

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEĞİŞİK DOKU ÖRNEKLERİNİN FARKLI SAKLAMA
SÜRELERİNDE KORUNMASI VE VİTRİFİKASYON
YÖNTEMİNİN PRİMER KÜLTÜRLER ÜZERİNE OLAN
ETKİSİNİN FARKLI YÖNTEMLER UYGULAYARAK
ARAŞTIRILMASI**

Arzu TAŞ ÇAPUTÇU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Doktora Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (DOKTORA) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

**KOCAELİ
2013**

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEĞİŞİK DOKU ÖRNEKLERİNİN FARKLI SAKLAMA
SÜRELERİNDE KORUNMASI VE VİTRİFİKASYON
YÖNTEMİNİN PRİMER KÜLTÜRLER ÜZERİNE OLAN
ETKİSİNİN FARKLI YÖNTEMLER UYGULAYARAK
ARAŞTIRILMASI**

Arzu TAŞ ÇAPUTÇU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Doktora Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (DOKTORA) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Doç. Dr. Süheyla GONCA
Eş Danışman : Prof. Dr. Sezen ARAT

KAMAG 1007 Programı 106G005 numaralı proje ve Kocaeli Üniversitesi BAP 2010/10 numaralı projeler tarafından desteklenmiştir.

KOCAELİ
2013

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: DEĞİŞİK DOKU ÖRNEKLERİNİN FARKLI SAKLAMA SÜRELERİNDE KORUNMASI VE VİTRİFİKASYON YÖNTEMİNİN PRİMER KÜLTÜRLER ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN FARKLI YÖNTEMLER UYGULAYARAK ARAŞTIRILMASI

Tez yazarı: Arzu TAŞ ÇAPUTÇU

Tez savunma tarihi:

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Süheyla GONCA

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Prof. Dr. Süreyya CEYLAN	
ÜYE(DANIŞMAN):	Doç.Dr. Süheyla GONCA	
ÜYE:	Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ	
ÜYE:	Prof. Dr. Birol VURAL	
ÜYE:	Yard. Doç. Dr. Ünal USLU	

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2013

Prof.Dr. Tuncay ÇOLAK

Enstitü Müdürü

DEĞİŞİK DOKU ÖRNEKLERİNİN FARKLI SAKLAMA SÜRELERİNDE KORUNMASI VE VİTRİFİKASYON YÖNTEMİNİN PRİMER KÜLTÜRLER ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN FARKLI YÖNTEMLER UYGULAYARAK ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Sunulan tez çalışmasında koyun ve sığıra ait kas ve kıkırdak dokularına uygulanan farklı saklama süreleri ve vitrifikasyon yönteminin primer kültür ve dokular üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, hücre elde edilmesi ve elde edilen hücrelerin canlılık ve kullanılabilirlikleri farklı yöntemlerle araştırılmıştır. Bu çalışma biyobankalar için dokuların saklanabilirliği ve bunlardan elde edilen hücrelerin Nükleer Transfer (NT) çalışmalarında kullanılabilirliğini göstermek amacı ile tasarlanmıştır.

Çalışmada sığır ve koyun türlerine ait olan kas ve kıkırdak dokuları 4°C’de 5, 48, 72, 96 ve 216 saat boyunca bekletilmiştir. Belirtilen süreler sonrasında taze (saklama sonrası hemen ekim yapılan) ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurulup çözülen dokuların ekim başarısı, saklama süresi ve vitrifikasyonun primer kültür üzerine etkileri incelenmiştir.

Primer kültürler sonrasında elde edilen hücrelerin antikorlar ile karakterizasyonları yapılmış ve Hematoksilen-Eosin (H-E) boyası ile de morfolojileri incelenmiştir. Popülasyon katlanma zamanları ve proliferatif özellikleri incelenerek hücrelerin aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Her grup için apoptotik hücre oranları belirlenmiş ve gruplar arasındaki farklılıklar istatistikî olarak değerlendirilmiştir. Hücrelerin Nükleer Transfer çalışmalarında kullanılabilirliğini göstermek amacıyla hücre siklus fazlarından olan G0-G1 fazı incelenmiştir.

Sonuçlar, vitrifikasyon yönteminin kas ve kıkırdak dokularında kolaylıkla ve başarı ile uygulanabileceğini göstermiştir. Vitrifikasyon sonrasında her iki tipteki dokudan da başarı ile hücreler elde edilerek tanımlanmıştır. Apoptotik hücre oranlarında gruplar arasında fark bulunmazken hücre siklus analizlerinde G0/G1 fazı bakımından taze ve vitrifiye gruplar arasında fark bulunmuştur. Sonuç olarak; vitrifikasyon yönteminin dokuların saklanması amacıyla biyobankalar için alternatif bir yöntem olarak uygulanabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kriyopreservasyon, Kas Dokusu, Kıkırdak Dokusu, Vitrifikasyon, Biyobankalar

PRESERVATION OF DIFFERENT TISSUE TYPES AT DIFFERENT TIME PERIODS AND INVESTIGATION OF EFFECTS OF VITRIFICATION ON PRIMARY CULTURES BY USING DIFFERENT METHODS

In the present study it was aimed to investigate the temporal post-mortem limits, within which there will be guarantees of obtaining living cells from several tissues (muscle and cartilage) of sheep and cattle and the effect of vitrification on the ability of cells from tissues and tissues stored at different times. For this purpose, obtaining cells from tissues, their viability and usability were investigated by different techniques. This study was designed to show the cryopreservation of tissue samples for biobanks and the use of cells obtained from vitrified tissues for Nuclear Transfer (NT) studies.

In this study, the muscle tissue and auricular cartilage from bovine and sheep were stored at 4°C for 5, 48, 72, 96 and 216 hours post-mortem (hpm). Tissue samples were sorted into two groups: one group was in vitro cultured immediately after storage and the other was vitrified after storage and then in vitro cultured. The effect of vitrification on primary tissue cultures was investigated.

The characterization of cells obtained from primary tissue culture were done with antibodies and general morphological features were investigated by Hematoxylin-eosin staining. The activities of cells were compared by population doubling time and proliferative activity assay. The apoptosis rates were determined for each group and differences between groups were evaluated by statistical analysis. The cell cycle analysis was done and the percentage of cells in G0/G1 phase was determined to show the usability of cells in NT studies.

The results of the present study showed that vitrification method can be used easily and successfully for muscle and cartilage tissue samples. The living cells could be obtained from both muscle and cartilage tissue samples after vitrification and these cells were characterized. There was no significant difference between fresh and vitrified groups in terms of apoptotic features. However, there was significant difference between fresh and vitrified groups in cell cycle analysis in G0/G1 phase. In conclusion, it was showed that vitrification method would be used as an alternative method for cryopreservation of the different tissue types in biobanking.

Key Words: Cryopreservation, Muscle Tissue, Cartilage Tissue, Vitrification, Biobanks

TEŞEKKÜR

Çalışma konumu belirleyerek bana yeni ufuklar açan, beni her zaman destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım, **Doç. Dr. Süheyla Gonca**; bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışmanım, **Prof. Dr. Sezen Arat'a**; eğitim sürem boyunca büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm hocalarım, **Prof. Dr. Süreyya Ceylan'a**; **Prof. Dr. Hakkı Dalçık'a**; **Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz'a**; **Prof. Dr. Serdar Filiz'e**; **Yrd. Doç.Dr. Yusufhan Yazır'a** ve **Prof. Dr. Haydar Bağış'a**;

Çalışmalarım süresinde desteğini gördüğüm ve yardımlarını esirgemeyen **TUBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarı çalışanları Dr. Tolga Akkoç, Dr. Diğdem Aktopraklıgil, Dr. Soner Aksu; Dr. Evren Koban; Dr. Gaye Çatinkaya, Gazi Turgut ve Şakir Sekmen'e**; Flow Cytometri analizleri konusunda yardımlarını esirgemeyen **Dr. Deniz Duralı ve Dr. İbrahim Hatipoğlu'na**; tezim ve hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan ve beni destekleyen **Aileme** ve eşim **Reha Çaputçu'ya**

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	4
1.2. Hipotezler	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Biyobankalar ve Önemleri	6
2.2. Dondurarak Koruma Yöntemi (Kriyoprezervasyon)	8
2.2.1. Kriyoprezervasyon Yöntemleri	11
2.2.1.1. Yavaş Dondurma	11
2.2.1.2. Hızlı Dondurma	11
2.2.1.3. Camsı Yapı Yöntemi (Vitrifikasyon)	12
2.3. Doku ve Hücrelerin Kriyoprezervasyonu	14
2.3.1. Dokuların Dondurulması	14
2.3.2. Hücre/Doku Kültürü ve Dondurularak Saklanması	15
2.4. Hücre Döngüsü (Siklusu)	17
2.5. Programlı Hücre Ölümleri (Apoptozis)	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Dokuların Alınması	25
3.2. Deney Grupları ve Hazırlanması	25
3.3. Vitrifikasyon İşlemi	26
3.4. Primer Kültür	28
3.5. Hücre Kültürü	28
3.6. Analiz Metodları	29
3.6.1. Dokuların Yapışma Oranları ve Konfluensi Zamanlarının Karşılaştırılması	29
3.6.2. Populasyon Katlanma (Population Doubling, PK) Sayıları ve Zamanı	29
3.6.3. Hücrelerin Proliferasyon Aktivitesi	30
3.6.4. Histolojik Boyamalar	30
3.6.4.1. Hematoksilen ve Eozin (H-E) Boyaması	30
3.6.4.2. Safranin O Boyaması	31
3.7. İmmunfluoresans Boyamalar	32
3.7.1. Hoescht (HXT) 33342 Nükleus Boyaması	32
3.7.2. Primer Antikorlar ile Yapılan Boyamalar	32
3.7.3. Kıkırdak Dokularının Elastin Antikoru ile Boyanması	33
3.8. Flow Sitometri (Akım Sitometresi) Analizleri	34
3.8.1. 7-Amino-Actinomycin D (7 AAD) Analizi	35
3.8.2. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit Analizi	36
3.8.3. Hücre Siklus Analizleri	37
3.9. Glikozaminoglikan (GAG) Analizi	38
3.10. İstatistiksel Analizler	38
4. BULGULAR	39
4.1. Primer Kültür	39

4.2. Dokuların Yapışma Oranları ve Konfluensi Zamanlarının Karşılaştırılması	40
4.3. Populasyon Katlanma (Population Doubling, PK) Sayıları ve Zamanı	42
4.4. Hücrelerin Proliferasyon Aktivitesi	43
4.5. Histolojik Boyamalar	45
4.5.1. Hematoksilen ve Eozin Boyaması	45
4.5.2. Safranin O Boyaması	51
4.6. İmmunfluoresans Boyamalar	51
4.6.1. Hoescht (HXT) 33342 Nükleus Boyaması	51
4.6.2. Primer Antikorlar ile Yapılan Boyamalar	56
4.6.3. Kıkırdak Dokularının Elastin Antikoru ile Boyanması	65
4.7. Flow Sitometri (Akım Sitometresi) Analizleri	66
4.7.1. 7 AAD Analizi	67
4.7.2. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit Analizi	78
4.7.3. Hücre Siklus Analizleri	81
4.8. Glikozaminoglikan (GAG) Analizi	92
5. TARTIŞMA	93
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	101
KAYNAKLAR DİZİNİ	103
EKLER	110
EK 1. PBS çözeltisi	111
EK 2. DMEM çözeltisi	111
EK 3. % 4 PFA çözeltisi	111
EK 4. Safranin O boyama çözeltileri	112
EK 5. Hoescht (HXT) 33342 Nükleus Boyası	112
EK 6. HBS çözeltisi	113
EK 7. Block çözeltisi	113
EK 8. Yıkama çözeltisi	113
EK 9. Kullanılan cihazlar	113
ÖZGEÇMİŞ	114

SİMGELER ve KISALTMALAR

- DMEM : Dulbescco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Dimetil Sülfoksit
FBS : Fetal Buzağı Serumu
HBS : Yüksek Tuz İçeren Tampon Çözeltilisi
H-E : Hematoksilen – Eozin Boyaması
HXT : Hoescht 33342 Boyası
IVF : In Vitro Fertilizasyon
NCAM : Nöral Hücre Adhezyon Molekülü
NT : Nükleer Transfer
PBS : Fosfat Tamponu
PFA : Paraformaldehit
T: Taze Ekim Grupları
V: Vitrikiye Ekim Grupları
MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay
PK : Populasyon Katlanması
PKZ: Populasyon Katlanma Zamanı
KZ : Konfluensi Zamanı
7AAD : 7-Amino-Actinomycin D

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hücre döngüsü (siklus)	18
Şekil 2.2. Hücre döngüsü ve DNA miktarı arasındaki ilişki	20
Şekil 2.3. Nekrozis ve apoptozis mekanizmalarının karşılaştırılması	24
Şekil 3.1. Dokuların dondurulmasında kullanılan payet ve yüklenme şekli	27
Şekil 3.2. Flow sitometri 7-AAD analiz sonucu örneği	35
Şekil 3.3. Flow sitometri FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit analiz sonucu örneği	36
Şekil 3.4. Hücre siklus fazlarının flow sitometri yöntemi ile belirlenmesi	37
Şekil 4.1. Primer kültürde üreme gösteren dokular	39
Şekil 4.2. Sığır ve koyunlara ait kas ve kıkırdak hücrelerinin proliferasyon aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan MTT test sonuçları	44
Şekil 4.3. Koyun kıkırdak dokularından elde edilen hücreler	46
Şekil 4.4. Koyun kas dokularından elde edilen hücreler	47
Şekil 4.5. Sığır kıkırdak dokularından elde edilen hücreler	48
Şekil 4.6. Sığır kas dokularından elde edilen hücreler	49
Şekil 4.7. Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularının H-E boyamaları	50
Şekil 4.8. Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularının Safranin O boyamaları	51
Şekil 4.9. Sığır kas dokularından elde edilen hücreler	52
Şekil 4.10. Sığır kıkırdak dokularından elde edilen hücreler	53
Şekil 4.11. Koyun kas dokularından elde edilen hücreler	54
Şekil 4.12. Koyun kıkırdak dokularından elde edilen hücreler	55
Şekil 4.13. Sığır kas hücrelerinde Aktin antikor boyama sonuçları	57
Şekil 4.14. Sığır kıkırdak hücrelerinde Aktin antikor boyama sonuçları	58
Şekil 4.15. Koyun kas hücrelerinde Aktin antikor boyama sonuçları	59
Şekil 4.16. Koyun kıkırdak hücrelerinde Aktin antikor boyama sonuçları	60
Şekil 4.17. Sığır kas hücrelerinde Vimentin antikor boyama sonuçları	61
Şekil 4.18. Sığır kıkırdak hücrelerinde Vimentin antikor boyama sonuçları	62
Şekil 4.19. Koyun kas hücrelerinde Vimentin antikor boyama sonuçları	63
Şekil 4.20. Koyun kıkırdak hücrelerinde Vimentin antikor boyama sonuçları	64
Şekil 4.21. Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularının Elastin boyamaları	65
Şekil 4.22. A) Negatif kontrol ve B) pozitif kontrol	67
Şekil 4.23. Koyun kas hücrelerinde 7 AAD boyama sonuçları	69
Şekil 4.24. Koyun kıkırdak hücrelerinde 7 AAD boyama sonuçları	71
Şekil 4.25. Sığır kas hücrelerinde 7 AAD boyama sonuçları	74
Şekil 4.26. Sığır kıkırdak hücrelerinde 7 AAD boyama sonuçları	76
Şekil 4.27. Annexin V ve PI boyama sonuçları değerlendirmede kullanılan alanların şematik gösterimi	78
Şekil 4.28. Annexin V ve PI boyama sonuçları	80
Şekil 4.29. Koyun kas hücrelerinde PI boyama sonuçları	83
Şekil 4.30. Koyun kas hücrelerinde PI boyama sonuçları	85
Şekil 4.31. Sığır kas hücrelerinde PI boyama sonuçları	88
Şekil 4.32. Sığır kıkırdak hücrelerinde PI boyama sonuçları	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deney gruplarının özet tablosu	26
Çizelge 4.1. Sığır kas ve kıkırdak dokularının taze ve vitrifiye gruplarının yapışma ve konfluensi zamanları	40
Çizelge 4.2. Koyun kas ve kıkırdak dokularının taze ve vitrifiye gruplarının yapışma ve konfluensi zamanları	41
Çizelge 4.3. Populasyon katlanma (PK)	42
Çizelge 4.4. Populasyon katlanma zamanları (PKZ)	43
Çizelge 4.5. Koyun kas hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması	70
Çizelge 4.6. Koyun kas hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması	70
Çizelge 4.7. Koyun kıkırdak hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması	72
Çizelge 4.8. Koyun kıkırdak hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması	72
Çizelge 4.9. Koyun kas ve kıkırdak hücrelerinin 7AAD sonuçlarının karşılaştırılması	72
Çizelge 4.10. Sığır kas hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması	75
Çizelge 4.11. Sığır kas hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması	75
Çizelge 4.12. Sığır kıkırdak hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması	77
Çizelge 4.13. Sığır kıkırdak hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması	77
Çizelge 4.14. Sığır kas ve kıkırdak hücrelerinin 7AAD sonuçlarının karşılaştırılması	77
Çizelge 4.15. Annexin V ve PI boyama sonuçları özet tablosu	80
Çizelge 4.16. Koyun kas hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması	84
Çizelge 4.17. Koyun kas hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması	84
Çizelge 4.18. Koyun kıkırdak hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması	86
Çizelge 4.19. Koyun kıkırdak hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması	86
Çizelge 4.20. Koyun kas ve kıkırdak hücrelerinin G0+G1 fazlarının karşılaştırılması	86
Çizelge 4.21. Sığır kas hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması	89
Çizelge 4.22. Sığır kas hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması	89

Çizelge 4.23. Sığır kıkırdak hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması	91
Çizelge 4.24. Sığır kıkırdak hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması	91
Çizelge 4.25. Sığır kas ve kıkırdak hücrelerinin G0+G1 fazlarının karşılaştırılması	91
Çizelge 4.26. Kıkırdak hücrelerinde taze ve vitrifiye gruplardaki GAG içerikleri	92

1.GİRİŞ

Biyolojik materyallerin uygun durumda korunmaları için biyolojik/medikal bilim, tarım ve biyoteknoloji alanlarındaki gelişmelere ve bilgi birikimlerine gereksinim vardır. Hayvan hücre hatlarının uzun süreli korunması, canlı organizmaların kriyoprezervasyonu (dondurarak koruma) bilim alanının yeni bir alt dalıdır. Ayrıca son zamanlarda doku kriyoprezervasyonunun tarımsal alanlarda uygulanması popüler bir konu haline gelmiş, ek olarak tehlike altındaki türlere ait doku ve hücrelerin kriyoprezervasyonu McLaren (2000) tarafından başarı ile uygulamaya aktarılmıştır. Biyomedikal alanında sadece hücrelerin dondurularak saklanması değil aynı zamanda dokularında dondurularak saklanması önemli bir uygulamadır (McLaren, 2000). Doku dondurma çalışmaları bu zamana kadar deney hayvanları ve az olarak da çiftlik hayvanları üzerinde yapılmıştır (Day and Stacey, 2007).

Yıllar boyunca, türlerin korunmasında in situ ve ekolojik koruma yöntemlerine ağırlık verilmiştir. Hâlbuki in situ koruma küçük popülasyonlar ve yaban hayvanları için etkili bir koruma yöntemi değildir (Gañán et al. 2010; Leon-Quinto et al. 2009). Genetik olarak değerli hayvanların embriyoları ve gametlerinin (oosit ve sperma) saklanması ve kriyoprezervasyonu biyolojik bankaların temelini oluşturmaktadır (Leon-Quinto et al. 2009; Nel-Themaat et al. 2007). Ancak gamet ve embriyoların kullanılması halinde sürekli olarak bankaya yenilerinin konulmasının gerekli olması ve özellikle elde edilebilen embriyo sayısının düşüklüğü kullanım alanını sınırlamaktadır (Nel-Themaat et al. 2007; Ryder, 2002). Donor hayvanların ölmüş olması ve/veya ulaşılamaz durumda olmaları halinde ise gamet ve embriyo alımı mümkün olmamakta ya da süreklilik sağlanamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, hücrelerin ve/veya dokuların kriyoprezervasyonu biyobankalar için kritik bir öneme sahiptir. Hücre veya doku biyobankalarının devamlılığının sağlanması embriyo ve/veya gamet biyobankalarına göre daha ucuz ve kolay olacaktır (Leon-Quinto et al. 2009).

Farklı türlerde yapılan başarılı klonlama çalışmalarından sonra, somatik hücre nükleer transferi (NT) tehlike altındaki türlerin korunması amacıyla alternatif bir yöntem olarak önerilmektedir (Andrabi and Maxwell, 2007; Ryder, 2002; Wildt and Wemmer, 1999). Tehlike altındaki sığır türünde yapılan klonlama çalışması bu duruma iyi bir

örnektir (Wells et al. 1998). Bu nedenle, koruma programları için biyobankalara sadece gametler ve/veya embriyoların alınmasının yanı sıra somatik hücreler gibi diğer biyolojik kaynaklarında bu programlara dahil edilmeleri önerilmektedir (Lean-Quinto et al. 2009). Türlerin geri kazanılması gerektiğinde, dondurulmuş örnekler toplanıp klon bireylerin üretimi için kullanılabilir (Smith et al. 2000). Nükleer transfer (NT) çalışmalarında kullanılacak olan somatik hücrelerin belirli bir hücre siklusunda olması tercih edilmektedir. Bu nedenle NT için, hücre siklusunun G0/G1 fazında doğal olarak kalmış olan hücreler (granüloza, kumulus hücreleri) veya farklı yöntemler ile (kontakt inhibisyon, serum açlığı veya inhibitörler) bu faza getirilmiş olan hücreler kullanılmaktadır (Arat ve ark. 2011; Gibbons et al. 2002). Bu sebepten dolayı dokuların dondurulmaları sonrasında elde edilen hücrelerin de hücre sikluslarının ayarlanması ve verimlilikleri önemli bir araştırma konusudur.

Doku ve hücre kriyoprezervasyonunda en önemli basamak klon canlıların üretilmesi için gerekli olan canlı hücrelerin elde edilmesidir. Yavaş dondurma yöntemi ile dondurulan hücrelerden klon canlıların üretildiği rapor edilmiştir (Arat ve ark. 2011; Gibbons et al. 2002). Yavaş dondurma yönteminde; sıcaklığı kontrollü düşürmek için özel dondurma ekipmanına ihtiyaç duyulmakta ve dondurma işlemi uzun zaman almaktadır. Bu nedenlerden dolayı; vitrifikasyon gibi cihaza ihtiyaç duymayan, kısa sürede dondurma işleminin gerçekleştiği ve maliyeti düşük alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Oosit, zigot ve embriyoların kriyoprezervasyonları için çoğunlukla vitrifikasyon yöntemi kullanılmasına rağmen hayvan dokularının kriyoprezervasyonları içinde vitrifikasyonun kullanıldığı doku dondurma çalışmaları da bulunmaktadır. Fakat bu çalışmalar çoğunlukla deri dokusu ile sınırlı kalmıştır (Silvestre et al. 2002; 2003; 2004; Vajta et al. 2009).

Dokuların kriyoprezervasyonu ve/veya saklanması sonrasında sağlıklı hücre popülasyonlarının elde edilmesinde doku örneklerinin toplanması da (ölüm sonrası zaman, çevresel sıcaklık v.b) oldukça önemli bir basamaktır. Dokusu saklanmak istenen hayvan dokusu alınmadan ölebilir. Bu gibi durumlarda canlının ölümünden sonraki hangi zaman zarfında örneklerin toplandığı kriyoprezervasyondan sonra canlı hücre elde edilebilirliği açısından önemlidir (Silvestre et al. 2003).

Ülkemiz biyolojik çeşitlilik açısından dünyada büyük bir öneme sahiptir. Bu çeşitlilik içerisinde yer alan yerli hayvan ırklarımızda oldukça önemlidir. Fakat çevresel değişimler nedeniyle yerli ırklarımızın sayıları azalmaktadır. Anadolu topraklarında yaşayarak uyum sağlamış, yapay seleksiyonlara maruz kalmadıkları için gen havuzları daralmamış, çevre koşullarına ve hastalıklara dirençli olan yerli ırklarımızın korunması bu gen havuzunun devamı açısından büyük öneme sahiptir. Yerli hayvan çeşitliğinin korunmasının önemi Interlaken Deklarasyonu ile belirlenmiş ve oluşturulan plan Türkiye’de dâhil olmak üzere 109 ülke tarafından kabul edilmiştir (FAO, 2007). Bu nedenle; Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile yerli evcil ırkların embriyo, sperma, hücre ve DNA’larının saklanması yönelik bir proje yapılmış ve tamamlanmıştır (Türkhaygen-1 Projesi, KAMAG 106G005). Bu projenin bir parçası olarak da, hücre bankasının alternatifi olabilecek doku dondurma çalışmaları yer almaktadır. Bu kapsamda yapılan çalışmalar tez çalışması olarak yapılmış ve dokulardan canlı hücre elde edebilmek için ölüm sonrası geçen süre belirlenmiş ayrıca gametlerin dondurulmasında yaygın olarak kullanılan vitrifikasyon tekniğinin dokuların dondurulmasında kullanılması ile elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Yapılan analizler ile dondurulup çözülen dokulardan elde edilen hücrelerin özellikleri incelenmiştir.

1.1. Amaç ve kapsam

Sunulan tez çalışmasında dokular üzerine uygulanan farklı saklama süreleri ve vitrifikasyonun primer kültür üzerine etkileri incelenmiştir. Vitrikiye edilen ve taze ekim yapılan dokulardan elde edilen hücrelerin canlılıkları incelenerek aynı zamanda bu hücrelerin G0/G1 fazına senkronize edilebilme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu bölümde sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerin yapılarıyla ilgili açıklamalara yer verilecektir. Deneyin ilk aşamasında sığır ve koyundan alınan kas ve kıkırdak dokuları 4°C'de 5, 48, 72, 96 ve 216 saat bekletilmiştir. Belirlenen sürelerde bekletilen dokular taze ve vitrikiye olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Taze gruplarda; dokular 4°C'de bekletildikten ve herhangi bir işleme tabi tutulmadan primer kültürleri yapılmış ve kontrol grubu olarak kullanılmışlardır. Vitrikiye gruplarda ise; dokular 4°C'de farklı sürelerde bekletildikten sonra Gereç ve Yöntem bölümünde ayrıntısı verilen vitrifikasyon tekniğine göre dondurulmuş ve çözülmüşlerdir. Çözme işleminin ardından dokuların primer kültürleri yapılmıştır.

Primer kültürler sonrasında dokuların yapışma özellikleri ve konfluensi zamanları karşılaştırılmıştır. Primer kültür sonrası elde edilen hücrelerin popülasyon katlanma zamanları ve sayıları, apoptozis ve hücre siklus (G0/G1) oranları belirlenmiştir. İmmunofloresans boyamalar ile hücreler karakterize edilmiş ve histolojik boyamalar ile de morfolojileri belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar ile farklı sürelerde bekletilen iki farklı doku tipinin vitrifikasyon yöntemi ile dondurulup çözülme sonrası ve taze ekimleri karşılaştırılarak dondurma-çözme işleminin dokular ve bu dokulardan elde edilen hücreler üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen hücrelerin normal ve serum açlığı uygulanmış kültür koşullarındaki apoptozis ve hücre siklus oranları incelenmiştir. Biyobankalar için alternatif bir yöntem olarak düşünülen doku dondurma işleminin işlevselliği araştırılmıştır.

1.2. Hipotezler

Biyobankalarda genelde saklanan materyaller gametler ve hücrelerdir. Hücrelerin saklanması için öncelikle dokulardan hücrelerin elde edilmesi gerekmektedir. Bu işlem için ise; yeni alınmış dokuların en fazla üç gün içerisinde mekanik ya da enzim yardımı ile parçalanarak ekimlerinin yapılması gerekmektedir. Bu saklanmak istenen canlının ölmesi ve/veya yaban hayatı için her zaman mümkün olamamaktadır. Bu nedenle dokuların alınmasını takiben hangi günlere kadar canlı hücre elde edilebileceği bu tez çalışmasının konularından birisidir.

Bir diğer çalışma konusu ise; gametlerin dondurulmasında başarı ile uygulanan vitrifikasyon yönteminin dokular için uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesidir. Literatürde deri dokusu ile yapılan çalışmalar ağırlıklıdır. Tez çalışması kapsamında kas ve kıkırdak dokularına da uygulanan vitrifikasyon yönteminin canlı hücre elde etmedeki başarısı karşılaştırılmıştır.

Dondurulup çözülen dokulardan elde edilen iki farklı tipteki hücrenin canlılıkları ve hücre siklus analizleri incelenmiştir.

Biyobankalarda saklanan gametler ve hücelere alternatif olarak düşünülen doku dondurma çalışmalarının etkinliğini ve başarısını göstermek tez çalışmasının ana hipotezidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BIYOBANKALAR VE ÖNEMLERİ

Biyolojik çeşitlilik; ekosistemlerin insanların refahı için gerekli olan yaşam destek sürecini sürdürebilme yeteneğinin ve sağlıklı bir çevrenin göstergesidir. Biyoçeşitliliğin tür çeşitliliğinden daha kapsamlı olmasının nedeni genleri de içerisine almasıdır. Genetik çeşitlilik; çevreye adaptasyon, hastalıklara dirençlilik gibi özelliklerden sorumludur. İzole olan populasyonlarda genetik çeşitlilik azalmakta bu nedenle de yok olmaya karşı daha dirençsiz hale gelmektedirler.

Sanayileşmenin ve nüfusun hızlı bir şekilde artması ve buna bağlı olarak besin ihtiyaçlarının artması, küresel ısınma, değişen çevre şartları, bilinçsiz tüketim ve ıslah çalışmaları nedeniyle bitki ve hayvan genetik kaynakları daha fazla zarar görmeye başlamıştır. Birçok bitki ve hayvan türü ya yok olmuş ya da yok olma tehlikesi ile karşı karşıya gelmiştir. Bu durum üzerinde bir yol haritasının oluşturulması gerekliliği üzerine çalışmalar başlamıştır. İlk olarak, 1992 yılında Birleşmiş Milletler tarafından “Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi” oluşturulmuş ve Birleşmiş Milletlere üye ülkeler için genetik kaynakların ve çeşitliliğin korunması önemli hale gelmiştir (FAO, 2005; Katkov, 2012). Bu sözleşmenin amaçları; biyolojik çeşitliliğin korunması, biyolojik çeşitliliği oluşturan unsurlardan sürdürülebilir kullanımın sağlanması, genetik kaynaklar ile teknoloji üzerinde sahip olunan bütün haklar dikkate alınarak bu kaynaklara gereğince ulaşımın ve transferinin sağlanması; uygun finansmanın tedariki de dahil olmak üzere bu kaynakların kullanımından doğan faydaların tüm dünya ülkeleri arasında eşit ve hakça paylaşılmasıdır (Dilbirliği, 2007).

Bu kapsamda; Birleşmiş Milletler altında Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agricultural Organization, FAO) Hayvan Genetik Kaynakları Grubu oluşturarak hayvan genetik kaynaklarının kullanımı ve düzenlenmesi ile ilgili stratejiler belirlemiştir (FAO, 2005). Genetik çeşitliliğin azalmasını ve/veya yok olmasını engellemek, ırkların sahip oldukları özel genleri araştırıp korumak ve gerektiğinde kullanmak, kaybedilen çeşitliliğin tekrar yapılandırılmasını sağlamak için ülkeler ya in vivo (canlı) ya da in

vitro (dondurarak) yöntemlerle genetik kaynaklarını koruma altına almaktadır (ERFP, 2003). Ülkelerin ulusal koordinatörleri; yerel genetik kaynaklarının korunmasından sorumludurlar. FAO'ya üye ülkeler arasında Türkiye'de yer almaktadır.

Ülkemiz biyoçeşitlilik ve genetik kaynaklar açısından en zengin ülkeler arasında yer almaktadır ve bu açıdan küresel bir öneme sahiptir. Ülkemizin biyoçeşitliliğinin korunmasında; Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın oluşturduğu bir komisyon tarafından çalışmalar yürütülmektedir. Irkların korunması iki yol ile olmaktadır: in-situ (yerinde koruma) ve ex-situ (yetiştirme sürüleri ile canlı koruma; in-vivo ve genetik materyalin dondurularak korunması; in-vitro) (Hall, 2004). İn-situ ve yetiştirme sürüleri ile koruma stratejileri türlerin korunmasında iyi birer yöntem olmasına karşılık ekonomik olarak oldukça masraflı koruma yöntemleridir. Tüm ırk ve türlerin bu yöntemlerle korunması da ayrıca mümkün değildir. Bu nedenle dondurarak koruma yöntemleri yani biyobankalar türlerin korunmasında oldukça önemli bir yere sahip olmuştur. 1950'li yıllarda kriyoprotektanların bulunması ile sperma dondurma çalışmaları yapılmış ve çözünme sonrasında gebelikler elde edilmiştir. Bunu takiben 1970'li yıllarda fare embriyolarının yavaş dondurma tekniği ile dondurulması ve çözünme sonrasında da başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Fare çalışmalarının ardından sığır, koyun ve daha birçok çiftlik hayvanında da embriyo dondurma yöntemi uygulanmıştır. Türlerin korunmasında da oluşturulacak biyobankalar için öncelikle embriyo ve spermaların saklanması başlanmıştır. Embriyo ve spermanın yok olan bir türün geri getirilmesinde yeterli olacağı düşünülmüştür (Gandini and Oldenbroek, 1999). Somatik hücrelerden yapılan klonlama çalışması sonrasında canlı klon olan Dolly'nin doğumu somatik hücrelerinde türlerin geri kazanılmasında oldukça önemli olduğunu göstermiş ve biyobankalarda korunması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Son 10 yıl içinde biyobankalar için dokularında dondurularak saklanabileceği ve bu dokulardan sağlıklı hücrelerin elde edilebileceği başarı ile gösterilmiştir.

Ülkemizdeki koruma çalışmaları 1995 yılından itibaren yürütülmektedir. İlk olarak in-situ ve yetiştirme sürüleri ile koruma çalışmalarına başlanmış ve 2007 yılında TÜBİTAK KAMAG 1007 kapsamında hazırlanan “TÜRKİYE YERLİ EVCİL HAYVAN GENETİK KAYNAKLARINDAN BAZILARININ İN VİTRO KORUNMASI VE ÖN MOLEKÜLER TANIMLANMASI-I (TÜRKHAYGEN-I)” ile de dondurarak saklama çalışmaları yapılmıştır. Bu proje kapsamında 13 koyun ırkı (Karayaka Koyunu, Herik Koyunu, Gökçeada Koyunu, Karagül Koyunu, Morkaraman Koyunu, Akkaraman Koyunu, Kıvırcık Koyunu, İvesi Koyunu, Dağlıç Koyunu, Çineçaparı Koyunu, Hemşin Koyunu, Norduz Koyunu, Sakız Koyunu), 6 sığır ırkı (Boz Sığırı, Yerli Kara Sığırı, Doğu Anadolu Kırmızısı Sığırı, Güney Anadolu Kırmızısı Sığırı, Zavot Sığırı, Yerli Güney Sarısı Sığırı), 5 keçi ırkı (Ankara Keçisi, Kilis Keçisi, Kıl Keçi, Norduz Keçisi), Anadolu mandası ve 5 At ırkına (Ayvacık Midillisi, Canik, Malakan, Hınısın Kolu Kısası, Çukurova) ait 1500 bireyin hücre, DNA, embriyo ve sperma bankaları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu biyobankalar ile ülkemiz dünyada genetik çeşitliliğini tam koruma altına alan 22 ülke arasına girmiştir. Ayrıca bu bankada muhafaza edilen hücrelerden 5 adet sağlıklı klon üretilmiştir (Arat ve ark. 2011). Bu klonların hepsi 3 yaşını doldurmuş ve iki tanesi birer sağlıklı buzağı doğurmuştur. Bu çalışma biyobankaların gelecekte kaybolacak türlerin geri getirilmesinde başarı ile kullanılabilceğinin en önemli kanıtıdır.

2.2. DONDURARAK KORUMA YÖNTEMİ (KRİYOPREZERVASYON)

Tüm canlıların belirli bir yaşam süreleri vardır. Bu yaşam süreleri içerisinde birçok değişikliğe maruz kalabilirler. Canlıların yaşamsal faaliyetlerinin sınırlandırılması birçok çalışma için önemli bir aşamadır. Yaşamsal faaliyetlerin durdurulması veya yavaşlatılması düşük sıcaklıklarda mümkün olabilmekte ve aynı zamanda etkili bir saklama koşulu oluşturmaktadır. Ökaryotik canlıların hücre ve dokularındaki su içeriğinin %80’den fazla olması nedeniyle 0°C’nin altındaki sıcaklıklarda buz kristalleri oluşur (Day and Stacey, 2007). Oluşan buz kristalleri çözündürme esnasında hücrelere zarar verir (Seki and Mazur, 2011). Düşük sıcaklıklarda koruma ve çözünme sonrası yüksek canlılık elde edebilmek için birçok çalışma yapılmıştır.

Başarılı bir kriyoprezervasyonda bilinmesi gereken üç ana etmen vardır: suyun davranışı, soğuma sonrası oluşabilecek hasar ve soğğun zararlı etkilerinden koruyucu kimyasal maddeler (kriyoprotektanlar) (Walker and Rapley, 2008). Bunlara ek olarak dondurulacak olan örneğin fiziksel özellikleri ve soğutma hızı da dondurma başarısını etkileyen diğer önemli faktörlerdir. Örnek olarak, hücre yapının olmadığı DNA, virüs gibi örnekleri korumak için -80°C dondurucular yeterli olurken doku gibi kompleks yapıların birden fazla hücre tipi içermesi, su içeriklerinin farklı olması ve kriyoprotektanları geçirme hızlarının farklılık göstermesi gibi nedenlerden dolayı kriyoprezervasyonları daha kompleks bir işlem gerektirir (Day and Stacey, 2007; Katkov, 2012).

Kriyoprezervasyonun iki amacı vardır. Birincisi örneklerde biyolojik durgunluğun sağlandığı düşük sıcaklığın tespit edilmesidir. Dış kriyojenik çevre uygulamasıyla örnekteki enerjinin azaltılması ve kimyasal-biyolojik aktivitelerin birlikte korunabileceği düşük enerjili katı halin elde edilebilmesidir. İkincisi ise hücre içerisinde buz kristallerinin oluşumunun engellenmesidir. Buz kristallerinin oluşumu hücre yapısına zarar vererek çözünme sonrası iyileşme ve canlılıkları üzerine olumsuz etkiye sahiptir. Protokoller uygulanırken örneklerin dondurma işlemi esnasında maruz kaldığı stresin miktarı ve çözünme sonrasındaki apoptozis durumları da mutlaka dikkate alınmalıdır (Katkov, 2012).

Dondurmanın zararlı etkilerinden koruma çalışmaları, 1949 yılında gliserolün keşfedilmesi ile birçok hayvan hücresinin başarı ile dondurulmasına ve çözündürme sonrasında yüksek canlılık oranı elde etmeye olanak sağlamıştır. Polge, Smith, ve Parkes (1949) kuş spermalarına %10-20 oranında gliserol katılması sonucunda -80 °C'de dondurduklarında canlılıklarını koruduklarını göstermişlerdir. Bu teoride gliserolün hücre içerisindeki çözünen madde miktarını arttırarak buz kristal oluşumunu azalttığı ve hücrelerin daha az hasar gördükleri öne sürülmektedir. Bu çalışmayı takiben yapılan çalışmalarda, sığır embriyolarının dondurulup çözülmesi ve sonrasında alıcı annelere transferleri sonucunda gebelikler elde edilmiştir. Bu öncül çalışmaların ardından kriyoprotektanlar, soğutma oranları, konsantrasyonları ve buz kristal oluşumları ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır (Akkoç, 2012; Day and Stacey, 2007; Katkov, 2012).

Kriyoprotektan maddeler hücre membranından geçme özelliklerine göre ikiye ayrılır. Hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahiptir ve bu grup içerisindeki kimyasallar, dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol (EG), 1.2 propanediol, 2.3 bütanediol, propilen glikol ve diğer bazı alkollerdir. Bu durumda hücrelerin içerisindeki osmotik basıncın korunabilmesi için kriyoprotektan maddeler hücre içerisindeki su ile yer değiştirirler. Hücre içi materyallerin konsantrasyonlarının azalması ile materyaller için etkili donma noktası oluşur, dış sıcaklık doğru olarak düzenlenir ve bu sayede buz kristallerinin oluşumu engellenmiş olur. -130°C 'nin altındaki sıcaklıklarda kalan sıvı faz çok az enerjiye sahiptir ki uzun vadede moleküler matriksleri ve kısa vade de yarı katı yapıların düzenlenmesini sağlar. Bu gruptaki kriyoprotektanlar suda yüksek oranda çözünebilirlik özelliğine sahiptirler. Su ve su içerisinde çözünen maddelerin geçirgenliklerinde, sıcaklıkta önemli bir etken oluşturur. Hücre içine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlar ise düşük molekül ağırlıklı (glikoz, süktroz, trehaloz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı şekerler) ve yüksek molekül ağırlıklı (polivinil alkol; PVA, polivinil pirrolidon; PVP ve diğer bazı polimerler) moleküller olarak kendi içlerinde ikiye ayrılır. Düşük molekül ağırlıklı olanlar, donma sırasında buz kristal oluşumunu azaltmak için soğutmadan önce hücreleri dehidre ederler. Düşük molekül ağırlıklı olanların kullanımında programlanabilir kontrollü soğutma cihazları ile soğutma hızının ayarlanmasına gereksinim duyarlar. Yüksek konsantrasyonlardaki kriyoprotektanların daha az buz kristali oluşturduğu düşünülmektedir. Yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan uygulaması ve çok hızlı soğutma ile buz kristalleri oluşmadan dondurmak mümkün olabilmektedir (Akkoç, 2012; Gordon, 2003; Katkov, 2012; Palasz and Mapletoft, 1996; Sağırkaya ve Bağış, 2003)

2.2.1. Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Kriyoprezervasyon farklı yöntemler ile yapılabilmektedir. Bunlar geleneksel yavaş dondurma, hızlı dondurma ve camsı yapı yöntemi (vitrifikasyon) ile dondurmadır.

2.2.1.1. Yavaş Dondurma

Yavaş dondurma sisteminde buz kristalleri dış ortamda ilk olarak oluşur. Böylece hücre içerisindeki suyun kimyasal potansiyeli medyum içerisindeki suyun kimyasal potansiyeline göre düşmesine neden olur ki bu farklılık osmotik basıncında etkisi ile suyun hücreden ayrılarak dış ortamda donmasını sağlar (Seki and Mazur, 2009). Yavaş dondurma yöntemi ile eritrosit, birçok lökosit, yetişkin ve embriyonik kök hücreler, umbilikal kord, birçok somatik hücre hattı ve en önemlisi de implantasyon öncesi embriyolar gibi birçok hücre başarı ile dondurulmuştur (Seki and Mazur, 2009). Yine de bu yöntemle de başarı elde edilemeyen (insan oositleri gibi) durumlarda söz konusudur. Yavaş dondurma işleminde komplike cihazların kullanılması gerekmektedir. Hücre zarından geçebilen kriyoprotektanlar düşük molaritelerde (1-2 M) kullanılır. Cihazların soğutma hız ve oranlarının 0,2-2°C/dakika olacak şekilde ayarlanarak -30°C ile -70°C arasındaki sıcaklıklara kadar kademeli ve yavaş bir şekilde soğutmanın gerçekleşmesi sağlanır. İstenen sıcaklığa ulaşıldıktan sonra örnekler sıvı azot içerisine aktarılır. Çözündürme işlemi içinde 25°C su banyosunda hızlı bir çözündürme işlemi yapılır ki çözündürme oranı 250°C/dakikadır. (Akoç, 2012; Palasz and Mapletoft, 1996; Sağırkaya ve Bağış, 2003). Cihaza gereksinim duymasından dolayı diğer yöntemlere göre daha pahalı bir protokoldür ve ayrıca dondurma işlemi uzun bir zaman sürecinde gerçekleşir.

