

TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNCİ KEFALİ (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) BEYNİNDE
NÖROSEKRESYON HÜCRELERİNİN DAĞILIMI VE GONADO-
RELEASİNG HORMON (GnRH) SALGILAYAN HÜCRELERİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İŞARETLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN : Ayşe AKÇOCUK
DANIŞMAN : Doç. Dr. Güler ÜNAL

VAN – 2006

TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNCİ KEFALİ (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) BEYNİNDE
NÖROSEKRESYON HÜCRELERİNİN DAĞILIMI VE GONADO-
RELEASİNG HORMON (GnRH) SALGILAYAN HÜCRELERİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İŞARETLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN : Ayşe AKÇOCUK

VAN - 2006

KABUL VE ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Güler ÜNAL danışmanlığında, Ayşe AKÇOCUK tarafından hazırlanan “İnci Kefalinde (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) Nörosekresyon Hücrelerinin Dağılımı ve Gonado-Releasing Hormon (GnRH) Salgılayan Hücrelerin İmmunohistokimyasal Olarak İşaretlenmesi” isimli bu çalışma 08/ 09/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:.....İmza:

Üye:.....İmza:

Üye:.....İmza:

Üye:.....İmza:

Üye:.....İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../..... Gün ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Yrd. Doç. Dr. Aşkın KOR
Enstitü Müdürü

ÖZET

İNCİ KEFALİNDE (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) NÖROSEKRESYON HÜCRELERİNİN DAĞILIMI VE GONADO-RELEASİNG HORMON (GnRH) SALGILAYAN HÜCRELERİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İŞARETLENMESİ

AKÇOCUK, Ayşe

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Güler ÜNAL

Ağustos 2006, 28 sayfa

Bu çalışmada, inci kefali beyindeki, nörosekresyon hücreleri (NSH)'nin dağılımı ve gonado-releasing hormon (GnRH) salgılayan hücrelerin immunohistokimyasal lokalizasyonu belirlendi.

Beyinden alınan kesitler hematoksilin-eosin ve aldehit-fuksin ile boyandı. Beyindeki NSH' nin anatomik lokalizasyonu gösterildi. Bu hücreler beyin bütün bölgelerinde gözlemlendi. Ancak, sayı, dağılım ve büyüklük bakımından farklı olduğu tespit edildi. Olfaktoriyal loplardaki NSH'nin homojen bir dağılım gösterdiği, telensefalon ile mezensefalon arasında ise grup halinde olduğu belirlendi. Diyensefalondaki NSH'nin hipotalamusta, nukleuslarda lokalize oldukları gözlemlendi. Optik tektumdaki NSH'nin az sayıda ve bazılarının bipolar yapıda olduğu, valvula serebelli'de ise çok sayıda ve homojen dağılım gösterdikleri tespit edildi. Metensefalondaki NSH'nin özellikle korpus serebellum'un çevresinde lokalize olduğu belirlendi. NSH'nin miyelensefalonda omuriliğin çevresinde iki grup şeklinde buldukları gözlemlendi.

Frozen kesitlerde, memeli GnRH (mGnRH) sentezleyen hücrelerin dağılımı immunohistokimyasal olarak belirlendi. mGnRH salgılayan hücreler olfaktoriyal çıkıntılarda homojen dağılım gösterirken telensefalonda ise area ventralis telencephalis pars dorsalis (Vd)'de yoğun olarak buldukları gözlemlendi. Diyensefalonda mGnRH salgılayan hücrelerin ventrikül uzantılarının çevresinde çok sayıda oldukları görüldü. Bu hücrelerin telensefalondaki gibi küçük boyutlu olup kuvvetli immunreaksiyon gösterdikleri tespit edildi. Mezensefalonda, optik tektumda birkaç tane, mGnRH antikoru ile koyu boyanan hücre belirlendi. mGnRH salgılayan hücrelerin metensefalonda, korpus serebellum etrafını çevreledikleri tespit edildi. Miyelensefalonda gri maddenin ventral köklerinde iki grup şeklinde mGnRH salgılayan hücreler belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Chalcalburnus tarichi*, İnci kefali, Hipotalamus, Gonado-Releasing Hormon (GnRH), Nörosekresyon Hücreleri.

ABSTRACT

THE DISTRIBUTION OF NEUROSECRETORY CELLS AND IMMUNOHISTOCHEMICAL LABELLING OF GONADO-RELEASING HORMONE SECRETING CELLS in *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811

AKÇOCUK, Ayşe
Msc Thesis, Biology Science
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Güler Ünal
August 2006, 28 pages

In this present study, the distribution of neurosecretory cells and the immunolocalization of gonadotropin-releasing hormones (GnRH) producing cells were investigated in the brain of the *Chalcalburnus tarichi*.

The sections which taken from brain, were stained with aldehyde-fucsine and hematoxilen-eosin. The anatomical localization of neurosecretory cells in the brain was indicated. These cells were present at all of regions of brain but it was different the number, distribution and large while the neurosecretory cells in olfactorial bulb were observed a homojen distribution, between telencephalon and mesencephalon in a nucleus. While the neurosecretory cells in optic tectum were a few number and some of them bipolar, in valvula cerebelli were abound and a homojen distribution. In metencephalon specially around of the korpus cerebellum were detected. In myelencephalon, the neurosecretory cells were indicated to be localized within two nuclei.

In the frozen sections, the immunolocalization of the mamalian gonado-releasing hormone (mGnRH) cells were detected. The mGnRH cells localized in both olfactrial bulb and telencephalone but more abundant in area ventralis telensefali pars dorsalis. mGnRH cells were numerous in the ventricle surrounding diencephalone. A few mGnRH cells were detected in the optic tectum. In the metencephalone, mGnRH cells localized around the corpus cerebelli. Two mGnRH cell groups localized in the ventral roots of gray matter were observed in the myelencephalone.

Key Words: *Chalcalburnus tarichi*, Hypothalamus, Neurosecretory cells, Gonado-releasing hormone.

ÖN SÖZ

Nörosekresyon hücreleri beynin bütün bölgelerinde bulunmakla birlikte daha çok hipotalamusta yoğunlaşmıştır. Bir arada bulunan nörosekresyon hücre gruplarına nukleus denir ve bunlar bulunduğu bölgeye göre adlandırılır. Örneğin, preoptik alandaki nörosekresyon hücrelerine preoptik nukleus denir. Bu hücreler salgılatıcı ve engelleyici olarak adlandırılan nörohormonları sentezler. Bunlar da vücudun diğer bölgelerinde sentezlenen hormonların fiziksel, sinirsel ve hormonal uyarım yolunda başlangıç noktasını teşkil ederler. Bunun için bu hücreler, canlının yaşamsal aktivitesinin düzenlenmesinde oldukça önemlidir.

Gonad hormonlarının sentezlenme yolundaki ilk hormonal uyarıcı gonado releasing hormon (GnRH) olarak adlandırılır. Bu, tüm omurgalılarda üremenin kontrolünde kilit rol oynayan bir polipeptit hormondur. Buna göre GnRH hipofiz bezinden folikül uyarıcı ve lüteinleştirici hormon sentezlenmesini uyarır. Bunlar da ovaryum ve testislerde üreme hücrelerinin gelişmesini sağlayan eşey hormonlarının sentezlenmesini uyarır. Bu sentez yolu türün devamlılığı için oldukça önemlidir.

İnci kefalinde ne nörosekresyon hücreleri ne de GnRH salgılayan hücrelerle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, Van Gölü ve göle dökülen akarsular için endemik bir sazan türü olan inci kefalinin üreme fizyolojisinin belirlenmesine önemli bir katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmayı yapmamı öneren ve çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Güler ÜNAL'a, immunohistokimyasal çalışmalarda özveriyle yardımcı olan Tıp Fakültesi Neuro Science öğretim üyelerinden Doç. Dr. Gürkan ÖZTÜRK, Doç. Dr. Ender ERDOĞAN, Dr. Serap BEKTAŞ ve Uzm. Elif KAVAL OĞUZ'a araştırmam sırasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. R. Ahmet OĞUZ, Burak KAPTANER, Emre EREZ, Ertuğrul KANKAYA ve Zehra KAYA'ya, iş arkadaşlarımdan Bayram ÇAKIR, Mehmet GÖKÇE, Dr. Cengiz MORDENİZ'e ayrıca çalışmam esnasında manevi açıdan her zaman yanımda hissettiğim aileme teşekkür ederim.

Ayşe AKÇOCUK

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	2
3. MATERYAL VE YÖNTEM	7
3.1. Materyal	7
3.2. Yöntem	7
3.2.1. Histolojik metodlar	7
3.2.2. İmmunohistokimyasal metod	7
4. BULGULAR	9
4.1. Beynin Genel Yapısı	9
4.2. Nörosekresyon Hücrelerinin ve GnRH Salgılayan Hücrelerin Dağılımı	9
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	23
KAYNAKLAR	25
ÖZ GEÇMİŞ	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. Beynin Genel Yapısı.	11
a. İnci kefalı beyinin dorsolateral görünüşü.	11
b. İnci kefalı beyinin dorsalden görünüşü.	11
c. İnci kefalı beyinin ventralden görünüşü.	11
Şekil 4.2. İnci kefalinde beyinden alınan kesitte telensefalon bölgesi.	12
a. Telensefalondaki nörosekresyon hücreleri.	12
b. Telensefalik yarımkürede mGnRH hücreleri.	12
Şekil 4.3. İnci kefalı beyinden alınan kesitte diyensefalon bölgesi.	13
a. Diyensefalon bölgesinin talamus kısmındaki nörosekresyon hücreleri.	13
b. Talamus kısmında III. ventrikül uzantılarının etrafındaki nörosekresyon hücreleri.	13
c. Diyensefalonun III.ventrikül etrafındaki nörosekresyon hücreleri.	14
d. Diyensefalonun III.ventrikül etrafındaki mGnRH hücreleri.	15
e. Hipotalamus kısmında yer alan mGnRH hücreleri.	15
Şekil 4.4. İnci kefalı beyinden alınan kesitte mezensefalon bölgesi.	16
a. Optik tektumda bulunan nörosekresyon hücreleri.	16
b. a'daki bölgede bulunan tek bir hücre.	16
c. Optik tektumda lokalize olan mGnRH hücreleri.	16
d. Mezensefalon bölgesindeki nörosekresyon hücreleri.	17
e. Mezensefalon bölgesinde mGnRH hücreleri.	17
f. Mezensefalon ile metensefalon arasında bulunan nörosekresyon hücreleri.	17
g. Mezensefalon bölgesinde IV. ventrikülün ventralindeki birinci nukleus.	18
h. Mezensefalonda IV. ventrikülün ventralindeki ikinci nukleus.	18
Şekil 4.5. İnci kefalı beyinin metensefalon bölgesi.	19
a. Korpus serebellumu çevreleyen nörosekresyon hücreleri.	19
b. Korpus serebellumdaki mGnRH hücreleri.	19
c. b'nin büyük büyütmedeki görüntüsü.	19
Şekil 4.6. İnci kefalı beyinden alınan kesitte miyelensefalon bölgesi.	20
a. Miyelensefalonda orta kısımda bulunan nörosekresyon hücreleri.	20
b. Miyelensefalonun rostralinde grup şeklindeki mGnRH hücreleri.	20
c. Miyelensefalonun orta kısmında bulunan mGnRH hücreleri.	21
d. Miyelensefalonda mGnRH hücrelerin oluşturduğu bir grup.	21
e. d'nin büyütülmüş görüntüsü.	22
f. Omurilikte mGnRH hücreleri.	22

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	Mikron
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
dk	Dakika
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
°C	Santigrad derece

