



**FARKLI HÜCRE SENKRONİZASYON YÖNTEMLERİNİN ERKEN VE GEÇ PASAJ
SAYILARINDAKİ SIĞIR VE KOYUN HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

ASLI TANI

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

2022

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FARKLI HÜCRE SENKRONİZASYON YÖNTEMLERİNİN ERKEN VE GEÇ PASAJ
SAYILARINDAKİ SIĞIR VE KOYUN HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

ASLI TANII

ORCID: 000-0001-6296-6204

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

TEMMUZ-2022
Her hakkı saklıdır.

ÖZET

FARKLI HÜCRE SENKRONİZASYON YÖNTEMLERİNİN ERKEN VE GEÇ PASAJ SAYILARINDAKİ SIĞIR VE KOYUN HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Aslı TANI

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

Donör hücrelerin hücre döngüsü aşaması, nükleer transfer embriyolarının gelişim yeteneğini etkileyen önemli bir faktördür. G0/G1 aşamaları nükleer transferde en uygun hücre döngüsü aşaması olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, sığır ve koyunlardan alınan granüloza hücreleri erken (5.) ve geç (15.) pasajlarda analiz edilmektedir. Deney grupları, aktif olarak bölünen hücrelerden, 24/72 saat konfluent (%10 FBS) ve 24/72 saat serum açlığı (%0.5 FBS) uygulanan hücrelerden oluşmaktadır. Hücre döngüsü fazları, G0/G1, S ve G2/M'deki hücre yüzdeleri hücrelerin propidyum iyodür, hücre canlılığı, apoptoz/nekroz hücre yüzdeleri hücrelerin propidium iyodür ve Annexin V-FITC ile boyanması sonrasında akış sitometri cihazında belirlenmiştir. Uygulama gruplarında 24/72 saat konfluent hücrelerde G0/G1 oranı %78.69-%87.58 arasında, 24/72 saat serum açlığı uygulanan hücrelerde G0/G1 oranı %83.02 %96,16 arasında değiştiği görülerek kontrol grubundan (%68.22-76.97) yüksek bulunmuştur (P<0.05). Analiz bulgularına göre erken ve geç apoptotik hücrenin toplam oranının %1.17 %4.42 arasında, nekroz hücrelerin %1.41-%6.46 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Koyun 15th pasaj hariç en iyi senkronizasyon serum açlığı deney gruplarından elde edilmiştir. Koyun 15th pasaj uygulama grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (P<0.05).

Anahtar Kelimeler: Hücre Kültürü, Hücre Siklusu, Hücre Senkronizasyonu, Granüloza, Erken/Geç Pasaj, Flow Sitometri

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENT CELL SYNCHRONIZATION METHODS ON EARLY AND LATE PASSAGE NUMBER SHEEP AND BOVINE CELLS

Aslı TANI

Department of Agricultural Biotechnology

MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Sezen ARAT

The cell cycle stage of donor cells is an important factor influencing developmental ability of nuclear transfer embryos. G0 or G1 stages are considered to be the most suitable stage for nuclear transfer. In this study, the granulosa cells from cattle and sheep were analyzed low (5th) and high (15th) passages. Experimental groups consist actively dividing cells, contact inhibition (%10 FBS) for 24 and 72 hours, cells starvation (%0.5 FBS) for 24 and 72 hours. Cell cycle phases ratios were determined after cells were stained with propidium iodide, cell viability/apoptosis/necrosis cell ratios were determined after cells were stained with propidium iodide and Annexin V-FITC by flow cytometry. In the treatment groups, it was observed that the G0/G1 rate was between %78.69-87.5 in confluent cells for 24/72 hours, and the G0/G1 rate was between %83.02-%96.16 in serum starvation cells for 24/72 hours found to be higher than the control group (%68.22-%76.97) (P<0.05). According to the analysis findings, it was determined that the total rate of early and late apoptotic cells varied between %1.17-%4.42, and necrosis cells varied between %1.41-%6.46. Except for sheep high (15th) passage, the best synchronization was obtained from serum starvation experimental groups. There was no statistical difference between the sheep higher (15th) passage application groups (P<0.05).

Keywords: Cell Culture, Cell Cycle, Cell Synchronization, Granulosa, Low/High Passage, Flow Cytometry

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
TEŞEKKÜR.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Hücre Kültürü	2
1.1.1 Hücre Kültürü Vasatı (Ortamı)	3
1.1.2 Hücre Kültürü Fizikokimyasal Faktörler	5
1.1.3 Granüloza Hücreleri.....	5
1.1.4 Pasaj Sayısı	6
1.2 Hücre Döngüsü (Siklus).....	7
1.2.1 G1 Evresi	7
1.2.2 S Evresi	8
1.2.3 G2 Evresi	8
1.2.4 M Evresi.....	8
1.2.5 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	8
1.2.6 Hücre Ölüm Şekilleri	10
1.2.6.1 Nekroz.....	11
1.2.6.2 Apoptoz	11
1.3 Hücre Senkronizasyon Yöntemleri	15
1.3.1 Kullanılan Bazı Kimyasallar	16
1.3.2 Serum Açlığı Yöntemi	17
1.3.3 Konfluent Yöntemi	17
1.4 Literatür Özeti	18
1.5 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı.....	20
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
2.1 Materyal	22
2.1.1 Kullanılan Hücre Çeşitleri	22
2.1.2 Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler.....	22

2.1.2.1 Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medium (DMEM)/F-12 Besiyeri	23
2.1.2.2 Fetal Bovine Serum (FBS)	23
2.1.2.3 Antibiyotik	24
2.1.2.4 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	24
2.1.2.5 Tripsin	24
2.1.2.6 Kriyoprotektan DMSO ve Dondurma Solüsyonu	25
2.1.2.7 Tripan Mavisi (Blue)	26
2.1.2.8 Flow Sitokiyometri Kitleri	26
2.1.3 Kullanılan Malzemeler	27
2.1.3.1 Petri Kapları, Kriyotüpler	27
2.1.3.2 Otomatik Pipet, Elektrikli Pipet Pompası ve Pipet Uçları	28
2.1.3.3 Süzme Aparatı (Vakumlu Filtrasyon)	29
2.1.3.4 Thoma Lamı	30
2.1.3.5 Mr. Frosty™ Cryo 1°C Dondurucu Kap	32
2.1.4 Kullanılan Cihazlar	32
2.1.4.1 Otoklav	33
2.1.4.2 Hassas Terazî	34
2.1.4.3 Manyetik Karıştırıcı	34
2.1.4.4 pH Metre	35
2.1.4.5 Su Banyosu	35
2.1.4.6 Laminer Flow Kabin	36
2.1.4.7 Vakum Pompası	36
2.1.4.8 Santrifüj	37
2.1.4.9 CO ₂ İnkübatörü	38
2.1.4.10 Isıtıcı Tabla	39
2.1.4.11 Inverted Mikroskop	39
2.1.4.12 Buzdolabı ve -80 °C Derin Dondurucu	40
2.1.4.13 Flow Sitometri	41
2.2 Yöntem	42
2.2.1 Besi Ortamının Hazırlanması	42
2.2.2 Dulbecco's Fosfat Buffer Saline (DPBS) Hazırlanması	44
2.2.3 Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması	44
2.2.4 Hücre Açma	44
2.2.5 Hücrelerin Çoğalması ve Pasajlanması	45
2.2.6 Hücrelerin Dondurulması	46

2.2.7 Hücrelerin Çözülmesi	47
2.2.8 Hücre Sayımı	48
2.2.9 Senkronizasyon Deney Grupları	48
2.2.9.1 Kontrol Grubu.....	48
2.2.9.2 Serum Açlığı 24 Saat.....	49
2.2.9.3 Serum Açlığı 72 Saat.....	49
2.2.9.4 Konfluent 24 Saat – Erken Konfluent	50
2.2.9.5 Konfluent 72 Saat – Geç Konfluent	50
2.2.10 Hücre Siklus Analizi.....	51
2.2.11 Hücrede Apoptozis ve Nekrozis Analizi	52
2.2.12 İstatistiksel Analizler	54
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	55
3.1 Sığır Hücresi Hücre Siklus Analiz Değerleri	55
3.2 Koyun Hücresi Siklus Analiz Değerleri.....	57
3.3 Sığır Hücresi Apoptoz ve Nekroz Analiz Değerleri.....	58
3.4 Koyun Hücresi Apoptoz ve Nekroz Analiz Değerleri.....	60
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1 Kullanılan Kimyasallar	22
Çizelge 2. 2 Kullanılan Malzemeler	27
Çizelge 2. 3 Kullanılan Cihazlar.....	33
Çizelge 3. 1 Sığır Hücrelerinde Erken (5 th) Pasaj Hücre Siklus Analiz Sonuçları.....	55
Çizelge 3. 2 Sığır Hücrelerinde Geç (15 th) Pasaj Hücre Siklus Analiz Sonuçları.....	56
Çizelge 3. 3 Koyun Hücrelerinde Erken (5 th) Pasaj Hücre Siklus Analiz Sonuçları.....	57
Çizelge 3. 4 Koyun Hücrelerinde Geç (15 th) Pasaj Hücre Siklus Analiz Sonuçları.....	57
Çizelge 3. 5 Sığır Hücrelerinde Erken (5 th) Pasaj Apoptoz/Nekroz Analiz Sonuçları.....	58
Çizelge 3. 6 Sığır Hücrelerinde Geç (15 th) Pasaj Apoptoz/Nekroz Analiz Sonuçları.....	59
Çizelge 3. 7 Koyun Hücrelerinde Erken (5 th) Pasaj Apoptoz/Nekroz Analiz Sonuçları.....	60
Çizelge 3. 8 Koyun Hücrelerinde Geç (15 th) Pasaj Apoptoz/Nekroz Analiz Sonuçları.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Granüloza-Oosit Kompleksi.....	6
Şekil 1. 2 Hücre Döngüsü (Siklusu).....	7
Şekil 1. 3 Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları	9
Şekil 1. 5 Siklin-CDK Kompleksleriyle Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi.....	10
Şekil 1. 6 Apoptoz ve Nekroz Görünümü	12
Şekil 1. 7 İntrensik ve Ekstrinsik Apoptozis Yolakları.....	14
Şekil 2. 1 Petri Kapları	28
Şekil 2. 2 Kriyotüpler	28
Şekil 2. 3 Otomatik Pipet, Elektrikli Pipet Pompası ve Pipet Uçları	29
Şekil 2. 4 Vakumlu Filtrasyon Düzeneği.....	30
Şekil 2. 5 Süzme Aparatı	30
Şekil 2. 6 Thoma Lamının Görüntüsü	31
Şekil 2. 7 Thoma Lamı Hücre Sayım Görüntüsü	31
Şekil 2. 8 Mr. Frosty™ Cryo 1°C Dondurucu Kap.....	32
Şekil 2. 9 Otoklav Cihazı.....	34
Şekil 2. 10 Hassas Terazi.....	34
Şekil 2. 11 Su Banyosu.....	35
Şekil 2. 12 Laminer Flow Kabin	36
Şekil 2. 13 Vakum Pompası	37
Şekil 2. 14 Santrifüj Cihazı.....	38
Şekil 2. 15 Karbondioksitli İnkübatör	39
Şekil 2. 16 Isıtıcı Tabla.....	39
Şekil 2. 17 İnverted Mikroskop	40
Şekil 2. 18 -80 °C Derin Dondurucu	40
Şekil 2. 19 Flow Sitometri Cihazı (Hücre Döngüsü Ölçüm Cihazı)	41
Şekil 2. 20 Flow Sitometri Cihazı (Apoptoz/Nekroz Ölçüm Cihazı).....	42

Şekil 2. 21 a) Toz DMEM/F12 Tartımı b) Sodyum Bikarbonat Tartımı	42
Şekil 2. 22 DMEM/F12 Besiyeri a) pH Değerini b) Ayarlama İşlemi.....	43
Şekil 2. 23 DMEM/F12 Besiyeri a) Süzme ve b) Stoklama İşlemi.....	43
Şekil 2. 24 Mr. Frosty'de Bulunan Hücrelerin Karton Kutuya Aktarılması	47
Şekil 2. 25 Thoma Lamı Tripan Mavisini (Blue) Ekleme Alanı	48
Şekil 2. 26 Kontrol Grubu Deney Örneği.....	49
Şekil 2. 27 Serum Açlığı 24 Saat Deney Örneği	49
Şekil 2. 28 Serum Açlığı 72 Saat Deney Örneği	50
Şekil 2. 29 Konfluent 24 Saat Deney Örneği	50
Şekil 2. 30 Konfluent 72 Saat Deney Örneği	51
Şekil 2. 31 Hücre Döngüsü (Siklus) Analiz Sonucu Görüntüsü	52
Şekil 2. 32 Hücrede Apoptozis ve Nekrozis Analiz Sonucu Görüntüsü Koyun Geç (15 th) Pasaj Kontrol Grubu	53

SİMGELER DİZİNİ

C° Santigrad Derece



KISALTMALAR DİZİNİ

CO ₂	Karbondioksit
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CHX	Sikloheximid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamaponlu Tuzu
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik
FBS	Fetal Sığır Serum
HCl	Hidrojen Klorür
µl	Mikrolitre
µM	Mikrometre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
NaOH	Sodyum Hidroksit
NT	Nükleer Transfer
nm	Nanometre
pH	Power of Hydrogen
PI	Propidyum İyodür
rpm	Roter Per Minute
SHNT	Somatik Hücre Nükleer Transferi

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimini her seferinde bana sabırla aktarmaya çalışan tez danışmanım Prof. Dr. Sezen ARAT'a teşekkür ediyorum. Laboratuvarında her zaman bir adımda ulaşıp yardım aldığım Doç. Dr. Raziye IŞIK, Arş. Gör. Dr. Yusuf SÜRMEİİ, Arş. Gör. Eyüp Erdem TEYKİN'e teşekkür ediyorum. Desteklerini hep hissettiğim yakın arkadaşlarım Sema GÖKCE, Fanti Büşra ÇELEBİ PEKŞEN, Bekir CAN'a teşekkür ediyorum. Hücre Siklus analizlerinde TNKÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Laboratuvarında bulunan Flow Sitometri cihazını kullanmama izin veren Prof Dr. Metin TUNA'ya ve bu aşamada bana yardım eden Ziraat Yüksek Mühendisi Yaren İpek ŞİMŞEK'e teşekkür ediyorum. Apoptoz/Nekroz analizlerinde TNKÜ Araştırma Hastanesi Hematoloji Laboratuvarında bulunan Flow Sitometri cihazını kullanmama izin veren Prof Dr. Burhan TURGUT' a ve bu aşamada bana yardım eden Laboratuvar Teknikeri Öznur GÜNGÖR'a teşekkür ediyorum. İstatistik analizleri konusunda bana yardım eden Ziraat Yüksek Mühendisi Bekir CAN'a teşekkür ediyorum. Her zaman bana destek olan ve kararlarımın arkasında duran biricik aileme çok teşekkür ediyorum.

Aslı TANI

Biyomühendis & Ziraat Mühendisi

1. GİRİŞ

Somatik hücre nükleer transferi (SHNT) çalışmalarında, hücre döngüsünde görevli ajanların belirlenmesi ve karakterize edilmesinde, hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının bozulduğu kanser çalışmalarında ve benzeri birçok çalışmada hücre senkronizasyonuna gerek duyulmaktadır (Campbell ve Alberio, 2003).

SHNT yönteminin başarısını birçok faktör etkilemektedir. Verici hücrelerin hücre döngüsünde hangi aşamada olduğu somatik hücre nükleer transferi yoluyla üretilen embriyoların gelişimini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Verici hücre ve alıcı yumurta hücresinin hücre döngülerinin koordine edilmiş olması, doğru ploidiyi korumak ve nükleer transfer (NT) ile yeniden yapılandırılmış embriyolarda DNA hasarını önlemek için gerekli olduğu anlaşılmaktadır (Campbell vd., 2003; Sadeghian-Nodoushan, Eftekhari, Dalman, Eimani ve Sepehri, 2014).

Hücre siklusu (döngüsü) G1, S, G2 evreleri ve mitozdan oluşmaktadır. Mitozu takiben iki kardeş hücre G1 fazına girmektedir. Bu dönemdeki hücre büyür ve hücre dışı büyüme faktörlerine cevap vermektedir. Yine bu dönemde kromozom yoğunlaşması kaybolarak tekrar çekirdek zarfı oluşmaktadır. Bunu takip eden S fazında ise DNA replikasyonu meydana gelmektedir. G2 fazında ise yeniden kromozomlar yoğunlaşır ve hücre mitozla girmektedir. Mitoz esnasında kromozomlar yoğunlaşmış olarak kalmaktadır (Campbell vd., 2003).

Araştırmalar hücre döngüsünün G0 aşamasında durdurulmuş donör hücrelerinin kullanımının oluşturulan embriyoların gelişimi ve yeniden programlanmasında başarılı sonuçlar verdiğini ortaya koymaktadır (Wilmot, Schnieke, McWhir, Kind ve Campbell, 1997; Kato vd., 1998, Baguisi vd., 1999; Kato, Tani ve Tsunoda, 2000). Bunun yanında hücre döngüsünün G1 aşamasındaki hücreler de donör hücre olarak kullanıldıklarında klon embriyoların gelişimlerini başarı ile tamamladıkları gözlenilmektedir (Arat, Rzucidlo, Gibbons, Miyoshi ve Stice, 2001; Arat vd., 2011; Cibelli vd., 1998; Kasinathan, Knott, Wang, Jerry ve Robl, 2001; Urakawa, Ideta, Sawada ve Aoyagi, 2004). Buna karşın, S fazında donör hücrelerin kullanılması, genellikle erken kromozom yoğunlaşması tarafından indüklenen kromozom pulverizasyonu sebebiyle, G2/M fazlarında donör hücrelerin kullanılması ile ise anöploidi nedeniyle klonlamadan sonra zayıf embriyo gelişimine yol açmaktadır (Campbell, Loi, Otaeguive Wilmot, 1996). Hücre büyümesini inhibe etme mekanizmaları birbirinden farklı göstermektedir (Hayes vd., 2005). Büyüme faktörü yoksunluğuna sebep olan serum açlığında ve kontakt inhibisyonuna maruz kalınan konfluent hücre büyümesi baskılanmaktadır.

Hücreler G0/G1 fazına değişik şekillerde getirilebilmektedir. Eğer hücreler kültüre ediliyorsa bölünen hücre popülasyonunda çok değişik dönemlerde hücre vardır. Bu hücreleri istenen döneme getirmek için serum açlığı (düşük serum varlığında kültür) uygulanabilir ve böylece hücreler yeteri kadar beslenemedikleri için dinlenme fazına yani G0 fazına geçirilmektedir. Bir diğer yöntemde ise hücreler kültür kaplarını kapladıklarında birbirleri ile temas ettikleri için (konfluent) S fazına geçemez ve G1’de kalmaktadır. Bir başka yöntem olarak ise sikline bağımlı kinaz inhibitörü gibi (roskovitin, dimetil sülfoksit, sikloheksimid) bazı kimyasallar kullanılarak hücrelerin G1 fazında durdurulmasıdır. (Gibbons vd. 2002).

Hücrelerin pasaj sayısı arttıkça hücre siklusundaki fazların süreleri değişebilir bu da hücrelerin senkronizasyon uygulamalarına vereceği yanıtı etkileyebilmektedir. Bazı durumlarda özellikle transgenik hayvanların elde edilmesinde hücrelere gen aktarılması ve sonrasında transgenik hücrelerin seçilmesi uygulamaları hücre pasaj sayısının artmasına sebep olmaktadır. Bu durumda geç pasaj sayısındaki hücrelerin nükleer transferde kullanılmadan önce senkronize edilmeleri gerekmektedir. Bu aşamada daha önce erken pasaj sayılarında belirlenen senkronizasyon protokolleri farklı sonuçlar verebilir veya bu protokoller hücre canlılığı üzerinde de daha farklı etki gösterebilir.

Günümüzde hücre senkronizasyonunu sağlamak için çeşitli yöntemler uygulansa da, bu yöntemlerin her birinin karşılaştırmalı olarak hangi oranda senkronizasyon sağladığı ve sonuçların kullanılan hücre tipine ve hücre pasaj numarasına göre farklılık gösterip göstermediği tam olarak bilinmemektedir.

1.1 Hücre Kültürü

Dokudan, primer kültürden veya hücre hattından enzimatik, mekanik veya kimyasal ayırma yöntemleriyle elde edilen hücrelerin doğal ortamlarının dışında kontrollü şartlar altında yetiştirilmesidir (Dabanlı, 2011; Esmer Duruel, Çağan, Işık ve Kayhan, 2021; Koçaklı, Akıllıoğlu ve Doğan, 2015). Hücre kültürlerinde, kültüre edilen hücreler elde edildikleri dokuların genel özelliklerini ve normal fonksiyonlarını gösterdiği belirtilmektedir. *İn vitro* hücre kültürleri, *in vivo* hücre davranışının altında yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktadır (Dabanlı, 2011).

Hücre kültürlerinden biyokimyasal, moleküler ve biyolojik çalışmalarda; sitogenetik, kanser, kök hücre araştırmalarında, farmasötik proteinlerinin ve aşı üretiminde, çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, doku mühendisliği gibi konularda yapılan araştırmalarda

yararlanılmaktadır (Esmer Duruel vd., 2021; Serter, 2019). Canlı hayvan testlerine alternatif olarak hücre kültürü büyük potansiyele sahip olmaktadır. Araştırmacının özel bir hücre tipi üzerinde çalışmasına olanak sağlanmaktadır. Hücre kültürlerinde çalışılan kimyasalın veya yöntemin etkisi her cins hücrede ayrı ayrı araştırılabilmekte ve karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan araştırmaların da yapılmasına olanak sağlanabilmektedir. Dokudan elde edilen çeşitli hücreler, zaman içerisinde tekrarlanan pasajlama işlemleriyle istenilen asıl homojen hücre elde edilebilmektedir. Hedeflenen hücreye ulaşıldıktan sonra, hücreler başka araştırmalar için ve tekrarlı deneylerde kullanılmak üzere uygun şartlar altında uzun yıllar saklanabilmektedir. Ancak, medyumdaki besin seviyesindeki azalma, hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimleri, zamana bağlı farklılık gibi bazı nedenlerden dolayı da hücre kültürü çalışmalarında değişkenlikler ile karşılaşılabilir. Bundan dolayı yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği sayesinde daha doğru sonuçlara ulaşılabilmektedir (Koçaklı vd., 2015).

1.1.1 Hücre Kültürü Vasatı (Ortamı)

Hücre kültüründe süspanse hücre kültürü ve yapışan hücre kültürü olmak üzere iki farklı tip bulunmaktadır. Hücre kültüründe hücrelerin doğal ortamlarının dışında kontrollü şartlar altında yetiştirildiğinden dolayı yetiştirilecek hücrenin tipine bağlı vasat gereksinimi değişiklik göstermektedir. Süspanse hücre kültürü besiyeri içerisinde serbest halde bulunarak kültür petri kaplarının yüzeyine yapışma özelliği göstermezken, yapışan hücre kültüründe hücreler içinde buldukları kültür petri kaplarının yüzeylerine yapışma davranışı göstermektedir. Yapışan bu hücreler kültür flaskları veya petri kapları gibi düz bir yüzey üzerine tek tabakalı olarak yapışarak çoğalmaktadır. Yapışık hücrelerin bağlanması çoğalma için gerekli ön koşul olarak belirtilmektedir. Temas inhibisyonuna maruz kaldıklarında yani birbirlerine değecekleri bir yoğunluğa ulaştıklarında bölünme durmaktadır (Esmer Duruel vd., 2021).

In vitro hücre kültüründe memeli hücrelerinin büyümesini sağlamak ve desteklemek amacıyla besiyeri ortamı kullanılmaktadır. Hücre kültür besiyerleri, hücrelerin normal metabolik aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gerekli olan ortam koşullarını sağlamak üzere hazırlanmış besleyici solüsyonlar olarak tanımlanabilmektedir. Hücrelere gerekli enerji kaynakları ve hücre döngüsünü düzenleyebilen bileşikler bu besin ortamıyla sağlanmaktadır (Koçaklı vd., 2015).

Hücrelerin petri kapları içindeki vasatın canlılığını devam ettirmesi ve büyüyüp gelişmesini sağlamak için aminoasit, glikoz, lipit, mineral, vitamin, hormon, büyüme faktörleri, karbondioksit, oksijen, antibiyotik, tuz, pH dengesi ve sabit vücut sıcaklığı, gereksinimlerini karşılamalı ve devamlılığı sağlanmalıdır (Esmer Duruel vd., 2021; Koçaklı vd., 2015).

