hücrede denove kolesterol sentezi, (2) HDL ve LDL lipoproteinleri (O'Shaughnessy and Wathes 1985). Kolesterol, hayvan türlerine göre değişmekle birlikte HDL veya LDL olarak kan dolaşımı ile ovaryuma taşınır (Grummer and Carrol 1988, Masumura ve ark. 1992, Clevidence and Bieri 1993).

Kolesterol, mitokondrial bir enzim olan sitokrom P450 ile pregnenolona çevrilerek, progesteron sentezinde kullanılır (Juengel ve ark. 1995; Sandhoff ve ark. 1996a). Yapılan çalışmalarda steroidojenik akut regülatör (StAR) proteinin stereoidogenezisin bu aşamasında önemli role sahip olduğu ortaya konmuştur (Sandhoff ve ark. 1996b, Townson ve ark. 1996). Bu protein kolesterolün dış mitokondriyal membrandan, kolesterolün pregnenolona dönüştürüldüğü iç mitokondriyal membrana taşınmasında görevlidir (Kiriakidou ve ark. 1996, Pescador ve ark. 1996, Stocco 1997).

Pregnenolonun bir kısmı endoplazmik retikulum da bulunan 3β -HSD enzimi ile progesterona dönüştürülür. Diğer bir kısmı ise önce 17α -hydroxylase (CYP17A1) enzimi ile 17-hydroxy-pregnenolona, daha sonra desmolaz enzimi ile dehidroepiandrosterona (DHEA) çevrilir. Daha sonra DHEA, 3β -HSD enzimi aracılığı ile androstenediona dönüştürülür (Luo ve Wiltbank. 2006).

Androstenedion ise östradiolün sentezinde kullanılan öncü steroid hormon olup, teka hücreleri tarafından üretilir. Östradiol sentezine katılmayan androstenedionlar granüloza hücrelerinde bulunan androstenedion reseptörlerine bağlanırlar (Vallée ve ark. 2001, Luo ve Wiltbank 2006).



Şekil 1.11. Gonadal steroid hormonların kimyasal yapısı ve sentezlenme yolları (Hafez ve ark. 2000).

1.4. Foliküler Gelişimin Hormonal Kontrolü

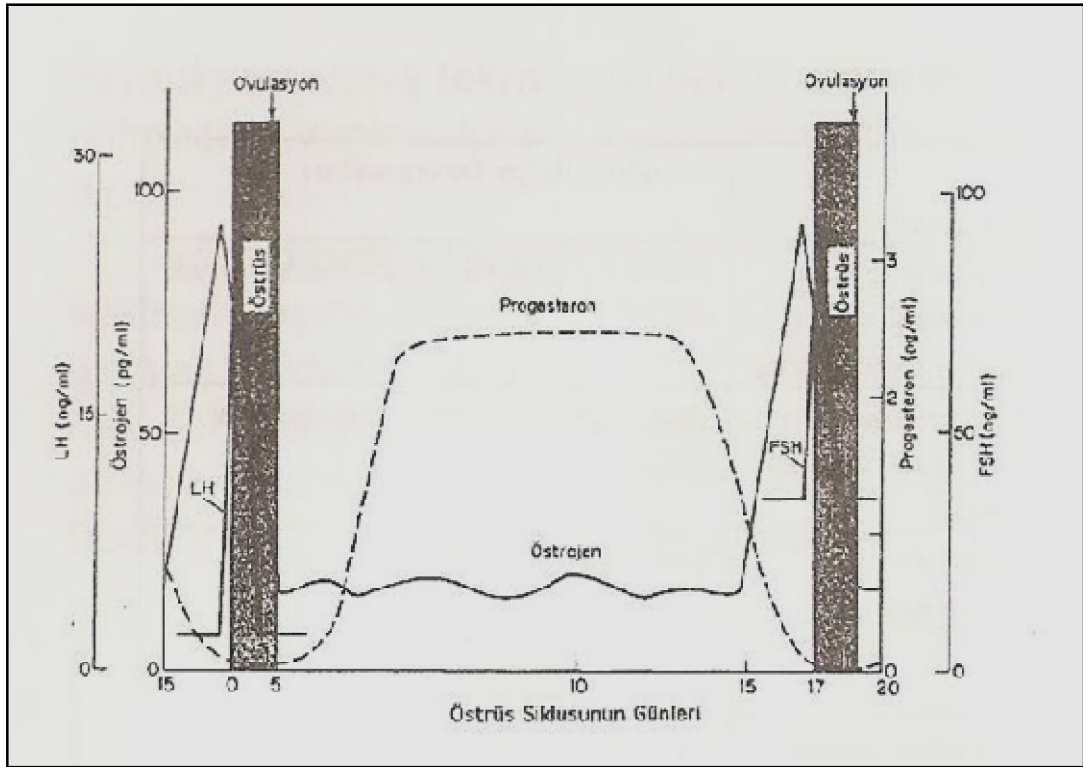
Ovaryum üzerindeki folikülerin farklılaşması ve büyümesi kompleks bir süreçtir. Bu süreç büyük oranda hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin olarak adlandırılan FSH ve LH hormonlarına bağlıdır (Şekil 1.12) (Richards 1994). Bununla birlikte foliküler gelişim, primordial aşamadan erken pre-antral döneme kadar, FSH ve LH'dan bağımsız olarak sürdürülebilir (Webb ve ark. 1999). Folikül uyarıcı hormon ve LH, heterodimerik glikoprotein yapısında olup, α ve β olmak üzere 2 alt birimden oluşmuşlardır. α alt birim; LH ve FSH'da aynıdır. β alt birimi ise farklı olup, aktif olan kısmı oluşturur (Webb ve ark. 1999).

Primer folikülün gelişimi sırasında, granüloza hücrelerinin farklılaşması FSH tarafından başlatılır. Aynı zamanda FSH'nin etkisiyle, LH reseptör gelişimi ve aromataz aktivitesi uyarılır (Hsueh ve ark. 1984, Dahl ve Hsueh 1988). Pre-antral foliküller ise FSH ile uyarıma in-vitro ortamda büyümeyi arttırarak cevap verirler (Webb ve ark. 1999).

Lüteinleştirici hormon reseptörleri hem granüloza hem de teka hücrelerinde, FSH reseptörleri ise sadece granüloza hücrelerinde bulunur (Richards ve ark. 1987, Hillier 1991). Lüteinleştirici hormon teka hücrelerinden androjen, luteal hücrelerden ise progesteron salınımını uyarır. Folikül uyarıcı hormon granüloza hücrelerinden progesteron ve östrojen sentezini uyarmaktadır (Richards ve ark. 1987). Östrojen ve FSH, granüloza hücre proliferasyonunu ve granüloza hücrelerinin üzerindeki LH reseptörlerinin oluşumunu birlikte çalışarak uyarırlar. Lüteinleştirici hormon reseptörlerinin granüloza hücreleri üzerinde oluşması, hem FSH hem de LH tarafından uyarılan aromataz sentezine, granüloza hücrelerinin yanıt vermesini sağlar ve bu da daha fazla östrojen üretimine neden olur (Richards 1994).

Lüteinleştirici hormon, spontan olarak veya çiftleşme ile ovulasyonun uyarılabildiği bütün türlerin üreme siklusunda çok önemli bir yere sahiptir. Östrus döneminde ovulasyonun şekillenmesi yeterli düzeyde LH salınmasına bağlıdır. Yeterli düzeyde LH'nın salınması da çiftleşme sayısı ve östrus siklusundaki

zamanlamayla ilişkilidir. Her çiftleşme LH'n bir kez daha uyarılmasına ve seviyesinin yükselmesine sebep olur. Çoğu kedide dört veya daha fazla sayıda çiftleşme ovulasyonun şekillenmesi için yeterli olmaktadır (Wildt ve ark. 1980, Johnson ve Gay 1981, Kalkan ve Horoz 2001).



Şekil 1.12. Kedilerde östrus siklusu boyunca hormonal değişiklikler (Kalkan ve Horoz 2001)

1.5. Östrojen ve Progesteron Sentezi

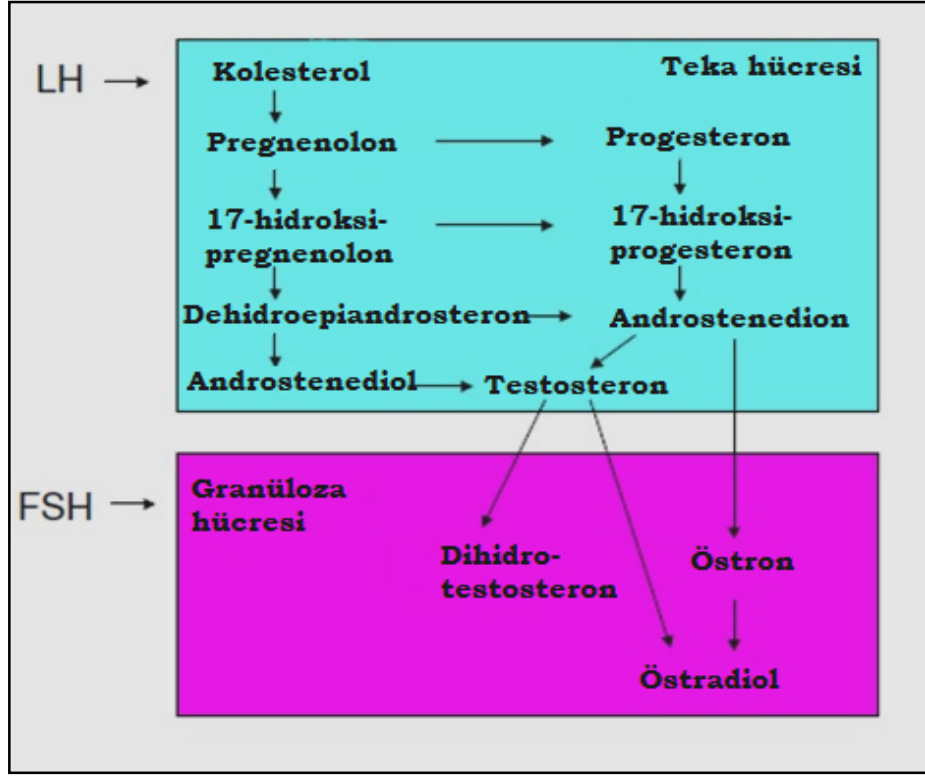
Östrojen ve progesteron foliküllerin gelişiminde rol oynayan önemli faktörlerdendir. Östrojen granüloza hücreleri tarafından, progesteron ise hem granüloza hem de teka hücreleri tarafından sentezlenir. Östrojen sentezi, hücrenin foliküler olgunluğa ulaştığını gösteren önemli bir işarettir (Hsueh 1984). Östrojen, folikül içerisindeki

granüloza hücrelerinin proliferasyonunu uyarak hem FSH hem de LH'nin etkisini kolaylaştırır (Richards 1980).

Antral foliküllerdeki temel stereoidojenik hücreler, östrojen sentezi için gerekli olan histogenetik özelliklere sahiptirler (Short 1962, Bjersing 1967, Ryan 1979). Östrojen sentezini açıklamak için Armstrong ve ark. (1979), "iki hücre-iki gonodotropin" modelini oluşturmuşlardır. Bu model dört temel özelliği içermektedir: 1) Granüloza hücreleri FSH reseptörüne sahiptir, 2) Teka hücreleri LH reseptörlerine sahiptir, 3) FSH, granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesini uyarır, 4) LH, teka hücrelerinde androjen sentezini uyarmaktadır.

Teka hücrelerinde steroid hormonların sentezlenmesi sırasında, LH'nin etkisiyle kolesterol pregnenonola çevrilir ve bir dizi öncül işlemlerden geçtikten sonra androjenler üretilir (Şekil 1.13). İki hücre-iki gonodotropin hormon modeline uygun olarak teka hücreleri tarafından üretilen androjenler, östrojene çevrilecekleri granüloza hücrelerine taşınırlar (Drummond 2006).

Anöstrus ve postöstrus dönemlerinde östradiol düzeyi 60-70 pmol/ml'den az iken, östrus döneminde 150-300 pmol/lt seviyelerinde seyretmektedir. Ovulasyon şekillenmezse 5-10 gün içerisinde östradiol miktarı bazal düzeye inmektedir. Bununla birlikte ovulasyon şekillenmişse, östradiol miktarı 2-3 gün içerisinde azalacaktır. Luteal fazın ilk bölümünde, gebelikte ve yalancı gebelikte östradiol miktarı, genellikle 70 nmol/lt'nin altındadır (Verstegen 2004).



Şekil 1.13. Östradiol sentezinin mekanizması (Drummond 2006).

Progesteron, preantral foliküllerdeki granüloza hücreleri tarafından FSH'a yanıt olarak düşük düzeylerde üretilir. Folikül uyarıcı hormon bu etkisini P450 enziminin salınımını artırarak sağlar (Richards ve ark. 1995, Hillier 2001). P450 enzimi, progesteron sentezi mekanizmasında ilk adımlardan biri olan kolesterolün pregnenolona çevrilmesinde rol oynamaktadır. Bununla birlikte FSH, pregnenolonun progesterona dönüşmesini sağlayan 3β -HSD enziminin sentezlenmesini de uyarmaktadır (Hsueh 1984, Richards 1988).

Progesteron, negatif geri besleme mekanizması ile hipofiz bezinden salınan FSH ve LH hormonlarının inhibe edilmesi ve ovulasyon için gereklidir. Progesteron reseptörü (PR) bloke edilen farelerde ovulasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Corpus luteumun öncelikli hormonal salgısı olan progesteron, aynı zamanda embriyonun gelişimini sürdürebilmesi için de gereklidir (Lydon ve ark. 1995).

Plazma progesteron miktarı, ovulasyon öncesi dönemde bazal düzeydedir. Gebe ve yalancı gebe kedilerde progesteron düzeyi, ovulasyon sonrası 24-50. saatler arasında artmaya başlar. Progesteron düzeyi, ilk çiftleşmeden sonra, 20-25 gün içerisinde maksimum 100-200 nmol/l'te kadar çıkabilmektedir. Gebe kedilerde progesteron düzeyi gebeliğin 25-35. günden sonra azalmaya başlar ve 15-30 nmol/l düzeyleri arasında sabit kalır. Yalancı gebe kedilerde ise progesteron miktarı yaklaşık 25. günden itibaren düşmeye başlar ve 30-40. günler arasında bazal değere ulaşır. Progesteron düzeyinin bu şekilde yavaşça azalması yalancı gebe kediler için karakteristiktir (Verstegen 2004).