Kısaltmalar

AF	Aldehit Fuksin
cGnRH	Chicken Gonado Releasing Hormon
DAB	Diaminobenzidine
DIC	Differansiyel İnterferans Contrast
FLI	Fos- Like İmmunoreaktivite
GH	Growht Hormon
GHF-1	Growth Hormon Faktör
GnRH	Gonado Releasing Hormon
GnRH-ir	Gonado Releasing Hormon-immunoreaktif
GtH	Gonadotrofik Hormon
HE	Hematoksilen Eosin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IHK	İmmunositokimyasal
KT	Ketotestosteron
lGnRH	Lamprey Gonado Releasing Hormon
mGnRH	Mamalian (memeli) Gonado Releasing Hormon
mRNA	Messenger Ribonükleikasit
NPY	Nöropeptit-Y
NPY-ir	Nöropeptit-Y immunoreaktif
NSH	Nörosekresyon Hücresi
PAP	Peroxidase anti peroxidase
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Pars Intermedia
pjGnRH	Pejerrey Gonado Releasing Hormon
PL	Prolaktin
PPD	Proksimal Pars Distalis
RIA	Radio İmmuno Assay
RPD	Rostral Pars Distalis
sbGnRH	Seabream Gonado Releasing Hormon

sGnRH
SL
T
TBS
TNG

Salmon Gonado Releasing Hormon
Somatolaktin
Testosteron
Tris Buffered Saline
Terminal Nerve Ganglion

1. GİRİŞ

İnci kefalı, Van Gölü'nde ve göle dökülen akarsularda yaşayan endemik bir sazan türüdür. Bir türün devamlılığının sağlanmasında o türün üreme fizyolojisinin iyi bilinmesi gerekir. İnci kefalinde gonad gelişmesi (Ünal ve ark., 1999) ve bir yıllık üreme periyodunda ovaryum foliküllerinin ince yapısı ve bazı steroid hormonların seviyesi belirlenmiştir (Ünal ve Elp., 2000). Bunun yanında, hipofizde gonadotropik hormon salgılayan hücreler immunohistokimyasal olarak işaretlenmiştir (Ünal ve ark., Yayınlanmamış). İnci kefalinde merkezi sinir sisteminin histolojisi çalışılmış (Koyuncu, 2000) fakat beyindeki nörosekresyon hücreleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Beynin bütün bölgelerinde bulunan nörosekresyon hücreleri, esas olarak hipotalamusta yoğunlaşmıştır. Hipotalamus, fiziksel uyarıların sinirsel uyarı şeklinde alındığı önemli bir merkezdir ve endokrin yolda başlangıç noktasını oluşturur (Takashima ve Hibiya, 1995). Örneğin, buradan sentezlenen gonado-releasing hormonu (GnRH) hipofiz tarafından sentezlenen gonadotropik hormonları düzenler. Bu hormonlar da gonadlarda sentezlenen cinsiyet hormonlarının sentezlenmesini kontrol ederek üreme hücrelerinin gelişmesini ve üreme davranışlarını düzenler (Okuzawa ve ark., 2003).

GnRH'lar genel olarak ilk tanımlandıkları canlının ismine göre adlandırılır ve bunlardan bir tanesi türe özgüdür. İlk izole edilip tanımlanan GnRH formu memeli GnRH'dır (Somoza ve ark., 2002b). Yapılan çalışmalarla omurgalı merkezi sinir sisteminde yapısal olarak farklı 16 GnRH'ın varlığı belirlenmiş ve bunlardan en az ikisinin bütün omurgalılarda bulunduğu bildirilmiştir (Somoza ve ark., 2002b). Çeşitli balıklarda yapılan çalışmalar ile beynin farklı bölgelerinde üç farklı GnRH varyantının varlığı belirtilmiştir (Somoza ve ark., 2002a, Stefano ve ark., 2000, Parhar ve ark., 1998). Bunlardan chicken GnRH-II (cGnRH-II) orta beyinde (Parhar ve ark., 1998, Amano ve ark., 2002, Okuzawa ve ark., 2003), türe özgü olan GnRH esas olarak preoptik alanda ve hipotalamusta (Mousa ve Mousa, 2003, Amano ve ark., 2002, Robinson ve ark., 2000, Parhar ve ark., 1998 Stefano ve ark., 2000) ve salmon GnRH (sGnRH) ise terminal sinir ganglionunda (TNG) ve olfaktoriyal çıkıntıda (Stefano ve ark., 2000, Parhar ve ark., 1998, Rodríguez ve ark., 1999) bulunur.

Lates niloticus (Mousa ve Mousa, 2003), white sucker (*Catostomus commersoni*) (Robinson ve ark., 2000), *Odontesthes bonariensis* (Stefano ve ark., 2000), mersin balığı (Egorova ve ark., 2001), *Synbranchus marmoratus*, *Xiphophorus maculatus*, *X. Helleri*, *Odontesthes hatchery* (Somoza ve ark., 2002), *Verasper moseri* (Amano ve ark., 2002), socheye salmon, chum salmon (Kitani ve ark., 2003), *Anguilla anguilla* L. (Montero ve ark., 1994), *Solea senegalensis* (Rodríguez-Gómez ve ark., 1999)'de GnRH içeren hücre ve fibrillerin hipotalamusun dışında, beynin olfaktoriyal loplari, telensefalik yarım küreler, diyensefalon ve mezensefalon bölgelerinde ayrıca medulla oblongatada (Amano ve ark., 2002, Kitani ve ark., 2003) bulunduğu immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir.

Bu çalışmada, inci kefalı beyindeki nörosekresyon hücrelerinin dağılımı ve GnRH salgılayan hücrelerin yeri belirlendi.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Bir günlük Sturgeon *Acipenser naccarii*'de, beyin telensefalon, diyensefalon, mezensefalon, serebellum ve rhombensefalon bölgeleri kolayca ayırt edilmiştir (Vázquez ve ark., 2002).

Traverso ve ark. (2003), *Odontesthes bonariensis*'in hipofiz ve beyinde nöropeptit-Y (NPY) immunreaktif hücrelerin ve fibrillerin dağılımını immunohistokimyasal metodlarla belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlar, immunreaksiyon gösteren NPY hücre gövde ve fibrillerinin ön beyin ve orta beyinde geniş bir dağılım gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, çok sayıda NPY fibrili ventral olarak hipotalamusa uzanan epitalamik seviyede ve hipofiz sapında bulunmuş, adenohipofize ulaşan NPY fibrilleri ile büyüme hormonu ve gonadotropik hormon sentezleyen hücreler arasında sıkı bir ilişki olduğu gösterilmiştir.

Süren (1999), *Rana ridibunda*'da yaptığı çalışmada, aldehit fuksin ile boyanmış preoptik nukleusta bulunan hücrelerin farklı boyutlarda olduğunu, farklı sıcaklıklarda tutulan deney ve kontrol gruplarındaki bu hücrelerin nukleus şekillerinin değişmezken sıcaklık ile büyüklüklerinin değiştiğini belirtmiştir. Ayrıca, kontrol ve deney gruplarındaki bütün nörosekresyon hücrelerinin çeşitli büyüklükte vakuoller içerdiklerini, genellikle sıcaklıktaki artışla birlikte vakuollerin sayısının arttığını bildirmiştir.

Meddle ve ark. (1999), dişi bıldırcın beyinde yaptıkları bir araştırmada, GnRH-I salgılayan hücre gövdelerinin preoptik bölgede genellikle periventriküler alanda lokalize olduğunu, çok az Fos-Like İmmunreaktif (FLI) hücresinin, preoptik alanda bulunduğunu ve birkaç hücrenin de III. ventriküle doğru bulunduğunu bildirmişlerdir.

Somoza ve ark. (2002b)'nin yaptıkları derlemede, GnRH varyantları balık beyininden memeli beyine kadar araştırılmıştır. Buna göre ilkel ve gelişmiş omurgalıların sinir dokusundan yaklaşık 16 GnRH izole edilip tanımlanmıştır. İncelenen tüm omurgalı türlerinde, merkezi sinir sisteminde en az iki GnRH formunun bir arada olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte, kemikli balıklarda orta beyinde cGnRH-II, preoptik alanda ve hipotalamusta türe özgü GnRH, terminal sinir ganglionunda ise sGnRH olmak üzere kemikli balıklarda GnRH'un üç formunun bulunduğunu bildirmişlerdir.

Egorova ve ark. (2001) tarafından mersin balığında yapılan çalışmada, GnRH salgılayan hücrelerin beyin çeşitli bölgelerinde bulunduğu, bunların bipolar ve oval şekilli oldukları, nukleuslarının eksentrik olarak yerleştiği ve sitoplazmada görülen nörosekresyon granüllerinin genel olarak hücre periferinde yoğunlaştığı bildirilmiştir. Bu hücrelerin (her bölümde 5-7 arası) hipotalamik infundibular bölgede çok sayıda ve ortalama 9.2 µm çapında olduğu; tuberal nukleusların supendimal bölgelerinde az sayıda (her bölümde 3-5 hücre) ve yaklaşık 10.3 µm çapında oldukları tespit edilmiştir. NSH'nin aynı büyüklükte olup endimal hücreler arasında yerleştikleri ve dentritlerini III. ventrikül boşluğuna uzattıkları gösterilmiştir.

Mousa ve Mousa (2003), *Lates niloticus*'un beyindeki Gonado- Releasing Hormon (GnRH) hücrelerinin dağılımını ve bu hormonların hipofizdeki farklı hücre

tipleri ile ilişkisini immunohistokimyasal olarak araştırmışlar ve chicken Gonado-Releasing Hormon-II (cGnRH-II) ve memeli Gonado-Releasing Hormon (mGnRH) hücrelerinin GnRH immunreaksiyon sistemin temel bileşenleri olduğunu belirtmişler. Araştırmacılar, mGnRH salgılayan hücre gövdelerinin preoptik bölgede ve hipotalamusun lateralis tuberculi nüksusunda bulunduğunu, cGnRH-II salgılayan hücre gövdelerinin ise optik sinirden sonra bulunmadığını bildirmişlerdir. Hipofiz, az sayıda cGnRH-II salgılayan hücre fibrilli içerirken çok sayıda mGnRH salgılayan hücre fibrilli içerdiği gösterilmiştir. Sonuç olarak, GnRH salgılayan hücre fibrilleri adenohipofizdeki farklı hücre tipleri ile ilişkili olduğundan, GnRH'nin çeşitli hipofiz hormonlarının düzenlenmesinde rolü olduğunu belirtmişlerdir.

Robinson ve ark. (1999), Cypriniformes familyasına ait karakteristik bir tür olan *Catostomus commersoni*'nin beyindeki GnRH formlarını, High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), Radio İmmuno Assay (RIA) ve immunositokimya metodları kullanarak araştırmışlar, salmon Gonado-Releasing Hormon (sGnRH), lamprey Gonado-Releasing Hormon I-II (lGnRH I –II) ve cGnRH-II dahil birkaç immunreaksiyon gösteren GnRH formu tanımlayarak GnRH formlarının, teleost beyin ve hipofizinde çok sayıda fonksiyona sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Stefano ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada, pejerrey beyninin sGnRH, cGnRH-II ve pejerrey Gonado-Releasing Hormon (pjGnRH) olmak üzere GnRH'nin 3 formunu içerdiği gösterilmiştir. Araştırmacılar, olgun *O. bonariensis*'in beyindeki GnRH hücrelerinin dağılımını araştırmışlar, GnRH salgılayan hücre gövdelerinin ve fibrillerinin çoğunlukla olfaktoriyal çıkıntılar ile telensefalonda birleşme yerindeki terminal sinir ganglionu (TNG)'nda, preoptik alanda ve dorsal tegmentumda bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, GnRH salgılayan hücre ve fibrillerin büyüklük, yoğunluk ve şekil bakımından farklı olduklarını bildirmişlerdir.