1955'te Eagle tarafından ilk kısmen kimyasal olarak tanımlanmış vasat olan EMEM (Eagle's Modified Essential Medium) geliştirildi. Serum içeren EMEM' un formülasyonu günümüzde yaygın olarak kullanılan birçok hücre kültürü vasatının temelini oluşturmaktadır (Esmer Duruel vd., 2021). Dulbecco's Modified Eagle's Medium, EMEM'in bir çeşididir ve orjinal formundan dört kat daha fazla vitamin ve aminoasit ile iki kat daha fazla glukoz içermektedir. İçerisinde demir ve fenol kırmızısı da bulunmaktadır (Koçaklı vd., 2015). Ham'ın yaptığı çalışma ile 1963'te F10 vasatı geliştirdi. Serum yerine iki tür serum protein fraksiyonu (albümin ve fetuin) kullanıldı. Ham's F12'nin Dulbecco ortamıyla karıştırılmasının ardından içerisine hormon ve büyüme faktörleri ilave edilerek DMEM/F12 olarak adlandırılan yeni bir formülasyon oluşturuldu. Böylece kimyasal olarak tanımlanmış ilk serumsuz hücre kültürü ortamı, DMEM ve Ham's F12 ortamının 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlanan DMEM/F12 vasatı olmaktadır (Esmer Duruel vd., 2021). Vasat ortamında glikoz ve glutamin, en temel enerji kaynaklarıdır (Esmer Duruel vd., 2021). Büyük miktarlarda protein ve nükleik asit sentezinin gerçekleştiği ve enerji ihtiyacının en fazla olduğu dönemde, hücrelerin gelişimine destek amacıyla glukoz yanında glutamin de gerekmektedir. Zira hücreler nükleotid, aminoasit, amino şeker ve vitamin gibi bazı moleküllerin sentezi için azota ihtiyaç duymaktadır. Glutamin ise bu moleküllerin ve diğer azot içeren bileşiklerin sentezinde azot kaynağı olarak rol oynamaktadır (Koçaklı vd., 2015).

Serum, hücre çoğalmasını ve tutunmasını etkileyen çok sayıda büyüme faktörü, mineral, lipid ve hormonları içermektedir (Koçaklı vd., 2015). Bu protein çözeltilisinin içinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matriks proteinleri bulunmaktadır (Esmer Duruel vd., 2021). Besiyeri ortamları genellikle hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve işlevlerini destekleyebilen bir ortam oluşturmak amacıyla hücre kültüründe en yaygın olarak kullanılan fetal sığır serumu (FBS) gibi bir serum ile zenginleştirilmektedir (Esmer Duruel vd., 2021; Koçaklı vd., 2015). FBS hücrelere kararsız veya suda çözünmeyen besinler için taşıyıcı olarak görev yapmaktadır. Hücreler için gerekli olan büyüme faktörleri ve hormonlar gibi proteinleri sağlamaktadır (Kalender, 2020).

In vitro hücre kültürü çalışmalarında ortamda meydana gelebilecek kontaminasyonları engellemek amacıyla vasat ortamında antibiyotikler kullanılmaktadır (Esmer Duruel vd., 2021). Çalışma sırasında, laminar akım kabin kullanımı, çalışma öncesinde 24 saat UV ile sterilizasyonu yapılmış inkübatörde petrilerin inkübe edilemesi ve ayrıca çalışma esnasında steril koşulların sağlanması kontaminasyon riskinin azalmasına katkı sağlamaktadır.

1.1.2 Hücre Kültürü Fizikokimyasal Faktörler

In vitro hücre kültüründe hücrelerin yaşamlarını devam ettirebilmeleri için normal fizyolojik çevrelerinin sağlanması amacıyla sıcaklık, pH, O₂ ve CO₂ yoğunluğu gibi fizikokimyasal koşulların sabit tutularak kontrolü sağlanmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarının başarısında özellikle pH değeri, sıcaklık, oksijen ve karbondioksit seviyeleri ile glikoz konsantrasyonunun büyük etkisi bulunmaktadır (Koçaklı vd., 2015) .

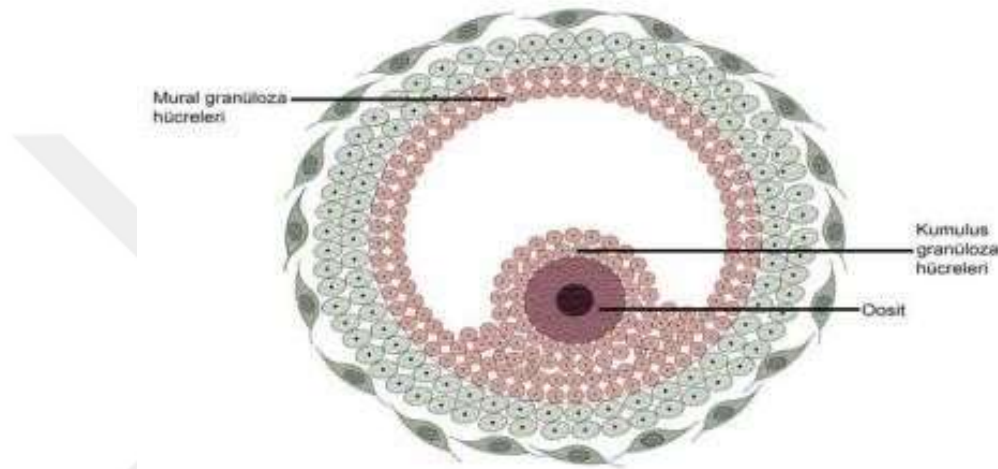
Hücrelerin gelişim pH değer aralığı 7,2-7,4 te bulunmaktadır. Kültür ortamındaki hidrojen iyonu konsantrasyonunda meydana gelecek değişiklikler, hücrelerin çoğalmasını olumsuz yönde etkilemektedir (Koçaklı vd., 2015). pH değişimi hücre döngüsünü, hücre büyümesini ve farklılaşmasını etkileyen ve aynı zamanda DNA hasarına ve genomik kararsızlığa neden olan bir durum ortaya koymaktadır. Hücre kültürü için gerekli olan pH'ın 7,2-7,4'de sabit bir şekilde kalabilmesi için CO₂'li bir fiziksel çevreye ihtiyaç olmaktadır. Bundan dolayı hücreler CO₂ inkübatöründe muhafaza edilmektedir. Vasat ortamları genellikle hücre tipine göre değişmekle birlikte %5-10 CO₂ desteklenmektedir. Böylece vasat ortamının pH değeri gaz fazındaki CO₂ konsantrasyonuyla besiyeri ortamındaki sodyum bikarbonat (NaHCO₃) konsantrasyonu arasındaki dengeyle korunmaktadır. Fenol kırmızısı boya araştırmacıların ortam pH değerini izlemek amacıyla toz besiyerinin içerisine dahil edilmektedir. Ayrıca 4- (2-Hidroksietil)-1-piperazinetasülfonik asit (HEPES), vasat ortamlarında, 7,2-7,4 pH aralığında üstün bir tamponlama kapasitesi gösteren kimyasal bir tampon olarak bulunmaktadır (Esmer Duruel vd., 2021).

Hücreler için gerekli uygun sıcaklık canlıların ve hücrelerin köken aldığı dokunun vücut içi sıcaklığına bağlı bulunmaktadır. Bu nedenle, sıcakkanlı canlılardan kültüre edilen hücreler için gerekli uygun sıcaklık genellikle 37°C'dir. Sıcaklığın hücreler üzerindeki direkt etkisinin yanında, düşük sıcaklıkta CO₂ çözünürlüğünün artması pH değişikliğine neden olmakta ve pH'daki değişimler ise hücre çoğalmasını baskılamaktadır (Koçaklı vd., 2015).

1.1.3 Granüloza Hücreleri

Oogenezin erken dönemlerinde, primer oositler granüloza hücrelerinden oluşan bir tabaka ile çevrilidir. Folikülogenez sırasında oosit büyümesine, granüloza hücresi çoğalması ve farklılaşması eşlik etmektedir (Doğan, 2021). Granüloza hücreleri olgun yumurtaların serbest bırakılmasıyla uterusun çabuk kavramasını senkronize etmekte gerekli hormonal ortamı sağlayan, oosit olgunlaşmasını sürdüren, germ hücrelerini besleyen yumurtalığın kritik bileşenleridir.

Yumurtlamada folikülün oluştuğu andan itibaren oosit serbest bırakılıncaya kadar oosit ile yakından etkileşime giren tek somatik hücreler granüloza hücreleridir. Oosit ve granüloza hücreleri ilişkisi boyunca önemli fonksiyonel ve morfolojik değişikliklerden geçmektedir (Baumgarten ve Stocco, 2018). Antral folikül aşamasında, granüloza hücreleri farklı fenotiplere sahip kümülüs granüloza hücreleri ve mural granüloza hücreleri olmak üzere iki ayrı gruba farklılaşmaktadır (Şekil 1.1). Kümülüs granüloza hücreleri oosite yakın seyrederek ve oosit büyümesi ile olgunlaşmasından sorumludur. Mural granüloza hücreleri ise steroidojenik aktivitede önemlidir. Granüloza hücreleri oosit gelişimi için gerekli mikroçevreyi oluştururlar (Doğan, 2021).



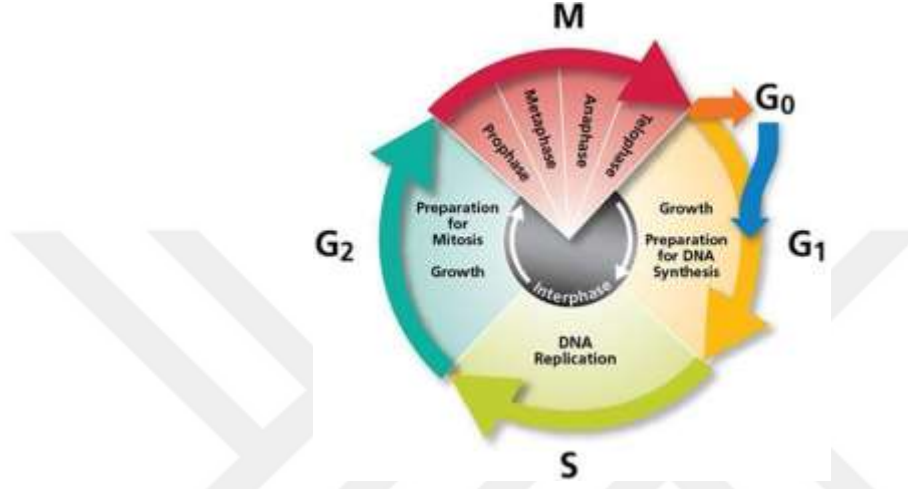
Şekil 1. 1 Granüloza-Oosit Kompleksi (Ünal ve Kabukçu,2022)

1.1.4 Pasaj Sayısı

Direkt olarak dokudan kimyasal, mekanik veya enzimatik ayrıştırma ile elde edilen hücrelerin kullanıldığı sistem primer hücre kültürü olarak isimlendirilir (Kalender, 2020). Primer kültür hücreleri genelde heterojen tiptedir yani birden fazla hücre çeşidini içerebilmektedir. Pasajlama sonrası elde edilen kültür ise alt kültür olarak adlandırılmaktadır. Hücreler, kültür kabı yüzeyini tamamen kaplayacak yoğunluğa ulaştığı zaman hücrelerin birbirleriyle olan etkileşiminin artması ve metabolik aktiviteleri sonucu ortamda atıkların birikmesi, hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını büyük oranda azaltmaktadır. Bu durumda, kültür hücrelerinin yeni kültür kaplarına daha az yoğunlukta hücre içerecek şekilde aktarılması gerekmektedir (Koçaklı vd, 2015). Bu her bir aktarılma sonucunda pasaj sayısı bir değer artmaktadır. Morfolojide, uyarılara verdiği tepkide, büyüme oranlarında, protein ekspresyonunda ve transkripsiyon verimliliğinde değişiklikler olduğundan dolayı yüksek ve düşük pasaj numarasına sahip hücreler arasında farklılıklar bulunmaktadır (Anonim,2022).

1.2 Hücre Döngüsü (Siklus)

Bir hücrenin bölünmeye başlamasından itibaren onu takip eden diğer hücre bölünmesine kadar geçen zaman aralığına hücre döngüsü (hücre siklusu) denilmektedir. Her biri ana hücreninkilerle aynı kromozomları içeren iki yavru hücre üretilmesi hücre döngüsünün amacını oluşturmaktadır. Hücre döngüsü içerisinde hücre büyümesini ve hücre bölünmesini kontrol eden, kendi kendini düzenleyen olaylar dizisi barındırılmaktadır (Cabadak, 2008).



Şekil 1. 2 Hücre Döngüsü (Siklus) (Anonim, t.y)

Hücre döngüsü hücrenin sürekli büyümesini temsil eden G1 (gap1) fazı, S (sentez) fazı ve G2 (gap2) fazı aşamalarını oluşturan interfaz ve genomun bölünmesi olarak tanımlanan M fazı (mitoz) olmak üzere iki ana faz içermektedir. Sürekli bölünen hücrelerde hücre siklusu 20-24 saatte bir ardı ardına G1-S-G2 (interfaz) ve M (mitoz) olacak şekilde (Şekil 1.2) gerçekleşmektedir (Karaca, 2008).

1.2.1 G1 Evresi

Mitoz bölünmenin ardından girilen yeni döngünün ilk aşaması olarak kabul edilmektedir. Hücre döngüsünün aşamaları arasında 9-12 saatlik zaman uzunluğunda gerçekleştiğinden en uzun evre olarak bilinmektedir. DNA sentezi ve kromozom replikasyonu için gerekli olan RNA ve proteinlerin sentezlendiği bu evrede en fazla büyüme görülmektedir. G1 fazından sonra hücreler döngüden çıkarak dinlenme durumuna geçtiği G0 fazı ya da döngünün devamı olan DNA sentezinin başladığı S faz yolu izlenilmektedir. G0 fazındaki hücrelerin metabolizması ve biyokimyası hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi için minimum düzeye düşürülmektedir. Bu hücre için bölünme yolunun durdurulduğuna işaret etmektedir. Ancak uygun bir uyarıdan sonra hücre döngüsüne yeniden girilebilmektedir (Cabadak, 2008).

1.2.2 S Evresi

G1 fazındaki hücrenin S fazına girmesi sonucunda DNA sentezi başlatılmaktadır. Ortalama 7,5-10 saatin ardından hücrenin DNA'sı ikiye katlanmaktadır. Mitoz bölünme fazında belirgin hale gelecek yeni kromatitler oluşmaktadır (Cabadak, 2008).

1.2.3 G2 Evresi

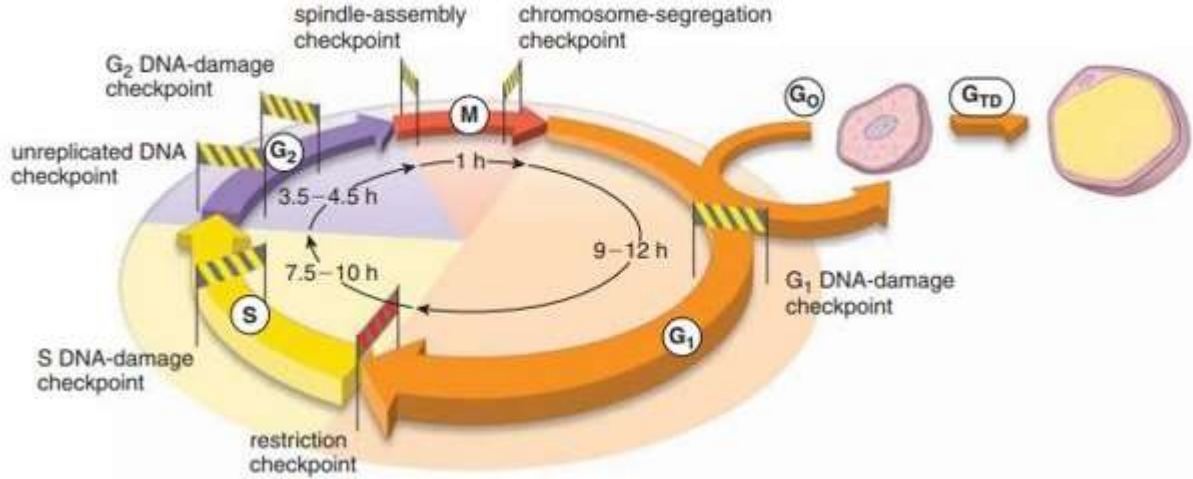
S fazındaki hücre G2 fazına girmesinin ardından hücre büyümeye devam ederek M fazı için gerekli RNA ve protein sentezlerine devam edilmekte ve mitoz hazırlanılmaktadır. Bu faz hızla bölünen hücrelerde 1 saat kadar kısa olabilmekte ancak ortalama 3,5-4,5 saat sürebilmektedir. Sentez fazı sonrası her bir kromozomdan 2 kopya içerdiği için 4n şeklinde belirtilmektedir (Cabadak, 2008).

1.2.4 M Evresi

Mitoz fazı profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşmakta ve telofazda sitoplazmik bölünme tamamlanarak aynı genetik materyali iki yeni hücre meydana getirilmektedir. Mitoz hem karyokineziyi (çekirdeğin bölünmesini) hem de sitokineziyi (hücrenin bölünmesini) içererek yaklaşık 1 saatte gerçekleştirilmektedir. M fazında iki özdeş yavru hücrenin ayrılmasıyla tam bir hücre döngüsü başarıyla gerçekleştirilmiş bulunmaktadır (Cabadak, 2008).

1.2.5 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü, hücre döngüsünün fazlarında ve fazlar arasındaki geçişlerde hücre içi sinyallerin yanında çevreden gelen hücre dışı sinyalleri tarafından kontrol edilmektedir. Hücre dışı sinyallere örnek olarak büyüme faktörleri verilirken hücre içi sinyallere hücre büyümesi, DNA replikasyonu, mitoz gibi hücresel süreçler örnek verilmektedir. Hücre döngüsü bu kontrol noktalarında durmakta (Şekil 1.3) ve yalnızca belirli koşullar karşılandığında devam edilebilmektedir (Eren, 2015).

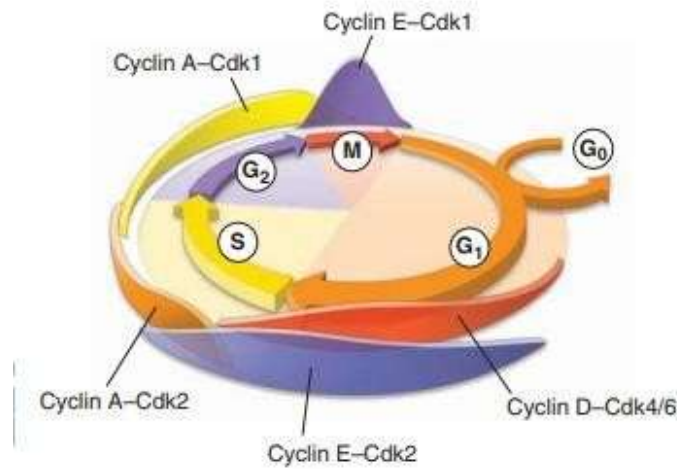


Şekil 1. 3 Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları (Ross, 2016)

G1 fazında restriksiyon ve DNA hasarı kontrol noktaları bulunmaktadır. Hücre bölünmesinin devam etmesi için uygun şartların bozulduğu durumlarda (besin yetersizliği, hücre büyüklüğü, doku hasarı gibi) hücre G1 kontrol noktasından geçemez ve hücre döngüsünün hareketsiz aşaması ya da dinlenme evresi olarak tanımlanan G0 fazına gönderilmektedir. G0 fazındaki hücreler metabolik olarak aktif olsalar da büyümesi durdurulmuş ve protein sentez hızı azaltılmıştır. DNA hasar kontrol noktasında ise yeni kopyalanmış DNA'nın bütünlüğü incelenmektedir. S fazında da DNA hasar kontrol noktası bulunmakta ve DNA kopyasının kalitesi izlenilmektedir. G2 fazında bulunan iki kontrol noktası da DNA izlenilmekle birlikte noktaların birinde G1 ve S fazında olduğu gibi DNA hasarı incelenmektedir. İkinci kontrol noktasında ise kopyalanmamış DNA kontrolü yapılarak DNA sentezi tamamlanmayan hücrenin M fazına geçmesi engellenmektedir. M fazında bulunan iki kontrol noktardan birinde anafaza erken giriş önlerken diğerinde ise tüm kromozomlar doğru şekilde ayrılana kadar sitokinez sürecini önlenmesi işlemi yapılmaktadır. G1 fazında DNA'da onarılamaz bir hasar varsa S fazına girmesine izin vermemekte ve tümör baskılayıcı protein p53'ün tespiti ile hücre büyük olasılıkla programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoza uğramaktadır. G2 fazında da DNA tamiri mümkün değilse hücre döngüsü durdurularak apoptoz işlemi gerçekleşmektedir (Ross, 2016).

Hücre döngüsü fazları siklinler (siklin A,D,E), siklin-bağımlı kinazlar (cyclin- dependent kinase CDK 1,2,4,6) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKI) (Şekil 1.4) düzenleyici proteinlerin aktivasyonları ve ekspresyonlarıyla düzenlenmektedir. Büyümekte olan bir hücrede hücre döngüsünü yürüten siklin bağımlı kinazlar sabit bir derişimde bulunmakta ve çoğu zaman inaktif durumdadır. İnaktif formdaki siklin bağımlı kinazın aktif hale geçmesi için bir sikline bağlanması gerekmektedir. Siklin değerlerindeki değişme ile siklin/siklin

bağlı kinaz (CDK) aktivitesinde de artma veya azalma gibi değişiklikler gözlemlenmektedir (Aktuğ, 2014; Eren, 2015).



Şekil 1. 4 Siklin-CDK Kompleksleriyle Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi (Ross, 2016)

Siklinler siklin bağımlı kinazlar (CDK) ile bağlanarak holoenzimleri oluşturmakta ve spesifik katalitik aktivasyonunu gerçekleştirilmektedir. Holoenzimler temel fonksiyonu olan retinoblastoma proteininin (Rb) fosforlanması görevini yapmaktadır. Bu işlem sonucunda retinoblastoma fosforilasyonu E2F (transkripsiyon faktörü) ailesi üyesi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gerçekleştirilmektedir. E2F salınması, S evresinin ilerlemesini düzenleyen çeşitli genlerin ekspresyonu sağlamaktadır. Retinoblastoma proteinleri de G0 evresinden G1 evresine geçişin düzenlenmesinde anahtar rol oynamakta ve aktivitesi siklin D1-CDK4 kompleksi ile düzenlenmektedir. Siklin D-CDK4/6 erken G1 evresinde siklin E-CDK2 ise S evresine geçişte önemli bir kompleks bileşen konumundadır. G1 fazının ortasında siklin D, sonlarına doğru ise siklin E'nin aktifliği görülmektedir. Siklin/CDK holoenzimlerinin kinaz aktiviteleri CDKI tarafından negatif olarak düzenlenmektedir (Aktuğ, 2014; Arslan, Önkol, Özçelik, 2022; Eren, 2015).

Hareketsiz durgun olarak tasvir edilen hücrelerin, siklin D ve siklin E ekspresyonunun olmaması, yüksek oranda yoğunlaştırılmış kromatin ve daha az ribozom içermesi ayırt edici özellikler arasında bulunmaktadır. Bu hücrelerin G1 döngülü benzerlerinden çok daha az RNA ve protein içerdiğini göstermesi hücrelerin G0 aşamasında olduğuna işaret etmektedir (Hayes vd., 2005).

1.2.6 Hücre Ölüm Şekilleri

Canlılarda hücre ölümü patolojik ya da fizyolojik süreçler sonunda gerçekleşmektedir.

Patolojik hücre ölümleri nekroz olarak adlandırılırken ve fizyolojik yani programlanmış hücre ölümleri apoptoz (Şekil 1.5) olarak adlandırılmaktadır (Ucbek, 2012).