Sonuç olarak GnRH'nin etkisi altında ön hipofiz bezinden salgılanan gonadotropinlerin (FSH ve LH) uyarımı sonucu sentezlenen progesteron ve östrojen hormonları, hem foliküler hem de luteal dönemlerde etkin rol oynamaktadırlar (Senger 2003).

1.6. Çalışmanın Amacı

Mevcut çalışmanın amacı dört ana başlık altında toplanabilir:

a. Kedi granüloza hücre kültürü protokolü geliştirilmesi.

Literatür taramalarında kedilere ait herhangi bir granüloza hücre kültürü çalışmasına rastlanılmadığından tezin bu aşamasında, optimum hücre hazırlama ve kültür şartlarının belirlenmesi hedeflendi.

b. Granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal progesteron ve östradiol düzeyinin belirlenmesi

Bu aşamada kültür ortamında büyütülen, belli sayıdaki hücrelerin sentezlediği bazal progesteron ve östradiol miktarının araştırılması hedeflendi.

c. Granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal progesteron ve östradiol düzeyine LH ve FSH hormonlarının etkisinin araştırılması

Tezin bu aşamasında LH ve FSH hormonlarının, uzun süreli kültürde, granüloza hücreleri tarafından üretilen progesteron ve östradiol üzerine etkisi araştırıldı. Ayrıca bu ajanların kombine olarak kullanılmasının steroidojenezis üzerine etkisi de çalışıldı.

d. Kolesterolün hücresel steroid sentezi üzerine etkisinin araştırılması

Bu aşamada kolesterolün bazal progesteron ve östradiol sentezi üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmada hücre membranından kolay geçiş yapabilme özelliğinden dolayı 22R-hidroksikolesterol (22R-HC) kullanıldı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Araç ve Gereçler

2.1.1. Hayvan materyali

Bu çalışmada hayvan sahipleri tarafından Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniğine kısırlaştırma operasyonu için getirilen, 1-3 yaşlarında toplam 18 sağlıklı dişi kedi kullanıldı. Kısırlaştırma operasyonu sonrası post-operatif bakımı yapılan hayvanlar, sağlıklı olarak hayvan sahiplerine teslim edildi. Araştırma etik kurallara uygun olarak (20.01.2010 tarih ve 10/03 sayılı Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Kararı) gerçekleştirildi.

Kediler altışarlı üç gruba ayrıldı. İlk gruptaki kediler bazal progesteron ve östradiol düzeylerinin belirlenmesinde ve kolesterolün (10ng/ml) bazal steroid sentezi üzerine etkisinin incelenmesinde kullanıldı. İkinci gruptaki kediler, FSH (10 ve 100ng/ml) ile FSH (10 ve 100ng/ml) ve kolesterolün (10ng/ml) kombine kullanımının bazal steroid sentezi üzerine etkisinin araştırılmasında ve kalan son gruptaki kediler ise, LH (10 ve 100ng/ml) ile LH (10 ve 100ng/ml) ve kolesterolün kombine uygulanmasının bazal steroid sentezi üzerine etkisinin incelenmesinde kullanıldı.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

1. Laminar flow kabini (Nüve)
2. Inverted mikroskop (Olympus)
3. Karbondioksitli inkübatör (Binder)
4. Masa tipi buharlı otoklav cihazı (Systec)
5. Hava sterilizasyon cihazı (Light Prossess)
6. Etüv (Nüve)
7. Ultra saf su cihazı (Millipore)
8. Gamma sayacı (Mini-assay type 6.20)
9. Vortex mixer (Stuart)
10. Santrifüj cihazı (Hettich)
11. Mini santrifüj (Eppendorf)
12. Poşetleme cihazı (Euroseal)
13. Su banyosu (Julabo)
14. Hassas terazi (Sartorius)

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Dulbacco's Modified eagles medium/Nutrient mixture F-12 HAM (Sigma D8437, USA)
2. 22(R)-Hydroxycholesterol (Sigma H9384, USA)
3. 4-Androstene-3,17-dione (Sigma A9630)
4. Folicle Stimulate Hormone (Bioniche)
5. Luteinizing Hormone (NHPP)
6. Pregnant mare serum gonadotrophin (Folligon)
7. ITS Liquid Media Supplement (Sigma I3146, USA)
8. Antibiotic/antimycotic gamma-irradiated cell culture tested (Sigma A5955, USA)
9. Albumine bovine fraction, v powder cell culture tested (Sigma A9418, USA)
10. Fetal Calf Serum (Sigma N4637)
11. Beta-Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (Sigma N7004, USA)
12. Nitro blue tetrazolium grade III crystalline (Sigma N5514,USA)
13. Trypan Blue Solution Cell Culture Tested (Sigma T8154, USA)
14. Phosphate Buffer Solution Tablets (Sigma 79382, USA)
15. Sigmacote (Sigma SL2, USA)

2.2. Yöntem

2.2.1. Süperfolikülasyon Oluşturma

Dişi kedilere kısırlaştırma operasyonu öncesi östrusu ve bununla birlikte süperfolikülasyonu uyarmak için 1. gün 240 IU, 2. gün 120 IU equine choronic gonodotropin (eCG; Folligon, Intervet, The Netherlands) enjeksiyonu (i.m) yapıldı. Hormon uygulamasını takiben, belirgin östrus davranışları (lordosis pozisyonu) başladıktan beş gün sonra kedilere kısırlaştırma operasyonu yapıldı.

2.2.2. Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu

Dişi kedilerden ovariohisterektomi operasyonu ile elde edilen ovaryumlar, soğuk zincirde ve steril şartlar altında antibiyotik içeren DMEM/HAM F-12 mediumu içerisinde laboratuara getirildi. Ovaryumlar üzerindeki fazla dokular makas yardımıyla temizlendikten sonra ovaryumların dışı steril PBS ile yıkandı. Daha sonra ovaryumlar +4 derecede, steril PBS içeren petri kabına aktarıldı. Ovaryum üzerindeki foliküller, bir enjektör vasıtası birçok yerinden delinerek folikül sıvısının dışarı çıkması sağlandı. Daha sonra ince uçlu bir cerrahi makası ile foliküller ikiye ayrıldı. Granüloza hücreleri folikül duvarından 0.1 µl'lik bir öze aracılığı ile çok nazik bir şekilde kazındı. Petri kabındaki PBS içerisinde toplanan hücreler, 15 ml'lik falkon tüpünün içerisine aktarıldı.

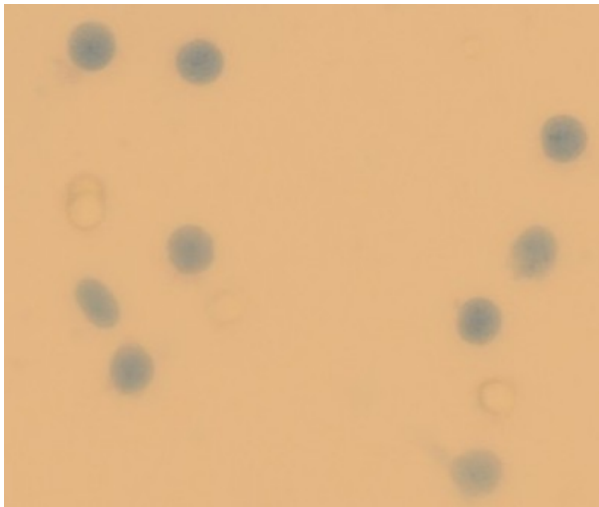
Elde edilen hücreler 400 g'de 10 dk süre ile santrifüj edilip, üzerindeki süpernetant atıldı. Hücreler homojenize edildikten sonra üzerine, kan hücrelerini elemine etmek için 2 ml steril saf su eklenerek 10 sn beklendi. Bu süre sonunda falkon tüpü 15 ml'ye kadar steril PBS ile tamamlandı. Hücreler 400 g'de 10 dk süre ile tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernetant atılarak hücreler tekrar homojenize edildi.

Hücrelerin son yıkaması antibiyotik içeren DMEM/HAM F-12 mediumu ile 500 g`de 5 dk süre ile santrifüj edilerek yapıldı. Son yıkama sonrası hücrelerin üzerindeki medium atılarak hücreler, 1 ml medium içerisinde homojenize edildi. Daha sonra ayrıışmayan hücrelerden kurtulmak için, medium içerisinde homojenize edilmiş hücreler 100 µm`lik süzgeç yardımıyla başka bir falkon tüpüne süzöldü. Pleytin her bir kuyucuğuna 50 µl hücre süspansiyonu koyulması plandığı için hücrelerin üzeri, sayım sonrası 1.2 ml`ye (24 kuyucuk x50 µl) tamamlandı.

2.2.3. Hücrelerin Canlılık Oranı ve Sayımı

Yapılan her uygulamadan elde edilen hücrelerin canlılık oranı ve sayımı trypan blue yardımıyla, thoma lamı kullanılarak yapıldı. Trypan blue boyasını alan hücreler ölü, almayan hücreler ise canlı kabul edildi (Şekil 2.1). Hücrelerin canlılık oranı % 20-30 arasında idi. Hücrelerin sayımı aşağıda belirtilen formöl ile hesaplandı. Sayımda canlı hücreler temel alındı.

$$\text{Hücre sayısı (hücre/ml)} = \text{Sayılan Canlı Hücre sayısı} \times \text{Sulandırma oranı} \times 10000$$



Şekil 2.1. İnkübasyon öncesi trypan blue ile granüloza hücre sayımı (x200)

2.2.4. Hücrelerin İnkübasyonu

Hücrelerin inkübasyonu için 24 kuyucuklu hücre kültürü pleytleri kullanıldı. Hücre kültürü pleytinin her bir kuyucuğuna, içine penisilin (100 IU/ml), streptomisin (100 mg/ml), fungizone (2.5 µg/ml) ve %5 fetal calf serum (FCS) ilave edilmiş medium (500 µl/oyuk) konuldu. Ardından daha önceden hazırlanmış olan hücre süspansiyonu bir otomatik mikropipet yardımıyla, her bir kuyucuğa 50 µl olarak eşit miktarda aktarıldı. Bu işlemlerden sonra hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'ye ayarlanmış inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin pleyt tabanına yapışmasını sağlamak için ilk 24 saat boyunca hücrelere hiçbir hormon uygulaması yapılmadı. Birinci günden sonra hücreleri besleyen medium her 48 saatte bir değiştirildi. Sonraki medium değişimlerinde mediuma, %5 FCS ilave edilmedi, bunun yerine ITS premiksi (1.0 mg/ml insulin, 0.55 mg/ml transferrin ve 0.5 µg/ml selenyum) ilave edildi. Hücreler toplam 5 gün süre ile kültür ortamında yaşatıldı. Birinci ve üçüncü günlerde hücrelere, steroidogenezis üzerine etkisi araştırılan ajanların farklı dozları ilave edildi. Üçüncü ve beşinci günlerde progesteron ve östradiol analizleri yapıldı.

2.2.5. İnkübasyon Sırasında Hücrelere Uygulanan İşlemler

İnkübasyonun birinci ve üçüncü günlerinde hücrelere, çalışmada oluşturulan uygulama gruplarına uygun olarak, aşağıda belirtildiği şekilde kolesterol (22R-HC) FSH ve LH uygulamaları yapıldı. Ayrıca medium değişim günlerinde hücreler, inverted mikroskop altında bakteriyel üreme, kültür mediyumun rengi gibi kontaminasyon belirtileri yönünden incelendi.

Birinci grup kedilerden elde edilen granuloza hücre süspansiyonu kontrol ve kolesterol uygulama grubu (10 ng/ml) olarak pleytlere ayrıldı

İkinci grup kedilerden elde edilen granuloza hücre süspansiyonu pleytlere kontrol grubu, FSH (10 ng/ml), FSH (100 ng/ml), FSH (10 ng/ml) + LH (10 ng/ml)

grupları ile 22R-HC (10 ng/ml), FSH (10 ng/ml) + 22R-HC (10 ng/ml), FSH (100 ng/ml) + 22R-HC (10 ng/ml), FSH (10 ng/ml) + LH (10 ng/ml) + 22R-HC (10 ng/ml) grupları olarak ayrıldı

Son gruptaki kedilerden elde edilen granuloza hücre süspansiyonu ise, pleytlere kontrol grubu, LH (10 ng/ml), LH (100 ng/ml), LH (10 ng/ml) + FSH (10 ng/ml), ile 22R-HC (10 ng/ml), LH (10 ng/ml) + 22R-HC (10 ng/ml), LH (100 ng/ml) + 22R-HC (10 ng/ml), LH (10 ng/ml) + FSH (10 ng/ml) + 22R-HC (10 ng/ml) grupları olarak ayrıldı.

Tüm gruplardan alınan örneklerde 3. ve 5. günde bazal östradiol ve progesteron düzeyleri ölçüldü.

2.2.6. Kültür Sonrası Granuloza Hücrelerin Boyanması

Hücrelerin boyanmasında steroidojenik aktiviteye sahip olan hücreleri boyayan 3 β -HSD boyaması kullanıldı. Bu boyama solüsyonu, tamponlanmış fizyolojik sıvı (PBS) içerisine % 0.1 oranında bovine serum albumin (BSA), 1.5 mM NAD enzimi, 0.25 mM nitro blue tetrazolium ve 0.2 mM 5 β -androstene-3 β -ol-17-one eklenerek hazırlandı.

Önce hücrelerin ortamındaki kültür mediumu pipetlenerek yerine 500 μ l % 1'lik paraformaldehid çözeltisi ilave edildi. Bu işlemle pleytin tabanına yapışık olan hücrelerin fikzasyonu sağlandı. Yirmi dakika sonra paraformaldehid ortamdan uzaklaştırılıp yerine 3 β -HSD boyama solüsyonu ilave edildi. Hücrelerin ışık almaması için pleyt alüminyum folyo ile sarılarak, 37 °C'de 4 saat su banyosu içinde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra inverted mikroskop altında hücrelerin gelişimleri ve ne kadar boyandıkları incelendi.

2.2.7. Hormon Analizi

İnkübasyon bitiminde toplanan mediumlar, östradiol ve progesteron analizi yapılmaya kadar –20 °C`de dondurularak muhafaza edildi. Progesteron ve östradiol analizi gamma sayacı cihazı (Mini-assay type 6.20) yardımıyla, DIA Source PROG-RIA-CT KIP1458 ve E2-RIA-CT KIP0629 ticari hormon kitleri kullanılarak, kiti üreten firmanın protokolüne göre yapıldı.