Parhar ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada, *Oreochromis niloticus* (tilapia)'un olgun erkek bireylerinde, üç farklı GnRH kodlayan Messenger Ribonükleik asit (mRNA)'nın üzerine kastrasyon (reme organlarının kesilip çıkarılması) ve progesteron uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Kastrasyonun önemli bir şekilde sGnRH mRNA seviyesini yükselttiğini fakat seabream Gonado-Releasing Hormon (sbGnRH) veya cGnRH -II mRNA seviyelerini yükseltmediğini; progesteron uygulamasının ise salmon, deniz levreği ve cGnRH -II mRNA seviyelerini etkilemediğini belirlemişlerdir. Buna göre, sGnRH'ı sentezleyen hücrelerin gonadal negatif feedback kontrolü altında olduğunu ve progesteronun erkek tilapia'da salmon, deniz levreği ve tavuk GnRH'ını kodlayan mRNA'ları düzenleyen esas hormon olamayacağını bildirmişlerdir.

Deniz levreği hipofizinde, sbGnRH ve cGnRH-II ve sGnRH'larının seviyeleri, ilk üreme periyodu ve seks farklılaşması süresince araştırılmıştır (Rodrıquez ve ark., 2000). Plazma gonadotropin-2 (GTH-2), testosteron (T) ve 11-ketotestosteron (11-KT) seviyeleri aynı periyotlar boyunca incelenmiştir. Hipofizde GnRH formlarının hepsi belirlenmiştir. sbGnRH seviyesinin cGnRH-II seviyesinden dokuz kat ve sGnRH seviyesinden on yedi kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, 3 GnRH formunun gonadal farklılaşmada muhtemel bir rolünü olduğu, sbGnRH'nin erkek deniz levreğinde ilk üreme döneminin düzenlenmesinde fonksiyonel olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, GTH-2 ve 11- KT

seviyelerinin spermiyasyon periyodu boyunca yüksek olmasından dolayı bu hormonların gonadal olgunlaşmada önemli rol oynayabileceklerini bildirmişlerdir.

Somoza ve ark. (2002a), çeşitli balık türlerinin beyin ekstraktlarında GnRH'ların varlığını HPLC ile araştırmışlardır. cGnRH II, pjGnRH ve sGnRH'ı bütün türlerde tespit etmişler, bu üç formun gen ifadesinin ortak olduğunu ortaya koymuşlardır.

GnRH, teleostlarda growth hormon (GH) ve somatolaktin (SL)'in muhtemel sentezleyicisidir. Socheye salmonu (*O. nerka*)'nda GnRH'nin GH, Prolaktin (PL) ve SL'i kodlayan hipofiz mRNA seviyelerine etkileri üreme döneminden önce incelendi. Buna göre, üreme öncesinde GnRH'nin SL gen ekspresyonunu uyarabildiği bildirilmiştir (Taniyama ve ark., 2000).

Hansen (1999), Australian lungfish'de yaptığı çalışmada, preoptik nukleusun preoptik bölgenin duvarında yerleştiğini göstermiştir. Preoptik nukleustaki hücrelerin, dorsal pars magnosellularis ve ventral pars parvosellularis olmak üzere farklı iki bölgede yerleştiği ve bu hücrelerin boyanmalarında da önemli farklılık gösterdikleri bulunmuştur.

Pinelli ve ark. (1997), immunreaksiyon gösteren mGnRH ve cGnRH-II hücre ve fibrillerinin dağılımını ayrıntılı olarak incelemişler ve önbeyinde mGnRH salgılayan hücrelerin çok sayıda, cGnRH-II salgılayan hücrelerin az sayıda olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, mGnRH salgılayan hücre fibrillerinin daha çok terminal sinirin intrakranial parçasından olfaktoriyal lopların mediobazal yüzeyine doğru, cGnRH-II salgılayan hücre fibrillerinin ise arka beyine doğru uzandıkları belirlenmiştir.

Amano ve ark. (2002) tarafından, ışın yüzgeçli flounder verasper moseri'nin beyinde GnRH'nin olası fonksiyonu ve GnRH'nin üç formunun beyinin çeşitli bölgelerindeki dağılımı ve seviyeleri incelenmiştir. Buna göre GnRH salgılayan hücre gövde ve fibrillerinin hipofiz ve beyinde lokalize olduğu, bunlardan sbGnRH formunun hipofizde daha yoğun ve seviyesinin de sGnRH ve cGnRH-II'den daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Montaner ve ark. (2001), *Micropogonias furnieri* and *Pagrus pagrus* olmak üzere iki perciform balığın beyin ekstraktlarında GnRH moleküler varyantlarını incelemişler, her iki türde sbGnRH, cGnRH-II ve sGnRH'ların varlığını göstermişlerdir.

Seabream'deki sGnRH, cGnRH-II ve sbGnRH kodlayan genlerin ekspresyonunun sezonal değişikliklerini, çevresel ve endokrin faktörlerle GnRH gen ekspresyonunun düzenleyici mekanizmalarını daha iyi anlamak için yapılan çalışmada, sbGnRH mRNA seviyesinin ovaryum histolojisi ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Okuzawa ve ark., 2003).

cGnRH-II ve sGnRH olmak üzere, iki GnRH formunun socheye salmonu ve chum salmonu'nun hipofiz bezinde ve beyinin farklı bölgelerindeki seviyesi smoltifikasyon ve üreme için göç dönemi boyunca spesifik zaman bağımlı fluoroimmunoassay sistem kullanılarak ölçülmüştür. Üreme göçü ve smoltifikasyon boyunca beyinin farklı bölgelerindeki sGnRH seviyesinin, hipofiz GtH veya serum tiroid hormonunun seviyeleri ile uyumlu iken cGnRH-II seviyesinin uyumsuz olduğu belirtilmiştir. Farklı beyin bölgelerinde bulunan sGnRH ve cGnRH-II'nin,

salmonidlerde yumurta göçü ve smoltifikasyonu boyunca farklı rollerinin olabileceği bildirilmiştir (Kitani ve ark., 2003).

Anguilla anguilla'da mGnRH ve cGnRH-II olmak üzere GnRH'nin iki formunun hipofiz ve beyindeki dağılımını belirlemek için, Montero ve ark. (1994) tarafından spesifik antikolar kullanılarak immunohistokimyasal bir çalışma yapılmıştır. Buna göre, mGnRH ve cGnRH-II'nin farklı hücrelerde lokalize olduğu mGnRH salgılayan hücre gövdelerinin, olfaktoriyal çıkıntılarda, olfaktoriyal çıkıntılarla telensefalonda arasındaki bağlantıda (nucleus alfakoretinalis), telensefalonda, preoptik bölge ve mediabazal hipotalamusta, mGnRH salgılayan hücre fibrillerinin ise hipofiz, olfaktoriyal çıkıntılar, ventral telensefalonda, hipotalamus, optik tektum ve mezensefalonda bulunduğu tespit edilmiştir. cGnRH-II salgılayan hücre gövdelerinin orta beyin tegmentumunda, fibrillerin ise beyin farklı bölgelerinde dağıldığı bulunmuştur. Hipofizin yoğun olarak mGnRH salgılayan hücre fibrilli ve az sayıda cGnRH salgılayan hücre fibrilleri içerdiği bildirilmiştir.

Senegal dilbalığında, GnRH yapılarının beyindeki dağılımı, immunohistokimyasal olarak Rodríguez-Gómez ve ark. (1999) tarafından incelenmiştir. Bu çalışmada, sGnRH ve cGnRH-II formlarının hücre gövdelerinin olfaktoriyal çıkıntılar ve telensefalonda (terminal sinir ganglion hücreleri) arasındaki bağlantıda, ventral telensefalonda, preoptik parvoselluler nukleusta ve medial longitudinal fasciculusun sinensefalik nukleusunda, fibrillerin ise yaygın olarak, telensefalonda, preoptik alanda, hipotalamusta, hipofizde, optik tektumda, orta beyinde ve rhombensefalonda buldukları bildirilmiştir.

Ünal ve Elp (2000), inci kefalinde ovaryumun ince yapısını ve bazı steroid hormonların bir yıllık üreme siklusunda ovaryumdaki değişimini araştırmışlardır. Ovaryumda 11-dehydrokortikosteroidin, vitellogenez boyunca çok az bir değişiklik gösterdiğini ovulasyondan sonra düştüğünü ve bu seviyesini koruduğunu; 17 β -östradiolün vitellogenez safhası boyunca artarak, safhanın 6. ayında en yüksek seviyede fakat ovulasyondan 15 gün sonra en düşük seviyede olduğunu; 17 α -hidroksi progesteronun, 17 β -östradiol gibi vitellogenez boyunca arttığını fakat safhanın sonunda ani olarak düştüğünü, ovulasyondan 10 gün sonra ise en yüksek seviyeye ulaştığını; progesteron seviyesinin 11-dehydrokortikosteroid gibi az değişiklik gösterdiğini fakat ovulasyondan sonra en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak, vitellogenez sırasında spesifik teka hücrelerin, ovulasyondan sonra ise granuloza hücrelerin steroid sentezlediğini; 11-dehydrokortikosteroidin olgunlaşmayı, 17 β -östradiol ve 17 α hidroksi progesteronun vitellogenin sentezini uyardığını, progesteron ve 17 α hidroksi progesteronun ise ovulasyondan 10 gün sonra pik oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Ünal ve ark. (1999), inci kefalinde gonad gelişimini yaşa ve cinsiyete bağlı olarak incelemişlerdir. Buna göre, oogeneze boyunca, kromatin nukleolus faz, perinükleolar faz, kortikal alveolar faz, vitellogenik faz, olgunlaşma fazı ve ovulasyon fazı olmak üzere altı gelişim safhası belirlemişlerdir. Ovulasyonun Mayıs-Haziran aylarında gerçekleştiğini, balığın ilk defa 36-37 aylık olduğunda yumurta bıraktığını ve ovulasyondan sonra genç oositlerin kortikal alveolar faza girerek yeni bir siklusu başlattığını bildirmişlerdir.

İnci kefalinde hipofiz bezinin histolojisi ve gonadotropik hücrelerin immunohistokimyasal lokalizasyonu incelenmiştir. Standart boyama teknikleri ile

adenohipofizin rostral pars distalis (RPD), proksimal pars distalis (PPD), pars intermedia (PI)'dan oluştuğu ve burada yedi hücre tipinin bulunduğu tespit edilmiştir. RPD ve PI 'de PAS pozitif hücrelerin anti-human FSH ve human LH ile kros reaksiyon verdiği ve az sayıda GTH hücrenin RPD'de lokalize olduğu gözlenmiştir. GTH hücrelerinin nörohipofizyal doku dalları arasında bulunduğu bildirilmiştir. PPD'deki hücrelerin çoğunun bazofilik olduğu ve bunların poligonal ve ovoid şekilli olmak üzere iki tipinin olduğu tespit edilmiştir. Poligonik tip hücrelerin PPD'nin ventral ve dorsal bölgelerinde dağınık olarak, PI ve RPD bölgelerinde ise çevresel olarak yerleştiği belirlenmiştir. Bu hücrelerin anti-hFSH ve hLH ile güçlü bir reaksiyon gösterdiği bildirilmiştir. Ovoid şekilli hücrelerin PPD'nin orta kısmında lokalize olduğu ve bu hücrelerin anti-hFSH ve LH ile ayrıca reaksiyon verdiği ancak zayıf boyandığı gösterilmiştir. PI bölgesine lokalize olan hücrelerin PAS negatif olduğu fakat PI'yi çevreleyen foliküldeki bazı hücrelerin hFSH ve LH ile kros reaksiyon gösterdiği belirlenmiştir. Anti-hLH ile boyanan hücrelerin genellikle anti hSH ile boyananlardan daha güçlü immunoreaksiyon gösterdiği bildirilmiştir. Gth hücrelerinin hipofizin bütün bölgelerinde bulunduğunu ancak PPD'de, RPD ve PI'dekinden daha yoğun olduğu gözlenmiş olup LH hücrelerinin oosit olgunlaşmasının kontrolü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ünal ve ark., basılmamış).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan İnci kefalı (*Chalcalburnus tarichi* Palas, 1811) Karasu çayı ve Van Gölü'nden serpmeye ağıyla yakalanarak oksijen ile beslenen kaplarda laboratuvara canlı olarak getirildi. Çalışma için, 15-20 cm boy ve ortalama 50-70 gr ağırlığındaki ergin balıklar kullanıldı. Balıklar, 20 mg/Lt konsantrasyondaki Quinaldine çözeltisinde anestezi edilerek beyine zarar vermeden kafatası kemikleri ayrıldı. Ortaya çıkartılan beyin, optik kanalları ve diğer sinir bağlantıları kesilerek dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve tespit solüsyonu içerisine kondu.