1.2.6.1 Nekroz

Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal çevresel faktörlerin hücre zarına hasar vermesi sonucunda zar geçirgenliği bozularak hücre dışı iyonların ve suyun hücre içine girmesine, hücrenin şişip parçalanmasına neden olduğu patolojik bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Nekrozun nedenleri; iskemi, hipoksi, hipertermi, litik viral enfeksiyonlar, toksik maddelerin yüksek konsantrasyonu ve şiddetli oksidatif stresdir. Hücrenin şişmesi ve membranı patlatarak hücrenin parçalanmasıyla hücre içindeki maddelerin dışarı dağılması bu bölgedeki çevre dokularda büyük zarara, başka bir deyişle inflamasyona neden olmaktadır. Nekrozda hücre membranının kaybı, kromatin flokülasyonu, hücre şişmesi, organellerin disintegrasyonu, endoplazmik retikulum dilatasyonu, büyük vakuollerin oluşması ve hücre lizisi görülmektedir (Celepli, Bigat, Celepli ve Karagin,2020).

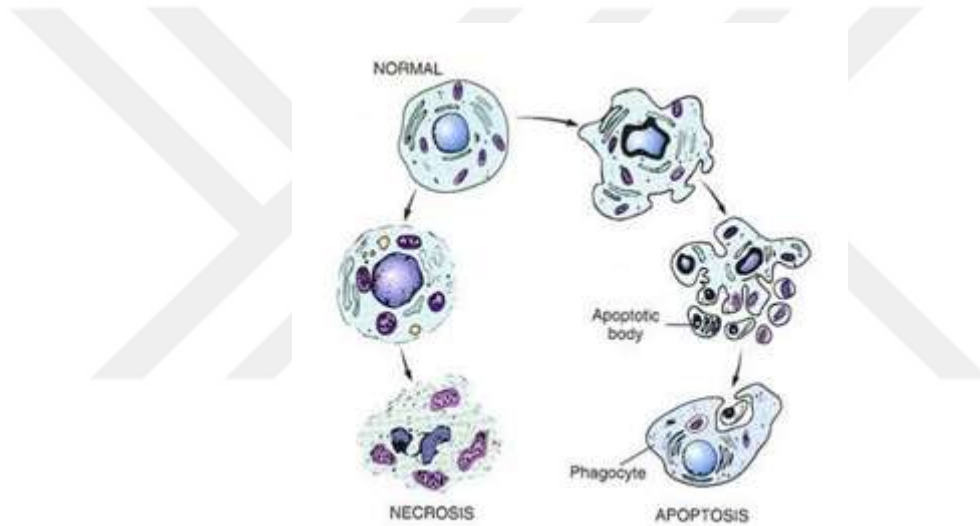
Nekroz ile ölüme giden hücrelerde hücrelerin boyutunda artış izlenir, hücre organelleri su alarak şişer ve hemen ardından hücre zarında parçalanmalar meydana gelir (Celepli vd.,2020).

1.2.6.2 Apoptoz

Görevini tamamlamış, fonksiyonu bozulmuş veya hasara uğramış hücrenin etrafındaki diğer hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırıldığı, genetik olarak kontrol edilen programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Çiçekteki petal yaprağın, çiçeğe zarar vermeden dökülmesine ya da ağaçtan düşen bir yaprağa benzetilmektedir. Apoptoz DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar, hücre döngüsü sinyalizasyonu ve yaşam sinyallerinin eksikliği gibi hücreyi içeriden ve dışarıdan etkileyen sinyallerle tetiklenebilmektedir (Dağdeviren, 2021; Ross, 2016).

Çok hücreli canlılarda istenmeyen bazı hücrelerin ortadan kaldırılmasında, genler ile düzenlenerek belirli bir kontrol ve program içerisinde gerçekleşen fizyolojik bir ölüm süreci olduğu bildirilmektedir. Hücrelerin kendi kendilerini yok ettiği apoptoz olayında hücre küçülmesi karakteristik bir özellik olduğu belirtilmektedir. Sitoplazma içeriğinde artış meydana gelerek, hücre büzülerek kıvrıntılı bir hal almaktadır. Apoptoza uğrayan hücre inflamasyona uğramadan ortadan kaldırılmaktadır. Aktif, metabolik ve genetik açıdan kodlanmış hücrenin evrimsel olarak tercih ettiği ölüm yolu olan apoptoz da RNA ve protein sentezine ve enerjiye gereksinim duyulmaktadır (Dağdeviren, 2021).

Apoptotik süreçte, gelen uyarının ardından hücre yapıştığı zeminden ve komşu hücrelerden bağlantılarını kopararak ayrılmasının ardından küçülmektedir. DNA fragmantasyonu, kromatin nükleer membran çevresinde toplanarak yoğunlaşmakta ve piknotik bir görünüm oluşmaktadır. Hücre DNA'sı nukleozamlarından kesilmektedir. Fakat hücre organellerinin yapısal özellik ve bütünlükleri korunmaktadır. Hücre zarında bulunan fosfolipid serin hücre zarı iç kısmından hücrenin dış yüzeyine taşınmaktadır. Hücre çekirdeği küçülmesinin ardından parçalara ayrılmaktadır. Apoptozis sürecinin sonunda morfolojik olarak hücre organelleri membran ile kaplı küçük apoptotik cisimciklere dönüşmektedir. Süreç ilerledikçe bu veziküller komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir. Apoptotik süreçte inflamasyon oluşmamaktadır. Apoptozun bilinen en önemli ve ilginç özelliği ise çevre dokularda herhangi bir yıkım oluşmamasıdır (Dağdeviren, 2021).



Şekil 1. 5 Apoptoz ve Nekroz Görünümü (Anonim, 2017)

Apoptozun düzenlenmesinde özellikle kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve çok sayıda mitokondri görev almaktadır (Dağdeviren, 2021).

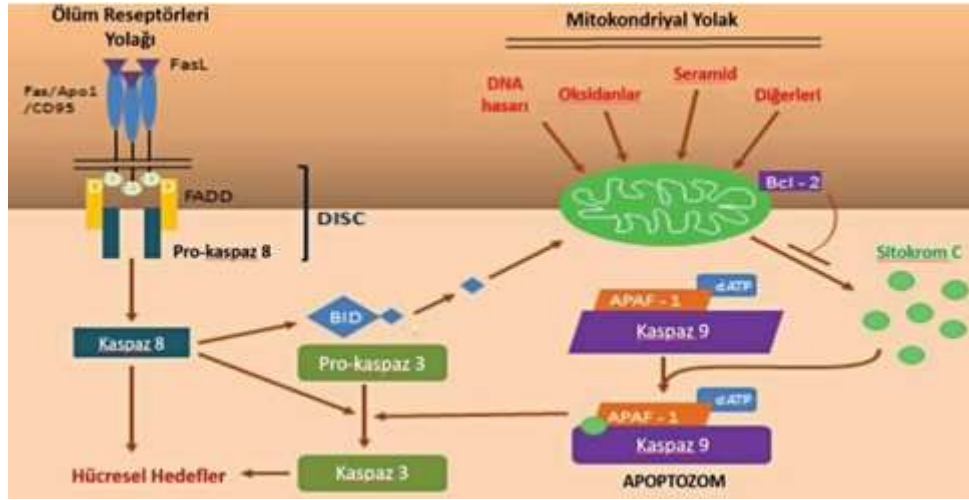
Hücrelerin apoptoza eğimli olup olmaması Bcl-2 ailesine bağlı olmaktadır. Bcl-2 ailesine ait proteinler; proapoptotik ve antiapoptotik grup olmak üzere birbirine zıt çalışan iki gruptan oluşmaktadır. Bir hücrede eğer proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha fazla eğilimli, antiapoptotik proteinler fazla ise daha az eğilimli olmaktadır. Ailenin proapoptotik üyeleri BIK, BIM, PUMA NOXA, BAD, BAX ve BAK proteinleridir. Antiapoptotik üyeleri ise BCL-2, BCL-XL, BCL-W ve MCL-1' dir. Hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğinin belirlenmesinde hücre içi Bcl-2/Bax oranı son derece önemli olmaktadır. Eğer Bax fazla ise hücre apoptoz, Bcl-2 fazla ise

apoptoz inhibasyonu gerçekleşmektedir. Proapoptotik proteinler sitozolde bulunmaktadır. Bu proteinler, Sitokromc ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör)' ün salımını düzenli olarak artırarak apoptozu indükleyici mekanizmaya sahip olmaktadır. Antiapoptotik üyeler, mitokondrinin dış zarında endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında bulunmaktadır. Por oluşturarak iyon transportunu gerçekleştirerek iyon taşınımını düzenleyici mekanizmayı yapmaktadır. Hücrelerde bulunan Ca^{++} miktarını kontrol ederler ve kaspazlar için öncül form olan AIF ve sitokrom-c salımını durdurmaktadır. Böylece apoptozu inhibe edilmektedir (Dağdeviren, 2021; Ucbek, 2012).

Hücrede, DNA hasarı gibi bir durum oluştuğunda bu hasarı gidermek için çeşitli mekanizmalara ihtiyaç duyulmaktadır. DNA hasarı söz konusu ise P53 tümör baskılayıcı gen ürünü olan p53 aktive edilmekte ve bu da hücre siklus inhibasyonu, apoptozis, DNA tamiri ve yaşlanmayı içeren antiproliferatif bir etkiye neden olmaktadır. Siklusunu bölünme kontrol noktalarından G1'de durdurup DNA onarımı için hücreye zaman kazandırılmaktadır (Gedikli, 2013). Eğer hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas yapımı artırılmaktadır. Böylece Bcl-2 ve Bcl-xL'nin baskılanması ile apoptozu indüklenmektedir. P53 bir transkripsiyon faktörü olmakla birlikte DNA hasarı, hipoksi, viral transformasyon, onkogen aktivasyonu, iğ hasarı, nükleotid düzensizliği gibi hücrelerde meydana gelen birçok bozukluk sonrası aktive edilerek hasarlı hücrenin proliferatif yayılımını engelleyecek gen ekspresyonunu başlatmaktadır (Dağdeviren, 2021).

Kaspazlar hücreyi apoptozdan koruyan proteinleri ortadan kaldıran veya inaktive eden bir protein grubu olarak bilinmektedir. Apoptozun başlatılmasında ve gerçekleşmesinde rol almaktadır. Apoptoz mekanizmasında hayati bir role sahip olan kaspazlar, sistein- aspartik – proteaz olarak bilinmektedir. Hücre içerisinde inaktif durumda bulunmaktadır. Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9, 10), efektör (cellat) kaspazlar (Kaspaz 3, 6, 7) ve inflamatuvar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) olmak üzere üç farklı kaspaz mekanizması bulunmaktadır (Dağdeviren, 2021).

Patolojik ve fizyolojik olarak gerçekleşen apoptozisde başlıca 5 farklı yolak kullanılmaktadır. Bunların en yaygın olarak bilineni metabolik ve hipoksik stres ile tetiklenen intrinsik (iç) yolak ve ölüm ligandları olarak bilinen Fas-L ya da tümör nekroz faktörü- α gibi dış uyaranlar ile tetiklenen ekstrinsik (dış) yolları (Şekil1.6) yer almaktadır. Diğer kullanılan yollar ise DNA hasarı üzerine p53 ile aktive olan kaspaz 2 bağımlı yolak, kaspazın doğrudan aktivasyonu ile granzim-B yolağı ve DNA fragmentasyonu ile başlayan granzim-A yolağı olarak bilinmektedir (Dağdeviren, 2021).



Şekil 1. 6 İntrensik ve Ekstrinsik Apoptozis Yolakları(Celepli, Bigat, Celepli ve Karagin,2020)

İntrensik apoptotik yolak, hücre içi sinyallerle, pH azalmasına bağlı olarak çeşitli iyonlaştırıcı etkenlerin neden olduğu gen seviyesindeki toksik hasar, endoplazmik retikulum stresi, DNA hasarına bağlı hücre siklus bozuklukları, mitokondriyal hasar ve onkojenlere bağlı hücre ölümü ya da çeşitli büyüme faktörleri gibi bazı uyarıların yokluğunda aktive olan yoldur. Hücre içi sinyallerin alınmasıyla apoptotik uyarı başlatılır, proapoptotik protein Bid, Bcl-2' yi inaktive eder. Böylece BAX ve BAK proteinleri aktive olur. Mitokondri membranında, BAX ve BAK proteinleri por oluşumunu gerçekleştirir, por oluşumu için uygun ortam hazırlandığında ise zar potansiyeli değişikliğe uğrar. Smac (second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endonükleaz-G, AIF (Apoptoz indükleyici faktör) mitokondri membran porlarından salınmak üzere uyarılır. Apoptozun gerçekleşmesi için oksidatif fosforilasyonun gerçekleşmesi gerekir. Sitokrom-c, elektron taşınımı yaparak oksidatif fosforilasyon sürecini başlatır. SMAC, inhibitör apoptotik faktör (IAF)'ü engeller ve apoptozu hızlandırır. İnhibitör apoptotik faktörlerin olması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunun durmasına neden olur. Apoptoz indükleyici faktör (AIF)'ün çekirdeğe translokasyonu tamamlanır ve Endonükleaz-g (ENDO-G) DNA' yı parçalar. Sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör-1) ve ATP'nin mitokondri porlarından salınması ile sitozolde apoptozom denilen yeni bir kompleks oluşur. Apoptozom, kaspaz-9' u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 ise prokaspaz-3 ü aktif kaspaz-3' e dönüştürür. Aktifleşen kaspaz-3 inaktif kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı inaktif hale getirerek serbestleştir. Çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve DNA'nın nükleozomları oluşturarak fragmente olmasını sağlayan ise CAD kompleksidir (Celepli, Bigat, Celepli, Karagin, 2020; Dağdeviren, 2021).

Apoptotik ekstrinsik yol (ölüm reseptörü yolu), iç yoldan farklı olarak aktive olmuş T hücreleri, doğal öldürücü (natural killer) (NK) hücreler ve makrofajların hedef hücrelerinin zarında bulunan ölüm reseptörlerine tutunması ile başlar. Tümör nekroz faktör (TNF) ve FAS reseptörü

hücre zarı integral proteinleridir. Ölüm aktivatörleri olan FasL ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ile bağlanarak, prokaspaz-8' kaspaz-8' e farklılaşır. Sonuçta kaspaz kaskadı oluşarak aktivasyon başlatılır (40). CD95 (Fas/APO-1), TNFR1, DR3 (APO-3), DR4 (TNF- Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor-1), DR5 (TRAIL R2) ve DR6 ölüm reseptörleridir. Hücrenin ölüm sinyali, hedefteki hücrenin hücre zarı üzerinde bulunan TNF ailesi ölüm reseptörlerine bağlanarak aktive olur. FAS, TNF ve DR5 gibi hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin ölüm sinyalleri olan FasL, TNF-alfa ve TRAIL ile bağlanması sonucu ölüm reseptörleri trimerik bir yapı kazanır. Trimerik yapıda olan reseptörler ile adaptör moleküller prokaspaz türevleri ile birleşerek Death inducing signaling complex (DISC) denilen bir yapı oluşturur. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 DISC kompleksi tarafından aktive edilir. Aktive olmuş kaspaz-8 ve kaspaz-10, yürütücü kaspazlardan kaspaz3, kaspaz-6 ve 7'yi aktif hale getirir. Aktifleşen, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 ise apoptoza neden olan proteinlerin ve hücre iskeletinin imhasını başlatır. Bu mekanizma doğrudan ve direkt yolla gerçekleşir. Direkt olarak kaspaz-8 kaspaz3 'ü aktive eder dolaylı olarak ise BİD'i keserek intrinsik yolda önce kaspaz-9' u hemen ardından da kaspaz-3' ü aktive eder. Dolaylı ve direkt olan bu yolda gerçekleşen mekanizmada aktif kaspaz-3, CAD aktivasyonu gösterir ve DNA fragmentasyonuna neden olur (Celepli vd., 2020; Dağdeviren, 2021).

1.3 Hücre Senkronizasyon Yöntemleri

Bir kültürdeki hücreler farklı fazlarda olabilirler. Hücre senkronizasyonu, bir kültürdeki hücre döngüsünün farklı aşamalarında bulunan hücrelerin çeşitli moleküler ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak aynı evreye getirilmesidir (Grdina, Meistrich, Meyn, Johnson ve White, 1987).

Verici çekirdeğin hücre döngüsü aşaması, metafaz II oositte bulunan yüksek seviyelerde olgunlaşmayı teşvik eden faktör (MPF) ile uyumlu olmalıdır. Bu nedenle, alınan MII oositlerine nükleer transplantasyon için yalnızca hücre döngüsünün G1 veya G0 fazlarındaki çekirdekler kullanılabilir. Yeniden oluşturulan embriyonun gelişimi ve yeniden programlama G0/G1 fazında çekirdek kullanımıyla geliştirilmektedir (Sadeghian-Nodoushan vd., 2014).

Senkronizasyon genellikle hücre döngüsünü belirli bir noktada durdurması beklenen ve sonraki çoğalma ve farklılaşma üzerinde minimum yan etkilere sahip olan geri dönüşümlü metabolik bloklar uygulanarak sağlanır. Bu nedenle, istenen bir senkronizasyon yöntemi, hücre canlılığını engellemeden hücrelerin çoğunluğunun hücre döngüsünün G0 aşamasında olmasını sağlamalıdır (Hayes vd., 2005).

Hücre döngüsünün belirli fazlarında bloke eden veya geciktiren ilaçların eklenmesiyle hücre döngüsü aşamaları geciktirilebilmektedir. Bunun için kullanılan yöntemler, hücre döngüsünün tutuklandığı faza bağlı olarak gruplandırılmaktadır (Merrill, 1998).

Senkronizasyon yöntemleri hücrelerin tutulma safhasına göre sınıflandırılabilir.

- 1) M fazında kromozomların sentromer bölgelerini bağlayan protein ipliklerini etkileyerek hücre bölünmesini bozmasıyla;
- 2) S fazındaki hücre döngüsü ile DNA sentezini etkilemesiyle;
- 3) G1 fazındaki restriksiyon noktasında tutmasıyla;
- 4) Bloke edici ajanların kombine uygulamasıyla; (Banfalvi, 2017).

1.3.1 Kullanılan Bazı Kimyasallar

Razoksan (Razoxane) Topoizomerez II enzimini spesifik olarak inhibe ederek hücre döngüsünün mitoz öncesi ve erken mitoz fazlarında hücre bölünmesinin inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır (Banfalvi, 2017).

Roskovitin (Roscovitine) ATP bağlanma safasında ATP ile rekabet ederek sikline bağlı kinazların (CDK1, CDK2, CDK5 ve CDK7) kinaz aktivitesi için oldukça güçlü bir inhibitördür. Memeli hücrelerinin sadece G1 -S'de değil, aynı zamanda G2-M kontrol noktalarında hücre döngüsünün ilerlemesini önlemektedir (Azevedo vd., 1997; Vacková, Engelová, Marinov ve Tománek, 2003).

Mumosayn (Mimosine) DNA replikasyonunun başlamasından yani S fazına girmeden önce G1 fazında hücre döngüsünü durduran nadir bir bitki aminoasididir (Mosca, Dijkwel ve Hamlin, 1992; Vacková vd., 2003).

Kolşisin (Colchicine) mikrotübüllerde tübülünü depolimerize ederek metafazda hücre döngüsü durmasına neden olmaktadır. Hücreler tedavi edildikten sonra hücreler M fazında birikir ve anafaza ilerleyemez (Boquest, Day, Prather, 1999).

Vinkristin (Vincristine) mikrotübüllerin ipliklerine bağlanarak DNA sentezini ve aminoasit metabolizmasını etkilemektedir. Bunun sonucunda metafazdaki mitozu azaltmaktadır. Birçok kanser türünü tedavi etmek için mitotik bir inhibitör ilaç olarak kullanılmaktadır (Al- Meshal, 1987).

Çift timidin bloğu (Double thymidine block) yaklaşık olarak % 40 konfluent hücreler, 1 ml kültür ortamı için 20ul timidin bloke edici çözelti eklenerek 19 saat inkübe edilmektedir. Daha sonrasında steril PBS ile 3 kez yıkanarak serum içeren taze hücre kültür ortamında 9 saat inkübe edilmektedir. Bir sonraki adım olarak da her 1 ml kültür ortamı için yine 20ul timidin bloke edici solüsyon eklenerek bu sefer 16 saat daha inkübe edilerek PBS ile yıkayıp yeni kültür ortamına eklenen hücrelerin çoğu G0/G1 fazında bulunmaktadır (Bostock, Prescott, Kirkpatrick, 1971).

Afidikolin (Aphidicolin) *Cephalosporium aphidicola* mantarı tarafından üretilen bu tetrasiklik diterpenoid, DNA polimeraz a'yı seçici olarak geri dönüşümlü inhibe etmektedir. Bu enzim, nükleer DNA onarım sentezini ve mitokondriyal DNA replikasyonu için gereklidir. Bundan dolayı hücre döngüsü erken S evresinde engellenmektedir (Sala vd., 1980).

Sikloheksamid (Cycloheximide)'in düşük konsantrasyonu ile tedavisi sağlanan C6 glioma (tümör) hücrelerinin hücre çoğalmasını ve hem G2 hem de M fazlarını bitirmiş hücrelerin inhibe edilerek G1 ve S fazlarında birikmesine neden olduğu düşünülmektedir (Goissis vd., 2007).

Dimetil Sülfoksit (DMSO) hücre döngüsünde görev alan siklin D ekspresyonunu azaltmakta ve A, B ve E siklinlerinin aşırı ekspresyonuna sebep olmaktadır. Hücreler bir sonraki hücre döngüsüne girdiğinde ortamda siklin D'nin bulunmaması nedeniyle erken G1 aşamasında tutulmaktadır (Choresca vd., 2010).

1.3.2 Serum Açlığı Yöntemi

Serum yokluğu (Serum starvation) G0/G1 fazlarındaki hücreleri senkronize etmek için bilinen yöntemdir. Kültürdeki hücrelerin, hücre döngüsü kontrol noktalarını geçmek ve mitozu tamamlamak için besin ve mitojenik uyarıların varlığı gereklidir. Serum yoksunluğu *in vitro* kültür sistemlerinde mitojenleri ve hormonları azaltmaktadır. Ayrıca hücre metabolizmasını azaltmakta ve hücre protein seviyelerinde düşüşe neden olmaktadır. Böylece hücreleri G0 durumuna yönlendirmektedir (Khammanit, Chantakru, Kitiyanant ve Saikhun, 2008).

1.3.3 Konfluent Yöntemi

Konfluensi sonucu oluşan kontak inhibisyon (contact inhibition) hücrelerin tek katmanlı büyümesini sağlayan düzenleyici bir mekanizmadır. Hücrelerin yayılması için petri kabının alt tabakasında alan varsa, hücreler serbestçe hareket ederek çoğalmaktadır. Ancak petri kabının alt tabakası dolu ise normal hücreler (kanser hücreleri hariç) çoğalmayı durduracaktır. Bundan dolayı hücrelerin zaman içinde hareketlilik ve mitotik aktiviteleri azalmaktadır. Böylece hücreler G0/G1

fazında bulunmaktadır (Sun vd., 2008).

1.4 Literatür Özeti

Vacková vd. (2003) tarafından bildirildiğine göre domuz granüloza hücrelerinde serum açlığı ve mimosin kimyasal inhibitörü ile hücre döngüsünü G1 fazında senkronizasyonu üzerine çalışma sonuçları belirtilmektedir. Deney grupları 24 saat normal ortamlarında gelişmesinin ardından 48 saat serum açlığı ve 48 saat normal ortamında büyümesinin yanında ilk 24 saatte ve son 24 saatte mimosin uygulaması yapılarak bütün deney grupları 78 saatin sonunda analize hazırlandığı belirtilmektedir. Flow sitometri de okunan hücre döngüsü analiz değerlerine bakıldığında serum açlığı uygulamaların normal ortam değerine göre yüksek olurken mimosin uygulamalı sonuçlardan daha düşük olduğu görülmektedir (Vacková vd., 2003).

Hayes vd. (2005) tarafından bildirildiğine göre sığır granüloza ve fibroblast hücrelerinde hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurmak amacıyla uygulanan konfluent ve serum açlığının etkileri belirtilmektedir. Nükleer transfer embriyolarının gelişim yeteneğini etkileyen önemli faktör olduğu belirtilmektedir. Birkaç gün boyunca serum açlığı ve hücre kültürün konfluent olması nükleer klonlama için donör hücrelerin hareketsiz faz olan G0 faz aşamasına uyararak getirmek, kullanılan yaygın yöntem olarak belirtilmektedir. Aktif olarak bölünen hücrelerin, 4 gün boyunca konfluent hücrelerin ve 1/3/5 gün boyunca serum açlığında bulunan hücrelerin oluşturduğu deney grupları oluşturulmaktadır. Konfluent ve Serum açlığı gruplarının normal bölünen hücrelerden farklı olmakla birlikte kendi aralarında G0'a giren hücrelerin yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmadığı belirtilmiştir. Ayrıca 1 ile 5 gün serum açlığı uygulanan gruplar arasında da, hücre döngüsünün G0/G1 fazına giren hücrelerin nispi yüzdesini arttırmadığı belirtilmektedir. Konfluent ve serum açlığı ile muamele gören fibroblast hücrelerinin granüloza hücrelerinden daha fazla oranda G0'a girdiği ve primer kültür ve 5. pasajın sonuçlarının aynı olduğu görülmektedir (Hayes vd.,2005).