2.2.1.2. Hızlı Dondurma

Hızlı dondurma yönteminde; hücre içerisinden geçebilen (2-4,5 M) ve geçemeyen kriyoprotektanlar (0,25-0,5M) birlikte kullanılır. Bu kombinasyonun kullanılması ile hücrelerin -170°C veya -196°C'ye hücre içi buz kristalleri oluşmadan soğutulmasına olanak sağlanmış olur. Dondurma hızı yaklaşık olarak 1200-1250°C arasındadır. Hızlı

dondurma yöntemi; farklı aşamalardaki embriyoların ve oositlerin dondurulmasında kullanılmıştır. Bu işlemin yavaş dondurmadan farkı; cihaza gereksinim duyulmaması ve kısa zaman içerisinde dondurma işleminin tamamlanmasıdır. Payetler içerisinde alınan örnekler osmotik olarak dengelendikten (ekilibirasyondan) sonra sıvı azot buharında kısa bir süre tutulur ve hemen ardından sıvı azot içerisinde aktarılır (Cseh et al. 1997; Park et al. 2000; Rayos et al. 1994). Vitrifikasyondan farklı olarak; hücre dışı ortamdaki su donar ve dondurma solüsyonunun ozmolaritesinde artış meydana gelebilir. Böylece hücre içerisinde bulunan donabilecek olan su miktarında azalma meydana gelir. Yinede hücre içerisinde buz kristalleri oluşma olasılığı söz konusudur ve uygun bir çözündürme işlemi gerçekleşmez ise hücre içerisindeki buz kristalleri hücrelere zarar verebilir. Çözündürme işlemi 37°C su banyosunda 20 saniye tutularak gerçekleştirilir (Palasz and Mapletoft, 1996).

2.2.1.3. Camsı Yapı Yöntemi (Vitrifikasyon)

Camsı yapı yöntemi ile dondurma; vitrifikasyon; hücrelerin, dokuların ve organların düşük sıcaklıklarda hücre içinin tamamıyla vitröz ya da camsı hale gelmesi yolu ile dondurulması işlemi için kullanılan bir terimdir (Palasz and Mapletoft, 1996; Pegg, 2005; Sağırkaya ve Bağış, 2003). Vitrifikasyon yöntemi embriyoların dondurulmasında kullanılan yavaş dondurma tekniğine alternatif olarak geliştirilmiştir. Basit, hızlı ve düşük maliyetli olması nedeniyle de tercih edilen bir yöntem olmuştur (Gordon, 2003).

Vitrifikasyonun amacı yüksek konsantrasyon içerisindeki hücrelerin ve çevrelerindeki medyumun içerisindeki suyun buz kristalleri oluşturmadan donmasının sağlanmasıdır. Bu da yüksek soğutma oranına ihtiyaç duyar ki -100°C'nin altındaki sıcaklıklarda soğutma gerçekleştirilir. Böylece suyun buz kristalleri oluşturmadan sıvı halden camsı hale gelmesi sağlanır. Bu sistem aynı zamanda yüksek çözündürme sıcaklığına da ihtiyaç duyar ki camsı yapının buz kristali haline dönmeden erimesi sağlanmış olur (Seki and Mazur, 2008; Seki and Mazur, 2009; Vajda et al. 1998). Birçok vitrifikasyon yönteminde French tip mini-payetler kullanılmaktadır ki bunların sıvı azot içerisinde direkt olarak daldırılması ile sağlanan maksimum soğutma ve çözündürme oranı 2000-2500°C/dakikadır (Gordon, 2003; Palasz and Mapletoft, 1996;

Sağırkaya ve Bağış, 2003; Vajda et al. 1998). Vitrifikasyon yönteminde yüksek konsantrasyonda kriyoprotektanların kullanımı gerekmektedir (Mazur, 1974). Kriyoprotektanların yaklaşık 5-7 molar gibi yüksek konsantrasyonlarda kullanılması ile vitrifikasyonun sağlanabileceği gösterilmiştir. Bu oran geleneksel yavaş dondurmadaki konsantrasyonların (genellikle 1-2 molar) yaklaşık 2-3 katıdır (Akkoç, 2012; Sağırkaya ve Bağış, 2003). Vitrifikasyonda kriyoprotektanların dondurma işleminde buz oluşumunu baskılamaları en önemli unsurdur ve sıcaklık düştükçe, solüsyon tümüyle viskoz bir hal alarak sonunda camsı bir faza geçmektedir. Farklı kriyoprotektanların suyla hazırlanan solüsyonlarının camsı faz oluşturabilme özelliklerinin değişken olduğu gösterilmiştir. Bunun da nedeninin, her bir kriyoprotektanın vitrifikasyonun gelişmesine yardımcı olmada ya da donmaya olan eğilimi azaltmada, su molekülleri ile olan etkileşimlerindeki farklılık olduğu bildirilmiştir (Palasz and Mapletoft, 1996; Sağırkaya ve Bağış, 2003). Yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektanların kullanılması hücreler üzerinde toksik etkilere sebep olabilmektedir.

Vitrifikasyon yönteminde kullanılan yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektanların zararlı etkilerinin önlenmesi amacıyla toksisiteyi azaltan sükroz, trehaloz ve formamid gibi şeker veya polisakkaritlerin kullanılması gerekmektedir. Ayrıca ekilibirasyonda zamanının kısaltılması ve iki aşamalı olarak yapılması da toksik etkiyi azaltmaya yönelik önlemlerdir. Polietilen glikol, 2.3 bütanediol, DMSO gibi kriyoprotektanlar hücre içerisine hızlı bir şekilde geçebildikleri için vitrifikasyon yöntemi için uygun maddelerdir (Dinnyés et al. 2003; Palasz and Mapletoft, 1996; Pegg, 2005; Sağırkaya ve Bağış, 2003, Wusteman et al. 2004). Vitrifikasyon yöntemi de kendi içerisinde birkaç alt yonteme ayrılmaktadır. Örneğin; yüksek dondurma oranına (20.000°C/dakika) sahip açık çekilmiş payet (open pulled straw, OPS) (Vajda et al. 1998), naylon halka (nylon loop) yöntemi (Sağırkaya ve Bağış, 2003, Seki and Mazur 2009) ve katı yüzey vitrifikasyonudur (solid surface vitrification, SSV) (Dinnyés et al. 2000). Tüm bu yöntemler; çoğunlukla embriyo ve oositlerin dondurulmasında tercih edilmektedir. Bu alt yöntemlerin amacı; az miktarda (1-3 µl) kriyoprotektan içerisinde, oldukça yüksek soğutma oranına sahip ve çözündürme sonrasında yüksek canlılık oranı olan bir yöntem geliştirmektir. Diğer dondurma yöntemlerinde olduğu gibi vitrifikasyon yönteminde de çözündürme işlemi oldukça önemlidir. Çözündürme işleminde su banyosu içerisinde hızlı çözündürme işlemi tercih edilmektedir.

2.3. DOKU ve HÜCRELERİN KRİYOPREZERVASYONU

2.3.1. Dokuların Dondurulması

Hayvan türleri için kriyoprezervasyon yöntemlerinin çoğunluğunda uzun süreli saklama çalışmaları için üreme hücreleri ve dokuları tercih edilmiştir. Hayvanların yeterli olgunlukta olmaması ve/veya yaban hayvanları için yeterli sayıda germ hücrelerinin toplanması her zaman mümkün olamamaktadır. Özellikle yaban hayatı için bu durum daha da zordur. Bu koşullar altında somatik materyallerin (doku ve hücre) toplanması ve dondurularak saklanması önemli hale gelmektedir (Benkeddache et al. 2012).

1903 yılından itibaren farklı hayvan türleri için dokuların saklanması ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. 1957 yılında kriyoprotektan içerisindeki memeli dokularının -20°C 'de dondurulabileceği Audrey Smith tarafından gösterilmiştir. Bunu takiben Smith ve Lovelock, guine pig uterine boynuzlarını %20 gliserol içerisinde -79°C 'de dondurmuşlar ve çözündürdükten sonra kasılmaların olduğunu göstermişlerdir. Doku dondurma çalışmaları 1960 ve 1970'lerde hız kazanmış ve 1980'lerde de devam etmiştir (Fahy et al. 2004). İnsan dokuları ile yapılan çalışmalar sonucunda deri dokusunun saklanması en ideal koşulun; besiyeri içerisinde 1 hafta boyunca 4°C olduğu gösterilmiştir (Benkeddache et al. 2012; May and Wainwright 1985). Fakat bunu hayvan türleri için uygulamak zordur. Uzun süreli saklama koşulu olarak deri dokusunun temel besiyeri ve/veya kriyoprotektanlar ile sıvı azot içerisinde saklanma metodu geliştirilmiştir (Villalba et al. 1996). Embriyo dondurmada geliştirilen ve kullanılan yöntemler hayvan deri dokularının dondurulmasında alternatif yöntemler olarak kullanılmaya başlanmıştır. Payetler içerisine alınan küçük doku parçalarının vitrifikasyonu ile sıvı azot içerisinde saklanabileceği tavşan deri dokusunda başarı ile gösterilmiştir (Silvestre et al. 2002). Bu başarılı deneme deri dokularının biyobankalar için materyal olabileceğini göstermiştir. Dondurma sonrası canlılığı etkileyen faktörlerden olan alınan dokunun ölüm sonrası (postmortem) saklanma koşulu ve zamanı da araştırılmıştır (Benkeddache et al. 2012; Silvestre et al. 2004).

Vitrifikasyon yöntemi dokuların dondurulmasında oldukça etkili olan bir yöntemdir. Bu yöntem ile karaciğer, böbrek, ovaryum, damar, deri, kas ve kıkırdak dokuları başarılı bir şekilde dondurulmuştur. Organların bir bütün olarak dondurulmasında da en etkili yöntemin vitrifikasyon olduğu düşünülmektedir (Fahy et al. 2004). Organların bütün olarak dondurulması doku transplantasyonları için oldukça önemlidir. Böylelikle acil doku nakli gereken durumlar için kaynak oluşturabilirler.

2.3.2. Hücre/Doku Kültürü ve Dondurularak Saklanması

Hücre/doku kültür çalışmalarına 1900'li yıllarda başlanmış ve 1950'li yıllarda ise farklı alanlarda yapılan çalışmalar ile hız kazanmıştır. Hücre kültürünün başarısını etkileyen faktörler; hücre ve/veya dokunun kaynağı, besiyeri, serum, petri kapları gibi birçok faktördür. Tüm bu faktörler ile ilgili çalışmalar yapılarak standart yöntemler oluşturulmuştur. İlk yapılan çalışmalarda parçalanmış doku kısımlarının ekilmesi ve bu kısımlardan mitoz ile hücrelerin petri yüzeylerine yayılmaları şeklinde gerçekleşmiştir. Bu yöntem ile hücrelerin elde edilmesi işlemine genel terim olarak doku kültürü denmektedir. Hücrelerin pasajlanmalarında tripsinin keşfine kadar mekanik yöntemler kullanılmıştır. 1950'lerde tripsinin bulunmasıyla hücrelerin pasajlanmasında en yaygın kullanılan enzim olmuştur (Freshney, 2005). Günümüzde de en yaygın ve etkili yöntem olarak devam etmektedir. Çalışmaların ilerlemesi ile farklı primer kültür metotları ve besiyerleri geliştirilmiştir. Bu yıllardan itibaren insan ve hayvan dokularından primer kültürler yapılarak hücrelerin elde edilmesi ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir.

Hücre kültür çalışmaları; intrasellüler aktiviteler ve değişimler, çevresel etkenler, hücre-hücre etkileşimleri, normal ve patolojik durumdaki genetik veriler, immortalizasyon, transformasyon, genetik manipülasyonlar, hücre ürünleri ve sekresyonları, biyoteknolojik çalışmalar gibi birçok araştırmanın yapılmasına olanak sağlayarak in vivo şartlarda meydana gelen olayların aydınlatılmasını sağlamıştır.

Yaşanan hızlı gelişmeler sayesinde sağlık, toksisite, monoklonal antikor ve aşı çalışmaları gibi hem insan hem de hayvan sağlığını etkileyen birçok çalışmada ana materyal olarak hücreler kullanılmaya başlanmıştır. Hayvan hücre hatları; insan ve

hayvan hastalıklarının tanı ve tedavisinde kullanılan in vitro metotların oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır. Hücreler üzerinde füzyon ve genetik manipulasyonlar yapılabilmesi sayesinde genetik analizler için somatik hücreler ana materyal olmuştur. Toksikite çalışmalarında da oldukça önemli bir yere sahiptir. İn vivo yapılan hayvan testlerinin yerine hücre kültür yöntemlerinin kullanılması ile deneylerde kullanılan hayvan sayıları azaltılmıştır. Embriyonik ve/veya mezenkimal kök hücrelerin izolasyonları ve kültürlerinin gelişmesi ile farklı hücre tiplerine farklılaştırma çalışmaları ve farklılaşan hücrelerin transplantasyonları gündeme gelmiş ve çalışmalar hızla devam etmektedir. Kök hücrelerin üç boyutlu malzemeler üzerinde kültürlerinin geliştirilmesi ile doku mühendisliği alanı ön plana çıkmıştır. Üç boyutlu malzemeler üzerinde doku ve/veya organların yapılabilmesi ve transplantasyonları günümüzün en popüler konuları arasında yer almaktadır. (Freshney, 2005; Ragoonanan et al. 2010; Stacey, 2004)

Hücrelerin kullanıldığı biyoteknoloji çalışmalarından biri de Somatik Hücre Nükleer Transferi (NT)'dir. NT çalışmalarının ana etmenlerinden biri olan somatik hücrelerin; doku parçalarından ekim sonrasında kolaylıkla elde edilebilmeleri, uzun zaman boyunca dondurularak saklanabilmeleri ve çözüldükten sonra kullanımları sayesinde birçok evcil ve/veya yaban hayvanlarının klonlanması başarı ile gerçekleşmiştir. NT çalışmaları için kullanılacak olan hücreler geniş bir çeşitlilik göstermektedir. Embriyonik kök hücreler, fibroblast hücreleri, kıkırdak hücreleri, meme bezi hücreleri, kumulus hücreleri, oviduktal hücreler, lökositler, granüloza hücreleri, germ hücreleri, kas hücreleri ve karaciğer hücreleri klon hayvan elde edilmesi için donör hücre olarak kullanılmıştır (Arat ve ark. 2011; Brem and Kuhholzer, 2002). Kullanılan donör hücreler taze dokulardan elde edilerek kullanılmıştır. Taze dokulardan elde edilmenin yanı sıra ısı ve/veya dondurularak liyofilize edilmiş hücrelerin donör hücre olarak kullanılacakları de gösterilmiştir. Isı ile liyofilize edilen hücrelerin kullanılması sonucunda blastosistler elde edilmiş ve alıcı annelere transfer sonrasında da klon yavrular elde edilmiştir (Loi et al. 2002). Dondurularak liyofilize edilen hücrelerden NT embriyolar elde edilmiş fakat alıcı annelere transfer edilmemiştir (Loi et al. 2008). Ölüm sonrasında alınan ve soğukta (0°C'de 24-72 saat) saklanan kas ve kıkırdak dokulardan elde edilen hücrelerinin kullanılması ile de NT blastosistler elde edilmiştir (Arat et al. 2005; 2004).

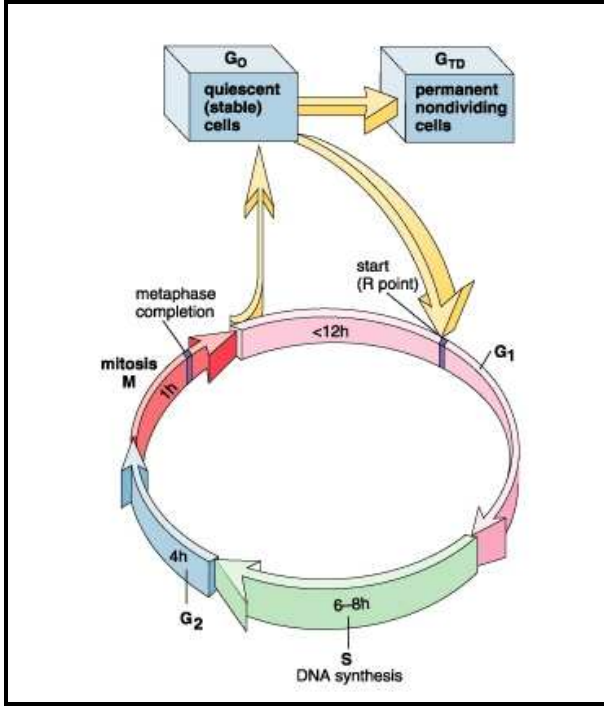
Hücre kültür çalışmalarının gelişmesi ve laboratuarlarda farklı hücre hatlarının oluşturulması sonucunda geliştirilen her bir hat değerli bir kaynak olmuştur. Bu aşamadan itibaren oluşturulan hatların korunması gündeme gelmiştir. Hücrelerin kriyoprezervasyonları için çalışmalar başlamıştır. DMSO ve gliserol gibi kriyoprotektanların bulunması ile hücre hatlarının dondurulması yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Hücrelerin kriyoprezervasyonunda dondurma yöntemi olarak en çok kullanılan yöntem; kriyoprotektan olarak DMSO uygulanması ve -80°C derin dondurucuda $-1^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ soğutma hızı ile dondurulmasıdır. Gece boyu -80°C 'de bekletmenin ardından sıvı azot tanklarının içerisine nakledilerek hücrelerin uzun süreli saklanması gerçekleştirilmiş olur (Stacey, 2004). DMSO'un tercih edilme nedeni ise gliserole göre hücre içerisine penetrasyonunun daha iyi olması nedeniyle çözündürme sonrasında da yüksek canlılık oranı sağlamasıdır. Hücrelerin dondurulması işlemi sırasında kullanılan DMSO konsantrasyonu genel olarak %5-15 arasında olmasına rağmen en yaygın kullanılan konsantrasyonlar %7,5-10'dur. Dondurma solüsyonunda DMSO serum ile birlikte kullanılmaktadır (Freshney, 2005).

Memeli hücre hatlarının kriyoprezervasyona olumlu yanıt vermeleri nedeniyle biyobankalar için önemli bir kaynak olmuşlardır.

2.4. HÜCRE DÖNGÜSÜ (SİKLUSU)

İki yavru hücre ortaya çıkarmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık "hücre döngüsü" olarak adlandırılmaktadır. Hücre döngüsü iki aşamaya ayrılır: İnterfaz ve Mitoz (M fazı). İnterfaz ise kendi içerisinde üç alt gruba ayrılır: gap 1 (G1), sentez (S) ve gap 2 (G2)'dir (Demir, 2006; Freshney, 2005; Ross, 2003) (Şekil 2.1). Hücre döngüsünde yer alan kontrol noktaları (checkpoints) ve karmaşık kontrol mekanizmaları ile her şeyin kendi sırası dâhilinde ve normal şartlar şekillendiği zaman ilerlemesi sağlanmış olur. Bu mekanizmalar hücrenin bölünmesini kontrol ederek hücrelerin canlılıklarında oldukça önemli rol oynamaktadırlar. Hücre bölünmesinin devam etmesi için gerekli olan uygun şartların bozulduğu durumlarda (uygun besin maddelerinin eksikliği ya da yokluğu, yaralanma, doku hasarı gibi), en azından bazı hücreler hücre bölünmesinden sonra (örneğin; hücre G1 fazında iken) G0 fazı olarak adlandırılan sakin faza ya da dinlenme fazına girerek normal hücre siklusundan ayrılma yeteneğine sahiptir. Bu durumda iken,

hücrenin metabolizması ve biyokimyası hücrenin yaşamını devam ettirmesi için gerekli olan minimum düzeye düşürülür. Reserve kök hücreler olarak adlandırılan hücrelerin G₀ fazında kaldıkları düşünülmektedir (Freshney, 2005; Oswald et al. 2005; Ross, 2003).



Şekil 2.1. Hücre döngüsü (sıklusu) (Ross, 2003)

Hücre döngüsünün interfaz safhasındaki en önemli olay S fazında gerçekleşir ki bu safhada nükleustaki DNA iki katına çıkar ve yaklaşık olarak 8 saat sürer. S fazı G₁ (yaklaşık 12 saat) fazını takiben oluşur. G₂ fazı S fazından sonra gelir ve yaklaşık olarak 4 saat sürer. Bu fazda kromozom yapısı diploiddir ve DNA'nın iki katına çıktığından emin olunur. Bu fazı takiben yaklaşık 1 saat süren mitoz (M) fazı gelir. Bu fazda kromozomların görünür hale geldiği profaz ve mitotik iğciğin olduğu metafaz evreleri gerçekleşir. Hücre bölünmesine hazırlık aşamasında hücre kütlelerinin iki katına çıkarılması için hücrenin büyümesi gereklidir. G₁ ve G₂ fazları ile mitoz öncesi ve sonrasında hücreye büyüme zamanı sağlanmış olur. Bu fazların dışında kalan G₀ denen dinlenme fazı vardır ki hücreler bölünme döngüsüne girmeden günlerce, aylarca hatta yıllarda bu fazda kalabilirler (Bulgurcuoğlu ve ark. 2003; Demir, 2006; Ross, 2003)

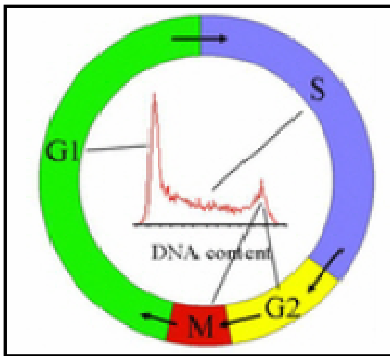
Hücre siklus fazları; siklinler (cyclin D,E ve A), siklin-bağımlı kinazlar (cyclin-dependent kinases, CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (cyclin-dependent kinase

inhibitors, CDKI) gibi düzenleyici proteinlerin aktivasyonları ve/veya ekspresyonları ile düzenlenir (Oswald et al. 2005; Ross, 2003; Zhou et al. 2010). Hücre siklusunda G1'den S fazına geçiş önemlidir. İki adet büyük protein kompleksinin oluşması ve bunların kinaz aktiviteleri ile düzenlenmesi gerekmektedir. Cyclin D-CDK4/6 erken G1 fazında, cyclin E-CDK2 ise S fazına geçişte gereklidir. G1 fazı siklin grupları tarafından desteklenir (G1 fazının ortasında cyclin D, sonlarında ise cyclin E). Bu siklinler, holoenzimleri oluşturmak için, spesifik katalitik alt üniteler (CDK) ile heterodimer yapı oluşturabilirler. Holoenzimlerin temel fonksiyonu retinoblastoma proteinlerini fosforlamaktır ki böylece transkripsiyon faktörlerinin E2F (transkripsiyonal faktör) ailesinin salınmasına önderlik ederler. E2F salınması, S fazının ilerlemesini düzenleyen çeşitli genlerin ekspresyonu olmasını sağlar. Retinoblastoma proteinleri de G0 fazından G1 fazına geçişin düzenlenmesinde anahtar rol oynar ve aktivitesi Cyclin D1-CDK4 kompleksi ile düzenlenir. Diğer taraftan siklin/CDK holoenzimlerinin kinaz aktiviteleri CDKI tarafından negatif olarak düzenlenir (Hashimoto et al. 2004; Zhou et al. 2010).

NT çalışmalarındaki en önemli faktör dediferansiyasyonun tamamlanması ve farklılaşmış somatik donör hücrelerin yeniden programlanabilmesidir. Bir diğer kritik faktör ise donör hücrelerin hücre siklus fazıdır (Oh et al. 2009). NT çalışmalarında donör hücrelerin G0/G1 fazında olması tercih edilir. Doğal olarak bu fazlarda bulunan kumulus ve granüloza hücreleri NT için önemli bir kaynaktır. Kumulus ve granüloza hücrelerinin oositin çevresinden elde edilmesi nedeniyle sadece dişi bireylerin klonlanmasına olanak sağlar. Bir ırk veya türü kurtarmak için hem dişi hemde erkek bireye ihtiyaç vardır. Doğal olarak bu fazlarda olmayan hücrelerin ise çeşitli faktörler ile G0/G1 fazına girmeleri sağlanabilir. Hücre siklusunun düzenlenmesinde sık kullanılan yöntemler; kontakt inhibisyon, serum açlığı veya roscovitin gibi siklus inhibitörlerinin kullanılmasıdır. Kontakt inhibisyonunda; kültür petrisindeki hücrelerin konfluent olmaları ve birbirlerine değmeleri nedeniyle mitozun gerçekleşmemesi ile hücre siklusu düzenlenir. Serum açlığında; hücrelerin %80-100 konfluent olmalarını takiben besiyeri içerisindeki serum miktarının azaltılması ile hücre siklusu düzenlenir. En çok kullanılan serum miktarı ise %5 ve %0,5'dir. Spesifik CDK2 inhibitörü olan roscovitin besiyerine uygulanması ile de hücre siklusu düzenlenir. Roscovitin ortamdan kaldırılması ile hücreler S fazına girerek mitozlarını tamamlarlar (Gibbons et al. 2002; Oh et al. 2009).

NT çalışmalarının başarılı sonuçlanması sağlıklı blastosistlerin elde edilmesi ve böylelikle canlı yavruların doğumları ile ölçüendirilmektedir. Bunun için enükle edilmiş oosit içerisine transfer edilen donör hücrenin oosit sitoplazması ile birleşmesi ve istenen diploid hücre çekirdeğini oluştururarak geriye doğru programlanması gerekmektedir. Donör hücrelerin buldukları hücre siklus fazı NT başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Boquest et al. 1999). NT çalışmalarında geri programlanmanın tam olarak meydana gelmesi için G0 fazındaki hücrelerin gerektiği düşünülse de G1 fazındaki hücrelerinde geri programlamada başarılı olduğu ve klon yavruları oluşturduğu gösterilmiştir (Cho et al. 2005; Cibelli et al. 1998). Donör hücreleri G0/G1 fazına getirebilmek için farklı yöntemler denenmiştir. Hücre tiplerinin G0/G1 fazına gelme oranları ile de birçok çalışma yapılmıştır. Halen günümüzde donör hücreler G0/G1 fazına getirilerek kullanılmaktadır (Hayes et al.2005).

Somatik hücrelerin çeşitli uyarılar ile G0/G1 fazına getirilmelerini ve G0/G1 fazındaki hücrelerin yüzde değerleride önemlidir. Her siklus fazında bulunan DNA miktarının farklı olması bunların ölçümünün yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Hücre içerisindeki DNA'nın propodium iodide ile boyanmasının ardından flow sitometrik yöntem ile hücre siklus fazları kolaylıkla ölçülebilmektedir (Schippers et al. 2011) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hücre döngüsü ve DNA miktarı arasındaki ilişki. (http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book/Chapter_6%3A_DNA_Analysis)

2.5. PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMLERİ (APOPTOZİS)

Çok hücreli organizmalarda hücre çoğalmalarının ve hücre ölümlerinin dengede olması gerekmektedir. Her iki durumda meydana gelebilecek olan bozukluklar çeşitli hastalıklara ve/veya yapı bozukluklarına sebep olabilmektedir.

Hücre ölümleri yaralanmalar veya hücrelerin programlı ölümleri sonucunda meydana gelir. İki farklı mekanizma vardır: Nekrozis ve apoptozis.

Nekrozis (Yaralanma sonucu hücre ölümü):

Patolojik bir durumdur ve hücreler istenmeyen fiziksel veya kimyasal etmenlerle (hipotermi, hipoksi, radyasyon, düşük ph, travma gibi) karşılaştığında ortaya çıkar. Akut hücresel yaralanma ve plazma membranının hasarı ile sonuçlanır. Hücrelerin şişmesi ve lizis ile karakterize bir durumdur. Nekroz mekanizmasında; hücre membranında hasar meydana geldiğinde hücre içerisine su ve hücre dışı iyonlar girer. Bu durum hücre içi organellerde geri dönüşümsüz hasara yol açar ve hücre membranı yırtılarak lizise neden olur. Sitoplazmik içerik ve enzimler hücre dışı alana geçer. Bu nedenle nekrotik hücre ölümlerinde çevre dokuda büyük zarar ve yoğun inflamasyon alanları görülür (Şekil 2.3) (Ross, 2003).

Apoptozis (Programlı Hücre Ölümleri):

Fizyolojik bir durumdur. Embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun yaşamının sürdürülmesinde önemli rol oynar. Organizmanın daha fazla ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücreler apoptozis ile kontrol edilerek ortadan kaldırılır (Akşit ve Bildik, 2008; Ross, 2003). Özellikle embriyogenezde olması gereken apoptozis mekanizmalarının oluşmaması çeşitli yapısal bozukluklara neden olabilir. Apoptozis iç ve dış sinyaller ile uyarılır. Hücre apoptozise giderken morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gösterir (Kandaş, 2004; Ross, 2003). Nükleusta geri dönüşümsüz DNA fragmentasyonlarına (parçalanma) neden olur. DNA fragmentasyonu, nükleer endonükleazisin Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağımlı aktivasyonu sonucu oluşur. Bu enzimler DNA'yı parçalayarak küçük oligonükleozomal parçalara ayırır. Nükleer kromatin agregatlara ayrılır ve nükleus, nükleus zarına bağlı birkaç parçaya bölünebilir. Hücre içeriğinin azalması sonucu sitoplazmada büzülme meydana gelir.

Sitoiskelet elemanları hücre yüzeyine paralel olacak şekilde yeniden düzenlenirler. Ribozomlar sitoplazma içerisinde kümeleşirler. Endositotik veziküller plazma membranı ile birleşirler. Mitokondriyal membran kanallarının geçirgenliklerinin değişmesi nedeniyle mitokondri fonksiyonunu kaybeder ve bütünlükleri bozulur. Mitokondri iç membranındaki proteinler (sitokrom c), proteolitik enzimleri aktive etmek için sitoplazmaya salınır (Ross, 2003).

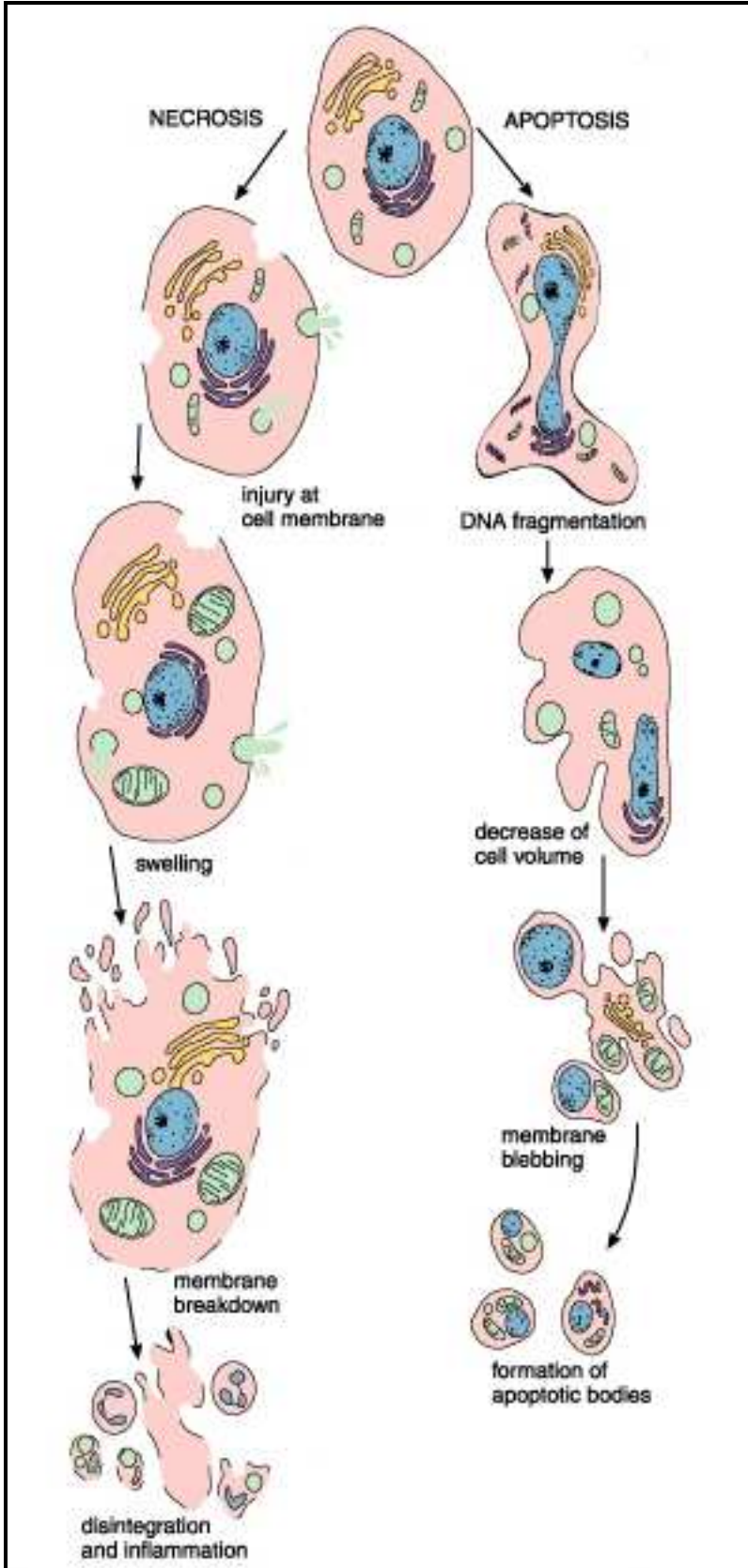
Plazma membranının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi fakat membran bütünlüğünün kaybolmaması sonucunda membranda kabarcıklar meydana gelir. Bu değişiklik sitoplazmik yüzeyden dış yüzeye doğru belirli moleküllerin taşınması ile ilişkilidir. Sitoplazma organellerini ve nüklear materyali içeren apoptotik cisimler oluşur. Apoptozisin son basamağı olan apoptotik cisimlerin oluşması sonucu hücrenin kırılması meydana gelir. Bu oluşumlar hızlıca fagositik hücreler (makrofajlar) tarafından yok edilirler. Nekrozisten farklı olarak inflamatuvar cevap oluşumu ve çevre hücrelerin etkilenmesi meydana gelmez (Akşit ve Bildik, 2008; Ross, 2003) (Şekil 2.3).

Apoptozis; programlanmış hücrelerde primer ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir. Tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), transforming büyüme faktörü beta (TGF- β), glukokortikoidler, nörotransmitterler, serbest radikaller, oksidantlar, radyasyon ve ilaçlar gibi dış faktörler apoptozisin başlatılmasında rol oynarlar. Apoptozisi başlatan hücre içi faktörler ise sitokinler, kalsiyum miktarındaki artış, onkogenler (myc ve rel gibi), p53 gibi tümör supressörleri, enfeksiyonlar ve antimetabolitlerdir. Bazı koşullarda ise nekrozis oluşturan durumlar az dahi olsa apoptozisi de başlatabilirler (Aitken et al. 2011; Akşit ve Bildik, 2008; Ross, 2003). Bunun yanı sıra apoptozis diğer hücrelerden veya çevreden gelen sinyaller ile engellenebilir. Büyüme faktörleri, hormonlar, nötral aminoasitler, çinko, ekstrasellüler proteinler ile olan etkileşimler apoptozisi durdurabilir (Ross, 2003).

Apoptozisin belirlenmesinde ilk olarak hücrelerin morfolojik görünümleri dikkate alınmıştır. Fakat sadece morfolojik görünüm yeterli olmamaktadır. Bunun yanı sıra, moleküler biyoloji ve genetik, immünolojik, biyokimyasal ve immunohistokimyasal

yöntemler gibi farklı yöntemler kullanılarak apoptozis belirlenmektedir (Akşit ve Bildik, 2008; Gavriel et al. 1992). Apoptozis esnasında plazma membranındaki fosfolipidlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler antikoagulan protein olan annexin V kullanılarak flow sitometride apoptozisin miktarı ve yüzdesi belirlenebilir (Shynkar et al. 2007). Flow sitometrik yöntemde; hücre popülasyonu içerisindeki ölü hücrelerin belirlenmesinde 7-Amino-Actinomycin D (7AAD) gibi boyalar kullanılmaktadır. Ölü hücrelerin membran bütünlükleri bozulur ve boya ölü hücrelerin içerisine geçer. Böylece ölü hücre içerisine geçmiş olan boyanın fluoresans yoğunluğu ve emisyon özelliğine göre flow sitometri cihazında ölçümlerin yapılabilmesine olanak sağlar (Schmid et al. 2001; Schmid et al. 1999).

NT çalışmalarında; donör hücrelerin G0/G1 fazında olması tercih edilir ki bu durum serum açlığı ve/veya inhibitör maddeler ile sağlanır. Uygulanan bu işlemler hücrelerin sikluslarını ayarlarken aynı zamanda apoptozise de neden olabilir. Erken apoptotik veya geç apoptotik hücrelerin kullanılması NT embriyolarda birçok hasara yol açabilir. Bu nedenle NT çalışmalarında hücre senkronizasyonu yanında hücrelerin canlılık durumları da oldukça önemli olmaktadır (Dalman et al. 2010; Cho et al. 2005; Hayes et al. 2005; Liam-Neto et al. 2010)



Şekil 2.3. Nekrozis ve apoptozis mekanizmalarının karşılaştırılması (Ross, 2003)

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Dokuların Alınması:

Çalışmada yerel mezbahadan elde edilen bacağı ait kas ve kulaktan alınan kırkırdak dokuları kullanılmıştır. Bu dokular koyun ve sığır türlerinden alınmıştır. Dokular temiz bisturi uçları ile alındıktan sonra %5 Antibiyotik (Sigma) içeren tuzlu fosfat tampon (PBS) (EK 1) çözeltisini içerisinde ve soğuk ortamda muhafaza edilerek en geç 3 saat içerisinde laboratuara getirilmiştir. Laboratuara getirilen doku örnekleri taze %5 antibiyotikli PBS içerisine alınarak deney yapılacak zamana kadar 4°C’de saklanmıştır.

3.2. Deney Grupları ve Hazırlanması:

Dokular 4°C’de 5, 48, 72, 96 ve 216 saat bekletildikten sonra taze ve vitrifiye olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Taze gruplarda; dokular 4°C’de bekletildikten ve herhangi bir işleme tabi tutulmadan primer kültürleri yapılmış ve kontrol grubu olarak kullanılmışlardır. Vitrifiye gruplarda ise; dokular 4°C’de bekletildikten sonra aşağıda ayrıntısı verilen vitrifikasyon tekniğine göre dondurulmuş ve çözülmüşlerdir (Çizelge 3.1). Çözme işleminin ardından dokuların primer kültürleri yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Deney gruplarının özet tablosu. Bu gruplar sığır ve koyun türleri için uygulanmıştır.

DENEY GRUPLARI

SAATLER	DOKULARA UYGULANAN İŞLEM	DOKU TİPİ
5	Vitrifiye	Kıkırdak
		Kas
	Taze	Kıkırdak
		Kas
48	Vitrifiye	Kıkırdak
		Kas
	Taze	Kıkırdak
		Kas
72	Vitrifiye	Kıkırdak
		Kas
	Taze	Kıkırdak
		Kas
96	Vitrifiye	Kıkırdak
		Kas
	Taze	Kıkırdak
		Kas
216	Vitrifiye	Kıkırdak
		Kas
	Taze	Kıkırdak
		Kas

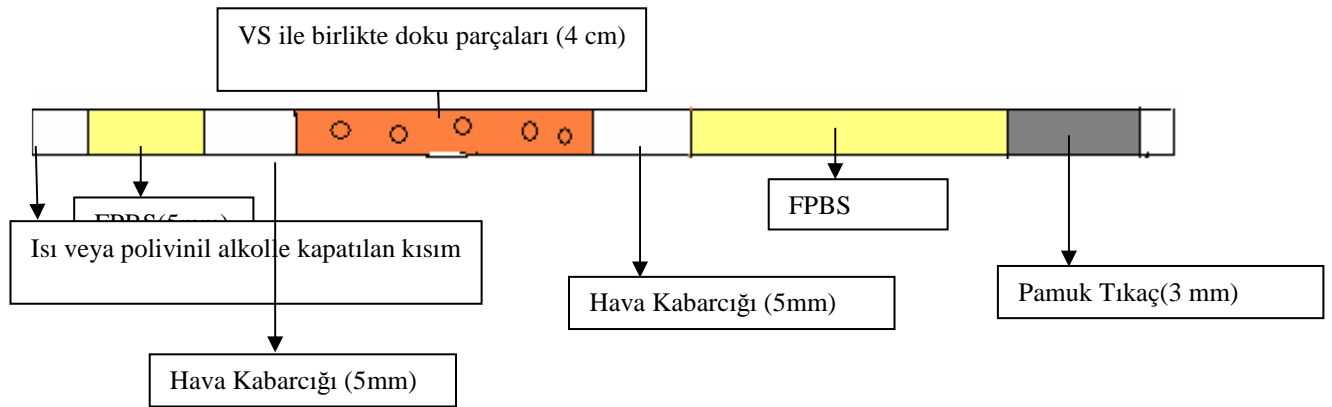
3.3. Vitrifikasyon İşlemi:

Dokular farklı sürelerde bekletildikten sonra; tüm gruplara aynı dondurma ve çözündürme protokolü uygulanmıştır. Kullanılan solüsyonlar deney günü taze olarak hazırlanmış ve oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Kullanılan temel solüsyon (F-PBS); %20 fetal buzağı serumu (FBS) ve %1 Antibiyotik içeren PBS'dir. Vitrifikasyon solüsyonu (VS); temel solüsyona ilave edilen 3,58 M (%20, v/v) ethylenglycol (Sigma) ve 2.82 M (%20, v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) ile hazırlanmıştır.

Dokuların 0,5 mm payetlerin içerisinde girebilmeleri için laminar kabin altında temizlenen dokular küçük parçalara (3-5 mm³) ayrılmış ve %2 antibiyotikli PBS içerisinde bekletilmiştir.

Her payetin içerisinde 4-5 adet doku parçası olacak şekilde payetler hazırlanmıştır. Payetin dizilimi şu şekilde yapılmıştır: F-PBS (0,5 cm) + hava kabarcığı (0,5 cm) + VS ile birlikte 4-5 parça doku (4 cm) + hava kabarcığı (0,5 cm) + F-PBS ile pamuk tıkaç ıslanana kadar çekilerek hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Payetin ucu ısıtılmış pens ile preslenerek kapatılmıştır. Hemen ardından payet sıvı nitrojene 45° açı ile yavaşça batırılmıştır. Payetin yüklenmesi ve sıvı azota daldırılması 30 saniyelik bir süre içerisinde gerçekleştirilmiştir. Soğutma ısısı yaklaşık olarak -1500°C/dakikadır.

Çözündürme işlemi iki basamak olarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak; payetler sıvı azot buharında 10 saniye kadar bekletilmiş (çözündürme ısısı ~ +700°C /dak) ve ardından 25°C'deki su banyosu içerisinde dondurma solüsyonu çözülene kadar tutulmuştur (çözündürme ısısı ~ +1200°C /dak). Payetlerin uçları kesildikten sonra içerik hemen 2 ml F-PBS + 0,25 mM Sükroz (Sigma) içeren solüsyona aktarılmıştır. Kriyoprotektanlar çözündürme solüsyonlarında yıkanarak uzaklaştırılmıştır ve temel solüsyonda 5 dakika bekletilmiştir.