2.2.7.1. Progesteron Analizi

Kitte belirtilen protokole göre, kalibrasyon, kontrol ve numunelerin her biri için 12x75mm boyutlarındaki antikor kaplı tüpler etiketlendi. Total count 1 ve 2 için özel plastik tüpler kullanıldı. Kalibrasyon, kontrol ve numuneler vorteks cihazı kullanılarak karıştırıldı. Daha sonra her birinden 50 µl dikkatli bir şekilde pipetlenerek etiketlenmiş tüplere kondu. Her bir tüpün üzerine, total count 1-2 dahil, 500 µl tracer eklendi. Tüpler hafif bir şekilde karıştırıldıktan ve ağızları alimünyum folyo ile kapatıldıktan sonra sıcaklığı 37 °C`ye ayarlanmış su banyosuna bir saat süre ile kaldırıldı. Bu süre sonunda total count tüpleri hariç, diğer tüplerin içleri radyoaktif atık torbasına boşatıldı. Daha sonra tüplerin üzerine, total count hariç, her bir tüpün içine 3 ml yıkama solusyonundan konulup, 2 dk beklendi. Tüpler hafifçe sallandıktan sonra tekrar radyoaktif atık torbasına boşatıldı. Bu işlem sonrasında, tüpler birkaç kat kurutma kağıdı serilmiş zemin üzerinde 2 dk ters çevrilerek bırakıldı. Gamma sayacı cihazında tüplerin 60 saniyedeki ölçümleri yapılarak sonuçlar kaydedildi. Elde edilen sonuçlar Mikrocal (TM) Origin 6.0 (Northampton, USA) grafik programı kullanılarak ng/ml`ye dönüştürüldü.

2.2.7.2. Östradiol Analizi

Kitte belirtilen protokole uygun olarak; kalibrasyon, kontrol ve numunelerin her biri için 12x75 mm boyutlarındaki antikor kaplı tüpler etiketlendi. Total count 1 ve 2 için özel plastik tüpler kullanıldı. Kalibrasyon, kontrol ve numuneler vorteks cihazı kullanılarak karıştırıldı. Daha sonra her birinden 100 µl dikkatli bir şekilde pipetlenerek etiketlenmiş tüplere kondu. Her bir tüpün üzerine, total count 1 ve 2 dahil, 1000 µl ¹²⁵Iodine E2 tracer eklendi. Tüpler hafif bir şekilde karıştırıldıktan ve ağızları alimünyum folyo ile kapatıldıktan sonra sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış su banyosuna üç saat süre ile kaldırıldı. Bu süre sonunda total count tüpleri hariç, diğer tüplerin içleri radyoaktif atık torbasına boşatıldı. Daha sonra tüplerin üzerine, total count hariç, her bir tüpün içine 3 ml yıkama solusyonundan konulup, 2 dk beklendi. Tüpler hafifçe sallandıktan sonra tekrar radyoaktif atık torbasına boşatıldı. Bu işlem sonrasında tüpler, birkaç kat kurutma kağıdı serilmiş zemin üzerinde 2 dk ters çevrilerek bırakıldı. Gamma sayacı cihazında tüplerin 60 saniyedeki ölçümleri yapılarak sonuçlar kaydedildi. Elde edilen sonuçlar, Mikrocal (TM) Origin 6.0 (Northampton, USA) grafik programı kullanılarak pg/ml'ye dönüştürüldü.

2.2.8. İstatistiksel Analiz

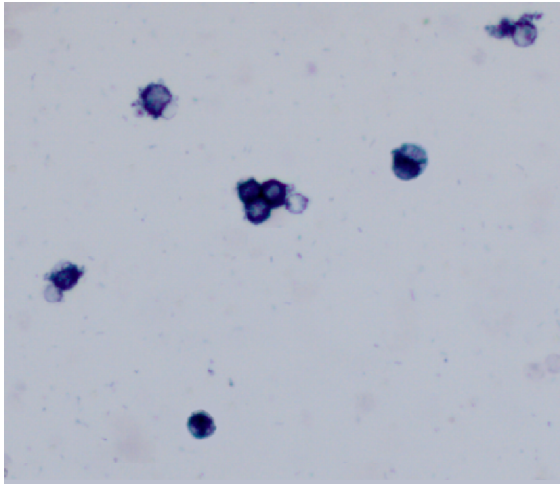
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SAS 8.02 (Inst. Cary NC. USA) paket programı ile yapıldı. Kültürün üçüncü ve beşinci gününe ait verilerin istatistiki hesaplamaları ve grupların ortalama değerleri arasındaki farklılıkların önemliliği için General Linear Model (GLM) prosedürü, farkın anlamlı olduğu gruplar arasındaki önemliliğin kontrolü içinde Tukey testi uygulandı. Şekiller Graph Pad Prism 4.0 programı ile çizildi.

3. BULGULAR

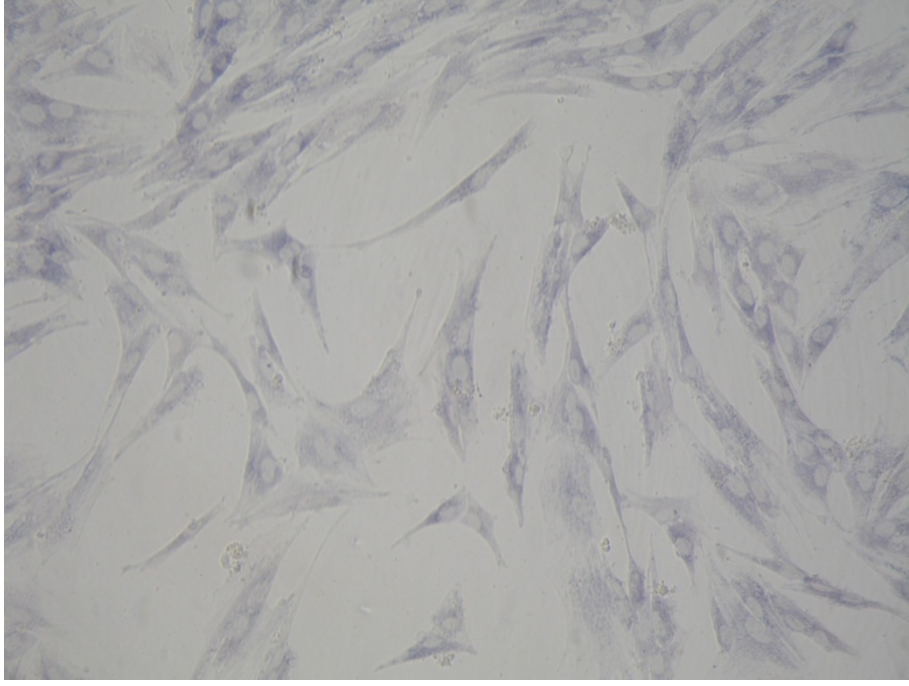
3.1. Hücre Boyaması

Kültür öncesi ve sonrası granüloza hücrelerine 3 β -HSD enzim boyaması uygulandı. Kültür öncesi Şekil 3.1.`de görüldüğü üzere başlangıçta yuvarlak olan hücreler inkübasyon sırasında, kültür pleytinin tabanına yapışarak büyümeye devam etmiş ve birbiri ile iletişim sağlamak için dallanmalar oluşturmuştur (Şekil 3.2). Bu durum bize beşinci günün sonunda hücrelerin hala aktif olduğunu ve inkübasyon süresince sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarına devam ettiğini göstermektedir. Eğer hücreler daha önceden ölmüş olsaydı 3 β -HSD enzimi aktivitesinden bahsetmek mümkün olmayacağından, hücreler ölümden sonraki süreye bağlı olarak ya hiç renk almayacak ya da enzim kalıntılarından dolayı çok hafif olarak boyanacaktı. Hücre gelişimi ve büyümesi de tamamlanmayacaktı.

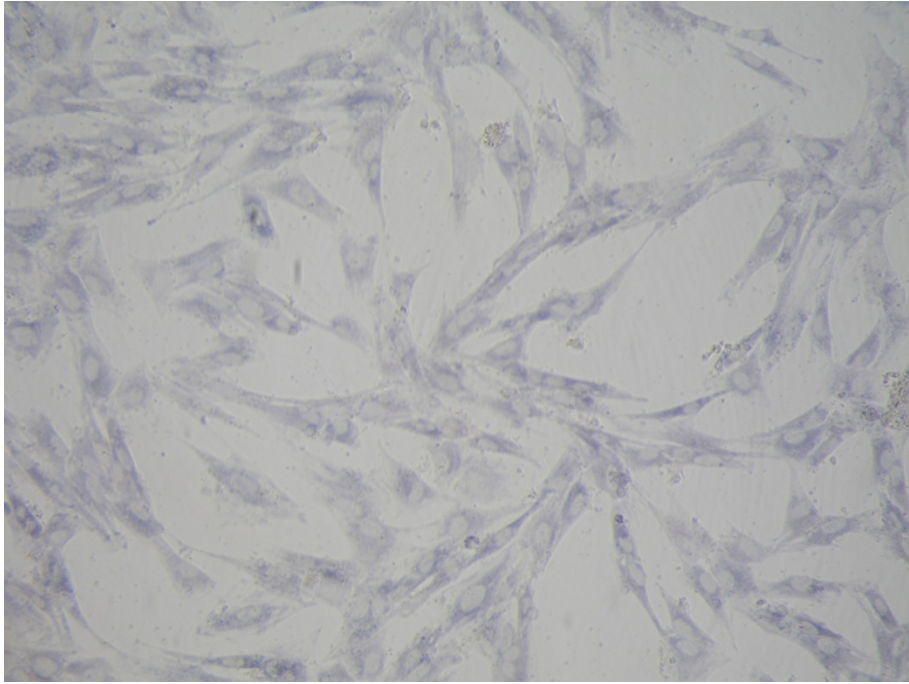
Kültür sonrasında yapılan 3 β -HSD enzim boyamaları incelendiğinde (Şekil 3.2-3.9), 22R-HC (10 μ g/ml) ile FSH (100 ng/ml)`ın kombine kullanıldığı grubun sadece 22R-HC (10 μ g/ml) eklenen gruba göre daha koyu boyandığı gözlemlendi (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).



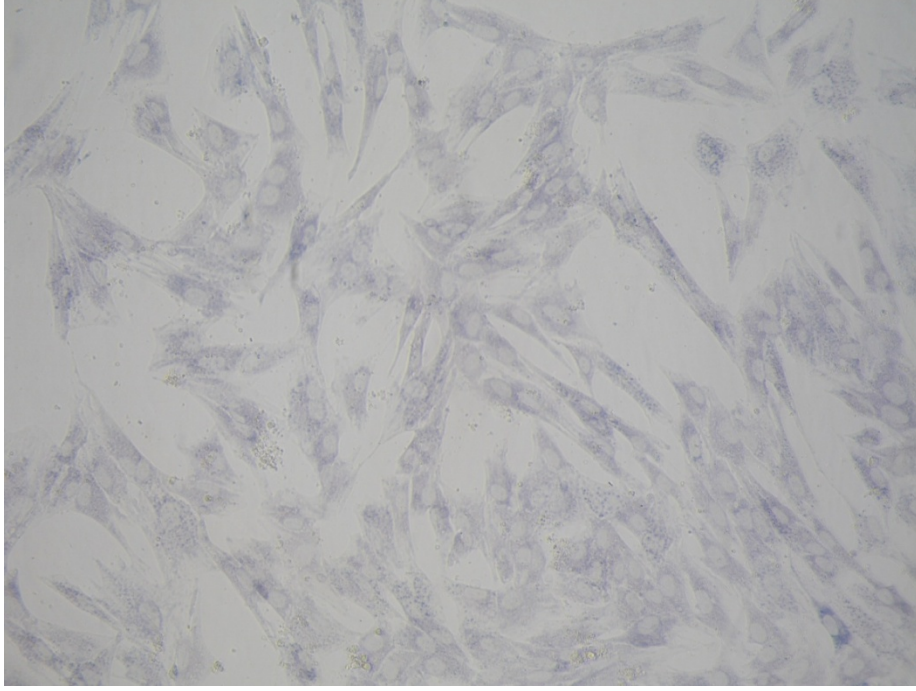
Şekil 3.1. İnkübasyon öncesi boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)



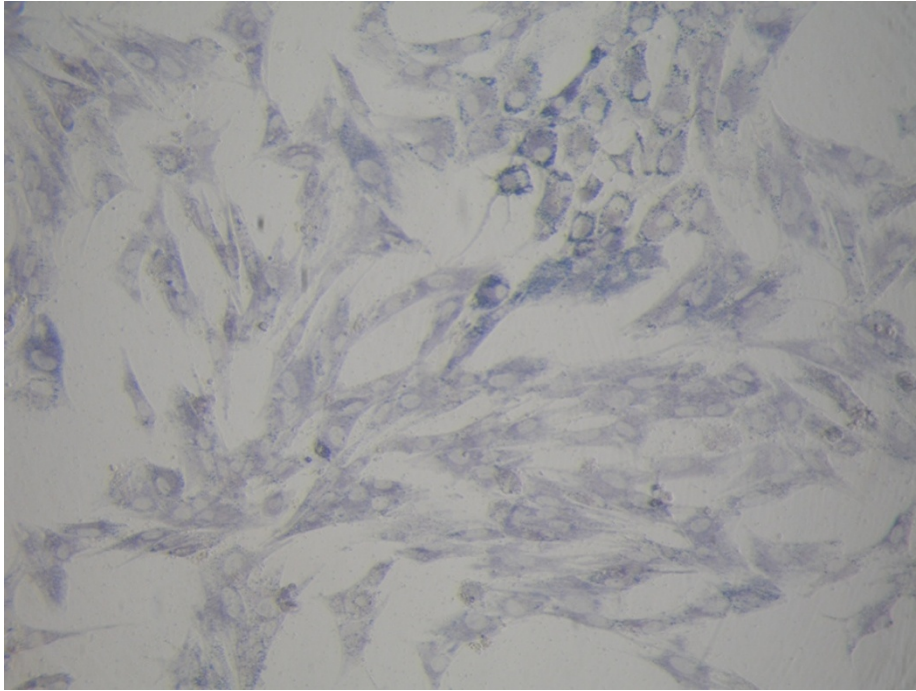
Şekil 3.2. İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti kontrol grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)