3.2. Yöntem

3.2.1. Histolojik metodlar

Çıkartılan beyin dokusu, Bouin ve %4'lük paraformaldehit solüsyonlarında oda sıcaklığında 24 saat tespit edildi. Bouin ile tespit edilen doku, %70'lik alkolde pikrik asidin sarı rengi gidene kadar, paraformaldehit ile tespit edilen dokular ise çeşme suyunda (1-2 saat) yıkandı. Dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek suyu alındı, ksilolde şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Parafin bloklardan hem enine hem boyuna 5-6 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Bazı kesitler dokunun tanınması için hematoksilin-eosin ile, diğer kesitler, nörosekresyon hücrelerinin belirlenmesi için nörosekresyon materyalini boyayan aldehit fuksin (Gomori 1950) boyası ile boyandı. Hazırlanan preparatlar, Nomarski differansiyel interferans kontrast (DIC) mikroskobu (Nikon-Eclipse E600) ile incelenerek gerekli resimler çekildi.

3.3.2. İmmunohistokimyasal metod

Beyin kesitlerinin immunohistokimyasal boyanması, poliklonal antikor (Rabbit anti Luteinizing Hormone Releasing Hormone-LHRH, Chemicon, lot-0509010464) kullanılarak yapıldı. %4'lük paraformaldehit ile tespit edilen beyin dokuları, 200 ml distile su içinde 1 adet PBS tableti çözülerek hazırlanan PBS (pH:7.4, Sigma, P-4417, lot-79H8200) solüsyonu ile yıkandıktan sonra, donma esnasında dokuda kristal oluşumunu engellemek için, %30'luk sukroz çözeltisinde 4 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu dokulardan Leica (CM 1900) marka frozen kesit cihazı ile 5-6µm kalınlığında kesitler alındı ve dokunun kuruyarak antijenik özelliğini kaybetmesini engellemek için her bir kesitin üzeri triton-x ile kaplandı.

Kesitler, Primer antikor ile 4 °C'de 4 saat inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yıkandı. Sekonder antikor (Biotinli keçi anti rabbit İgG, Sigma) ilave edilerek 4 °C'de 1 gece bekletildi. Kesitler tekrar PBS ile yıkandı ve ekstrasidin peroksidaz

(ExtrAvidin Peroksidaz Konjugatı steril distile suda 1/100 oranında hazırlandı. Sigma, E-2886, lot-69H4806) ile 4 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler tris tampon (15 ml diionize suda bir tablet çözüldü. pH:7.6, Sigma, T-5030, lot-118H8200) ile yıkandı. Daha sonra kesitlerin üzerine DAB solüsyonu (1 ml substrat ile 20 µl kromojen karıştırıldı. Dako, K3467, lot-11363) damlatılarak oda sıcaklığında kahverengi renk oluşumu gözlemlendi. Preparatlar distile suda yıkandıktan sonra gliserjel (Benmari usulü 50°C'de 3-5 dk bekletildi. Dako, C0563, lot-07103) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar, Nikon marka araştırma mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

4. BULGULAR

4.1. Beynin Genel Yapısı

Beyin önden arkaya doğru esas olarak telensefalon (ön beyin), diyensefalon (ara beyin), mezensefalon (orta beyin), metensefalon (arka beyin) ve miyelsefalon (son beyin) bölgelerinden oluşur ve bu bölgeler çıplak gözle rahatlıkla ayrılabilir. Telensefalon'da, çift haldeki koklama lopları, koklamaya ait sınırlar ve ön beyin yarımküreleri bulunur. Diyensefalon, dorsalden bakıldığında çok belirgin olmamakla birlikte ventralden bakıldığında bu bölgenin uzantısı olan hipotalamusun çift olan inferior lopları ve tek olan medial lop kolaylıkla görülür. Mezensefalon, beynin en iri bölgesi olup dorsalden bakıldığında içerdiği optik loplar ayırt edilir. Metensefalon bir lop halinde olup ön kısmında genişçe bir korpus serebelli bulunur; bunun arka kısmı da kaudal lop olarak adlandırılan iki çıkıntı ile sonlanır. Son beyini takip eden medulla spinalis ise kaudal yüzgece kadar uzanır (Şekil 4.1a, Şekil 4.1b, Şekil 4.1c).

4.2. Nörosekresyon Hücrelerinin ve GnRH Salgılayan Hücrelerin Dağılımı

Olgun inci kefalı beyninden alınan enine ve boyuna kesitlerde, nörosekresyon hücreleri (NSH) beynin bütün kısımlarında belirlendi. NSH'nde nukleusun eksentrik olarak yerleştiği ve nörosekresyon materyalinin ise hücre periferinde bulunduğu gözlemlendi. Yapılan immunohistokimyasal çalışmada da aynı şekilde beynin bütün kısımlarında memeli Gonado-Releasing Hormon (mGnRH) salgılayan hücreler tespit edildi. Bu bölgelerde bulunan nörosekresyon ve mGnRH salgılayan hücreler sayı, büyüklük ve dağılım bakımından farklılık gösteriyordu.

Olfaktoriyal Loplar: Bu bölgedeki NSH'nin küçük boyutlu olup homojen olarak dağıldığı görüldü. mGnRH salgılayan hücrelerin kuvvetli immunreaksiyon gösterdiği ve beynin diğer bölgelerine göre daha yoğun buldukları tespit edildi.

Telensefalon: Bu bölgeden enine alınan kesitlerde, NSH'nin area ventralis telencephalis pars dorsalis'de area dorsalis telencephali pars centralis'e göre daha yoğun oldukları gözlemlendi. Telensefalik yarımküreler ile olfaktoriyal loplar arasındaki bağlantıyı sağlayan kısımda çok sayıda nörosekresyon hücrelerinin varlığı görüldü (Şekil 4.2a). mGnRH salgılayan hücrelerin özellikle telensefalik yarımkürelerin birleştiği alanda ve telensefalonunun dış fibrial kısımlarında fazla sayıda buldukları tespit edildi (Şekil 4.2b).

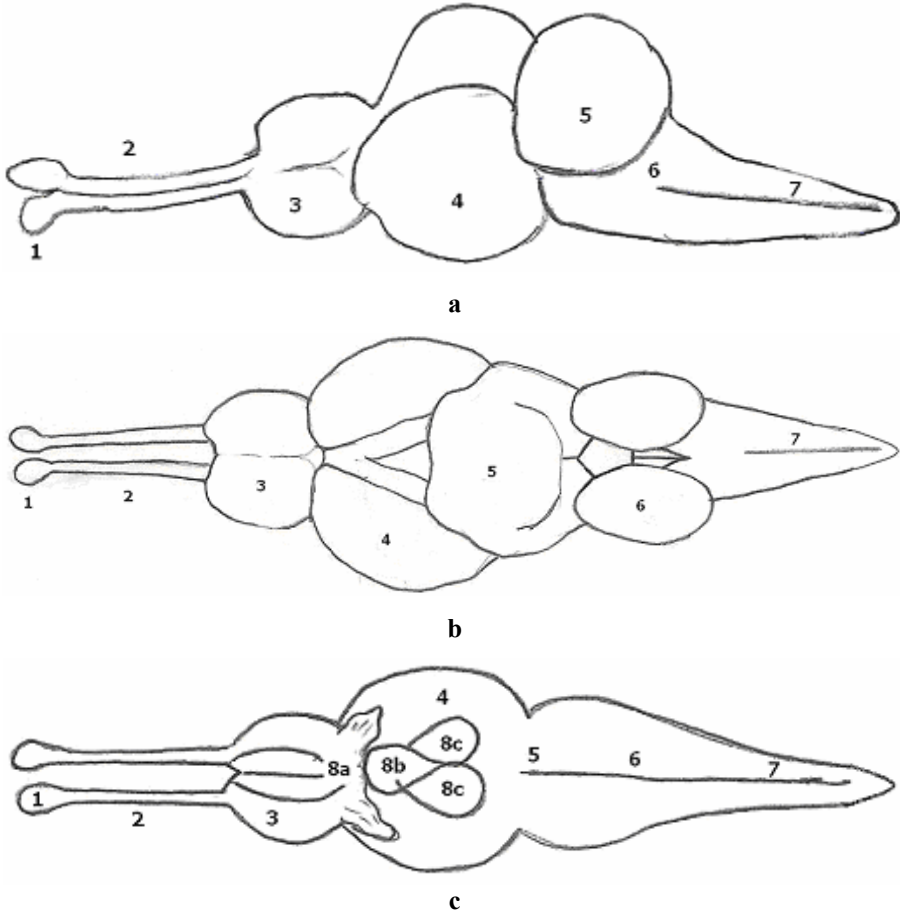
Diyensefalon: Bu bölgedeki NSH'nin nucleus preopticus periventricularis (NPP) ve nucleus lateralis tuberis (NLT)'de yoğun olarak yerleştikleri tespit edildi. NSH'nin hipotalamusta beynin diğer bölgelerine göre daha yoğun oldukları ve özellikle diyensefalon ventrikül uzantılarının çevresinde yerleştikleri gözlemlendi (Şekil 4.3a, Şekil 4.3b, Şekil 4.3c). Hipotalamustaki mGnRH salgılayan hücrelerin telensefalondaki gibi

küçük boyutlu olup kuvvetli immunreaksiyon gösterdikleri tespit edildi. Hipotalamusun inferior lopları ve medial lomu olmak üzere her üç lopa da mGnRH salgılayan hücrelerin özellikle diyensefalon ventrikülü etrafında oldukça yoğun yerleştikleri görüldü (Şekil 4.3d, Şekil 4.3e).