Şekil 3.1. Dokuların dondurulmasında kullanılan payet ve yüklenme şekli

3.4. Primer Kültür:

4°C’de 5, 48, 72, 96 ve 216 saat bekletilmiş taze ve vitrifiye doku örnekleri %2 antibiyotik içeren PBS ile yıkandıktan sonra steril bisturi ile küçük parçalara (1 mm³) ayrılarak 35 mm kültür petrilere ekilmiştir. Doku parçalarının yapışmasının ardından tüm dokuların yüzeyini kaplayacak şekilde %20 FBS ve 2 µl/ml (100µg/ml veya 1:500) oranında antibiyotik (50 mg/ml, Primocin, İnvivoGen) içeren Dulbecco Modified Eagle’s Medium with high glucose (DMEM) (EK 2) medyumunu ile kaplanmıştır. Ekim yapılan doku petrilere 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Petrilere ilk 7 gün boyunca yerlerinden oynatılmadan kontrolleri yapılmıştır. 7. günün sonunda petrilere dokuların yapışma oranları kontrol edilmiştir. Aynı zamanda petrilere konfluent olma zamanları da incelenmiştir. Yedinci günden itibaren her iki günde bir petrilere medyumları değiştirilmiştir. Tüm incelemeler invert mikroskop altında yapılmıştır.

3.5. Hücre Kültürü:

Primer kültür sonrası konfluent olan petrilere doku parçaları aspirasyon yöntemi ile alınmıştır. Petri yüzeyleri PBS ile yıkanmış ve aspirasyonun ardından %0,25 Tripsin-EDTA (Gibco) uygulanmıştır. Tripsine maruz bırakılan petrilere 5 dakika boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Ardından konulan tripsinin 2 katı kadar %10 FBS ve 2 µl/ml (100µg/ml veya 1:500) oranında antibiyotik (50 mg/ml, Primocin, İnvivoGen) içeren DMEM yüksek glikoz içeren besiyeri eklenerek hücreler tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Hücreler 15 ml’lik tüplere aktarılarak 5 dakika boyunca 1200 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından hücreler, tripsini inhibe etmek için kullanılan aynı besiyeri ile sulandırılarak ekimleri yapılmış ve çalışmalar için hazırlanmıştır. Aynı zamanda hücreler dondurularak saklanmıştır. Dondurma sırasında santrifüj sonrası sulandırılan hücreler 1:1 oranında dondurma solüsyonu (%40 FBS ve %10 DMSO) ile karıştırılmıştır. Dondurma solüsyonu içindeki hücreler kriyoviallere (dondurma tüpleri) alınarak dondurma kaplarına yerleştirilmiş ve -80°C’de gece boyu bekletildikten sonra sıvı azot içerisine alınmıştır. Yapılan tüm analizlerde hücrelerin pasaj sayıları 2 ile 5 arasında kullanılmıştır.

3.6. Analiz Metodları

3.6.1. Dokuların Yapışma Oranları ve Konfluensi Zamanlarının Karşılaştırılması:

Taze ve vitrifiye grupların primer kültür ekimleri sırasında dokuların petri yüzeyine yapışma oranları incelenmiştir. Ekimler esnasında petri yüzeylerine 10-20 adet doku parçaları ekilmiş ve 7. günde petri yüzeylerindeki yapışan doku sayıları belirlenmiştir. Grupların yapışma yüzdeleri belirlenerek istatistikî analizleri yapılmıştır. Primer kültürlerin ekimlerini takiben kaçınıcı günde konfluent oldukları belirlenerek istatistikî analizleri yapılmıştır.

3.6.2. Populasyon Katlanma (Population Doubling, PK) Sayıları ve Zamanı:

Taze ve vitrifiye dokulardan elde edilen 5 ve 216 saatlik gruplara ait kas ve kıkırdak hücre hatlarının populasyon katlanma sayıları (PK) ve zamanları (PKZ) karşılaştırılmıştır. Çalışmada; hücreler sayılarak kültür kabına 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Beş gün aralıklarla sayılan hücreler yine aynı sayıda ekilmiştir. Ekim beş kez tekrarlanmış ve populasyon katlanma sayıları “ $\log_{10}(N/N_0) \times 3.33$ ” formülü (N: beş gün sonra petri yüzeyinden kaldırılan hücre sayısı ve N_0 : ekilen hücre sayısı) ile populasyon katlanma süresi “Populasyon Katlanma Sayısı / Toplam Katlanma Zamanı” formülleri ile hesaplanmış ve hücre hatları arasındaki populasyon katlanma zamanları da oranlanmıştır (Arat ve ark. 2002; Stolzing and Scutt, 2006).

3.6.3. Hücrelerin Proliferasyon Aktivitesi:

Taze ve vitrifiye dokulardan elde edilen 5 ve 216 saatlik gruplara ait kas ve kıkırdak hücrelerinin canlılıkları trypan blue boyası ile belirlenmiş ve dondurup çözündürme sonrası proliferasyon aktiviteleri ise 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay yöntemi ile belirlenmiştir. Hazırlanan hücrelerin sayımları yapılarak 2×10^4 hücre/ml'de olacak şekilde 96 kuyulu petrilere ekilerek 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Kültürün 2 ve 5 günlerinde eski besiyeri aspire edilerek 0,5 mg/ml MTT içeren taze besiyeri eklenmiş ve üç saat boyunca inkübe edilmiştir. Her kuyunun optik yoğunluk değerleri (OD) Elisa mikroplate okuyucuda (BIORAD) 595 nm dalga boyunca ölçülmüştür. Vitrifiye grup hücrelerinin OD değerleri taze kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Proliferasyon aktiviteleri; “Yüzde Artış (%) = $100 - (OD2 \text{ gün} \times 100) / OD5\text{gün}$ ” formülüne göre hesaplanmıştır (Cetinkaya ve Arat, 2011; Martin et al. 2000).

3.6.4. Histolojik Boyamalar

3.6.4.1. Hematoksilen ve Eozin (H-E) Boyaması:

Hücrelerde yapılan boyama:

Taze ve vitrifiye dokulardan elde edilen 5 ve 216 saatlik gruplara ait kas ve kıkırdak hücreleri konfluent olduktan sonra %4 Paraformaldehit (PFA) (EK 3) ile 20 dakika oda ısısında fikse edilmiştir. Rehidratasyon işleminden geçirilen (%100 alkolden %70 alkole azalan oranlarda geçiş yapılması) hücreler hematoksilen boyası ile 5 dakika muamele edilmiştir. PBS ile yıkamanın ardından eozin boyası ile 5 dakika boyanmış ve dehidratasyon (%70 alkolden %100 alkole artan oranlarda geçiş yapılması) işleminden geçirilmiştir. Son olarak PBS ile yıkandıktan sonra invert mikroskopta (Nikon Ti-U) inceleme yapılmıştır. Boyama sonucunda hücrelerin sitoplazmaları pembe renkte, çekirdek ise mavi renkte gözlemlenmiştir. H-E boyası ile kültürdeki hücrelerin genel morfolojileri belirlenmiştir.

Dokularda yapılan boyama:

Taze ve vitrifiye kıkırdak dokuları %4 PFA ile 24–48 saat 4°C’de fikse edildikten sonra akan çeşme suyu altında yıkanmıştır. Dokular gece boyu %70 alkolde bekletildikten sonra %80, %90 ve %100 alkolde 2’şer saat tutulmuştur. Alkol serilerinin ardından 1 saat oda ısısında ksilol ve ½ saat 60–65°C etüvde ksilol-parafin’de bekletildikten sonra parafin bloklar hazırlanmıştır. Hazırlanan bloklarda 5 µm kalınlığında kesitler alınarak preparatlar hazırlanmıştır. Preparatlardan parafini uzaklaştırmak için ½ saat ksilol ile muamele edilmiştir. Ardından, preparatlar rehidratasyon işlemine tabi tutulmuş ve son olarak da distile suda bekletildikten sonra hematoksilen boyasına aktarılarak 5 dakika bekletilmiştir. Akan çeşme suyunda 10 dakika yıkamanın ardından eozin boyasına alınarak 5 dakika tutulmuştur. Akan çeşme suyu ile yıkandıktan sonra dehidratasyon işlemi yapılmış ve son olarak ksilol’de bekletilerek şeffaflandırmanın ardından entellan ile kapatılarak inceleme yapılmıştır. Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularının genel morfolojileri incelenmiştir.

3.6.4.2. Safranin O (EK 4) Boyaması:

Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularından hazırlanan preparatlardan parafini uzaklaştırmak için ½ saat ksilol ile muamele edilmiştir. Ardından, preparatlar rehidratasyon işlemine tabi tutulmuş ve son olarak da distile suda bekletildikten sonra Weigert’s demirli hematoksilen çalışma çözeltisinde 10 dakika bekletilir. Süre sonunda akan çeşme suyunda 10 dakika yıkanmış ve Fast Green solüsyonunda 5 dakika tutulduktan sonra %1 Acetic Acid solüsyonunda 10–15 saniye tutulmuştur. %0.1’lik safranin O solüsyonuna alınarak 5 dakika bekletildikten sonra %95 alkol, absolü alkol ve ksilol solüsyonlarında 2’şer dakika tutulmuştur. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra entellan ile kapatılmıştır. Dokularda bulunan kıkırdak dokusu turuncu-kırmızı, sitoplazma gri-yeşil ve nükleuslar ise siyah renkte görüntülenmiştir.

3.7. İmmunfluoresans Boyamalar:

Bu kapsamda yapılan boyamalarda 5 ve 216 saatlik grupların taze ve vitrifiye grupları ele alınmıştır. Hoescht 33342 boyaması ile nükleuslar boyanarak hücrelerin apoptotik durumları incelenmiştir. Aktin, β - III Tubulin, Vimentin, NCAM, Cytokeratin, Elastin ve Oct-4 antikoru ile boyamalar yapılarak hücrelerin karakterizasyonları yapılmıştır.

3.7.1. Hoescht (HXT) 33342 Nükleus Boyaması:

Hücreler %4 PFA ile 4 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası PBS ile yıkama yapıldıktan sonra 1 μ g/ml HXT (EK 5) boyası ile 4 dakika boyanmıştır. PBS ile yıkamanın ardından UV ışık altında invert mikroskop ile incelemeler yapılmıştır (Baarine et al. 2011). Bu boyama ile apoptotik ve nekrotik nükleuslar belirlenerek hücrelerin canlılıkları belirlenmiştir. Mikroskopta inceleme yapıldığında; yuvarlak ve düzgün nükleusa sahip olan hücreler canlı, yoğun ve/veya parçalanmış nükleusa sahip olanlar ise apoptotik hücre olarak değerlendirilmiştir.

3.7.2. Primer Antikorlar ile Yapılan Boyamalar:

Hücrelerin karakterizasyonları için Aktin, β -III Tubulin, Vimentin, NCAM, Cytokeratin, Elastin ve Oct-4 antikoru kullanılmıştır. Mezenşimal köken için Aktin ve Vimentin, nöroektoderm köken için β -III Tubulin ve NCAM, epitelyal köken için Cytokeratin, pluripotensi için Oct-4 ve kıkırdak hücrelerinin tanımlanabilmesi için Elastin antikoru seçilmiştir.

Doksan altı kuyulu petrilere ekilen hücreler %4 PFA ile 20 dakika fikse edilmiştir. Bu çalışmada blok çözeltisi (EK7) olarak %3 keçi serumu, %0,1 TritonX-100 (Sigma) ve %1 polivinilprolin (PVP, Sigma) içeren yüksek tuzlu tampon (High Salt Buffer; HBS) (EK 6) çözeltisi kullanılmıştır. Aynı blok çözeltisi kullanılarak primer antikorlar ve sekonder antikor hazırlanmıştır. Antikorlar ve dilüsyonları aşağıdadır:

- Aktin (Sigma A 2547); 1:200 dilüsyon
- β -III Tubulin (Sigma T 5076); 1:100 dilüsyon
- Vimentin (Sigma C 9080); 1:200 dilüsyon
- NCAM (Abcam ab51932); 1:100 dilüsyon
- Cytocerin (Sigma C 9179); 1:200 dilüsyon
- Elastin (Santa Cruz sc-58756); 1:50 dilüsyon
- Oct-4 (Santa Cruz sc-5279); 1:50 dilüsyon
- Sekonder antikor anti-mouse IgG FITC (SIGMA F-5262); 1:100 dilüsyon

Fikse edilen örnekler PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 45 dakika blok çözeltisinde bekletilmiş ve HBS ile yıkanmıştır. Primer antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Primer antikor inkübasyonunun ardından yıkama çözeltisi (EK 8) ve HBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor belirtilen dilüsyonda hazırlanarak kuyulara aktarılmış ve bir saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yıkamanın ardından floresans ataçmanlı invert mikroskopta boyamalar kontrol edilmiştir.

3.7.3. Kıkırdak Dokularının Elastin Antikoru ile Boyanması:

Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularından hazırlanan preparatlardan parafini uzaklaştırmak için ½ saat ksilol ile muamele edilmiştir. Ardından, preparatlar rehidratasyon işlemine tabi tutulmuş ve son olarak da PBS'te bekletildikten sonra blok çözeltisinde 45 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elastin (Santa Cruz sc-58756) primer antikoru 1:50 dilüsyonda blok çözeltisinde hazırlanmış ve 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra, 1:100 dilüsyonda blok çözeltisi içerisinde hazırlanan sekonder antikor anti-mouse IgG FITC (SIGMA F-5262) antikoru ile 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Boyamanın ardından preparatlar floresans ataçmanlı invert mikroskop ile incelenmiştir.

3.8. Flow Sitometri (Akım Sitometresi) Analizleri:

Dokuların dondurulup çözülmesi sonrasında elde edilen hücrelerin canlılıkları ve hücre siklusları fazları incelenmiştir. Böylece bu hücrelerin etkinlikleri belirlenerek biyobankalar ve NT çalışmaları için kaynak olarak kullanılabilirlikleri flow sitometrik yöntem ile belirlenmiştir. Hücrelerin plazma membranlarında meydana gelen değişiklikler ile apoptotik hücreler, membran bütünlükleri bozulanların belirlenmesi ile ölü hücreler ve hücre siklus fazları arasındaki DNA miktarlarının farklılıkları sayesinde de hücre siklus fazları flow sitometrik yöntemler ile tespit edilmiştir.

Hücre popülasyonları içerisindeki, ölü hücre oranlarını belirlemek için 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD; BD Pharmingen 559925), apoptotik hücreler için FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen 556547) ve hücre siklus analizleri için ise Propidium Iodide (PI) (BD Pharmingen 556463) boya ları kullanılmıştır. Analizler; Becton Dickinson FACScan cihazı ve Cell Quest Pro (USA) programı ile incelenmiştir.

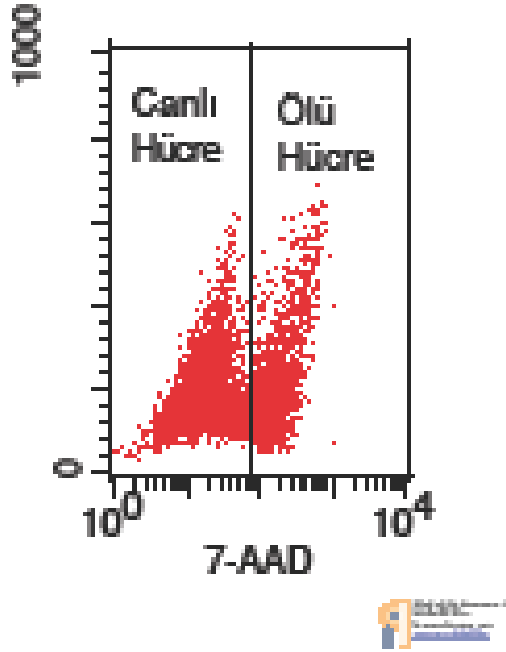
Flow sitometri analizlerinde 5 ve 216 saatlik grupların taze ve vitrifiye grupları ele alınmıştır. Bu gruplar; uygulanan hücre senkronizasyon yöntemine göre ayrıca üç alt gruba daha ayrılmıştır. Alt gruplar aşağıdaki belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

- a) %100 Konfluent ve 3 gün boyunca %10 FBS içeren besiyeri
- b) %100 Konfluent ardından 3 gün boyunca %5 FBS içeren besiyeri
- c) %100 Konfluent ardından 3 gün boyunca %0,5 FBS içeren besiyeri

Yukarıdaki gruplar haricinde %50 konfluent olan kas ve kıkırdak hücreleri ve -80 °C'de bekletilerek öldürülmüş hücreler hazırlanarak kontrol olarak değerlendirilmiştir. Tüm örneklerde 10 000 hücre analiz edilmiştir.

3.8.1. 7-Amino-Actinomycin D (7 AAD) Analizi:

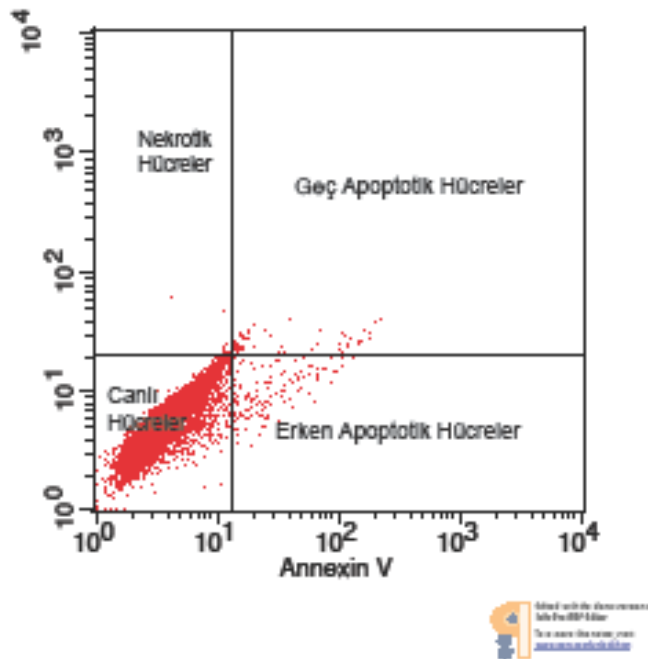
Hücreler tripsinizasyon işlemi ile petri yüzeyinden kaldırıldıktan sonra hücre sayımları yapılmıştır. Hücre peleti soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra PBS içerisinde hazırlanan 7 AAD (5µl (0,25 µg)/ 1x10⁶ hücre) boyası ile 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Sürenin sonunda hücreler santrifüjlenerek üst sıvı alındıktan sonra iki kez soğuk PBS ile yıkanarak 4°C’de santrifüjlenmiştir. Ardından her tüpe 500 µl PBS eklenmiş ve flow sitometri cihazı ile analizler yapılmıştır. Ölü hücrelerin membran bütünlüklerini kaybetmeleri ve boyanın bu hücrelerin içine geçmesi sayesinde boyanın flouresans yoğunluğu ve emisyon özelliği ölçülerek ölü ve canlı hücre oranları belirlenir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Flow sitometri 7-AAD analiz sonucu örneği

3.8.2. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit Analizi:

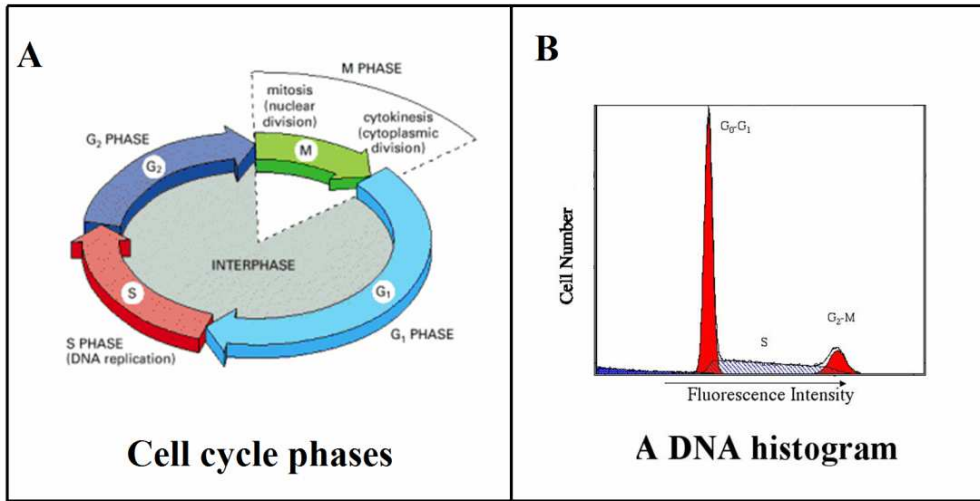
Hücreler tripsinizasyon işlemi ile petri yüzeyinden kaldırıldıktan sonra hücre sayımları yapılmıştır. Hücre peleti soğuk PBS ile iki kez yıkanıldıktan sonra kit içerisinde bulunan 1X Binding Buffer ile de iki kez yıkanmıştır. Hücreler, kit içerisinde yer alan 1X Binding Buffer içerisinde hazırlanan 5µl Annexin V boyası ile 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta boyamanın ardından tüplere 1X Binding Buffer ve 4 µl propidium iodide (PI) eklenmiştir. Tüpler yeniden 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilerek boyanmıştır. Sonrasında tüplere 1X Binding Buffer solüsyon eklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Sürenin sonunda hücreler santrifüjlenerek üst sıvı alındıktan sonra % 1 PFA solüsyonunda buz üzerinde 10 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası hücreler iki kez soğuk PBS ile yıkanmış ve üst sıvılar aspire edilmiştir. Hücre peleti bulunan tüplere 50 µg/ml RNase A (Fermentas EN0531) eklenerek 15 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir. Tüpler bir kez soğuk PBS ile yıkanmış ve ardından her tüpe 500 µl PBS eklenerek flow sitometri cihazı ile analizler yapılmıştır (Rieger et al. 2011). Analiz sonucunda; sadece Annexin V boyasını alan hücreler erken apoptotik, sadece PI boyasını alanlar nekrotik ve her iki boyayı birden alan hücreler ise geç apoptotik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Flow sitometri FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit analiz sonucu örneği

3.8.3. Hücre Siklus Analizleri:

Hücreler tripsinizasyon işlemi ile petri yüzeyinden kaldırıldıktan sonra hücre sayımları yapılmıştır. Hücre peleti soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 500 µl soğuk PBS ve 5 ml %70 etanol ile hücreler fikse edilmiştir. Fikse edilen hücreler 4°C’de en az 24 saat tutulduktan sonra (4 haftaya kadar bekletilebilir) santrifüj edilerek fiksatif uzaklaştırılmıştır. Birkaç kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra hücre peleti; 500 µl PBS içerisinde 100 µg/ml RNase A (Fermentas EN0531), 50 µg/ml PI (BD Pharmingen 556463) ve %0,1 Triton X-100 (Sigma) bulunan boyama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra flow sitometri cihazı ile analizler yapılmıştır (Zhou 2010). Hücre siklus fazları arasındaki DNA miktarlarının farklı olması ve DNA’nın PI boyası ile boyanması sonucunda boyanın fluoresans yoğunluğunun ölçülmesi ile fazlar belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Hücre siklus fazlarının flow sitometri yöntemi ile belirlenmesi (Takahashi, 2011).

3.9. Glikozaminoglikan (GAG) Analizi:

Kıkırdak dokusu; laküenalar içerisindeki kondrositler ve bunların ekstrasellüler matrikslerinden oluşur. Ekstrasellüler matriks içerisinde glikozaminoglikanlar (GAG), kollajen ve elastik fibriller bulunur. Kıkırdak doku ve hücrelerinin tanımlanmasında kullanılan bir yöntemde GAG miktarlarının ölçümüdür.

Hücrelerin içerisindeki GAG miktarı, 1,9-dimethylmethylen blue (DMB) boyası ile açığa çıkarılmıştır. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile petri yüzeyinden kaldırıldıktan sonra hücre sayımları yapılmış ve 1×10^4 hücre/ml'de olacak şekilde sulandırılarak 24 kuyulu petri kaplarına ekim yapılmıştır. Kültürün 5. gününde besiyeri aspire edildikten sonra papain extraction solüsyonu (200 µg/ml Papain, 0.1 M sodium acetate, 0.005 M cysteine HCl, 0.01 M Na₂EDTA pH 6.5 Sigma) kuyulara konmuş ve 65°C etüvde 4 saat tutulmuştur. Süre sonunda 100 µl digestion solüsyon ile 100 µl DMB çalışma solüsyonu (Formik asit içerisindeki 32 µg/ml DMB, pH 3.5 Sigma) karıştırılmış ve Elisa mikroplate okuyucuda (BIORAD) 595 nm dalga boyunca ölçülmüştür. GAG içeriği hesaplanmıştır (Çetinkaya ve Arat 2011). GAG içeriği ve absorbans değerlerinin korelasyonları alınmış ve Chondroitin sulfat standart eğrisine göre hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki fark incelenmiştir.

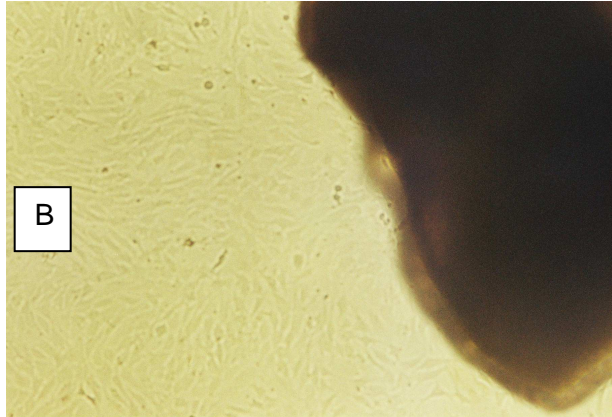
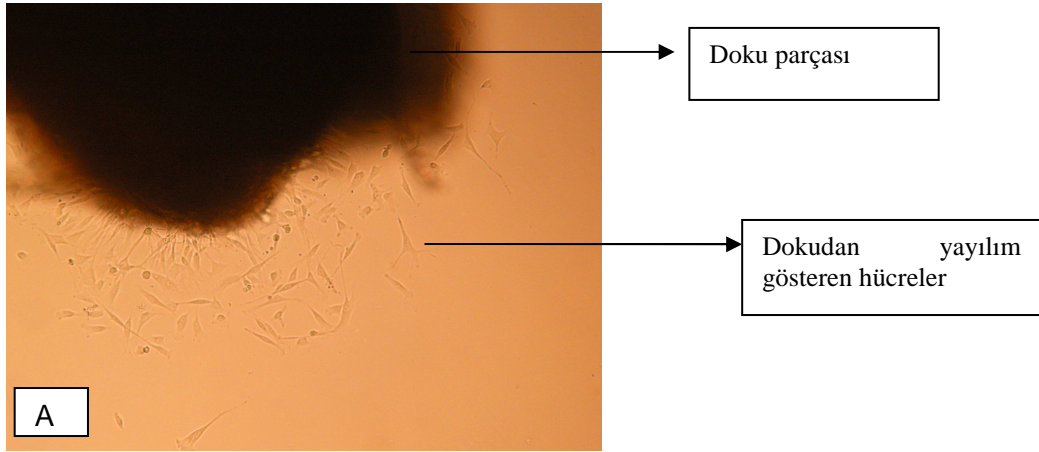
3.10. İstatistiksel Analizler:

Tüm deneyler en az üç kere tekrarlanmıştır. Uygulamalar arasındaki farklar One way ANOVA, Regresyon, Korelasyon ve General Linear Modellerine göre analiz edilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı değer kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Primer Kùltür

Taze ve vitrikiye gruplara ait dokuların primer kùltürleri yapılarak sağlıklı hücreler elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Primer kùltürde üreme gösteren dokular. A) Dokudan yayılım gösteren hücreler B) Dokudan yayılım gösteren ve konfluent olan hücreler

4.2. Dokuların Yapışma Oranları ve Konfluensi Zamanlarının Karşılaştırılması

Sığır türü ile yapılan çalışmada; genel olarak doku tipine bağlı olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. Kıkırdak dokusu kas dokusuna göre daha az oranda petri yüzeyine yapışma eğilimi göstermiştir. 216 saatlik grupta ise; taze ve vitrifiye gruplar arasında anlamlı fark görülmezken kas ve kıkırdak doku tipleri arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Konfluensi oranları ve zamanları incelendiğinde ise doku tipi ve uygulanan işlemler bakımından gruplar arasında anlamlı fark tespit edilememiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Sığır kas ve kıkırdak dokularının taze ve vitrifiye gruplarının yapışma ve konfluensi zamanları

EG-hpm	Örnek Uygulamaları	Doku Tipi	Yapışma		Örnek Subkonfluensi (%)		KZ
			Yapışma Sayısı	Örnek	İlk Yapışma (%)	İlk	
5	T	Kıkırdak	18	15 (80) ^{a,b}	15	15 (100)	15
		Kas	15	13 (87) ^{a,b,c}	13	13 (100)	17
	V	Kıkırdak	13	7 (55) ^{b,d}	7	7 (100)	17
		Kas	15	12 (84) ^{a,b,c}	12	12 (100)	19
48	T	Kıkırdak	15	9 (60) ^{b,d}	9	9 (100)	17
		Kas	15	13 (88) ^{a,b,c}	13	13 (100)	19
	V	Kıkırdak	13	9 (70) ^{a,b,c}	9	9 (100)	17
		Kas	15	13 (88) ^{a,b,c}	13	13 (100)	17
72	T	Kıkırdak	15	14 (90) ^{a,b,c}	14	14 (100)	18
		Kas	15	14 (92) ^{a,b,c}	14	14 (100)	19
	V	Kıkırdak	15	13 (89) ^{a,b,c}	13	13 (100)	21
		Kas	15	13 (87) ^{a,b,c}	13	13 (100)	17
96	T	Kıkırdak	15	13 (87) ^{a,b,c}	13	13 (100)	21
		Kas	15	14 (93) ^{a,b,c}	14	14 (100)	22
	V	Kıkırdak	15	12 (84) ^{a,b,c}	12	12 (100)	25
		Kas	15	13 (89) ^{a,b,c}	13	13 (100)	22
216	T	Kıkırdak	15	10 (66) ^{b,d}	10	10 (100)	16
		Kas	17	16 (94) ^c	16	16 (100)	17
	V	Kıkırdak	15	9 (58) ^{b,d}	9	9 (100)	21
		Kas	15	14 (93) ^{a,b,c}	14	14 (100)	21

*: EG:deneySEL gruplar; hpm: post-mortem bekleme süresi. T: Taze V: Vitrifiye KZ: Konfluensi zamanı. a,b,c,d: p≤0,05

Koyun türü ile yapılan çalışmada; genel olarak doku tipine bağlı olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. Kıkırdak dokusu kas dokusuna göre daha az oranda petri yüzeyine yapışma eğilimi göstermiştir. 216 saatlik grupta; kas ve kıkırdak dokuları bakımından arasında anlamlı fark görülmezken taze ve vitrifiye gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Konfluensi oranları ve zamanları incelendiğinde ise gruplar arasında anlamlı fark tespit edilememiştir. Konfluensi zamanları incelendiğinde; 96 ve 216 saatlik vitrifiye gruplarında kas ve kıkırdak dokularının konfluensi zamanlarının diğer gruplardan daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Koyun kas ve kıkırdak dokularının taze ve vitrifiye gruplarının yapışma ve konfluensi zamanları

EG-hpm	Örnek Uygulamaları	Doku Tipi	Yapışan Örnek		Subkonfluensi (%)		KZ
			Yapışan Sayısı	Örnek	İlk	Yapışma	
			İlk (%)	Yapışma			
5	T	Kıkırdak	10	6 (60) ^{b,d}	6	6 (100)	15 ^{a,b}
		Kas	10	6 (57) ^{b,d}	6	6 (100)	15 ^{a,b}
	V	Kıkırdak	10	6 (58) ^{b,d}	6	6 (100)	15 ^{a,b}
		Kas	10	5 (50) ^d	5	5 (100)	15 ^{a,b}
48	T	Kıkırdak	15	13 (87) ^{a,b,c}	13	13 (100)	14 ^b
		Kas	15	14 (93) ^c	14	14 (100)	14 ^b
	V	Kıkırdak	14	9 (66) ^{b,d}	9	9 (100)	16 ^{a,b}
		Kas	13	12 (94) ^c	12	12 (100)	16 ^{a,b}
72	T	Kıkırdak	15	14 (93) ^c	14	14 (100)	14 ^b
		Kas	15	14 (93) ^c	14	14 (100)	14 ^b
	V	Kıkırdak	14	11 (75) ^{a,b}	11	11 (100)	16 ^{a,b}
		Kas	15	13 (88) ^{a,b,c}	13	13 (100)	16 ^{a,b}
96	T	Kıkırdak	14	14 (100) ^c	14	14 (100)	19 ^a
		Kas	14	14 (100) ^c	14	14 (100)	19 ^a
	V	Kıkırdak	14	12 (86) ^{a,b,c}	12	12 (100)	22 ^a
		Kas	14	12 (88) ^{a,b,c}	12	12 (100)	22 ^a
216	T	Kıkırdak	15	13 (84) ^{a,b,c}	13	13 (100)	16 ^{a,b}
		Kas	15	12 (82) ^{a,b,c}	12	12 (100)	16 ^{a,b}
	V	Kıkırdak	15	9 (62) ^{b,d}	9	9 (100)	20 ^a
		Kas	15	10 (67) ^{b,d}	10	10 (100)	19 ^a

*: EG:deneySEL gruplar; hpm: post-mortem bekleme süresi. T: Taze V: Vitrifiye KZ: Konfluensi zamanı. a,b,c,d: p≤0,05

4.3. Populasyon Katlanma (Population Doubling, PK) Sayıları ve Zamanı

Populasyon katlanma sayıları ve zamanları 5 ve 216 saatlik grupların taze ve vitrifiye grupları arasında incelenmiştir. Populasyon katlanma sayıları ve zamanları incelendiğinde; bekleme süresi, tür ve hücre tiplerinden bağımsız olarak uygulanan işlem bakımından farklılık olduğu tespit edilmiştir. Populasyon katlanma (PK) sayıları bakımından vitrifiye grupların taze gruplara göre daha az katlandıkları yani az mitoz bölünme geçirdikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Populasyon katlanma zamanları (PKZ) incelendiğinde ise vitrifiye grupların populasyon katlanma zamanlarının taze gruplara göre daha uzun olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu sonuç populasyon katlanma sonuçları ile de doğru orantılıdır.

Çizelge 4.3. Populasyon katlanma (PK)

EG-hpm	Örnek Uygulamaları	Tür	Hücre Tipi	PK
5	V	Sığır	Kıkırdak	11,1
			Kas	17,2
		Koyun	Kıkırdak	20,1
	T	Sığır	Kas	16,6
			Kıkırdak	18,4
		Koyun	Kas	19,4
216	V	Sığır	Kıkırdak	22,3
			Kas	18,4
		Koyun	Kıkırdak	12
	T	Sığır	Kas	18,6
			Kıkırdak	24,1
		Koyun	Kas	14,4
T	Sığır	Kıkırdak	16,9	
		Kas	24,1	
	Koyun	Kıkırdak	24,9	
			Kas	14,4

*: EG:deneySEL gruplar; hpm: post-mortem bekleme süresi. T: Taze V: Vitrifiye PK: Populasyon katlanma sayısı

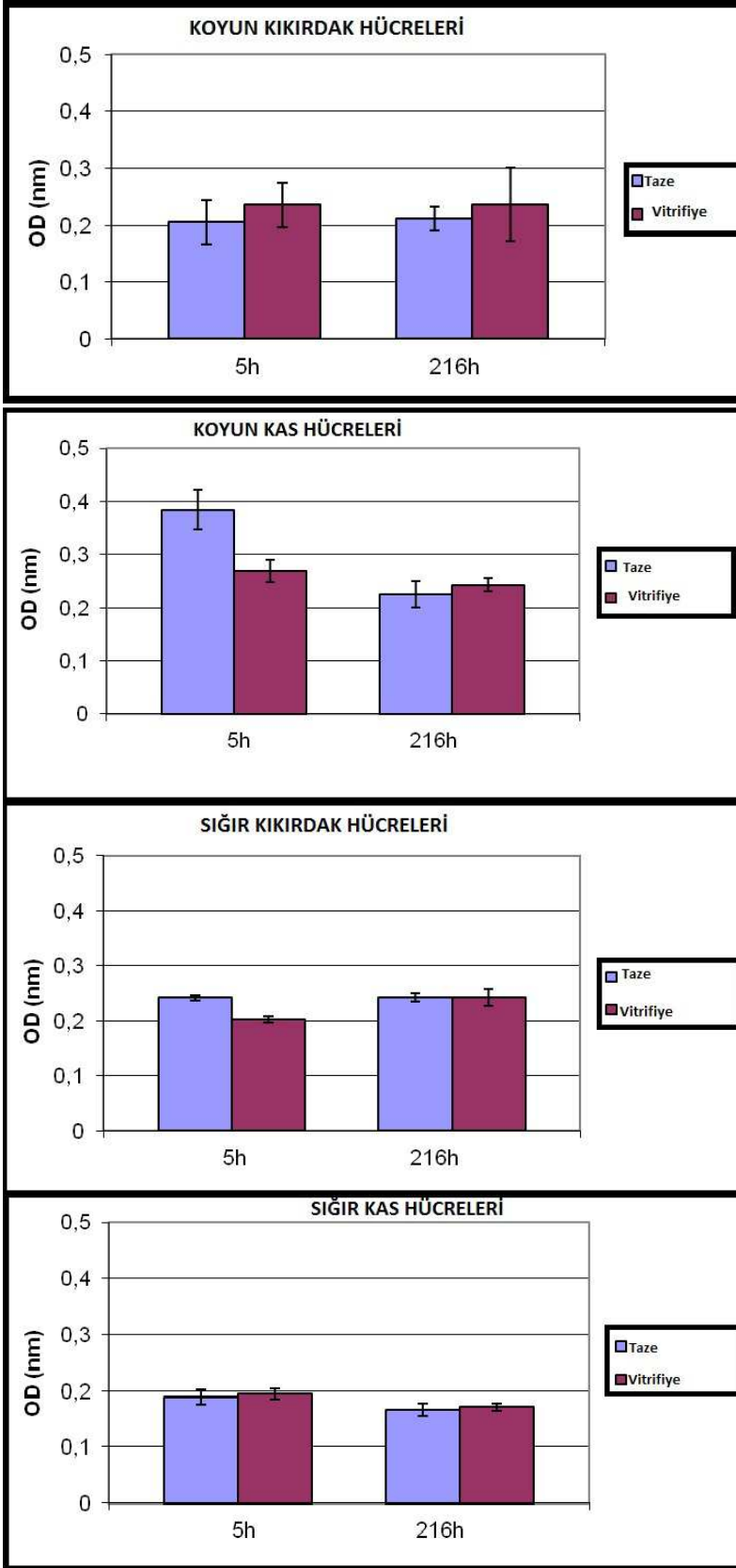
Çizelge 4.4. Populasyon katlanma zamanları (PKZ)

EG-hpm	Örnek Uygulamaları	Tür	Hücre Tipi	PKZ (Saatler)	
5	V	Sığır	Kıkırdak	76,2	
			Kas	59,3	
		Koyun	Kıkırdak	38,4	
	T	Sığır	Kas	51,5	
			Kıkırdak	42,9	
		Koyun	Kıkırdak	40,2	
216	V	Sığır	Kas	35,6	
			Kıkırdak	42,9	
		Koyun	Kas	83,5	
			Kıkırdak	36,1	
		T	Sığır	Kas	64,7
				Kıkırdak	30,7
	Koyun		Kas	64,7	
	T	Sığır	Kıkırdak	43,8	
			Kas	30,9	
Koyun		Kıkırdak	29,9		
			Kas	65,3	

*: EG:deneySEL gruplar; hpm: post-mortem bekleme süresi. T: Taze V: Vitrifiye PKZ: Populasyon katlanma zamanı

4.4. Hücrelerin Proliferasyon Aktivitesi:

Hücrelerin proliferasyon aktiviteleri MTT analizleri ile incelenmiştir. MTT analiz sonuçları incelendiğinde, koyun kıkırdak hücre hatlarının taze ve vitrifiye grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=1$). Koyun kas hücre hatlarında ise 5 saatlik grupta taze ve vitrifiye grup arasında anlamlı fark bulunurken ($p<0,05$), 216 saatlik gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=1$). Sığır kas ve kıkırdak hücre hatlarının taze ve vitrifiye grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=1$) (Şekil 4.2).



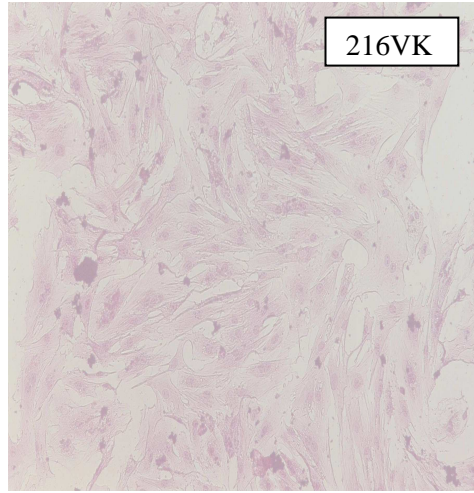
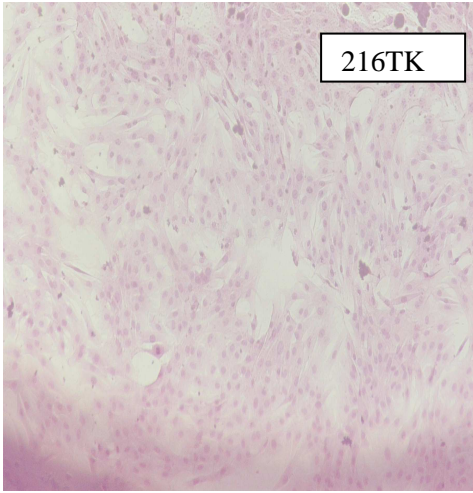
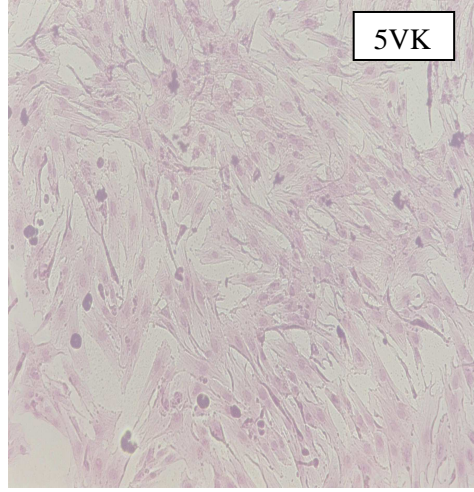
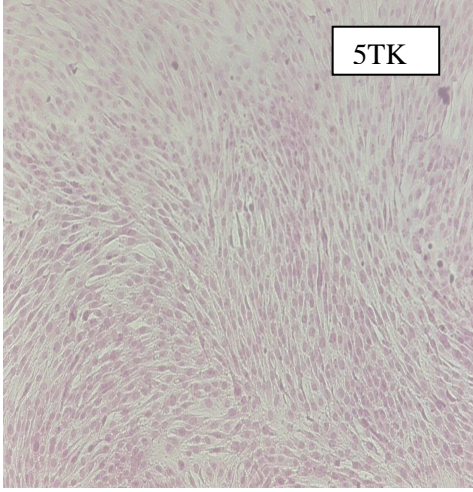
Şekil 4.2. Sığır ve koyunlara ait kas ve kıkırdak hücrelerinin proliferasyon aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan MTT test sonuçları

4.5. Histolojik Boyamalar

4.5.1. Hematoksilen ve Eozin Boyaması

Hücreler ile yapılan boyamalar

Kas ve kıkırdak dokularının taze ve vitrifiye edilmeleri sonrasında elde edilen hücreler H-E ile yapılan boyama sonucunda hücrelerin normal morfoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Kıkırdak dokularının 216 saat vitrifiye gruplarından elde edilen hücrelerde ise az oranda morfolojik değişiklikler belirlenmiştir (Şekil 4.3-6).