Cho vd. (2005) tarafından bildirildiğine göre sığır fetal fibroblast hücreleri üzerine senkronizasyon yöntemlerinden konfluent, roskovitin ve serum açlığı uygulamalarının etkileri belirtilmektedir. Çalışmanın deney gruplarını %10 FBS içeren besiyeri ortamında %90 konfluent olan konfluent grup, %10 FBS içeren besiyeri ortamında 12 saat kaldıktan sonra %90 birleşene kadar (grup 1, birleşik), DMEM'de + 30 µM roskovitin uygulanan grup ve 5 gün boyunca %0.5 FBS içeren serum açlığı grubu oluşturmaktadır. Tüm uygulama gruplarının G0/G1 oranları arasında bir farklılık görünmemekle birlikte G0/G1 oranları %80'nin üzerinde tutulduğu belirtilmektedir. Böylece sığır fetal fibroblast hücrelerinin senkronize edilebildiği görülmektedir

(Cho vd, 2005).

Goissis vd. (2007) tarafından bildirildiğine göre serum açlığı ve sikloheksimidin kimyasalının düşük (5th) ve yüksek (15th) pasajların domuz fibroblastlarının hücre döngüsü üzerine etkileri belirtilmektedir. Çalışmanın deney gruplarını düşük ve yüksek pasajlarda kontrol grubu, 24/48/72/96/120/144 saat serum açlığı ve 12/24/48 saat sikloheksimidin uygulamaları oluşturmaktadır. Yüksek pasajda bütün serum açlığı uygulamalarında erken pasajda ise 72 saat hariç diğer serum açlığı uygulamaları kendi içlerinde yani aynı olduğu pasaj sayısında istatistik olarak birbirlerinde farklı bulunmaktadır. Ancak serum açlığı uygulamasında pasaj sayısı yükselince G0/G1 oranının atması nedeniyle daha iyi senkronizasyon yapıldığı belirtilmektedir. Ayrıca serum açlığı uygulamasını G0/G1 değerleri sikloheksimidin kimyasalının G0/G1 değerlerinden daha yüksek olduğundan dolayı daha iyi senkronizasyon yaptığı tespit edilmektedir. Serum açlığı ve sikloheximid (CHX) uygulamaların uzun süreli tedavilerden sonra ölü hücre sayısının artmasına neden olduğu belirtilmektedir. Düşük pasajda 24 saat serum açlığı ve yüksek pasajda 24/72 saat serum açlığı uygulamalarının ölü hücre sayısının istatistik olarak kontrol grubu ile aynı, diğer uygulamalardan düşük ve farklı olduğu görülmektedir (Goissis vd., 2007).

Sun vd. (2008) tarafından bildirildiğine göre transgenik klonlanmış sığır kulak derisinden elde edilen fibroblast hücrelerinin roskovitin, serum açlığı ve kontakt inhibisyon uygulamalarının hücre döngüsü senkronizasyonuna etkileri bildirilmektedir. Çalışmanın deney gruplarını 1/2/3/4/5 gün serum açlığı, kontakt inhibisyon ve roskovitin uygulama grupları oluşturmaktadır. 3/4/5 gün serum açlığı uygulamalarının 1/2gün serum açlığı uygulamalarına göre G0/G1 oranının anlamlı derecede yükselttiği belirtilmektedir. Roskovitin uygulamasında ise 2/3/4/5 günlerindeki uygulamalar 1 günlük uygulamaya göre G0/G1 oranını arttırdığı belirtilmektedir. Kontakt inhibisyonda ise G0/G1 oranlarının 3/4/5 günlerinin benzer olmaklabirlikte tedavi süresi arttıkça arttığı belirtilmektedir. Üç farklı senkronizasyon yönteminde de 3 günlük uygulamaların önerildiği belirtilmektedir (Sun vd., 2008).

Nodoushan vd. (2014) tarafından bildirildiğine göre koyun granüloza hücrelerinde 1/2/3gün serum açlığı, konfluent etkisi, mimosin ve nokodazol kimyasal inhibitörleri gibi senkronizasyon yöntemlerinin DNA sentezi, apoptoz ve G0/G1 senkronizasyonuna etkileri değerlendirilmektedir. Kesilen koyunların yumurtalık antral foliküllerinden elde edilerek birinci ve beşinci pasajlarda ki hücreler çalışmada kullanılmaktadır. Flow sitometri analizlerine göre konfluent hücrelerin, 24/48/72 saat serum açlığına, mimosin ve nocodazol tedavisine maruz gören hücrelerin normal büyüyen hücrelere kıyasla G0/G1 faz hücrelerinin önemli ölçüde arttırdığı görülmektedir. Mimosin,

nokodazol ve üç grup serum açlığı proliferasyonu durdurduğu belirtilmektedir. Granüloza hücrelerinde 72 saat serum açlığında apoptoz değerinin en yüksek olduğu belirtilmektedir (Sadeghian-Nodoushan vd., 2014).

Veraguas vd. (2017) tarafından bildirildiğine evcil (domestic) ve orman (kodkod) kedisinden alınan deri fibroblast hücreleri üzerine serum açlığı ve kontakt inhibisyon gibi hücre döngüsü senkronizasyon yöntemlerinin etkileri ve canlılık/apoptoz analizi sonuçları belirtilmektedir. Çalışmanın deney gruplarını 1/3/5 gün serum açlığı ve kontakt inhibisyon oluşturmaktadır. Evcil kedilerde 3/5 gün serum açlığı ve kontakt inhibisyon yöntemi kontrol grubu ve 1 günlük serum açlığı/ kontakt inhibisyon yöntemine göre G0/G1 oranını önemli oranda arttırdı bildirilmektedir. Orman kedilerinde ise 3/5 günlük serum açlığı ve 1/3 günlük kontakt inhibisyon deney grubu G0/G1 oranını arttırdığı bildirilmektedir. Hem evcil kedilerde hemde orman kedilerinde 5 günlük serum açlığı canlı hücre oranını azalttığı belirtilmektedir. Evcil kedi fibroblastlarında, 1/3/5 gün serum açlığı ve kontakt inhibisyon yöntemleri arasında bir farklılık bulunmadığı belirtilmektedir. Orman kedisi fibroblastlarında 3/5 günlerde serum açlığı ve kontakt inhibisyon yöntemlerinin olumlu etkileri olduğu ancak 5 gün serum açlığı ve 3 gün kontakt inhibisyonun hücre canlılık üzerine olumsuz bir etkiye sahip olabilmesinden dolayı hücre döngüsü senkronizasyonu için en iyi yöntem olarak 3 günlük serum açlığı önerildiği belirtilmektedir (Veraguas, Gallegos, Castro, Rodriguez-Alvarez, 2017).

1.5 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Hücre senkronizasyonu; somatik nükleer hücre transferi çalışmalarında, hücre döngüsünde görevli ajanların belirlenmesi ve karakterize edilmesinde, hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının bozulduğu kanser çalışmalarında ve benzeri birçok çalışmada gerek duyulan bir işlemdir.

Günümüzde hücre senkronizasyonunu sağlamak için çeşitli yöntemler uygulansa da, bu yöntemlerin her birinin karşılaştırmalı olarak hangi oranda senkronizasyon sağladığı ve sonuçların kullanılan hücre tipine ve hücre pasaj numarasına göre farklılık gösterip göstermediği bilinmemektedir.

Bu çalışmada farklı hücre senkronizasyon yöntemlerinin erken ve geç pasaj sayısındaki koyun ve sığır hücrelerinde etkilerinin akış sitometre kullanılarak incelenmesi planlanmıştır. Bu araştırmadan elde edilecek sonuçların öncelikli olarak somatik hücre nükleer transferi çalışmalarında olmak üzere, hücre senkronizasyonu gerektiren tüm çalışmalarda uygun

senkronizasyon yönteminin belirlenmesine ışık tutması beklenmektedir.

Bu çalışma, senkronizasyon amacı ile erken/geç (5th/15th) pasaj sığır ve koyun granülosa hücrelerine 24 ve 72 saat süre ile uygulanan serum açlığı ve konfluens yöntemlerinin hücre döngüsüne ve hücre canlılığına olan etkilerini araştırmayı kapsamaktadır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

Bu tez çalışmasının materyalleri Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarından temin edilmiştir.

2.1.1 Kullanılan Hücre Çeşitleri

Çalışılan hücre materyali 20.11.2017 tarihinde Tekirdağ Büyükşehir Belediyesi mezbahasında kesilen dişi sığır ve koyunun, ovaryumundan elde edilen granüloza hücrelerinin, -80°C derin dondurucuda bulunan stoklar oluşturulmuştur.

2.1.2 Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2. 1 Kullanılan Kimyasallar

Kimyasallar	Marka
Annexin V-FITC , PI, Binding Buffer 4X	eBioscience BMS500FI
Antibiyotik –Penicillin/Streptomycin	BOICHROM-A
Antibiyotik – Antimikotik	SIGMA A5955
Dimetilsülfoksit (DMSO)	SIGMA D4540
DMEMF-12 (1:1)	Gibco 32500-035
DPBS	SIGMA D5652-10X1L
Etil Alkol	SIGMA
Etanol Absoluto	ISOLAB 920.026.2500
Fetal Bovine Serum (FBS)	SIGMA F9665
Izopropil Alkol (2-propanol)	SIGMA-ALDRICH 24137
L-Glutamine	SIGMA G8540
RNaseA	Thermo Scientific – EN0531
Sodyum Bikarbonat	SIGMA S5761
PI	SIGMA-ALDRICH P4864
Teksol %96	TEKKİM TK.200650.02501
Tripan Blue	BIOCHROM L 6323
%0.25 Tripsin-EDTA (1X)	Gibco 25200-056

2.1.2.1 *Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medium (DMEM)/F-12 Besiyeri*

Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa 1955 yılında Eagle tarafından tanımlanmıştır. (Esmer Duruel vd., 2021). Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medium'u (DMEM), Eagle's Minimal Essential Medium'a (EMEM) dayanmakla birlikte dört kat daha yüksek amino asit ve vitamin ayrıca iki kat daha fazla glukoz konsantrasyonu içermektedir (Koçaklı vd., 2015). Ham'ın F-12'si, Ham'ın F-10 ortamına dayanmaktadır (Esmer Duruel vd., 2021). DMEM/F-12 ise DMEM ve Ham's F-12'nin 1:1 oranında hazırlanmasıyla oluşturulan karışımdır (Esmer Duruel vd., 2021). Bu formülasyon, DMEM'in yüksek konsantrasyonlardaki glikoz, amino asitler ve vitaminleri ile F-12'nin çok çeşitli bileşenlerini birleştirmektedir. DMEM/F-12 birçok farklı memeli hücrelerinin büyümesini desteklemek için yaygın olarak kullanılan bir bazal ortamdır (Koçaklı vd., 2015).

Gibco hücre kültürü ortamının toz formları, hazırlama sırasında sodyum bikarbonat takviyesi, pH ayarlaması ve filtrasyon gerektirmektedir. İçerisinde L-glutamin, HEPES ve fenol kırmızısı barındırmaktadır. Fenol kırmızısı sayesinde pH değişikliklerini 6,2'den (sarıdan) 8,2'ye (kırmızıya) izlenebilmektedir. Stok DMEM/F-12 hazırlandıktan belirli bir süre sonra oluşturulacak medyuma belirli bir oranda L-glutamin takviyesi yapılması gerektirmektedir. DMEM/F-12, bir sodyum bikarbonat tampon sistemi kullanıldığından fizyolojik pH'ı korumak için %5-10 CO₂ ortamı gerektirmektedir. DMEM/F-12, protein, lipit veya büyüme faktörü içermemektedir. DMEM/F-12 özellikle FBS ile desteklendiğinde çeşitli memeli hücre hatlarının büyümesi için temel besinleri sağlamış bulunmaktadır. Bu nedenle, DMEM/F-12, genellikle %10 Fetal Bovine Serum (FBS) takviyesi gerektirmektedir. DMEM/F-12 medyum; %1 Antibiyotik, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %89 stok DMEM/F-12 oranlarında karıştırılmasıyla elde edilmektedir.

2.1.2.2 *Fetal Bovine Serum (FBS)*

DMEM/F-12 medyumunun içerisinde kullanılan bu protein çözeltilisinin içinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matriks proteinleri, mineral ve lipitler bulunmaktadır. Yetişkin sığır serumu, dana, insan ve at serumları gibi farklı tipleri sıralanabilmektedir. Hayvan hücre kültürü çalışmalarda daha çok fetal bovine serum (FBS) kullanılmaktadır. Fötal sığır serumu, bir sığır fetüsünden alınan kanın doğal pıhtılaşmasından arta kalan kısmından hazırlanmaktadır. Hücre çeşidi ve uygulama alanına göre besiyerine eklenen serum oranı değişiklik gösterebilmektedir. Standart bir somatik hücre kültüründe tercihen %10 oranında serum eklenilmektedir. Serumlar dondurulmuş olarak saklanmaktadır. Çok sayıda dondurma ve çözündürme işlemine tabi tutulmaması önerildiği için daha

küçük hacimlere bölünerek saklanmaktadır. Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarından FBS -20°C muhafaza edilmektedir.

2.1.2.3 Antibiyotik

Laminar akım kabin kullanımı ve steril koşulların sağlanması yanında kültür ortamında meydana gelebilecek herhangi bir kontaminasyonu engellemek amacıyla rutin olarak medyumun içerisine eklenerek kullanılmaktadır. Kontaminasyon, kültür ortamında istenmeyen bakteri ve mantarların bulunması çalışmanın olumsuz yönde sonuçlanmasına neden olmaktadır. Besiyeri içerisine de standart somatik hücre kültüründe %1 oranında antibiyotik (10,000 U/ml penicillin G, 10,000 mg/ml streptomycin) eklenilmektedir.

2.1.2.4 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)

Hücre kültürü çalışmalarında hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutmak amacıyla kullanılan tuz çözeltisidir. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını desteklemekte ve pH'yı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlamaktadır. PBS genel olarak dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), potasyum klorür (KCl), sodyum klorür (NaCl) kimyasallarından oluşmaktadır. Dulbecco'nun modifiye ettiği DPBS kimyasalı ise hücre yapışmasında rol oynayan kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2}) tercih edilmediği için kalsiyum klorür ve magnezyum klorür içermeyen diye kutunun üzerinde belirtilmektedir. Tripsin ekleme işleminden önce hücrelerin bulunduğu petri kabı DPBS ile yıkanarak serum içeren kültür medyumunun tamamen uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Serumun içerisinde tripsin inhibitörleri bulunduğundan dolayı yapılan bu yıkama işlemi tripsinin performansını arttırmasına yardımcı olmaktadır. Hücre kültürü için uygun hazırlanan toz DPBS 1 litre su ile homojen karışması sağlandıktan sonra 121°C de 20 dakika steril edilerek +4°C muhafaza edilmektedir.

2.1.2.5 Tripsin

Hücreler büyük bir kısmı bir yüzeye yapışık şekilde tek tabakalı yüzeye yapışarak büyüebilmektedir. Bir yüzeye bağlanmak çoğalmanın ön koşulu durumundadır. Hücrelerin birbirine veya bir substrata bağlı olduğu kültürlerde hücreler ve substrat arasındaki bağı kırmak için hücrelerin proteolitik bir enzim ile muamele edilmesi gerekmektedir (Unchern, 1999). Tripsin de petri kabına yapışık hücreleri ayırmaya yarayan bir proteolitik enzimdir. Lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri yıkmaktadır. Tripsin hücrelerin yüzeyini örtecek kadar uygulanmaktadır. Serum tripsin inhibitörlerini içermektedir. Bundan dolayı hücrelere tripsin

uygulanmadan önce Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanarak yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmaktadır. Tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlamaktadır. Bundan dolayı uygulanan tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar %10 FCS'li besiyeri uygulanmaktadır. Tripsin uygulamasından sonra hücrelerin petri yüzeyinden ayrılma hızı değişebilmektedir. Besiyerindeki serum oranı, hücre tipi, petrideki hücre yoğunluğu, tripsinin aktivitesi ve son pasaj üzerinden geçen zamana göre hücreler farklı zamanlarda kalkabilmektedir. Ayrıca tripsin $-20^{\circ}C$ de muhafaza edilmektedir (Kalender,2020).

2.1.2.6 Kriyoprotektan DMSO ve Dondurma Solüsyonu

Kriyoprotektan dondurma ve çözündürme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır. Kriyoprotektan maddeleri, hücre membranından nüfuz edilebilme özelliklerine göre iki farklı grupta incelenebilmektedir. Bunlar hücre membranından geçebilen, yani hücre içerisine nüfuz edebilen (permeating) ve hücre membranından geçemeyen, yani hücre içerisine nüfuz edemeyen (non-permeating) kriyoprotektanlar olarak ayrılmaktadırlar. Kokusuz ve renksiz bir sıvı olan Dimetilsülfoksit (DMSO) hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar arasında bulunmaktadır. Hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahip olabilmektedir. Bu gruptaki kriyoprotektan maddeler hücre içine hızlı bir şekilde diffüze olup su dengesini sağlayarak hücreler osmotik şoktan korunmaktadır. Ayrıca bu kriyoprotektanların çoğu yüksek oranda suda çözünebilme yeteneğine sahip, suyun hidrojen bağlarını koparabilir, su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilir ve böylece suyun buz kristallerine dönüşmesini azaltması ile bilinmektedir (Topçul,2003). İntrasellüler bir ajan olarak DMSO ekstrasellüler elektrolit dengesini sağlayarak ve intrasellüler ve ekstrasellüler osmolarite farkını azaltarak dehidratasyon hasarı önlenmektedir (Arat vd.; 2011; Sağırkaya, Bağış, 2003; Sevim Tüten, Arat; 2021; Ündar, t.y).

Dondurma solüsyonunun içeriği %20 DMSO ve %80 FBS den oluşmaktadır. Dondurma işlemlerine başlamadan önce hazırlanarak $+4^{\circ}C$ ye kaldırılarak sıcaklığının sabitlenmesi gerekmektedir. DMSO oda sıcaklığında depolanmakla birlikte deney aşamasında oda sıcaklığında kullanıldığında hücrelere toksik etki yaratmaktadır. Bu nedenle $+4^{\circ}C$ de sabit bir hızda eklenmeli ve hemen dondurma aşamasına geçilmektedir. Hücreler dondurulurken bir kriyotüpün içeriği %50 dondurma solüsyonu ve %50 medyum olacak şekilde işlem tamamlanmaktadır. Bundan dolayı $-80^{\circ}C$ ye kaldırılacak bir kriyotüpün içerisinde %10 DMSO bulunmaktadır.

2.1.2.7 Tripan Mavisi (Blue)

Hücre kültürü çalışmalarında elimizdeki petri kabının veya kriyotüpün içerisindeki hücre sayısının belirlenmesine yardımcı olan bir azo boyasıdır. Canlı hücrelerin zarları bütün ve yapısı bozulmamış olduğundan dolayı tripan mavisi canlı hücrelerin zarlarından geçememektedir. Ancak, ölü hücrelerin zarlarından geçerek hücreyi boyayabilmektedir. Boyayama işleminin öncesinde adheren (yere yapışık bulunan) hücrelerin önce tripsinize edilerek süspansiyon yani devamlı hareketli ortamda yaşayabilen ve buldukları kabın yüzeyine yapışmadan canlılıklarını devam ettirebilen hale getirilmesi gerekmektedir. Ölü hücreler içerisine boya girdiğinden dolayı sitoplazmaları boyanmış olarak görülmektedir. Canlı hücreler ise boyayı almadığından dolayı parlak sarı renkte görülerek ayırt edilmektedir ve sayım işlemi yapılmaktadır (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarında inverted mikroskop altında tripan mavisi yardımıyla canlı hücre sayımı hızlıca yapılabilmektedir.

2.1.2.8 Flow Sitokiyometri Kitleri

DNA, çift sarmalla şelat yapabilen floresan boyalarla işaretlenebilmektedir. Boyama miktarı hücrede bulunan DNA miktarıyla doğru orantılı olduğundan dolayı sitokiyometrik bir sonuç göstermektedir. Bu amaçla kullanılan boyaların başında propidyum iyodür (PI) gelmektedir. DNA'nın, hücre zarı geçirgen hale getirildikten ve RNase ile işlem gördükten sonra boyanması önerilmektedir. Boyama sonucunda hücre döngüsünün incelenmesine olanak sağlanmaktadır.

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde membran lipidlerinden fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre eğer apapotoza giderse hücre zarının dış yüzüne transfer olunmaktadır. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelmektedir. Anneksin-V, görünür olabilmek için floresan bir madde olan FITC ile işaretlenmektedir. Anneksin-V/FITC kompleksinin hücrenin dış yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanması sonucunda apoptotik hücre görünür hale getirilebilmekte ve flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Boyanma sonucunda canlı hücreler (Annexin-V negatif, PI negatif), erken apoptotik hücreler (Annexin-V pozitif, PI negatif), geç apoptotik (Annexin-V pozitif, PI pozitif) ve nekrotik hücrelerin (Annexin-V negatif, PI pozitif) birbirinden ayırt edilmesini sağlanmaktadır (Güleş ve Eren, 2008; Shynkar vd., 2007). Daha önce yapılmış çalışmalarda annexin V/PI boyama protokolünde PI'nın DNA ile birlikte aynı zamanda sitoplazma içinde RNA'yı da boyayarak %40'lar düzeyinde hatalı pozitif sinyallere sebep olduğu ve bu

durumun önüne geçilmesi için RNaz kullanılmasının yararlı olacağı belirtilmiştir. (Rieger, Hall, Luong, Schang, Barreda 2010; Rieger, Nelson, Konowalchuk, Barreda, 2011; Sevim Tüten ve Arat, 2021). Bu nedenle çalışmamızda genel protokolde bu yönde bir değişiklik yapılmıştır.

2.1.3 Kullanılan Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan malzemeler çizelge 2.2 de verilmiştir.

Çizelge 2. 2 Kullanılan Malzemeler

Malzemeler	Marka
Dereceli Pipet Ucu	SPL LIFE SCIENCES
Elektrikli Pipet Pompası	ISOLAB
Petri Kapları	Corning
Pipet Uçları	ISOLAB
Kriyotüp	ISOLAB
Otomatik Pipet	Transferpette BRAND
Mr. Frosty	NALGENE
Süzme Aparatı	İSOLAB
Süzme Aparatı Kağıdı	MILLIPORE
Thoma Lamı	Germany

2.1.3.1 Petri Kapları, Kriyotüpler

Hücrelerin kültür ortamında yaşayabilmesi ve çoğalabilmesi için yüzeye tutunabilmesi gerekmektedir. Bunun için hücre kültüründe akla ilk gelen petri kapları olmaktadır. Hücre kültürüne uygun üretilen petri kapları tek kullanımlık ve polistirenden yapılmaktadır. Polistiren yapısal olarak hidrofobiktir ve bundan dolayı hücre bağlanması için uygun bir yüzeyi bulunmamaktadır. Kimyasal işlemler veya gamma ışınlanması işlemleri uygulanarak hücre kültürüne uygun hale getirilmektedir. Petri kaplarının büyüme yüzeyleri düz olduğundan dolayı düzgün dağılmış ve tekrarlanabilir tek tabakalı kültürler elde edilmesine olanak sağlamaktadırlar. Hücre kültürü çalışmaların başında yapılan planlamanın bir adımını da 35-60-100-150 mm boyutunda ki petri kaplarının seçimi yer almaktadır. Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarında boyut olarak 60 mm (Şekil 2.1) ve 100 mm'lik petri kapları kullanılmaktadır.



Şekil 2. 1 Petri Kapları

Kriyotüpler (Şekil 2.2) ultra şeffaf saf polipropilenden üretilen, çok düşük sıcaklıklara dayanıklı, 2 ml hacminde, üzerinde hacim göstergesi ve geniş bir yazılım alanı bulunan tüplerdir. Biyolojik ürünlerin, hayvan ve insan hücrelerinin çok düşük sıcaklıklarda saklanmasına olanak sağlamaktadırlar. Ani değişen sıcaklık durumunda aynı malzemedan yapılmış kapak ve gövde aynı tepkiyi vermesinden dolayı sızdırma sorunu oluşmamaktadır. Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarında çalışılan hayvan hücreleri -80°C derin dondurucudakarton kutuların içinde ki kriyotüplerde saklanmaktadır.