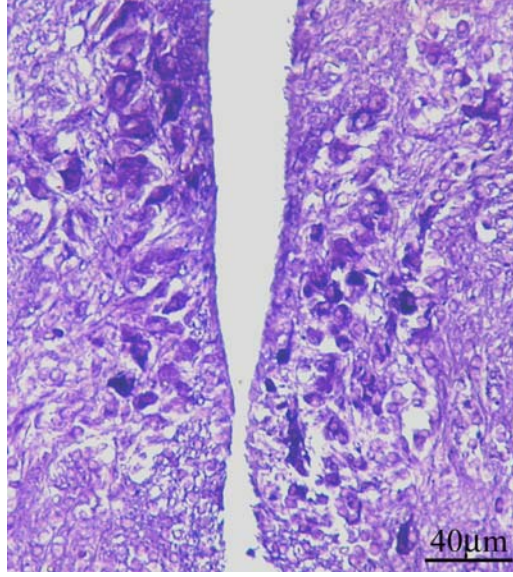
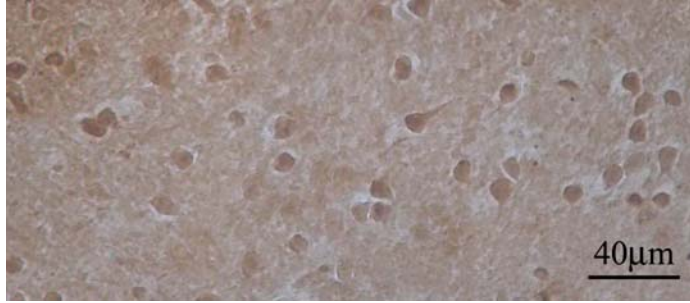
Mezensefalon: Optik tektumda, özellikle stratum griseum centrale, stratum album centrale ve stratum griseum periventriculare'de bazıları bipolar yapıda olan az sayıda NSH gözlenirken (Şekil 4.4a, Şekil 4.4b), daha az sayıda mGnRH salgılayan hücrelere de rastlandı (Şekil 4.4c). Optik tektumun altında, mezensefalonun bir uzantısı olan valvula serebelli'de (Şekil 4.4d) bulunan NSH'nde homojen bir dağılım görüldü. Aynı alanda hipotalamus ve telensefalondaki mGnRH salgılayan hücrelere göre daha büyük boyutlu ve daha zayıf immunreaksiyon gösteren hücreler tespit edildi. Mezensefalonun, optik tektum dışında kalan kısımlarında daha çok sayıda ve homojen bir şekilde yerleşim gösteren mGnRH salgılayan hücreler belirlendi (Şekil 4.4e). Telensefalona yakın olan ön kısmında bir grup NSH gözlendi. Mezensefalonun arka bölgesinde ise IV. ventrikülün yakınında diğer kısımlara göre daha küçük ve dağınık olan NSH görüldü. Mezensefalon ile mezensefalon arasındaki geçiş bölgesinde bir arada bulunan NSH belirlendi (Şekil 4.4f). Bu kısımların dışında valvula serebelli'nin altında bulunan central acoustik lobe'da enine kesitlerde birkaç tane NSH'nin varlığı gözlendi. Enine kesitlerde, mezensefalon bölgesinin arkasına doğru IV. ventrikülün ventralinde, mauthner hücrelerinin her iki yanında birer nükleus tespit edildi (Şekil 4.4g, Şekil 4.4h).

Metensefalon: Metensefalondan geçen enine ve boyuna kesitlerde NSH'nin özellikle moleküler tabaka ile granüler tabaka arasındaki purkinje hücre tabakasının etrafında korpus serebellum adeta bir kuşak şeklinde çevreledikleri (Şekil 4.5a) ve korpus serebellum'un rostralinde bulunan eminentia granularis etrafında yer aldığı görüldü. Aynı alanda küçük boyutlu ve mGnRH antikoruна karşı kuvvetli immunreaksiyon veren hücrelerin de korpus serebellum etrafında yerleştikleri belirlendi (Şekil 4.5b, Şekil 4.5c). Daha alt kesitlerde IV. ventrikülün her iki tarafında yine az sayıda, büyük boyutlu ve zayıf immunreaksiyon gösteren mGnRH salgılayan hücreler tespit edildi. Metensefalon ile mezensefalon arasında, optik tektuma yakın bölgede lokalize olan NSH, korpus serebellum etrafındakilere göre daha küçüktür. Metensefalon ile mezensefalon arasındaki geçiş bölgesinde IV. ventriküle yakın alanda yerleşen NSH oldukça dağınıktır. IV. ventrikülün kaudal loplara bakan kısmında farklı büyüklükte NSH görüldü.

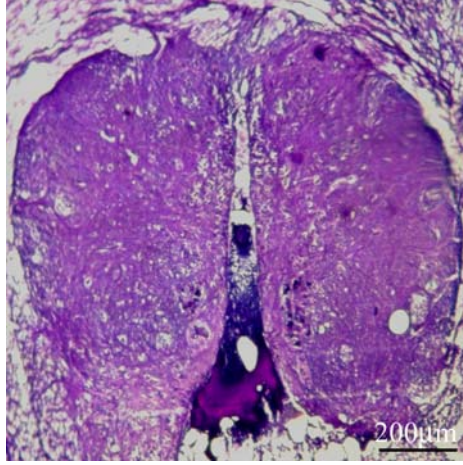
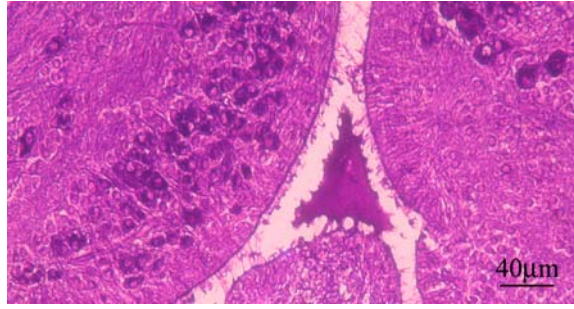
Miyelensefalon: Miyelensefalondan geçen boyuna kesitlerde, medulla oblongatannın dorsalinde az sayıda, küçük ve dağınık olan NSH gözlendi. Ventrala doğru inildikçe bu hücrelerin daha büyük olduğu görüldü (Şekil 4.6a). Aynı düzeyde hipotalamusa yakın bölgede (Şekil 4.6b), medial alanda simetrik halde yerleşim gösteren nükleus şeklinde büyük boyutlu ve zayıf immunreaksiyon gösteren mGnRH salgılayan hücreler belirlendi (Şekil 4.6c, Şekil 4.6d, Şekil 4.6e). Spinal kordda Y-harf şeklindeki gri maddenin ventral köklerinde iki grup NSH tespit edildi. Ayrıca omurilik kanalı etrafında da NSH tespit edilirken bu hücrelerin kuvvetli immunreaksiyon gösteren küçük boyutlu mGnRH salgılayan hücreler olduğu gözlendi. Omurilikte çok seyrek olmak üzere büyük ve zayıf immunreaksiyon gösteren hücrelere de rastlandı (Şekil 4.6f).



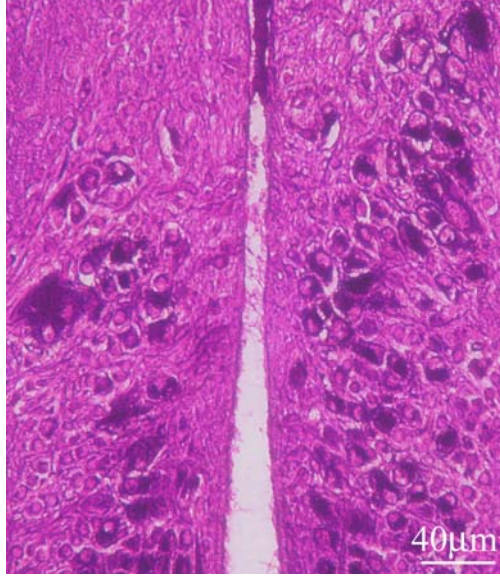
Şekil 4.1. Beynin Genel Yapısı. a. İnci kefalı beyninin dorsolateral görünüşü, b. İnci kefalı beyninin dorsalden görünüşü, c. İnci kefalı beyninin ventralden görünüşü (1. Olfaktoriyal loplar, 2. Koklama kanalı, 3. Telensefalik yarımküreler, 4. Optik lopları gözüken mezensefalon, 5. Metensefalon, 6. Miyelensefalon, 7. Omurilik, 8a. Optik kiyazma, 8b. Mediyal lop, 8c. İnferyor lop).

**a****b**

Şekil 4.2. İnci kefalinde beyinden alınan kesitte telensefalon bölgesi. a. Telensefalondaki nörosekresyon hücreleri (aldehit fuksin), b. Telensefalik yarımkürede mGnRH hücreleri (ihk).

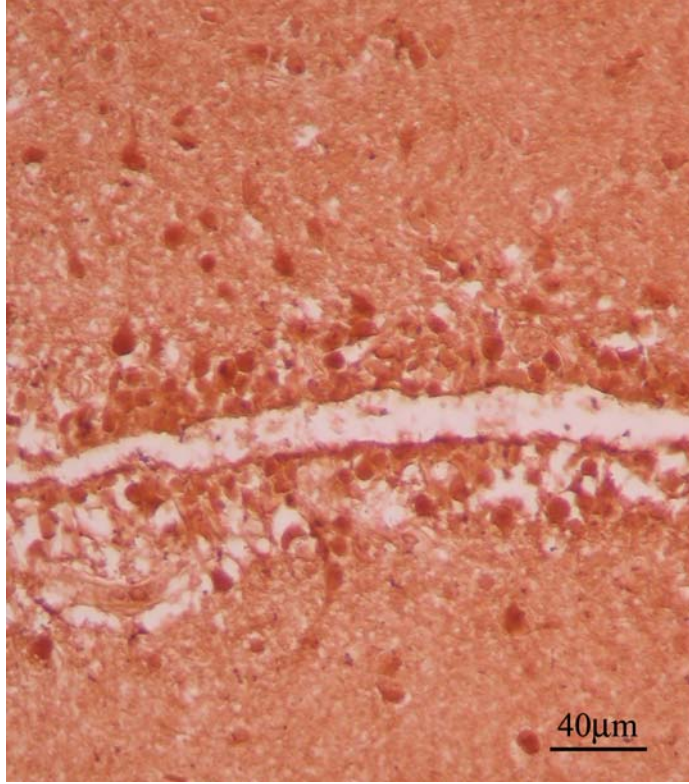
**a****b**

Şekil 4.3a,b. İnci kefalı beyninden alınan kesitte diyensefalon bölgesi (aldehit fuksin). a. Diyensefalon bölgesinin talamus kısmındaki nörosekresyon hücreleri. b. Talamus kısmında III. ventrikül uzantılarının etrafındaki nörosekresyon hücreleri.

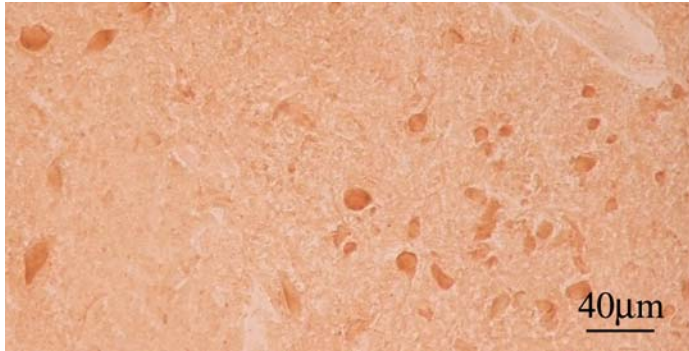


c

Şekil 4.3c. İnci kefalı beyninden alınan kesitte diyensefalon bölgesi (aldehit fuksin). c. Diyensefalonun III.ventrikül etrafındaki nörosekresyon hücreleri.