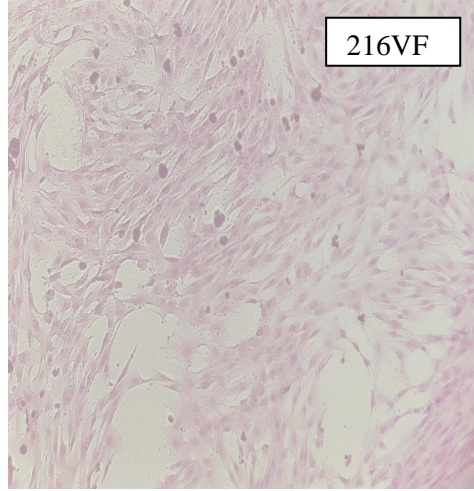
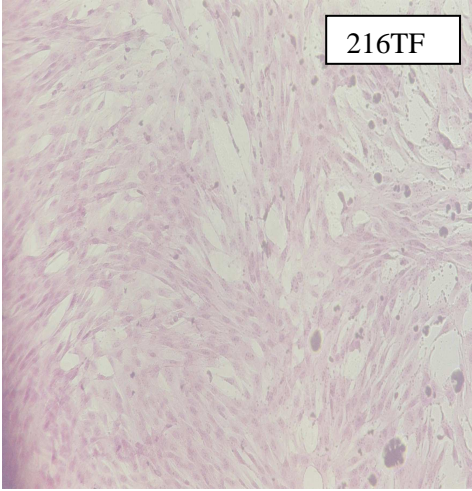
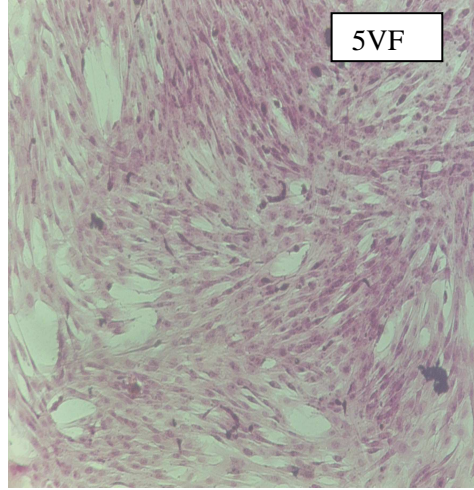
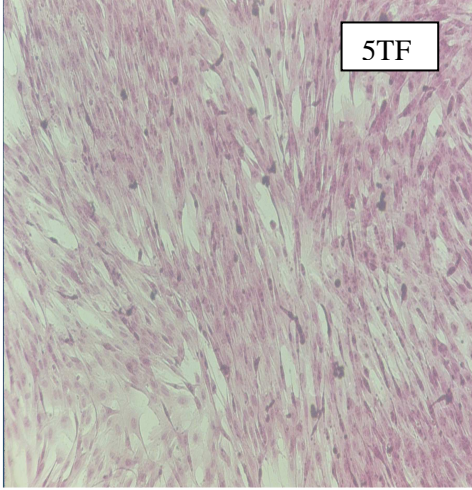
Şekil 4.3. Koyun kıkırdak dokularından elde edilen hücreler.

5TK: 5 saat taze kıkırdak hücreleri (x4).

5VK: 5 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri (x10).

216TK: 216 saat taze kıkırdak (x4).

216VK: 216 saat vitrifiye kıkırdak (x10).



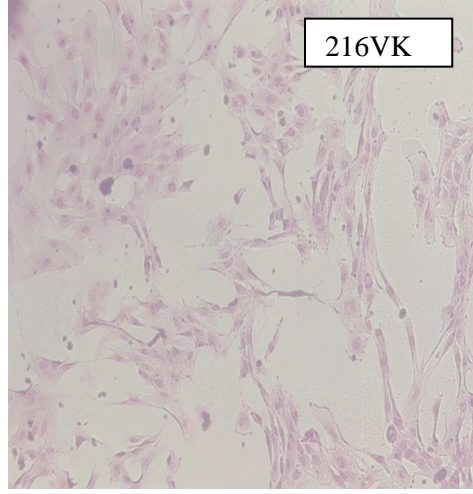
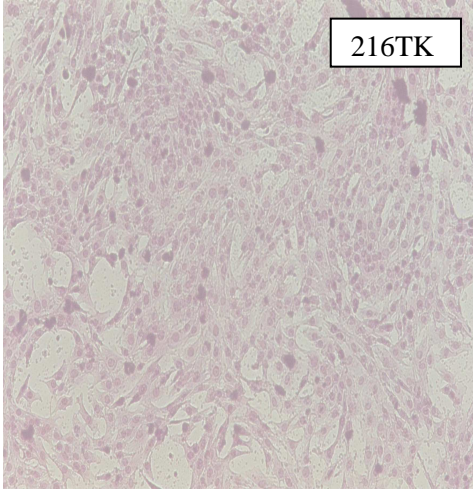
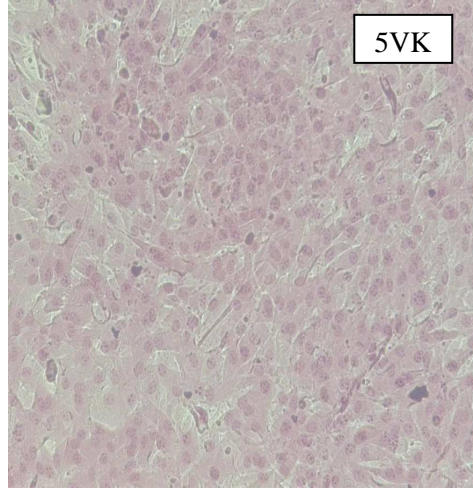
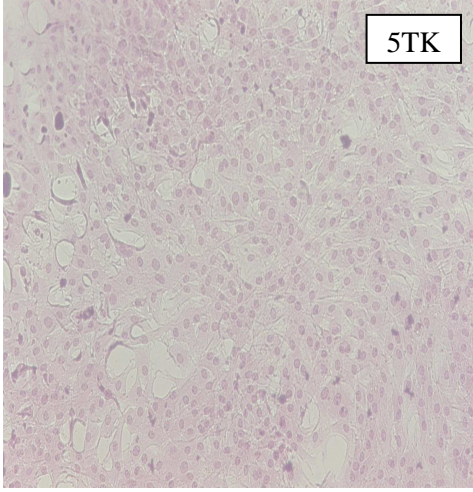
Şekil 4.4. Koyun kas dokularından elde edilen hücreler (x10).

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5VF: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216VF: 216 saat vitrifiye kas hücreleri



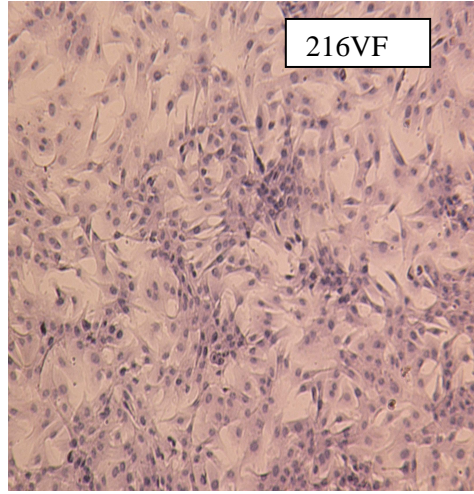
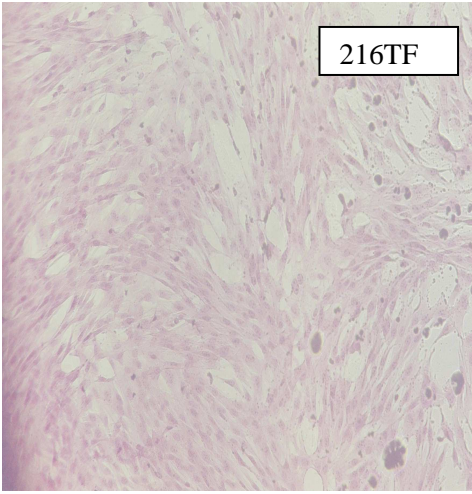
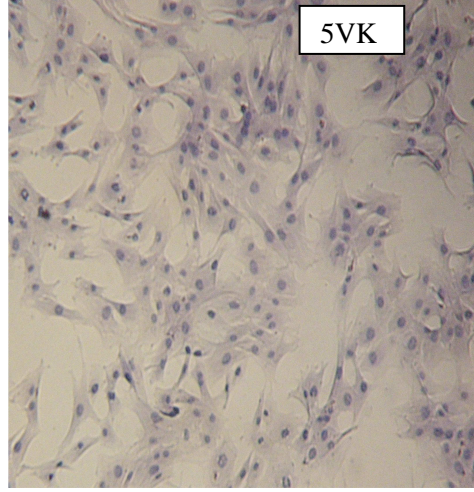
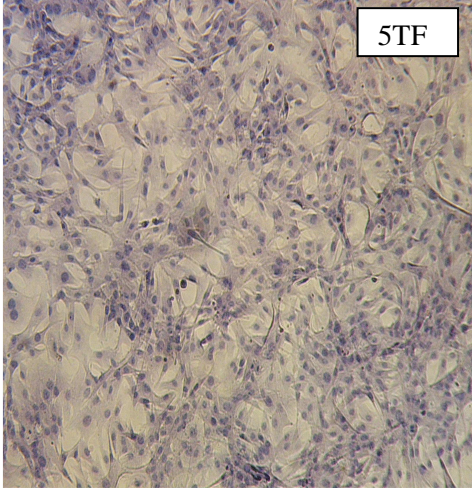
Şekil 4.5. Sığır kıkırdak dokularından elde edilen hücreler (x10).

5TK: 5 saat taze kıkırdak hücreleri

5VK: 5 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri

216TK: 216 saat taze kıkırdak

216VK: 216 saat vitrifiye kıkırdak



Şekil 4.6. Sığır kas dokularından elde edilen hücreler (x10).

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

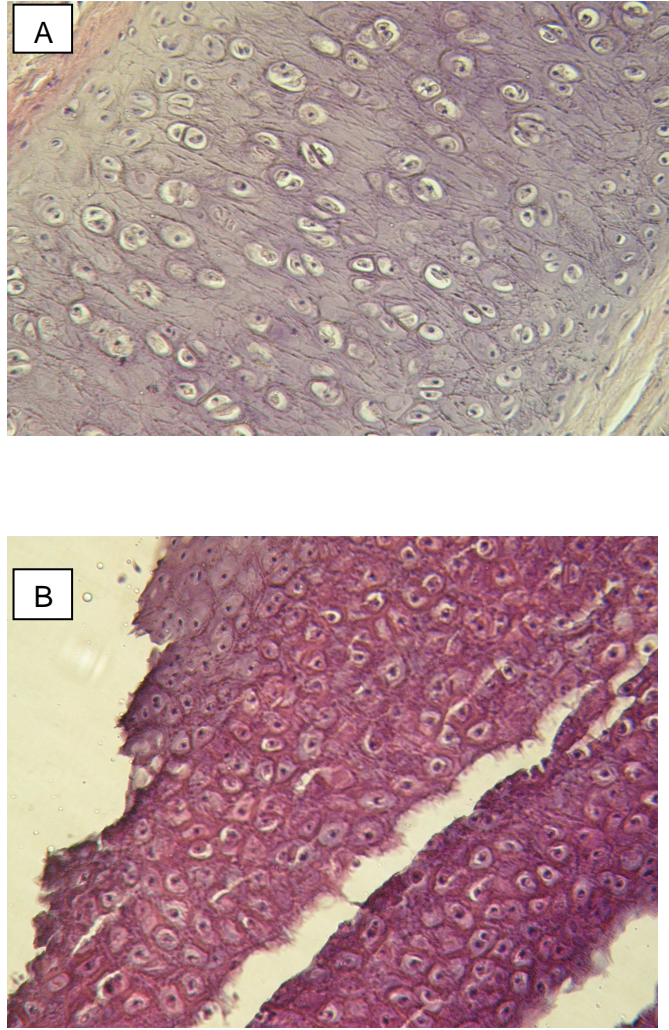
5VF: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216VF: 216 saat vitrifiye kas hücreleri

Dokularda yapılan boyamalar

Taze ve vitrifiye kıkırdak dokuları H-E boyası ile boyandıktan sonra morfolojileri incelenmiştir. Vitrifikasyona bağı olarak ekstrasellüler matriksin azalmış olduğu görülmesine rağmen taze ve vitrifiye kıkırdak dokulardaki kondrositlerin normal morfolojileri korunmuştur (Şekil 4.7).



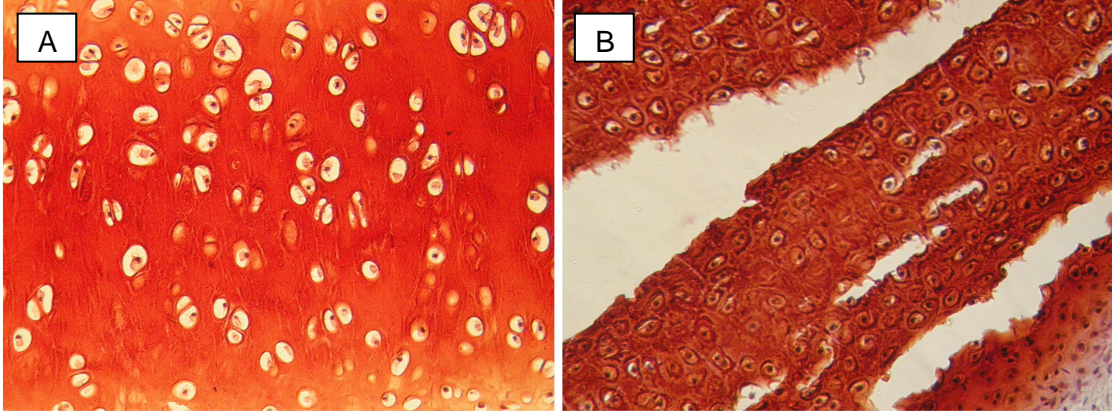
Şekil 4.7. Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularının H-E boyamaları.

A) 5 saat taze kıkırdak dokusu (x20)

B) 216 saat vitrifiye kıkırdak dokusu (x10)

4.5.2. Safranin O Boyaması

Kıkırdak dokusunun morfolojisi göstermek için kullanılan Safranin O boyası ile yapılan çalışma sonucunda taze kıkırdak dokusunun normal morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Vitrifiye kıkırdak dokusunda bazı kondrositlerin normal morfolojilerini kaybettikleri tespit edilse de dokunun genel olarak normal morfolojiye sahip olduğu ve doku bütünlüğünü kaybetmediği gösterilmiştir. Vitrifiye doku resminde görülen bölünmeler; yapı bozukluğundan değil dokunun dondurma öncesinde küçük parçalara ayrılması nedeniyle ortaya çıkmıştır (Şekil 4.8).



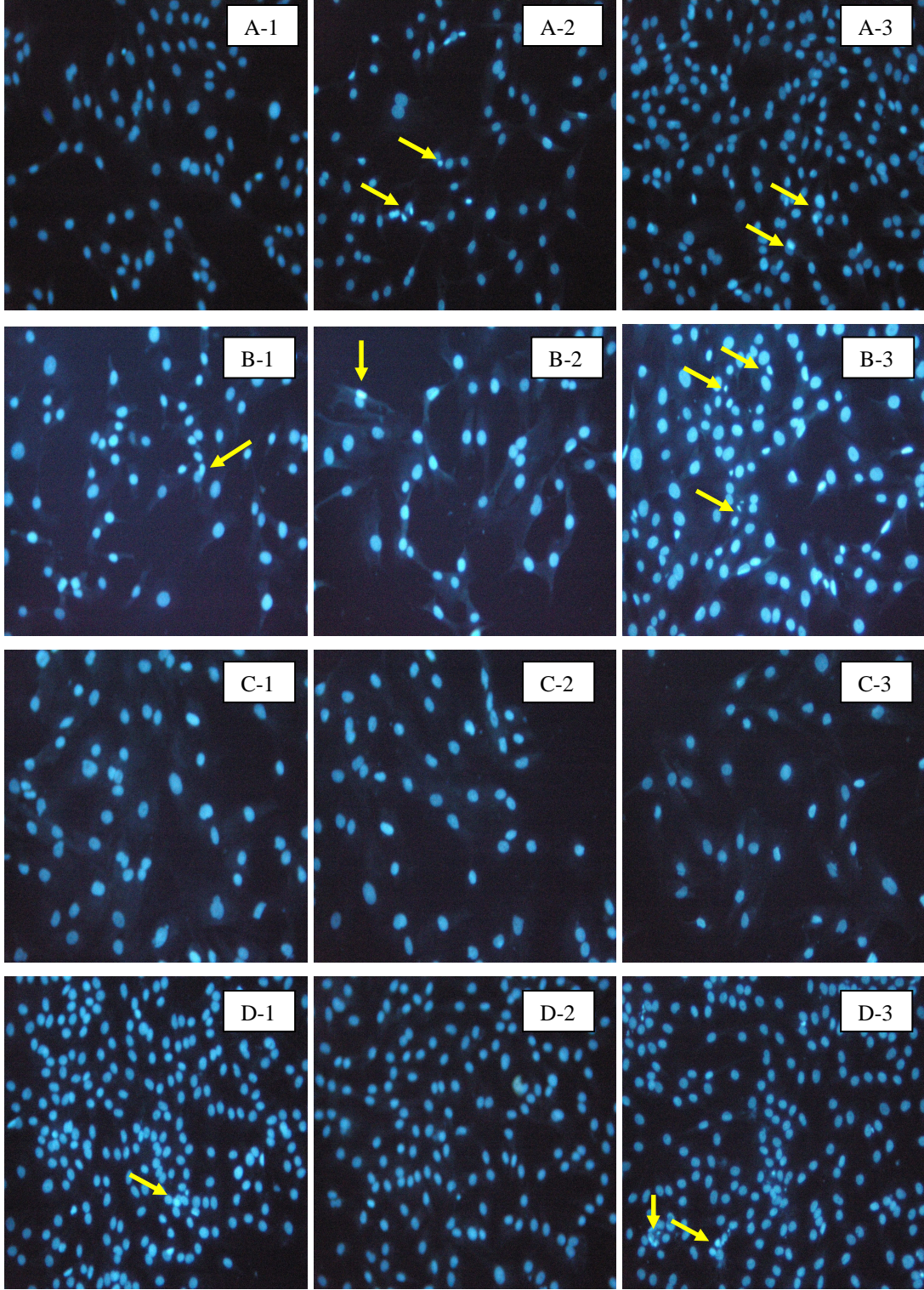
Şekil 4.8. Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularının Safranin O boyamaları. A) 5 saat taze kıkırdak dokusu (x20) B) 216 saat vitrifiye kıkırdak dokusu (x10)

4.6. İmmunfluoresans Boyamalar

4.6.1. Hoescht (HXT) 33342 Nükleus Boyaması

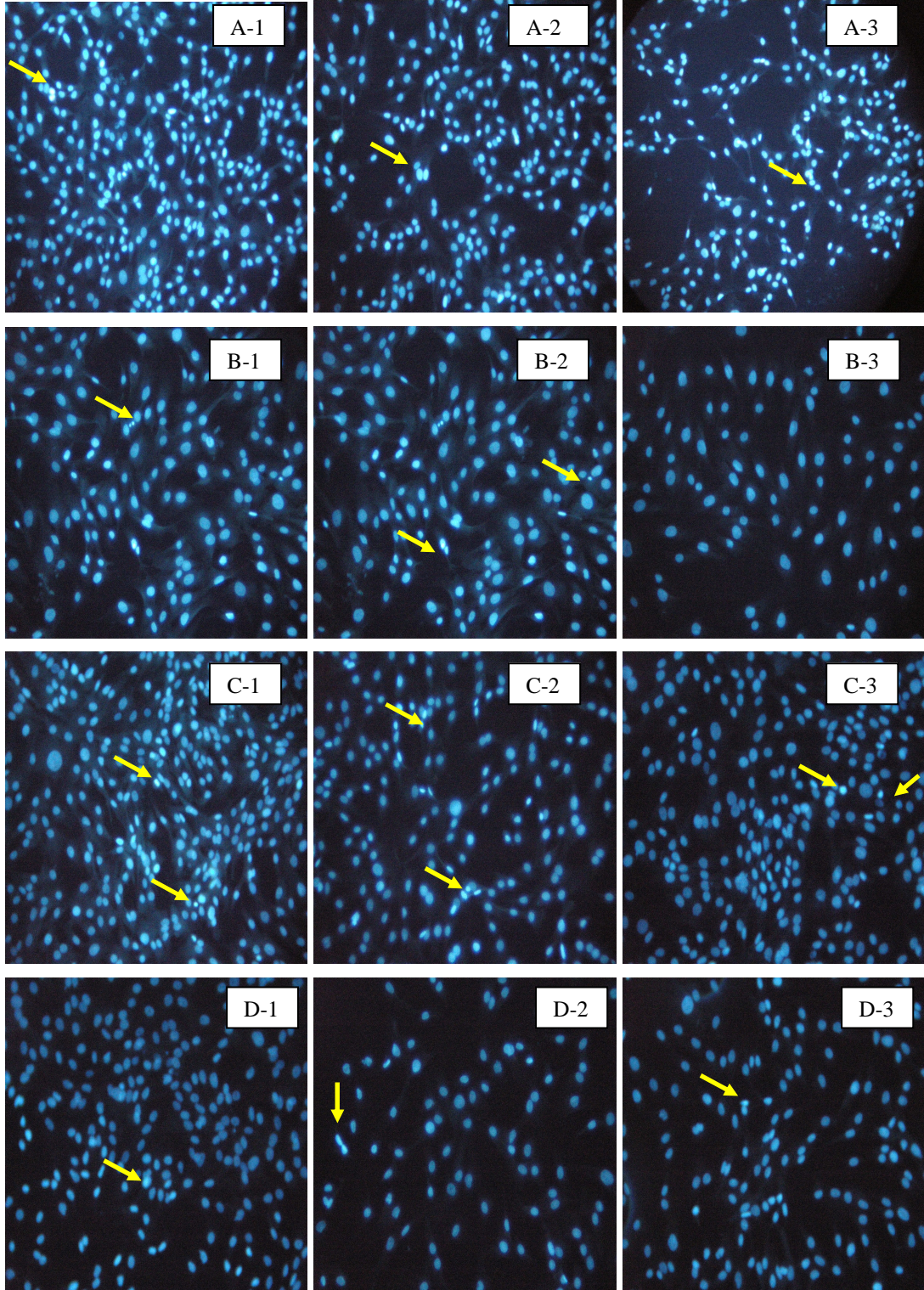
Kültürdeki hücrelerin apoptotik ve nekrotik nükleuslarını belirlemek ve canlılıklarını tespit etmek için HXT boyaması yapılmıştır. Boyama; 5 ve 216 saatlik grupların taze ve vitrifiye grupları arasında incelenmiştir. Bu hücreler ayrıca üç alt gruba daha ayrılarak serum açlığı halindeki apoptotik özellikleri de belirlenmiştir.

Hücrelerin çok az sayıda apoptotik nükleuslara sahip olduğu tespit edilmiştir. Apoptotik nükleusların boyayı daha fazla aldıkları ve parlak mavi renkte oldukları belirlenmiştir. Konfluent ve ardından üç gün boyunca %0,5 FBS ile muamele edilen gruplarda genel olarak diğer gruplara (Konfluent ve üç gün %10 FBS ve Konfluent ve üç gün %5 FBS) göre apoptotik nükleus sayılarının arttığı gözlemlense de gruplar arasında farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.9-12). Şekiller üzerindeki sarı oklar apoptotik hücreleri göstermektedir (Şekil 4.9-12).



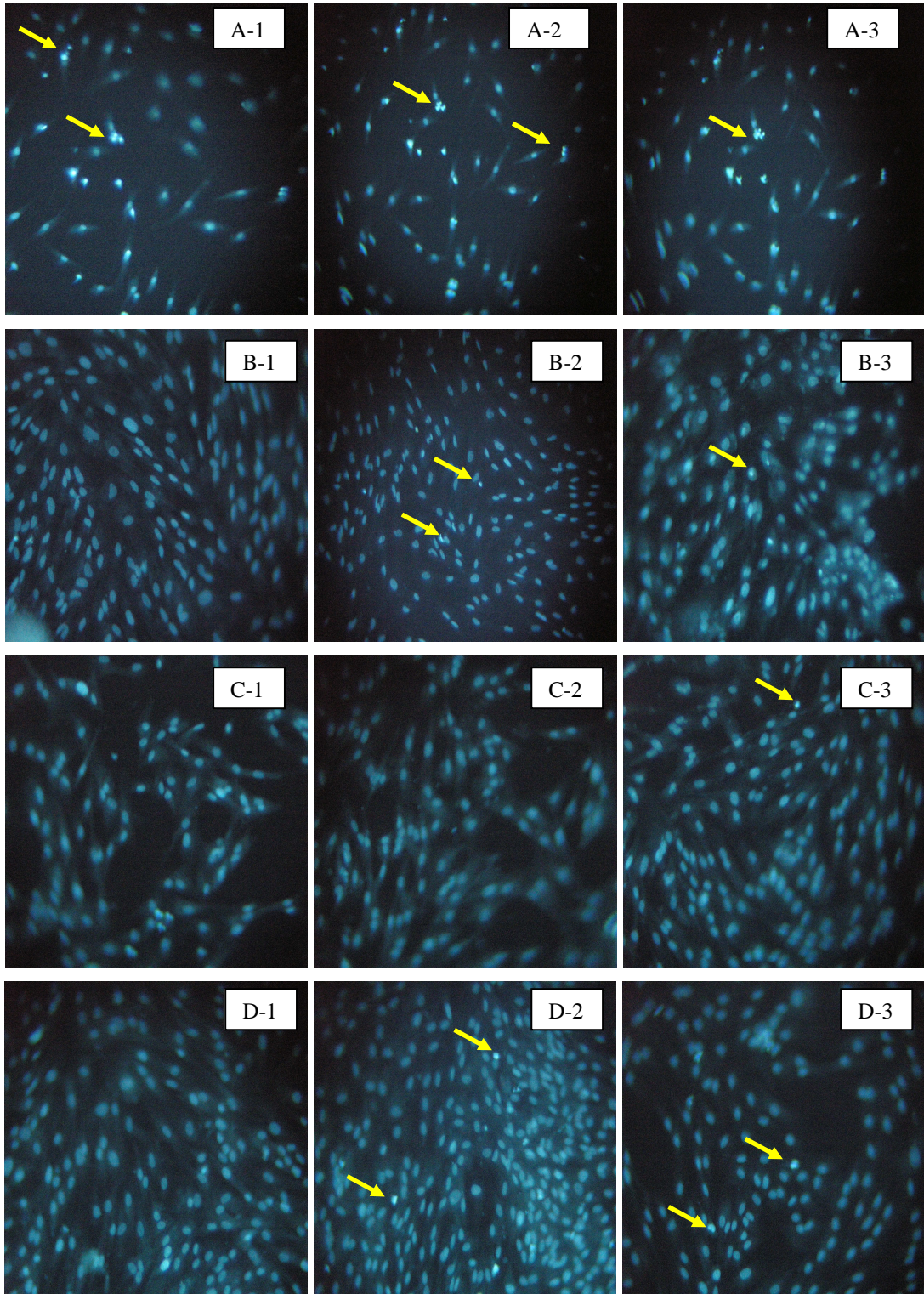
Şekil 4.9. Sığır kas dokularından elde edilen hücreler.

- A) 5TF: 5 saat taze kas hücreleri. 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
 B) 5VF: 5 saat vitrifiye kas hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
 C) 216TF: 216 saat taze kas hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
 D) 216VF: 216 saat vitrifiye kas hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün



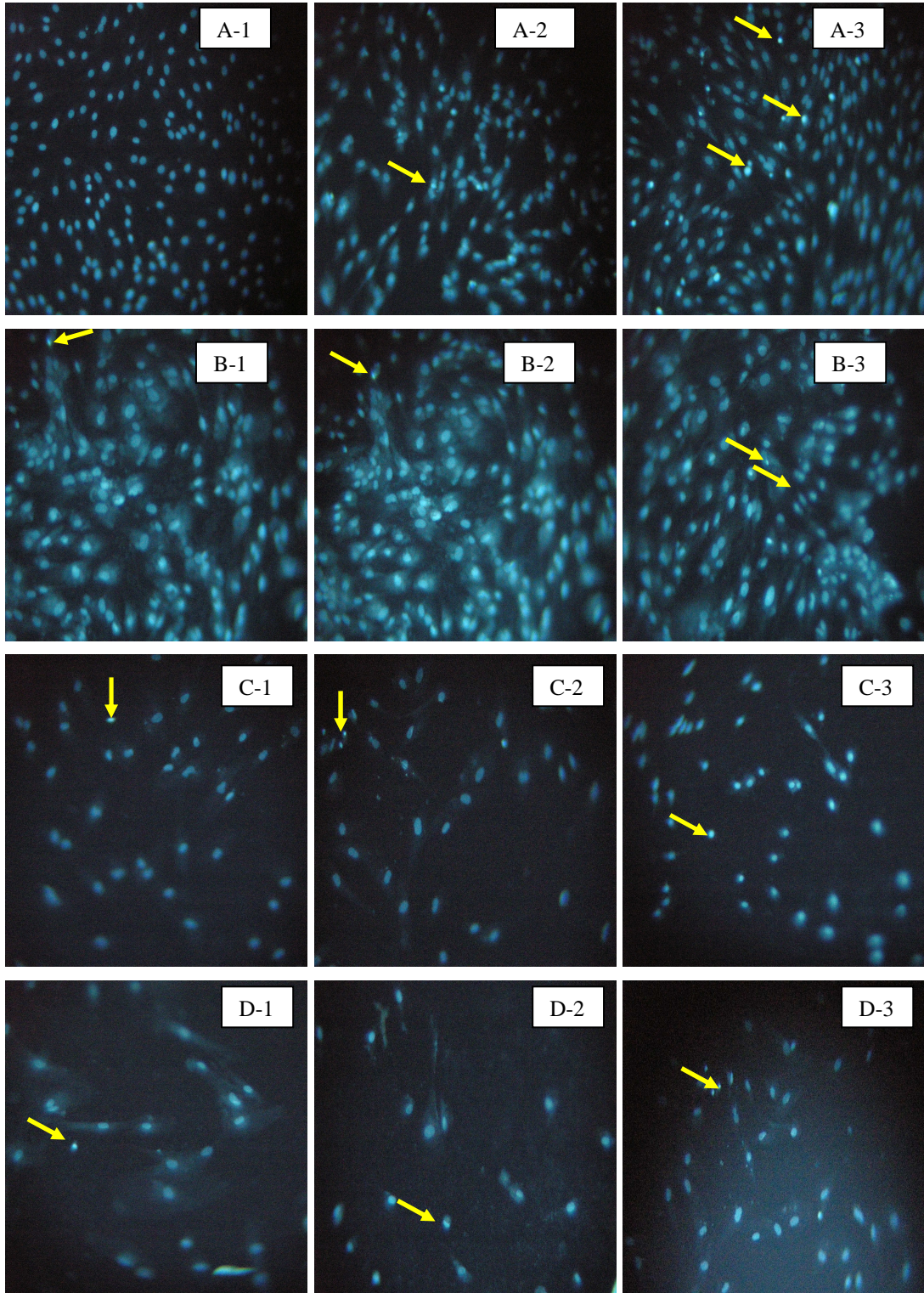
Şekil 4.10. Sığır kıkırdak dokularından elde edilen hücreler.

- A) 5TK: 5 saat taze kıkırdak hücreleri. 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
- B) 5VK: 5 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
- C) 216TK: 216 saat taze kıkırdak hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
- D) 216VK: 216 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün



Şekil 4.11. Koyun kas dokularından elde edilen hücreler.

- A) 5TF: 5 saat taze kas hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
 B) 5VF: 5 saat vitrifiye kas hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
 C) 216TF: 216 saat taze kas hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
 D) 216VF: 216 saat vitrifiye kas hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün

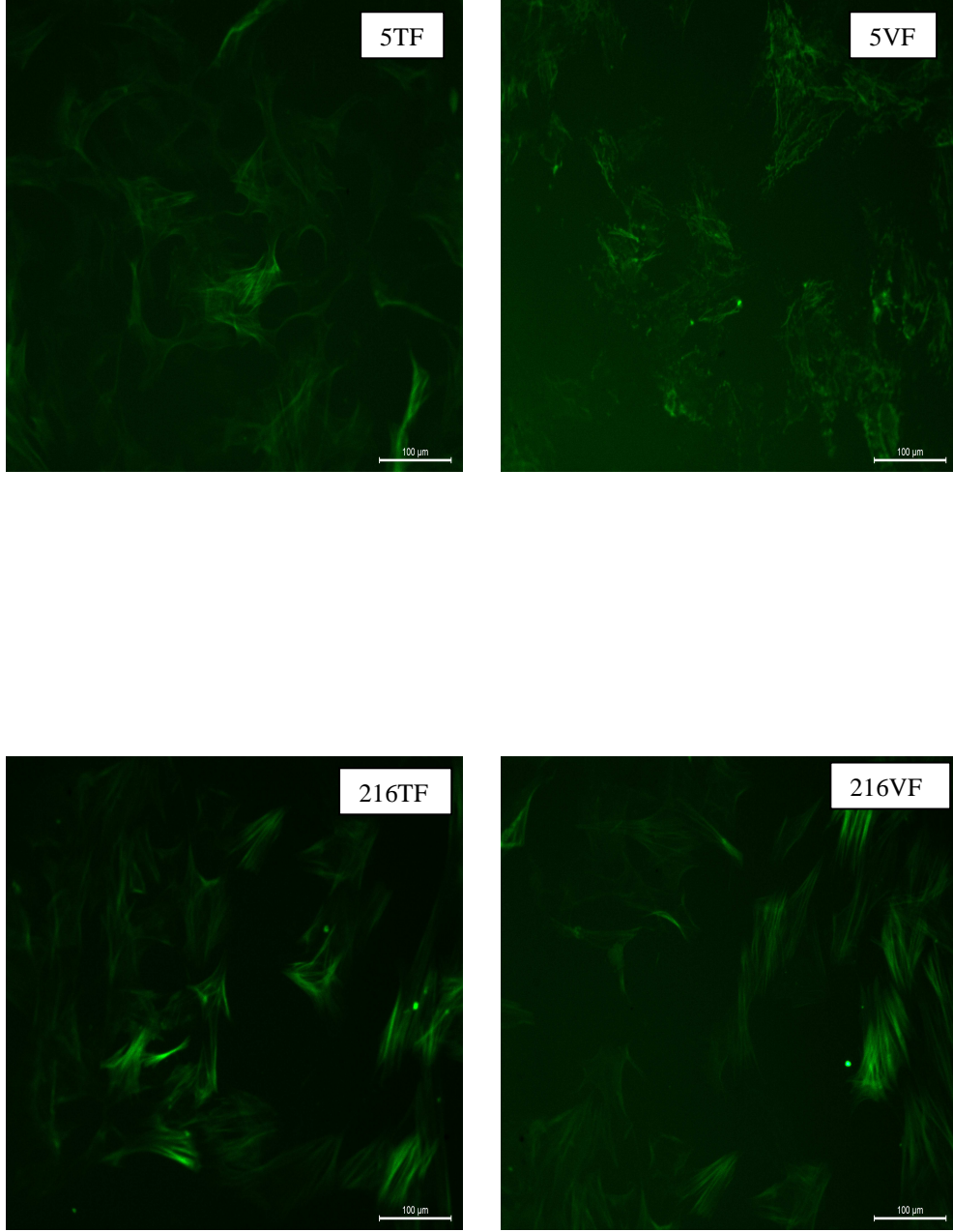


Şekil 4.12. Koyun kıkırdak dokularından elde edilen hücreler.

- A) 5TK: 5 saat taze kıkırdak hücreleri. 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
- B) 5VK: 5 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
- C) 216TK: 216 saat taze kıkırdak hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün
- D) 216VK: 216 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri 1: %10 FBS 3 gün 2: %5 FBS 3 gün 3: %0,5 FBS 3 gün

4.6.2. Primer Antikorlar ile Yapılan Boyamalar

Boyamalarda 5 ve 216 saatlik grupların taze ve vitrifiye grupları incelenmiştir. Yapılan boyamalar sonucunda Aktin ve Vimentin antikorlarında pozitif boyanma görülürken diğer antikorlarda boyanma tespit edilmemiştir. Aktin antikor boyamalarında; vitrifiye gruplarda taze gruplara ve 216 saatlik gruplarda 5 saatlik gruplara göre kuvvetli pozitif boyanma olduğu tespit edilmiştir. Vimentin antikorunda ise pozitiflik bakımından gruplar arasında genel olarak fark görülmesi de taze gruplarda ekspresyonun daha fazla olduğu görülmüştür. Kıkırdak hücrelerinin tanımlanması amacıyla yapılan Elastin boyamasında zayıf bir pozitif boyanma tespit edilmesine rağmen tatmin edici bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 4.13-20).



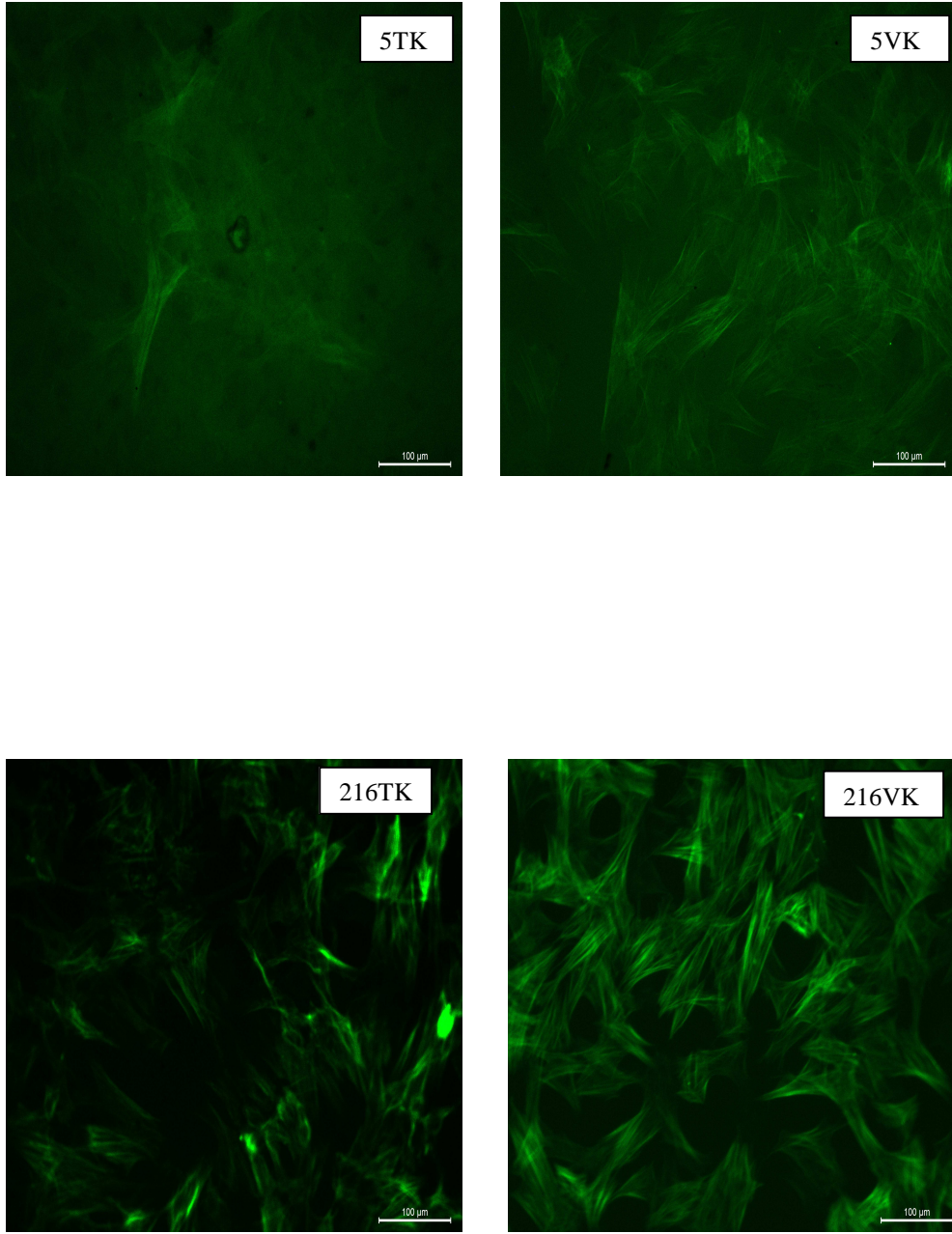
Şekil 4.13. Sığır kas hücrelerinde Aktin antikor boyama sonuçları (x20)

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5VF: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216VF: 216 saat vitrifiye kas hücreleri



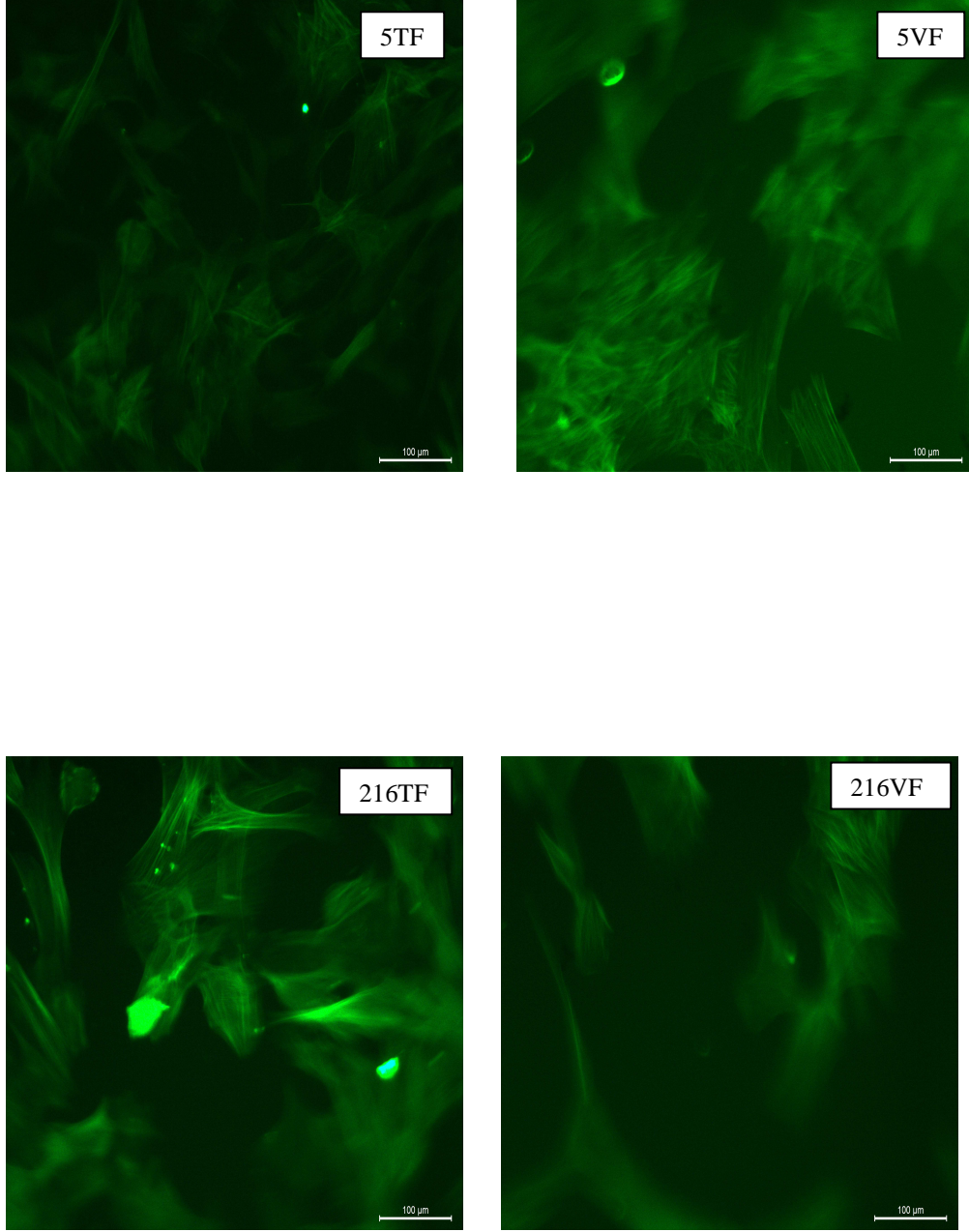
Şekil 4.14. Sığır kıkırdak hücrelerinde Aktin antikor boyama sonuçları (x10)