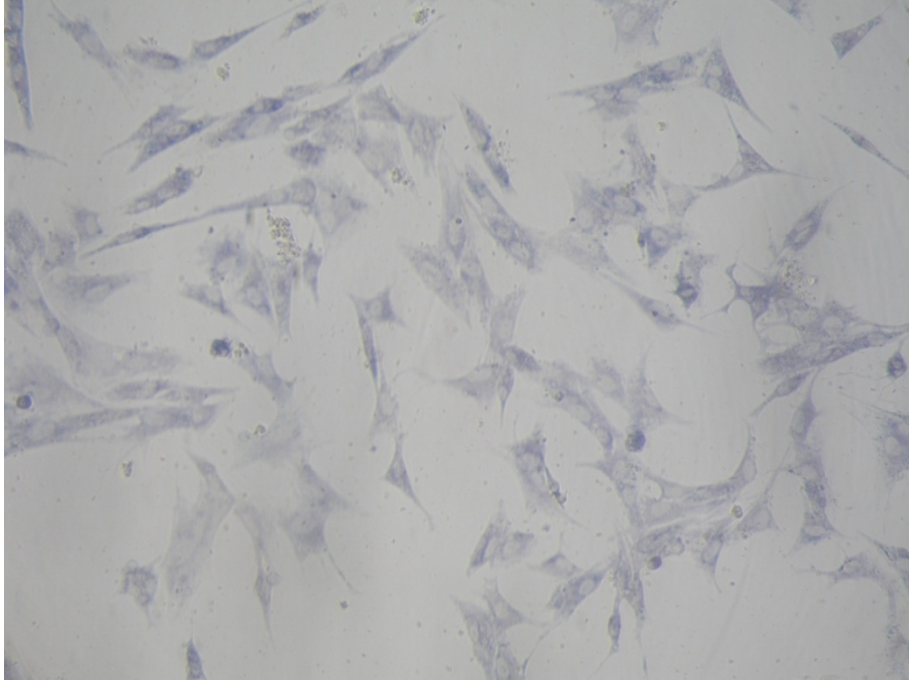
Şekil 3.3. İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti FSH (100 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)



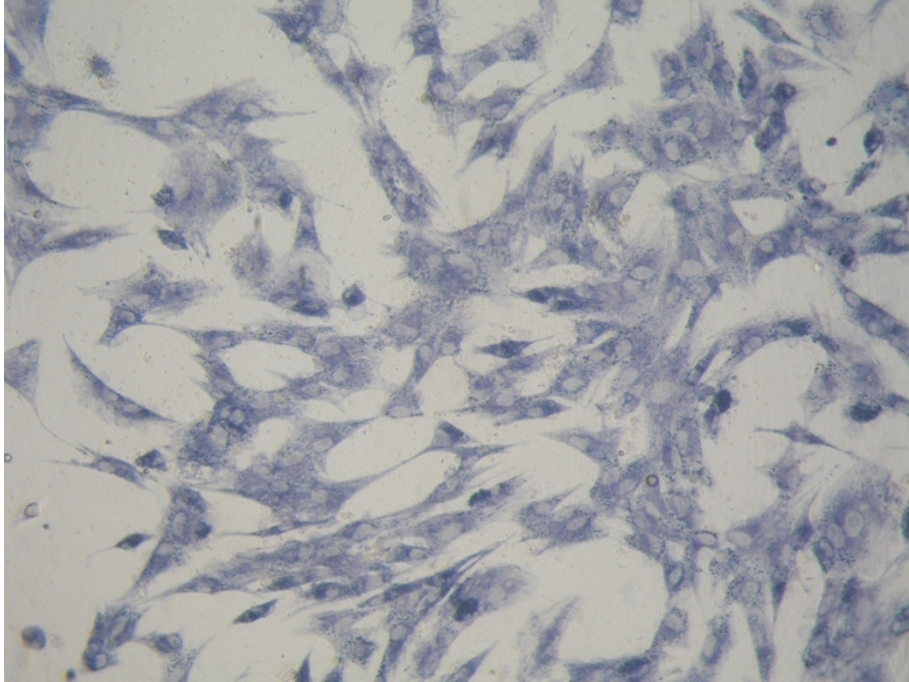
Şekil 3.4. İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti LH (100 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granuloza hücreleri (x200)



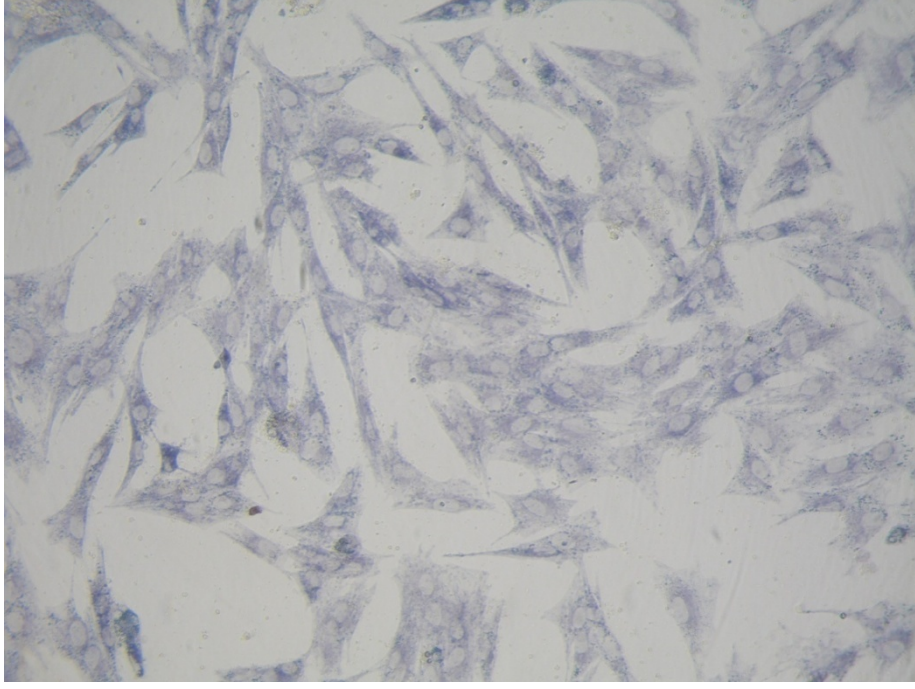
Şekil 3.5. İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti FSH (10 ng/ml) + LH (10 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granuloza hücreleri (x200)



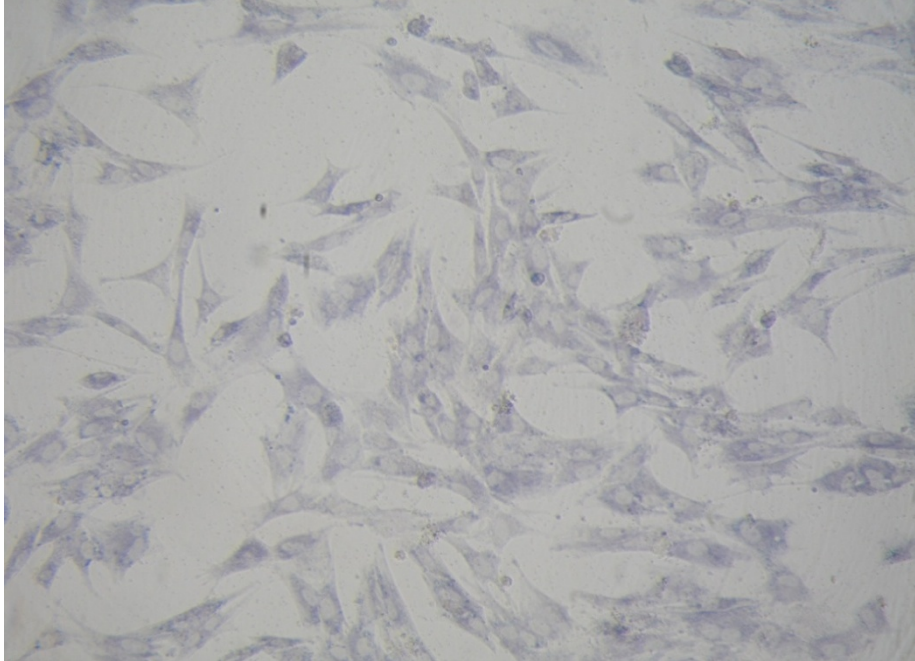
Şekil 3.6. İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti 22R-HC (10 µg/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)



Şekil 3.7. İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti 22R-HC (10 µg/ml) + FSH (100 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)



Şekil 3.8. İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti 22R-HC (10 µg/ml) + LH (100 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)



Şekil 3.9. İnkübasyonun beşinci gününde, kültür pleyti 22R-HC (10 µg/ml) + FSH(10 ng/ml) + LH(10 ng/ml) grubunda boyanmış kedi granüloza hücreleri (x200)

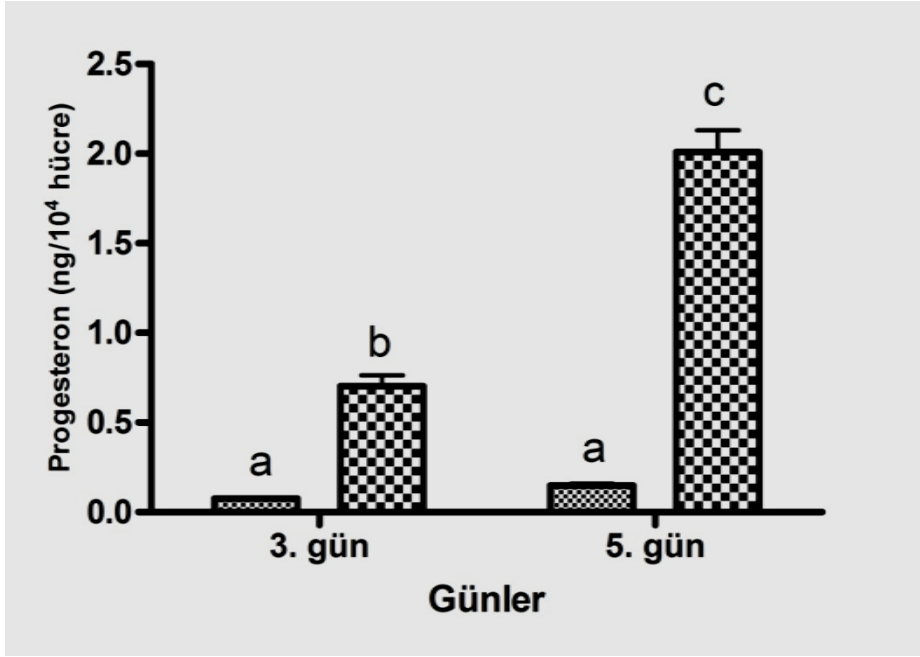
3.2. Hormon Analiz Bulguları

3.2.1. Kolesterolün Bazal Stereoidogenezis Üzerine Etkisi

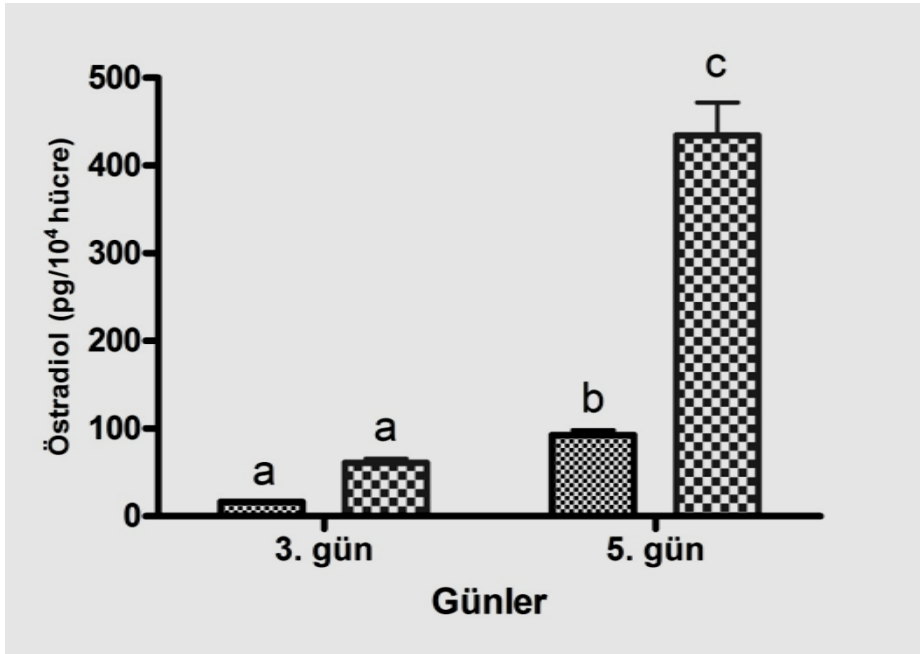
22R-HC uygulanan gruplarda hem progesteron hem de östradiolün bazal üretim miktarında istatistiksel açıdan önemli miktarda bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). Bu artış beş günlük hücre kültürü boyunca devam etti.

Üretilen progesteron miktarı açısından kültürün 3. ve 5. günlerinde, kontrol grubu ile 22H-RC uygulanan grup arasındaki fark önemli ($p<0.001$) bulundu (Şekil 3.10). Bu farkın 3. günde 9.1 kat, 5. günde ise 13.5 kat olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte kontrol grubunun 3. ile 5. günü arasında sentezlenen progesteron miktarı bakımından önemli bir fark olmamasına karşın, 22H-RC grubunda 3. ile 5. gün arasındaki fark önemli bulundu ($p<0.001$).

Kültürün 3. gününde 22H-RC grubunda üretilen östradiol miktarı ile kontrol grubundaki miktar arasında önemli bir fark bulunmamasına rağmen, 5. günde bu gruplar arasındaki fark önemli ($p<0.001$) bulundu (Şekil 3.11). Kültürün 3. ile 5. günleri kıyaslandığında hem kontrol grubunda hem de kolesterol grubunda sentezlenen östradiol miktarında önemli miktarda artış görüldü ($p<0.01$). Bu artış kontrol grubunda 5.7 kat, kolesterol grubunda ise 7.1 kat olarak hesaplandı.