Şekil 2. 2 Kriyotüpler

2.1.3.2 Otomatik Pipet, Elektrikli Pipet Pompası ve Pipet Uçları

Otomatik pipetler (Şekil 2.3), laboratuvarlarda $1\mu\text{l}$ - 1ml aralığında ayarlanan belirli sabit değerdeki sıvının transfer işleminde kullanılan malzemelerdir. Ayrıca hava yer değiştirme prensibine dayalı çalışmaktadırlar. Hacim ayarlama düğmesi ile istenilen değer ayarlandıktan sonra pipet ucu takılmaktadır. Piston aşağı doğru yavaşça bastırıldıktan sonra pipet ucu sıvı numuneye

batırılmaktadır. Piston hafifçe bırakıldığında pipet gövdesinden yukarı doğru çıkarken kısmi bir vakum oluşur ve ardından sıvı numune yukarı yükselerek seçilen hacimdeki boşluk doldurmaktadır. Pipet ucuna alınan sıvı pistonu bastırılmasıyla boşaltılmaktadır.

Pipet pompası (Şekil 2.3), özel plastikten üretilmiş elektrik ile sarj edilen 0,1 ml ile 100 ml arasındaki dereceli pipetler ile kullanılan laboratuvar malzemesidir. Çekme ve boşaltma tuşları sayesinde istenilen sıvı miktarı hızlıca kısa sürede çekilebilir ve ardından bırakılabilmektedir.

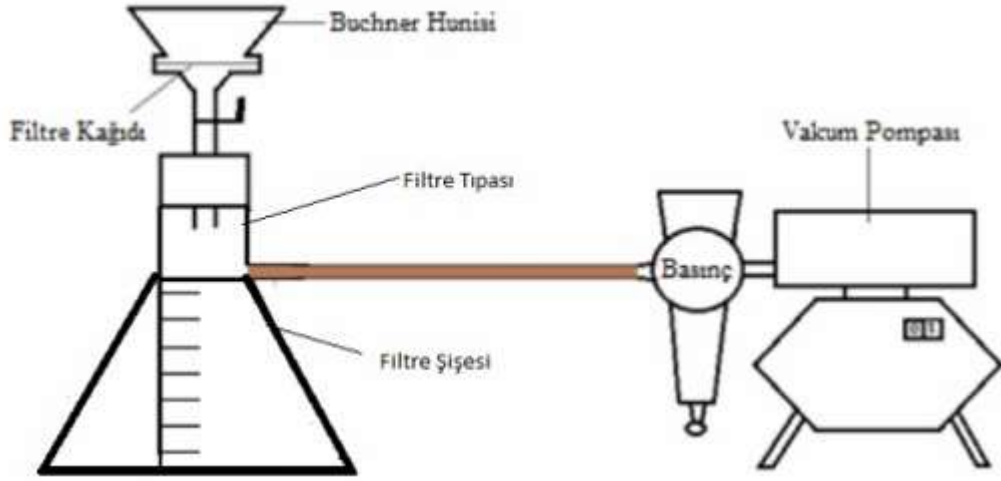


Şekil 2. 3 Otomatik Pipet, Elektrikli Pipet Pompası ve Pipet Uçları

Pipet uçları, laboratuvarlarda sıvı taşıma ve sıvı aktarma işlemleri için otomatik pipetlerin ucuna takılan tek kullanımlık tamamlayıcı üründür. Özel uygulamalara ve pipetlere uyacak şekilde seçilebilecek çeşitli hacimler olanları bulunmaktadır. Mavi pipet ucu 100-1000 μ l, sarı pipet ucu 2-200 μ l, beyaz pipet ucu 0,5-10 μ l aralıklarında ki sıvı çekimi için kullanılmaktadır. Bu sayede otomatik pipetler ve pipet pompası steril koşullar için ideal çalışma malzemeleri arasında bulunmaktadır.

2.1.3.3 Süzme Aparatı (Vakumlu Filtrasyon)

Vakum filtrasyon, çözeltilerdeki katıyı sıvıdan basınç farkıyla ayırmakta kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem yerçekimli (basit) filtrasyondan çok daha hızlıdır. Süzme aparatı vakum filtre şişesi, filtre tıpası, Buchner hunisinden oluşmanın yanında vakum pompasına da bağlanmasının sonucunda vakum filtrasyon setini (Şekil 2.4) oluşturmaktadır. Buchner hunisine dökülen süzülmesi istenen sıvı karışım vakum pompasının etkisiyle aşağıya doğru çekilerek sıvı kısım filtre şişesinde toplanırken katı maddeler ise filtre yüzeyinde kalmaktadır (Anonim,2016).



Şekil 2. 4 Vakumlu Filtrasyon Düzeneği (Anonim,2016)

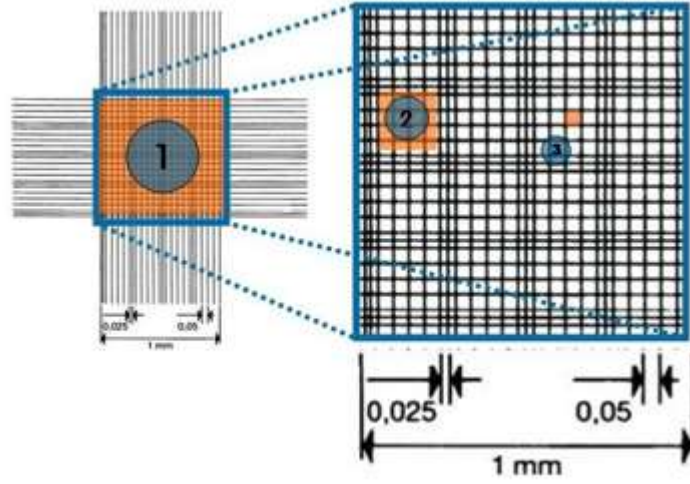
Filtrasyon işleminde filtre tıpası ile Buchner hunisi arasına 0,22 μm filtre kağıdı yerleştirilmesinin ardından kaymasını ve sıvı sızıntısını önlemek amacıyla filtre tıpası ve Bunchner hunisi birbirine pens ile sıkıştırılmaktadır. Böylece süzme aparatı (Şekil 2.5) filtrasyon düzeneğinde hazır hale getirilmesinin ardından DMEM/F12 stok besiyerinin süzme işlemi gerçekleştirilmektedir. Süzme işlemiyle stok DMEM/F12 besiyerinin sterilizasyonu gerçekleşmektedir. Böylece istenilen zaman hücrelerin kullanacağı ortam için hazır hale getirilmiş olmaktadır.



Şekil 2. 5 Süzme Aparatı

2.1.3.4 Thoma Lamı

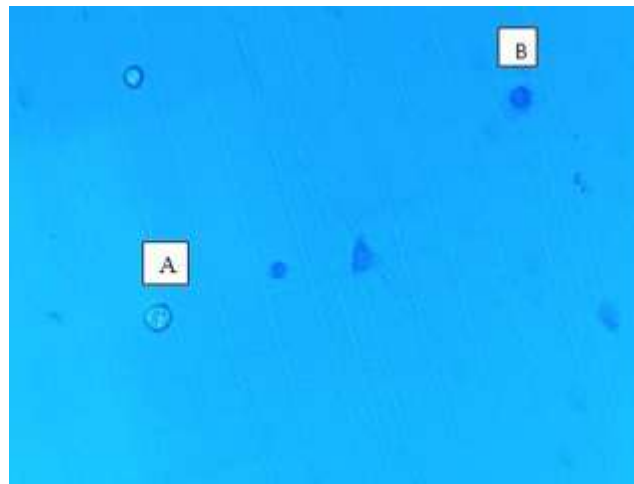
Laminer kabindeki falkon tüpte 1 ml besiyeri içerisinde bulunan hücrenin sayısını mikroskop yardımıyla 0,1 mm^3 hacimde sayım yapılarak hesaplama sonucunda belirlenmesini sağlayan malzeme ve yöntemdir.



Şekil 2. 6 Thoma Lamının Görüntüsü

Thoma lamında (Şekil 2.6) sayımın yapıldığı 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmakla birlikte sayım bölgesinde $16 \times 25 = 400$ küçük kare bulunmaktadır. Sayım bölgesinin toplam alanı 1 mm^2 olmakla birlikte lamel Thoma lamına yapıştırıldığında sayım bölgesinin yüksekliği de $0,1 \text{ mm}$ 'dir.

Besiyeri ortamında 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj edilen hücrelerin üst kısımda kalan süpernatant atılarak peleti oluşturan hücreler 1 ml besiyeriyle sulandırılmaktadır. Pipetleme yapılarak homojen hale getirildikten sonra eppendorf tüpün içerisine $10 \mu\text{l}$ hücre süspansiyonu ve üzerine $90 \mu\text{l}$ tripan blue eklenmektedir. Hazırlanan $\%10$ seyreltik çözelti Thoma lamı ile lameli arasına kapiler kuvvetin etkisiyle de Thoma lamında ki sayım alanına aktarılmaktadır.



Şekil 2. 7 Thoma Lamı Hücre Sayım Görüntüsü (A:Canlı Hücre, B:Ölü Hücre)

Inverted mikroskop altında sayım yapılırken tripan blue ölü hücrelerin içine girme özelliğinden yararlanılmaktadır. Bundan dolayı sayım yaparken koyu mavi gözüken hücreler ölü,

açık renkteki parlak hücreler canlı (Şekil 2.7) olarak sayılmaktadır. Thoma lamında hücreler sayıldıktan sonra aşağıda verilen formüle göre canlı hücre sayısı elde edilmektedir (Anonim, 2013).

$$\text{Canlı hücre sayısı} = 16 \text{ büyük karedeki hücre sayısı} \times 10,000 \times \text{dilüsyon faktörü}$$

2.1.3.5 Mr. Frosty™ Cryo 1°C Dondurucu Kap

Polikarbonat kap (Şekil 2.8), polietilen kapak, 18 adet tüp tutucu ve köpük ara parçalarından oluşan dondurma kabıdır. Tüp tutucu bölüm ile polikarbonat kap duvarı arasında belirtilen seviyede izopropil alkol koyularak kullanıma hazır hale getirilmektedir. Hücreler son hacmi %10 DMSO, %40 FBS, %50 DMEM/F12 besiyeri içeren solüsyon içerisinde homojen karışması sağlanmasının ardından 2 ml'lik dondurma tüpleri aktarılmaktadır. Hazırlanan tüplerin Mr. Frosty'ye aktarıldıktan sonra -80°C'de 24 saat bekletilerek, hücrelerin dondurulma işleminin -1°C/dakika soğutma hızıyla gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Donmuş tüpler Mr. Frosty'den alınarak uzun süreli depolanmak üzere karton kutulara aktarılarak -80°C derin dondurucuya kaldırılmaktadır (Sevim Tüten ve Arat, 2021).



Şekil 2. 8 Mr. Frosty™ Cryo 1°C Dondurucu Kap

2.1.4 Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar çizelge 2.3 de verilmiştir.

Çizelge 2. 3 Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	Model
Buz Dolabı +4 °C	Beko
Flow Sitometri	PARTEC
Flow Sitometri	BECKMAN COULTER
Hassas Terazı	AND GF-600
Isıtıcı Tabla	Enda
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	WiseStir MSH-20A
İnkübatör	Panasonic
İnvert Mikroskop	BOECO BAB DCM 510
Laminer Flow Kabin	Heal Force HFsafe-1200
Otoklav	ART Lab ALP
pH Metre	Jenco 6173pH
Santrifüj	Hettich Universal 320
Su Banyosu	DAIHAN
Ultra Saf Su Cihazı	Millipor Direct-Q 3 UV with Pump
Vakum Pompası	KNF N022AN.18

2.1.4.1 Otoklav

Steril koşul gerektiren ısıya ve basınca dayanıklı laboratuvar çalışma materyallerin (cam pastör pipetler, şişeler, saf ve ultra saf sular vb.) kullanım öncesi yüksek sıcaklık ve basınç altında dekontamine edilmesi için kullanılan kilitli kapaklı (Şekil 2.9) sterilizasyon cihazıdır. Sterilizasyon, bir maddenin üzerinde veya içinde bulunan tüm mikroorganizmalardan arındırılma işlemidir. Bu işlem esnasında tüm mikroorganizmalar öldürülmektedir. Otoklav ilesterilizasyonda nem, sıcaklık, uygulama süresi ve basınç sterilizasyon işlemini etkilemektedir. Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarı materyallerinin çalışma öncesinde yapılan sterilizasyon;1 atmosfer basınç altında 121°C de 20 dakika uygulanmaktadır. Otoklav cihazına yerleştirilecek materyallerin üzerine yapıştırılan otoklav bandı sayesinde de sterilizasyon işleminin kesin olarak gerçekleştiğinden emin olunmaktadır.



Şekil 2. 9 Otoklav Cihazı

2.1.4.2 Hassas Terazî

Laboratuvarda kullanılan kimyasalların kütlelerini en doğru şekilde ölçmesi (Şekil 2.10) için tasarlanmış aşırı hassas laboratuvar cihazlarından. Yapılan ölçümler aşırı hassas olduğundan sonuçlar havada uçuşan toz gibi maddelerden, hava sirkülasyonundan kolayca etkilenebilmektedir. Bu sebeplerden ötürü ölçüm esnasında laboratuvar kapısının ve varsa odadaki klimanın kapalı olduğundan emin olmakta birlikte benchlerin üzerine dokunmamaya özen gösterilmelidir. Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarında besiyeri hazırlamanın ilk sırasında hassas terazi ile tartım işlemi yer almaktadır.



Şekil 2. 10 Hassas Terazî

2.1.4.3 Manyetik Karıştırıcı

Laboratuvarda bulunan kimyasal ve sıvı materyallerin cam kaplar içerisine konularak,

oluşan manyetik alanın etkisi ile karıştırma işlemini sağlayan cihazdır. Bir sıvının homojen bir hale gelmesi için karışması ve içerisindekilerin çözünmesini gerektirir. Beher içindeki çözeltinin homojen bir şekilde karışması için içerisine manyetik balık atılır. Manyetik karıştırıcı içerisinde motorla birlikte dönen mıknatıs kafa, bu manyetik balıkların karışım içerisinde dönmesini sağlayarak çözeltinin homojen hale gelmesine yardımcı olmaktadır. Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarında besiyerinin ve PBS'nin homojen bir çözelti haline gelmesi için kullanılmaktadır.

2.1.4.4 pH Metre

Sulu çözeltilerdeki hidrojen iyonu aktivitesini yani H^+ ve OH^- konsantrasyonlarını ölçen başka bir değişle asitliğini veya bazikliğini gösteren cihazdır. Eğer bir çözeltide pH değeri 7 den büyük çıkarsa bazik, 7 den küçük çıkarsa asidik ve 7 değerine sahip bulunursa nötral olarak kabul edilmektedir. Ölçülen pH değerini düşürmek için hidrojen klorür (HCl), yükseltmek için sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmaktadır. Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarında kullanılacak DMEM/F12 besiyerinin pH değeri 7,2 – 7,4 arasında olacak şekilde ayarlanarak kullanılmaktadır.

2.1.4.5 Su Banyosu

Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarında kimyasalların ve çözeltilerin kontrollü olarak ısıtılmasında ve $-80^{\circ}C$ derin dondurucudan çıkarılan kriyotüplerde ki hücrelerin hızlı çözünmesinde kullanılan cihazdır. $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edilen kimyasalların ve $+4^{\circ}C$ 'de muhafaza edilen çözeltilerin kısa veya uzun süreler sabit ve istenen $37^{\circ}C$ sıcaklık tutulabilmesinde (Şekil 2.11) yardımcı olmaktadır.



Şekil 2. 11 Su Banyosu

2.1.4.6 Laminer Flow Kabin

Biyogüvenlik kabinleri çalışan personel ve çevreyi enfeksiyöz aerosol ve sıçramalardan korumaya yönelik tasarlanan hava akımı düzenlenmiş cihazlardandır (Şekil 2.12). Amaca yönelik kontrollü hava akımı sağlaması ve hava içindeki mikroskobik partikülleri elimine etmesi bu cihazın önemli özelliklerindedir. Sınıf-II Biyogüvenlik Kabinleri çalışanların ve çevrenin korunması yanında ürün korumaya yönelik olarak da tasarlanmış olmaları dolayısıyla daha yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Eliminasyon, kabin içindeki ventilasyon ya da mekanik hava yolu üzerine yerleştirilmiş HEPA (High-Efficiency Particulate Air) adı verilen bir tür filtre veya filtre sistemleri tarafından sağlanmaktadır. HEPA filtreler 0.3 mikron çapındaki parçacıkların en az %99,97'sini tutma kapasitesine sahiptirler. Filtreler borosilikat fiberden üretilmektedirler. Çalışma yüzeyindeki ön panel açıklığının altında bir ızgara sistemi bulunmaktadır. Buradan dış ortam oda havası doğrudan HEPA filtreye yönlendirilerek önce temizlenmektedir. Daha sonra ise temiz havanın ön panel açıklığından giren hava ile “güvenli hava duvarı” oluşturacak şekilde çalışma yüzeyine laminar akım halinde gönderilmesi sağlanmaktadır. Bu döngü sırasında havanın bir kısmı dışarıya atılmaktadır. Böylece hem çalışma yüzeyi temiz kalır hem de çalışanlar ve çevre korunmuş olmaktadır (Abacıoğlu vd., 2021).



Şekil 2. 12 Laminer Flow Kabin

2.1.4.7 Vakum Pompası

Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarında ortamda istenilmeyen sıvıların uzaklaştırılmasında ve besiyeri süzme aşamasında kullanılan (Şekil 2.13) yardımcı cihazdır. Vakum pompasının hortumunun ucuna pastör pipet takılmasının ardından Laminer Flow kabin içerisinde açılan petri kaplarının veya falkon tüplerinin içerisinde istenilmeyen besiyeri veya PBS pastör pipet yardımıyla vakum yardımıyla çekilerek ortamdaki uzaklaştırılmasına yardımcı

olmaktadır. Vakum pompasının hortumu süzme aparatına takıldığında ise vakumun etkisiyle besiyerinin porlardan hızla geçmesinde yardımcı olmaktadır.



Şekil 2. 13 Vakum Pompası

2.1.4.8 Santrifüj

Farklı yoğunluktaki katı ve sıvı parçacıkların yoğunluklarına göre birbirinden ayrılmasını sağlayan cihazdır. Merkezkaç kuvveti prensibi ile çalışarak cihaz içindeki tüplerde bulunan karışımlar çökelme prensibine göre ayrılmaktadır. Ağır maddelerin tüpün alt kısmına çöken pelet ile hafif maddelerin üst kısımda toplanan süpernatantın birbirinden ayrılması sağlanmaktadır. Santrifüje yerleştirilecek falkon tüplerinin son hacimleri eşit miktarda olmasına dikkat ederek, ayrışmasını istediğimiz solüsyon 15 ml falkon tüplerine aktarılmaktadır. Bu tüpleri cihaza simetrik olarak yerleştirilmektedir. (Şekil 2.14) Santrifüjün sabit açılı rotarı sayesinde peletin falkon tüpünün uç kısmında değil de tüpün duvar kısmında toplanması sağlanmaktadır. Bu sayede pelete zarar vermeden süpernatantın uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktadır.



Şekil 2. 14 Santrifüj Cihazı

2.1.4.9 CO₂ İnkübatörü

Hücre kültürü işlemleri esnasında hücrelerin çoğalabilmesi için uygun koşullarda üretilmesi, analiz öncesi ve süresince muhafazası için kullanılan; homojen ve sabit sıcaklık (37°C), karbondioksit (%5-10) ve nem (%95) de bulunan hava geçirmez laboratuvar cihazıdır (Şekil 2.15). Ortam sıcaklığı cihaz tarafından sağlanırken, ortam nemi inkübatörün alt kısmında bulunan su kabına koyulan otaklavlanmış saf suyla, karbondioksik ise inkübatöre bağlanmış tüpler aracılığı ile sağlanmaktadır. Ayarlanan sıcaklık değerlerinden uzaklaşmadan sabit ve homojen şekilde ısı dağıtılmaktadır. Sensör sistemi ile karbondioksitin uygun koşullardakalması sağlanırken, hava ve nem sirkülasyonunu sabit düzeylerde ayarlamaktadır. İnkübatör nemi, sıcaklığı ve karbondioksit değerinin fazla değişmemesi ve kontaminasyon riskinin artmaması için kapağının fazla açık tutulmaması gerekmektedir. Ayrıca cihaz içi sterilizasyonu inkübatör çalışmaya başlamadan 24 saatlik zaman diliminde ve inkübatör kapağının her açılıp/kapandıktan sonraki 5 dakikalık periyotta uv ışın aracılığıyla yapılmaktadır.



Şekil 2. 15 Karbondioksitli İnkübatör

2.1.4.10 Isıtıcı Tabla

Üzerine bırakılan kapların içindeki sıvıları ısıtmak ve sıcaklığını korumak amacıyla (Şekil 2.16) kullanılan cihazdır. İnkübatör içerisinde kültüre edilen hücreler, inverted mikroskopta incelenmek istediğinde ortamın sıcaklık farkından etkilenmemesi ve hücrelerin devamlı olarak ihtiyaç duyduğu sıcaklığın devamlılığı amacıyla petri kapları sabit 37°C bulunan ısıtıcı tabla üzerine bırakılmaktadır.



Şekil 2. 16 Isıtıcı Tabla

2.1.4.11 Inverted Mikroskop

Kültüre alınan petri kaplarında sıvı besiyeri içerisinde bulunan hücreleri, lam lamele bağlı kalmadan incelememizi sağlayan mikroskop çeşididir (Şekil 2.17). Hücre kültürü laboratuvarlarında daha çok kullanılan inverted (ters) mikroskopta objektifler tablanın alt kısmındadır ve mercek preparatı üstten değil alttan görmektedir. Hücrelerin petri kabına

yapışmasını, büyümesini, çoğalmasını, morfolojik özelliklerini, kontaminasyon durumunu, petri kabından kalkıp/kalkmadığını incelemesine ve hücre sayım işlemine yardımcı olmaktadır.



Şekil 2. 17 İnvrted Mikroskop

2.1.4.12 Buzdolabı ve -80 °C Derin Dondurucu

Hücre kültürü laboratuvarlarında Annexin V-FITC, propidyum iyodür, DMEM/F-12 besiyeri, DPBS gibi bazı kimyasal ve çözeltilerin zarar görmemesi için +4°C gibi düşük sıcaklıklarda; tripsin, antibiyotik, FBS gibi bazı kimyasallar da zarar görmemesi için -20°C gibi daha düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmektedir.

Hücrelerin biyolojik aktivitelerinin yavaşlaması veya durdurulması ve daha sonrasında istenilen zamanda canlılığını etkin duruma getirilerek kullanılması amacıyla yapılan kriyoprezervasyon olarak adlandırılan dondurularak saklanma işleminde -80°C gibi ultra düşük sıcaklıklarda (Şekil 2. 18) hücreler muhafaza edilmektedir.