5TK: 5 saat taze kıkırdak hücreleri

5VK: 5 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri

216TK: 216 saat taze kıkırdak

216VK: 216 saat vitrifiye kıkırdak



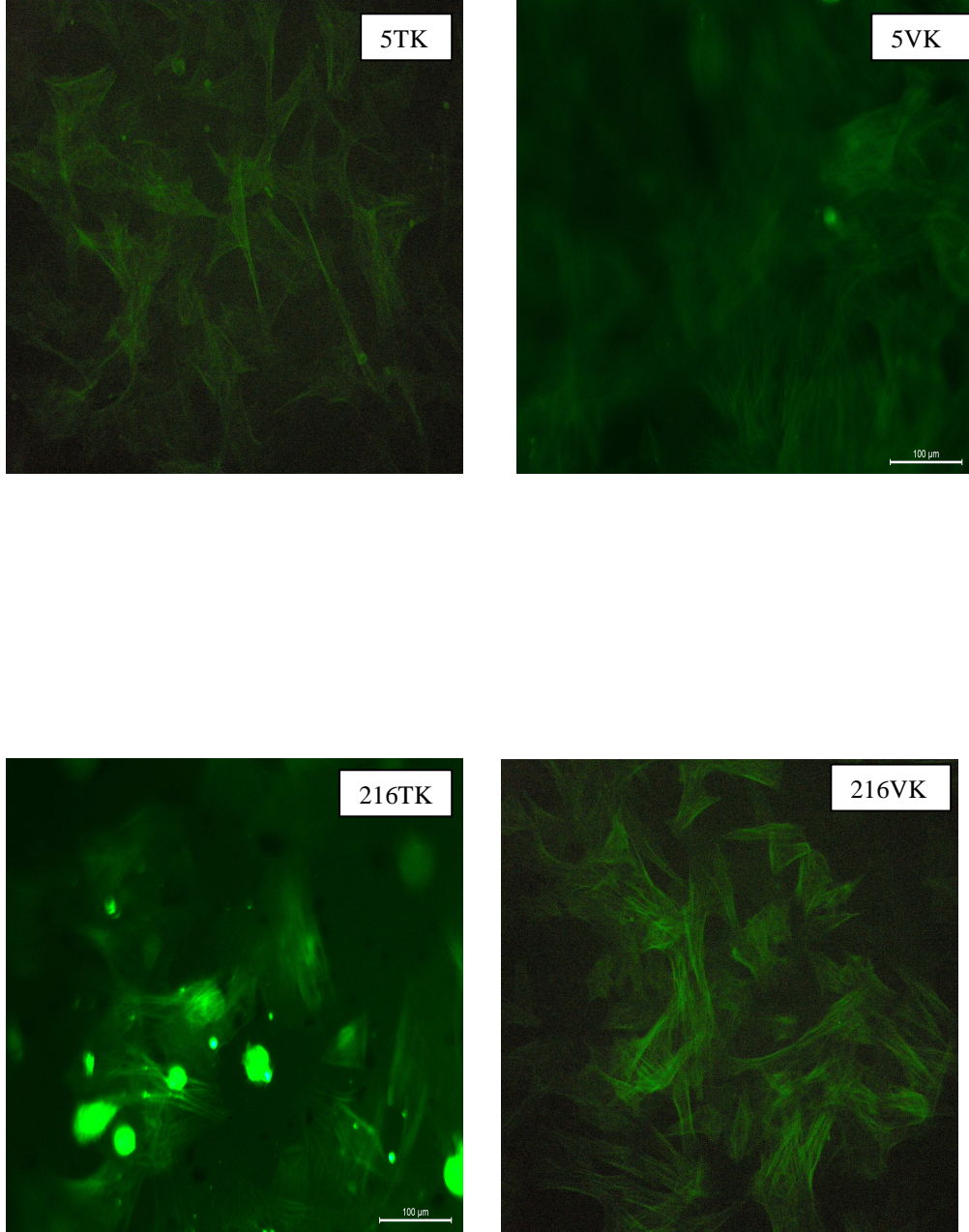
Şekil 4.15. Koyun kas hücrelerinde Aktin antikor boyama sonuçları (x20)

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5VF: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216VF: 216 saat vitrifiye kas hücreleri



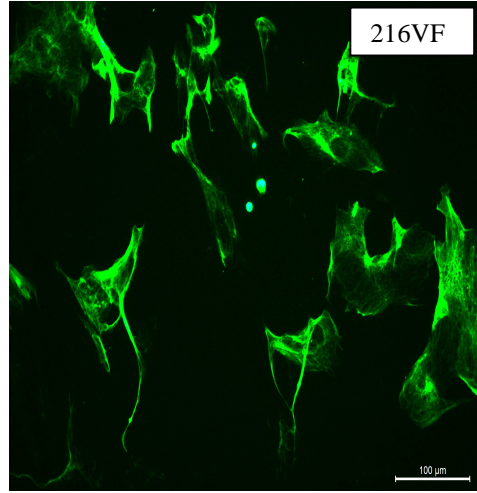
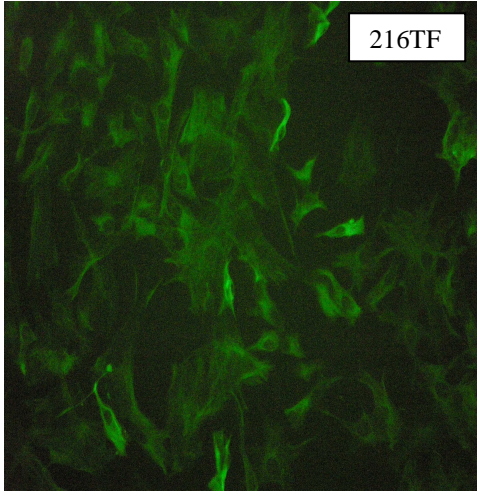
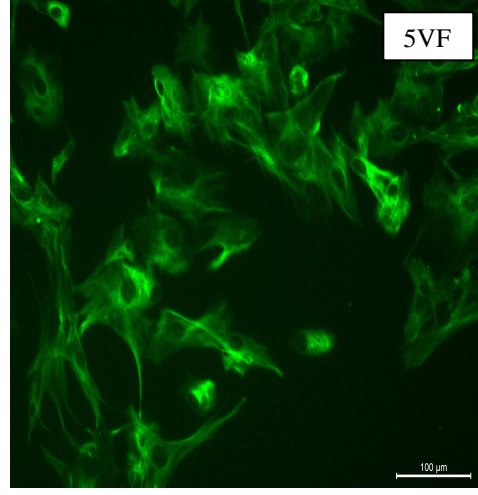
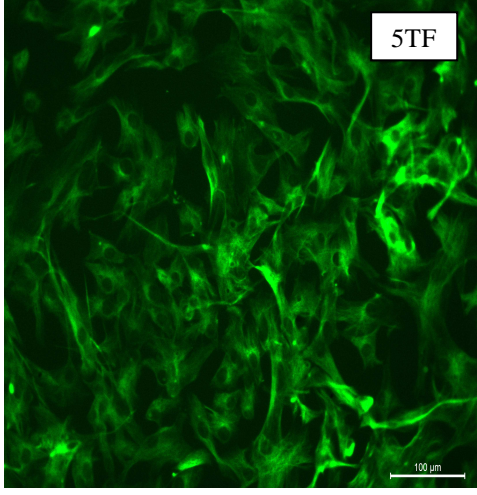
Şekil 4.16. Koyun kıkırdak hücrelerinde Aktin antikor boyama sonuçları (x10)

5TK: 5 saat taze kıkırdak hücreleri

5VK: 5 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri

216TK: 216 saat taze kıkırdak

216VK: 216 saat vitrifiye kıkırdak



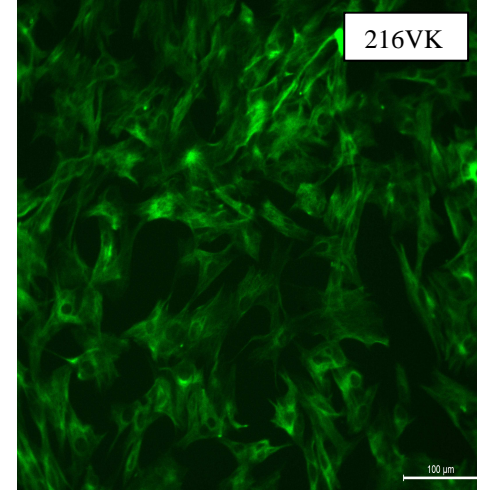
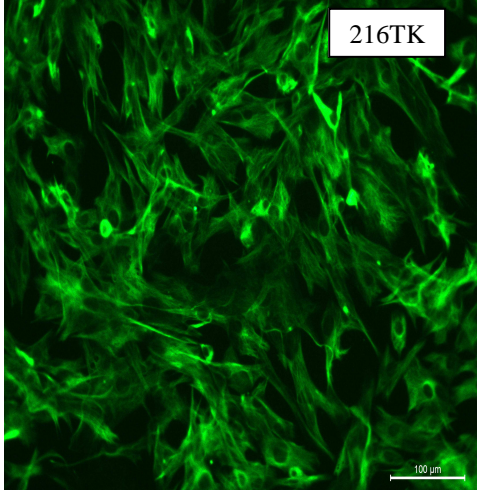
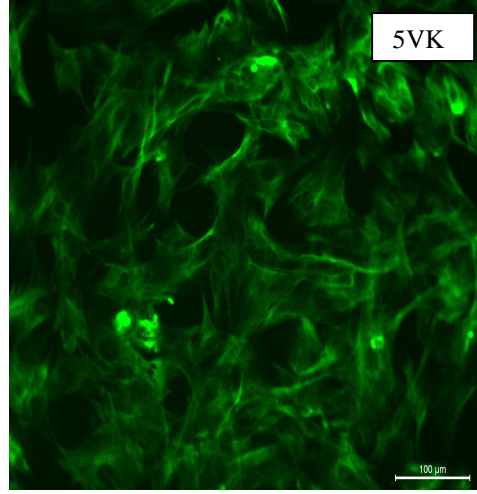
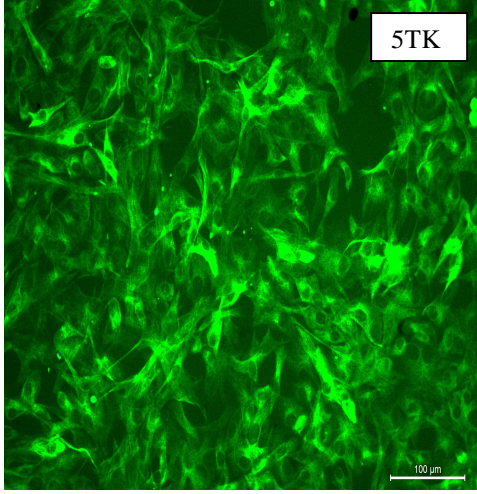
Şekil 4.17. Sığır kas hücrelerinde Vimentin antikor boyama sonuçları (x10)

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5VF: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216VF: 216 saat vitrifiye kas hücreleri



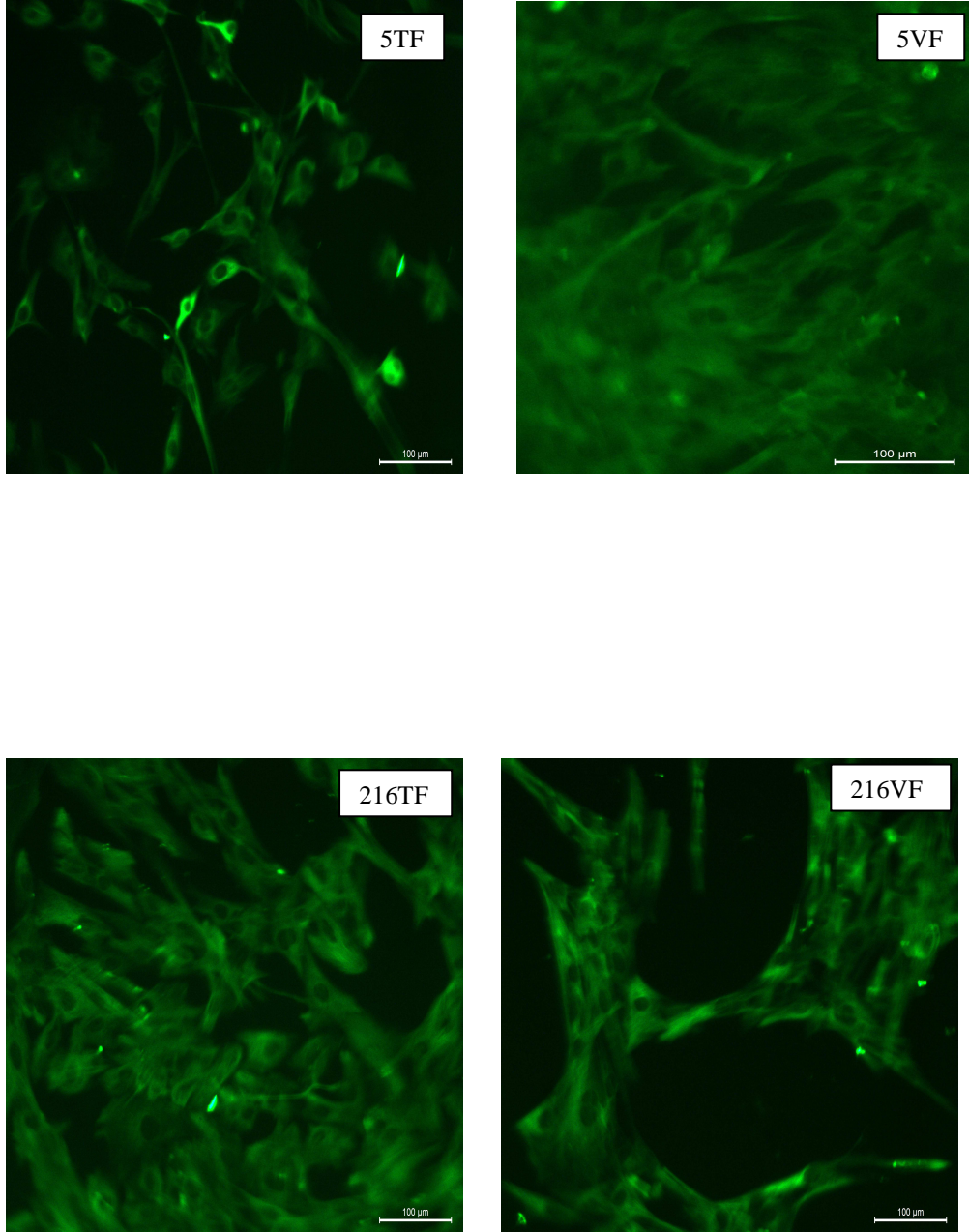
Şekil 4.18. Sığır kıkırdak hücrelerinde Vimentin antikor boyama sonuçları (x10)

5TK: 5 saat taze kıkırdak hücreleri

5VK: 5 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri

216TK: 216 saat taze kıkırdak

216VK: 216 saat vitrifiye kıkırdak



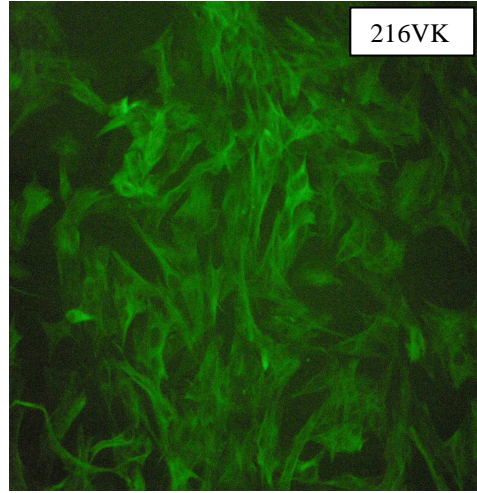
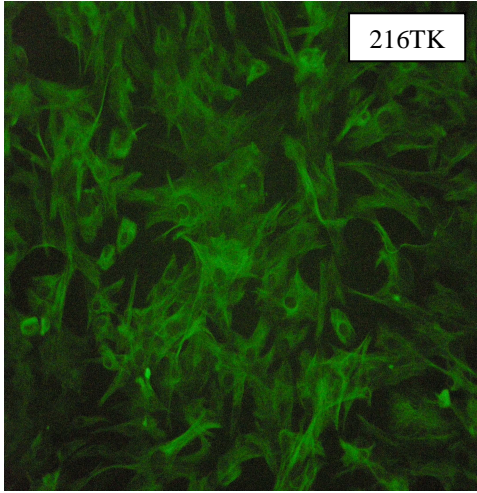
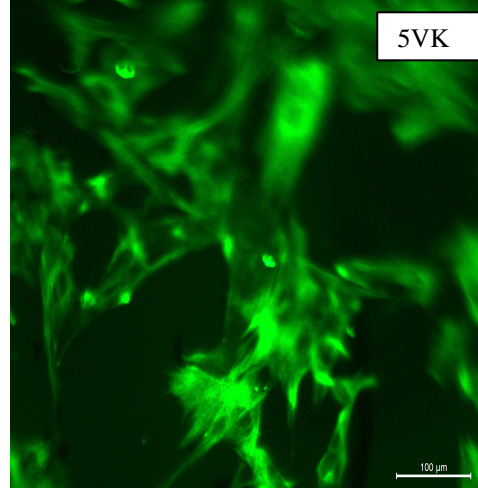
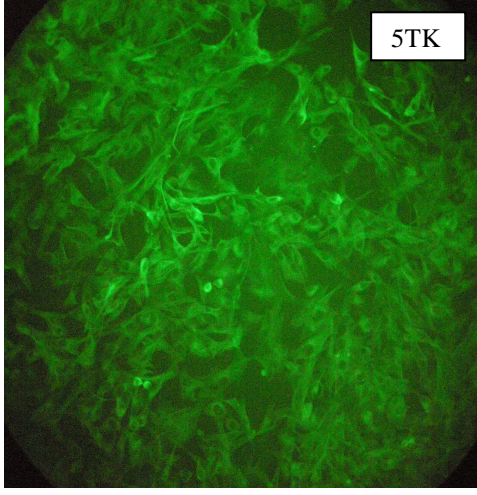
Şekil 4.19. Koyun kas hücrelerinde Vimentin antikor boyama sonuçları (x10)

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5VF: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

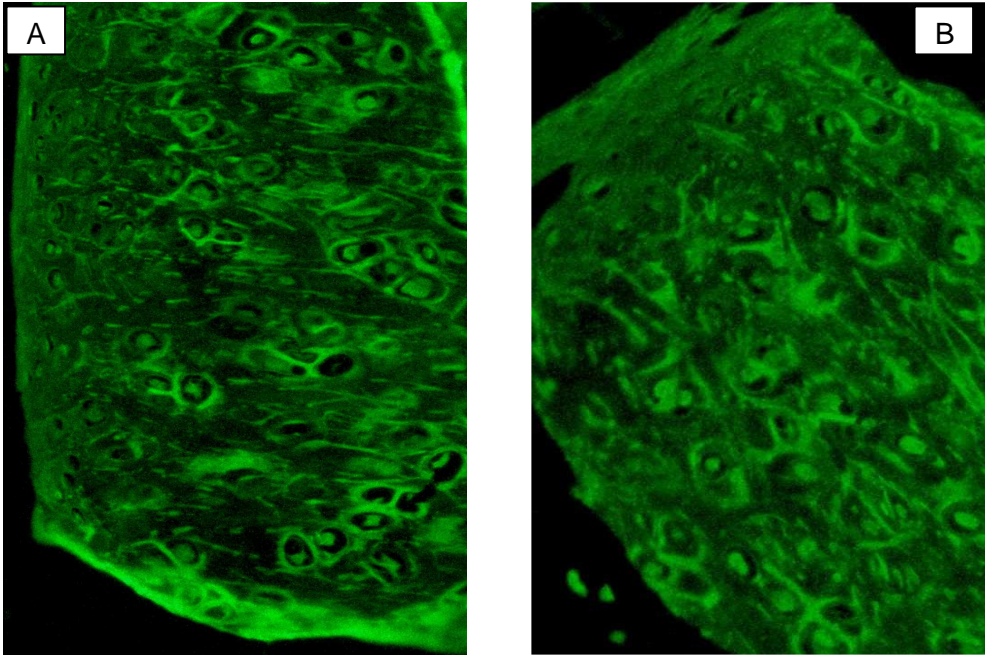
216VF: 216 saat vitrifiye kas hücreleri



Şekil 4.20. Koyun kıkırdak hücrelerinde Vimentin antikor boyama sonuçları
5TK: 5 saat taze kıkırdak hücreleri (x5)
5VK: 5 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri (x20)
216TK: 216 saat taze kıkırdak (x10)
216VK: 216 saat vitrifiye kıkırdak (x10)

4.6.3. Kıkırdak Dokularının Elastin Antikoru ile Boyanması

Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularında elastin antikoru ile boyama yapılmış ve pozitif boyanma elde edilmiştir. Kıkırdak dokusunda bulunan elastin fibriller gösterilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Taze ve vitrifiye kıkırdak dokularının Elastin boyamaları.

A) 5 saat taze kıkırdak dokusu (x10)

B) 216 saat vitrifiye kıkırdak dokusu (x20)

4.7. Flow Sitometri (Akım Sitometresi) Analizleri

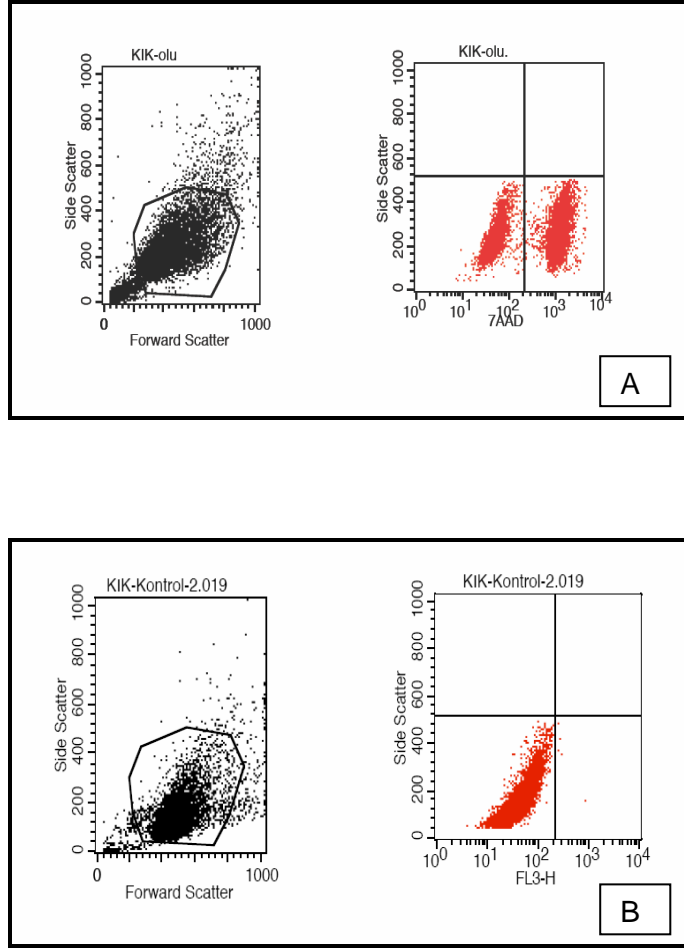
Flow sitometri analizleri esnasında boyanmamış hücreler ilk olarak okutulmuş ve canlı olan hücrelerin olduğu alanlar belirlenmiştir. Alan belirlendikten sonra boyalı olan örneklerin analizleri yapılmıştır. Analizler; belirlenen alan içerisindeki hücre oranlarını vermektedir. Flow sitometri analizleri ile hücrelerin canlılık ve hücre siklus oranları belirlenmiştir. Deney grupları olarak; 5 ve 216 saatlik grupların taze ve vitrifiye grupları incelenmiştir. Bu gruplar; uygulanan hücre senkronizasyon yöntemine göre ayrıca üç alt gruba daha ayrılmıştır. Alt gruplar aşağıdaki belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

- a) %100 Konfluent ve 3 gün boyunca %10 FBS içeren besiyeri
- b) %100 Konfluent ardından 3 gün boyunca %5 FBS içeren besiyeri
- c) %100 Konfluent ardından 3 gün boyunca %0,5 FBS içeren besiyeri

Canlılık ve hücre siklus analizleri yukarıda belirtilen gruplara göre karşılaştırmalı olarak incelenerek istatistiki analizleri yapılmıştır.

4.7.1. 7 AAD Analizi

İncelenen örneklerdeki canlı ve ölü hücre oranlarını belirlenmiştir. Negatif ve pozitif kontrol hücreleri hazırlanmıştır. Negatif kontrol olarak hazırlanan hücrelerde canlılık oranı %38,07 ve ölü hücre oranı ise %61,93 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol hücrelerinde ise canlılık oranı %99,95 ve ölü hücre oranı ise %0,05 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.22).

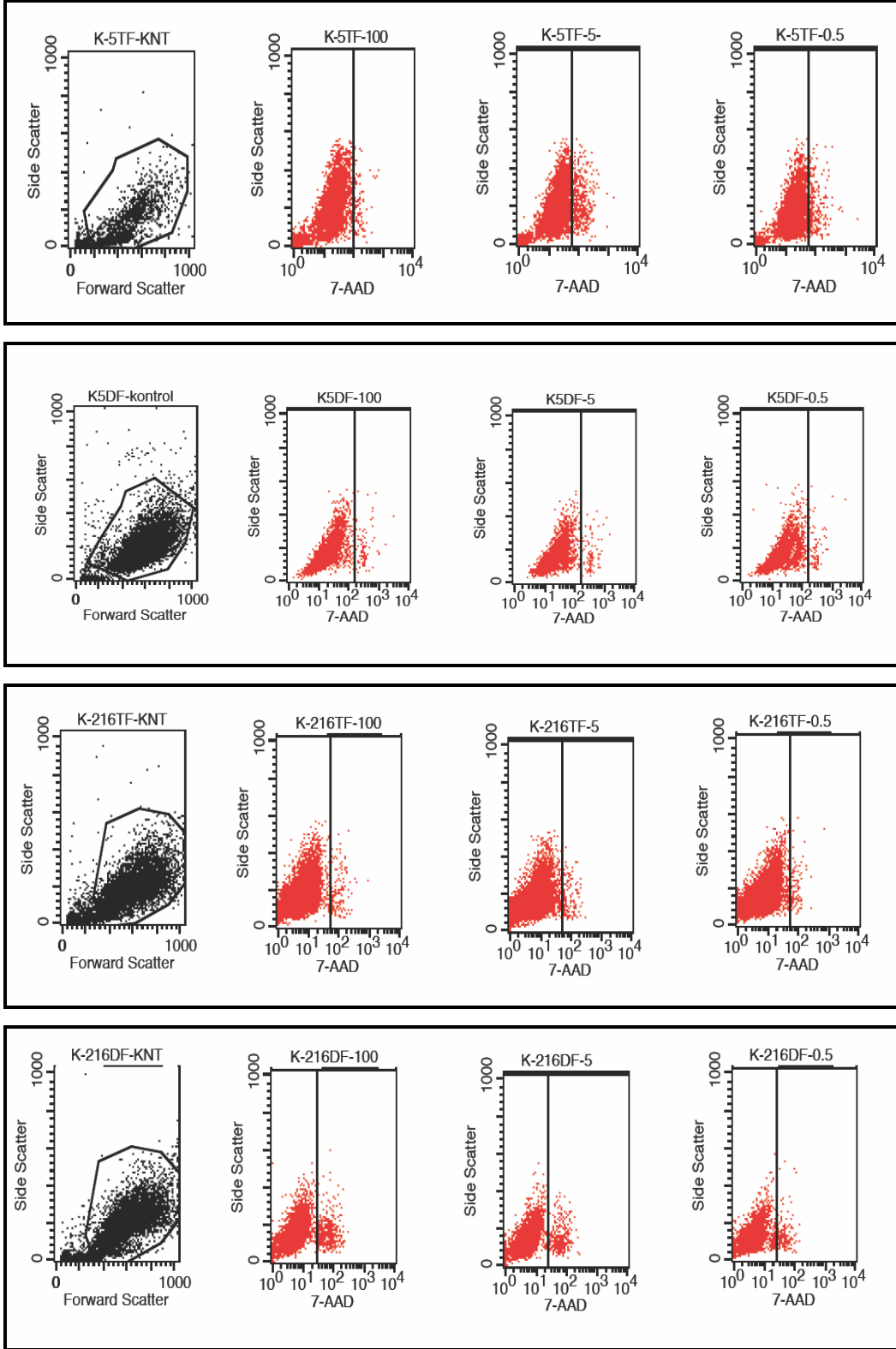


Şekil 4.22. A) Negatif kontrol (%38,07) ve B) pozitif kontrol(%99,95)

Koyun kas hücrelerinde deney grupları hücre senkronizasyon yöntemlerine göre değerlendirildiğinde; 5TF grubunda %100 ve %5 kültür koşulları arasında ve 216VF grubunda ise %100 ile %5 ve %0,5 kültür koşulları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. 216TF ve 5VF grupları içerisinde ise anlamlı fark tespit edilmemiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.23). Deney grupları canlı ve ölüm oranlarına göre değerlendirildiğinde; %100 kültür grubu diğer gruplarla anlamlı fark göstermiştir. %5 kültür grubunda ise gruplar arasında fark bulunmamıştır. %0,5 grubunda 216TF grubu diğerlerine göre yüksek canlılık oranına sahiptir ve diğer gruplarla arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.23).

Koyun kıkırdak hücrelerinde deney grupları hücre senkronizasyon yöntemlerine göre değerlendirildiğinde; 5TK ve 216VK grupları içerisinde anlamlı fark tespit edilmemiştir. 5VK ve 216TK gruplarında ise %0,5 grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.24). Deney grupları canlı ve ölüm oranlarına göre değerlendirildiğinde; %100 ve %5 kültür gruplarında 5TK grubu yüksek canlılık göstererek diğer gruplarla arasında anlamlı fark bulunmuştur. %0,5 grubunda taze ve vitrifiye gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.24).

Koyun kıkırdak ve kas hücreleri karşılaştırıldığında; 5T grubunda kas ve kıkırdak hücreleri arasında anlamlı fark gözlemlenmezken 5V, 216T ve 216V gruplarında kas ve kıkırdak hücreleri arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.23. Koyun kas hücrelerinde 7 AAD boyama sonuçları.

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5V(D)F: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216V(D)F: 216 saat vitrifiye kas hücreleri

Kültür koşulları: **100**: %10 FBS 3 gün **5**: %5 FBS 3 gün **0,5**: %0,5 FBS 3 gün

Çizelge 4.5. Koyun kas hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması

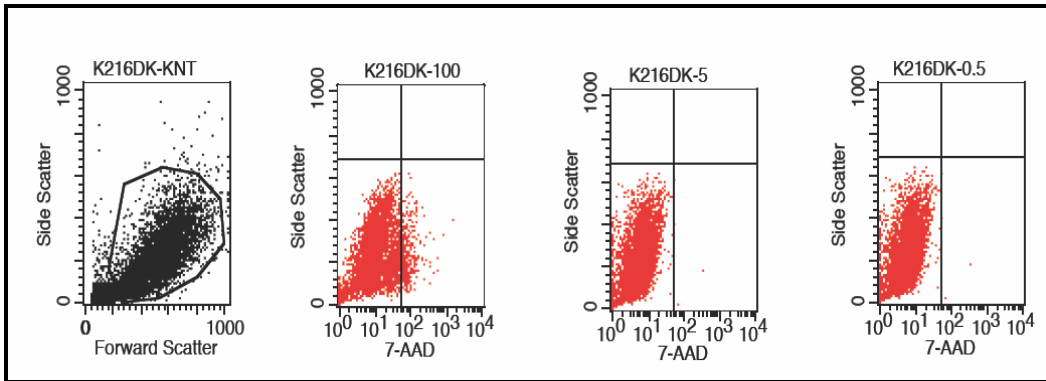
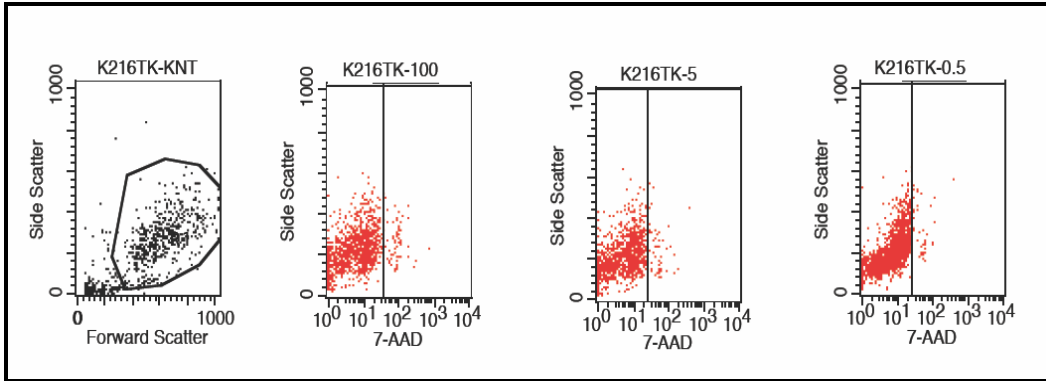
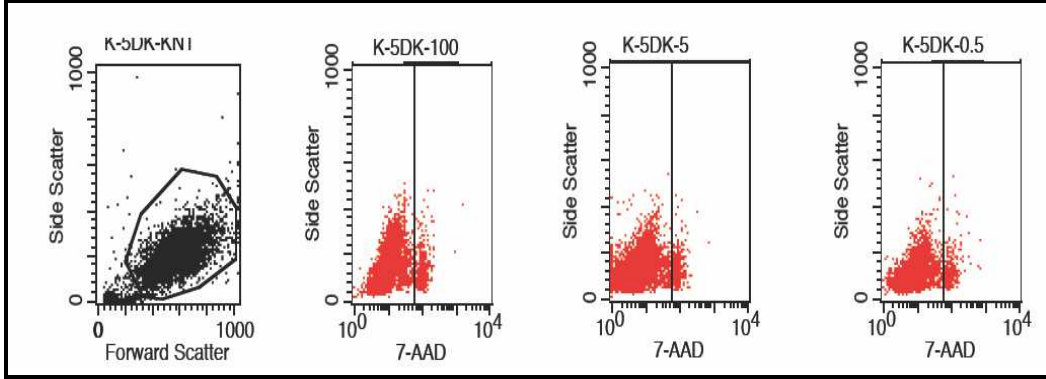
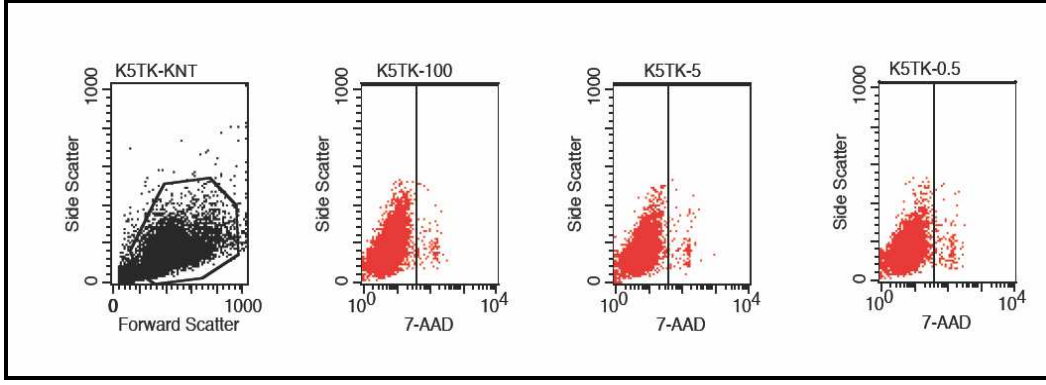
Koyun Kas Hücreleri 7AAD Sonuçları				
Kültür Koşulları	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
%100				
Canlı Hücre Oranı	98,63±0,29 ^b	98,06±0,18 ^a	97,98±0,23 ^a	94,71±0,14 ^b
Ölü Hücre Oranı	1,45 ^b	1,89 ^a	2,02 ^a	5,29 ^b
%5				
Canlı Hücre Oranı	95,53±1,49 ^a	98,30±0,23 ^a	96,71±1,84 ^a	96,22±0,68 ^a
Ölü Hücre Oranı	4,04 ^a	1,63 ^a	3,30 ^a	3,79 ^a
%0,5				
Canlı Hücre Oranı	97,12±0,13 ^a	97,88±0,23 ^a	98,67±0,15 ^a	97,44±0,88 ^a
Ölü Hücre Oranı	2,92 ^a	2,06 ^a	1,33 ^a	2,57 ^a

Canlı hücre ve ölü hücre oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

Çizelge 4.6. Koyun kas hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması

Koyun Kas Hücreleri 7AAD Sonuçları						
Deney Grupları	Kültür Koşulları					
	%100		%5		%0,5	
	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı
5T	98,63±0,29 ^b	1,45 ^b	95,53±1,49 ^a	4,04 ^a	97,12±0,13 ^{a,c}	2,92 ^{a,c}
5V	98,06±0,18 ^b	1,89 ^b	98,30±0,23 ^a	1,63 ^a	97,88±0,23 ^{a,c}	2,06 ^{a,c}
216T	97,98±0,23 ^b	2,02 ^b	96,71±1,84 ^a	3,30 ^a	98,67±0,15 ^{b,c}	1,33 ^{b,c}
216V	94,71±0,14 ^a	5,29 ^a	96,22±0,68 ^a	3,79 ^a	97,44±0,88 ^{a,c}	2,57 ^{a,c}

Canlı hücre ve ölü hücre oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b,c : p≤0,05



Şekil 4.24. Koyun kıkırdak hücrelerinde 7 AAD boyama sonuçları

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5V(D)F: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216V(D)F: 216 saat vitrifiye kas hücreleri

Kültür koşulları: **100**: %10 FBS 3 gün **5**: %5 FBS 3 gün **0,5**: %0,5 FBS 3 gün

Çizelge 4.7. Koyun kıkırdak hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması

Koyun Kıkırdak Hücreleri 7AAD Sonuçları				
Kültür Koşulları	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
%100				
Canlı Hücre Oranı	97,94±1,49 ^a	92,66±0,56 ^a	94,55±0,3 ^a	94,63±0,12 ^a
Ölü Hücre Oranı	2,06 ^a	7,34 ^b	5,45 ^a	5,37 ^a
%5				
Canlı Hücre Oranı	98,18±0,81 ^a	93,91±0,59 ^{a,c}	95,13±0,11 ^a	94,62±0,1 ^a
Ölü Hücre Oranı	1,82 ^a	6,09 ^b	4,87 ^a	5,38 ^a
%0,5				
Canlı Hücre Oranı	97,84±0,75 ^a	95,38±0,31 ^{b,c}	97,02±0,12 ^b	94,6±0,1 ^a
Ölü Hücre Oranı	2,16 ^a	4,62 ^a	2,98 ^b	5,40 ^a

Canlı hücre ve ölü hücre oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b,c : p≤0,05

Çizelge 4.8. Koyun kıkırdak hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması

Koyun Kıkırdak Hücreleri 7AAD Sonuçları						
Deney Grupları	Kültür Koşulları					
	%100		%5		%0,5	
	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı
5T	97,94±1,49 ^a	2,06 ^a	98,18±0,81 ^a	1,82 ^a	97,84±0,75 ^a	2,16 ^a
5V	92,66±0,56 ^b	7,34 ^b	93,91±0,59 ^b	6,09 ^b	95,38±0,31 ^b	4,62 ^b
216T	94,55±0,3 ^b	5,45 ^b	95,13±0,11 ^b	4,87 ^b	97,02±0,12 ^a	2,98 ^a
216V	94,63±0,12 ^b	5,37 ^b	94,62±0,1 ^b	5,38 ^b	94,6±0,1 ^b	5,40 ^b

Canlı hücre ve ölü hücre oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

Çizelge 4.9. Koyun kas ve kıkırdak hücrelerinin 7AAD sonuçlarının karşılaştırılması

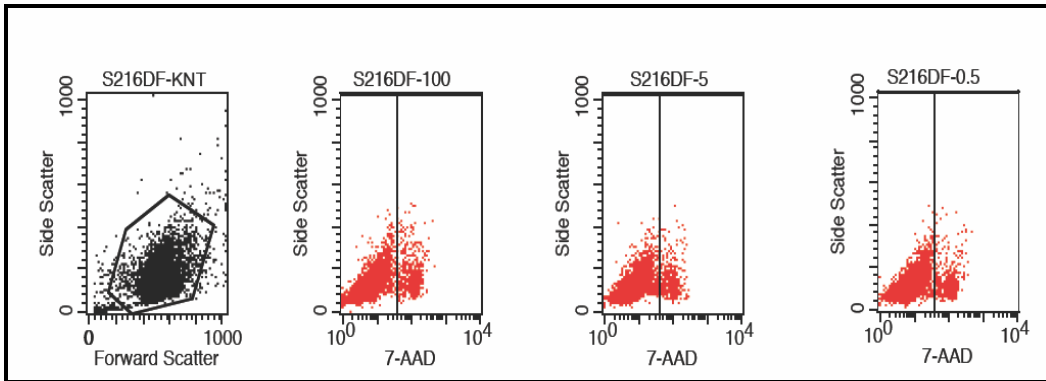
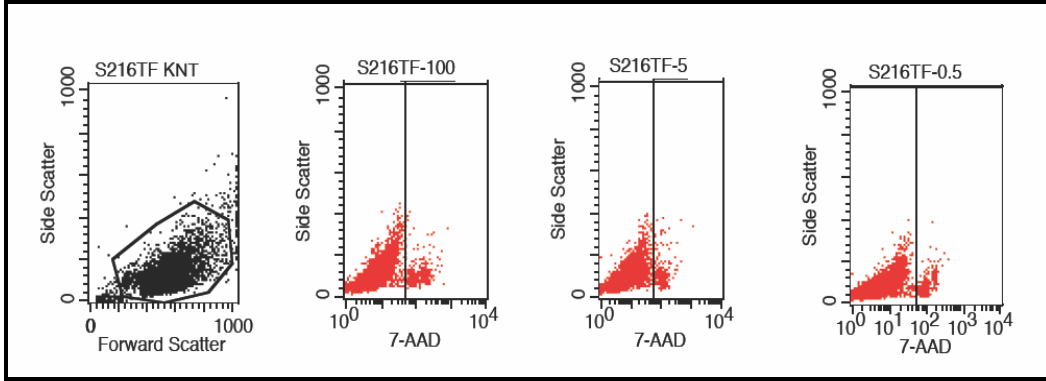
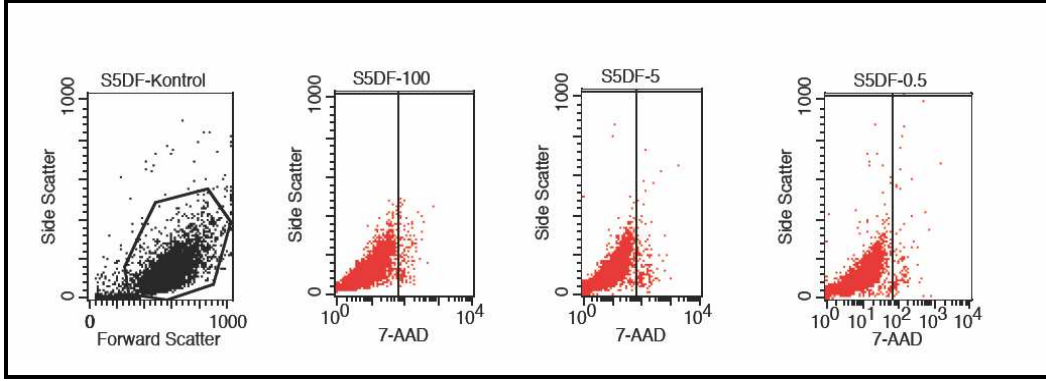
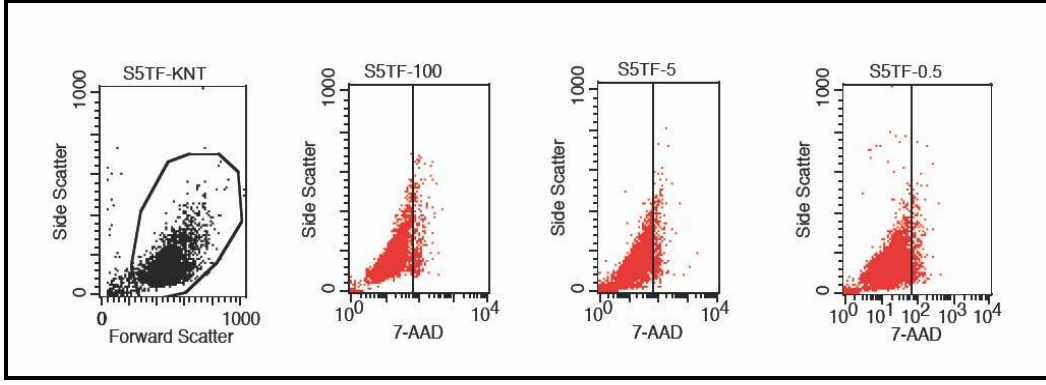
Koyun Hücre Tiplerine Göre Canlılık Sonuçları				
Hücre Tipleri	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
Kas	97,09 ^a	98,08 ^b	97,99 ^b	96,25 ^b
Kık	97,98 ^a	93,98 ^a	95,56 ^a	94,61 ^a

Sütunlar kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

Sığır kas hücrelerinde deney grupları hücre senkronizasyon yöntemlerine göre değerlendirildiğinde; 5TF grubunda %100 ve %0,5 kültür koşulları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. 5V, 216T ve 216V grupları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.25). Deney grupları canlı ve ölüm oranlarına göre değerlendirildiğinde; %100 ve %5 kültür gruplarında 5T ve 216V arasında ve 5V ve 216T arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. %0,5 grubunda 5T ve 5V arasında anlamlı fark tespit edilirken diğer gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.25).