Şekil 3.10. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal progesteron düzeyi üzerine kolesterolün etkisi. (▨) Kontrol (▩) 10 µg/ml 22R-HC. n=6, (a,b, c: p<0.001)



Şekil 3.11. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal östradiol düzeyi üzerine kolesterolün etkisi. (▨) Kontrol (▩) 10 µg/ml 22R-HC. n=6, (a,b,c: p<0.01)

3.2.2. Folikül Uyarıcı Hormonun Steroidogenezis Üzerine Etkisi

Kültürün hem 3. hem de 5. günlerinde FSH (10 ve 100 ng/ml) uygulanan gruplarda progesteron üretimi açısından, kontrol grubuna göre önemli bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). Bu artışın kültürün 3. gününde 2.8 - 3.4 kat ve 5. gününde ise 3.5-3.7 kat arasında olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte kültür süresince FSH uygulamalarında, sentezlenen progesteron düzeyinde doza bağlı bir artış görülmedi ($p>0.05$) (Şekil 3.12).

Folikül uyarıcı hormon (10 ng/ml) ile LH (10 ng/ml) 'ın kombine uygulandığı gruplar, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında progesteron üretimi bakımından kültürün 3. ve 5. günlerinde istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmedi. Kültürün 3. ile 5. günü arasındaki progesteron üretimi kıyaslandığında ise aradaki fark önemli bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 3.12).

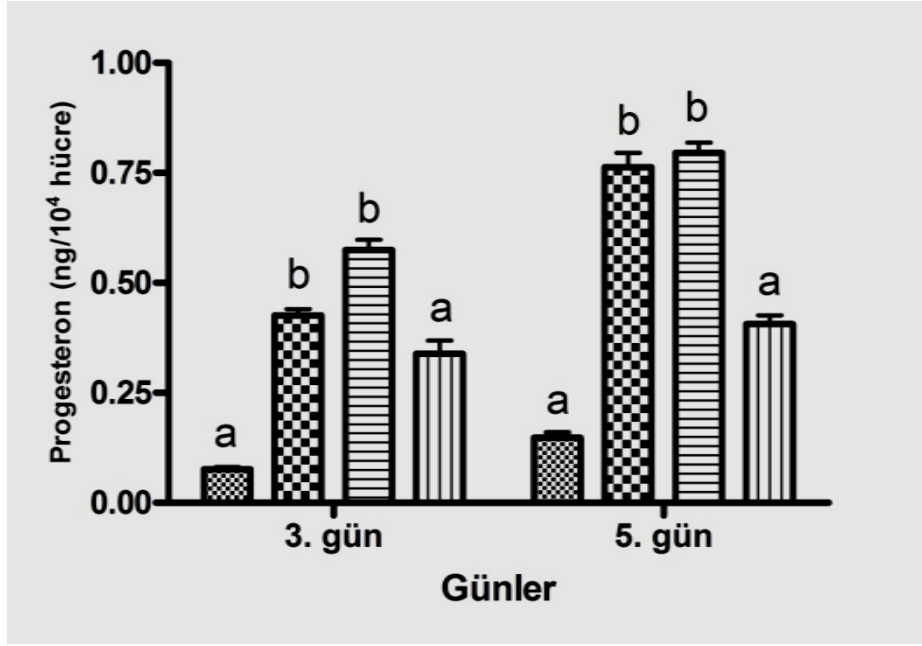
Kültürün 3. ve 5. günlerinde, FSH'nin düşük (10 ng/ml) ve yüksek (100 ng/ml) dozlarının uygulandığı gruplarda östradiol sentezi incelendiğinde önemli bir fark tespit edilmedi (Şekil 3.13). Bununla birlikte kültürün 3. ve 5. günleri arasında östradiol üretimi açısından oluşan fark önemli bulundu ($p< 0.001$). Bu fark kültürün 3. gününde 1.7 - 3.4 kat ve 5. gününde ise 3.7 kat arasında değişmektedir.

Folikül uyarıcı hormon (10 ng/ml) ile LH (10 ng/ml) 'ın kombine uygulandığı gruplar, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında östradiol üretimi bakımından kültürün 3. ve 5. günlerinde istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmedi. Kültürün 3. ile 5. günü arasındaki östradiol üretimi kıyaslandığında ise aradaki fark önemli ($p<0.01$) bulundu (Şekil 3.13).

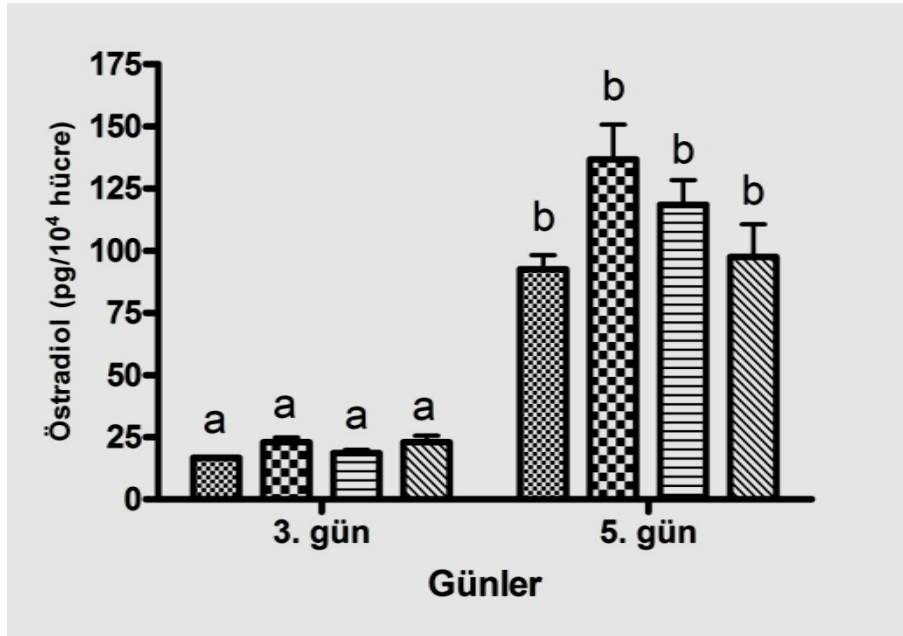
22R-Hydroxycholesterol (10 ng/ml) uygulanan gruplarda kültürün 3. ve 5. günlerinde progesteron üretimi bakımından FSH'nin düşük dozu ile yüksek dozu arasında oluşan fark önemli bulunmadı (Şekil 3.14). Bununla birlikte FSH uygulanan gruplar, sadece 22R-HC uygulanan grup ile karşılaştırıldığında ise oluşan farkın önemli olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Bu artışın FSH'nin uygulanan dozuna bağlı olarak kültürün 3. gününde 2.8-3.4 kat, 5. gününde ise 3.5-3.7 kat arasında değiştiği görüldü.

Kontrol grubuna kıyasla, folikül uyarıcı hormonun düşük (10 ng/ml) ve yüksek (100 ng/ml) dozlarının 22R-HC`nin 10 ng/ml dozu ile kombine kullanıldığı gruplarda kültürün 3. ve 5. günlerinde östradiol miktarında doza bağlı bir etki gözlenmemesine rağmen, kültürün 3. ve 5. günü arasında istatistiksel açıdan önemli bir artış ($p<0.001$) tespit edildi (Şekil 3.15). Bu artışın, sadece 22R-HC uygulanan grupla karşılaştırıldığında kültürün 3. gününde 1.6-1.8 kat ve 5. gününde ise 2.7-2.8 kat arasında olduğu gözlemlendi.

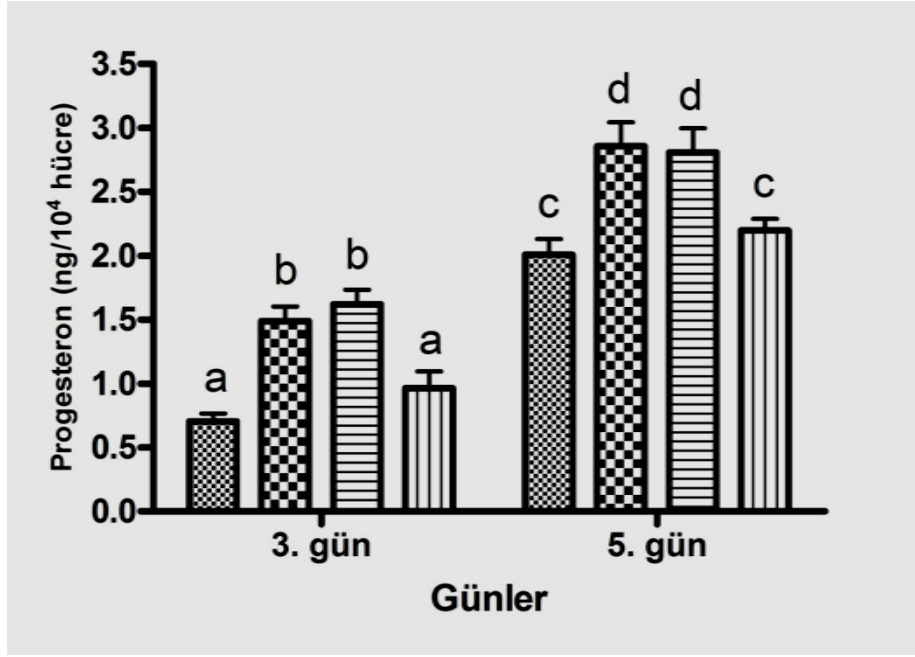
22R-HC (10 ng/ml), FSH (10 ng/ml) ve LH (10 ng/ml) hormonlarının kombine uygulandığı gruplarda, östradiol ve progesteron üretimi bakımından sadece 3. ile 5. gün arasında oluşan farkın önemli olduğu tespit edildi ($p<0.001$). FSH (10 ng/ml) ve LH`n (10 ng/ml) tek başına uygulandığı gruplar ile kıyaslandığında ise oluşan farkın önemli olmadığı görüldü (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15).



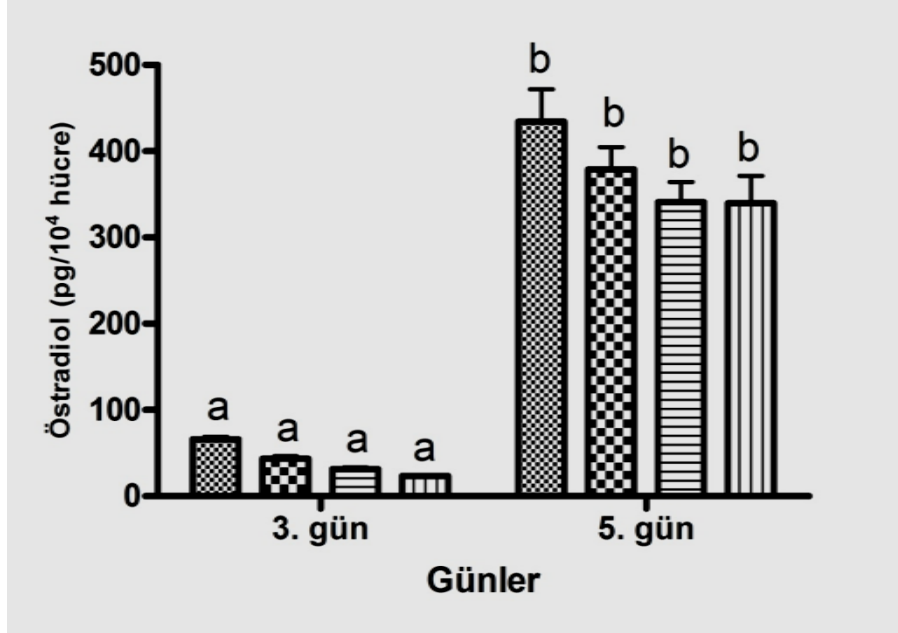
Şekil 3.12. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal progesteron düzeyi üzerine FSH 'ın doza bağlı etkisi. (▤) Kontrol (▥) FSH 10 ng/ml (≡) FSH 100 ng/ml (|||) FSH 10 ng/ml+LH 10 ng/ml. n=6, (a,b: p<0.05)



Şekil 3.13. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal östradiol düzeyi üzerine FSH 'ın doza bağlı etkisi. (▤) Kontrol (▥) FSH 10 ng/ml (≡) FSH 100 ng/ml (|||) FSH 10 ng/ml+LH 10 ng/ml. n=6, (a,b: p<0.001)



Şekil 3.14. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen progesteron düzeyi üzerine FSH 'ın, LH ve 22R-HC ile kombine kullanımının etkisi. (checkered) 22R-HC 10 µg/ml (cross-hatched) 22R-HC 10 µg/ml + FSH 10 ng/ml (horizontal lines) 22R-HC 10 µg/ml + FSH 100 ng/ml (vertical lines) 22R-HC 10 µg/ml + FSH 10 ng/ml + LH 10 ng/ml. n=6, (a,b,c,d: p<0.05)



Şekil 3.15. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen östradiol düzeyi üzerine FSH 'ın, LH ve 22R-HC ile kombine kullanımının etkisi. (checkered) 22R-HC 10 µg/ml (cross-hatched) 22R-HC 10 µg/ml + FSH 10 ng/ml (horizontal lines) 22R-HC 10 µg/ml + FSH 100 ng/ml (vertical lines) 22R-HC 10 µg/ml + FSH 10 ng/ml + LH 10 ng/ml. n=6, (a,b: p<0.001)

3.2.3. Luteinleştirici Hormonun Steroidogenezis Üzerine Etkisi

Kültürün 3. ve 5. gününde LH`ın uygulandığı düşük (10 ng/ml) ve yüksek doz (100 ng/ml) gruplar ile kontrol grubu arasında progesteron sentezi açısından istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi. Aynı zamanda LH`ın düşük ve yüksek doz olarak uygulandığı gruplarda da progesteron sentezi incelendiğinde kültürün 3. ve 5. günü arasında istatiki açıdan önemli bir fark bulunmadı (Şekil 3.16).

Lüteinleştirici hormon (10 ng/ml) ve FSH (10 ng/ml)`ın kombine uygulandığı gruplar kontrol göre kıyaslandığında progesteron sentezi açısından kültürün 3. ve 5. günlerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı. Lüteinleştirici hormon (10 ng/ml) ve FSH (10 ng/ml)`ın kombine uygulandığı gruplarda progesteron üretimi bakımından, 3. ile 5. gün arasında oluşan fark önemli bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 3.16).