Şekil 2. 18 -80 °C Derin Dondurucu

2.1.4.13 Flow Sitometri

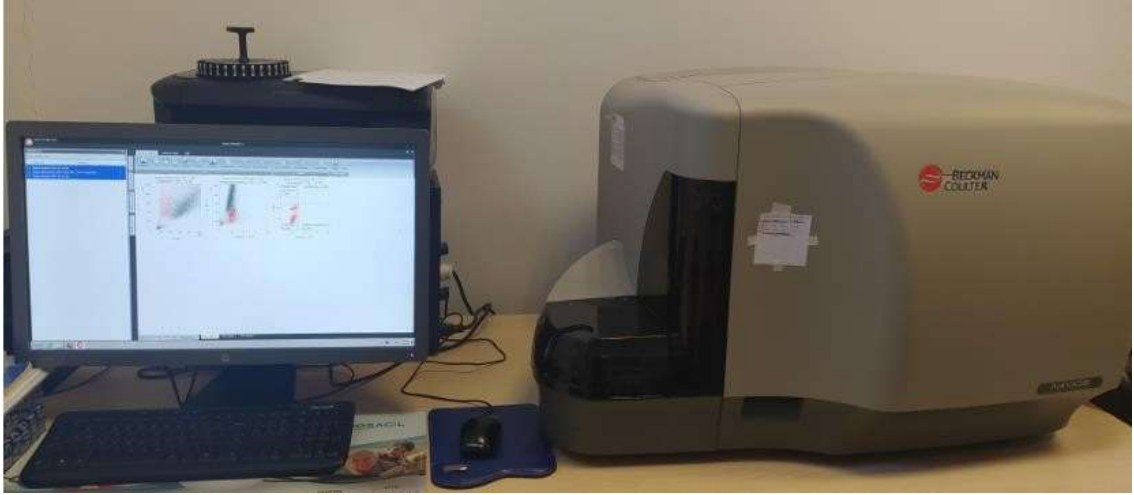
Akan bir sıvının içerisinde süspansiyon halde ki hücreler akış kanalı boyunca tek tek geçerken hücresel özelliklerinden kaynaklı verdikleri sinyalleri toplayarak kantitatif ölçüm yapan teknik ve cihazdır. Sinyallerin kaynağı, hücrelerin büyüklük ve içyapıları (granülarite) gibi fiziksel özellikleri veya hücrelere bağlanan farklı florokromlar da (floresan antikor) olabilmektedir (Karaboz, Kayar ve Akar, 2008).

Flow sitometri (Şekil 2.19) hücrelerin hangi bölünme fazında ne miktarda hücre bulunduğunu tespit etme konusunda yardımcı olarak hücre döngüsü incelenebilmektedir. Diploid (2n DNA içeriği) hücreler G0/G1 fazında bulunurken, tetraploid (4n DNA içeriği) hücreler G2/Mitoz fazında bulunmaktadır. S (sentez) fazındaki hücrelerin ise DNA içeriği diploid ile tetraploid (2n-4n) hücreler arasında belirlenmektedir (Hayes vd., 2005; Kanev ve Gökalp Muranlı, 2016).



Şekil 2. 19 Flow Sitometri Cihazı (Hücre Döngüsü Ölçüm Cihazı)

Flow sitimetri (Şekil 2.20) hücre canlılık analizleri konusunda da yardımcı olmaktadır. Hücre membranının normalde iç kısmında bulunan fakat apoptozis ile hücre yüzeyine çıkan fosfotidil serine bağlanma özelliği gösteren Annexin V ile hücrelerde apoptozis tayini yapılabilmektedir. Hücrelerin eşzamanlı olarak propidyum iyodür ile boyanmasıyla da ölü- canlı hücre ayrımı yapılabilmektedir (Kanev vd., 2016).



Şekil 2. 20 Flow Sitometri Cihazı (Apoptoz/Nekroz Ölçüm Cihazı)

2.2 Yöntem

Bu tez çalışması Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Hayvan Biyoteknolojisi I Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

2.2.1 Besi Ortamının Hazırlanması

Beherin içerisine toz besiyeri DMEM/F12 (Gibco-32500-035) 12 gram ve sodyum bikarbonat (Sigma S5761) 2,438 gram tartılarak (Şekil 2.21) koymuştur. Mezurda 900 ml otoklavlanmış ultra saf su ölçülerek beherin içerisine dökülmüştür.



(a)



(b)

Şekil 2. 21 a) Toz DMEM/F12 Tartımı b) Sodyum Bikarbonat Tartımı

Hazırlanan besiyerinin manyetik karıştırıcı sayesinde homojen hale gelmesi sağlanırken aynı zamanda pH metre sayesinde de pH değerinin 7,2 ile 7,4 arasında olması (Şekil 2.22)

sağlanmıştır. Çoğunlukla yüksek çıkan pH değeri 1 N HCl'ün damla damla eklenmesiyle istenen değer aralığına düşürülmüştür.



Şekil 2. 22 DMEM/F12 Besiyeri a) pH Değerini b) Ayarlama İşlemi

Çözeltinin karışması sağlandıktan sonra beherdeki besi yeri mezura dökülerek, üzerine son ultrasaf su ilaveyle son hacmi 1000 ml ye tamamlanmıştır. Besi yeri behere dökülüp, üzeri parafilm ile kapatıldıktan sonra laminar flow kabine alınmıştır. Süzme aparatına takılan 0,22µm çapındaki porlu filtreden geçirilmesiyle besi yerinin sterilizasyonu (Şekil 2.23) sağlanmıştır. Süzülen stok besi yeri cam şişelere (Şekil 2.23) boşaltılıp ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra +4°C ye kaldırılmıştır.



(a)



(b)

Şekil 2. 23 DMEM/F12 Besiyeri a) Süzme ve b) Stoklama İşlemi

Hücrelere kullanılmak üzere hazırlanan besi yeri için kullanılacak stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035), FBS (Sigma-F9665) ve antibiyotik (Biochrom) öncelikle su banyosunda sıcaklığı 37°C ye ulaşip sabitlendikten sonra üzerleri alkolle silinip laminar flow kabini içerisine alınmıştır. 100 ml besi yeri hazırlamak için otoklavlanmış bir cam şişenin içerisine 89ml stok

DMEM/F12, 10 ml FBS ve 1 ml antibiyotik koyularak homojen karışması sağlanmıştır. Böylece hücreler için hazırlanan 100 ml besi yerinde DMEM/F12'nin %89, FBS'nun %10 ve antibiyotiğin %1 oranında olması sağlanmıştır. Hazırlanan bu DMEM/F12 besi yeri 3 hafta içinde kullanılmıştır.

2.2.2 Dulbecco's Fosfat Buffer Saline (DPBS) Hazırlanması

Cam beherin içerisine 1 litrelik için özel olarak hazırlanmış toz DPBS (Sigma D5662) boşaltılmıştır. Üzerine 1 litre otoklavlanmış ultra saf su ilave edilerek manyetik karıştırıcı sayesinde homojen karışması sağlanmıştır. Hazırlanan DPBS karışımı cam şişelere boşaltılmıştır. Cam şişelerin kapağı tam sıkılmayarak üzerine alüminyum folyo sarıldıktan sonra otoklav bandı yapıştırılıp 121°C de 20 dk otoklavlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Benchin üzerinde bir gece soğumaya bırakılarak daha sonrasında cam şişelerin ağızları sıkıca kapatılarak +4°C ye kaldırılmıştır.

2.2.3 Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması

Dondurma işlemi gerçekleşmeden belirli bir süre önce laminer flow kabin içerisinde falkon tüplerine DMSO (Sigma D4540) %20 ve FBS (Sigma-F9665) %80 oranında olacak şekilde karıştırılmıştır. Pipetleme işlemi yapılarak hazırlanan homojen karışım +4°C ye kaldırılmıştır.

2.2.4 Hücre Açma

Hücre kaynağı olarak -80°C derin dondurucuda kriyotüplerde bulunan sığır ve koyun granüloza hücrelerinin pasaj 1 ve pasaj 2'de ki stokları kullanılmıştır. Laminer flow kabin içerisinde 15 ml'lik falkon tüplerine 3 ml sıcaklığı su banyosu kullanılarak 37°C getirilen %10FBS ve %1 antibiyotik ve %89 stok DMEM/F12 içeren DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. - 80°C deki derin dondurucudan hızlıca alınan kriyotüpler 37°C deki su banyosuna daldırılıp erimesi sağlandıktan sonra kriyotüp kutularının üzerleri alkolle dezenfekte edilip otomatik pipet yardımıyla hemen falkon tüpteki DMEM/F12 besi yerinin içerisine aktarılmıştır. Falkon tüp içerisindeki hücreler 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi esnasında laminer akım kabini içerisinde ekim yapılacak olan 60 mm'lik petri kabının üzerine hücrenin ismi, pasajsayısı ve çalışmanın yapıldığı günün tarihi yazıldıktan sonra petri kabının içerisine ise 5 ml DMEM/F12 besiyeri koyulmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında kabin içerisinde falkon tüpte hücrelerin üst kısmında ki süpernatant kısım vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücre yığını olan peletin zarar görmemesine dikkat ederek çekilmiştir. Pelet 500 µl DMEM/F12 besiyeri ile sulandırılıp pipetleme yapılarak homojen karışması sağlandıktan sonra 60 mm'lik petri kabına ekilmiştir. Hücrelerin petrinin her tarafına dağılması için "+" olacak şekilde yavaş yavaş önce ileri-

geri daha sonrada sağa-sola sallanmıştır. Ekilen hücrelerin petri kabına yapışması ve çoğalması için 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

2.2.5 Hücrelerin Çoğalması ve Pasajlanması

Belirli zaman aralıklarıyla incelenmek üzere inkübatörden alınan hücrelerin makroskobik ve mikroskobik incelemeleri yapıldıktan sonra hücreler eğer petri kabının yüzeyini %100 konfluent olacak şekilde doldurmadıysa besi yeri değişikliği, %100 konfluent olacak şekilde doldurduysa paşajlama işlemi yapılmıştır. Eğer besiyeri değişimi yapılacaksa laminer flow kabininde içirisinde sıcaklığı su banyosu kullanılarak 37°C getirilen %10 FBS, %1 antibiyotik ve %89 stok DMEM/F12 içeren DMEM/F12 besiyeri ve DPBS hazır edilmiştir. Petri kapları laminer flow kabinin içine alındıktan sonra vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücrelerin üzerindeki besi yeri çekilmiştir. Hücrelerin üzerine 5 ml DPBS yavaşça dökülerek yıkanması sağlanmıştır. DPBS te yine besi yeri gibi vakum pompası kullanılarak hücrelerin üzerinden uzaklaştırılmıştır. Her bir petri kabına 5 ml DMEM/F12 besiyeri konularak 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Eğer paşajlama işlemi yapılacaksa laminer flow kabininde içirisinde sıcaklığı su banyosu kullanılarak 37°C getirilen %10 FBS, %1 antibiyotik ve %89 stok DMEM/F12 içeren DMEM/F12 besiyeri ve %0,25 Tripsin-EDTA (Gibco- 25200-056) hazır edilmiştir. Petri kapları laminer flow kabinin içine alındıktan sonra vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücrelerin üzerindeki besi yeri çekilmiştir. Hücrelerin üzerine 5 ml DPBS yavaşça dökülerek yıkanması sağlanmıştır. DPBS te yine besi yeri gibi vakum pompası kullanılarak hücrelerin üzerinden uzaklaştırılmıştır. Hücreler üzerine otomatik pipet yardımıyla 60 mm'lik petri kabının bütün yüzey alanını kaplayacak şekilde 500 µl tripsin koyulduktan sonra 5 dakika 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında laminer flow kabin içirisinde 15 ml'lik falkon tüplerine 3 ml DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. İnkübasyon süresi sona erdiğinde petri kapları ısısını fazla kaybetmemesi için 37°C olan ısıtıcı tablanın üzerine bırakılmıştır. Hızlıca inverted mikroskopta hücrelerin kalkıp- kalkmadığı kontrol edilmiştir. Eğer hücreler kalkmamış ise petri kaplarının yanlarından mekanik kuvvet uygulanarak kalkması sağlanmıştır. Hemen laminer flow kabinin içirisine alınarak, tripsinin etkisini inhibe etmek amacıyla üzerine 1 ml DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. 60 mm'lik petri içirisindeki hücreler pipetlenerek tek hücre haline getirilmesi sağlandıktan sonra hazırlanan falkon tüpüne aktarılmıştır. Falkon tüp içirisindeki hücreler 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi esnasında laminer akım kabini içirisinde ekim yapılacak olan 60 mm'lik petri kabının üzerine hücrenin ismi, hücrelerin kaldırıldığı petride yazan paşaj sayısı 1 arttırılarak yeni oluşturulan paşaj sayısı ve çalışmanın yapıldığı günün tarihi yazıldıktan sonra petri kabının içirisine ise 5 ml DMEM/F12

besiyeri koyulmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında kabin içerisinde falkon tüpte hücrelerin üst kısmında ki süpernatant kısım vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücre yığını olan peletin zarar görmemesine dikkat ederek çekilmiştir. Pelet 500 µl DMEM/F12 besiyeri ile sulandırılıp pipetleme yapılarak homojen karışması sağlandıktan sonra 60 mm'lik petri kabına ekilmiştir. Hücrelerin petrinin her tarafına dağılması için "+" olacak şekilde yavaş yavaş önce ileri-geri daha sonrada sağa-sola sallanmıştır. Ekilen hücrelerin petri kabına yapışması ve çoğalması için 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

2.2.6 Hücrelerin Dondurulması

Belirli zaman aralıklarıyla incelenmek üzere inkübatörden alınan petrielerde pasaj 4 ve pasaj 14 te bulunan koyun ve sığır hücrelerin makroskobik ve mikroskobik incelemeleri yapıldıktan sonra hücreler eğer petri kabının yüzeyini %100 konfluent olacak şekilde doldurduysa hücrelerin dondurma işlemi yapılmıştır. Dondurma işlemi yapılmadan önce dondurma solüsyonu hazırlanarak +4 °C ye kaldırılmıştır. Ayrıca laminer flow kabininde içerisinde sıcaklığı su banyosu kullanılarak 37°C getirilen %10 FBS, %1 antibiyotik ve %89 stok DMEM/F12 içeren DMEM/F12 besiyeri, DPBS ve tripsin hazır edilmiştir. Petri kapları laminer flow kabinin içine alındıktan sonra vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücrelerin üzerindeki besi yeri çekilmiştir. Hücrelerin üzerine 5 ml DPBS yavaşça dökülerek yıkanması sağlanmıştır. DPBS te yine besi yeri gibi vakum pompası kullanılarak hücrelerin üzerinden uzaklaştırılmıştır. Hücreler üzerine otomatik pipet yardımıyla 60 mm'lik petri kabının bütün yüzey alanını kaplayacak şekilde 500 µl tripsin koyulduktan sonra 5 dakika 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında laminer flow kabin içerisinde 15 ml'lik falkon tüplerine 3 ml DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. İnkübasyonsüresi sona erdiğinde petri kapları ısısını fazla kaybetmemesi için 37°C olan ısıtıcı tablanın üzerine bırakılmıştır. Hızlıca inverted mikroskopta hücrelerin kalkıp-kalkmadığı kontrol edilmiştir. Eğer hücreler kalkmamış ise petri kaplarının yanlarından mekanik kuvvet uygulanarak kalkması sağlanmıştır. Hemen laminer flow kabinin içerisine alınarak, tripsinin etkisini inhibe etmek amacıyla üzerine 1 ml %10 FBS içeren DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. 60 mm'lik petri içerisindeki hücreler pipetlenerek tek hücre haline getirilmesi sağlandıktan sonra hazırlanan falkon tüpüne aktarılmıştır. Falkon tüp içerisindeki hücreler 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi esnasında laminer akım kabini içerisinde dondurulacak olan kriyotüpün üzerine hücrenin ismi, hücrelerin kaldırıldığı petride yazan pasaj sayısı ve dondurma işleminin yapıldığı günün tarihi yazılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında kabin içerisinde falkon tüpte hücrelerin üst kısmındaki süpernatant kısım vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücre yığını olan peletin zarar görmemesine dikkat ederek çekilmiştir.

Pelet 500 µl DMEM/F12 besiyeri ile sulandırılıp pipetleme yapılarak homojen karışması sağlandıktan 500 µl %20 DMSO ve %80 FBS içeren dondurma solüsyonu +4°C den alındığından dolayı soğuk olması nedeniyle hücrelerin üzerine yavaş yavaş bırakılmıştır. Dondurma solüsyonu eklendikten sonra pipetleme yapılarak karıştırıldıktan sonra kriyotüpüne aktarılmıştır. Kriyotüpler Mr. Frosty içerisinde (Şekil 2.24) -80°C derin dondurucuda 24 saat bekletildikten sonra karton kriyokutulara (Şekil 2.24) aktarılarak -80°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.



Şekil 2. 24 Mr. Frosty’de Bulunan Hücrelerin Karton Kutuya Aktarılması

Hücrelere dondurma işlemi uygulanırken %50 besi yeri ve %50 dondurma solüsyonu uygulandığı için, kriyotüplerin son derişimleri %10 DMSO, %20 FBS ve %50 DMEM/F12 olması sağlanmıştır. Senkronizasyon işlemleri uygulanıp sonrasında Hücre Siklus Analizi ve Hücre Apoptozis/Nekrozis Analizi için hazırlanacak sığır ve koyun hücreleri pasaj 4 (erken pasaj) ve pasaj 14 (geç pasaj) te stoklanarak -80°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

2.2.7 Hücrelerin Çözülmesi

Hücre kaynağı olarak hazırlanarak -80°C derin dondurucudaki kriyotüplerde stoklanan sığır ve koyun granüloza hücrelerinin pasaj 4 ve pasaj 14 de ki stokları kullanılmıştır. Laminer flow kabin içerisinde 15 ml’lik falkon tüplerine 3 ml sıcaklığı su banyosu kullanılarak 37°C getirilen %10 FBS, %1 antibiyotik ve %89 stok DMEM/F12 içeren DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. -80°C deki derin dondurucudan hızlıca alınan kriyotüpler 37°C deki su banyosuna daldırılıp erimesi sağlandıktan sonra kriyotüp kutularının üzerleri alkolle dezenfekte edilip otomatik pipet yardımıyla hemen falkon tüpteki DMEM/F12 besi yerinin içerisine aktarılmıştır. Falkon tüp içerisindeki hücreler 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında kabin içerisinde falkon tüpte hücrelerin üst kısmında ki süpernatant kısım vakum pompası

kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücre yığına olan peletin zarar görmemesine dikkat ederek çekilmiştir. Pelet 1000 µl DMEM/F12 besiyeri ile sulandırılıp homojen karışması için pipetleme işlemi yapılmıştır.

2.2.8 Hücre Sayımı

Sığır ve koyun hücrelerinin pasaj 4 ve pasaj 14 te ki hücrelerinin çözdürülüp, peletin 1000 µl %10 FBS, %1 antibiyotik ve %89 stok DMEM/F12 içeren DMEM/F12 besiyeri ile sulandırılıp, homojen karışması için pipetleme işlemi yapıldıktan sonra ependorf tüpüne 10 µl sayım yapılmak için alınmıştır. Ependorf tüpünün üzerine 90 µl tripan blue eklenerek homojen karışması için pipetleme yapılırken köpük yapmasını engellemek amacıyla da yavaşça yapılmıştır. Hazırlanan homojen karışımdan 10 µl alınarak Thoma lamı ile lameli arasına (Şekil 2.25) boşaltılmıştır.



Şekil 2. 25 Thoma Lamı Tripan Mavisi (Blue) Ekleme Alanı

İnvert mikroskop yardımıyla 10 µl karışımın içerisindeki canlı hücre sayısı sayılmıştır. Hesaplama yapılarak 1000 µl lik karışımdaki hücre sayısına ulaşılmıştır. Her 60 mm lik petri kabına 300.000 hücre gelecek gibi hesaplaması yapılarak belirlenen miktarda hücre karışımından ekilmiştir. Böylece deney gruplarının işlem uygulanacak petrilerdeki hücreleri bir bir hazır edilmiştir.

2.2.9 Senkronizasyon Deney Grupları

2.2.9.1 Kontrol Grubu

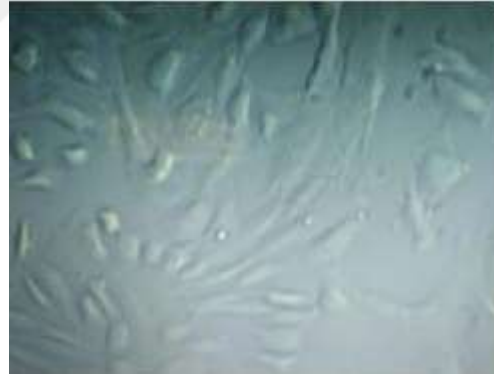
Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS (Sigma-F9665), %1 antibiyotik (Biochrom) ve %89 stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035) içeren DMEM/F12 besiyeriyle kültüre edilmiştir. Konfluent olmadan yani kültür kabını kaplamadan %50 konfluent (Şekil 2.26) olduğunda %0,25 Tripsin-EDTA (25200-056) ile kaldırılarak analiz için hazırlanmıştır. Kültür kabının konfluensisi mikroskopta gözle incelenerek belirlenmiş, kültür kabının yarı yarıya kaplayan kültürler %50 konfluent olarak kabul edilmiştir.



Şekil 2. 26 Kontrol Grubu Deney Örneği

2.2.9.2 Serum Açlığı 24 Saat

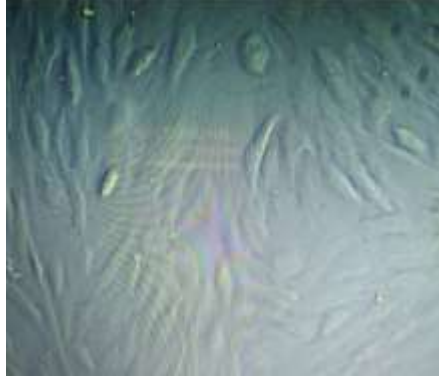
Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS (Sigma-F9665), %1 antibiyotik (Biochrom) ve %89 stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035) içeren DMEM/F12 besiyeriyle kültüre edilmiştir. Konfluent olmadan (%50 konfluent) medyum %0,5 FBS (Sigma-F9665), %1 antibiyotik (Biochrom) ve %98,5 stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035) içeren DMEM/F12 besiyeriyle değiştirmiştir. Bu düşük serumlu ortamda hücreler 24 saat kültüre (Şekil 2.27) edilmiştir. Sürenin sonunda hücreler %0,25 Tripsin-EDTA (25200-056) ile kaldırılarak analiz için hazırlanmıştır.



Şekil 2. 27 Serum Açlığı 24 Saat Deney Örneği

2.2.9.3 Serum Açlığı 72 Saat

Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS (Sigma-F9665), %1 antibiyotik (Biochrom) ve %89 stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035) içeren DMEM/F12 besiyeriyle kültüre edilmiştir. Konfluent olmadan (%50 konfluent) medyum %0,5 FBS (Sigma-F9665), %1 antibiyotik (Biochrom) ve %98,5 stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035) içeren DMEM/F12 besiyeriyle değiştirmiştir. Bu düşük serumlu ortamda hücreler 72 saat kültüre (Şekil 2.28) edilmiştir. Sürenin sonunda hücreler %0,25 Tripsin-EDTA (25200-056) ile kaldırılarak analiz için hazırlanmıştır.



Şekil 2. 28 Serum Açlığı 72 Saat Deney Örneği

2.2.9.4 Konfluent 24 Saat – Erken Konfluent

Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS (Sigma-F9665), %1 antibiyotik (Biochrom) ve %89 stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035) içeren DMEM/F12 besiyeriyle kültüre edilmiştir. Konfluent olmaları yani kültür kabını tamamen kaplaması sağlanmıştır. %10 FBS (Sigma- F9665), %1 antibiyotik (Biochrom) ve %89 stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035) içeren DMEM/F12 besiyeri tazelenmiştir. Bu ortamda hücreler 24 saat kültüre (Şekil 2.29) edilmiştir. Sürenin sonunda hücreler %0,25 Tripsin-EDTA (25200-056) ile kaldırılarak analiz için hazırlanmıştır.



Şekil 2. 29 Konfluent 24 Saat Deney Örneği

2.2.9.5 Konfluent 72 Saat – Geç Konfluent

Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS (Sigma-F9665), %1 antibiyotik (Biochrom) ve %89 stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035) içeren DMEM/F12 besiyeriyle kültüre edilmiştir. Konfluent olmaları yani kültür kabını tamamen kaplaması sağlanmıştır. %10 FBS (Sigma- F9665), %1 antibiyotik (Biochrom) ve %89 stok DMEM/F12 (Gibco-32500-035) içeren DMEM/F12 besiyeri tazelenmiştir. Bu ortamda hücreler 24 saat kültüre (Şekil 2.30) edilmiştir. Sürenin sonunda hücreler %0,25 Tripsin-EDTA (25200-056) ile kaldırılarak analiz için hazırlanmıştır.