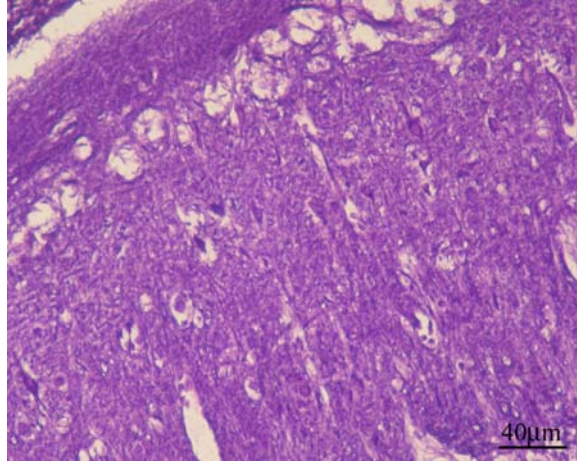
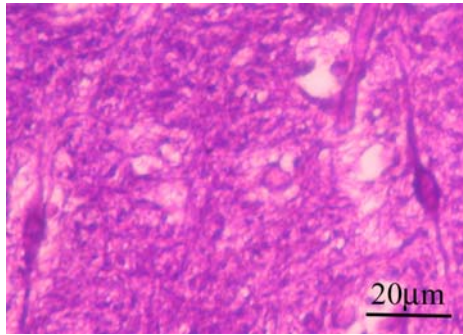
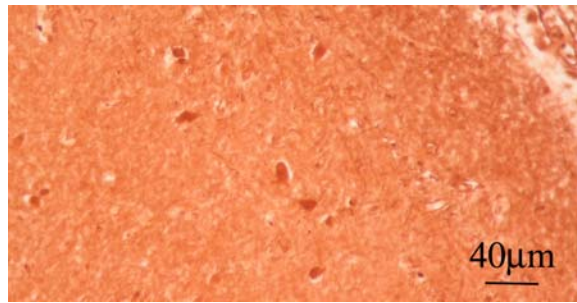


d

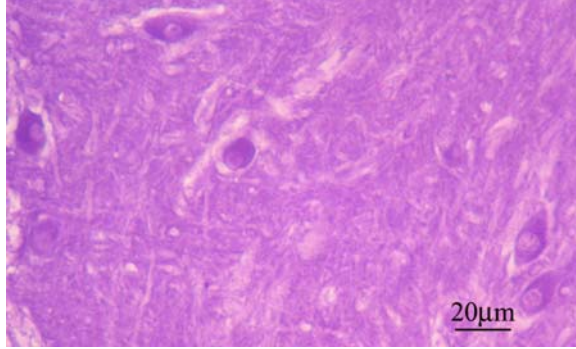
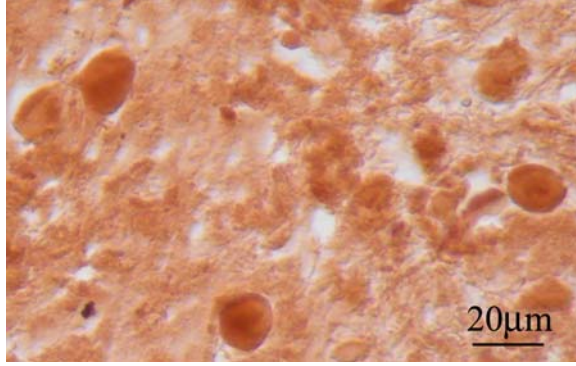
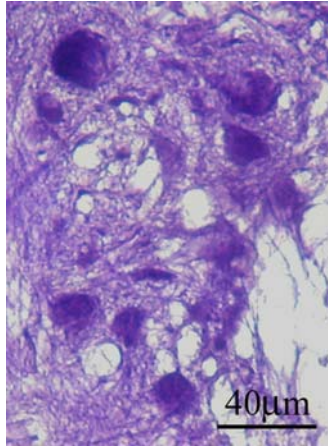


e

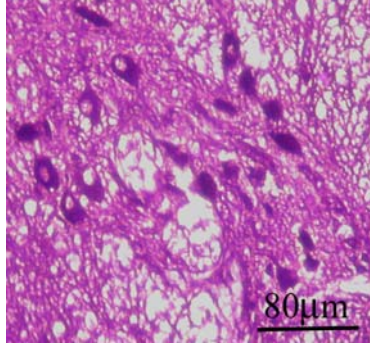
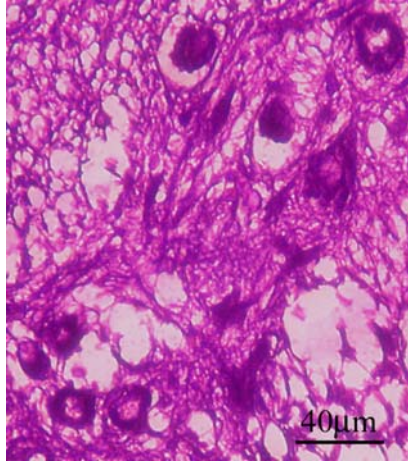
Şekil 4.3d,e. İnci kefalı beyninden alınan kesitte diyensefalon bölgesi (ihk), d. Diyensefalonun III.ventrikül etrafındaki mGnRH hücreleri, e. Hipotalamus kısmında yer alan mGnRH hücreleri.

**a****b****c**

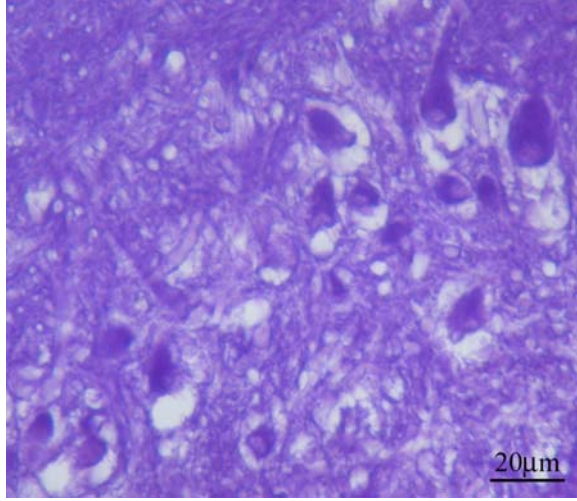
Şekil 4.4a,b,c. İnci kefalı beyninden alınan kesitte mezensefalon bölgesi. a. Optik tektumda bulunan nörosekresyon hücreleri (aldehit fuksin), b. a'daki bölgede bulunan tek bir hücre (aldehit fuksin), c. Optik tektumda lokalize olan mGnRH hücreleri (ihk).

**d****e****f**

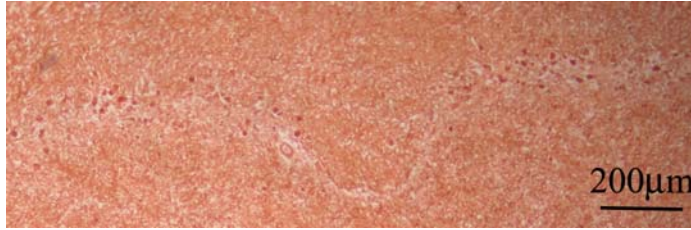
Şekil 4.4d,e,f. İnci kefalı beyninden alınan kesitte mezensefalon bölgesi. d. Mezensefalon bölgesindeki nörosekresyon hücreleri (aldehit fuksin), e. Mezensefalon bölgesinde mGnRH hücreleri (ihk), f. Mezensefalon ile metensefalon arasında bulunan nörosekresyon hücreleri (aldehit fuksin).

**g****h**

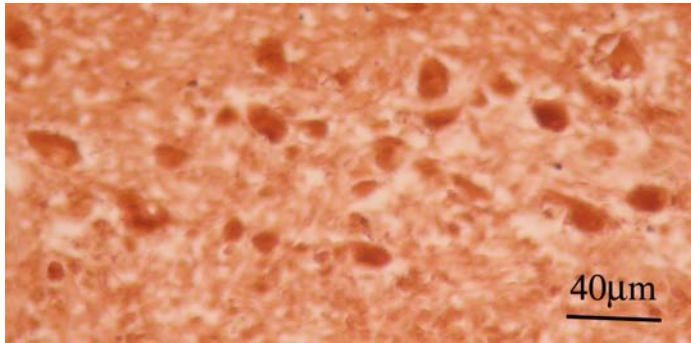
Şekil 4.4g,h. İnci kefalı beyninden alınan kesitte mezensefalon bölgesi (aldehit fuksin), g. Mezensefalon bölgesinde IV. ventrikülün ventralindeki birinci nukleus, h. Mezensefalonda IV. ventrikülün ventralindeki ikinci nukleus.



a

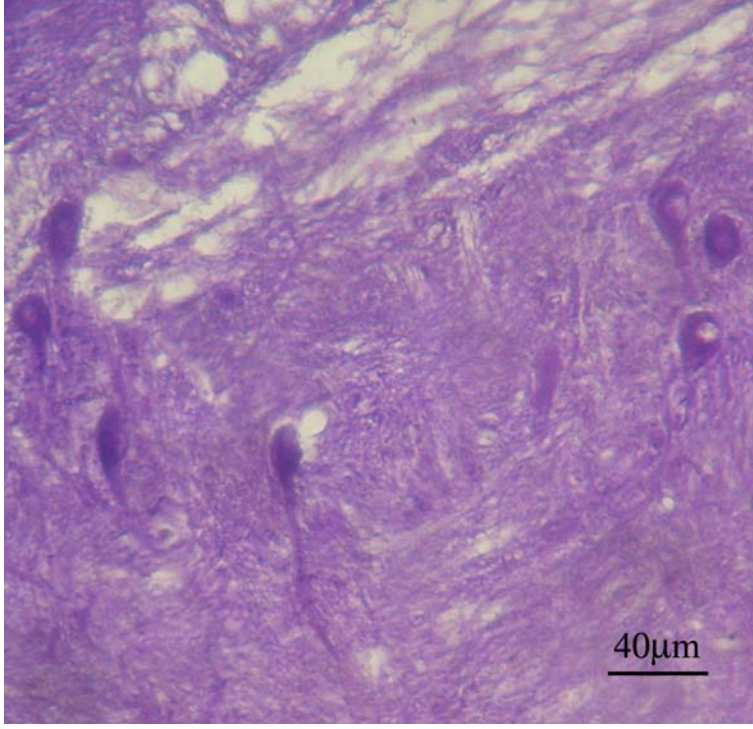
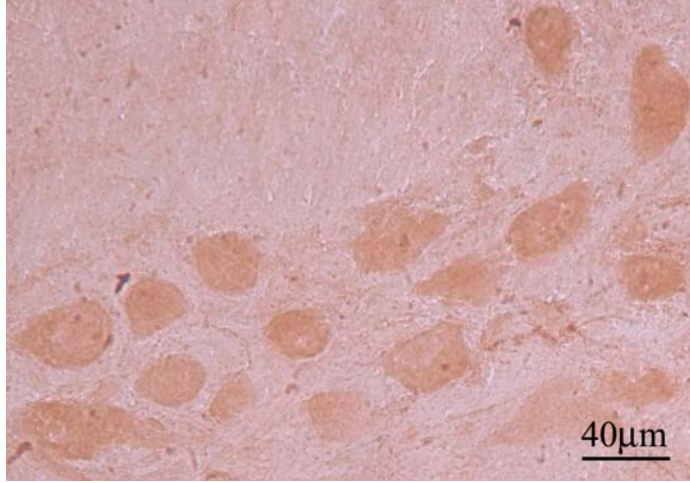