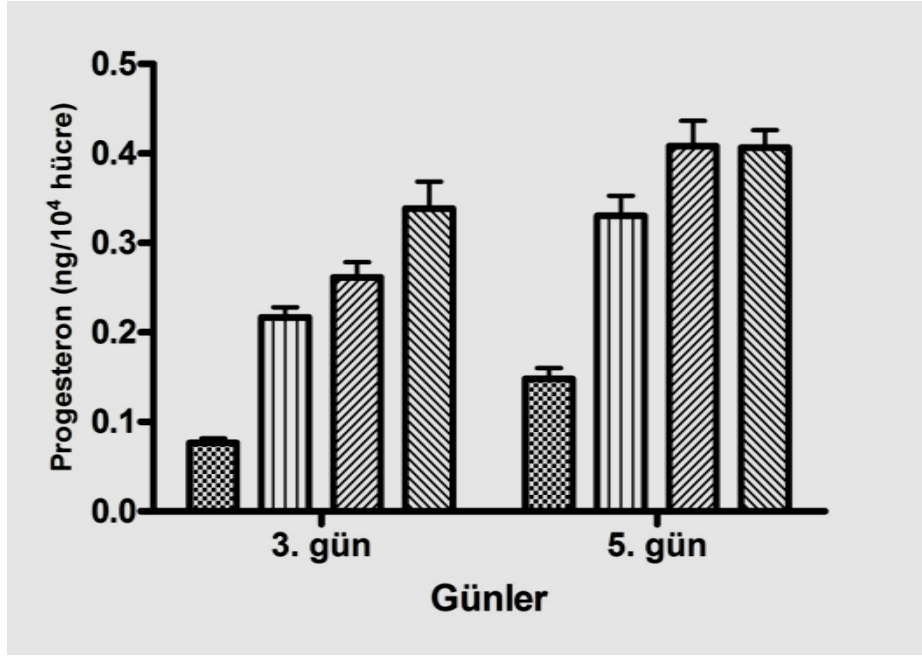
Kültürün 3. gününde LH`ın uygulandığı gruplarda östradiol sentezi açısından kontrole göre istatistiksel önemde bir fark tespit edilmemesine rağmen, kültürün 5. gününde yüksek doz LH uygulanan grupta oluşan fark önemli ($p<0.05$) bulundu (Şekil 3.17). Lüteinleştirici hormonun düşük ve yüksek dozlarının uygulandığı gruplarda kültürün 3. günü ile 5. günü arasında östradiol sentezi açısından oluşan fark önemli bulundu ($p<0.001$) (Şekil 3.17). Bu farkın kontrol grubu ile kıyaslandığında, 4.0 ile 4.7 kat arasında değiştiği gözlemlendi.

Lüteinleştirici hormon (10 ng/ml) ve FSH (10 ng/ml)`ın kombine uygulandığı gruplar kontrol göre kıyaslandığında östradiol sentezi açısından kültürün 3. ve 5. günlerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı. Lüteinleştirici hormon (10 ng/ml) ve FSH (10 ng/ml)`ın kombine uygulandığı gruplarda östradiol sentezi açısından 3. ile 5. gün arasında oluşan farkın önemli olduğu ($p<0.01$) tespit edildi (Şekil 3.17).

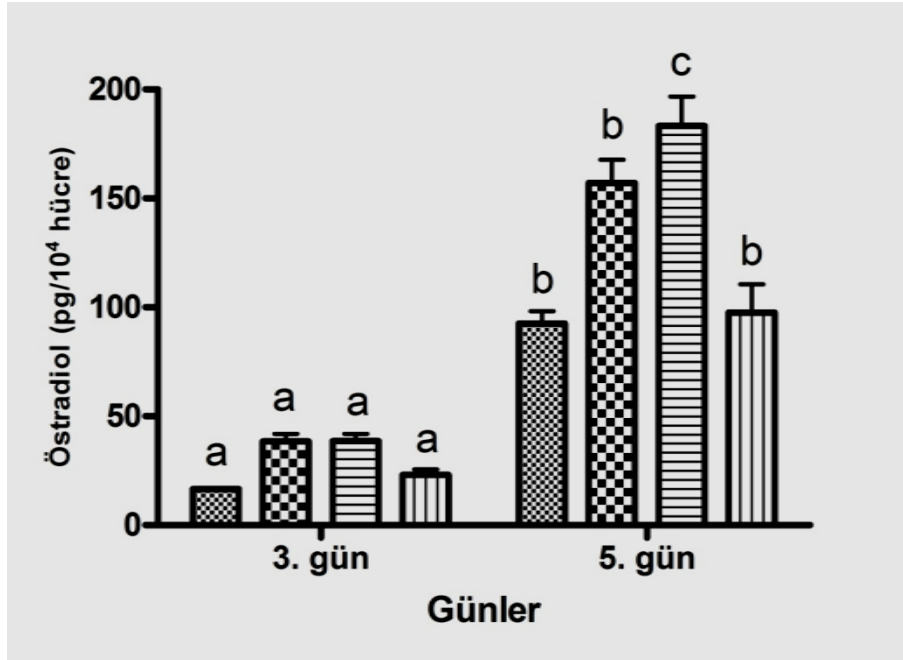
Kültürün 3. ve 5. günlerinde LH`ın düşük ve yüksek dozunun 22R-HC ile kombine uygulandığı gruplarda, östradiol ve progesteron üretimi açısından doza bağlı bir fark bulunmadı. Lüteinleştirici hormonun düşük ve yüksek dozlarının 22R-HC (10 ng/ml) ile kombine kullanıldığı gruplarda kültürün 3. ile 5. günleri arasında hem östradiol hem de progesteron miktarında meydana gelen artışın önemli

($p < 0.001$) olduğu gözlemlendi (Şekil 3.18 ve Şekil 3.19). Bununla birlikte LH'nin 22R-HC ile kombine uygulanması sadece LH uygulanan gruplarla kıyaslandığında progesteron sentezinde kültürün 3. gününde 3.0-3.4 kat ve 5. gününde ise 4.8-6.1 kat kadar bir artış gözlemlenmiştir. Östradiol sentezinde ise kültürün 3. gününde 0.9-1.0 kat ve 5. gününde ise 2.4-2.6 kat kadar bir artış sağlamıştır.

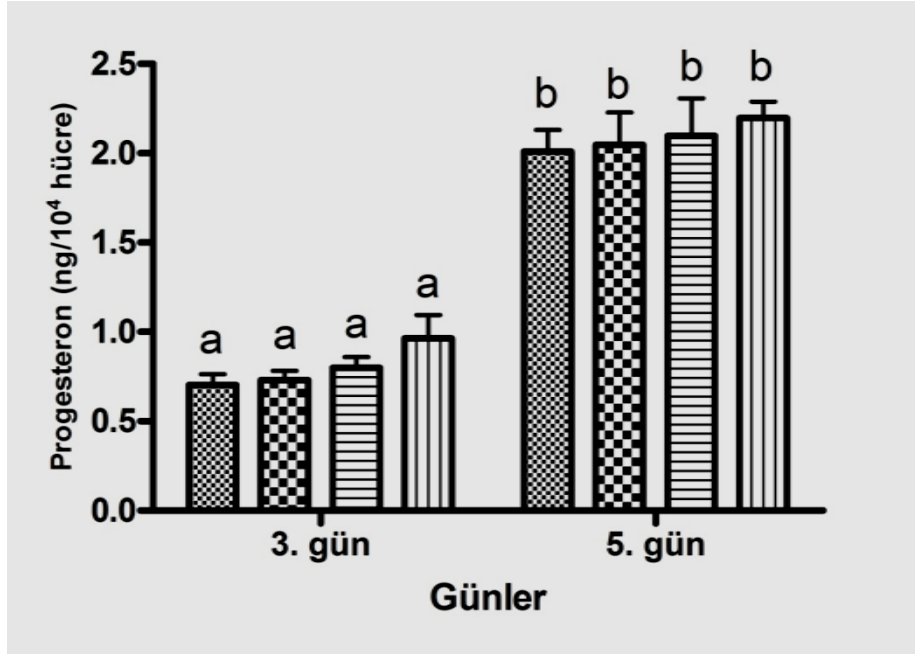
22R-HC (10 ng/ml), LH (10 ng/ml) ve FSH (10 ng/ml) hormonlarının kombine uygulandığı gruplarda, progesteron ve östradiol üretimi bakımından sadece 3. ile 5. gün arasında oluşan farkın önemli olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). LH (10 ng/ml) ve FSH'nin (10 ng/ml) tek başına uygulandığı gruplar ile kıyaslandığında ise oluşan farkın önemli olmadığı görüldü (Şekil 3.18 ve Şekil 3.19).



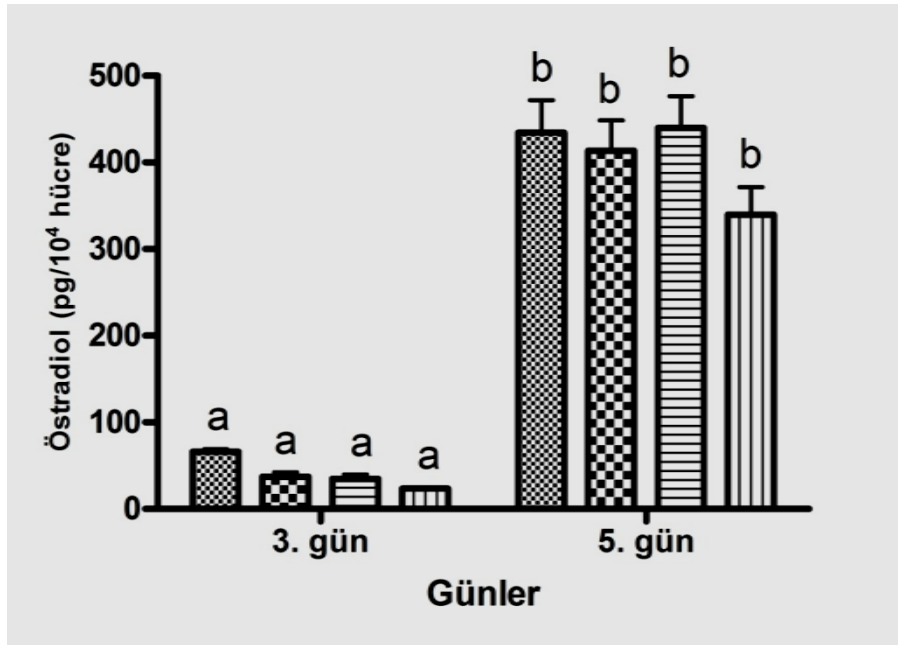
Şekil 3.16. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal progesteron düzeyi üzerine LH 'ın doza bağlı etkisi. (▨) Kontrol (▩) LH 10 ng/ml (≡) LH 100 ng/ml (|||) LH 10 ng/ml + FSH 10 ng/ml. n=6



Şekil 3.17. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen bazal östradiol düzeyi üzerine LH 'ın doza bağlı etkisi. (▨) Kontrol (▩) LH 10 ng/ml (≡) LH 100 ng/ml (|||) LH 10 ng/ml + FSH 10 ng/ml. n=6, (a,b: p<0.001; a,c: p<0.001; b,c: p<0.05)



Şekil 3.18. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen progesteron düzeyi üzerine LH 'ın, FSH ve 22R-HC ile kombine kullanımının etkisi. (▤) 22R-HC 10 µg/ml (▥) 22R-HC 10 µg/ml + LH 10 ng/ml (≡) 22R-HC 10 µg/ml + LH 100 ng/ml (||) 22R-HC 10 µg/ml + LH 10 ng/ml + FSH 10 ng/ml. n=6, (a,b: p<0.001)



Şekil 3.19. Kedi granüloza hücreleri tarafından üretilen östradiol düzeyi üzerine LH 'ın, FSH ve 22R-HC ile kombine kullanımının etkisi. (▤) 22R-HC 10 µg/ml (▥) 22R-HC 10 µg/ml + LH 10 ng/ml (≡) 22R-HC 10 µg/ml + LH 100 ng/ml (||) 22R-HC 10 µg/ml + LH 10 ng/ml + FSH 10 ng/ml. n=6, (a,b: p<0.001)

4. TARTIşMA VE SONUÇ

Granüloza hücre fizyolojisi inekler başta olmak üzere birçok türde, onlarca araştırıcı tarafından incelenmiştir (May ve Schomberg 1981, Benhaim ve ark. 1995, Bréard ve ark. 1998, Greisen ve ark. 2001, Tosca ve ark. 2005). Ancak tarafımızdan yapılan literatür taramasında bu güne kadar, kedilerde gerçekleştirilen herhangi bir granüloza hücre kültürü çalışmasına rastlanılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma kedi granüloza hücre kültürü alanında yapılan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Granüloza hücrelerinin gelişimi ve steroidojenik aktivitenin devamlılığında rol oynayan birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler içerisinde FSH ve LH etkisi en fazla araştırılan ajanlardır (Willis ve ark. 1996, Greisen ve ark. 2001, Johnson ve ark. 2002, Chandras ve ark. 2007). Ancak bunlardan hiç birinin kedi granüloza hücreleri üzerine etkisi araştırılmamıştır.

Bilindiğı üzere kedilerin ovaryum fizyolojisi (provoke ovulatör olmalarından dolayı) diğerk evcil hayvanlara göre farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıktan en çok etkilenen graff folikülü ve dolayısıyla granüloza hücreleridir. O nedenle bu türe ait granüloza hücre fizyolojisinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı bu çalışmada kedi granüloza hücreleri üzerine gonadotropinlerin etkisi araştırılmıştır. Bununla birlikte steroid hormonların sentezlenmesinde önemli rolü olan 22R-HC`nin tek başına veya gonadotropinlerle kombine kullanımının steroidogenezis üzerine etkisi de bu çalışmada incelenmiştir.

Granüloza hücre kültürü üzerine yapılan çalışmaları karşılaştırırken araştırmacıların, hücrelerin pleyte yapışması için kullandıkları metod göz önünde bulundurulmalıdır. Bazı araştırmacılar serumlu pre-inkübasyon yöntemini tercih ederken, bazıları ise serumsuz pre-inkübasyonu tercih etmişlerdir. Bu iki yönteminde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Serumlu pre-inkübasyonda, kullanılan FCS içerisinde birçok bilinmeyen faktör bulunması yapılan spesifik hormon çalışmalarını ne ölçüde etkilediğı bilinmemektedir. Serumsuz pre-inkübasyon uygulamalarında ise hücrelerin pleyte yapışması tam sağlanamadığından hücre kaybı meydana gelmektedir. Shanmugam ve ark. (2009)`nın bu sorunu aşmak için fibronektin ile pre-inkübasyon uygulaması yaparak tamamen serumsuz bir bufalo granüloza hücre

kültürü metodu geliştirmişlerdir. Shanmugam ve ark. (2009)'nın geliştirdikleri bu granüloza hücre kültürü metodu sonucunda daha önceki serumlu pre-inküasyon çalışmalarıyla (Silva ve Price 2000, Bhushan ve ark. 2004) benzer olarak, kültür süresince bazal östradiol miktarında azalma, progesteron miktarında ise artış olduğu bildirilmiştir. Bu şekilde kültür süresince, östradiol üretiminin stabil kalmasının sağlanamaması granüloza hücrelerinin luteinezasyona uğramış olabileceklerini düşündürmektedir (Shanmugam ve ark. 2009).

Gutierrez ve ark. (1997)'nin yaptıkları çalışmada ise serum ile pre-inkübe edilen granüloza hücrelerinin serumsuz pre-inkübasyona göre daha az miktarda östradiol sentezlediği, üretilen progesteron miktarında ise değişme olmadığı rapor edilmiştir. Gutierrez ve ark. (1997) buna dayanarak, serumla pre-inkübasyonun hücrelerin toplam steroidojenik kapasitesinde bir azalmaya neden olduğu sonucuna varmıştır.

Yapılan bu kedi granüloza hücre kültürü çalışmasında ise Langhout ve ark. (1991) ile Spicer ve ark. (2004)'nın kullanmış oldukları pre-inkübasyon metoduna benzer olarak hücre yapışmasını sağlamak için serumlu pre-inkübasyon metodu kullanıldı. Fakat, daha önceki araştırmacıların bildirdikleri serumdan kaynaklanabilecek dezavantajları minimize etmek için (serumdaki bilinmeyen faktörler ve toplam steroidojenik kapasiteyi azaltması) granüloza hücrelerinin pre-inkübasyonda kullanılan FCS'un oranı daha az (%5) olarak ve daha kısa süre (18 saat) ile uygulandı.

Bazal östradiol miktarı, hem serumlu hem de serumsuz pre-inkübasyon metodunu kullanan daha önceki bazı araştırmacıların bildirdiklerinin (Berndtson ve ark. 1995, Yang ve Rajamahendran 1998, Shanmugam ve ark. 2009) aksine, kültür süresince artış gösterdi. Bazal progesteron miktarında ise hem serumlu hem de serumsuz pre-inkübasyon metodunu kullanan önceki çalışmaların (Silva ve Price 2000, Bhushan ve ark. 2004) aksine kültür boyunca istatistiksel açıdan önemli bir artış gözlenmedi. Kültür süresince sentezlenen östradiol miktarında artış gözlenmesi ve progesteron miktarının değişmemesi, granüloza hücrelerinin steroidojenik özelliklerini sağlıklı bir şekilde sürdürdüklerini göstermektedir.

Jimenez-Krassel ve Ireland (2002)'ın inek granüloza hücrelerinde yaptığı çalışmada FSH'nin 1, 10 ve 100 ng/ml dozlarında 48 saat süre ile uygulanması progesteron sentezini önemli miktarda uyarmıştır ($p<0.05$). Bhushan ve ark. (2004)'nın serum pre-inkübasyonlu yaptığı hücre kültürü çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Mevcut çalışmada ise, kedi granüloza hücrelerine FSH'nin 10 ve 100 ng/ml dozlarında uygulanması, kültürün 3. ve 5. günlerindeki progesteron düzeyini önemli miktarda arttırmıştır ($p<0.001$). Östradiol düzeyinde ise kültür boyunca istatistiksel olarak önemli uyarıcı bir etki meydana getirmemiştir ($p>0.05$). Elde edilen bu sonuçlar, serum pre-inkübasyonlu hücre kültürü sistemini kullanan Yang ve Rajamahendran (1998) ile Jimenez-Krassel ve Ireland (2002)'ın yapmış oldukları çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte Jimenez-Krassel ve Ireland (2002)'ın çalışmalarında bildirdiklerinin aksine bu çalışmada progesteron sentezi üzerine FSH'nin 10 ve 100 ng/ml dozları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmedi.

Yang ve Rajamahendran (1998)'ın yapmış oldukları çalışmada, küçük foliküllerden elde edilen granüloza hücreleri üzerine LH'nin etkisini incelenmiştir. Bu araştırmacılar LH'nin progesteron ve östradiol sentezi üzerine uyarıcı bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Yang ve Rajamahendran (1998)'ın elde ettikleri sonuçlar ile benzer olarak yaptığımız bu çalışmada da kültürün 3. gününde, kedi granüloza hücreleri üzerine LH'nin 10 ve 100 ng/ml dozlarında uygulanmasının progesteron ve östradiol sentezi üzerine etkisinin olmadığı tespit edildi. Kültürün 5. gününde ise Yang ve Rajamahendran (1998)'ın bildirdiklerinin aksine yüksek doz LH uygulaması östradiol sentezini uyarmaktadır. Kültür boyunca LH'nin, uygulanan düşük ve yüksek dozları arasında da progesteron ve östradiol üretimi açısından önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Buna ilaveten mevcut çalışmada, FSH (10 ng/ml) ile LH (10 ng/ml) hormonlarının kombine kullanımının da kültürün 3. ve 5. gününde, progesteron ve östradiol sentezi üzerine önemli bir etki göstermediği ortaya konmuştur.

Yapılan literatür taramalarına göre, kedi granüloza hücre kültüründe steroidogenezis üzerine 22R-HC'nin etkisine ilk defa bu çalışmada bakıldı. Daha önce Arıkan ve Yiğit (2009) kedi luteal hücre kültüründe progesteron sentezi üzerine 22R-HC'nin etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada, 10 µg/ml 22R-HC uygulanan gruplarda bazal progesteron düzeyinin kültürün 3. gününde 2.7 kat ve 5. gününde ise 5.1 kat arttığını bildirmişlerdir. Yaptığımız bu granüloza hücre kültürü çalışmasında ise progesteron sentezi, 10 µg/ml 22R-HC'nin etkisine bağlı olarak kültürün 3. gününde 9.1 kat ve 5. gününde ise 13.5 kat artış gösterdi.

Folikül uyarıcı hormon ve LH'nin değişik dozlarının 22R-HC ile birlikte kombine etkisi de yine ilk defa mevcut çalışmada ortaya konmuştur. Folikül uyarıcı hormonun 22R-HC ile kombine uygulandığı gruplarda hem progesteron hem de östradiol miktarında önemli bir artış olduğu gözlemlendi. Steroid hormon üretimi açısından kıyaslandığında progesteron sentezinde meydana gelen artış, östradiol sentezine göre kültürün 3. gününde 1.8 kat, 5. gününde ise 1.3 kat daha fazla olduğu gözlemlendi. Lüteinleştirici hormonun 22R-HC ile kombine uygulandığı gruplarda ise progesteron sentezinin östradiol sentezine göre kültürün 3. gününde yaklaşık olarak 3.3 kat ve 5. gününde ise 2.3 kat daha fazla olduğu tespit edildi. Bu da bize FSH ve LH'nin düşük ve yüksek dozlarının 10 µg/ml 22R-HC ile kombine uygulanmasının progesteron sentezini, östradiol sentezine göre daha fazla oranda etkilediğini göstermektedir. Bunda 22R-HC'nin progesteron sentezinde önemli rol oynamasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Kültür sonrası yapılan 3β-HSD enzim boyamaları incelendiğinde ise 22R-HC (10 µg/ml) ile FSH (100 ng/ml)'in kombine kullanıldığı grubun, sadece 22R-HC (10 µg/ml) uygulanan gruba göre daha koyu boyandığı gözlemlendi. Bu gruplar, progesteron sentezi açısından kıyaslandığında ise daha koyu boyanan grupta progesteron sentezinin önemli miktarda fazla olduğu tespit edildi. Bu da bize 3β-HSD enzim boyamasının luteal hücrelerde uygulandığı gibi (Arıkan ve ark. 2009) granüloza hücrelerindeki progesteron aktivitesinin ortaya konmasında da kullanılabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile kedilerde ilk defa granüloza hücre kültürü modeli geliştirilmiştir. Diğer hayvanlar üzerinde yapılan önceki bazı çalışmalarda

ifade edilen, kültür süresince östradiol sentezindeki düşmenin ve progesteron sentezindeki artışın engellenememe problemi ile bu çalışmada karşılaşılmamıştır. Bu problemin kedi granüloza hücrelerinin pre-inkübasyonunda FCS`un %5 oranında 18 saat süreyle kullanılması ile aşıldığı düşünülmektedir. Steroid hormon üretiminde önemli role sahip olan kolesterolün kedi granüloza hücreleri üzerine etkileri de bu çalışma ile ortaya kondu.

Elde edilen veriler ışığında kedi granüloza hücrelerinden sentezlenen progesteron miktarı üzerine LH uygulamasının herhangi bir etki sağlamadığı, FSH`ın ise progesteron üretimini önemli miktarda arttığı tespit edildi. Bununla birlikte yüksek doz LH uygulamasının östradiol sentezini uyardığı, FSH uygulamasının ise östradiol sentezinde önemli bir fark oluşturmadığı ortaya konmuştur. Mevcut çalışmada, FSH uygulamasının progesteron sentezini uyarması ve östradiol sentezinde ise önemli bir artış sağlamaması, granüloza hücrelerinin 10 ng/ml FSH`den daha yüksek doza maruz kalmasının luteinizasyonu uyardığı düşünülmektedir. Bu durum diğer türler üzerinde yapılan önceki bazı çalışmalarla benzer olarak kedi granüloza hücre kültürü çalışmalarında da aşılması gereken noktalardan biri olarak durmaktadır.

KAYNAKLAR

- AERTS MJ ve BOLS PEJ (2008) Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals*, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x
- ARIKAN S ve YİĞİT AA (2009) Effects of cholesterol and cAMP on progesterone production in cultured luteal cells isolated from pseudopregnant cat ovaries. *Animal Reproduction Science*, 115: 238-246.
- ARMSTRONG DT, GOFF AK, DORRINGTON JH (1979) Ovarian Follicular Development and Function. In Midgley AR, Sadler WA (eds), Raven Press, New York, p:169-182.
- BANKS DR (1986) Physiology and endocrinology of the feline estrous cycle. In Morrow DE(ed): *Current Therapy in Theriogenology*. WB Saunders Company Philadelphia, USA, p:795.
- BENHAİM A, FERAL C, LANGRIS M, BOCQUET J, LEYMARIE P (1995) Progesterone Secretion and Proliferation in Cultured Rabbit Granulosa Cells under Conditions of - D-Xyloside-Induced Inhibition of Proteoglycan Synthesis. *Biology of Reproduction*, 52: 939-946
- BERNDTSON AK, VINCENT SE, FORTUNE JE (1995) Low and high concentrations of gonadotropins differentially regulate hormone production by theca interna and granulosa cells from bovine preovulatory follicles. *Biology of Reproduction*, 52: 1334-1342.
- BHUSHAN S, PALTA P, BANSAL N, SHARMA V, MANIK RS (2005) Effect of insulin on the proliferation of and progesterone production by buffalo granulosa cells in vitro. *Veterinary Record*, 157: 746-748.
- BJERSING L (1967) On the morphology and endocrine function of granulosa cells of ovarian follicles in corpora lutea. *Acta Endocrinologica (Copenhagen), Supplement*. 125: 5-23.

- BRÉARD E, DELARUE B, BENHAÏM A, FÉRAL C, LEYMARIE P (1998) Inhibition by gonadotropins of interleukin-1 production by rabbit granulosa and theca cells: effects on gonadotropin-induced progesterone production. *European Journal of Endocrinology*, 138: 328-336.
- BRISTOL SK ve WOODRUFF TK (2004) Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor beta superfamily ligands in the feline ovary. *Biology of Reproduction*, 70: 846–859.
- CHAKRABORTY PK, WILDT DE, SEAGER SWJ (1982) Induction of estrus and ovulation in the cat and dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 12: 85-91.
- CHANDRAS, C, HARRIS TE, BERNAL AL, ABAYASEKARA DRE, MICHAEL AE (2007) PTGER1 and PTGER2 receptors mediate regulation of progesterone synthesis and type 1 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity by prostaglandin E-2 in human granulosa-lutein cells. *Journal of Endocrinology*. 194: 595-602.
- CHRISTIANSEN IJ (1984) Gynaecology of the Normal Female. *Reproduction in the Dog and Cat*, Chapter 11, p: 225-236.
- CLEVIDENCE BA ve BIERI JG (1993) Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology*, 214: 33-47.
- CONCANNON PW, HODGSON B, LEIN D, REFLEX LH (1980) Release in estrus cats following single and multiple copulations. *Biology of Reproduction*, 23: 111-117.
- ÇOYAN K (1994) Evcil Hayvanlarda Seksüel Sikluslar. In Alaçam E(ed): *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun’i Tohumlama, Dogum ve infertilite*. 1. baskı, Konya Dizgievi, p: 35-36.
- DAHL KD ve HSUEH AJW (1988) Mechanism of action of FSH in the ovary. In: Cook B, King R, Van Der Molen H, eds. *New Comprehensive Biochemistry: Hormones and their Action*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers, p: 181-192.
- DRUMMOND AE (2006) The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4: 16.

- FELDMAN EC ve NELSON RW (1996) *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 2nd edition. WB Saunders Company, Philadelphia, USA, p:741-768
- FONTBONNE A ve MALANDIAN E (2006) Ovarian ultrasonography and follow-up of estrus in the bitch and queen. In *Waltham Focus*(ed), Harvey R, 16: 22-29.
- GRAHAM LH, BYERS AP, WILDT DE, ARMSTRONG DL, BROWN JL (1996) *Natural versus chorionic gonadotropin*-induced ovarian responses in the tiger assessed by fecal steroids. *Biology of Reproduction Supplement*, 54:114(abstract)
- GREÏSEN S, LEDET T, OVESEN P (2001) Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Human Reproduction*, 16: 2061-2065.
- GRUMMER RR ve CARROLL DJ (1988) A review of lipoprotein cholesterol metabolism: Importance to ovarian function. *Journal of Animal Science*, 66: 3160-3173.
- GUDERMUTH DF, NEWTON L, DAELS P, CONCANNON P (1997) Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 51: 177–84.
- GUTIERREZ CG, CAMPBELL BK, WEBB R (1997) Development of a Long-Term Bovine Granulosa Cell Culture System: Induction and Maintenance of Estradiol Production, Response to Follicle-Stimulating Hormone, and Morphological Characteristics. *Biology of Reproduction*, 56: 608-616.
- HAFEZ ESE, JAINUDEEN MR, ROSNINA Y (2000) Hormones, Growth Factors and Reproduction. In Hafez B (ed.): *Reproduction in Farm Animals* (7th ed.), Chapter: 3, Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- HILLIER SG (1991) Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. *Journal of Endocrinology*, 131: 171-175.
- HILLIER SG (2001) Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179: 39–46.

- HSUEH AJW, ADASHI EY, JONES PBC, WELSH TH, JR (1984) Hormonal Regulation of the Differentiation of Cultured Ovarian Granulosa Cells. *Endocrine Reviews*, 5: 76-127.
- JEMMETT JE ve EVANS JM (1977) A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *Journal of Small Animal Practice*, 18: 31–37.
- JIMENEZ-KRASSEL F ve IRELAND JJ (2002) Development and Validation of a Short-Term, Serum-Free Culture System for Bovine Granulosa Cells: Evaluation of the Effects of Somatotropin and Growth Hormone-Releasing Factor on Estradiol Production. *Journal of Dairy Science*, 85: 68-78.
- JOHNSON LM ve GAY VL (1981) Luteinizing hormone in the cat. II. Mating-induced secretion. *Endocrinology*, 109: 247-252.
- JOHNSTON SD, ROOT KUSTRITZ MV, OLSON PNS (2001). The Feline Estrous Cycle. *Canine and Feline Theriogenology*, Chapter 25, p: 396-405.
- JOHNSON ML, REDMER DA, REYNOLDS LP, BĪLSKĪ JJ and GRAZUL-BĪLSKA AT (2002) Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Endocrine Reviews*, 18: 261-270.
- JUENGEL JL, MEBERG BM, TURZILLO AM, NETT TM, NISWENDER GD (1995) Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology*, 136: 5423-5429.
- KALKAN C ve HOROZ H (2001) Pubertas ve seksüel sikluslar. In: Alaçam E.(ed). *Evcil Hayvanlarda Dogum ve İnfertilite*. 3. Baskı, Medisan, Ankara, s: 23–40.
- KIRIAKIDOU M, MCALLISTER JM, SUGAWARA T, STRAUSS JF (1996) Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81: 4122-4128.
- KUTZLER MA (2007) Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*, 68: 354-374.

- LANGHOUT DJ, SPICER LJ, GEISERT RD (1991) Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *Journal of Animal Science*, 69: 3321-3334.
- LAWLER DF, JOHNSTON SD, HEGSTAD RL, KELTNER DG, OWENS SF (1993) Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. *Journal of Reproduction & Fertility Supplement*, 47: 57-61.
- LEIN D, CONCANNON PW, HODGSON BG (1982) Reproductive behaviour in the queen. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181: 275.
- LOFSTEDT RM (1982) The estrous cycle of the domestic cat. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 4:52-58.
- LUO W AND WILTBANK MC (2006) Distinct Regulation by Steroids of Messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in Bovine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, 75: 217–225
- LYDON JP, DEMAYO FJ, FUNK CR, MANI SK, HUGHES AR, MONTGOMERY CA JR, SHYAMALA G, CONNEELY OM, O'MALLEY BW (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*, 9: 2266-2278.
- MASUMURA S, FURUI H, HASHIMOTO M, WATANABE Y (1992) The effect of season and exercise on the levels of plasma polyunsaturated fatty acids and lipoprotein cholesterol in young rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1125: 292-296.
- MAY JV ve SCHOMBERG DW (1981) Granulosa Cell Differentiation in vitro: Effect of Insulin on Growth and Functional Integrity. *Biology of Reproduction*, 25: 421-431
- MCDONALD LE (1989) Veterinary Endocrinology and Reproduction. Fourth Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- MICHAEL RP (1961) Observations upon the sexual behaviour of domestic cat (*Felis catus* L.) under laboratory conditions. *Behaviour*, 8: 1-23.

- OJEDA SR (2000) Female Reproductive Function. In: Griffin JEaSRo (ed). *Textbook of Endocrine Physiology*, Fourth Edition. Oxford University Press, New York, p: 215-216
- ONCLIN K, LAUWERS F, VERSTEGEN JP (2001) FSH secretion patterns during pregnant and nonpregnant luteal periods and 24h secretion patterns in male and female dogs. *Journal of Reproduction & Fertility Supplement*, 57: 15-21.
- O'SHAUGHNESSY PJ ve WATHES DC (1985) Role of lipoproteins and de-novo cholesterol synthesis in progesterone production by cultured bovine luteal cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 74: 425-432.
- PESCADOR N, KORIAN SS, STOCCO DM, PRICE CA, MURPHY BD (1996) Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction*, 55: 485-491.
- PETERS H ve MCNATTY KP (1980) The ovary. Berkeley and Los Angeles, CA: University of California Press.
- POPE CE (2000) Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, 53: 163-174.
- RICHARDS JS (1980) Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews*, 60: 51-89.
- RICHARDS JS (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, 15: 725-751.
- RICHARDS JS ve HEDIN L (1988) Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annual Review of Physiology*, 50: 441-463.
- RICHARDS JS, FITZPATRICK SL, CLEMENS JW, MORRIS JK, ALLISTON T, SIROIS J (1995) Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Progress in Hormone Research*, 50: 223-254.

- RICHARDS JS, JAHNSEN T, HEDIN L, LIFKA J, RATOOSH SL, DURICA JM, GOLDRING NB (1987) Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Progress in Hormone Research*, 43: 231–270.
- ROOT M (1995) Early spay-neuter in the cat: Effect on development of obesity and metabolic rate. *Veterinary Clinical Nutrition*, 2: 132-134.
- ROOT MV, JOHNSTON SD, OLSON PNS (1995) Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 31: 429-433.
- RYAN KJ (1979) Granulosa-thecal cell interaction in ovarian steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry*, 11: 799-800.
- SANDHOFF TW ve MCLEAN MP (1996a) Prostaglandin F₂ α reduces steroidogenic acute regulatory (StAR) protein messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. *Endocrinology*, 5: 183-190.
- SANDHOFF TW ve MCLEAN MP (1996b) Hormonal regulation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in leydig cells. *Endocrinology*, 137: 4522-4525.
- SARAH BG ve TERESA KW (2006) Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*) *Theriogenology*, 66: 5–13.
- SCOTT PP (1955) The domestic cat as a laboratory animal for the study of reproduction. *The Journal of Physiology*, 130: 47–48.
- SCOTT PP (1970) Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. In Hafez ESE(ed): Philadelphia, PA: Lea and Febiger, p: 192–208.
- SENGER PL (2003) Pathways to pregnancy and parturition. 2nd ed., Current Conceptions in Pullman, WA.
- SHANMUGAM M, PANDITA S, PATLA P (2009) Effects of FSH and LH on Steroid Production by Buffalo (*Bubalus bubalis*) Granulosa Cells Cultured In Vitro Under Serum-Free Conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, doi: 10.1111/j.1439-0531

- SHILLE VM, LUNDSTRÖM KE, STABENFELDT GH (1979) Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 concentrations in plasma: Relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*, 21: 953-963.
- SHILLE VM ve SOJKA NJ (1995) Feline Reproduction. In Ettinger SJ, Feldman EC(eds): *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, WB Saunders Co, p: 1690.
- SHORT RV (1962) Steroids in the follicular fluid and the corpus luteum of the mare. A 'Two-Cell Type' theory of ovarian steroid synthesis. *Journal of Endocrinology*, 24: 59-63.
- SILVA JM ve PRICE CA (2000) Effect of Follicle-Stimulating Hormone on Steroid Secretion and Messenger Ribonucleic Acids Encoding Cytochromes P450 Aromatase and Cholesterol Side-Chain Cleavage in Bovine Granulosa Cells In Vitro. *Biology of Reproduction*, 62: 186-191.
- SPICER LJ, VOGEL JL, ALLEN DT (2004) Insulin-like growth factor-II stimulates steroidogenesis in cultured bovine thecal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 227: 1-7.
- STOCCO DM (1997) A StAR search: implications in controlling steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, 56: 328-36
- THOMPSON FN (2004) Duke's Physiology of Domestic Animals (Twelfth edition). In Reece WO(ed), Cornell University Press, p: 677-703.
- TOSCA L, FROMENT P, SOLNAIS P, FERRÉ P, FOUFELLE F, DUPONT J (2005) Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 146: 4500-4513.
- TOWNSON DH, WANG XJ, KEYES PL, KOSTYO JL, STOCCO DM (1996) Expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the corpus luteum of the rabbit: dependence upon the luteotrophic hormone, 17 β -estradiol. *Biology of Reproduction*, 55: 868-874.

- VALLÉE M, MAYO W, LE MOAL M (2001) Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging. *Brain Research Reviews*, 37: 301–312.
- VAN HAAFTEN B, BEVERS MM, VAN DEN BROM WE, OKKENS AC, VAN SLUIJS FJ, WILLEMSE AH, DIELEMAN SJ (1994) Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. *Journal of Reproduction & Fertility*, 101: 221-225.
- VERSTEGEN JP (2004) Manual of small animal reproduction and neonatology. In Gillian Simpson(ed), *British Small Animal Veterinary Association*, p: 11-17.
- WEBB R, CAMPBELL BK, GARVERICK HA, GONG JG, GUTIERREZ CG, ARMSTRONG DG (1999) Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 54: 33–48.
- WILDT DE, SEAGER SWJ, CHAKRABORTY PK (1980) Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the Cat. *Endocrinology*, 107: 1212-1217.
- WILDT DE, CHAN SY, SEAGER SW, CHAKRABORTY PK (1981) Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biology of Reproduction*, 25: 15–28.
- WILLIS D, MASON H, GILLING SMITH C, FRANKS S (1996) Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81: 302-309.
- YANG MY ve RAJAMAHENDRAN R (1998) Effects of gonadotropins and insulin-like growth factors-I and -II on in vitro steroid production by bovine granulosa cells. *Canadian Journal of Animal Science*, 78: 587–597.
- YOUNG B, HEATH JW (2000) Female Reproductive System. In: Wheather`s Functional Histology, Fourth ed. Churchill Livingstone, London, p: 341-371.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi: 20.01. 2010

Toplantı Sayısı: 10/03

Karar No: 10/03

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 20.01.2010 çarşamba günü saat 12:00'de Prof. Dr. Serdar GÜNAYDIN'ın başkanlığında toplanarak gündemdeki konuları görüştü.

03: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji A.D. öğretim üyesi Doç. Dr. Şevket ARIKAN sorumluluğunda yürütülecek "Kedi granüloza hücre kültüründe, FSH ve LH hormonlarının steroidojenik aktivite üzerine etkilerinin araştırılması" isimli proje incelenerek Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesinde belirtilmiş olan Etik ilkelere uygun olduğuna katılanların oybirliğiyle karar verildi.

Prof. Dr. Serdar GÜNAYDIN
Başkan

Doç. Dr. Siyami KARAHAN
Başkan Vekili

Doç. Dr. Saadet ATSÜ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Nahit PAMUKOĞLU
Üye

Mustafa AKIN
Üye

Doç. Dr. Z. Aytül ÇAKMAK
Üye

Doç. Dr. Hakan KALENDER
Üye

Doç. Dr. Aydın YAĞMURLU
Üye

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Özkan

Soyadı: ŞİMŞEK

Doğum yeri ve tarihi: İzmir-1983

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

Adres: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Yahşıhan,

71451, KIRIKKALE.

Telefon: 0318 357 33 01 / 3169

E-posta: ozksimsek@hotmail.com

II- Eğitimi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2007

İzmir Beştepe Lisesi 2000

İzmir Vali Nevzat Ayaz İlköğretim Okulu 1997

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

Veteriner Hekim 2007

Araştırma Görevlisi 2008

III- Mesleki Deneyimi

2008 - Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma görevliliği

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Aldığı Burslar: Yüksek Öğretim Kurulu 2010
Doktora Araştırma Bursu (3 ay süre ile)
Faculty of Veterinary Medicine,
University of Glasgow, SCOTLAND

Ödüller: TÜBİTAK yayın teşvik ödülü

Projeleri:

1. ARIKAN S, KALENDER H, SIMSEK O. “Ankara keçilerinde erken ve geç luteal dönemde kolesterol, LH, ve cAMP nin küçük ve büyük luteal hücre steroidogenezisi üzerine etkisinin araştırılması” TOVAG Proje no: 108O520
2. ARIKAN S, SIMSEK O. “ Kedi granüloza hücre kültüründe, FSH ve LH hormonlarının steroidojenik aktivite üzerine etkilerinin araştırılması” BAP Proje no: 2010/03

Verdiği konferans ve seminerler:

- 1- Yetişkin kök hücreler, Ocak 2009

Katıldığı Kongre ve Sempozyumlar:

- 1- Deney Hayvanlarında Yeni Teknolojiler Sempozyumu, 06 Kasım 2008, GATA ARGE Merkez Başkanlığı, ANKARA
- 2- IV. Kök Hücre Sempozyumu, 26-27 Haziran 2009, Türkiye Bilimler Akademisi, ANKARA
- 3- Advances in Stem Cell Research: Development, Regeneration and Disease, 6-8 Nisan 2011, Institut Pasteur, PARİS

V- Yayınları

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

-

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. ARIKAN S, GUZEL M, OZTURK AS, SIMSEK O (2010) Frequencies of Blood Type A, B and AB in cats from the Mediterranean Sea Coast of the Turkey. *Revue Méd. Vét* 161: 322-325.
2. ARIKAN S, KALENDER H, SIMSEK O (2010) Effects of Cholesterol on Progesterone Production by Goat Luteal Cell Subpopulations at Two Different Stages of the Luteal Phase. *Reprod Dom Anim* 45: e434-e439.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. ARIKAN S, KALENDER H, SIMSEK O. “Farklı iki luteal dönemde elde edilen keçi luteal hücre alt gruplarında, kolesterolün progesteron sentezine etkisi” Uluslararası katılımlı IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2010, Belek, ANTALYA.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

-

VI- Diğer Bilgiler

Deney hayvanı kullanım sertifikası: 3-11 Kasım 2008, GATA ARGE Merkez Başkanlığı, ANKARA