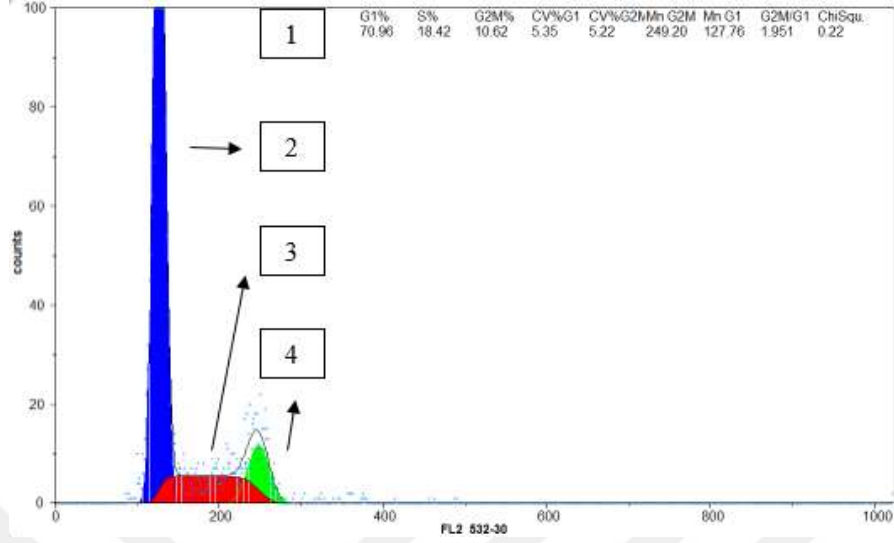


Şekil 2. 30 Konfluent 72 Saat Deney Örneği

2.2.10 Hücre Siklus Analizi

Pasaj 5 ve pasaj 15 te ki koyun ve sığır granüloza hücrelerinin 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde senkronizasyon işlemleri ve süresi tamamlandıktan sonra laminer flow kabininde içerisinde sıcaklığı su banyosu kullanılarak 37°C getirilen % 10 FBS ve % 1 antibiyotik ve %89 stok DMEM/F-12 içeren DMEM/F12 besiyeri, DPBS ve tripsin hazır edilmiştir. Petri kapları laminer flow kabinin içine alındıktan sonra vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücrelerin üzerindeki besi yeri çekilmiştir. Hücrelerin üzerine 5 ml DPBS yavaşça dökülerek yıkanması sağlanmıştır. DPBS te yine besi yeri gibi vakum pompası kullanılarak hücrelerin üzerinden uzaklaştırılmıştır. Hücreler üzerine otomatik pipet yardımıyla 60 mm'lik petri kabının bütün yüzey alanını kaplayacak şekilde 500 µl tripsin koyulduktan sonra 5 dakika 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında laminer flow kabin içerisinde 15 ml'lik falkon tüplerine 3 ml DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. İnkübasyonsüresi sona erdiğinde petri kapları ısısını fazla kaybetmemesi için 37°C olan ısıtıcı tablanın üzerine bırakılmıştır. Hızlıca inverted mikroskopta hücrelerin kalkıp- kalkmadığı kontrol edilmiştir. Eğer hücreler kalkmamış ise petri kaplarının yanlarından mekanik kuvvet uygulanarak kalkması sağlanmıştır. Hemen laminer flow kabinin içerisine alınarak, tripsin etkisini inhibe etmek amacıyla üzerine 1 ml DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. 60 mm'lik petri içerisindeki hücreler pipetlenerek tek hücre haline getirilmesi sağlandıktan sonra hazırlanan falkon tüpüne aktarılmıştır. Falkon tüp içerisindeki hücreler 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında kabin içerisinde falkon tüpte hücrelerin üst kısmındaki süpernatant kısım vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücre yığını olan peletin zarar görmemesine dikkat ederek çekilmiştir. Üzerine 1 ml soğuk DPBS dökülerek yıkaması sağlandıktan sonra tekrar 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. 1 ml DPBS ile sulandırıldıktan sonra 3 ml soğuk %70 lik etanol ilave ettikten sonra +4°C de 20 dk bekletilerek fikse edilmesi sağlanmıştır. Bekleme sonrasında 500 µl DPBS, 5 µl RNase A, 5 µl triton X100 ve 10 µl PI eklenerek 37°C inkübatrde 30 dk bekletilmiştir. Ardından flowsitometre

tüplerine aktarılmış, üzeri ışık almaması için alüminyum folyo ile sarılarak Flow Sitometre cihazında analiz (Şekil 2.31) edilmiştir.



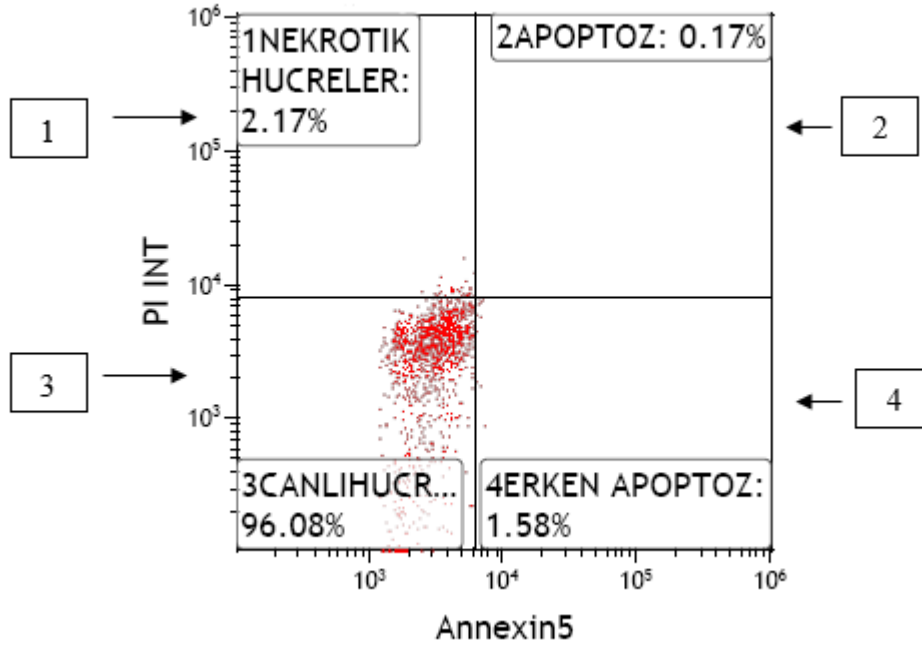
Şekil 2. 31 Hücre Döngüsü (Siklus) Analiz Sonucu Görüntüsü

1. Bölge; Fazlara göre hücrelerin yüzdeleri,
2. Bölge; G0/ G1 fazındaki hücreler,
3. Bölge; S fazındaki hücreler,
4. Bölge; G2/ M fazındaki hücreler

2.2.11 Hücrede Apoptozis ve Nekrozis Analizi

Pasaj 5 ve pasaj 15 te ki koyun ve sığır granüloza hücrelerinin 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde senkronizasyon işlemleri ve süresi tamamlandıktan sonra laminar flow kabininde içerisinde sıcaklığı su banyosu kullanılarak 37°C getirilen % 10 FBS ve % 1 antibiyotik ve % 89 stok DMEM/F-12 içeren DMEM/F12 besiyeri, DPBS ve tripsin hazır edilmiştir. Petri kapları laminar flow kabinin içine alındıktan sonra vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücrelerin üzerindeki besi yeri çekilmiştir. Hücrelerin üzerine 5 ml DPBS yavaşça dökülerek yıkanması sağlanmıştır. DPBS te yine besi yeri gibi vakum pompası kullanılarak hücrelerin üzerinden uzaklaştırılmıştır. Hücreler üzerine otomatik pipet yardımıyla 60 mm'lik petri kabının bütün yüzey alanını kaplayacak şekilde 500 µl tripsin koyulduktan sonra 5 dakika 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında laminar flow kabin içerisinde 15 ml'lik falkon tüplerine 3 ml DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. İnkübasyonsüresi sona erdiğinde petri kapları ısısını fazla kaybetmemesi için 37°C olan ısıtıcı tablanın üzerine bırakılmıştır. Hızlıca inverted mikroskopta hücrelerin kalkıp- kalkmadığı kontrol edilmiştir. Eğer hücreler kalmamış ise petri kaplarının yanlarından mekanik kuvvet uygulanarak kalması sağlanmıştır. Hemen laminar

flow kaninin içerisinde alınarak, tripsin etkisini inhibe etmek amacıyla üzerine 1 ml DMEM/F12 besi yeri konulmuştur. 60 mm'lik petri içerisindeki hücreler pipetlenerek tek hücre haline getirilmesi sağlandıktan sonra hazırlanan falkon tüpüne aktarılmıştır. Falkon tüp içerisindeki hücreler 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında kabin içerisinde falkon tüpte hücrelerin üst kısmında ki süpernatant kısım vakum pompası kullanılarak cam pastör pipet yardımıyla hücre yığına olan peletin zarar görmemesine dikkat ederek çekilmiştir. Üzerine 1 ml soğuk DPBS dökülerek yıkaması sağlandıktan sonra tekrar 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Karanlık ortamda 195µl Binding Buffer ve 5 µl Annexin eklenerek 10 dk inkübatörde inkübe edilmiştir. Ardından 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek supernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. 190 µl Binding Buffer eklenip pipetleme yapılarak homojen karışması sağlandıktan sonra 5 µl RNase A ve 10 µl propidium iodide (PI) eklenmiştir. İnkübatörde 10 dk bekletildikten sonra santrifüj edilerek supernatant atılmıştır. Son olarak 500 µl DPBS ile sulandırıp homojen karışması sağlanmasının ardından flow sitometre tüplerine aktarılmış, üzeri ışık almaması için alüminyum folyo ile sarılarak Flow Sitometre cihazında analiz (Şekil 2.32) edilmiştir.



Şekil 2. 32 Hücrede Apoptozis ve Nekrozis Analiz Sonucu Görüntüsü Koyun Geç (15th) Pasaj Kontrol Grubu

1. Bölge; nekrotik hücreler (Annexin-V negatif, PI pozitif)
2. Bölge; geç apoptotik hücreler (Annexin-V pozitif, PI pozitif)
3. Bölge; canlı hücreler (Annexin-V negatif, PI negatif)
4. Bölge; erken apoptotik hücreler (Annexin-V pozitif, PI negatif)

2.2.12 İstatistiksel Analizler

Çalışmada her deney grubunun hem siklus hem de canlılık analizleri üç tekrarlamalı olarak incelenmiştir. Elde edilen verilere tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) testi uygulanmış ve deney gruplarına ait ortalamalar arasındaki fark Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir ($P<0.05$) . İstatistiksel analizlerin tamamı SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılarak yapılmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Hücre döngüsü üzerinde konfluent ve serum açlığının etkisini değerlendirmek için flow sitometre cihazıyla DNA içeriği ölçüldü. Hücre döngüsü yeni başlayan hücreler RNA ve protein sentezlerinin yoğun şekilde gerçekleştiği G1 fazında veya istirahat fazı olarak bilinen G0 fazında olabilmektedir. DNA içeriği olarak birbirinden farksız olan G0/G1 fazında bulunan hücrelerin DNA içeriği diploid (2n) ile ifade edilirken, G2 fazı çok kısa olduğundan M fazından ayırt edilemez ve bundan dolayı G2/M fazındaki hücrelerin DNA içeriği ise tetraploid (4n) ile ifade edilmektedir. S fazının başında diploid bir hücre her iki kromozomdan iki kopya içerirken, DNA sentezi sonrasında yani S fazının sonunda hücrenin DNA miktarı iki katına çıktığı için analiz aşamasında hücrelerin DNA içeriği diploid ile tetraploid (2n-4n) hücreler arasında belirlenmektedir. Flow sitometri cihazı yardımıyla PI ile boyanan hücrelerin yaydığı ışığın yoğunluğuna göre siklus fazlarının değerlerine ulaşılmaktadır (Hayes vd., 2005).

3.1 Sığır Hücreleri Hücre Siklus Analiz Değerleri

Erken ve geç pasaj sayısına ait sığır hücrelerinden elde edilen verilerle yapılan istatistiksel analizler sonucunda deney grupları arasında önemli farklılıklar olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). Aynı harfe sahip ortalamalar arasındaki fark tesadüften ileri gelmiştir ve istatistiksel olarak önemsizdir. Sonuçlar Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 de aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 3. 1 Sığır Hücrelerinde Erken (5th) Pasaj Hücre Siklus Analiz Sonuçları

Deney Grubu	G0/G1(%)	S (%)	G2/M (%)
Kontrol	68,22±1,37 c	20,39±1,58 a	11,39±0,22 b
Konfluent 24	82,00±1,33 b	6,21±0,26 b	11,78±1,58 b
Konfluent 72	83,29±3,30 b	3,02±1,00 c	13,69±2,30 b
Serum 24	92,75±0,36 a	0,84±0,30 c	6,41±0,45 b
Serum 72	86,27±0,80 b	2,27±0,37 c	11,46±0,43 a

Erken (5th) pasaj sığır hücrelerindeki tüm deney gruplarında (Çizelge 3.1), G0/G1 oranı kontrol grubundan önemli derecede yüksek bulunmuştur. Konfluent gruplar ve 72 saat serum açlığı grubu sonuçları birbirine benzer bulunurken, en yüksek G0/G1 oranı 24 saat serum açlığı grubundan elde edilmiştir ($P < 0.05$).

Çizelge 3. 2 Sığır Hücrelerinde Geç (15th) Pasaj Hücre Siklus Analiz Sonuçları

Deney Grubu	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Kontrol	76,02±0,25 d	3,82±0,15 a	20,15±0,40 a
Kontakt 24	79,72±0,23 c	1,62±0,51 b	18,65±0,28 a
Kontakt 72	78,69±1,60 c	1,61±0,36 b	19,70±1,75 a
Serum 24	88,80±0,11 a	0,47±0,13 c	11,39±0,73 b
Serum 72	85,63±0,92 b	1,86±0,37 b	12,49±0,75 b

Geç (15th) pasaj sığır hücrelerindeki tüm deney gruplarında (Çizelge 3.2), G0/G1 oranı kontrol grubundan önemli derecede yüksek bulunmuştur. Konfluent grupların sonuçları arasındaki fark önemsiz bulunurken, serum açlığı gruplarının oranları konfluent gruplardan önemli derecede yüksek bulunmuştur (P<0.05). En yüksek G0/G1 oranı 24 saat serum açlığı uygulamasından elde edilmiştir.

Sığır kumulus hücreleri ile yapılan daha önceki bir çalışma 2 gün sonunda %60-70 konfluent olan kontrol grubunun yanında 5 gün boyunca düşük serum kültüründe bekletilen serum açlığı ve 2 hafta boyunca kültürde bekletilen konfluent gruplarının oluşturduğu deney gruplarından oluşmuştur. Bu çalışmada benzer sonuç veren uygulama gruplarında G0/G1 oranları sırasıyla %91.1, %92.6 olarak kontrol grubundan (%70.5) yüksek bulunmuştur (Cheong, Park, Ikeda ve Takahashi, 2003). Ayrıca 5. pasajdaki sığır granüloza hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada 4 günlük konfluent grup ile 24 ve 72 saat serum açlığının uygulandığı deney grupları oluşturulmuş, benzer şekilde birbirine yakın değer veren deney gruplarının G0/G1 oranları sırasıyla %85.65, %81,78, %91.34 olarak tespit edilmiş ve kontrol grubundan (%42) yüksek bulunmuştur (Hayes vd., 2005). Mevcut çalışmada erken (5th) pasaj sığır hücrelerinde G0/G1 oranları 24/72 saat konfluent gruplarında sırası ile %82.00, %83.29, 24/72 saat serum açlığı gruplarında sırasıyla %92.75, %86.27 olarak tespit edilmiş ve kontrol grubundan (%68.22) yüksek bulunmuştur. Ancak iki konfluent grup ile 72 saat serum açlığı grupları arasındaki farkın istatistik önemi olmadığı tespit edilmiştir. Geç (15th) pasaj sığır hücrelerinde ise G0/G1 oranları 24/72 saat konfluent gruplarında sırasıyla %79.72, %78.69, 24/72 saat serum açlığı gruplarında ise %88.80, %85.63 olarak tespit edilmiş ve tüm sonuçlar kontrol grubundan (%76.02) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Serum açlığı uygulaması sonuçları elde edilen G0/G1 oranı konfluent gruplardan elde edilenlerden anlamlı derecede daha yüksek olmuştur (P<0.05). Mevcut çalışma ile daha önceki çalışmalar genel olarak karşılaştırıldığında uygulamalar sonucu elde edilen G0/G1 oranları benzerlik göstermektedir. Sığırlarda erken ve geç pasaj hücrelerinin birlikte incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak domuzlarda erken (5th) ve geç (15th) pasaj fibroblast

hücrelerinde farklı sürelerde serum açlığı uygulaması yapılmış, mevcut çalışmadan farklı olarak en iyi sonuçların geç pasaj hücrelerinden elde edildiği bildirilmiştir (Goissis vd., 2007). Bu ve mevcut çalışmadaki fark hücre tipi ve hayvan türü farklılığından kaynaklanmış olabilir.

3.2 Koyun Hücresi Siklus Analiz Değerleri

Erken ve geç pasaj sayısına ait koyun hücrelerinden elde edilen verilerle yapılan istatistiksel analizler sonucunda deney grupları arasında önemli farklılıklar olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Aynı harfe sahip ortalamalar arasındaki fark tesadüften ileri gelmiştir ve istatistiksel olarak önemsizdir. Sonuçlar Çizelge 3.3, Çizelge 3.4 te aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 3. 3 Koyun Hücrelerinde Erken (5th) Pasaj Hücre Siklus Analiz Sonuçları

Deney Grubu	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Kontrol	73,67±0,12 d	14,41±1,07 a	11,92±1,17 b
Konfluent 24	79,42±1,25 cd	1,79±0,62 b	18,78±1,43 a
Konfluent 72	87,58±4,11 b	1,48±0,60 b	10,94±3,53 b
Serum 24	86,20±1,97 bc	1,70±0,34 b	12,11±1,75 b
Serum 72	96,16±0,89 a	0,39±0,17 b	3,45±0,78 c

Erken (5th) pasaj koyun hücrelerindeki 72 saat konfluent ve 24/72 saat serum açlığı gruplarında (Çizelge 3.3), G0/G1 oranı kontrol grubundan önemli derecede yüksek bulunmuştur. En yüksek G0/G1 oranı 72 saat serum açlığı grubundan elde edilmiştir ($P<0.05$).

Çizelge 3. 4 Koyun Hücrelerinde Geç (15th) Pasaj Hücre Siklus Analiz Sonuçları

Deney Grubu	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Kontrol	76,97±1,06 c	7,22±0,97 a	15,81±1,67 a
Konfluent 24	82,74±0,62 ab	3,37±0,46 b	13,90±1,00 a
Konfluent 72	81,32±0,39 b	2,08±0,51 bc	16,60±0,74 a
Serum 24	83,02±0,78 ab	0,39±0,25 c	16,59±0,59 a
Serum 72	84,51±0,39 a	0,81±0,32 c	14,69±0,34 a

Geç (15th) koyun sığır hücrelerindeki tüm deney gruplarında (Çizelge 3.4), G0/G1 oranı kontrol grubundan önemli derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Tüm uygulama grupları birbirine çok yakın sonuçlar vermiştir.

Koyun 5. pasaj granüloza hücreleriyle yapılan bir çalışmada %70-80 konfluent olan kontrol grubu, %100 konfluent grubu ve 24 saat ve 72 saat serum açlığı deney grupları bulunmaktadır.

İstatiksel olarak benzer sonuçlar veren konfluent grup ile 24/72 saat serum açlığı deney gruplarının G0/G1 oranları sırasıyla, %72.6, %75.4, %90.7 olarak tespit edilmiş ve kontrol grubundan (%56.1) yüksek bulunmuştur (Sadeghian-Nodoushan vd., 2014). Mevcut çalışmada ise erken (5th) pasaj koyun hücrelerinde G0/G1 oranları 24/72 saat konfluent gruplarında sırasıyla %79.42, %87.58, 24/72 saat serum açlığı gruplarında sırasıyla %86.20, %96.16 olarak tespit edilmiştir. Deney gruplarından 72 saat konfluent ve 24/72 saat serum açlığı grupları kontrol grubundan (%73.67) yüksek bulunmuştur. Ancak 72 saat serum açlığından hariç diğer deney grupları arasındaki farkın istatistik önemi olmadığı tespit edilmiştir. Geç (15th) pasaj koyun hücrelerinde ise G0/G1 oranları 24/72 saat konfluent gruplarında sırasıyla %82.74, %81.32, 24/72 saat serum açlığı gruplarında ise sırasıyla %83.02, %84.51 olarak tespit edilmiş ve tüm sonuçlar kontrol grubundan (%76.97) yüksek bulunmuştur. Mevcut çalışma ile koyun 5. pasaj granüloza hücreleriyle yapılan çalışma (Sadeghian-Nodoushan vd., 2014) karşılaştırıldığında mevcut çalışmada G0/G1 oranlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Sığırlarda olduğu gibi koyunlarda da erken ve geç pasaj hücrelerinin birlikte incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Domuz (Goissis vd., 2007) erken ve geç pasaj hücrelerinde serum açlığı uygulaması yapılan çalışmada geç pasaj hücrelerinin daha iyi senkronize edildiği bildirilmesine rağmen mevcut çalışmada erken ve geç pasaj hücrelerine serum açlığı uygulamasının verdiği cevapta böyle bir fark tespit edilmemiştir.

3.3 Sığır Hücreleri Apoptoz ve Nekroz Analiz Değerleri

Sığır granüloza erken/geç (5th/15th) pasaj hücreleri tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücrelerin Apoptoz/Nekroz Analizleri yapılmıştır. Erken ve geç pasaj sayısına ait sığır hücrelerinden elde edilen verilerle yapılan istatistiksel analizler sonucunda deney grupları arasında önemli farklılıklar olduğu görülmektedir. (P<0.05) Aynı harfe sahip ortalamalar arasındaki fark tesadüften ileri gelmiştir ve istatistiksel olarak önemsizdir. Sonuçlar Çizelge 3.5, Çizelge 3.6 da aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 3. 5 Sığır Hücrelerinde Erken (5th) Pasaj Apoptoz/Nekroz Analiz Sonuçları

Deney Grup No	Nekrotik Hücreler (%)	Geç Apoptotik Hücreler (%)	Canlı Hücreler (%)	Erken Apoptotik Hücreler (%)
Kontrol	1,57±0,25 b	0,15±0,05 a	97,57±0,33 a	0,70±0,03 c
Kontakt 24	2,29±0,30 ab	0,21±0,18 a	95,37±0,30 b	2,13±0,23 a
Kontakt 72	3,24±0,82 a	0,20±0,01 a	95,58±0,81 b	0,97±0,10 c
Serum 24	3,63±0,13 a	0,12±0,04 a	95,00±0,62 b	1,25±0,56 ab
Serum 72	3,22±0,50 a	0,24±0,03 a	95,15±0,07 b	1,38±0,49 ab

Erken (5th) pasaj sığır hücrelerindeki tüm deney gruplarında (Çizelge 3.5), canlılık oranı çok yüksek olmamakla birlikte kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. En yüksek nekrotik hücre oranları 72 saat konfluent, 24/72 saat serum açlığı gruplarında tespit edilmiştir. Tüm grupların geç apoptotik hücre oranları kontrol ile benzerdir (P<0.05). En yüksek erken apoptotik hücre oranı 24 konfluent, 24/72 serum açlığı gruplarında tespit edilmiştir.

Çizelge 3. 6 Sığır Hücrelerinde Geç (15th) Pasaj Apoptoz/Nekroz Analiz Sonuçları

Deney Grup No	Nekrotik Hücreler (%)	Geç Apoptotik Hücreler (%)	Canlı Hücreler (%)	Erken Apoptotik Hücreler (%)
Kontrol	1,97±0,26 d	0,29±0,01 b	95,32±0,16 a	2,42±0,21 ab
Kontakt 24	3,35±0,13 c	0,44±0,15 ab	94,80±0,19 a	1,42±0,14 b
Kontakt 72	3,08±0,04 c	0,58±0,21 ab	93,61±0,20 b	2,72±0,37 a
Serum 24	4,28±0,06 b	0,24±0,06 b	93,67±0,15 b	1,81±0,03 ab
Serum 72	6,46±0,13 a	1,13±0,43 a	90,52±0,17 c	1,90±0,56 ab

Geç (15th) pasaj sığır hücrelerindeki tüm deney gruplarında (Çizelge 3.6), canlılık oranı aradaki fark çok yüksek olmamakla birlikte 24 saat konfluent grup hariç kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Tüm gruplarda nekrotik hücre oranı kontrol grubundan yüksek bulunmuş, en yüksek nekrotik hücre oranları 24/72 saat serum açlığı gruplarında tespit edilmiştir. Erken ve geç apoptotik hücre oranları bakımından kontrol grubu da dahil olmak üzere gruplar arasında çok büyük farklılıklar bulunmamıştır (P<0.05).