b

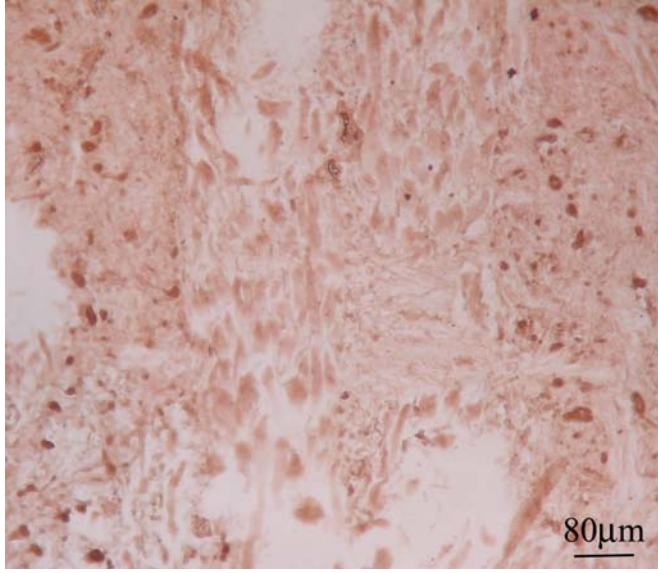


c

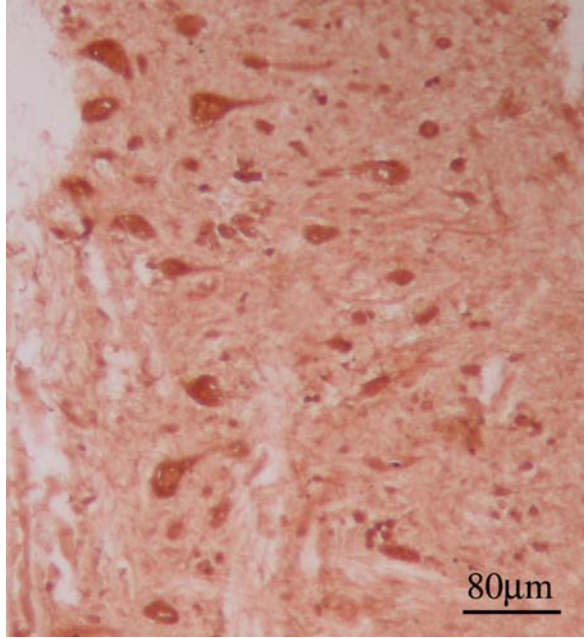
Şekil 4.5. İnci kefali beyninin metensefalon bölgesi. a. Korpus serebellumu çevreleyen nörosekresyon hücreleri (aldehit fuksin), b. Korpus serebellumdaki mGnRH hücreleri (ihk), c. b'nin büyük büyütmedeki görüntüsü (ihk).

**a****b**

Şekil 4.6a,b. İnci kefali beyninden alınan kesitte miyelensefalon bölgesi. a. Miyelensefalonda orta kısımda bulunan nörosekresyon hücreleri (aldehit fuksin), b. Miyelensefalunun rostralinde grup şeklindeki mGnRH hücreleri (ihk).

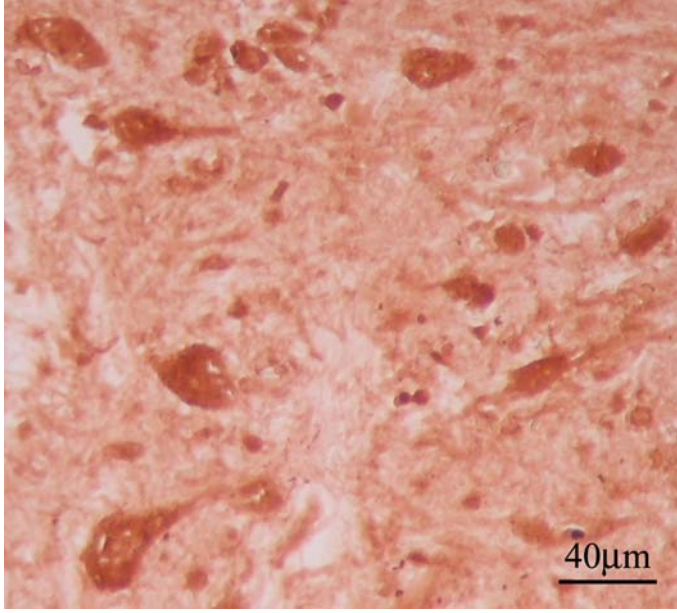


c

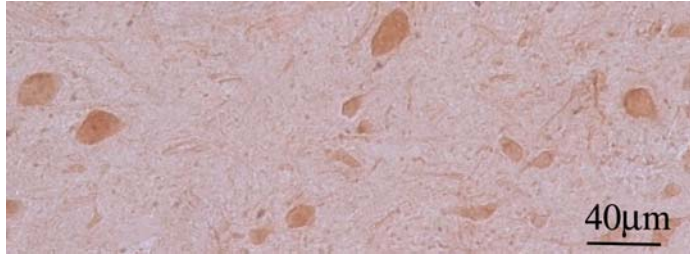


d

Şekil 4.6c,d. İnci kefalı beyninden alınan kesitte miyelensefalon bölgesi (ihk), c. Miyelensefalonun orta kısmında bulunan mGnRH hücreleri (ihk), d. Miyelensefalonda mGnRH hücrelerin oluşturduğu bir grup.



e



f

Şekil 4.6e,f. İnci kefali beyninden alınan kesitte miyelensefalon bölgesi (ihk), e. d'nin büyütülmüş görüntüsü, f. Omurilikte mGnRH hücreleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diğer balıklarda olduğu gibi, inci kefalinde de merkezi sinir sistemi, telensefalon, diyensefalon, mezensefalon, metensefalon ve miyelsefalon olmak üzere beş bölgeye ayrılır. Bu balığın beyinde bulunan nörosekresyon hücreleri (NSH) ve Gonado-Releasing Hormon (GnRH) salgılayan hücrelerin lokalizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Beyinden alınan enine ve boyuna kesitlerde, NSH'nin beyin hemen hemen bütün bölgelerinde bulunduğu ve bu hücrelerden bazılarının mGnRH antikoru ile kuvvetli veya zayıf immunreaksiyon verdiği gözlemlendi.

Bazı balıklarda beyin farklı bölgeleri (Sas ve ark., 1990), bu bölgelerdeki nukleusların adlandırılması ve lokalizasyonu (Cardenas ve ark., 2000), bu nukleuslarda bulunan hücrelerin morfolojik ve boyanma özellikleri (Hansen, 1999), boyutları (Zambrano, 1970) ve ince yapısı (Lederis, 1962) incelenmiştir. Kurbağa (Süren, 1999), kuş (Meddle ve ark., 1999) ve balıklarda (Zambrano, 1970) yapılan çeşitli çalışmalar ile beyinde bulunan nörosekresyon hücrelerinin benzer yapılarda olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, olfaktoriyal loplardaki NSH'nin, diyensefalon bölgesi hariç diğer bölgelerdeki hücelere göre küçük boyutlu oldukları ve homojen bir şekilde dağıldıkları belirlendi. Yılan balığı (Montero ve ark., 1994) ve mersin balığındaki (Egorova ve ark., 2001) bulgulara benzer olarak inci kefalinde de olfaktoriyal loplarda mGnRH salgılayan hücreler tespit edildi. Bununla birlikte bu bölgede, barfin flounder'de sGnRH, cGnRH-II, sbGnRH'a karşı kullanılan antikorlardan sadece sGnRH'ın (Amano ve ark., 2002) ve white sucker'da kullanılan sGnRH, lGnRH-I, lGnRH-III, cGnRH-II antikorlarından sadece türe özgü GnRH salgılayan hücre fibrillerinin varlığı tespit edilmiştir (Robinson ve ark., 2000). Tilapia'da yapılan ekstraksiyon çalışması ile bu bölgede sadece sGnRH salgılandığı belirtilmiştir (Parhar ve ark., 1998). Bu da, bu bölgede bulunan GnRH salgılayan hücrelerin, türler arasında farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Telensefalik yarımkürelerin birleştiği alanda yoğun ve yarımkürelerde seyrek olmak üzere, olfaktoriyal loplardaki hücelere aynı büyüklükte NSH'nin varlığı tespit edildi. Bu bölgelerde daha az sayıda ve benzer dağılıma sahip mGnRH salgılayan hücreler belirlendi. Benzer olarak aynı bölgede, yılan balığında mGnRH salgılayan hücreler ve fibrilleri (Montero ve ark., 1994), nil levreğinde de ventral telensefalonda mGnRH salgılayan hücre fibrillerinin varlığı belirlenmiştir (Mousa ve Mousa, 2003). White sucker'da, telensefalonda sGnRH, lGnRH-I, lGnRH-III, cGnRH-II antikorlarından sGnRH, lGnRH ve cGnRH içeren fibrillerin olduğu bildirilmiştir (Robinson ve ark., 2000). Dil balığında yapılan ekstraksiyon çalışması ile bu bölgede sadece sGnRH tespit edilmiştir (Rodríguez ve ark., 1999).

İnci kefali beyinin preoptik alanındaki NSH, Australian lungfish'indeki bulgulara benzer olarak (Hansen, 1999), diyensefalon ventrikülünün etrafında özellikle nukleus preoptikus magnosellularis ve nukleus preoptikus parvosellularis'de daha yoğun olduğu belirlendi. Pejerrey'de yapılan bir çalışmada diyensefalon ventrikülünün iki kıyısında ir-NPY hücrelerin bulunduğu ve bunların GnRH salgılayan hücelere sıkı bağlantılı oldukları bildirilmiştir (Traverso ve ark., 2003). Preoptik alanda bulunan NSH'nin diyensefalon ventrikülünün etrafındaki hücelere göre daha az sayıda ve daha

homojen dağıldıkları gözlemlendi. Bu alan, pejerrey'de GnRH için immunoreaksiyon veren alanlardan biri olarak tespit edilmiştir (Stefano ve ark., 2000). İnci kefalinde de preoptik alanda, daha yoğun olarak hipotalamusta ve diyensefalon ventrikülü etrafında mGnRH salgılayan hücrelerin varlığı gözlemlendi. Benzer olarak nil levreği (Mousa ve Mousa, 2003) ve yılan balığı (Montero ve ark., 1994)'nda preoptik bölge ve hipotalamusun alt orta bölgesinde mGnRH salgılayan hücrelerin varlığı bildirilmiştir. Bununla birlikte aynı alanda, Barfin flounder'de sbGnRH sentezleyen hücre ve fibrilleri (Amano ve ark., 2002), ve white sucker'da sGnRH ve lGnRH içeren hücrelerin varlığı gösterilmiştir (Robinson ve ark., 2000). Tilapia'da yapılan ekstraksiyon çalışması ile de preoptik alanda sadece sbGnRH sentezlendiği tespit edilmiştir (Parhar ve ark., 1998).

Optik tektumda diyensefalon ve telensefalona göre daha seyrek ve bazıları bipolar özellikte olan NSH görüldü. Bu bölgede birkaç tane de mGnRH salgılayan hücre tespit edildi. Ayrıca mezensefalonun optik tektum dışında kalan kısımlarında homojen dağılım gösteren, telensefalon ve diyensefalondakilere göre daha büyük olan ancak zayıf reaksiyon veren mGnRH hücrelerin varlığı belirlendi. Farklı olarak, Stefano ve ark. (2000), pejerrey beyninde bu bölgede mGnRH salgılayan hücrelerin değil, cGnRH-II'yi sentezleyen hücrelerin bulunduğunu, ayrıca optik tektum tabakalarından stratum album centrale, stratum griseum centrale ve stratum fibrosum griseum superficialis'te GnRH salgılayan hücrelerin yer aldığını bildirmişlerdir. İnci kefalinde soluk boyanan bu hücreler, cGnRH-II salgılayan hücreler olabilir. Barfin flounder'de sGnRH sbGnRH ve cGnRH-II antikoru kullanılarak yapılan çalışmada, ortabeyin tegmentumunda sadece cGnRH-II-ir hücre gövdelerinin bulunduğu bildirilmiştir (Amano ve ark., 2002). European silver ell'de ise mGnRH ve cGnRH-II antikorlarından cGnRH ile reaksiyon veren hücreler, diyensefalon ve mezensefalon arasında gözlenmiştir (Montero ve ark., 1994).

İnci kefalinde, serebellum'da bulunan NSH, mezensefalonun içine doğru uzanan valvula serebelli'de yoğunudur ve bunlar korpus serebellumu bir kuşak şeklinde çevreler. Bu hücrelerin arasındaki bazı hücrelerde, mGnRH antikoru ile zayıf reaksiyon gözlemlendi. Metensefalonda IV. ventrikülün kaudal loplara bakan kısmında, (daha alt kesitlerde) IV. ventrikülün her iki tarafında ve metensefalon ile mezensefalonun geçiş bölgesinde (IV. ventriküle yakın alanda) yer alan NSH belirlendi. Literatürde bu bölgede çeşitli GnRH salgılayan hücre fibrillerinin varlığı belirtilirken (Rodríguez ve ark., 1999), inci kefalinde metensefalonun diğer bölgelerinde açık renkli boyanmakla birlikte korpus serebellum etrafında daha koyu boyanan mGnRH sentezleyen hücreler tespit edilmiştir. Bu bölgede herhangi bir GnRH sentezlendiğine dair literatür bilgisine rastlanmazken inci kefalinde, omurilikte, Y harfi şeklindeki gri maddenin ventral köklerinde iki grup NSH belirlendi ve bu hücrelerin çoğunun da mGnRH antikoru pozitif reaksiyon verdiği tespit edildi. Bununla birlikte pejerrey'de yapılan bir çalışmada, bu bölgede GnRH sentezleyen hücre fibrillerinin varlığı belirtilmiştir (Stefano ve ark., 2000).

Sonuç olarak, inci kefal beyinde olfaktoriyal loplara, telensefalon, diyensefalon, mezensefalon ve metensefalon bölgelerinde NSH, telensefalon ve diyensefalonda ise mGnRH hücrelerin yoğun olarak buldukları belirlendi. Literatürden farklı olarak omuriliğin boz madde içerisinde iki tane NSH grupları ve bu gruplarda anti mGnRH ile güçlü reaksiyon veren hücreler tespit edildi.

KAYNAKLAR

- Amano, M., Oka, Y., Yamanome, T., Okuzawa, K., Yamamori, K., 2002. Three GnRH Systems in the Brain and Pituitary of a Pleuronectiform Fish, the Barfin Flounder *Verasper moseri*. *Cell Tissue Res.*, (309): 323-329.
- Cardanes, R., Lin, X., Chavez, M., Aramburo, C., 2000. Characterization and Distribution of somatostatin Binding Sites in Goldfish Brain. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, (117): 117-128.
- Egorova, A. E., Kuzik, V.V., Danilova, O.A., 2001. Morphofunctional Characteristics of Gonadotropin-Releasing Hormone Immunoreactive Structures in the Brain of the Sturgeon *Acipenser güldenstädti* Before Spawning. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.*, (37): 664-671.
- Hansen, G.N., 1999. Vascularization of the Pituitary of the Australian Lungfish and *Neoceratodus forsteri*. *Acta Zoologica.*, (80): 311-324.
- Kitani, T., Matsumoto, S., Yamada, H., Amano, M., Iwata, M., Ueda, H., 2003. Changes in GnRH Levels in the Brain and Pituitary Gland During Migrations of Sockeye Salmon and Chum Salmon. *Fish Physiol. and Biochem.*, (28): 269-270.
- Koyuncu, N., 2000. *İnci Kefalinde (Chalcalburnus tarichi Pallas, 1811) Merkezi Sinir Sistemi Üzerinde Anatomik ve Histolojik Bir Araştırma*, (Yüksek Lisans Tezi Basılmış) YYÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. 29s.
- Lederis, K., 1962. Ultrastructure of the Hypothalamo-Neurohypophysial System in Teleost Fishes and Isolation of Hormone-Containing Granules from the Neurohypophysis of the Cod (*Gadus morrhua*). *Cell and Tissue Research (Historical Archive)*, 58(2): 192-213.
- Meddle, S.L., Foidart, A., Wingfield, J.C., Ramenofsky, M., Balthazart, J., 1999. Effects of Sexual Interactions with a Male on Fos-Like Immunoreactivity in the Female Quail Brain. *Journal of Neuroendocrinol.*, (11): 771-784.
- Montaner, A.D., Miranda, L.A., Vizziano, D., López, A., Okuzawa, K., Somoza, G.M., 2001. Gonadotropin- Releasing Hormone in Two Perciform Fishes: *Micropogonias furnieri* and *Pagrus pagrus*. *Fish Physiol. and Biochem.*, (24): 243-246.
- Montero, M., Vidal, B., King, J.A., Tramu, G., Vandesande, F., Dufour, S., K., O., 1994. Immunocytochemical Localization of Mammalian GnRH (Gonadotropin- Releasing Hormone) and Chicken GnRH-II in the Brain of the European Silver Eel (*Anguilla anguilla* L.). *J. Chem. Neuroanat.*, 7(4): 227-41.
- Mousa, M.A., Mousa, S.A., 2003. Immunohistochemical Localization of Gonadotropin- Releasing Hormone in the Brain and Pituitary Gland of the Nile Perch, *Lates niloticus* (Teleostei, Centropomidae). *Gen. and Comp. Endocrinol.*, (130): 245-255.
- Okuzawa, K., Gen, K., Bruysters, M., Bogerd, J., Gothilf, Y., Zohar, Y., Kagawa, H., 2003. Seasonal Variation of the Three Native Gonadotropin- Releasing

- Hormone Messenger Ribonucleic Acids Levels in the Brain of Female Red Seabream. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, (130): 324-332.
- Parhar, I.S., Soga, T., Sakuma, Y., 1998. Quantitative in Situ Hybridization of Three Gonadotropin-Releasing Hormone-Encoding mRNAs in Castrated and Progesterone-Treated Male Tilapia. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, (112): 406-414.
- Pinelli, C., D'aniello, B., Fiorentino, M., Bhat, G., Saidapur, S.K., Rastogi, R.K., 1997. Distribution of Gonadotropin-Releasing Hormone Immunoreactivity in the Brain of *Ichthyophis beddomei* (Amphibia: Gymnophiona). *The J. of Comp. Neurol.*, (384): 283-292.
- Robinson, T.C., Tobet, S.A., Chase, C., Waldron, T., Sower, S.A., 2000. Gonadotropin- Releasing Hormones in the Brain and Pituitary of the Teleost, the White Sucker. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, (117): 381-394.
- Rodríguez, L., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Soubrier, M.A., Mañanós, E., Holland, M.C.H., Zohar, Y., Zanuy, S., 2000. Pituitary Levels of Three Forms of GnRH in the Male European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) During Sex Differentiation and First Spawning Season. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, (120): 67-74.
- Rodríguez-Gómez, F.J., Rendón, M.C., Sarasquete, C., Muñoz-Cueto, J.A., 1999. Distribution of Gonadotropin- Releasing Hormone Immunoreactive Systems in the Brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *The Histochem. Journal*, (31): 695-703.
- Sas, E., Maler, L., Tiner, B., 1990. Catecholaminergic Systems in the Brain of a Gymnotiform Teleost Fish: an Immunohistochemical Study. *J. Comp. Neurol.*, 292(1):127-62.
- Somoza, G.M., Lescheid, D.W., Miranda, L.A., Lo Nostro, F.L., Magliulo-Cepriano, L., Montaner, A.D., Schreiberman, M.P., Rivier, J.E., Sherwood, N.M., 2002a. Expression of Pejerrey Gonadotropin- Releasing Hormone in Three Orders of Fish. *Biol. of Reprod.*, (67): 1864-1871.
- Somoza, G.M., Miranda, L.A., Strobl-Mazzulla, P., Guilgur, L.G., 2002b. Gonadotropin- Releasing Hormone (GnRH): From Fish to Mammalian Brains. *Cellular and Molecular Neurobiology*, (22): Nos. 5/6.
- Stefano, A.V., Aldana-Marcos, H.J., Affanni, J.M., Somoza, G.M., 2000. Gonadotropin- Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems in the Pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiol. and Biochem.*, (23): 215-223.
- Süren, S., 1999. The Functional Relationships Between the Neurosecretory Material and the adrenal gland of *Rana ridibunda* (Amphibia-Anura). *Tr. J of Zool.*, (23): 305-311.
- Takashima F., Hibiya T. 1995. *An atlas of Fish Histology*. Stuttgart . New york.
- Taniyama, S., Kitahashi, T., Ando, H., Kaeriyama, M., Zohar, Y., Ueda, H., Urano, A., 2000. Effects of Gonadotropin- Releasing Hormone Analog on Expression of Genes Encoding the Growth Hormone/Prolactin/Somatolactin Family and a Pituitary-Specific Transcription Factor in the Pituitaries of Prespawning Sockeye Salmon. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, (118): 418-424.

- Traverso, J.M., Ravaglia, M.A., Vissio, P.G., Maggese, M.C. Paz, D.A., 2003. Localization of Neuropeptide Y-like Immunoreactive Structures in the Brain of the Pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atheriniformes). *Anat. Histol. Embryol.*, (32): 29-35.
- Ünal, G., Çetinkaya, O., Elp, M., 1999. İnci Kefalinde (*Chalcalburnus tarichi* Palas, 1811) Gonad Gelişiminin Histolojik Olarak İncelenmesi. *Tr. J. of Zool.*, (23): 328-338.
- Ünal, G., Elp, M., 2000. *İnci Kefalinde (Chalcalburnus tarichi Palas, 1811) Ovaryumun İnce Yapısı ve Bazı Steroid Hormonların Mevsimsel Değişimi*. Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiş 15.06.2000 tarihinde tamamlanıp kabul edilmiş 97-FED-2000 Nolu Proje (Basılmamış).
- Ünal, G., Oğuz., A.R., Kaptaner, B., İnci Kefalinde (*Chalcalburnus tarichi* Palas, 1811) Hipofiz Bezinin Histolojisi Gonadotropik Hücrelerin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu (Basılmamış).
- Vázquez, By. M., Rodríguez, F., Domezain, A., Salas, C., 2002. Development of the Brain of the Sturgeon *Acipenser naccarii*. *J. Appl. Ichthyol.*, (18): 275-279.
- Zambrano, D., 1970. The Nucleus Lateralis Tuberis System of the Gobiid Fish *Gillichthys mirabilis* I. Ultrastructural and Histochemical Characterization of the Nucleus. *Cell and Tissue Research(Historical Archive)*, 110(1): 9-26.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe AKÇOCUK, 1972 yılında Antalya’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Antalya’da, lise öğrenimini ise İstanbul Haydarpaşa Sağlık Meslek Lisesi’nde tamamladı. 1990 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı. Aynı yıl Sağlık Bakanlığı’na bağlı olarak Radyoloji Teknisyeni olarak göreve başladı. 1993 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sosyal Bilimler Meslek Yüksekokulu, İşletmecilik Bölümünü kazanarak okuldan ayrıldı. 1995 yılında işletmecilik bölümünden mezun oldu. 1996 yılında Anadolu Üniversitesi, Açık Öğretim Fakültesi, Sağlık Programları Sağlık Teknikerliği Bölümünü kazandı ve 1999 yılında mezun oldu. 2000 yılında, tekrar Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümüne kayıt yaptırarak 2003 yılında bu bölümden başarıyla mezun oldu. 2003 yılı Eylül ayında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2005 yılında Konya iline bağlı Beyşehir Devlet Hastanesi’ne atandı. “İnci Kefalinde (*Chalcalburnus tarichi* Guldenstädt, 1814) Nörosekresyon Hücrelerinin Dağılımı ve Gonado Releasing Hormon (GnRH) Salgılayan Hücrelerin İmmunohistokimyasal Olarak İşaretlenmesi” isimli yüksek lisans tezini tamamladı. Halen Beyşehir Devlet Hastanesi’nde Radyoloji Teknisyeni olarak görev yapmaktadır.