Sığır kıkırdak hücrelerinde deney grupları hücre senkronizasyon yöntemlerine göre değerlendirildiğinde; 5TK ve 216TK grupları içerisinde anlamlı fark tespit edilmemiştir. 5VK ve 216VK gruplarında ise %5 grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.26). Deney grupları canlı ve ölüm oranlarına göre değerlendirildiğinde; %100 ve %0,5 kültür gruplarında 216VK grubu düşük canlılık göstererek diğer gruplarla arasında anlamlı bulunmuştur. %5 grubunda ise 5TK grubu yüksek canlılık göstererek diğer gruplarla arasında anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.26).

Sığır kıkırdak ve kas hücreleri karşılaştırıldığında; 5V ve 216T gruplarına ait kas ve kıkırdak hücreleri bakımından anlamlı fark gözlemlenmezken 5T ve 216V gruplarında kas ve kıkırdak hücreleri arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).



Şekil 4.25. Sığır kas hücrelerinde 7 AAD boyama sonuçları

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5V(D)F: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216V(D)F: 216 saat vitrifiye kas hücreleri

Kültür koşulları: **100**: %10 FBS 3 gün **5**: %5 FBS 3 gün **0,5**: %0,5 FBS 3 gün

Çizelge 4.10. Sığır kas hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması

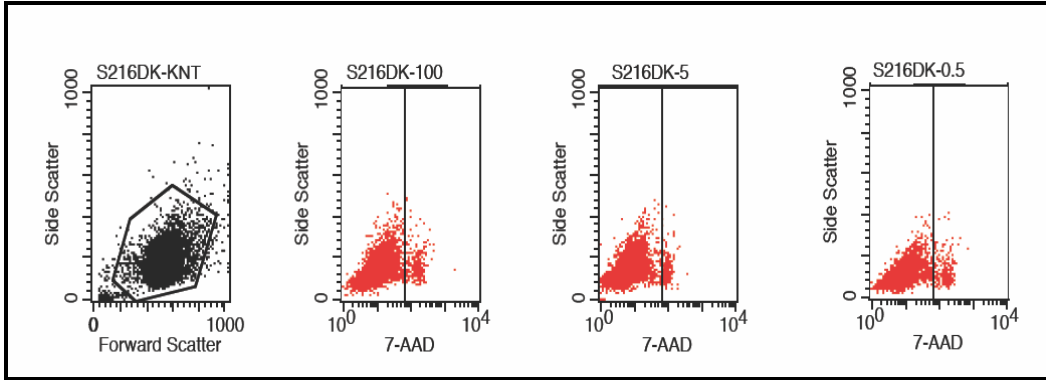
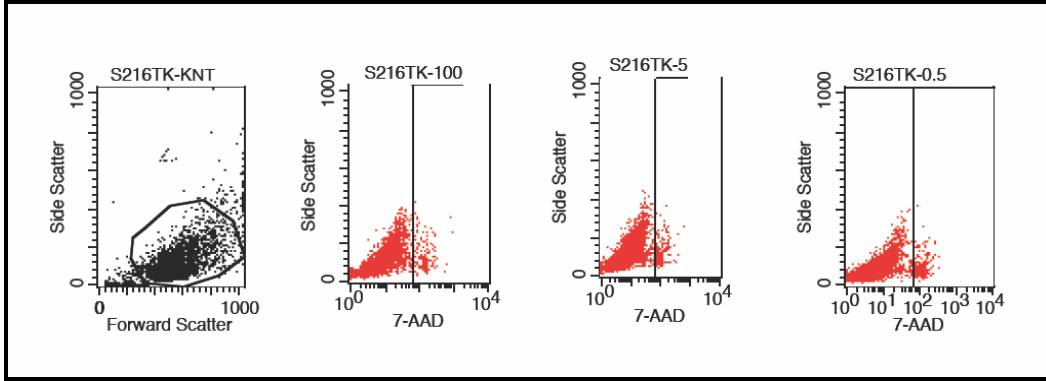
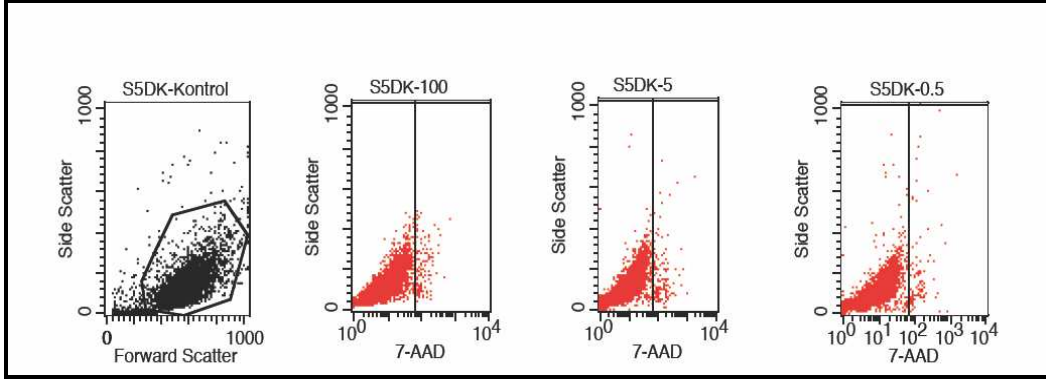
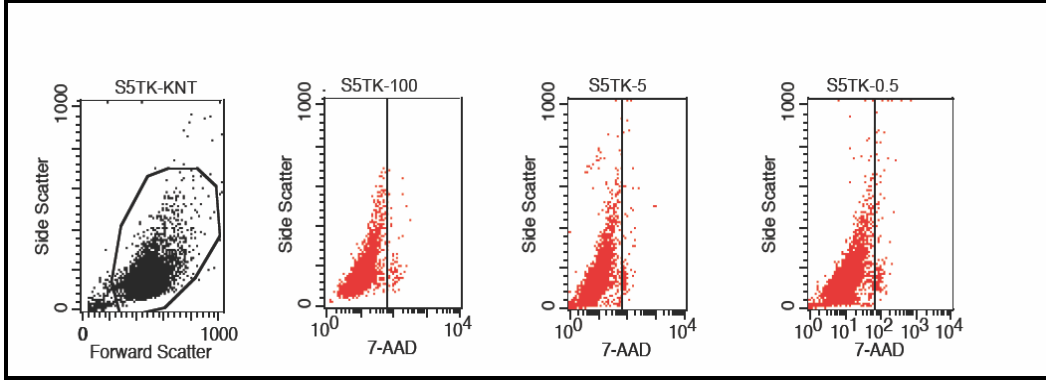
Sığır Kas Hücreleri 7AAD Sonuçları				
Kültür Koşulları	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
%100				
Canlı Hücre Oranı	94,71±0,25 ^a	98,15±1,0 ^a	97,65±0,14 ^a	95,16±1,56 ^a
Ölü Hücre Oranı	5,29 ^a	1,85 ^a	2,35 ^a	4,84 ^a
%5				
Canlı Hücre Oranı	94,94±0,05 ^a	98,17±0,88 ^a	98,07±1,03 ^a	95,62±1,02 ^a
Ölü Hücre Oranı	5,06 ^a	1,83 ^a	1,93 ^a	4,38 ^a
%0,5				
Canlı Hücre Oranı	95,34±0,31 ^b	98,29±0,62 ^a	96,83±0,69 ^a	95,06±1,13 ^a
Ölü Hücre Oranı	4,66 ^b	1,71 ^a	3,17 ^a	4,94 ^a

Canlı hücre ve ölü hücre oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

Çizelge 4.11. Sığır kas hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması

Sığır Kas Hücreleri 7AAD Sonuçları						
Deney Grupları	Kültür Koşulları					
	%100		%5		%0,5	
	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı
5T	94,71±0,25 ^a	5,29 ^a	94,94±0,05 ^a	5,06 ^a	95,34±0,31 ^{b,c}	4,66 ^{b,c}
5V	98,15±1,0 ^b	1,85 ^b	98,17±0,88 ^b	1,83 ^b	98,29±0,62 ^a	1,71 ^a
216T	97,65±0,14 ^b	2,35 ^b	98,07±1,03 ^b	1,93 ^b	96,83±0,69 ^{a,c}	3,17 ^{a,c}
216V	95,16±1,56 ^a	4,84 ^a	95,62±1,02 ^a	4,38 ^a	95,06±1,13 ^{a,c}	4,94 ^{a,c}

Canlı hücre ve ölü hücre oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b,c : p≤0,05



Şekil 4.26. Sığır kıkırdak hücrelerinde 7 AAD boyama sonuçları

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5V(D)F: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216V(D)F: 216 saat vitrifiye kas hücreleri

Kültür koşulları: **100**: %10 FBS 3 gün **5**: %5 FBS 3 gün **0,5**: %0,5 FBS 3 gün

Çizelge 4.12. Sığır kıkırdak hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması

Sığır Kıkırdak Hücreleri 7AAD Sonuçları				
Kültür Koşulları	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
%100				
Canlı Hücre oranı	99,11±0,08 ^a	97,99±0,25 ^a	98,84±1,07 ^a	96,78±0,05 ^a
Ölü Hücre Oranı	0,89 ^a	2,01 ^a	1,16 ^a	3,22 ^a
%5				
Canlı Hücre oranı	99,21±0,49 ^a	98,82±0,12 ^b	98,56±0,51 ^a	98,22±0,17 ^b
Ölü Hücre Oranı	0,79 ^a	1,18 ^b	1,44 ^a	1,78 ^b
%0,5				
Canlı Hücre oranı	98,48±0,18 ^a	98,0±0,11 ^a	98,09±0,17 ^a	96,78±0,06 ^a
Ölü Hücre Oranı	1,52 ^a	2,00 ^a	1,91 ^a	3,22 ^a

Canlı hücre ve ölü hücre oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

Çizelge 4.13. Sığır kıkırdak hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması

Sığır Kıkırdak Hücreleri 7AAD Sonuçları						
Deney Grupları	Kültür Koşulları					
	%100		%5		%0,5	
	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı	Canlı Hücre Oranı	Ölü Hücre Oranı
5T	99,11±0,08 ^a	0,89 ^a	99,21±0,49 ^a	0,79 ^a	98,48±0,18 ^a	1,52 ^a
5V	97,99±0,25 ^a	2,01 ^a	98,82±0,12 ^b	1,18 ^b	98,0±0,11 ^a	2,00 ^a
216T	98,84±1,07 ^a	1,16 ^a	98,56±0,51 ^b	1,44 ^b	98,09±0,17 ^a	1,91 ^a
216V	96,78±0,05 ^b	3,22 ^b	98,22±0,17 ^b	1,78 ^b	96,78±0,06 ^b	3,22 ^b

Canlı hücre ve ölü hücre oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

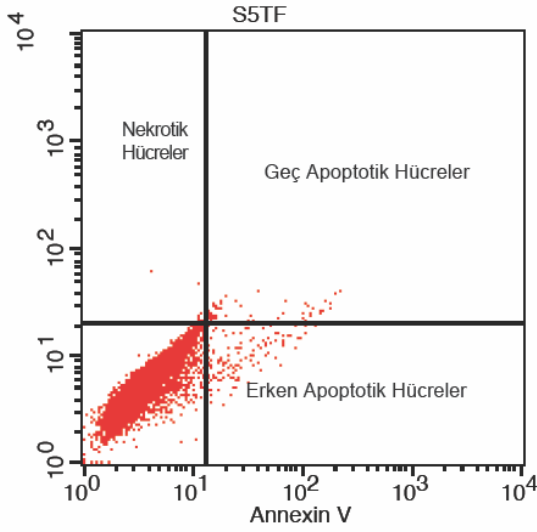
Çizelge 4.14. Sığır kas ve kıkırdak hücrelerinin 7AAD sonuçlarının karşılaştırılması

Sığır Hücre Tiplerine Göre Canlılık Sonuçları				
Hücre Tipleri	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
Kas	95,00 ^a	98,21 ^a	97,52 ^a	95,28 ^a
Kık	98,93 ^b	98,27 ^a	98,50 ^a	97,26 ^b

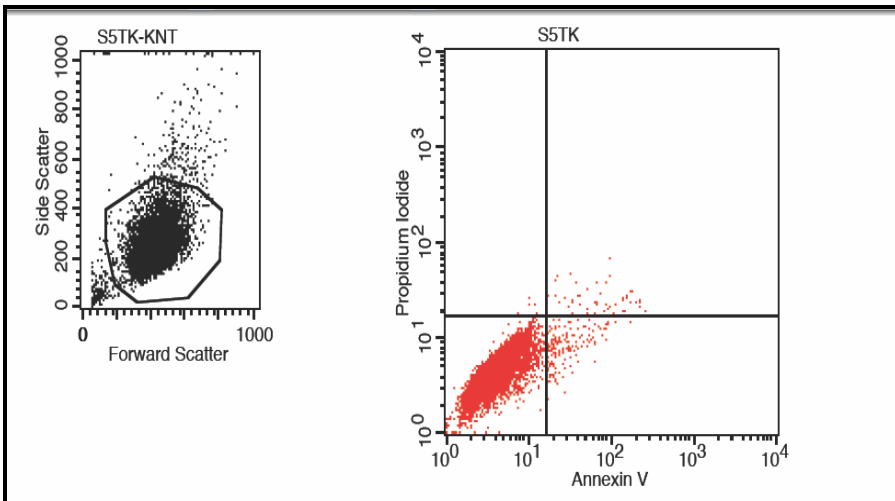
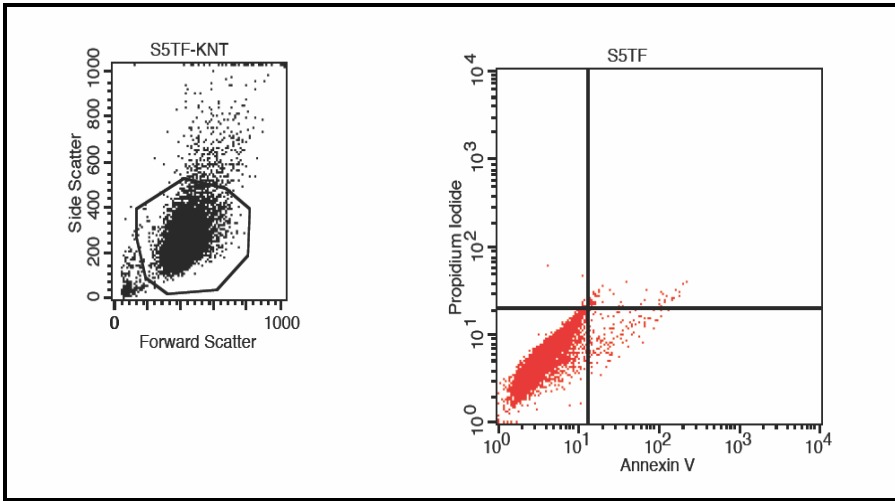
Sütunlar kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

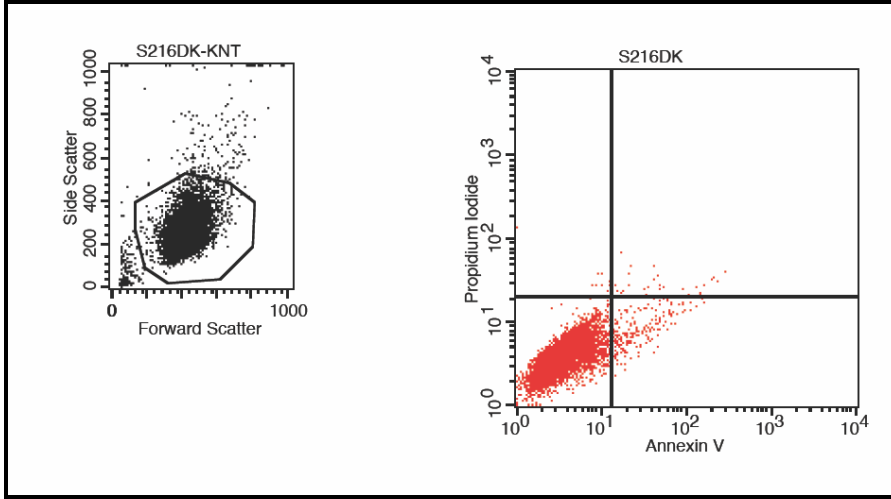
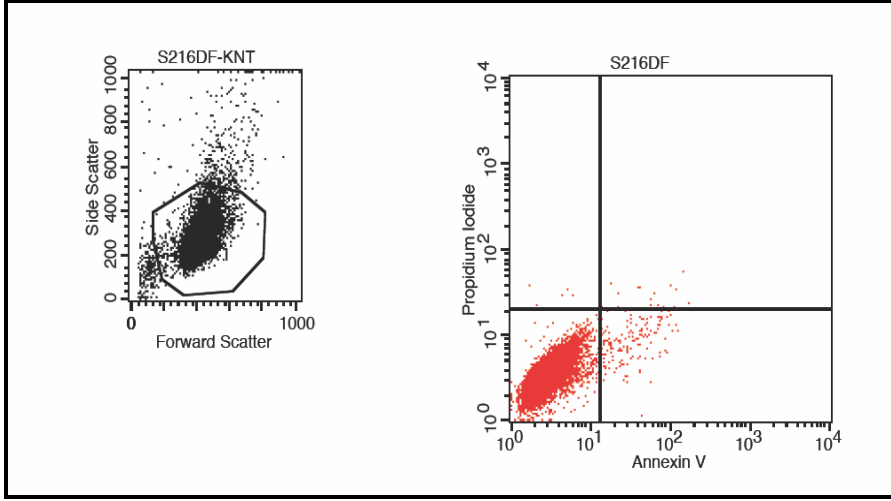
4.7.2. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit Analizi

Hücrelerdeki erken dönem apoptotik, geç dönem apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır (Şekil 4.27). Yapılan analizler sonucunda; canlı hücre ve erken apoptotik hücre oranları bakımından gruplar arasında anlamlı fark görülürken geç apoptotik hücre ve nekrotik hücre oranları bakımında fark bulunmamıştır (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.28).



Şekil 4.27. Annexin V ve PI boyama sonuçları değerlendirilmede kullanılan alanların şematik gösterimi





Şekil 4.28. Annexin V ve PI boyama sonuçları

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5TK: 5 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri

216V(D)F: 216 saat vitrifiye kas hücreleri

216V(D)K: 216 saat vitrifiye kıkırdak hücreleri

Çizelge 4.15. Annexin V ve PI boyama sonuçları özet tablosu

Annexin V ve PI Boyama Sonuçları				
Gruplar	Canlı Hücre Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Nekrotik Hücre Oranı
5TK	96,66 ^a	2,82 ^a	0,48 ^a	0,03 ^a
5TF	97,94 ^{b,c}	0,48 ^d	0,50 ^a	0,14 ^a
216VK	97,56 ^b	2,11 ^b	0,26 ^a	0,06 ^a
216VF	98,10 ^{b,c}	1,61 ^c	0,19 ^a	0,10 ^a

Sütunlar kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b,c,d: $p \leq 0,05$

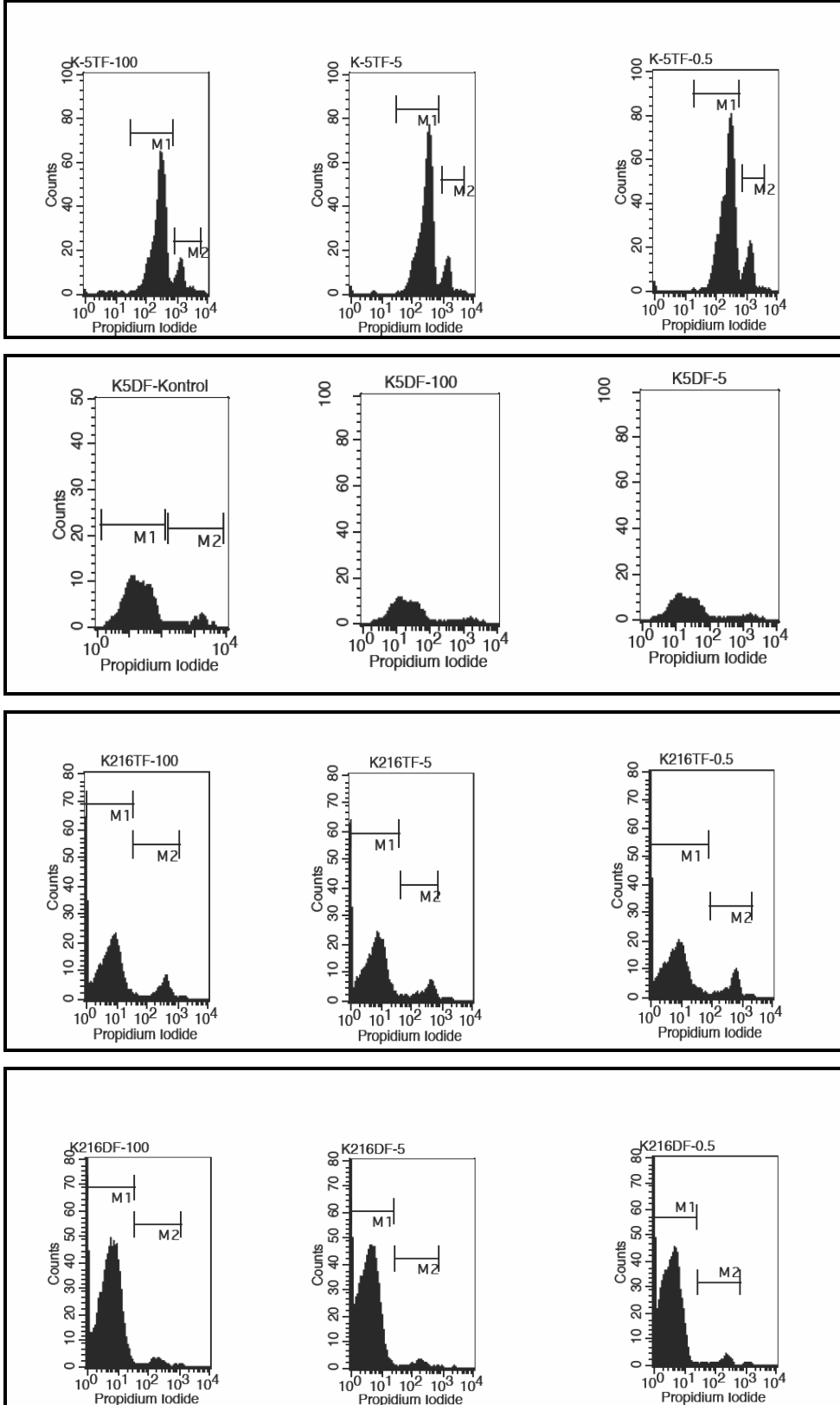
4.7.3. Hücre Siklus Analizleri

Taze ve vitrifiye dokulardan elde edilen hücrelerin sikluslarını düzenlenmek için üç farklı kültür ortamı kullanılmış ve ardından hücre siklus fazları flow sitometri kullanılarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak %50 konfluent olan hücre kültürü kullanılmıştır. Negatif kontrolün analiz sonuçları; G0+G1 fazı %58, S fazı %9,02 ve G2+M fazı ise %23,47 olarak tespit edilmiştir.

Koyun kas hücrelerinde; gruplar uygulanan kültür koşullarına göre kendi içlerinde G0+G1 faz bakımından değerlendirildiğinde; 5T grubu arasında fark görülmemesine rağmen konfluent olduktan sonra %5 FBS uygulanan grubun diğer gruplara göre yüzde oranının fazla olduğu görülmüştür. 5V grubunda; %0,5 FBS uygulanan grubu ile %100 ve %5 grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. 216T ve 216V gruplarında % 5 grubu ile %100 ve %0,5 grupları arasında anlamlı fark gözlemlenmiştir. Gruplar kendi aralarında değerlendirildiklerinde en yüksek G0+G1 oranının konfluent olmanın ardından üç gün boyunca %5 FBS uygulanan gruplarda elde edildiği görülmüştür (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.29). Kültür koşullarına göre deney grupları değerlendirildiğinde; %100 grubunda 5V ve 216V grubu arasında fark görülmemiş, 216T ve 5T grupları, hem kendi aralarında hem de vitrifiye gruplar ile anlamlı fark göstermiştir. %5 ve %0,5 grubunda G0+G1 bakımından gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Gruplar genel olarak değerlendirildiğinde; vitrifiye grupların taze gruplara göre daha yüksek oranda G0+G1 fazına sahip oldukları tespit edilmiştir. Vitrifiye gruplar arasında da 5 saatlik grup yüzde oran bakımından yüksek orana sahiptir. Taze gruplar arasında da yine 5 saatlik grup daha yüksek G0+G1 fazına sahiptir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.29).

Koyun kıkırdak hücrelerinde; gruplar uygulanan kültür koşullarına göre kendi içlerinde G0+G1 faz bakımından değerlendirildiğinde; deney grupları arasında anlamlı fark gözlemlenmemiştir. Gruplar kendi aralarında değerlendirildiklerinde en yüksek G0+G1 oranının konfluent olmanın ardından üç gün boyunca % 0,5 FBS uygulanan gruplarda elde edildiği görülmüştür. (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.30). Kültür koşullarına göre deney grupları değerlendirildiğinde; tüm kültür gruplarında 5T grubu ile diğer gruplarla arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. 216 saatlik gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir. Gruplar genel olarak değerlendirildiğinde; 5T grubunun en yüksek G0+G1 faz oranına sahip olduğu görülmüştür. Kıkırdak hücrelerinde 5 saatlik grupların G0+G1 faz oranları bakımından 216 saatlik gruplara göre daha yüksek oranlara sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.19 ve Şekil 4.30).

Koyun kıkırdak ve kas hücreleri G0+G1 hücre fazları bakımından karşılaştırıldığında; kas ve kıkırdak hücreleri arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. 5 saatlik taze grubunda kıkırdak hücreleri daha yüksek orana sahipken vitrifiye grupta ise kas hücrelerinin yüksek oranda G0+G1 fazında oldukları görülmüştür. 216 saatlik grupta da 5 saatlik grup ile benzer sonuç elde edilmiştir. Kıkırdak hücrelerinde taze gruplarda yüksek oranda G0+G1 fazı elde edilirken kas hücrelerinde ise vitrifiye gruplarda daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.20).



Şekil 4.29. Koyun kas hücrelerinde PI boyama sonuçları. M1; G0-G1safhası M2: S-G2-M safhası
 5TF: 5 saat taze kas hücreleri
 5V(D)F: 5 saat vitrifiye kas hücreleri
 216TF: 216 saat taze kas hücreleri
 216V(D)F: 216 saat vitrifiye kas hücreleri
 Kültür koşulları: **100**: %10 FBS 3 gün **5**: %5 FBS 3 gün **0,5**: %0,5 FBS 3 gün

Çizelge 4.16. Koyun kas hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması

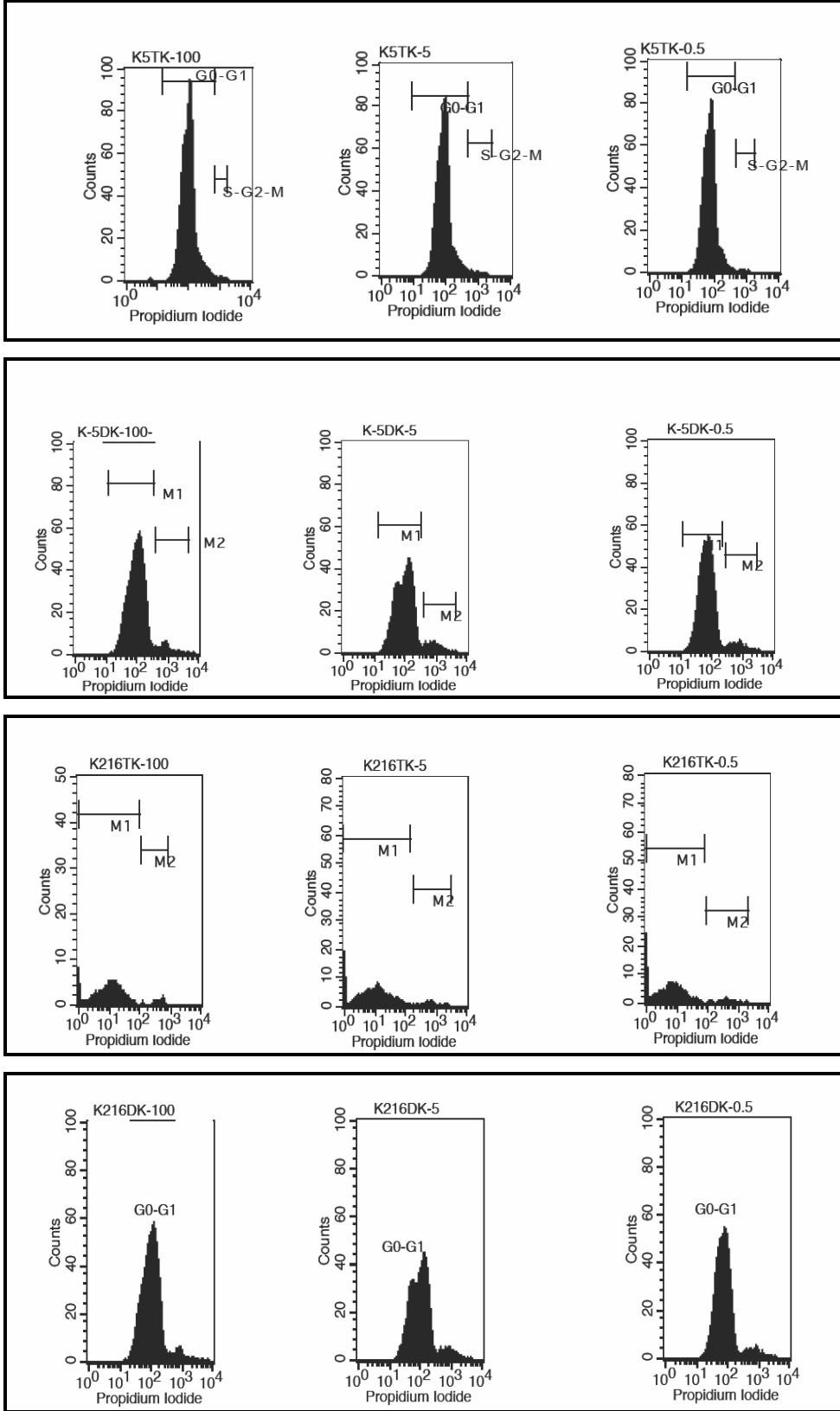
Koyun Kas Hücreleri Hücre Siklus Sonuçları				
Kültür Koşulları/Hücre Siklus Fazları	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
%100				
G0+G1	87,18±0,65 ^a	98,74±0,01 ^b	82,39±1,61 ^a	96,94±0,03 ^a
S	2,41±0,14 ^b	0,15±0,05 ^a	3,07±0,02 ^a	0,68±0,20 ^a
G2+M	7,48±1,43 ^a	0,19±0,04 ^a	11,57±0,52 ^a	1,64±0,25 ^a
%5				
G0+G1	88,13±0,80 ^a	98,77±0,03 ^b	86,12±0,42 ^b	97,36±0,10 ^b
S	2,08±0,06 ^b	0,19±0,01 ^a	3,39±0,16 ^b	0,71±0,07 ^a
G2+M	7,91±0,25 ^a	0,15±0,08 ^a	8,66±1,19 ^a	1,52±0,10 ^a
%0,5				
G0+G1	86,56±0,79 ^a	98,28±0,17 ^a	84,39±0,08 ^a	96,64±0,10 ^a
S	3,33±0,12 ^a	0,18±0,11 ^a	3,23±0,06 ^a	0,78±0,22 ^a
G2+M	8,68±0,29 ^a	0,25±0,22 ^a	10,64±1,26 ^a	1,81±0,24 ^a

Hücre faz oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

Çizelge 4.17. Koyun kas hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması

Koyun Kas Hücreleri Hücre Siklus Sonuçları									
Deney Grupları/Hücre Siklus Fazları	Kültür Koşulları								
	%100			%5			%0,5		
	G0+G1	S	G2+M	G0+G1	S	G2+M	G0+G1	S	G2+M
5T	87,18±0,65 ^b	2,41±0,14 ^c	7,48±1,43 ^b	88,13±0,80 ^b	2,08±0,06 ^b	7,91±0,25 ^a	86,56±0,79 ^b	3,33±0,12 ^b	8,68±0,29 ^c
5V	98,74±0,01 ^c	0,15±0,05 ^b	0,19±0,04 ^c	98,77±0,03 ^d	0,19±0,01 ^d	0,15±0,08 ^b	98,28±0,17 ^d	0,18±0,11 ^a	0,25±0,22 ^b
216T	82,39±1,61 ^a	3,07±0,02 ^a	11,57±0,52 ^a	86,12±0,42 ^a	3,39±0,16 ^a	8,66±1,19 ^a	84,39±0,08 ^a	3,23±0,06 ^b	10,64±1,26 ^a
216V	96,94±0,03 ^c	0,68±0,20 ^d	1,64±0,25 ^c	97,36±0,10 ^c	0,71±0,07 ^c	1,52±0,10 ^b	96,64±0,10 ^c	0,78±0,22 ^a	1,81±0,24 ^b

Hücre faz oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b,c,d : p≤0,05



Şekil 4.30 Koyun kas hücrelerinde PI boyama sonuçları. M1; G0-G1safhası M2: S-G2-M safhası

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5V(D)F: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216V(D)F: 216 saat vitrifiye kas hücreleri

Kültür koşulları: **100**: %10 FBS 3 gün **5**: %5 FBS 3 gün **0,5**: %0,5 FBS 3 gün

Çizelge 4.18. Koyun kıkırdak hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması

Koyun Kıkırdak Hücreleri Hücre Siklus Sonuçları				
Kültür Koşulları/Hücre Siklus Fazları	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
%100				
G0+G1	97,17±1,66a	93,83±0,36a	91,38±0,60a	90,82±0,18a
S	1,06±0,43a,b	1,30±0,02b	2,37±0,14a	2,01±0,31b
G2+M	0,17±0,06a	3,62±0,87a	4,81±0,21a	5,47±0,02a
%5				
G0+G1	97,16±0,87a	92,84±0,35a	90,85±0,07a	91,11±0,39a
S	1,49±0,05a	1,51±0,02b	2,26±0,33a	2,04±0,05b
G2+M	0,10±0,02a	4,62±0,34a	5,93±0,15b	5,69±0,27a
%0,5				
G0+G1	98,48±0,52a	93,71±0,33a	91,48±0,13a	92,11±0,96a
S	0,54±0,02b	0,83±0,28a	1,53±0,52a	1,17±0,10a
G2+M	0,28±0,12a	4,31±0,42a	6,20±0,18b	5,46±1,11a

Hücre faz oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

Çizelge 4.19. Koyun kıkırdak hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması

Koyun Kıkırdak Hücreleri Hücre Siklus Sonuçları									
Deney Grupları/Hücre Siklus Fazları	Kültür Koşulları								
	%100			%5			%0,5		
	G0+G1	S	G2+M	G0+G1	S	G2+M	G0+G1	S	G2+M
5T	97,17±1,66a	1,06±0,43a	0,17±0,06a	97,16±0,87a	1,49±0,05a	0,10±0,02a	98,48±0,52a	0,54±0,02a	0,28±0,12a
5V	93,83±0,36b	1,30±0,02a,c	3,62±0,87b	92,84±0,35b	1,51±0,02a	4,62±0,34b	93,71±0,33b	0,83±0,28a,b	4,31±0,42b
216T	91,38±0,60c	2,37±0,14b,c	4,81±0,21c	90,85±0,07c	2,26±0,33b	5,93±0,15c	91,48±0,13c	1,53±0,52a,b	6,20±0,18c
216V	90,82±0,18c	2,01±0,31b,c	5,47±0,02c	91,11±0,39c	2,04±0,05b	5,69±0,27c	92,11±0,96c	1,17±0,10b	5,46±1,11c

Hücre faz oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b,c : p≤0,05

Çizelge 4.20. Koyun kas ve kıkırdak hücrelerinin G0+G1 fazlarının karşılaştırılması

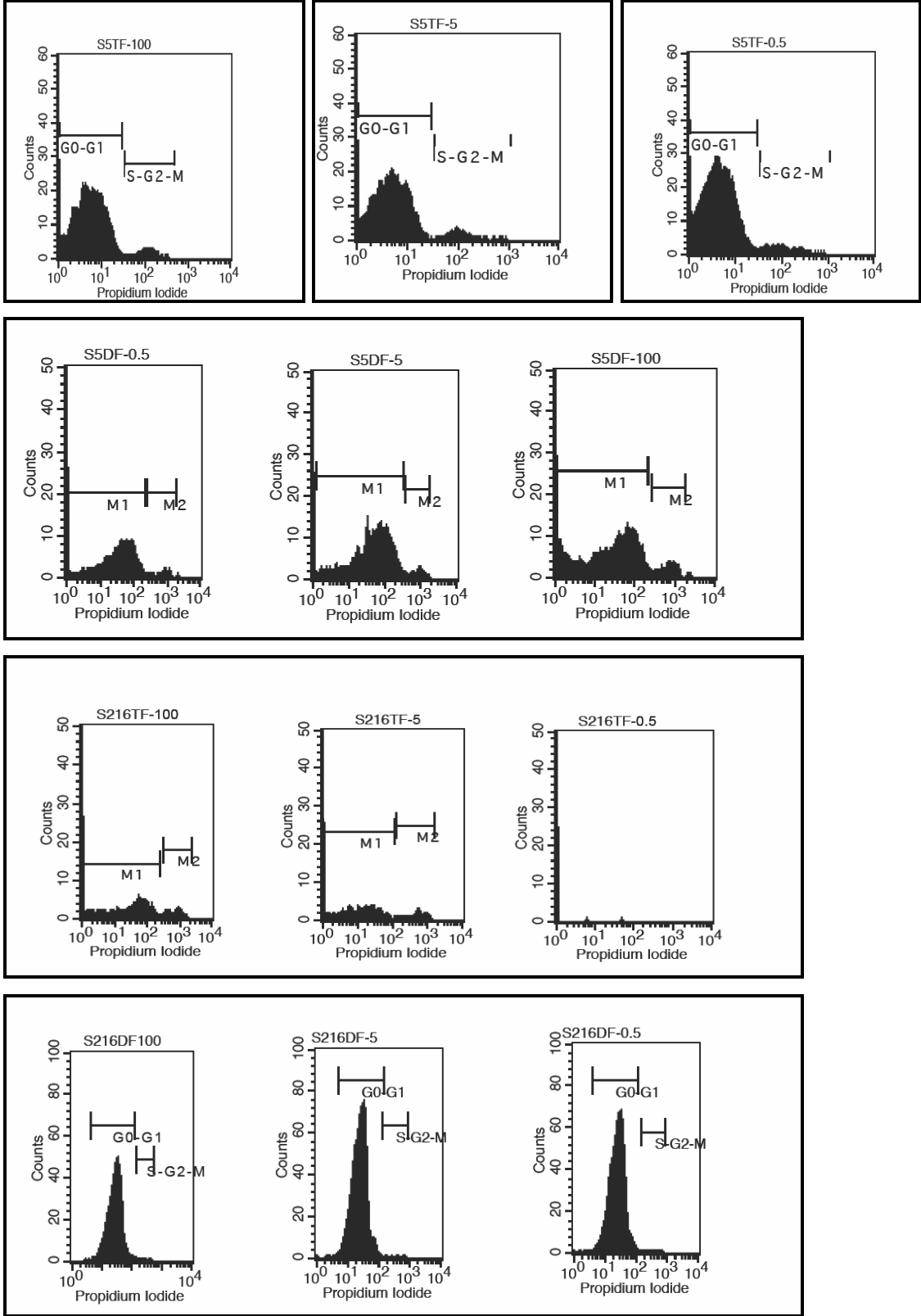
Koyun Hücre Tiplerine Göre G0+G1 Faz Sonuçları				
Hücre Tipleri	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
Kas	87,29 ^a	98,60 ^a	84,30 ^a	96,98 ^a
Kık	97,60 ^b	93,46 ^b	91,24 ^b	91,35 ^b

Sütunlar kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

Sığır kas hücrelerinde; gruplar uygulanan kültür koşullarına göre kendi içlerinde G0+G1 faz bakımından değerlendirildiğinde; 5T grubu arasında %5 grubu diğer iki grup ile ve 5V grubunda %100 grubu, %5 ve %0,5 grubu anlamlı farklılık göstermiştir. 216 saatlik gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Gruplar kendi aralarında değerlendirildiklerinde en yüksek G0+G1 oranının 216V grubu hariç diğer gruplarda konfluent olmanın ardından üç gün boyunca %0,5 FBS uygulanan gruplarda elde edildiği görülmüştür. 216V grubunda ise konfluent olmanın ardından üç gün boyunca %5 FBS uygulanan grupta yüksek G0+G1 oranı elde edilmiştir (Çizelge 4.21 ve Şekil 4.31). Kültür koşullarında göre deney grupları değerlendirildiğinde; tüm kültür koşullarında 5T grubu ile diğer deney grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Gruplar genel olarak değerlendirildiğinde; vitrifiye grupların taze gruplara göre daha yüksek oranda G0+G1 fazına sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.31).