Genel bir değerlendirme yapılacak olursa; bu çalışmada sığır erken (5th) pasaj granüloza hücrelerinde tüm uygulama gruplarında birbirine benzer şekilde canlı hücre oranı kontrol grubundan düşük bulunurken, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranları tüm deney grupları benzer bulunmuştur. Erken apoptotik hücre oranları ise 24 saat konfluent, 24/72 saat serum açlığı gruplarında benzer iken 72 saat konfluent grupta bu oran kontrol gruba benzer bulunmuştur. Erken (5th) pasaj sığır hücrelerinin nekrotik hücre oranları % 2.29-% 3.63 arasında, toplam apoptotik hücre oranları ise % 1.17-% 2.34 arasında değişmiştir. Erken (5th) pasaj sığır hücrelerinin en iyi senkronizasyon seçiminde deney grupları arasında canlı hücre oranları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmadığından, en yüksek G0/G1 oranına (% 92.75) sahip ve istatistiksel olarak ayrı bir grup içinde yer alan 24 saat serum açlığı grubu seçilebilir. Sığır geç (15th) pasaj granüloza hücrelerinde canlı hücre oranları 24 saat konfluent ile gruba kontrol grubunda ve 72 saat konfluent grup ile 24 saat serum açlığı grubunda benzer bulunurken, en düşük canlı hücre oranı 72 saat serum açlığı grubunda tespit edilmiştir. Nekrotik hücre oranlarında konfluent gruplar arasında fark bulunmazken, tüm deney gruplarında nekrotik hücre oranı kontrol grubundan yüksek bulunmuştur.

En yüksek nekrotik hücre oranı ise 72 saat serum açlığı grubundan tespit edilmiştir. Erken ve geç apoptotik hücre oranları ise kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm deney gruplarında benzer bulunmuştur. Geç (15th) pasajsız sığır hücrelerinin nekrotik hücre oranlarının %3.08-%6.46 arasında, toplam apoptotik hücre oranları %1.86-%3.3 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Sığır hücrelerinin (2-6 pasaj) serum açlığı, konfluensi, roskovitin uygulamaları ile senkronize edildiği daha önceki bir çalışmada canlılık (Eren, 2015) üzerine uygulamaların benzer etkiler oluşturduğu ve toplam erken geç apoptotik hücre oranının %0.59-%2.01 arasında, nekrotik hücre oranlarının %0.63-%5.83 arasında değiştiği bildirilmiştir. Erken/geç (5th/15th) sığır hücrelerin de uygulama gruplarındaki canlı hücre oranı düşüklüğünün apoptotik hücrelerden ziyade nekrotik hücre oranlarından kaynaklandığı değerlendirilmektedir. Canlılık oranları da dikkate alınarak geç pasaj sığır hücrelerinde en iyi senkronizasyon uygulaması en yüksek G0/G1 oranına (%88.80) sahip 24 saat serum açlığı olarak değerlendirilebilir.

3.4 Koyun Hücresi Apoptoz ve Nekroz Analiz Değerleri

Koyun granüloza erken/geç (5th/15th) pasaj hücreleri tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücrelerin Apoptoz/Nekroz Analizleri yapılmıştır. Erken ve geç pasaj sayısına ait koyun hücrelerinden elde edilen verilerle yapılan istatistiksel analizler sonucunda deney grupları arasında önemli farklılıklar olduğu görülmektedir (P<0.05). Aynı harfe sahip ortalamalar arasındaki fark tesadüften ileri gelmiştir ve istatistiksel olarak önemsizdir. Sonuçlar Çizelge 3.7, Çizelge 3.8 de aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 3. 7 Koyun Hücrelerinde Erken (5th) Pasaj Apoptoz/Nekroz Analiz Sonuçları

Deney Grup No	Nekrotik Hücreler (%)	Geç Apoptotik Hücreler (%)	Canlı Hücreler (%)	Erken Apoptotik Hücreler (%)
Kontrol	1,10±0,11 d	0,07±0,01 b	98,36±0,12 a	0,47±0,003 d
Kontakt 24	3,55±0,02 b	0,54±0,14 a	93,49±0,03 d	2,42±0,15 bc
Kontakt 72	4,47±0,20 a	0,82±0,13 a	91,11±0,26 e	3,60±0,22 a
Serum 24	1,41±0,10 d	0,06±0,003 b	96,85±0,16 b	1,69±0,10 c
Serum 72	2,62±0,28 c	0,21±0,10 b	94,29±0,39 c	2,88±0,62 ab

Erken (5th) pasaj koyun hücrelerindeki deney gruplarında (Çizelge 3.7), canlılık oranları kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Tüm gruplarda nekrotik hücre oranı kontrol grubundan yüksek bulunmuş, en yüksek nekrotik hücre oranları 24/72 saat konfluent gruplarında tespit edilmiştir. En yüksek geç apoptotik hücre oranları 24/72 konfluent gruplarında elde edilmiştir. Tüm gruplarda erken apoptotik hücre oranı kontrol grubundan yüksek bulunmuş, en yüksek erken

apoptatik hücre oranları 72 saat konfluent ve 72 saat serumaçlığında bulunmuştur (P<0.05).

Çizelge 3. 8 Koyun Hücrelerinde Geç (15th) Pasaj Apoptoz/Nekroz Analiz Sonuçları

Deney Grup No	Nekrotik Hücreler (%)	Geç Apoptotik Hücreler (%)	Canlı Hücreler (%)	Erken Apoptotik Hücreler (%)
Kontrol	2,23±0,14 c	0,14±0,02 a	96,30±0,11 a	1,34±0,17 d
Kontakt 24	2,70±0,31 c	0,48±0,24 a	94,69±0,18 b	2,13±0,40 bc
Kontakt 72	5,44±0,34 a	0,21±0,13 a	92,68±0,56 d	1,66±0,20 bc
Serum 24	2,37±0,36 c	0,34±0,07 a	94,02±0,08 bc	3,27±0,25 a
Serum 72	3,75±0,14 b	0,27±0,14 a	93,57±0,21 cd	2,41±0,10 b

Geç (15th) pasaj koyun hücrelerindeki deney gruplarında (Çizelge 3.8) canlılık oranları kontrol grubuna göre düşük bulunmuş ve birbirine çok yakın sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek nekrotik hücre oranları 72 saat konfluent ve 72 saat serum açlığı gruplarında tespit edilmiştir. Geç apoptotik hücre oranları bakımından kontrol grubunda dahil olmak üzere gruplararası çok büyük farklılıklar bulunmamıştır. Tüm gruplarda erken apoptotik hücre oranı kontrol grubundan yüksek bulunmuş, en yüksek erken apoptotik hücre oranları 24 saat serum açlığında bulunmuştur (P<0.05).

Genel bir değerlendirme yapılacak olursa; bu çalışmada koyun erken (5th) pasaj granüloza hücrelerinde tüm grupların canlı hücre oranları birbirinden farklı ve kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Nekrotik hücre oranlarında kontrol grup ile 24 saat serum açlığı grupları benzer bulunurken, diğer uygulama gruplarından farklı bulunmuştur. Geç apoptotik hücre oranlarında konfluent gruplar kendi aralarında benzer bulunurken, serum açlığı grupları ve kontrol grubu arasında bir fark bulunmamıştır. Uygulama gruplarının erken apoptotik hücre oranları birbirleri ile benzer ve kontrol grubundan yüksek olarak tespit edilmiştir. Erken (5th) pasaj koyun hücrelerinin nekrotik hücre oranları %1.41-%4.47 değerleri arasında, toplam apoptotik hücre oranları %1.75-%4.42 değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. Koyun granüloza hücreleri (5. pasaj) ile yapılan başka bir çalışmada (Sadeghian-Nodoushan vd., 2014) konfluent grupta apoptotik hücre oranı %4.8, serum açlığı gruplarında ise %5.2 ve %6.5 olarak tespit edilmiş, bu oranlar kontrol grubundan (%2.9) yüksek bulunmuştur. Mevcut çalışmada erken (5th) pasaj koyun hücrelerinin en iyi senkronizasyon seçiminde canlı hücre oranlarına da dikkat ederek en yüksek G0/G1 oranına (%96.16) sahip ve istatistiksel olarak ayrı bir grup içerisinde yer alan 72 saat serum açlığı seçilebilir. Koyun geç (15th) pasaj granüloza hücrelerinde yapılan uygulama gruplarının hücre canlılık oranları ve erken apoptotik hücre oranları kontrol grubundan farklı ve birbiriyle benzer bulunmuştur. Nekrotik hücre oranları 24 saat konfluent ve 24 saat serum açlığı, kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. Geç apoptotik hücre oranları ise tüm deney gruplarında benzer bulunmuştur. Geç

(15th) pasaj koyun hücrelerinin nekrotik hücre oranları %2.37-%5.44 arasında, toplam apoptotik hücre oranları %1.87-%3.61 arasında bulunmuştur. Sığır hücre ile yapılan uygulamalarda olduğu gibi erken/geç (5th/15th) koyun hücrelerindeki uygulamalarda da canlı hücre oranlarındaki azalmanın apoptotik hücre oranlarından çok nekrotik hücre oranlarından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak geç (15th) pasaj koyun hücrelerinin deney gruplarında G0/G1 oranları ve hücre canlılık oranları arasında farklılık tespit edilmemiştir.



4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan mevcut çalışmada sığır ve koyun erken/geç pasaj hücrelerinin analiz bulgularına göre 24/72 saat konfluent hücrelerde G0/G1 oranlarının %78.69-%87.58 arasında, 24/72 saat serum açlığı uygulanan hücrelerde G0/G1 oranlarının %83.02-%96.16 arasında değiştiği ve kontrol grubundan (%68.22-%76.97) yüksek olduğu bulunmuştur. Genel olarak bakıldığında çalışma sonuçlarının benzer hücre tipleri ile yapılan daha önceki çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğu değerlendirilmiştir. Sığır ve koyun erken/geç pasaj hücrelerinde 24/72 saat konfluent ve serum açlığı uygulanan deney gruplarının G0/G1 değerleri kontrol deney grupları değerlerinden yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar uygulama gruplarının hepsinin senkronizasyon işleminde başarılı olduğunu göstermektedir.

Sığır erken (5th) pasaj konfluent G0/G1 oranı %82.00-%83.29, serum açlığı G0/G1 oranı %86.27-%92.75 arasında iken geç (15th) pasaj konfluent G0/G1 oranı %78.69-%79.72, serum açlığı G0/G1 oranı %85.63-%88.80 arasında bulunmuştur. Koyun erken (5th) pasaj konfluent G0/G1 oranı %79.42-%87.58, serum açlığı G0/G1 oranı %86.20-%96.16 arasında iken geç (15th) pasaj konfluent G0/G1 oranı %81.32-%82.74, serum açlığı G0/G1 oranı %83.02-%84.51 arasında tespit edilmiştir. Koyun erken (5th) pasaj hariç sığır erken/geç (5th/15th) pasaj ve koyungeç (15th) pasaj da serum açlığı G0/G1 değerleri konfluent G0/G1 değerlerinden daha yüksek tespit edilmiştir. Bundan dolayı serum açlığı konfluent yöntemine göre daha iyi senkronizyon yapmaktadır.

Sığır ve koyun erken/geç (5th/15th) pasaj analiz bulgularında erken ve geç apoptotik hücrenin toplam oranının %1.17-%4.42 değerleri arasında değiştiği, nekroz hücrelerinin ise %1.41-%6.46 değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. Genel olarak apoptotik ve nekrotik hücre oranları karşılaştırıldığında apoptotik hücre oranının daha düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuç uygulamaların hücre canlılığı üzerine olumsuz etkisinin DNA hasarlı kaynaklı apoptozdan ziyade hücrelere muamele (hücre açma/dondurma/pasajlama, tripsinleme, pipetleme, sıcaklık, pH vb) sırasında sebep olunan nekrozdan kaynaklı olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına bakılarak sığır hücrelerinde erken pasajda G0/G1 oranı %92.75 değeriyle en yüksek olan 24 saat serum açlığı uygulaması, geç pasajda ise G0/G1 oranı %88.80 değeriyle en yüksek olan 24 saat serum açlığı uygulaması, koyun hücrelerinde erken pasajda G0/G1 oranı %96.16 değeriyle en yüksek olan 72 saat serum açlığı uygulaması seçilebilir. Geç pasajda ise G0/G1 oranları bakımında uygulama grupları arasında bir fark bulunmamıştır.

Takip eden yeni çalışmalarda önerilen uygulamalarla senkronize edilen hücrelerin nükleer transferde kullanılması uygulamaların embriyoların gelişimi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi açısından faydalı olacaktır.



KAYNAKLAR

- Abacıoğlu, H., Arslantürk, A., Ayhan, F.Y., Berberoğlu, U., Ceyhan, İ., Çoşgun, Y., Demir, M., Demir, T., Doğan, Y., Turan, M., Özkütük, A., Furkan Sevindi, D., Sönmez, C. (2021). Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Laboratuvar Güvenliği Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı. Ankara. Erişim adresi https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/kurumsal/yayinlarimiz/rehberler/UMS-Laboratuvar_GAveliAi_Rehberi-2021_2_versiyon.pdf
- Aktuğ, H. (2014). Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Tıp Dergisi* 53, 60-64.
- Al-Meshal, I. A. (1987). Mitodepressive effect of (-)-cathinone, from *Catha edulis*, on the meristematic region of *allium cepa* root tips. *Toxicon* 4, 451–454.
- Anonim. (2013). Laboratuvar Hizmetleri Mikroskopik Sayım. T.C. Millî Eğitim Bakanlığı. Ankara. Erişim adresi http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Mikroskopik%20Say%C4%B1m.pdf
- Anonim. (2016). Vakum Filtrasyon ve Özgül Filtrasyon Direncinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü. Erişim adresi <https://cevre.erciyes.edu.tr/upload/LI6EPME5-vakum-filtrasyon.pdf>
- Anonim, (2017). Hücre zedelenmesi. Erişim adresi https://www.tusdapatoloji.com/index.php?option=com_content&view=article&id=162&catid=101&Itemid=1000
- Anonim. (2022). Passage number effects in cell lines. Technical Documents. Erişim adresi <https://www.atcc.org/-/media/resources/technical-documents/passage-number-effects-in-cell-lines.pdf>
- Anonim, (t.y). Cell cycle analysis assays. Erişim adresi <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cell-cycle.html>
- Arat, S., Caputcu, A.T, 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. *Reproduction, Fertility and Development*. 23: 1012-1023.
- Arat, S., Rzucidlo S. J., Gibbons, J., Miyoshi, K. ve Stice, S. L. (2001). Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulose cells into enucleated oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 60, 20-26.
- Arslan, G., Önkol, T., Özçelik, A.B. (2022). Siklin Bağımlı Kinaz 4/6 ve İnhibitörleri. Ankara Ecz. Fak. Derg., 46 (1) 193-208 194
- Azevedo, W. F., Leclerc, S., Meijer, L., Havlicek, I., Strnad, M. ve Kim, S. H. (1997). Inhibition of cyclin-dependent kinases by a purine analogs: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem*, 243:518–526.

- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Desrempes, M. M. Cammuso, C., Williams JL, Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P, Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W.G., Overstrom, E. ve W., Echelard, Y. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 17, 456-461.
- Banfalvi G., (2017) Cell cycle synchronization: *Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*
- Baumgarten, S. C., Stocco, C. (2018). Granulosa Cells. In M. K. Skinner (2rd Ed), Encyclopedia of Reproduction. vol. 2, pp. 8–13. Academic Press: Elsevier.
- Bostock, C. J., Prescott D. M. and Kirkpatrick. J. B. (1971). An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Experimental Cell Research*, 68:163-168.
- Boquest, A. C., Day, B. N. ve Prather, R. S. (1999). Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biology of Reproduction*, 60: 1013–1019.
- Cabadak, H. (2008). Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 9(3) : 51 - 61
- Campbell, H. K.S., Alberio, R. (2003). Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reproduction Supplement*, 61, 477-94.
- Campbell, K.H.S., Loi, P., Otaegui, P.J., Wilmot, I. (1996). Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Reviews of Reproduction* 1, 40–46.
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji*. 103-111 Erişim adresi <https://guncel.tgv.org.tr/journal/82/pdf/100641.pdf>
- Cheong, H.T., Park, T.M., Ikeda, K., Takahashi, Y. (2003). Cell cycle analysis of bovine cultured somatic cells by flow cytometry. *Japanese Journal of Veterinary Research* 512 95-103.
- Cho, S.R., Ock, S.A, Yoo, J.G., Mohana Kumar, B., Choe, S.Y., Rho, G.J. (2005). Effects of confluent, roscovitine treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts. *Reprod Dom Anim* 40, 171–176.
- Choresca, C. H., Koo, O. J., Hong, S. G., Oh, H. J., Gomez, D. K., Kim, J. H., Lee, B. C. ve Park, S. C. (2010). Effect of dimethyl sulfoxide on cell cycle synchronization of goldfish caudal fin derived fibroblasts cells. *Reprod Dom Anim* 45, e73–e77.
- 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*, Vol 280, 1256–1258.
- Dabanlı, D. (2011). *Echinops orientalis* trautv. bitkisinin kökünden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal ve antikanserijen etkisinin incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi), Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erciyes.
- Dağdeviren, T. (2021). Programlı hücre ölümü; Apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 120-135.

- Doğan, D. E. (2021). *İnsan Granüloza Hücresi Mitokondriyon Fonksiyonu ile AMH ve Östrojen İlişkisi* (Tıpta Uzmanlık Tezi). Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
- Esmer Duruel, H.E., Çağan, N.S., Işık, S., Kayhan, F.E. (2021). Hücre kültürlerine genel bakış. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 47(2), 136-149.
- Eren, A. (2015). *Çiftlik hayvanlarına ait fibroblast, kıkırdak, granüloza ve kas hücrelerinde immunohistokimyasal karakterizasyon ve hücre siklus analizleri* (Yüksek Lisans Tezi) Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Erkekoğlu, P., Baydar, T. (2021). Güncel in vitro sitotoksosite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45-63.
- Gedikli, S. (2013). *Melatoninin MCF-7 hücre kültüründeki apoptoz aktivasyonunun ve sitotoksitesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), mtt hücre canlılık testi ve immunsitokimya yöntemleriyle araştırılması* (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Gibbons, J., Arat,S., Rzcudlo, J., Miyoshi, M., Waltenburg, R., Respass, D., Venable, A., Stice, S. (2002). Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biology Of Reproduction* 66, 895–900
- Goissis, M. D., Caetano, H. V. A., Marques, M. G., Barros, F. R. O., Feitosa, W. B., Milazzotto, M. P., Binelli, M., Assumpc, M. A. ve Visintin, J. A. (2007). Effects of serum deprivation and cycloheximide on cell cycle of low and high passage porcine fetal fibroblasts. *Reprod Dom Anim*, 42, 660–663
- Grđina, D.J., Meistrich, M. L., Meyn, R.E., Johnson, T.S. ve White, R.A. (1984). Cellsynchrony techniques. I. A comparison of method. *Cell Tissue Kinet* 17,223-236.
- Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.
- Hayes, O., Ramos, B., Rodriguez, L. L., Aguilar, A., Badia, T., Castro, F. O. (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. *Animal reproduction science*, 87(3-4), 181-192.
- Kalender, S. M. (2020). *Ishikawa ve Huvec hücreleri ile oluşturulmuş sferoid mono-kültür ve sferoid ko-kültür modellerinin morfolojik ve imminohistokimyasal (e-kaderin ve betakatenin) olarak karşılaştırılması* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kanev, M. O., Gökalp Muranlı, F. D. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya University Journal of Science*, 20(1), 33-38.
- Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S. (2008). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(2), 1-18.

- Karaca, T. D. (2008). *İnsan meme kanseri hücre kültüründe nerium oleander bitkisinden elde edilen ekstraktların antikanserojen etkisinin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Kasinathan, P., Knott, J.G., Wang, Z., Jerry, D.J. ve Robl, J.M. (2001). Production of calves from G1 fibroblasts, *Nature Biotechnology*, 19, 1176–1178.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurosawa, K., Kato, J. Y., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. (1998). Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282, 2095–2098.
- Kato, Y., Tani, T., and Tsunoda, Y. (2000). Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil*, 120, 231–237.
- Khammanit, R., Chantakru, S., Kitiyanant, Y. ve Saikhun, J. (2008). Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts. *Theriogenology*, 70, 27–34
- Koçaklı, Z.G., Akıllıoğlu, Ayşe Doğan, A. (2015). Vasküler düz kas hücrelerinin izolasyonu ve kültürü. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24(3), 390-401.
- Ündar, L. (t.y.). Kan ve ilik işlenmesi, Kriyopreservasyonu, Depolanması ve Transportasyonu. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı. Erişim adresi <https://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/kanveilikislenmesi.pdf>
- Merrill, G. F. (1998). Cell synchronization. methods. *Methods in Cell Biology*. Vol. 57, 229–249.
- Mosca, P. J., Dijkwel, P. A. ve Hamlin, J. L. (1992). The plant amino acid mimosine may inhibit initiation at origins of replication in Chinese hamster cells. *Mol Cell Biol*, 12, 4375– 1483.
- Rieger, A.M., Hall, B.E., Luong, L.T., Schang, L.M., Barreda, D.R. (2010). Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. *Journal of Immunological methods* 358,81-92.
- Rieger, A.M., Nelson, K.L., Konowalchuk J.D., Barreda, D.R. (2011). Modified annexin v/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments* 50, e2597.
- Ross, M.H. (2016). A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology. *Histology*. 7th Edition.
- Sadeghian-Nodoushan, F., Eftekhari-Yazdi, P., Dalman, A., Eimani, H., Sepehri, H. (2014). Mimosine as well as serum starvation can be used for cell cycle synchronization of sheep granulosa cells. *Chinese Journal of Biology*, (7), 851736.
- Sağırkaya, H., & Bağış, H. (2003). Memeli embriyonlarının kriyoprezervasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(1-2-3), 127-135.
- Sala, F., Parisi, B., Burrone, D., Amileni, A. R., Pedrali-Noy, G. ve Spadari, S. (1980). Specific and reversible inhibition by aphidicolin in the alpha-like DNA polymerase of plant cells. *FEBS Lett*, 117, 93–98

- Serter, E. (2019). *Sığır ve koyundan elde edilen farklı tip hücrelerin dondurulmasında kriyo koruyucuların ve ısı değışikliklerinin hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Sevim Tüten, E., Arat, S. (2021). Combining Dimethyl Sulphoxide (DMSO) With Different Cryoprotectants Ensures Better Cartilage Cell Cryopreservation. *CryoLetters* 42(4), 220-226.
- Shynkar, V.V., Klymchenko, A.S., Kunzelmann, C., Duportail, G., Muller, C.D., Demchenko, A.P., Freyssine, J.M., Mely, Y. (2007). Fluorescent Biomembrane Probe For Ratiometric Detection Of Apoptosis. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(7):2187-2193.
- Sun, X. Z., Wang, S. H., Zhang, Y.H., Wang, H. P., Wang, L. L. ve Ying, L. L. (2008). Cell-cycle synchronization of fibroblasts derived from transgenic cloned cattle ear skin: effects of serum starvation, roscovitine and contact inhibition. *Zygote* 16 (2) 111–116
- Topçul, F. (2003). *He-La Hücrelerinde Dimetilsülfoksit (DMSO) ve karboplatin'in hücre proliferasyonu üzerinde etkileri* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ucbek, A. (2012). *Metforminin nöronal hücre kültüründe proliferasyon ve apoptosis üzerine etkisi* (Yüksek Lisans Tezi). Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bolu.
- Urakawa, M., Ideta, A., Sawada, T. ve Aoyagi, Y. (2004). Examination of modified cell synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells, *Theriogenology*, 62, 714–728.
- Ünal, M. S., Kabukçu, C. (2022). İnsan kumulus granüloza hücrelerinin izolasyonu. *Van Tıp Derg* 29(1): 84-89.
- Vacková, I., Engelová, M., Marinov, I., & Tománek, M. (2003). Cell cycle synchronization of porcine granulosa cells in G1 stage with mimosine. *Animal reproduction science*, 77(3-4), 235-245.
- Veraguas, D., Gallegos, P.F., Castro, F.O., Rodriguez-Alvarez, L. (2017). Cell cycle synchronization and analysis of apoptosis-related gene in skin fibroblasts from domestic cat (*Felis silvestris catus*) and kodkod (*Leopardus guigna*). *Reprod Dom Anim*. 2017;00:1–9.
- Wilmot, I., Schnieke, A., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810–81