Sığır kıkırdak hücrelerinde; gruplar uygulanan kültür koşullarına göre kendi içlerinde G0+G1 faz bakımından değerlendirildiğinde; vitrifiye gruplarda anlamlı fark gözlemlenmemiştir. Taze gruplarda ise %100 grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Gruplar kendi aralarında değerlendirildiklerinde en yüksek G0+G1 oranının konfluent olmanın ardından üç gün boyunca % 0,5 FBS uygulanan gruplarda elde edildiği görülmüştür (Çizelge 4.32 ve Şekil 4.32). Kültür koşullarında göre deney grupları değerlendirildiğinde; tüm kültür gruplarında 5T grubu ile diğer gruplarla arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Gruplar genel olarak değerlendirildiğinde; vitrifiye grupların taze gruplara göre daha yüksek oranda G0+G1 fazına sahip oldukları tespit edilmiştir. Vitrifiye gruplar arasında da 216 saatlik grup yüzde oran bakımından daha yüksek orana sahiptir. Taze gruplar arasında da 216 saatlik grup daha yüksek G0+G1 fazına sahiptir (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.32).

Sığır kıkırdak ve kas hücreleri G0+G1 hücre fazları bakımından karşılaştırıldığında; 5V ve 216V gruplarında kas ve kıkırdak hücreleri bakımından anlamlı fark gözlemlenmemiştir. 5T ve 216T gruplarında ise kas hücreleri kıkırdak hücrelerine göre daha yüksek oranda G0+G1 faz oranına sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.25).



Şekil 4.31. Sığır kas hücrelerinde PI boyama sonuçları. M1; G0-G1 safhası M2: S-G2-M safhası

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5V(D)F: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216V(D)F: 216 saat vitrifiye kas hücreleri

Kültür koşulları: **100**: %10 FBS 3 gün **5**: %5 FBS 3 gün **0,5**: %0,5 FBS 3 gün

Çizelge 4.21. Sığır kas hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması

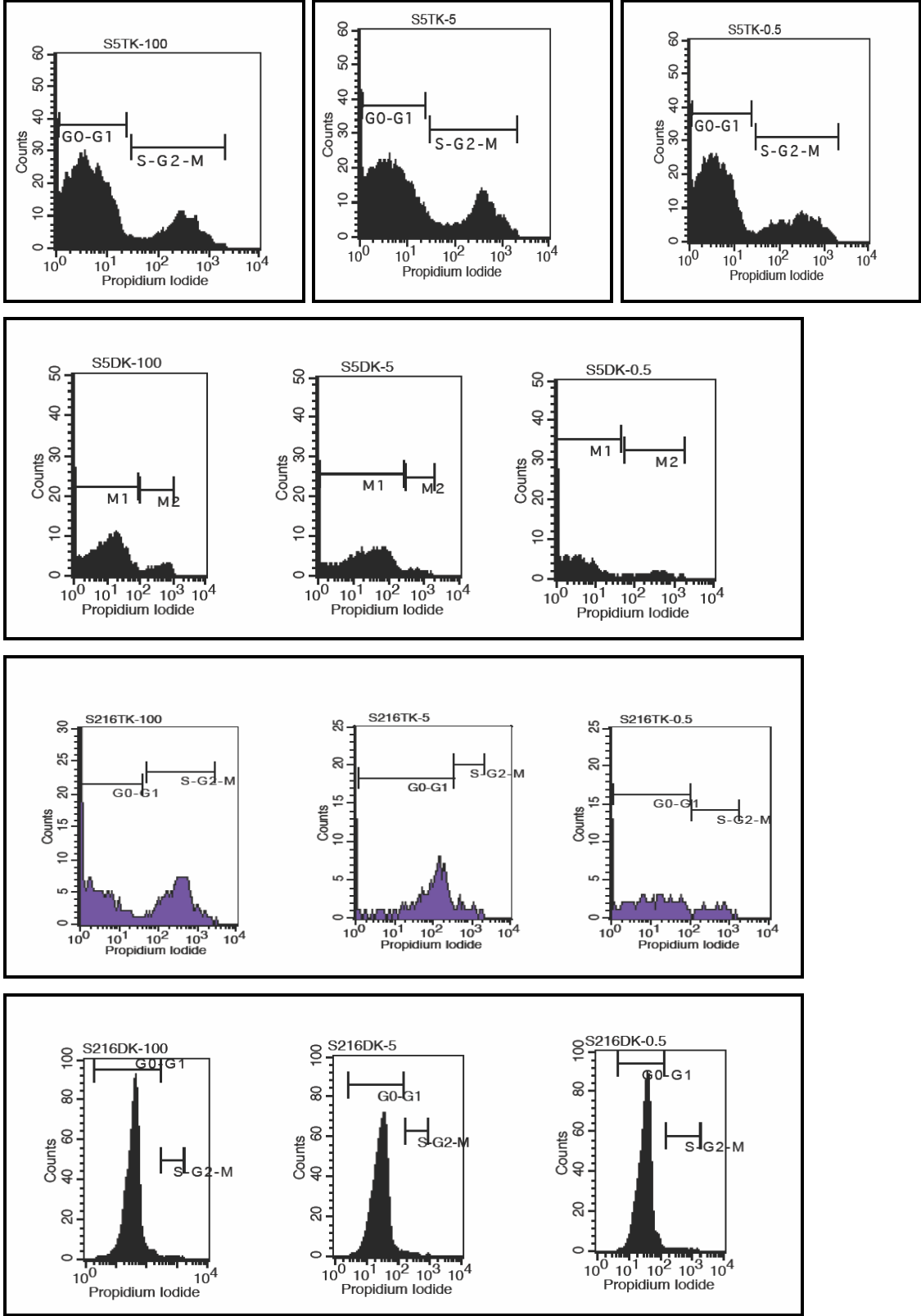
Sığır Kas Hücreleri Hücre Siklus Sonuçları				
Kültür Koşulları/Hücre Siklus Fazları	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
%100				
G0+G1	92,88±0,86b	96,29±0,44a	97,64±0,01a	98,95±0,59a
S	1,25±0,35b	1,37±0,13a	1,06±0,07b	0,61±0,12a
G2+M	4,50±0,14b	1,89±0,38b	1,26±0,03a	0,16±0,03b
%5				
G0+G1	91,21±0,11a	97,87±0,37b	97,90±0,02a	99,25±0,51a
S	1,33±0,00b	0,62±0,23b	1,06±0,03b	0,32±0,07b
G2+M	5,79±0,30a	1,05±0,04a	1,08±0,02a	0,14±0,02b
%0,5				
G0+G1	92,82±0,23b	97,93±0,27b	98,55±0,73a	98,89±0,58a
S	2,13±0,04a	0,42±0,10b	0,39±0,09a	0,53±0,03a
G2+M	4,59±0,02b	1,45±0,24b	1,06±0,64a	0,28±0,02a

Hücre faz oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b : p≤0,05

Çizelge 4.22. Sığır kas hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması

Sığır Kas Hücreleri Hücre Siklus Sonuçları									
Deney Grupları/Hücre Siklus Fazları	Kültür Koşulları								
	%100			%5			%0,5		
	G0+G1	S	G2+M	G0+G1	S	G2+M	G0+G1	S	G2+M
5T	92,88±0,86b	1,25±0,35b	4,50±0,14a	91,21±0,11a	1,33±0,00a	5,79±0,30a	92,82±0,23a	2,13±0,04a	4,59±0,02a
5V	96,29±0,44a	1,37±0,13b	1,89±0,38c	97,87±0,37c	0,62±0,23b	1,05±0,04c	97,93±0,27b	0,42±0,10b	1,45±0,24c
216T	97,64±0,01a	1,06±0,07b,c	1,26±0,03d	97,90±0,02c	1,06±0,03a	1,08±0,02c	98,55±0,73b	0,39±0,09b	1,06±0,64b,c
216V	98,95±0,59a,c	0,61±0,12a,c	0,16±0,03b	99,25±0,51b	0,32±0,07b	0,14±0,02b	98,89±0,58b	0,53±0,03b	0,28±0,02b,c

Hücre faz oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b,c : p≤0,05



Şekil 4.32. Sığır kıkırdak hücrelerinde PI boyama sonuçları. M1; G0-G1safhası M2: S-G2-M safhası

5TF: 5 saat taze kas hücreleri

5V(D)F: 5 saat vitrifiye kas hücreleri

216TF: 216 saat taze kas hücreleri

216V(D)F: 216 saat vitrifiye kas hücreleri

Kültür koşulları: **100:** %10 FBS 3 gün **5:** %5 FBS 3 gün **0,5:** %0,5 FBS 3 gün

Çizelge 4.23. Sığır kıkırdak hücrelerinin hücre senkronizasyon yöntemlerine göre karşılaştırılması

Sığır Kıkırdak Hücreleri Hücre Siklus Sonuçları				
Kültür Koşulları/Hücre Siklus Fazları	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
%100				
G0+G1	77,94±0,67a	95,78±1,03a	85,94±0,47a	98,66±0,12a
S	3,88±0,27a,c	0,60±0,14a	2,35±0,65a	0,71±0,09a
G2+M	17,36±0,00b	2,15±0,73a	10,63±0,40a	0,39±0,26a
%5				
G0+G1	75,39±0,91b	97,82±0,73a	89,70±0,87c	98,81±0,31a
S	3,47±0,79c	1,35±0,04b	3,20±0,19	0,68±0,03a
G2+M	17,04±1,02b	0,31±0,10b	5,50±0,66b	0,29±0,19a
%0,5				
G0+G1	75,65±0,48b	97,80±0,72a	96,96±0,46b	99,06±0,09a
S	2,32±0,42b	1,35±0,05b	1,38±0,28b	0,49±0,08a
G2+M	20,86±0,21a	0,32±0,10b	1,65±0,1c	0,37±0,05a

Hücre faz oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b,c : p≤0,05

Çizelge 4.24. Sığır kıkırdak hücrelerinin deney gruplarına göre karşılaştırılması

Sığır Kıkırdak Hücreleri Hücre Siklus Sonuçları									
Deney Grupları/Hücre Siklus Fazları	Kültür Koşulları								
	%100			%5			%0,5		
	G0+G1	S	G2+M	G0+G1	S	G2+M	G0+G1	S	G2+M
5T	77,94±0,67a	3,88±0,27b	17,36±0,00a	75,39±0,91a	3,47±0,79a	17,04±1,02a	75,65±0,48a	2,32±0,42a	20,86±0,21a
5V	95,78±1,03c	0,60±0,14a	2,15±0,73c	97,82±0,73c	1,35±0,04b	0,31±0,10c	97,80±0,72b,c	1,35±0,05c	0,32±0,10c
216T	85,94±0,47b	2,35±0,65b	10,63±0,40b	89,70±0,87b	3,20±0,19a	5,50±0,66b	96,96±0,46b	1,38±0,28c	1,65±0,16b
216V	98,66±0,12d	0,71±0,09a	0,39±0,26d	98,81±0,31c	0,68±0,03b	0,29±0,19c	99,06±0,09b,c	0,49±0,08b	0,37±0,05c

Hücre faz oran sütunları kendi aralarında değerlendirilmiştir. a,b,c,d : p≤0,05

Çizelge 4.25. Sığır kas ve kıkırdak hücrelerinin G0+G1 fazlarının karşılaştırılması

Sığır Hücre Tiplerine Göre G0+G1 Faz Sonuçları				
Hücre Tipleri	Deney Grupları			
	5T	5V	216T	216V
Kas	92,33 ^a	97,36 ^a	98,03 ^a	99,03 ^a
Kık	76,33 ^b	97,16 ^a	90,86 ^b	98,85 ^a

Sütunlar kendi aralarında değerlendirilmiştir. a, b : p≤0,05

4.8. Glikozaminoglikan (GAG) Analizi

Yapılan analizlerde GAG içerikleri ve absorbanları Chondroitin Sulfate standart eğrisine göre değerlendirilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak 0,938 bulunmuştur. Bu değer yapılan kalibrasyonun doğruluğunu göstermektedir. Sonuçlar incelendiğinde 5 saatlik taze kıkırdak ile 5 saatlik vitrifiye kıkırdak hücreleri arasında GAG içerikleri bakımından fark bulunurken diğer gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir (Çizelge 4.26). GAG içeriği bakımından en yüksek değer 5 saat vitrifiye grupta tespit edilmiştir. GAG'lar kıkırdak hücreleri gibi hücrelerin zemin maddesini oluştururlar ve bu madde boyamalar esnasında görülmez. Bağ dokusu hücreleri tarafından sentezlenirler ve en yoğun olarak bulunduğu hücre ise kıkırdak hücreleridir. Yapılan bu analiz ile kıkırdak hücrelerinin tanımlanması yapılabilmektedir.

Çizelge 4.26. Kıkırdak hücrelerinde taze ve vitrifiye gruplardaki GAG içerikleri

5 günlük GAG İçerikleri		
İşlem Saat	Gruplar	
	Taze	Vitrifiye
5 saat	3,33±1,26 ^a	7,42±0,73 ^b
216 saat	5,80±0,07	5,20±2,70

a.b: $p \leq 0,05$

5. TARTIŞMA

Gliserolun kriyoprotektan özelliğinin keşfedilmesinin ardından 1950'li yıllarda organların kriyoprezervasyonları yeni bir araştırma alanı olmaya başlamıştır (Fahy et al. 2004). Tüm vitrifikasyon metodlarının esas problemi; hücre veya dokunun soğuma esnasında vitrifiye (camsı yapı) olmasını ve çözünme sırasında ise buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek uygun ortamın oluşturulması ve hücre veya dokuya zarar verilmemesidir (Wusteman et al. 2004). Taze veya vitrifiye dokulardan hücrelerin elde edilmesindeki bir diğer önemli faktörde dokuların alınma zamanları ve saklama sıcaklığıdır. Düşük sıcaklık hücre metabolizmasının azalmasını sağlayarak doku örneklerinden sağlıklı hücre popülasyonlarının elde edilmesine olanak sağlar. Ölü hayvanların taşınması esnasında dokuların korunması için gerekli olan düşük sıcaklıklar buzdolabı veya buz ile sağlanabilir (Silvestre et al. 2003).

Bu yöntem ölüm zamanları bilinen evcil hayvanlardan alınan dokuların taşınmasında rahatlıkla kullanılabilir. Yaban hayatı için durum biraz daha karışıktır. Çünkü hayvanların tam olarak ölüm zamanlarının bilinmemesi önemli bir sorundur. Bu nedenle hücrelerin elde edilmesinde dokuların vitrifikasyonları alternatif bir metod olarak kullanılabilir. Bu tez çalışmasında; koyun ve sığırtürlerine ait kas ve kıkırdak dokuları incelenmiştir. Dokular; 4°C'de 5, 48, 72, 96 ve 216 saat bekletilmişler ve ardından direkt ekimleri (taze) ve vitrifikasyon ile dondurup çözme sonrası (vitrifiye) canlılıkları karşılaştırılmıştır. Taze ve vitrifiye gruplara ait kas ve kıkırdak dokularının her ikisinden de canlı hücreler elde edilmiştir. Yapışma oranları incelendiğinde kas dokularının kıkırdak dokularına göre daha iyi yapışma gösterdikleri belirlenmiştir. Buna rağmen, konfluensi zamanları bakımından ise gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir (Silvestre et al. 2004).

Tüm ülkeler için çiftlik hayvanlarının korunması oldukça önemlidir. En iyi koruma yöntemi canlı koruma olmasına karşılık bu yöntem oldukça pahalıdır. Bu nedenle ex situ in vitro koruma stratejileri kapsamında hayvan genetik kaynaklarının gen bankaları veya biyobankalarda dondurularak saklanması üzerine yeni yöntemler geliştirilmektedir (Prentis and Azar, 2011). Biyobankalarda genel olarak embriyo ve spermalar saklanmaktadır. Embriyo ve spermanın dondurulması çalışmaları uzun zamandır yapılmaktadır. Fakat oositlerin dondurularak saklanması sperma ve embriyoya göre daha zordur (Prentis and

Azar 2011; Schroeder et al. 1991; Silvestre et al. 2003). Koruma programları kapsamında; biyobankalarda sadece gametlerin veya embriyoların saklanması yanı sıra somatik hücreler veya dokular gibi diğer biyolojik örneklerinde saklanması önerilmektedir (Lean-Quinto et al. 2009; Ryder 2002).

Dokuların dondurularak saklanması doku transplantasyonu ve genetik çeşitliliğin korunmasında kullanılabilir. Tehlikeli türlerin korunması amacıyla ex situ yöntemlerle birlikte gen bankalarının oluşturulması türlerin korunmasında etkili olacaktır. Nükleer transfer çalışmaları ile kaybolan ve/veya kaybolma tehlikesi olan türlerin geri kazanılmasının mümkün olması nedeniyle doku veya hücrelerin saklanması oldukça önemli hale gelmiştir. Biyobankalar; popülasyonların azalması, hastalıklar veya neslin tükenmesi gibi nedenler ile kaybolmayla karşı karşıya kalan genetik çeşitliliğin korunmasında geleceğin sigortasıdır.

Hayvan doku ve hücrelerin kriyoprezervasyon protokolleri başarı bir şekilde uygulanmaktadır. İnsanlarda yapılacak olan transplantasyon çalışmaları için; deri, ovaryum ve testis dokularının saklanması ve bankalarının oluşturulması çalışmaları yapılmaktadır (Isachenko et al. 2003; Silvestre et al. 2002; Song et al. 2010). Dokuların dondurulmasında doku tiplerinin ve dondurma yöntemlerinin etkileri araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada; hızlı dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri karaciğer ve böbrek doku parçalarında karşılaştırılmıştır. Böbrek dokusunda; hızlı dondurma yönteminde sonuç alınmazken vitrifikasyon yönteminde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Karaciğer dokusunda da hızlı dondurma yönteminde sonuç alınmasına rağmen vitrifikasyon hızlı dondurmaya göre daha başarılı sonuç vermiştir (de Graff et al. 2007). Tavşan damar dokusunun dondurulmasında da vitrifikasyon tekniğinin etkili olduğu gösterilmiş (Baicu et al. 2006). Vitrifikasyon yöntemi deri dokusunun dondurulmasında da kullanılarak çözme sonrasında sağlıklı hücre hatlarının elde edilmesini sağlamıştır (Silvestre et al. 2002; 2003; 2004). Kıkırdak dokusu ile dondurma çalışmaları yapılmıştır. Kıkırdak dokusunun dondurulmasında yavaş dondurma, hızlı dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri denenmiştir. Hızlı dondurma yönteminin kullanıldığı çalışmada; çözündürme sonrasında kıkırdak dokusu içerisinde yer alan kondrosit hücrelerinin çoğunluğunun öldüğü gösterilmiştir (Guan et al. 2006). Vitrifikasyon ve yavaş dondurmanın karşılaştırıldığı çalışmada ise kıkırdak dokusunun canlılık oranı, proliferatif etkisi ve GAG sentezi bakımından iki yöntem arasında farklılık bulunmazken çözündürme sonrasında hücre elde etme başarısı incelendiğinde ise

vitrifikasyonun daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir (Cetinkaya ve Arat, 2011). Sunulan tez çalışması kapsamında da vitrifikasyon yöntemi kas ve kıkırdak dokularına başarı ile uygulanmıştır. Dokuların dondurulup çözünmesi sonrasında dokulardan sağlıklı hücreler elde edilmiştir.

Dokulardan hücrelerin elde edilmesinde önemli bir etkende dokuların ekim öncesindeki bekleme süreleridir. Yapılan çalışmalar ile dokuların saklanmasında en iyi sıcaklığın 4°C olduğu ve ruminantlar için en fazla 15 ve tavşan için ise 10 gün olduğu, saklamanın ardından vitrifikasyon sonrası hücre elde edilebileceği gösterilmiştir (Silvestre et al. 2000; 2003; 2004). Bir başka çalışmada ise dokular -20°C'de %10 DMSO'da 20 güne kadar bekletilerek dokulardan hücre elde etme başarıları incelenmiştir. Sonuç olarak, 10.günden sonra canlılığın azaldığı gösterilmiştir (Benkeddache et al. 2012). Tez çalışmasında kas ve kıkırdak dokuları 9.güne (216 saat) kadar 4°C'de bekletilerek dokular hemen (taze) ekilmiş veya vitrifiye edilmiştir. Taze ve vitrifiye grupların her ikisinde de 9.günde canlı hücreler elde edilmiştir. Elde edilen sonuç; Silvestre ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzerdir.

Vitrifikasyon sonrası 5 ve 216 saatlik gruplardan elde edilen hücrelerin proliferasyon aktiviteleri MTT analizi ile yapılmıştır. Sığır taze ve vitrifiye gruplardan elde edilen kıkırdak ve kas hücreleri arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. Koyunlarda ise taze ve vitrifiye gruplardan elde edilen kıkırdak hücrelerinde anlamlı fark gözlemlenmezken kas hücrelerinde ise 5 saatlik grupta taze ve vitrifiye gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmiştir. Populasyon katlanma sayıları ve zamanları incelendiğinde; bekleme süresi, tür ve hücre tiplerinden bağımsız olarak uygulanan işlem bakımından farklılık olduğu tespit edilmiştir. Populasyon katlanma (PK) sayıları bakımından vitrifiye grupların taze gruplara göre daha az katlandıkları tespit edilmiştir. Populasyon katlanma zamanları (PKZ) incelendiğinde ise vitrifiye grupların populasyon katlanma zamanlarının taze gruplara göre daha uzun olduğu belirlenmiştir.

Dokuların ve hücrelerin morfolojik özelliklerini göstermek amacıyla H-E boyaması yapılmıştır. Boyama sonucunda; hücrelerin genel olarak normal morfoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Kıkırdak dokularında ise 216 saat vitrifiye gruplarından elde edilen hücrelerde az oranda morfolojik değişiklikler belirlenmiştir. Kıkırdak dokusunda vitrifikasyona bağlı ekstrasellüler matrikste azalma olsa da taze kıkırdak dokusu ile benzer morfolojiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kıkırdak dokusu için özel bir boya olan Safranin O boyası ile de H-E boyama sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kıkırdak dokusunun tanımlanmasında kullanılan bir diğer yöntem de elastin antikoru ile yapılan immunofloresans boyamadır. Elastin antikoru ile kıkırdak dokularının boyanması sonucunda pozitif boyanma elde edilerek elastin fibriller net bir şekilde gösterilmiştir.

Taze ve vitrifiye kas ve kıkırdak dokularında elde edilen hücrelerin tanımlanması amacıyla immunofloresans boyamalar yapılmıştır. Mezenşimal köken için Aktin ve Vimentin, nöroektoderm köken için β - III Tubulin ve NCAM, epitelyal köken için Cytokeratin, pluripotensi için Oct-4 ve kıkırdak hücrelerinin tanımlanabilmesi için Elastin antikoru kullanılmıştır. Yapılan boyamalar sonucunda sadece Aktin ve Vimentin antikoru pozitif boyanma elde edilmiştir. Vimentin antikoru boyama sonucunda genel olarak gruplar arasında fark gözlemlenmemiştir. Aktin antikoru boyamasında ise vitrifiye gruplarda taze gruplara ve 216 saatlik gruplarda 5 saatlik gruplara göre kuvvetli pozitif boyanma olduğu tespit edilmiştir.

Hücrelerin sitoplazmalarında hücre morfolojiyi sağlayan filamentlerden oluşan sitoskelet denilen yapılar bulunur. Bu filamentlerden birisi ise aktindir. Aktin; kas olmayan hücrelerin %15'ini oluştururlar ve hücrede önemli birçok olayda rol alırlar (Ballestrem et al. 1998; Gartner and Hiatt, 1997). Aktin, vinkulin proteinine bağlanarak stres fibrillerini meydana getirir. Bu stres fibrilleri, hücre kültüründeki fibroblastlarda gösterilmiştir (Gartner and Hiatt, 1997). Hücre veya dokuların dondurulmasında hücre membranının oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Hücre sitoskeleti ile hücre membranının çözündürme sonrası canlılığı etkileyen bir unsur olduğu da unutulmamalıdır. Fibroblast hücreleri ile yapılan çalışmada dondurma-çözmeden kaynaklı osmotik stresin aktin filamentlerinin artmasına sebep olduğu gösterilmiştir (Ragoonanan et al. 2010; 2013). Bu bulgu, vitrifiye gruplardaki artmış aktin ekspresyonu ile uyumludur.

Vitrifiye dokulardan elde edilen, özellikle 216 saatlik gruplarda, hücrelerdeki artan aktin ekspresyonunun donmaya karşı hücreleri koruduğu ve hücre canlılığı üzerine olumlu etki yaptığı düşünülmektedir.

Biyobankalarda muhafaza edilecek olan hücrelerin canlılıklarının ve proliferasyon kapasitelerinin yüksek olması gerekmektedir. Biyobankalar için hücreler genellikle taze dokuların primer kültürlerinin yapılması ile elde edilmektedir. Dokuların dondurularak saklanması biyobankalar için alternatif bir yöntem olarak önerilmektedir. Dondurularak saklanan dokuların çözündürülmelerinin ardından hücre elde edilebilme kapasiteleri ve canlılıkları da önemli bir faktördür. Yapılan çalışmalar ile dondurulup çözülen deri dokularında sağlıklı fibroblast hücreleri elde edilmiştir (Silvestre et al. 2003; 2004). Hücre bankalarının en önemli kullanım alanı Nükleer Transfer (NT) çalışmaları için donör hücre kaynakları olarak kullanılabilirlerdir. NT çalışmaları için fibroblast hücreleri en uygun donör hücre olarak kabul edilmektedir. Kulak kıkırdak dokusunun primer kültürünün yapılması ile de kıkırdak hücreleri kolaylıkla elde edilebilmektedir (Arat et al. 2009; Asawa et al. 2009; Fröhlich et al. 2007). Böylelikle kıkırdak hücreleri de fibroblast hücreleri gibi donör olarak kullanılabilir ve sağlıklı klonlar elde edilebilir (Arat et al. 2011). Aynı zamanda; kas hücrelerinin de NT için donör hücre olarak kullanılabileceği ve canlı yavru doğumlarının elde edildiği gösterilmiştir (Shiqa et al. 1999).

NT çalışmalarında kullanılacak olan donör hücrelerin içinde buldukları hücre siklus fazı embriyo eldesi üzerine etkili en önemli parametredir. Yapılan çalışmalarda; G0/G1 fazındaki hücrelerin kullanılması ile daha yüksek oranda embriyo eldesi ve daha iyi oranda gebelik elde edildiği bildirilmiştir (Gibbons et al. 2002; Ideta et al 2010; Miyoshi et al. 2001). G0/G1 fazındaki hücrelerin enükle oosit içerisine transferi sonrasında geri programlanmalarının daha başarılı olduğu düşünülmektedir (Miyoshi et al. 2001). Granüloza veya kumulus hücreleri doğal olarak GO/G1 fazında bulunan hücrelerdir. Fakat bu hücreler ile yapılan çalışmalardan sadece dişi bireyler elde edilebilir. Erkek bireylerin elde edilebilmesi için somatik hücrelerin kullanılması gerekmektedir. Somatik hücreler ise hücre siklusunun farklı fazlarında bulunabilirler. Bu nedenle somatik hücrelerin GO/G1 fazına getirilmeleri için farklı metotlar kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan yöntemler ise konfluensi, serum açlığı ve hücre siklus inhibitörleridir.

Çeşitli hücre siklus çalışmaları kapsamında bu üç yöntem karşılaştırılarak en iyi embriyo gelişimi ve canlı yavru eldesine olanak sağlayan yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Sığır ve at fibroblast hücrelerinde yapılan çalışmalarda; serum açlığı (%0,5 FBS) ve konfluensi uygulamasının G0/G1 faz oranları bakımından benzer sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Gibbons et al. 2002; Hayes et al. 2005; Liam-Neto et al. 2010). Granüloza hücrelerinde de fibroblastlar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Hayes et al. 2005). Hücre siklus inhibitörü olan roscovitinin serum açlığı ile karşılaştırıldığı sığır çalışmasında; roscovitinin serum açlığına göre hücrelerin daha yüksek oranda G0/G1 fazında buldukları gösterilmiştir (Gibbons et al. 2002). Köpek fibroblastları ile yapılan çalışmada ise konfluensi ile roscovitin uygulamasının hücrelerde aynı oranda G0/G1 fazı oluşturduğu gösterilmiştir (Oh et al. 2009). Kedilerde yapılan çalışmada, fibroblast hücrelerinde %100 konfluensi ve %100 konfluensi +serum açlığı karşılaştırılmış ve G0/G1 faz oranlarının artmasında etkili oldukları gösterilmiştir (de Barros et al. 2010).

Sunulan tez çalışmasında sığır ve koyun türlerine ait kas ve kıkırdak dokularının 5 ve 216 saatlik taze ve vitrifiye gruplarından elde edilen hücrelerin hücre siklus ve apoptozis özellikleri incelenmiştir. Hücrelerin hücre sikluslarının düzenlenmesinde üç grup kullanılmıştır. Bunlar; 1) %100 konfluent +3 gün %10 FBS 2) Konfluent + 3 gün %5 FBS ve 3) Konfluent + 3 gün %0,5 FBS kültür gruplarıdır. Hücrelerin canlılık oranları HXT boyaması ve flow sitometri yöntemleri ile incelenmiştir. HXT boyama sonuçları incelendiğinde kas ve kıkırdak hücrelerinin her ikisinde de apoptotik hücre sayılarının az olduğu ve hücrelerin sağlıklı nükleuslara sahip olduğu gösterilmiştir. Flow sitometri ile yapılan 7AAD boyaması ile canlı ve ölü hücre oranları belirlenmiştir. Aynı zamanda Annexin V-PI boyaması ile de canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranları belirlenmiştir. Koyun kas hücrelerinde deney grupları canlı ve ölüm oranlarına göre değerlendirildiğinde; %100 kültür grubu diğer gruplarla anlamlı fark göstermiştir. 216V grubu ise en düşük canlılık oranına sahip olarak 5T, 5V ve 216T grupları ile anlamlı farklılık göstermiştir. Koyun kıkırdak hücrelerinde ise %100 ve %5 kültür gruplarında 5TK grubu yüksek canlılık göstererek diğer gruplarla arasında anlamlı fark bulunmuştur. %0,5 grubunda taze ve vitrifiye gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir.

Sığır kas hücrelerinde deney grupları canlı ve ölüm oranlarına göre değerlendirildiğinde; %100 ve %5 kültür gruplarında 5T ve 216V arasında ve 5V ve 216T arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. %0,5 grubunda 5T ve 5V arasında anlamlı fark tespit edilirken diğer gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. Kıkırdak hücrelerinde ise %100 ve %0,5 kültür gruplarında 216V grubu düşük canlılık göstererek diğer gruplarla arasında anlamlı fark bulunmuştur. %5 grubunda ise 5T grubu yüksek canlılık göstererek diğer gruplarla arasında anlamlı fark bulunmuştur.

7AAD boyaması sonucunda genel olarak canlılık oranları değerlendirildiğinde; sığır ve koyunlarda elde edilen kas ve kıkırdak hücrelerinin canlılık oranlarının ortalama olarak %95 ve üzeri olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak -80°C kriyoprotektan madde olmaksızın bekletilen hücrelerin canlılık oranları ise %38 olarak belirlenmiştir. Annexin V-PI boyama sonucu incelendiğinde; 7AAD analiz sonuçları ile benzer oranda hücre canlılığına sahip olduğu tespit edilmiştir.

Hücre siklus analizleri incelendiğinde ise; koyun ve sığır kas hücrelerinde, vitrifiye grupların taze gruplara göre daha yüksek oranda G0+G1 fazına sahip oldukları tespit edilmiştir. Vitrifiye gruplar arasında da 5 saatlik grup yüzde oran bakımından yüksek orana sahiptir. Koyun kıkırdak hücrelerinde, 5 saatlik grupların G0+G1 faz oranları bakımından 216 saatlik gruplara göre daha yüksek oranlara sahip olduğu belirlenmiştir. Sığır kıkırdak hücreleri incelendiğinde ise vitrifiye grupların taze gruplara göre daha yüksek oranda G0+G1 fazına sahip oldukları tespit edilmiştir. Vitrifiye grupların PKZ sonuçları ile G0+G1 fazları oranları birbirleri ile doğru orantılıdır.

Hücrelerin canlılık oranlarında; canlılığı etkileyen esas faktör hücre tipi iken hücre siklus sonuçlarında ise hücre tipi ile birlikte uygulanan dondurma yöntemi, bekleme süresi ve hayvan türü de etkili olmuştur. Kas hücrelerinde, türden bağımsız, vitrifiye gruplarda daha fazla oranda G0+G1 fazı elde edilmiştir. Kıkırdak hücrelerinde ise; koyunlarda 5 saatlik gruplar daha fazla oranda G0+G1 fazına sahipken sığır kıkırdak hücrelerinde ise vitrifiye gruplar iyi sonuç vermiştir. Hücre siklus fazları kas ve kıkırdak hücreleri için genel olarak incelendiğinde; hücrelerin %80 ve üzerinde G0+G1 fazına ulaştıkları ve konfluent + 3 gün %5 FBS uygulanan grubun genel olarak başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak büyüyen bir hücre popülasyonunun hücre siklus analizi yapıldığında %58 oranında G0+G1 fazına ve %20 oranında ise G2+M fazına sahip olduğu belirlenmiştir ki yüksek G2+M oranı hücrelerin mitoz özelliklerinin devam ettiğinin göstergesidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hergün maruz kaldığımız çevre kirliliği, sanayileşme, küresel ısınma gibi birçok faktör türlerin sayılarının azalmasına veya yok olmasına neden olmaktadır. Bu hızlı yok oluş; tüm ülkeler için bir “B planı” oluşturma gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Biyobankalar ülkelerin “B” planlarıdır. Biyobankalar ilk kurulduklarında embriyo ve spermalar saklanmaktaydı. Nükleer Transfer çalışmalarında somatik hücrelerin kullanılması ve başarılı sonuçların elde edilmesi ile de somatik hücreler biyobankalar için önemli hale gelmiştir. Hücreler dokuların primer ekimleri ve ardından kültürleri ile hazırlanmaktadır. Biyobankalar için sağlıklı ve çok sayıda hücrenin banka içerisinde olması gerekmektedir. Bu durumda yüksek maliyet gerektirmektedir. Bu nedenle; dokuların dondurularak saklanabilecekleri gündeme gelmiştir. Dokuların dondurulmasında etkili faktörler ve dondurma yöntemleri ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Sunulan tez çalışmanında; ilk olarak dokuların postmortem bekleme süreleri araştırılmıştır. 216 saate kadar 4°C’de dokular bekletilerek primer kültür ekimleri yapılmış ve hücreler elde edilmiştir. Belirlenen bekleme süreleri sonrasında dokular vitrifikasyon yöntemi ile dondurulup-çözme sonrasında primer kültür ekimleri yapılmış ve hücreler elde edilmiştir. Bekleme sürelerinin yapışma ve konfluensi zamanları üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak; dokuların 216 saate kadar 4°C’de bekletilmeleri sonucunda hem taze hem de vitrikiye gruplardan sağlıklı hücre populasyonları elde edilebildiği gösterilmiştir.

Taze ve vitrikiye gruplardan elde edilen kas ve kıkırdak hücrelerinin populasyon katlanma ve proliferasyon aktiviteleri incelenmiştir. Populasyon katlanma zamanlarının vitrikiye gruplarda daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Proliferasyon aktivitesinde sığır kas ve kıkırdak hücrelerinde anlamlı fark tespit edilmemiştir. Koyunlarda ise 5 saat kıkırdak grubunda taze ve vitrikiye grup arasında anlamlı fark tespit edilmiştir.

Hücre ve doku morfolojileri ve özellikleri göstermek amacıyla boyamalar yapılmıştır. H-E boyamalarında, hücre ve dokularda 216 saat vitrifiye gruplarda az da olsa morfolojik değişiklik görülsede taze gruplarla benzer olarak normal morfoloji göstermişlerdir. Hücrelerin vimentin antikoruna ile boyanması sonucunda taze ve vitrifiye grupları arasında farklılık görülmemiştir. Aktin boyamasında ise vitrifiye gruplarda artmış bir ekspresyon gözlemlenmiştir.

Hücre canlılık ve hücre siklus özellikleri taze ve vitrifiye grupları için incelenmiştir. Hücre canlılıklarının her iki grupta da yüksek olduğu görülmüştür. Hücre siklusunda genel olarak vitrifiye gruplarının daha yüksek oranda G0/G1 fazında buldukları tespit edilmiştir. Hücre siklus fazları incelenirken hücre tipine ve türe göre farklılıklarda tespit edilmiştir. Kıkırdak hücrelerinin GAG analizlerinde taze ve vitrifiye grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir.

Vitrifikasyon yönteminin kas ve kıkırdak dokularının dondurularak saklanması için ideal bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Dokuların 216 saate kadar saklanması için primer kültür üzerine ve vitrifikasyon üzerine olumsuz etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; dokuların vitrifikasyon yöntemi ile dondurularak saklanabileceği ve bunların biyobankalar için alternatif bir yöntem olabileceği gösterilmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda vitrifiye dokulardan elde edilen hücrelerin NT çalışmaları için etkinliklerinin araştırılması gerekmektedir. Taze ve vitrifiye dokulardan elde edilen kas ve kıkırdak hücreleri kullanılarak NT denemeleri yapılarak blastosist gelişim oranları ve canlı doğum oranları incelenebilir. Çalışmada sunulan hücre siklus fazlarının ve canlı hücre oranlarının yüksekliği dikkate alındığında başarılı sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aitken JR, Findlay JK, Hutt JK and Kerr JB (2011) Apoptosis in the germ line. *Reproduction* 141; 139–150
- Akkoç T (2012) *İn vitro* sığır blastosist üretimi üzerine tanımlanmış medyumların etkisi ve blastosistlerin farklı kriyoprezervasyon teknikleri ile dondurulması. Doktora tezi.
- Akşit H ve Bildik A (2008). Apoptozis. *YYÜ VET FAK DERG.* 19(1): 55-63
- Andrabi SMH, Maxwell, WMC (2007) A review of reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sci* 99: 223-243.
- Arat S, Bagis H, Ergin F, Sagirkaya H, Mercan Odaman H, Dinnyes A (2004) Cold storage of tissue as source for donor cells does not reduce the *in vitro* development of bovine embryos following nuclear transfer. *Reprod Fertility Dev.* 16 (1,2):135
- Arat S, Bagis H, Mercan Odaman H, Dinnyes A (2005) Cloned embryos can be produced using donor cells obtained from 72-hour cooled carcass. *Reprod Fertility Dev* 17:164
- Arat S, Caputcu AT, Akkoc T, Pabuccuoglu S, Sagirkaya H, Cirit U, Nak Y, Koban E, Bagis H, Demir K, Nak D, Senunver A, Kilicaslan R, Tuna B, Cetinkaya G, Denizci M, Aslan O (2011) Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reprod Fertil Dev* 23(8):1012-1023.
- Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Respass DS, Tumlin M, Stice SL (2002) *In-vitro* development of bovine nuclear transfer embryos from clonal lines of transgenic adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol Reprod* 66:1768-1774
- Arat S, Tas A, Akkoc T, Cetinkaya G, Bagis H, Sekmen S, Ates E, Soysal D (2009) Effect of growth factors on development of nuclear transfer embryos from cartilage cell of an Anatolian native cow. *Reprod Domes Anim.* 44:93
- Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, Mori Y, Takato T, Hoshi K (2009) Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 15:1109-1118
- Baarine M, Thandapilly SJ, Louis XL, Mazué F, Yu L, Delmas D, Netticadan T, Lizard G, Latruffe N (2011) Pro-apoptotic versus anti-apoptotic properties of dietary resveratrol on tumoral and normal cardiac cells. *Genes Nutr.* 6(2):161-169
- Baicu S, Taylor MJ, Chen Z, Rabin Y (2006) Vitrification of Carotid Artery Segments: An Integrated Study of Thermophysical Events and Functional Recovery Toward Scale- Up for Clinical Applications. *Cell Preserv Technol.* 4(4): 236–244.
- Ballestrem C, Wehrle-Haller B and Imhof B.A (1998) Actin dynamics in living mammalian cells. *Journal of Cell Science* 111: 1649-1658

- Benkeddache D, Bodinier P, Joly T, Berchiche M, Vignon X (2012) Recovery of viable cells from rabbit skin biopsies after storage at -20°C for up to 10 days. *Cell and Tissue Banking* 13(3): 479-486
- Boquest AC, Day BN, Prather RS (1999) Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol Reprod.* 60(4):1013-1019
- Brem G, Kuhholzer B (2002) The recent history of somatic cloning in mammals. *Cloning Stem Cells* 4(1):57-63
- Bulgurcuoğlu S, Özsait B, Attar E (2003) Büyüme faktörlerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerindeki etkisi. *Artemis* 4(1): 18-26
- Cetinkaya G, Arat S (2011) Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. *Cyrobiology* 63: 292-297
- Cho SR, Ock SA, Yoo JG, Mohana Kumar B, Choe SY, Rho GJ (2005) Effects of confluent, roscovitine treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts. *Reprod Domest Anim.* 40(2):171-176.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A., and Robl, J. M. (1998). Cloned transgenic calves from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256-1258.
- Cseh S, Corselli J, Nehlsen-Cannarella SL, Bailey LL, Szalay AA (1997) The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology.* 48(1):43-50.
- Dalman A, Eftekhari-Yazdi P, Valojerdi MR, Shahverdi A, Gourabi H, Janzamin E, Fakheri R, Sadeghian F, Hasani F (2010) Synchronizing cell cycle of goat fibroblasts by serum starvation causes apoptosis. *Reprod Domest Anim.* 45(5):46-53
- Day JG, Stacey GN (2007) Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2nd edn, Humana Press, New Jersey,
- de Barros FR, Goissis MD, Caetano HV, Paula-Lopes FF, Peres MA, Assumpção ME, Visintin JA. (2010) Serum starvation and full confluency for cell cycle synchronization of domestic cat (*felis catus*) foetal fibroblasts. *Reprod Domest Anim.* 45(1):38-41
- de Graaf IA, Draaisma AL, Schoeman O, Fahy GM, Groothuis GM, Koster HJ (2007). Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification *Cryobiology* 54: 1–12
- Demir R. (2006) Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Dilbirliği E (2007). Biyolojik çeşitlilik ve genetik kaynakların sürdürülebilir kullanım stratejilerinin değerlendirilmesi üzerine bir araştırma. Ankara Üniversitesi Peyzaj Mimarlığı Doktora Tezi
- Dinnyés A, Bagis H, Ji W, Kikuchi K, Lee J-W, Li X, Nagai T, Presicce AG, Somfai T, Si W, Yang X (2003) Gene banking in rare breeds and species whose gametes are difficult to cryopreserve. *Animal Husbandry and Nutrition*, 52: 82-90

Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X (2000) High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reproduction* 63: 513-518.

ERFP. (2003). Guidelines form the constitution of national cryopreservation programmes for farm animals. Publication no 1 of the European Regional Focal Point on Animal Genetic Resources. Hiemstra, S.C. (ed.)

Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, Zendejas E (2004) Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* 48:157-178

FAO (2005) <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health> Accessed 11 January 2005.

FAO (2007). Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration, Rome. Available at <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1404e/a1404e00.pdf> [Accessed 6 September 2011]

Freshney I. R. (2005) *Culture of Animal Cell. A Manual of Basic Technique*. 5th Edition . Wiley-Liss (A John Wiley & Son, Inc., Publication

Fröhlich M, Malicev E, Gorenssek M, Knezevic M, Velikonja NK (2007) Evaluation of rabbit auricular chondrocyte isolation and growth parameters in cell culture. *Cell Biology International* 31:620-625

Gañán N, Sestelo A, Garde JJ, Martínez F, Vargas A, Sánchez I, Pérez-Aspa MJ, López-Bao JV, Palomares F, Gomendio M, Roldan ER (2010) Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction* 139:275–285

Gandini G., Oldenbroek J.K. (1999). Choosing the conservation strategy in genebanks and conservation of farm animal genetic resources, Ed. Oldenbroek J.K., Lelystad, The Netherlands

Gartner L.P and Hiatt J.L (1997). *Color textbook of histology*. W.B Saunders Company.

Gavriel Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear dna fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119(3):1992 493-501

Gibbons J, Arat S, Rzucidlo SJ, Waltenburg R, Respass DS, Venable AM, Stice, SL(2002) Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol Reprod* 66:895-900

Gordon I (2003). *Laboratory Production of cattle embryos*. Biotechnology in Agriculture Series No:27. 2nd edition. CABI Publishing.

Guan J, Urban JP, Li ZH, Ferguson DJ, Gong CY, Cui ZF. (2006) Effects of rapid cooling on articular cartilage. *Cryobiology*. 52(3):430-9.

Hall S.J.G (2004) *Livestock Biodiversity: Genetic resources for the farming of the future*. Conservation of livestock biodiversity Chapter. 1st Edition. Blackwell Publishing Company.

Hashimoto T, He Z, Ma WY, Schmid PC, Bode AM, Yang CS, Dong Z (2004) Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. *Cancer Res*. 64(9):3344-9.

Hayes O, Ramos B, Rodríguez LL, Aguilar A, Badía T, Castro FO.(2005) Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. *Anim Reprod Sci.* 87(3-4):181-192.

http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book/Chapter_6%3A_DNA_Analysis

Ideta A, Hayama K, Urakawa M, Tsuchiya K, Aoyagi Y, Saeki K (2010) Comparison of early development in utero of cloned fetuses derived from bovine fetal fibroblasts at the G1 and G0/G1 phases. *Animal Reproduction Science* 119:191–197

Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F (2003). Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *European Journal of Obstetric & Gynecology and Reproductive Biology* 108: 186-193

Kandaş ÖN (2004) Apoptosis, programlı hücre ölümü. *Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi.* 5(1): 7-10

Katkov I. (2012) *Current Frontier in Cyrobiology.* InTech,

Leon-Quinto T, Simon MA, Cadenas R, Jones J, Martinez-Hernandez FJ, Moreno JM, Vargas A, Martinez F, Soria B (2009) Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Animal Reproduction Science* 112:347–361

Lima-Neto J. F., Fernandes C. B., Alvarenga M. A., Golim M. A., Landim-Alvarenga F. C.(2010) Viability and cell cycle analysis of equine fibroblasts cultured in vitro. *Cell Tissue Bank* 11:261–268

Loi P, Clinton M, Barboni B, Fulka JJr, Cappai P, Feil R, Moor MR, Ptak G (2002) Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biology of Reproduction* 67:126–132

Loi P, Matsukawa K, Ptak G, Clinton M, Fulka JJr, Nathan Y, Arav A (2008) Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. *Plos One* 3(8): e2978

Martin H, Bournique B, Sarsat JP, Albaladejo V, Lerche-Langand C (2000) Cryopreserved rat liver slices: A critical evaluation of cell viability, histological integrity, and drug metabolizing enzymes. *Cryobiology* 41:135-144

May SR, Wainwright JF (1985) Integrated study of the structural and metabolic degeneration of skin during 4°C storage in nutrient medium. *Cryobiology* 22:18–24

Mazur P (1974) Freezing of living cells: mechanism and implications. *Am J Physiol* 247:C125-142

McLaren A (2000) Cloning: pathways to a pluripotent future. *Science* 288:1775-1780

Meryman HT (2007) Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 47: 935-945

- Miyoshi K, Rzucidlo JS, Gibbons JR, Arat S, Stice SL (2001). Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in a protein-free medium. *BMC Developmental Biology* 1:12
- Nel-Themaat L, Gómez MC, Damiani P, Wirtu G, Dresser BL, Bondioli KR, Lyons LA, Pope CE, Godke RA (2007) Isolation, culture and characterization of somatic cells derived from semen and milk of endangered sheep and eland antelope. *Reproduction, Fertility and Development* 19:576–584
- Oh HJ, Hong SG, Park JE, Kang JT, Kim MJ, Kim MK, Kang SK, Kim DY, Jang G, Lee BC. (2009) Improved efficiency of canine nucleus transfer using roscovitine-treated canine fibroblasts. *Theriogenology*. 72(4):461-470
- Oswald E, Nougayre`de JP, Taieb F, Sugai M (2005) Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Current Opinion in Microbiology*, 8:83–91
- Palasz AT and Mapletoft RJ. (1996) Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14 (2): 127-149
- Park SP, Kim EY, Oh JH, Nam HK, Lee KS, Park SY, Park EM, Yoon SH, Chung KS, Lim JH. (2000) Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum Reprod*. 15(8):1787-1790.
- Pegg DE (2005) The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Human Fertility*, 8(4): 231 – 239
- Prentice JR, Anzar M (2011) Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Vet Med Int*. pii: 146405. doi: [10.4061/2011/146405](https://doi.org/10.4061/2011/146405)
- Ragoonanan V, Hubel A, Aksan A (2010) Response of the cell membrane–cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. *Cryobiology* 61: 335-344
- Ragoonanan V, Less R, Aksan A (2013). Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. Part 2: The link between the state of the membrane-cytoskeleton complex and the cellular damage. *Cryobiology*. 66(2):96-104
- Rayos AA, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H (1994) Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J Reprod Fertil*. 100(1):123-129.
- Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. (50). pii: 2597. doi: [10.3791/2597](https://doi.org/10.3791/2597).
- Ross M.H., Kaye G.I., Pawlina W. (2003) *Histology: A text and Atlas with Cell and Molecular Biology*. 4th Edition. A Wolters Kluwer Company.
- Ryder OA (2002) Cloning advances and challenges for conservation. *Trends Biotechnol*. 20:231–232

- Sağırkaya H ve Bağış H (2003). Memeli Embriyolarının Kriyoprezervasyonu. Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med 22 (1-2-3) : 127-135
- Schippers KJ, Martens DE, Pomponi SA, Wijffels HR (2011) Cell cycle analysis of primary sponge cell cultures. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal* 47:302–311
- Schmid I, Ferbas J, Uittenbogaart CH, Giorgi JV (1999) Flow cytometric analysis of live cell proliferation and phenotype in populations with low viability. *Cytometry*. 35(1):64-74.
- Schmid I, Hausner MA, Cole SW, Uittenbogaart CH, Giorgi JV, Jamieson BD (2001). Simultaneous flow cytometric measurement of viability and lymphocyte subset proliferation. *J Immunol Methods*. 247(1-2):175-786.
- Seki S and Mazur P (2008) Effect of Warming Rate on the Survival of Vitrified Mouse Oocytes and on the Recrystallization of Intracellular Ice. *Biology of Reproduction* 79, 727–737
- Seki S and Mazur P (2009). The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 59 : 75–82
- Seki S and Mazur P (2011) Stability of mouse oocytes at -80°C: the role of the recrystallization of intracellular ice. *Reproduction* (2011) 141 407–415
- Shiga K, Fujita T, Hirose K, Sasae Y, Nagai T (1999) Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology* 52 (3):527-535
- Shroeder AC, Johnston D, Epping JJ (1991) Reversal of post-mortem degeneration of mouse oocytes during meiotic maturation in vitro. *J Exp Zool* 258:240-245
- Shynkar VV, Klymchenko AS, Kunzelmann C, Duportail G, Muller CD, Demchenko AP, Freyssinet JM, Mely Y (2007) Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. *J Am Chem Soc*. 129(7): 2187-2193
- Silvestre MA, Saeed AM, Cervera RP, Escriba MJ, Garcia-Ximenez F (2003) Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: Effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated immediately after death. *Theriogenology* 59:1469-1477
- Silvestre MA, Saeed AM, Escriba MJ, Garcia-Ximenez F (2000) Vitrification and rapid-freezing of cumulus cells from rabbits and pigs. *Theriogenology* 54(9):1359-1371
- Silvestre MA, Saeed AM, Escribá MJ, García-Ximénez F. (2002) Vitrification and rapid freezing of rabbit fetal tissues and skin samples from rabbits and pigs. *Theriogenology* 58(1):69-76
- Silvestre MA, Sanchez JP, Gomez EA (2004) Vitrification of goat, sheep, and cattle skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. *Cryobiology* 49: 221-229
- Smith LC, Bordignon V, Babkine M, Fecteau G, Keefer C (2000) Benetif and problems with cloning animals. *Can Vet J* 4: 919-924.
- Song Y, Sharp R, Lu F, Hassan M. (2010) The future potential of cryopreservation for assisted reproduction. *Cryobiology*. 60(3 Suppl): 60-65

Stacey, G.N (2004).Fundamental Issues for Cell Line Banks in Biotechnology and Regulatory Affairs. In: "Life in the Frozen State", Eds. Fuller, B.J., Lane, N., and Benson, E.E. CRC Press, London. 437 – 453

Stolzing, A., and Scutt, A. (2006). Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell* 5:213-224

Takahashi H (Ed) (2011) *Liver Biopsy*. Publisher, InTech ISBN 978-953-307-644-7

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development* 51:53–58

Vajta G, Nagy ZP, Cobo A, Conceicao J, Yovich J (2009) Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion, *Biomed Online* 19:1-7

Villalba R, Benitez J, No-Lewis ED, Rioja LF, Gómez-Villagrán JL (1996) Cryopreservation of human skin with propane-1,2-diol. *Cryobiology*. 33(5):525-9.

Walker JM, Rapley R (2008) *Molecular Biomethods Handbook*, 2nd Edition Humana Press, Totowa, NJ. pp 917- 947

Wells DNA, Misica P M, Tervit HR, Vivanco WH (1998) Adult somatic cell NT in used to preserve the last surviving cow of Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*. 10: 369-378.

Wildt DE, Wemmer C (1999) Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. *Biodivers. Conserv* 8: 965-976.

Wusteman M, Robinson M, Pegg D (2004) Vitrification of large tissues with dielectric warming: Biological problems and some approaches to their solution. *Cryobiology* 48:179

Zhou CH, Xiang M, He SY, Qian ZH (2010) Crocetin inhibits cell cycle G1/S transition through suppressing cyclin D1 and elevating p27kip1 in vascular smooth muscle cells. *Phytotherapy Research* 24(7):975-981

EKLER

EK 1. PBS çözeltilisi

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS) (GIBCO 21600-010) bir litre ultra saf suda çözüldükten sonra pH 7,2 ve osmolaritesi 0,280-0,300 mOsm olacak şekilde ayarlanmıştır. 0,22 µm'lik membran filtrelerinde süzölmüştür.

EK 2. DMEM çözeltilisi

DMEM High Glucose (Gibco 12800-017) bir litre ultra saf suda çözüldükten sonra pH 7,2 olacak şekilde ayarlanmış ve osmolaritesi ölçölmüştür. 0,22 µm'lik membran filtrelerinde süzölmüştür. Hazırlanan çözeltiliye %10 ve %20 oranında fetal buzağı serumu (FBS GIBCO), %1 oranında antibiyotik (Primocin, InvivoGen) çözeltilisi uygulanmıştır. Dokuların primer kültürlerinde %20 FBS içeren ve rutin hücre kültüründe ise %10 FBS içeren besiyeri kullanılmıştır.

EK 3. % 4 PFA çözeltilisi

40 gr PFA (Merck 1.04005.1000) bir litre PBS içerisinde 60° C'ye ayarlanmış manyetik karıştırıcı üzerinde şeffaflaşana kadar karıştırılır. Şeffaflanmış solüsyon soğutulduktan sonra 0,22 µm'lik membran filtrelerinde süzölmüştür. Hazırlanan solüsyon 4° C'de bekletilmiştir.

EK 4. Safranin O boyama çözeltileri

Weigert's Demirli Hematoksilen Çözeltisi:

Stok Solüsyon A:

Hematoksilen : 1 g
%95 Alkol : 100 ml

Stok Solüsyon B:

%29 Ferric chloride (suda) : 4 ml
Distile Su : 95 ml
Konsantre Hydrochloric asit : 1ml

Weigert's Demirli Hematoksilen Çalışma Çözeltisi:

Stok A ve B solüsyonlarından eşit miktarlarda karıştırılır. Bu çözelti 4 hafta boyunca kullanılabilir.

%0.001 Fast Green (FCF) Solüsyonu:

Fast green, FCF, C.I. 42053 : 0.01 g
Distile Su : 1000 ml

%1 Acetic Acid Solüsyonu:

Acetic acid, glacial : 1 ml
Distile su : 99 ml

%0.1 Safranin O Solüsyonu:

Safranin O, C.I. 50240 : 0.1 g
Distile su :100 ml

EK 5. Hoescht (HXT) 33342 Nükleus Boyası:

100 mg'lık ambalaj halinde bulunan toz HXT (Sigma B 2261) boyası 10 ml PBS ile sulandırılarak 10 mg/ml final konsantrasyondaki solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyon oligotlaranarak -20 ° C'de saklanır. 10 mg/ml'lik ana stoklardan alınarak PBS ile sulandırılarak 1 µg/ml'lik boya solüsyonları kullanım öncesi hazırlanmıştır.

EK 6. HBS çözeltisi

14,61 gr sodyum klorid 50 ml 1 M Tris içerisinde çözülür ve bir litreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında iki hafta süresince saklanır.

EK 7. Block çözeltisi

0,5 gr polivinilpropoid 48 ml HBS çözeltisi içinde çözülür. % 3 keçi serumu ve % 0,1 Triton X-100 hazırlanan çözeltiye eklenir. +4 ° C'de saklanır. 48 saat içinde kullanılmalıdır.

EK 8. Yıkama çözeltisi

50 ml HBS içerisinde % 0,05 olacak şekilde Tween 20 eklenir ve +4 ° C'de saklanır.

EK 9. Kullanılan cihazlar

- - 80°C dondurucu
- +4/-18°C buzdolabı
- -20°C dondurucu
- Su Banyosu (Nüve BM 400)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Karıştırıcı (Ikamag)
- Osmometre (Gonate, Osmomat 030)
- PH metre (Hanna)
- 37°C % 5 CO₂ etüv (Sanyo)
- Steril kabin (Telstar)
- Stereo mikroskop (Solf)
- Axiovert 25 M İvert mikroskop (Zeiss)
- Nikon TiU İvert mikroskop
- -150°C dondurucu
- Sıvı Azot Tankları (-196°C)
- Flow Cytometri Cihazı (BD)

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Arzu TAŞ ÇAPUTÇU
Doğum yeri ve tarihi : Kocaeli; 14 Eylül 1980
Ev adresi : Karabaş Mahallesi Asım Efendi Sokak Birlik Apt. No:4
Daire:8 İzmit KOCAELİ
İş adresi : TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji
Enstitüsü, Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi
Laboratuvarı,41470, Gebze Kocaeli
E-Mail : tasarzu@gmail.com; arzu.tas@tubitak.gov.tr
Yabancı dil : İngilizce
Eğitim durumu :
1994-1998 İzmit Süper Lisesi
1998-2002 Lisans, Ege Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji
2002-2005 Yüksek Lisans, Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
2005-2013 Doktora, Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Bilimsel Araştırma ve Tecrübeleri

DeneySEL nazal mukozal fleplerde histopatolojik değişikliklerin ve mukosilier aktivitenin değerlendirilmesi ile ilgili çalışma.

Değişik gruplardaki termde insan plasentasında Igf'lerin immunositokimyasal olarak incelenmesi ile ilgili çalışma.

Eklamptik, diabetik ve IUGR olan gebelerden elde edilen plasenta, kordon ve fetal zarların histopatolojik olarak incelenmesi.

Using cell banks as a tool in conservation programs of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle

A Comparative Study of Partenogenetic Activation and in vitro Fertilization of in vitro Maturated Bovine Oocytes

Comparing in vitro Embryonic Development of Bovine Oocytes Cultured in G1.3/G2.3 Sequential Culture Media and CR1aa Medium

Determination of the expression of fish antifreeze protein (afp) in 7th generation transgenic mice tissues and serum

Cryogenic Effect of Antifreeze Protein on Transgenic Mouse Ovaries and the Production of Live Offspring by Orthotopic Transplantation of Cryopreserved Mouse Ovaries

Comperative investigation of spontaneous and retinoic acid-induced differentiation of embryonic stem cell

Induction of differentiation of mouse embryonic stem cells to neuronal cells

Gene Expression Profiles of Vitrified in vitro- and in vivo-derived Bovine Blastocysts by Microarray Analysis

Histokimyasal çalışmalar ve İmmunohistokimya çalışmaları.

Sığır ve farelerden oosit ve embriyo eldesi.

Oosit ve embriyo kültürleri.

Transgenik hayvan eldesi ve analizleri

Nükleer Transfer

Doku Vitrifikasyon

Embriyo Dondurma

Hücre kültürü ve besleyici tabaka hazırlanması

Fare Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürasyonu, Farklılaşması ve Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi).

Proje Deneyimleri

“ANADOLU YERLİ SIĞIR IRKLARININ KLONLANMASI” Araştırmacı,

“TÜRKİYE YERLİ EVCİL HAYVAN GENETİK KAYNAKLARINDAN BAZILARININ İN VİTRO KORUNMASI VE ÖN MOLEKÜLER TANIMLANMASI-I (TÜRKHAYGEN-1)” Araştırmacı,

“MODERN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLER KULLANILARAK DONDURULMUŞ KOÇ SPERMASI ve CİNSİYETİ BELİRLİ İNEK EMBRİYOSU ÜRETİMİ” Araştırmacı, İş Paketi Sorumlusu ve Kurum içi Yürütücü Yardımcılığı,

“ULUSAL BİYOÇEŞİTLİLİĞİN VE GEN KAYNAKLARININ KORUNMASI HEDEFLERİ DOĞRULTUSUNDA BÜYÜK MEMELİ TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI, KORUNMASI VE YÖNETİMİ” Araştırmacı, İş Paketi Sorumlusu ve Kurum içi Yürütücü Yardımcılığı,

“TÜRK BOZA İÇECEĞİNİN BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ VE SÜT VERİMİ ÜZERİNE ETKİSİ” Araştırmacı

Bilimsel Aktiviteler

Yayınlar:

YAYINLAR				
YAZAR(LAR)	MAKALE/BİLDİRİ BAŞLIĞI	DERGİ/TOPLANTI ADI	CİLT/SAYI/SAYFA	TARİH
A.Tas, S.Arat	Comperative investigation of spontaneous and retinoic acid-induced differentiation of embryonic stem cell	Clinical Dermatology, Retinoids and other treatment Impact factor : 0,855 Citations : 0	23(1); 6-8	2007
S Özkan, B Vural,C Dalcık, A Tas, and H Dalcık	Placental expression of insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor-basic and neural cell adhesion molecule in pregnancies with small for gestational age fetuses	Journal of Perinatology Impact factor : 2,003 Citations : 6	1-7	2008
Haydar Bağış, Tolga Akkoc, Arzu Taş, Dıgdem Aktopraklıgil	Cryogenic Effect of Antifreeze Protein on Transgenic Mouse Ovaries and the Production of Live Offspring by Orthotopic Transplantation of Cryopreserved Mouse Ovaries	Molecular Reproduction And Development Impact factor : 2,395 Citations : 14	75:608-613	2008

Haydar Bağış, Arzu Taş , Orhan Kankavi	Determination of the expression of fish antifreeze protein (afp) in 7th generation transgenic mice tissues and serum.	Journal Of Experimental Zoology Part-A Comparative Experimental Biology Impact factor : 1,5 Citations : 0	309A:255–261	2008
Mesut Cevik, Hakan Sagirkaya, Arzu Tas , Tolga Akkoc, Haydar Bagis and Sezen Arat	Comparing <i>in vitro</i> Embryonic Development of Bovine Oocytes Cultured in G1.3/G2.3 Sequential Culture Media and CR1aa Medium	Journal of Animal and Veterinary Advances, Impact factor : 0,292 Citations : 2	8 (6): 1185-1189	2009
Mesut Çevik, Arzu Taş , Tolga Akkoç, Haydar Bağış, Sezen Arat	A Comparative Study of Partenogenetic Activation and in vitro Fertilization of in vitro Maturated Bovine Oocytes	Turk. J. Vet. Sci TUBİTAK Impact factor : 0,276 Citations : 1	33(5) :393-399	2009
Sezen Arat, Arzu Caputcu , Tolga Akkoc, Serhat Pabuccuoglu ^B , Hakan Sagirkaya, Umut Cirit, Yavuz Nak, Evren Koban, Haydar Bagis, Kamber Demir, Deniz Nak, Adem Senunver, Ragip Kilicaslan, Bilginer Tuna, Gaye Cetinkaya, Melis Denizci and Ozgur Aslan	Using cell banks as a tool in conservation programs of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle	Reproduction, Fertility and Development Impact factor : 2,553 Citations : 0	23(8):1012-1023	2011
Digdem Aktoprakligil Aksu, Cansu Agca, Soner Aksu, Tolga Akkoc, Arzu Tas Caputcu , Ali Cihan Taskin, Sedat H. Kizil, Tahir Karasahin, Numan Akyol, Muharrem Satilmis, Hakan Sagirkaya, Zekeriya Nur, Haydar Bagis,	Gene Expression Profiles of Vitrified in vitro- and in vivo-derived Bovine Blastocysts by Microarray Analysis	Journal of Molecular Reproduction and Development (Kabul edildi. Yayınlanma aşamasında) Impact factor : 2,46 Citations : 0		

Yuksel Agca.				
Arzu Tas Caputcu, Tolga Akkoc, Gaye Cetinkaya and Sezen Arat	Tissue cryobanking for conservation programs: effect of tissue type and storage time after death	Cell and Tissue Banking (Online Basımı gerçekteştir.) Impact factor : 1,157 Citations : 0	DOI 10.1007/s10561-012-9292-6	2012

DİĞER HAKEMLİ DERGİLER

A.Tas, S.Arat, H.Dalcik	Induction of differentiation of mouse embryonic stem cells to neuronal cells	Journal of Science & Technology	Vol:1 Issue :2 56-60	2005
Ali Cihan Taskin, Tolga Akkoc, Arzu Tas Caputcu, Sezen Arat, Haydar Bagis	Optimal method of mouse blatomere biopsy: in vitro developmental potential of the biopsied embryo to blastocyst stage after aspirated eight-cell mouse embryos	Journal of Animal and Veterinary Advance. Impact factor : 0,292 Citations : 0	10 (22): 3027-3030	2011
Tolga Akkoc, Ali Cihan Taskin, Arzu Tas Caputcu, Sezen Arat, Haydar Bagis	The Effect of Solid Surface Vitrificaiton (SSV) Versus Classic Vitrification Technique on Survive Rate of in vitro produced bovine blastocysts	Journal of Animal and Veterinary Advance. Impact factor : 0,292 Citations : 1	10 (22): 2885-2891	2011

DERGİDE YAYINLANAN KONGRE ÖZETLERİ

Vural B, Özkan S, Tas A, Dalcik C, Dalcik H, Yucesoy G.	Placental expression on insulin-like growth factor-1,fgf and ncam in pregnancies complicatedwith intrauterine growth retardation.	Gynecology And Obstetrics Impact factor : 0,054 Citations : 0	Vol:271 Supplement 1, 28	May 2005
A.Tas, S.Arat, H.Dalcik.	Comparative investigation of spontaneous and ra induced differentiation of embryonic stem cells.	THE FEBS JOURNAL Impact factor : 3,129 Citations : 1	Vol: 273 Supplement 1, 129	June 2006
S. Arat, H. Bagis, A.Tas, T. Akkoc	Effect Of Several Parameters On Parthenogenetic Bovine Embryo Development In	Reproduction, Fertility And Development	Vol:18(1,2), 119	January 2006

	Vitro.	Impact factor : 2,553 Citations : 0		
H. Bagis, S.Arat, H. Odaman, A.Tas	Effect Of Oocyte Age On The Development Of Mouse Parthenogenetic Embryos And Effect Of Oxygen Concentration On Embryo Development In Vitro	Reproduction, Fertility And Development Impact factor : 2,553 Citations : 0	Vol:18(1,2), 119-120	January 2006
A.Tas , S.Arat, H.Dalcik	Comparative Evaluation Of Various Protocols For Neural Differentiation Of Mouse Embryonic Stem Cells.	Reproduction, Fertility And Development Impact factor : 2,553 Citations : 1	Vol:18(1,2), 211	January 2006
Haydar Bagis, Arzu Tas , Tolga Akkoc	Investigation of Antifreeze Protein (AFP) Expression in Oocytes and Embryos of Transgenic Mice with Carrying AFP GENE by Immunohistochemical Staining.	33rd. FEBS Congress 11 th IUBMB Conference. Atina/YUNANİSTAN. THE FEBS JOURNAL Impact factor : 3,129 Citations : 0	Vol: 275 Supplement 1, 296	June 2008
Haydar Bağış, Arzu Taş , Orhan Kankavi	Investigation Of Fish Antifreeze Protein (Afp) Expression In Fibroblast Cell Of Transgenic Mice Carrying Afp Gene By Immunohistochemical And Western Blot Analysis	33rd. FEBS Congress 11 th IUBMB Conference. Atina/YUNANİSTAN. THE FEBS JOURNAL Impact factor : 3,129 Citations : 0	Vol: 275 Supplement 1, 298	June 2008
S Arat, A Tas , G Cetinkaya, T Akkoc, H Bagis	The Effects of Embryo Culture Mediums on Reprogramming of Cartilage Cells From Male and Female Cow.	33rd. FEBS Congress 11 th IUBMB Conference. Atina/YUNANİSTAN. THE FEBS JOURNAL Impact factor : 3,129 Citations : 0	Vol: 275 Supplement 1, 296	June 2008
Sezen Arat, Arzu Tas , Haydar Bagis, Hakan Sagirkaya, Yavuz Nak, Deniz Nak, Tolga Akkoc, Gaye Cetinkaya	Cloning of Anatolian Grey Bull	Reproduction, Fertility And Development Impact factor : 2,553 Citations : 0	Vol:21, 110-111	January 2009

Arzu Tas, Sezen Arat, Gaye Cetinkaya, Tolga Akkoc, Haydar Bagis	The Effect of Electrical Pulse on Development of Nuclear Transfer (NT) Bovine Embryos from Cartigale Cells	Reproduction, Fertility And Development Impact factor : 2,553 Citations : 1	Vol:21, 126-127	January 2009
Evren Koban, ArzuTaş, Özgür Aslan, Tolga Akkoç, Sezen Arat, Haydar Bağış	Sexing of bovine Embryos Based on PCR Technique	Reproduction, Fertility And Development Impact factor : 2,553 Citations : 0	Vol:21, 230	January 2009
A Tas, S Arat, T Akkoc, G Cetinkaya, H Bagis, S Sekmen, E Ates	Effects of Cell Type and Cell Synchronization on Embryo Development following Bovine Nuclear Transfer	13 th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) Reproduction in Domestic Animals Impact factor : 1,606 Citations : 0	Vol 44, Supplement 3, September 2009. 91	9-12 Eylül 2009
S Arat, A Tas, T Akkoc, G Cetinkaya, H Bagis, S Sekmen, E Ates, D Soysal	Effect of Growth Factors on Development of Nuclear Transfer Embryos from Cartilage Cells of an Anatolian Native Cow	13 th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) Reproduction in Domestic Animals Impact factor : 1,606 Citations : 0	Vol 44, Supplement 3, September 2009. 93	9-12 Eylül 2009
D.Aktopraklıgil Aksu, C.Agca, S.Aksu, T.Akkoc, A. Tas Caputcu, S.H. Kızıl, H. Sagirkaya, H. Bagis, Y. Agca	177 Gene Expression profiles of in vitro and in vivo derived bovine embryos	37 th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS) Reproduction, Fertility and Development Impact factor : 2,553 Citations : 0	Vol 23 (1) 190	January 2011
Aktoprakligil Aksu, C Agca, S Aksu, T Akkoc, A Tas Caputcu, SH Kizil, H Sagirkaya, H Bagis, Y Agca.	Gene Expression Profiles of in vitro- and in vivo-derived Bovine Embryos.	37 th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS) Reproduction, Fertility and Development	Vol 23 (1)	January 2011

		Impact factor : 2,553		
		Citations : 0		
Tolga Akkoc, Ali Cihan Taskin, Arzu Tas Caputcu , Sezen Arat, Haydar Bagis	Comparing SSV and OPS Vitrification Techniques and Different Sollutions on Cryopreservation of Mouse Blastocysts (Accepted)(Poster)	Abstract / Current Opinion in Biotechnology Impact factor : 8,486 Citations : 0	22S S 15-S152	İstanbul-2011
Fatih Karakaya, Arzu Tas Caputcu , Ozlem Celasin, Gaye Cetinkaya, Tolga Akkoc, Umut Tasdemir, Sezen Arat	Establishing Cell-Banks-of Anatolian Domestic Breeds with Visualization of Cryostorage.(Accepted) (Poster)	Abstract / Current Opinion in Biotechnology Impact factor : 8,486 Citations : 0	22S S 15-S152	İstanbul-2011
Diğdem Aktopraklogil Aksu, Cansu Ağca, Soner Aksu, Haydar Bağış, Tolga Akkoç, Arzu Taş Çaputçu , Sezen Arat, Ali Cihan Taşkın, Sedat Hamdi Kızıl, Hakan Sağırkaya, Yüksel Ağca	Gene expression profiling of in vitro-derived and invivo-derived bovine blastocysts using microarray analysis	Abstract / Current Opinion in Biotechnology Impact factor : 8,486 Citations : 0	22S S 15-S152	İstanbul-2011

KONGRE BİLDİRİLERİ

A.Taş , S.Arat, H.Dalçık	Fare Embriyonik Kök Hücrelerin Spontan Farklılaşma Kapasiteleri	IV.Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi. Antalya		25-28 Ekim 2007
Haydar Bağış, Tolga Akkoç, Korhan Arslan, Gaye Çetinkaya, Arzu Taş , Sezen Arat.	Pronükleer Safhadaki Fare Embriyolarının SAGE Medyumlarında in vitro Kültürleri	IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Adana.		20-23 Mayıs 2008
Sezen Arat, Arzu Taş , Gaye Çetinkaya, Tolga Akkoç, Haydar Bağış	The Effect of Fussion Parameters on Bovine Blastocysts Development Rats on Nuclear Transfer	IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Adana.		20-23 Mayıs 2008
S. Arat, A. Taş , H. Bağış, H. Sağırkaya, Y. Nak, D. Nak, S.	Anadolu Boz Sığır Irkının Klonlanması	Veteriner Jinekoloji Derneği III. Veteriner Jinekoloji Kongresi		23-26 Ekim 2008

Pabuccuoğlu, Ü. Cirit, E. Karaman, K. Demir, K. Ak, T. Akkoç, G. Çetinkaya				
T. Akkoç, A. Taş , G. Çetinkaya, H. Bağış, S. Arat	Partenogenetik Sığır Blastosistlerinin Open Pulled Straw (OPS) Vitrifikasyon Yöntemi ile Dondurulması ve Çözündürülmesinde Kullanılan FCS Miktarlarının Blastosist Canlılık Oranları Üzerine Etkisi.	Veteriner Jinekoloji Derneği III. Veteriner Jinekoloji Kongresi		23-26 Ekim 2008
Sezen Arat, Arzu Taş Çaputçu , Tolga Akkoç, Gaye Çetinkaya, Haydar Bağış, Şakir Sekmen, Erman Ateş	Aynı Hayvana Ait Farklı Hücre Tiplerinin ve Büyüme Faktörlerinin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkileri [Sözlü Sunum]	V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi		1-4 Ekim 2009 Elazığ
Arzu Taş Çaputçu , Sezen Arat, Tolga Akkoç, Gaye Çetinkaya, Haydar Bağış, Şakir Sekmen, Erman Ateş, Deniz Soysal	Sığır Nükleer Transfer Çalışmalarında Hücre Tipi ve Senkronizasyonunun Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi	V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi		1-4 Ekim 2009 Elazığ
Arzu Taş Çaputçu , Sezen Arat, Tolga Akkoç, Gaye Çetinkaya, Haydar Bağış, Şakir Sekmen, Erman Ateş, Erdoğan Sezgin	Farklı Hayvan Irklarına Ait, Farklı Hücre Tiplerinin Sığır Klon Embriyolarının Gelişimi Üzerine Etkisi	V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi		1-4 Ekim 2009 Elazığ
Tolga Akkoç, Arzu Taş Çaputçu , Haydar Bağış, Sezen Arat	Farklı Somatik Hücre Tipleri Kullanılarak Yapılan Nükleer Transfer Sonucunda Elde Edilen Blastosistlerin Vitrifikasyonu	V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi		1-4 Ekim 2009 Elazığ
Mesut Çevik, Arzu Taş , Tolga Akkoç, Haydar Bağış, Sezen Arat	Partenogenetik Aktivasyon ve in vitro Fertilizasyon ile Üretilmiş Sığır Embriyolarının Ardışık Kültür Medyumunda Gelişim Oranları.	V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi		1-4 Ekim 2009 Elazığ

Sezen Arat , Arzu Taş Çaputçu , Tolga Akkoç, Gaye Çetinkaya, Haydar Bağış, S.Pabuçcuoğlu, Ü. Cirit, K.Demir, K. Ak, Ş. Adem, R.Kılıçaslan, H.Sağırkaya, Y.Nak, D.Nak	Anadolu Boz Sığırının Klonlanması	XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi		13-16 Aralık 2009
Gaye Çetinkaya, Arzu Taş Çaputçu , Sezen Arat	Farklı Dondurma Hızlarının Primer Sığır Kas ve Kıkırdak Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi		13-16 Aralık 2009
Çaputcu Tas A , Arat S, Akkoc T, Cetinkaya G, Bağış H, Pabuccuoğlu S, Cirit U, Demir K, Senunver A, Kılıçaslan R, Sağırkaya H, Nak , Nak D, Tuna B	Anadolu boz sığır klonlarında plasentanın incelenmesi	X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi		17-20 Mayıs 2010
Arzu Taş Çaputçu , Tolga Akkoç, Gaye Çetinkaya, Sezen Arat	The Effect of Vitrification on Bovine Ear and Muscle Tissues Extirpated After Death and Maintained at Different Time Periods.	Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs (CRYO) Palacio de Congresos		27 - 30 Mayıs 2010
Cetinkaya G, Tas A , Arat S,	Comparative studies of different cryopreservation methods for chondrocytes and myocytes	Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs (CRYO) Palacio de Congresos		27 - 30 Mayıs 2010
Arat S, Çaputcu Tas A , T Akkoc, G Cetinkaya, H Bagis, H Sağırkaya, Y Nak, D Nak, S Pabuccuoğlu, Ü Cirit, E Karaman, K Demir, K Ak,	Yerli sığır ırklarının klonlanması	1. Uluslararası Katılımlı Veteriner Hekimliği Kongresi – EXPO Vet Fuarı		3 - 6 Haziran 2010
Sezen Arat, Arzu Çaputcu , Tolga Akkoc, Gaye Cetinkaya, Evren Koban, Ozgur Aslan	Cloning of anatolian grey cows	14th International Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society		14-18 Eylül 2010

		Rimini – İtalya		
Arzu Caputcu Tas , Sezen Arat , Tolga Akkoc, Gaye Cetinkaya, Ozlem Celasin	Klon Sığırlarda Plasentanın İncelenmesi	IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi - Antalya		4 - 7 Kasım 2010
Özlem Celasin, Arzu Caputcu Tas , Sezen Arat	Leukemia inhibitor facto(LIF)'in sığır embriyo gelişimi üzerine etkisi	IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi - Antalya		4 - 7 Kasım 2010
Sezen Arat , Arzu Caputcu Tas , Tolga Akkoc, Gaye Cetinkaya, Evren Koban, Ozgur Aslan, Melis Denizci, Haydar Bağış, Serhat Pabuccuoğlu, Umut Cirit, Adem Senunver, Ragıp Kılıcaslan, Kamber Demir, Hakan Sağırkaya, Yavuz Nak, Deniz Nak, Bilginer Tuna	Yerli sığır ırklarının klonlanması	Yerli sığır ırklarının klonlanması - Antalya		4 - 7 Kasım 2010
Tolga Akkoç, Arzu Taş Çaputçu , Haydar Bağış, Sezen Arat	Sığır Oositlerinin Katı Yüzey Vitrifikasyon Tekniği ile Vitrifikasyonu, Vitrifikasyon Sonrası <i>in vitro</i> Gelişim Oranlarının İncelenmesi	VI. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi.		18-22 Mayıs 2011 Antalya
Arzu Taş Çaputçu , Tolga Akkoç, Gaye Çetinkaya, Sezen Arat	Ölümden Sonra Farklı Zaman Periyotlarında Örneklenen Koyun Kulak ve kas Dokuları Üzerine Vitrifikasyonun Etkisi	VI. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi		18-22 Mayıs 2011 Antalya
Sezen Arat, Arzu Taş Çaputçu , Tolga Akkoç, Gaye Çetinkaya, Ali Cihan Taşkın	Nüklear Transferlerde Oosit Yaşının İnek Blastosist Gelişim Oranlarına Etkileri.	VI. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi		18-22 Mayıs 2011 Antalya
Tolga Akkoc, Ali Cihan Taskin, Arzu Tas Caputcu , Sezen Arat, Haydar Bagis	The effect of solid surface vitrification (ssv) and classic vitrification technique on survive rate of in vitro produced Bovine blastocysts	Molecular Immunology & Immunogenetics Congress (MIMIC2012)		27-29 Nisan 2012, Antalya

Katıldığı Kurslar:

- 1- “Hücre Manipulasyon Teknikleri, Çekirdek Transferi ve Embriyonik Kök Hücrelerin Tanımlanması Kursu“.1. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi Memorial Hastanesi 7-9 Mayıs 2004
- 2- “Yardımcı Üreme Teknikleri ve Transgenik Hayvan Üretiminde Kullanılan Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu.” TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. 28 Haziran- 02 Temmuz 2004 ve 05-09 Temmuz 2004.
- 3- “Yardımcı Üreme Teknikleri ve Transgenik Hayvan Üretiminde Kullanılan Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu.” TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. (2005 iki kurs, Eğitmen) .
- 4- ”Deney Hayvanları Kullanım ve Etik Kursu” TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. 22-23 Şubat 2006 ve 22-23 Aralık 2009
- 5- “Yardımcı Üreme Teknikleri ve Transgenik Hayvan Üretiminde Kullanılan Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu.” TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. 3-7 Temmuz 2006 (Eğitmen)
- 6- “Yardımcı Üreme Teknikleri ve Transgenik Hayvan Üretiminde Kullanılan Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu.” TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü. 25-29 Haziran 2007. (Eğitmen)
- 7- “Yardımcı Üreme Teknikleri ve Transgenik Hayvan Üretiminde Kullanılan Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu.” TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü. 05-09 Ekim 2009. (Eğitmen)
- 8- “Memeli Hayvanlarda İn Vitro Embriyo Üretimi ve Nükleer Transfer Uygulamalı Eğitimi” TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü. 28 Mart-01 Nisan ve 04-08 Nisan 2011 (Eğitmen)
- 9- "Fundamentals and Applications of Fluorescence Microscopy in Modern Cell Biology" Koç Üniversitesi 11-17 Ağustos 2012

Katıldığı Kongreler:

- 1- IV. Deneysel ve Klinik Araştırma Kongresi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri 16-18 Mayıs 2003
- 2- I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi , İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, İstanbul 7-9 Mayıs 2004 .
- 3-VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Mersin 18-21 Mayıs 2004
- 4-I. International Mediterranean Pharmacy Congress, Mersin 28-31 Ekim 2005 (En iyi Sözlü Sunu ödülü alınmıştır.)
- 5-II. Kök Hücre Biyolojisinde Güncel Kavramlar Klinik Uygulamalar Sempozyumu, İstanbul 7 Eylül 2006
- 6-31st FEBS Congress Molecules in Health&Disease, İstanbul 24-29 Haziran 2006
- 7-IV. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Manavgat/ANTALYA, 25-28 Ekim 2007

- 8-IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, ADANA, 20-23 Mayıs 2008
- 9-III. Veteriner Jinekoloji Kongresi, Lara/ANTALYA, 23-26 Ekim, 2008,
- 10- 13th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction, Belçika 9-12 Eylül 2009
- 11- V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 01-04 Ekim 2009. ELAZIĞ.
- 12- X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir 17-20 Mayıs 2010
- 13- IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi, Antalya 01-04 Kasım 2010
- 14- VI. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 18-22 Mayıs 2011. Antalya
- 15- 2. Kök Hücre Sempozyumu, 23 Aralık 2011. İstanbul

Kurs Kitabı:

- 1- “Yardımcı Üreme Teknikleri ve Transgenik Hayvan Üretiminde Kullanılan Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu“ kitabı. Yazarlar: Prof. Dr.Haydar BAĞIŞ, Doç.Dr.Sezen ARAT, Tolga AKKOÇ, Arzu Taş Çaputçu, Ali Cihan Taşkın, Şakir Sekmen, Gazi Turgut.
- 2- “Memeli Hayvanlarda İn Vitro Embriyo Üretimi ve Nükleer Transfer Uygulamalı Eğitimi” kitabı. Yazarlar: Doç.Dr.Sezen ARAT, Arzu Taş Çaputçu, Tolga AKKOÇ, Gaye Çetinkaya, Ali Cihan Taşkın, Özlem Celasin, Fatih Karakaya, Şakir Sekmen, Gazi Turgut.

Katıldığı Eğitimler:

- 1- “Sürekli Kurumsal Gelişim ve Değişim” konulu uygulamalı çalışma programı. TÜBİTAK-TÜSSİDE, 06-08. Eylül 2007.
- 2- “Sunum Becerilerinin Geliştirilmesi ve Etkili Konuşma” konulu uygulamalı çalışma programı. TÜBİTAK-TÜSSİDE, 11-12 Nisan 2007
- 3- “Temel İlk Yardım Eğitim Programı” 03-04 Eylül 2007
- 4- ISO 9001 KALİTE YÖNETİM SİSTEMİ EĞİTİMİ 17 Nisan 2008
- 5- ISO 14001 ÇEVRE YÖNETİM SİSTEMİ" EĞİTİMİ 18 Nisan 2008
- 6- “Chemwatch Veri Tabanı Programı Eğitimi 25 Aralık 2008
- 7- “ISO/IEC 17025 LABORATUVAR YÖNETİM SİSTEMİ” 30-31 Mart 2009
- 8- “Sertifikalı İlk Yardım Güncelleme Eğitim” 16 Eylül 2010
- 9- “Temel İstatistik ve İleri İstatistik Eğitimleri” 01-02 Aralık 2010 ve 15-17 Aralık 2010
- 10- “Proje Yönetimi” 9-12 Mayıs 2011
- 11- “Yeni Başlayanlar İçin Biyogüvenlik 3 Laboratuvarı (BSL-3)” Eğitim Programı 15-16.08.2011 TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü
- 12- 13-15 Temmuz 2011 ve 12-14 Eylül 2011 tarihlerinde Biyogüvenlik Seviye 3 Laboratuvarı (BSL 3) Eğitimi, TÜV SÜD CLEANCERT GMBH, Prof. Dr. Horst WEIßSIEKER
- 13- 24 - 25 Kasım 2011 tarihinde “Metod Validasyonu ve Mikrobiyolojik Belirsizlik” Eğitimi
- 14- 31 Ekim – 01 Kasım 2011 tarihinde “Metod Validasyonu ve Kimyasal Belirsizlik” Eğitimi
- 15- 18 Haziran 2012 “Uygulamalı Argede Temel Yaklaşımlar Eğitimi”

Alman Ödüller:

- 1- “Induction of differentiation of mouse embryonic stem cells to neuronal cells” başlıklı çalışma ile en iyi sözlü sunum ödülü (I. International Mediterranean Pharmacy Congress, Mersin 28-31 Ekim 2005)
- 2- B Kategorisi TÜBİTAK MAM Başarı Ödülü; “Anadolu Yerli Sığırlarının Klonlanması“ Projesi, 2010
- 3- “Leukemia inhibitor facto(LIF)’in sığır embriyo gelişimi üzerine etkisi” başlıklı çalışma ile poster ikincilik ödülü (IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi, Antalya 01-04 Kasım 2010)

Üyelikler:

Society of Cyrobiology

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği