

**ÇİFTLİK HAYVANLARINA AİT
FİBROBLAST, KIKIRDAK, GRANÜLOZA
VE KAS HÜCRELERİNDE
İMMUNOHİSTOKİMYASAL
KARAKTERİZASYON VE HÜCRE SIKLUS
ANALİZLERİ**

**Aysel EREN
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Rifat BİRCAN
2.Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT**

2015

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇİFTLİK HAYVANLARINA AİT FİBROBLAST, KIKIRDAK,
GRANÜLOZA VE KAS HÜCRELERİNDE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
KARAKTERİZASYON VE HÜCRE SİKLU ANALİZLERİ**

Aysel EREN

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Rifat BİRCAN

2.DANIŞMAN: Prof. Dr. Sezen ARAT

TEKİRDAĞ-2015

Her hakkı saklıdır.

Bu tez çalışması Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından NKUBAP.00.10.YL.13.08 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Rıfat BİRCAN ve Prof. Dr. Sezen ARAT danışmanlığında, Aysel EREN tarafından hazırlanan “Çiftlik hayvanlarına ait fibroblast, kıkırdak, GRANÜLOZA ve kas hücrelerinde immunohistokimyasal karakterizasyon ve hücre siklus analizleri ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Doç. Dr. Rıfat BİRCAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Sezen ARAT

İmza :

Üye : Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nadim YILMAZER

İmza :

Üye : Doç. Dr. Savaş GÜZEL

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇİFTLİK HAYVANLARINA AİT FİBROBLAST, KIKIRDAK, GRANÜLOZA VE KAS HÜCRELERİNDE İMMUNOHİSTOKİMYASAL KARAKTERİZASYON VE HÜCRE SIKLUS ANALİZLERİ

Aysel EREN

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Rıfat Bircan
2.Danışman: Prof. Dr. Sezen Arat

Nükleer transfer (NT) sonucu bir canlının klonlanması, yani genetik kopyasının oluşturulması modern biyoteknolojinin günümüzdeki en ileri noktası ve yardımcı üreme tekniklerinin en gelişmişidir. Bu teknoloji üstün genetik yapıya sahip veya hastalıklara dirençli bireylerin sayısını artırmak için kullanılabilir gibi, aynı zamanda sayıları gittikçe azalan lokal ırkların yok olma sınırından kurtarılması için de kullanılabilir. Ancak ilk klonun üretilmesinden bu yana birçok çalışma yapılarak teknoloji iyileştirilmeye çalışılmış olsa da, başarı yüzdesi halen istenilen seviyede değildir. Klon embriyosu ölümlerinin vücut hücrelerinin yetersiz yeniden programlanmasının sonucu olan dengesiz gen ekspresyonları sebebiyle meydana geldiği yaygın bir kanıdır. Donör nükleusun yeniden programlanmasında gerçekleşen bazı hataların klonlamadaki başarısızlıkların temel sebebi olduğu ileri sürülmektedir. Hücre programlanmasının ve dolayısıyla klonlama başarısının anahtar faktörlerinden biri donör hücre ile oositin arasındaki uyumdur. Bu nedenle NT'de en önemli basamak klonlanması istenen canlının hücresinin istenilen siklus dönemine getirilmesidir. Yapılan bu çalışmanın amacı, farklı türlere ait (sığır, koyun, keçi, manda) çiftlik hayvanlarından elde edilen farklı tipteki hücrelerin (deri fibroblastı, kas hücresi, kıkırdak hücresi, granüloza hücresi) immünohistokimyasal karakterizasyonunun yapılmasının ardından, değişik yöntemler kullanılarak (serum açlığı, kontak inhibisyon ve roskovitin) hücre siklusunun istenilen dönemine getirilmesini sağlamak (senkronizasyon), yöntemlerin hücre üzerinde meydana getirebileceği muhtemel zararlı etkileri belirlemek, en iyi sonuç veren ve en zararsız yöntemi tespit etmektir. Yapılan bu çalışmada immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak hücrelerin karakterizasyonu yapılmıştır. Senkronizasyon deneyleri sonucunda flow sitometre ile hücrelerin canlılık ve hücre siklusu analizleri yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, dört hayvan türünde klonlama çalışmalarında en az bir kez kullanılmış ve canlı doğum ile sonuçlanmış dört farklı hücre tipi için en yüksek G1/G0 oranı veren ve hücrelere en az zararlı olan bir veya birkaç hücre senkronizasyon seçeneği belirlenmiştir. Bu çalışma şimdiye kadar bu kadar farklı hücre tipinde farklı senkronizasyon yöntemlerinin denendiği ve aynı zamanda bu yöntemlerin hücre üzerindeki zararının analiz edildiği ilk çalışmadır. Ayrıca genetik kaynakların koruma programları kapsamına alınan dondurulmuş hücre bankalarında saklanacak hücreler de düşünülerek tüm uygulamalar hem taze hem de donmuş hücre kültürlerinde karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Sonuç olarak roskovitin uygulanan deney gruplarında senkronizasyon işleminde başarı elde edilememişken, konfluensi ve serum açlığı uygulanan gruplarda senkronizasyon sağlanmıştır. Senkronizasyonun en iyi gerçekleştiği ve hücre canlılığının en az etkilendiği grup ise serum açlığının uygulandığı deney grupları olmuştur.

Anahtar kelimeler: Hücre kültürü, hücre siklusu, hücre senkronizasyonu, immünohistokimyasal karakterizasyon, nükleer transfer, akış sitometrisi

2015 , 143 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANALYSES OF CELL CYCLES FIBROBLASTS, CARTILAGE, GRANULOSA AND MUSCLE CELLS FROM FARM ANIMALS

Aysel EREN

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Rıfat Bircan
Co Supervisor : Prof. Dr. Sezen Arat

Cloning of organisms with nuclear transfer (NT), namely production of genetic copy of organisms, is the most advanced point of today's modern biotechnology and assisted reproductive techniques. This technology can be used to increase the number of genetically superior organisms or disease-resistant individuals as well as to save local breeds the number of which are dwindling from the border of extinction. Although this technology could be improved by performing many studies since the production of the first clone, success rate is still not at the desired level. The common belief for deaths of cloned embryo is the inadequate reprogramming of somatic cells which causes unbalanced gene expression. Some failures that occur during reprogramming of the donor nucleus are considered as the main reason for unsuccessful cloning. The one of the key factors for cell programming, and thus success of cloning, is harmony between the donor cell and the oocyte. Therefore, the most important step of NT is to synchronize the cells of desired animal at desired cell cycle stage for cloning. The aim of this study is to characterize of cells (such as skin fibroblasts, muscle cells, cartilage cells and granulosa cells) with immunohistochemical staining and then synchronize different types of the cells obtained from various species at a particular cell cycle stage using a variety of methods (serum starvation, contact inhibition and roscovitine), to determine the potential harmful effects of methods on these cells, and to establish the less hazardous and the best method. Cells were characterized immunohistochemically. After synchronization experiments, cells were analysed by flow cytometry for cell viability, apoptosis, necrosis and cell cycle stages. As a result of this study, one or a few cell synchronization options giving highest rate of G1/G0 and having lowest harmful effect on cells were identified for four different cell types used at least on time for nuclear transfer studies and resulted in live birth. This is the first study in which several synchronization methods were tested on different cell types and harmful effects of those methods on the cell were analyzed. In addition, taking into account of cells stored in frozen cell banks in the scope of genetic resources conservation program, all methods were comparatively applied on both fresh and frozen cells. As a result, synchronization wasn't achieved in roscovitine treated groups, but the cells were synchronized in serum starvation and confluency groups. The groups of best synchronization and the least affected cell viability were serum starvation groups.

Keywords : cell culture, cell cycle, cell synchronization, immunohistochemical characterization, nuclear transfer, flow cytometry

2015 , 143 pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1 İmmünohistokimyasal Karakterizasyon	5
2.1.1 İndirekt Yöntem İle İmmünohistokimyasal Karakterizasyon	6
2.2 İmmün Histokimyasal Karakterizasyonda Yararlanılan Hücre organelleri ve Kısımları	7
2.2.1 Hücre İskeleti	7
2.2.1.1 Hücre İskeletindeki Ara Filamentler (İplikler).....	7
2.3 Hücre Döngüsü (Siklusu)	9
2.3.1 İnterfaz Evresi	10
2.3.1.1 G1 Evresi.....	10
2.3.1.2 S Evresi	11
2.3.1.3 G2 Evresi.....	11
2.4 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	12
2.5 Hücre Senkronizasyonu.....	15
2.6 Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz)	17
2.6.1 Apoptozun Düzenlenmesi	20
2.6.2 Apoptozun Mekanizması.....	20
2.6.2.1 İntersik Yol	21
2.6.2.2 Ekstrinsik Yol.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1 Materyal	25
3.1.1 Dokuların Alınması	25
3.1.2 Kullanılan Aletler	25
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar	26
3.1.3.1 Kullanılan Antikorlar	26
3.1.3.2 Kullanılan Çözeltiler	27
3.1.3.3 Kullanılan Kitler.....	27
3.2 Yöntemler.....	27
3.2.1 Primer Kültür.....	27
3.2.2 Hücre Kültürü.....	28
3.2.3 Hücrelerin Karakterizasyonu.....	28
3.2.4 Hücrelerin Dondurulması	29
3.2.5 Senkronizasyon Deney Grupları	29
3.2.5.1 Kontrol Grubu	29
3.2.5.2 Roskovitin-1 Hücre Grubu	29
3.2.5.3 Roskovitin-2 Hücre Grubu	30
3.2.5.4 Erken Konfluent Grubu	30

3.2.5.5 Geç Konfluent Grubu	30
3.2.5.6 72 Saat Serum Açlığı Grubu	30
3.2.5.7 120 Saat Serum Açlığı Grubu	30
3.3 Analiz Yöntemleri	31
3.3.1 Hücre Siklusu Analizi	32
3.3.2 Hücrede Apoptoz ve Nekroz Analizi	33
3.3.3 İstatistiksel Analizler	35
4. BULGULAR	36
4.1 Primer Kültür	36
4.2 Hücre Karakterizasyonu	39
4.2.1 Hücrelerin Aktin Ve Vimentin Antikoru İle Boyanması	39
4.2.2 Hücrelerin Elastin, Desmin ve Sitokeratin Antikoru İle Boyanması	45
4.3 Hücre Siklus Analizi	46
4.3.1 Hücre Sayısı Optimizasyonu	46
4.3.2 PI Boyama Optimizasyonu	47
4.3.3 Hücre Siklus Analiz Sonuçları	51
4.4 Hücrede Apoptoz ve Nekroz Analizi	84
4.4.1 RNaz Optimizasyonu	84
4.4.2 Apoptoz ve Nekroz Analiz Sonuçları	86
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	121
6. KAYNAKLAR	135
ÖZGEÇMİŞ	142

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Cdk ve siklinlerin hücre döngüsünde aktif olduğu fazları gösteren çizelge.....	14
Çizelge 4.1. Erkek sığır taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları.....	53
Çizelge 4.2. Erkek sığır donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları.....	53
Çizelge 4.3. Erkek sığır taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	54
Çizelge 4.4. Erkek sığır donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	54
Çizelge 4.5. Erkek sığır taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	55
Çizelge 4.6. Erkek sığır donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	55
Çizelge 4.7. Dişi sığır taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	56
Çizelge 4.8. Dişi sığır donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	57
Çizelge 4.9. Dişi sığır taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	57
Çizelge 4.10. Dişi sığır donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	58
Çizelge 4.11. Dişi sığır taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	58
Çizelge 4.12. Dişi sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	59
Çizelge 4.13. Dişi sığır taze granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	59
Çizelge 4.14. Dişi sığır donmuş granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	60
Çizelge 4.15. Erkek koyun taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	60
Çizelge 4.16. Erkek koyun donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	61
Çizelge 4.17. Erkek koyun taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları.....	62
Çizelge 4.18. Erkek koyun donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları.....	62
Çizelge 4.19. Erkek koyun taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	63
Çizelge 4.20. Erkek koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları.....	64
Çizelge 4.21. Dişi koyun taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	64
Çizelge 4.22. Dişi koyun donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	65
Çizelge 4.23. Dişi koyun taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	66
Çizelge 4.24. Dişi koyun donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları.....	66
Çizelge 4.25. Dişi koyun taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları.....	67
Çizelge 4.26. Dişi koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	67
Çizelge 4.27. Dişi koyun taze granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	68
Çizelge 4.28. Dişi koyun donmuş granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	69
Çizelge 4.29. Erkek keçi taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	69
Çizelge 4.30. Erkek keçi donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları.....	70
Çizelge 4.31. Erkek keçi taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	70
Çizelge 4.32. Erkek keçi donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	71
Çizelge 4.33. Erkek keçi taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	71
Çizelge 4.34. Erkek keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	72
Çizelge 4.35. Dişi keçi taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	72
Çizelge 4.36. Dişi keçi donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	73
Çizelge 4.37. Dişi keçi taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	73
Çizelge 4.38. Dişi keçi donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	74
Çizelge 4.39. Dişi keçi taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	74
Çizelge 4.40. Dişi keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	75
Çizelge 4.41. Dişi keçi taze granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	76
Çizelge 4.42. Dişi keçi donmuş granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	76
Çizelge 4.43. Erkek manda taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	77
Çizelge 4.44. Erkek manda donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	77
Çizelge 4.45. Erkek manda taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	78

Çizelge 4.46. Erkek manda donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	78
Çizelge 4.47. Erkek manda taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	79
Çizelge 4.48. Erkek manda donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları.....	79
Çizelge 4.49. Dişi manda taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları.....	80
Çizelge 4.50. Dişi manda donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları	81
Çizelge 4.51. Dişi manda taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları.....	81
Çizelge 4.52. Dişi manda donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları	82
Çizelge 4.53. Dişi manda taze granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları.....	82
Çizelge 4.54. Dişi manda donmuş granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları.....	83
Çizelge 4.55. Annexin V boyama protokolünde RNaz kullanımının etkisi.....	85
Çizelge 4.56. Erkek sığır taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları	88
Çizelge 4.57. Erkek sığır donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları	89
Çizelge 4.58. Erkek sığır taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları	89
Çizelge 4.59. Erkek sığır donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları	90
Çizelge 4.60. Erkek sığır taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	90
Çizelge 4.61. Erkek sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	91
Çizelge 4.62. Dişi sığır taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	92
Çizelge 4.63. Dişi sığır donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	93
Çizelge 4.64. Dişi sığır taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	93
Çizelge 4.65. Dişi sığır donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	94
Çizelge 4.66. Dişi sığır taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	94
Çizelge 4.67. Dişi sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	95
Çizelge 4.68. Dişi sığır taze granuloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	95
Çizelge 4.69. Dişi sığır donmuş granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	96
Çizelge 4.70. Erkek koyun taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	97
Çizelge 4.71. Erkek koyun donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	97
Çizelge 4.72. Erkek koyun taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	98
Çizelge 4.73. Erkek koyun donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları	99
Çizelge 4.74. Erkek koyun taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	99
Çizelge 4.75. Erkek koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları... 100	
Çizelge 4.76. Dişi koyun taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	100
Çizelge 4.77. Dişi koyun donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	101
Çizelge 4.78. Dişi koyun taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	101
Çizelge 4.79. Dişi koyun donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	102
Çizelge 4.80. Dişi koyun taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	103
Çizelge 4.81. Dişi koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	103
Çizelge 4.82. Dişi koyun taze granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	104
Çizelge 4.83. Dişi koyun donmuş granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları....	104
Çizelge 4.84. Erkek keçi taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	105
Çizelge 4.85. Erkek keçi donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	105
Çizelge 4.86. Erkek keçi taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	106
Çizelge 4.87. Erkek keçi donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	107
Çizelge 4.88. Erkek keçi taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	107
Çizelge 4.89. Erkek keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	108
Çizelge 4.90. Dişi keçi taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	108
Çizelge 4.91. Dişi keçi donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	109
Çizelge 4.92. Dişi keçi taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	110
Çizelge 4.93. Dişi keçi donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	110
Çizelge 4.94. Dişi keçi taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	111
Çizelge 4.95. Dişi keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	112

Çizelge 4.96. Dişi keçi taze granuloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	112
Çizelge 4.97. Dişi keçi donmuş granuloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	113
Çizelge 4.98. Erkek manda taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	113
Çizelge 4.99. Erkek manda donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	114
Çizelge 4.100. Erkek manda taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	115
Çizelge 4.101. Erkek manda taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	115
Çizelge 4.102. Erkek manda taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	116
Çizelge 4.103. Erkek manda donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	116
Çizelge 4.104. Dişi manda taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	117
Çizelge 4.105. Dişi manda donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları.....	118
Çizelge 4.106. Dişi manda taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	118
Çizelge 4.107. Dişi manda donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	119
Çizelge 4.108. Dişi manda taze granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	119
Çizelge 4.109. Dişi manda donmuş granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları.....	120

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Monoklonal antikor üretiminin şematize edilmesi.....	6
Şekil 2.2. İndirekt yöntemle immünokarakterizasyonun şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3. Deneysel şekillerden esinlenerek çizilen hücre modelinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.4. Hücre döngüsünün şematik gösterimi	11
Şekil 2.5. Hücre döngüsü kontrol noktaları.....	13
Şekil 2.6. Hücre döngüsü sırasında siklin seviyesinin şematik olarak gösterimi.....	14
Şekil 2.7. Nükleer transfer işleminin şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.8. Apoptozdaki olayların şematik olarak gösterilmesi.....	18
Şekil 2.9. Hücre yüzeyindeki değişikliklerin fagositler tarafından fark edilmesinin ardından hücrenin fagositoz edilişi.....	19
Şekil 2.10. Apoptoz mekanizmasında intrinsik yolun şematize edilmesi.....	21
Şekil 2.11. Apoptoz mekanizmasında ekstrinsik yolun şematize edilmesi.....	22
Şekil 2.12. Apoptoz ve nekrozun karşılaştırılması.....	23
Şekil 3.1. Sıvı bir sistem içinde hücrelerin lazere taşınması ve tek tek lazerden geçişi.....	31
Şekil 3.2. Hücre döngüsünün her bir fazının akış sitometrisinde gösterimi.....	32
Şekil 3.3. Sağlıklı ve apoptotik hücreler ile apoptoz belirleme işaretlerinin gösterildiği diyagram.....	34
Şekil 3.4. Akış sitometrisi FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit analiz sonucu örneği.....	35
Şekil 4.1. Primer kültürde üreme gösteren sığır kıkırdak hücreleri.....	36
Şekil 4.2. Primer kültürde üreme gösteren sığır kas hücreleri.....	36
Şekil 4.3. Ovaryumdan elde edilen sığır granüloza hücreleri.....	37
Şekil 4.4. Primer kültürde üreme gösteren sığır fibroblastları.....	37
Şekil 4.5. Primer kültürdeki sığır kas hücrelerinin üremesi. (yaklaşık 30 günlük kültür).....	38
Şekil 4.6. Primer kültürdeki sığır kıkırdak hücrelerinin üremesi (yaklaşık 10 günlük kültür).....	38
Şekil 4.7. Primer kültürdeki sığır fibroblast hücrelerinin üremesi.(yaklaşık 10 günlük kültür).....	38
Şekil 4.8. Sığır granüloza hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	39
Şekil 4.9. Sığır kıkırdak hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	39
Şekil 4.10. Sığır fibroblastlarının aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	40
Şekil 4.11. Sığır kas hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	40
Şekil 4.12. Manda granüloza hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması(10X).....	40
Şekil 4.13. Manda kıkırdak hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X) ...	41
Şekil 4.14. Manda fibroblastlarının aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	41
Şekil 4.15. Manda kas hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	41
Şekil 4.16. Keçi granüloza hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	42
Şekil 4.17. Keçi kıkırdak hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	42
Şekil 4.18. Keçi fibroblastlarının aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	42
Şekil 4.19. Keçi kas hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	43
Şekil 4.20. Koyun granüloza hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	43
Şekil 4.21. Koyun kıkırdak hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X)....	43
Şekil 4.22. Koyun fibroblastlarının aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	44
Şekil 4.23. Koyun kas hücrelerinin aktin ve vimentin antikorları ile boyanması (10X).....	44

Şekil 4.24. Sığır granüloza hücrelerinin sitokeratin antikoruna ile boyanması (10X)	45
Şekil 4.25. Ekimden 1 gün sonra hücrelerin mikroskoptaki görüntüsü. (4×10^5 hücre).....	46
Şekil 4.26. Ekimden 3 gün sonra hücrelerin mikroskoptaki görüntüsü. (%50 konfluent).....	46
Şekil 4.27. Ekimin 6-7. günü hücrelerin mikroskoptaki görüntüsü. (%100 konfluent).....	47
Şekil 4.28. 50µg/ml PI ile boyanan kıkırdak hücrelerine ait analiz sonucu.....	48
Şekil 4.29. 30µg/ml PI ile boyanan kıkırdak hücrelerine ait analiz sonucu.....	49
Şekil 4.30. 20µg/ml PI ile boyanan kıkırdak hücrelerine ait analiz sonucu.....	50
Şekil 4.31. Hücre siklus analizi programı kullanılarak fazların yüzdelilerinin belirlenmesi.....	51
Şekil 4.32. Bölünen normal fibroblast grubu.....	52
Şekil 4.33. Fibroblastlarda geç konfluent grubu.....	52
Şekil 4.34. RNaz eklenmeyen boyama sonucu.....	84
Şekil 4.35. RNaz eklenen boyama sonucu.....	85
Şekil 4.36. Canlılık analiz sonuçlarının değerlendirilmesinin gösterimi.....	86
Şekil 4.37. Sığır fibroblastlarının kontrol grubu.....	87
Şekil 4.38. Sığır fibroblastlarında erken konfluent grubu.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	:Apoptoz indükleyici faktör
CAD	:Kaspaz aktive edici DNaz
CDK	:Siklin bağımlı kinaz
CDKI	:Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
ddH ₂ O	:Ultrasaf su
dH ₂ O	:Saf su
DMEM	:Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DPBS	:Dulbecco'nun fosfat içeren tuz tamponu
EDTA	:Etilendiamin tetraasetikasit
Endo-G	:Endonükleaz-G
FAO	:Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agricultural Organization of the United Nations)
FAS	:Hücre yüzey reseptörü
FBS	:Fötal sığır serumu
HBS	:Yüksek tuz tamponu
Hc	:Hücre
HCl	:Hidrojen klorür
IAF	:Apoptotik faktör İnhibitörü
ICAD	:İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
IVF	:In Vitro Fertilizasyon
KCl	:Potasyum klorür
NaCl	:Sodyum klorür
nm	:Nanometre
NT	:Nükleer transfer
PBS	:Fosfatlı tuz tamponu
PFA	:Paraformaldehit
PI	:Propidyum iyodit
RNA	:Ribonükleik asit
Smac	:Mitokondri kökenli ikinci kaspaz aktivatörü

TEŞEKKÜR

Sözlerime klasik cümlelerle başlamak istemedim çünkü madem ortada bir çalışma var ben buna nasıl dahil oldum anlatayım dedim. Bir gün sevgili danışmanım Doç. Dr. Rıfat BİRCAN'ın bana yazdığımız proje geçmedi demesiyle başlayan hikayemden kısaca bahsetmek istedim.

Kader bu ya, yazdığımız proje geçmemişti ve yüksek lisansım uzayabilirdi, ama bir de Prof. Dr. Sezen ARAT'ın bir projesi vardı, 'onda çalışmak ister miydim' diye sorulunca, evet dedim ve ortaya bu tez çıktı.

Yanında bulunduğum süre boyunca iş ahlakından, laboratuvar tasarımına, deney yapılmasından, proje yazımına kadar bildiği her bilgiyi benimle paylaşan ve hep yanımda olan bir nevi annem gibi sevdiğim birtanecik hocam Prof. Dr. Sezen ARAT'a teşekkürü borç bilir ve bundan sonraki yıllarda da arkamda olmasını istediğimi belirtirim.

Tez çalışmalarım boyunca pek fazla göremediğim ama 'Hocam şuna ihtiyacım var, bu gerekiyor yada şunu yapabilir miyiz' dediğim her an yardımlarını esirgemeyen, hep yanımda olan sevgili danışmanım Doç. Dr. Rıfat BİRCAN'a,

gülyüzünü ve yardımlarını hiç esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN e,

espirileri ile yüzümü güldüren bilgilerini esirgemeyen Doç. Dr. Cenk ARAL'a,

yüksek lisansa başladığımdan beri etrafımda gördüğüm arkadaşım Hande AKALAN'a,

kaderin bir cilvesi olarak karşılaştığım ilk günden itibaren yol arkadaşım olan, hiçbir şeyini benden esirgemeyen canım dostum Esra ULU'ya,

odasını benimle paylaşıp bir abla edası ile her an yanımda olan Elif Ceren KALINKARA'ya,

deli dolu tavırlarıyla beni güldüren, derdime ortak olup beni destekleyen canım dostum Gizem SÖNMEZ'e,

bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Devrim OSKAY'a,

deneylerimin yapılması sırasında laboratuvarını bana açan ve cihazlarını kullanmama izin veren, yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Metin TUNA'ya,

kardeşim gibi sevdiğim, küçük yaşına rağmen beni her zaman dinleyen, çoğu zaman mutluluk sebebim olan birtanecik kuzenim Hasan Eren ÖDEMİŞ'e,

aramızdaki mesafelere rağmen bir telefon uzağımda olan, kafasını bolca şişirdiğim ama bir o kadar da çok sevdiğim canım dostum Narin Nergis BAYRAKTAR'a,

arkadaşlığını esirgemeyen Hüseyin KELEŞ'e,

tezimin yarım kalmasını engelleyen, yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Arzu TAŞ ÇAPUTÇU'ya,

bilgisayar programlarını bulmak için kafasını şişirdiğim ve yardımlarını esirgemeyen, tanıdığım en tatlı çift olan Dilan KIZILOCAK ve Gürkan AKYILDIZ'a

yukarıda ismi geçen geçmeyen tüm biyoloji bölümü mensubu hocalarıma ve tarımsal biyoteknoloji bölümü hocalarıma, kısaca üzerimde emeği olan herkese TEŞEKKÜR EDİYORUM.

Sevginin emek vermek, sabretmek ve yanında olmak demek olduğunu öğreten, dünyanın en anlayışlı adamı olan babam Ahmet EREN'e, tüm derdime tasama ortak olan, sabırla beni dinleyen, destekleyen birtanecik annem Süheyla EREN'e, maddi manevi yanımda olup kahırımı çeken, vaktimin çoğunu onu kızdırarak geçirdiğim yeter artık bitmedi şu okul diye başımın etini yiyen canım babaannem Fatma EREN'e sonsuz teşekkürler ediyorum.

Sözlerimi bitirirken üzerimde sonsuz emeği olan özellikle de Prof. Dr. Sezen ARAT'a, Doç. Dr. Rıfat BİRCAN'a ve aileme siz yanımda olmasaydınız bu tezi bitiremezdim diyorum, iyi ki varsınız ve sizi iyi ki tanımışım.

Şubat, 2015

Aysel EREN
Biyolog

1.GİRİŞ

Nükleer transfer sonucu bir canlının klonlanması yani genetik kopyasının oluşturulması modern biyoteknolojinin günümüzdeki en uç noktası ve yardımcı üreme tekniklerinin en gelişmişidir. Bu teknoloji üstün genetik yapıya sahip veya hastalıklara dirençli bireylerin sayısını artırmak için kullanılabilceği gibi aynı zamanda sayıları gittikçe azalan lokal ırkların yok olma sınırından kurtarılması için de kullanılabilir. Bu yüzden Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gen kaynaklarının korunması için ülkeleri belli zamanlarda bir araya getirmekte ve bu toplantılarda gelecekte yok olacak türleri geriye getirmek için hücre bankalarının kurulmasının gerekliliğini tartışmaktadır. Kurulacak hücre bankalarının etkin bir şekilde kullanılabilmesi, teknolojinin sorunlarının çözülmesine bağlıdır. Bu nedenle hala bu teknolojiyi kullanabilen ülkeler yoğun olarak araştırmalarına devam etmektedirler (Campbell 2002).

Erişkin bir canlının başarı ile klonlanması sonucu doğan ilk klon koyun "Dolly" nin (Wilmut ve ark. 1997) ardından sığır, keçi, at, domuz, tavşan, manda, katır, fare, tavşan ve deve gibi birçok memeli türü aynı yöntem ile klonlanmıştır (Arat ve ark. 2011). İlk klonun üretilmesinden bu yana birçok çalışma yapılarak teknoloji iyileştirilmeye çalışılmış olsa da, başarı yüzdesi halen istenilen seviyede değildir. Bazı çalışmalarda %12.5 gibi daha yüksek sonuçlar alınmasına karşın (Arat ve ark. 2011) sığır da dahil olmak üzere çoğu türde NT'in başarı ortalaması %0.5 ile 5 arasında değişmektedir (Smith ve ark. 2000, Solter 2000, Shi ve ark. 2007, Wani ve ark. 2010). In vitro fertilizasyon (IVF) ile karşılaştırıldığında embriyonal kayıplar çok fazladır ve embriyoların çoğu gebeliğin 35 ila 60. günleri arasında %50-100 kayıpla sonuçlanmaktadır (Edwards ve ark. 2003). Bu kayıplar tek bir anomaliden çok, gelişim bozukluğu ve geriliğinden, muhtemel kromozom anomalilerinden, yenidoğanın artan ağırlığından, akciğerdeki anormalliklere, solunum problemlerinden metabolik hasarlara kadar değişen komplikasyonlara bağlıdır. NT ile elde edilen embriyoların plasentaları genelde büyük ama az sayıda plasentom, ödem ve hidroallantois içerir (Hill ve ark. 1999, Constant ve ark. 2006, Farin ve ark. 2006, Bertolini ve ark. 2007). Yavrunun normalden büyük olması ile karakterize büyük yavru sendromu sık görülen bir gelişme bozukluğudur (Cibelli ve ark. 1998, Constant ve ark. 2006). NT etkinliğini arttırmak için birçok çalışma yapılmış, genotip (Heyman ve ark. 2002), donör hücre çeşidi (Kato ve ark. 2000) ve evresine (Renard ve ark.

2002) bağlı olarak kk değişiklikler gözlemlenmiş, ancak çok büyük bir başarı elde edilememiştir.

Döllenmemiş yumurta hresi yetişkin vücut hresine özgü gen ekspresyon motiflerinin silinip embriyonal gelişimin yeniden başlatılması için gerekli gen ekspresyonu motiflerini oluşturabilme potansiyeline sahiptir. Bu olgu yeniden programlama olarak adlandırılır. Yeniden programlanma vücut hresi nükleusunun epigenetik olarak tekrar ayarlanması ile oluşturulur, ancak yeniden programlanma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Birçok klon embriyo anormal büyük plasentaya sahiptir ve embriyogenezin değişik gelişim evresinde veya doğum öncesi dönemde ölürlere (Ogura ve ark. 2002). Klon embriyosu ölümlerinin vücut hrelerinin yetersiz yeniden programlanmasının sonucu olan dengesiz gen ekspresyonları sebebiyle meydana geldiği yaygın bir kanıdır. NT işleminde oosit (yumurta hresi), donör (vücut hresi) nükleusu orijinal halinden zigotik çekirdeğe dönüştürür. Donör nükleusun yeniden programlanmasında gerçekleşen bazı hataların klonlamadaki başarısızlıkların temel sebebi olduğu düşünülür. Hücre programlanmasının ve dolayısıyla klonlama başarısının anahtar faktörlerinden biri donör hücre ile oositin arasındaki uyumdur (Campbell ve ark. 2003). Bu nedenle NT'de en önemli basamak hücrenin istenilen siklus (döngü) dönemine getirilmesidir.

Hücre siklusu (döngü) G1, S, G2 evreleri ve mitozdan oluşur. Mitozu takiben iki kardeş hücre G1 fazına girer. Bu dönemdeki hücre büyür ve hücre dışı büyüme faktörlerine cevap verir. Yine bu dönemde kromozom yoğunlaşması kaybolur ve tekrar çekirdek zarfı oluşur. Bunu takip eden S fazında ise DNA replikasyonu meydana gelir. G2 fazında ise yeniden kromozomlar yoğunlaşır ve hücre mitoz girer. Mitoz esnasında kromozomlar yoğunlaşmış olarak kalır. Nükleer transfer çalışmalarında çoğunlukla G1/G0 fazındaki hücreler seçilir. Bu dönemdeki hücrelerin yeniden programlanmaya daha uygun olduğu ve daha yüksek oranda normal embriyo gelişimi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Wilmut ve ark. 1997, Baguisi ve ark. 1999, Kubota ve ark. 2000, Campbell 2000, Arat ve ark. 2001a, Gibbons ve ark. 2002). Buna karşın diğer hücre siklus dönemlerindeki hücrelerin örneğin S fazında olanların kullanıldığı durumda, erken kromozom yoğunlaşması sonucu kromozomal anomali, G2/M fazında olanların kullanıldığı durumda ise anöploid sonucunda düşük embriyo gelişimi görüldüğü bildirilmiştir (Campbell ve ark. 2003).

Hücreler G1/G0 fazına değişik şekillerde getirilebilirler. Kumulus hücreleri ise elde edildikleri anda G1/G0 döneminde oldukları ve hemen NT için kullanılabilirler. 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 geçerler. İlk başarılı NT çalışmasında bu yöntem kullanılmıştır (Wilmot ve ark. 1997). Diğer yöntemde hücreler kültür kaplarını kapladıklarında birbirleri ile temas ettikleri için (kontakt inhibisyon) S fazına geçemezler ve G1'de kalırlar. Bazı NT çalışmalarında bu yöntem kullanılmıştır (Cibelli ve ark. 1998, Arat ve ark. 2001b, Arat ve ark. 2002, Gerger ve ark. 2010, Arat ve ark. 2011). Bir başka yöntem ise sikline bağımlı kinaz inhibitörü gibi (roskovitin, dimetil sülfoksit, sikloheksimid) bazı kimyasallar kullanılarak hücrelerin G1 fazında engellemesidir ve bazı NT çalışmalarında da bu yöntem kullanılmıştır (Arat ve ark. 2001b, Gibbons ve ark. 2002, Goissis ve ark. 2007, Hashem ve ark. 2006). Bu senkronizasyon ajanlarının kullanımı hücre siklusunu düzenlemede etkili olmakla birlikte DNA hasarına sebep olarak hücre hasarı veya ölümü ile sonuçlanabilen toksik etkileri beraberinde getirebilir (Koo ve ark. 2009). Benzer bir durumun da serum açlığı sonucu görüldüğüne dikkat çeken ve gerek embriyonal dönemde gerekse doğum sonrası ölümlere bu yöntemin sebep olduğu, ölümlerin DNA hasarlarına veya apoptozise bağlı olabileceğini ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (Kato ve ark. 1998, Wells ve ark. 1998a, Hill ve ark. 1999, Gibbons ve ark. 2002). Ancak hücre kültüründe serum açlığının apoptoza sebep olduğunu gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır ve erişkin hücreler (Peng ve ark. 2013, Dalman ve ark. 2010) ile yapılmış birkaç çalışma dışında çoğu fetal hücrelerde yapılmıştır (Peura 2001, Kues ve ark. 2002, Cho ve ark. 2005). Buna karşın serum açlığının herhangi bir olumsuz etkisine rastlanmadığını rapor eden bir çalışma da mevcuttur (Lima-Neto ve ark. 2010). Bunun yanı sıra, senkronizasyonda kullanılan kimyasal ajanlar farklı tip hücrelerde farklı reaksiyonlara sebep olabilirler, ancak bununla ilgili ayrıntılı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bugüne kadar; fibroblastlar, meme bezi hücresi, kumulus hücresi, ovidukt hücresi, lökositler, granüloza hücresi, üreme hücresi, kas hücresi, karaciğer hücresi gibi çok değişik erişkin hücre tipleri klonlama çalışmalarında kullanılmış ancak farklı başarı oranları ile sonuçlanmıştır (Brem ve Kuhholzer 2002). Daha sonra klonlamada kullanılabileceği gösterilen hücre tiplerine böbrek hücresi (Adams ve ark. 2004) ve kıkırdak hücresi (Arat ve ark. 2011) gibi yenileri eklenmiştir. Ancak bu çalışmaların hiçbirinde uygulanan senkronizasyon yöntemlerinin hücre üzerinde nasıl etki yaptığı incelenmemiştir.

Birçok türün klonlanmasından sonra nükleer transfer teknolojisi özellikle nesli tehlike altındaki türlerin korunma programlarında ele alınmaya başlanmıştır. Yıllar önce teknolojinin

nesli tehlike altındaki türlerin korunmasına nasıl fayda sağlayacağı ile ilgili bir rapor yayınlanmıştır (Wells ve ark. 1998b). Bu nedenle gen bankalarında artık sadece dondurulmuş sperma ve embriyo saklamak yerine aynı zamanda dondurulmuş hücrelerin saklanması da önerilmektedir (Ryder 2002, Andrabi ve Maxwell 2007, Leon-Quinto ve ark. 2009). Ülkemizde ve dünyada ilk kez gen bankasında saklanan hücreler ile sayıları azalan bir yerli ırkımız klonlanmış ve yukarıda bahsedilen varsayım ve öneriler somut veriler ile kanıtlanmıştır (Arat ve ark. 2011).

Literatür bilgilerinden anlaşıldığı üzere çoğunlukla tek, bazen iki hücre tipi kullanılarak sınırlı sayıda yapılan denemelerle geliştirilen hücre senkronizasyon yöntemlerinin farklı türlerde ve farklı tipteki hücrelerde uygulandığı çeşitli NT çalışmalarında standart sonuçların alınamaması ve başarı oranlarının çok değişken seyretmesi, bu yöntemlerin farklı türlerde ve farklı tip hücrelerde daha ayrıntılı incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca yöntemlerin hücre üzerindeki toksik etkilerinin de varsayımdan öte *in vitro* çalışmalar ile ortaya çıkarılmaya ihtiyacı vardır. Kullanılan yöntemlerin hücreye zararına ilişkin ortaya konan çelişkili raporlardan konunun yeterince aydınlatılmadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca, daha fazla türde ve çeşitli hücre tiplerinde aynı anda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğunu da işaret etmektedir. Bununla beraber gelecekte kaybolan tür veya ırkların geriye getirilmesinde kullanılacak hücrelerin hücre bankalarında dondurulmuş olarak saklanmış olacağı düşünülürse bu donmuş hücrelere uygulanacak her türlü senkronizasyon yönteminin de verimliliğini ve hücreye verebileceği zararı belirlemek önemlidir.

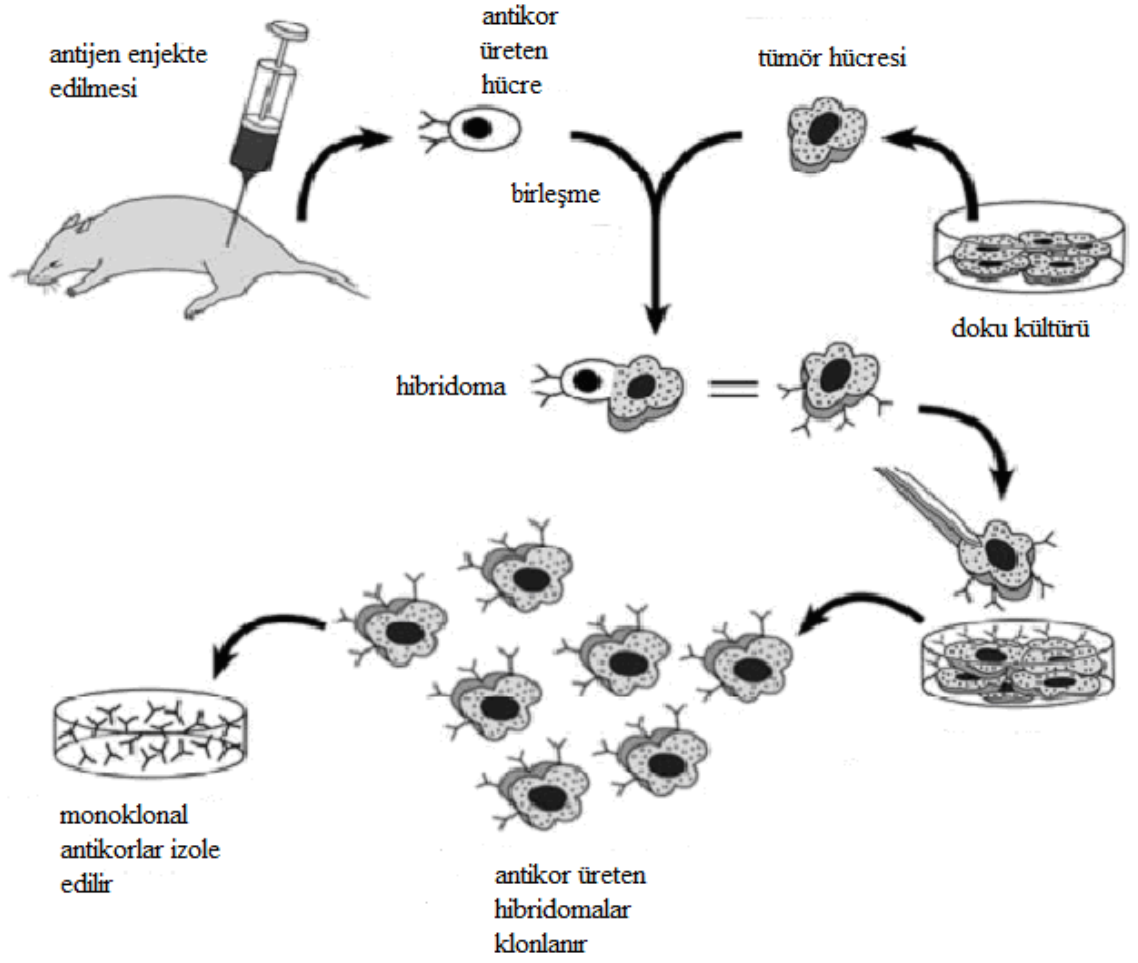
Yapılan bu çalışmada sığır, koyun, keçi ve mandadan elde edilen primer deri, kas, kıkırdak ve granüloza hücre hatlarında hücrelerin G1/G0 fazına getirilmesi için serum açlığı, kontak inhibisyon ve roskovitin uygulanması olarak bilinen senkronizasyon yöntemleri kullanılarak, bu yöntemlerin farklı türlere ait farklı tipteki taze ve dondurulmuş hücreler üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda hangi türün hangi hücre tipinde, hangi yöntemin en yüksek oranda senkronizasyonu sağladığı tespit edilmeye çalışılmış, aynı zamanda uygulamanın hücre canlılığı üzerindeki etkileri de incelenerek hücreye en az zarar veren yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Tüm çalışma hem taze hem dondurulmuş hücrelerde karşılaştırmalı yapılarak özellikle dondurulmuş hücrelerde elde edilen sonuçlarda fark olup olmadığı incelenmiştir. Dondurulmuş hücrelerin sonuçları özellikle hücre bankalarında saklanan hücrelerle yapılacak çalışmalar için ayrı bir önem taşımaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 İmmünohistokimyasal Karakterizasyon

Histokimya Pears'ın tanımı ile maddeleri hücre ve doku düzeyinde ayırt etmeye, yerleşimlerini ve miktarlarını saptamaya yarayan kimyasal tekniklerin ortak adıdır. Bu amaçla spesifik maddeler, reaktif gruplar ve enzim katalizörleri kullanılabilir. Raspail ve Pears doku ve hücrenin mikroskopik incelenmesi amacıyla kimyasal reaksiyonların kombinasyonunu 1825'te gerçekleştirmiş olmalarına karşın, tekniğin histoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılması 1860'larda başlamış ve vazgeçilmez olarak nitelendirilmesi 1930'lu yılları bulmuştur. 1970'lerde histokimyasal prosedürler geliştirilmiş, in situ hibridizasyon ve moleküler biyolojik teknikler histokimyaya eklenmiştir (Damjanov ve Linder 1996).

İmmünohistokimya hücre ve doku içinde bulunan bazı enzimlerin ya da makromoleküllerin lokalizasyonlarını incelemeye yardımcı olan bir tekniktir. İncelenecek olan makromoleküle karşı geliştirilmiş olan bir antikorun kullanılması immünohistokimyanın temelini oluşturmaktadır. Dokuda saptanmaya çalışılan protein antijen, bu proteinin saptanması için yararlanılan protein ise antikordur. Poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki tip antikor kullanılır. Poliklonal antikorlar, uygun bir hayvanı bir antijen ile immunize ederek üretilen antikorlardır. Bir hayvandan (örneğin bir sıçandan) alınan bir antijen başka bir hayvana (örneğin tavşan) enjekte edildiğinde, yabancı bir madde olarak algılandığından dolayı B lenfositler tarafından verilen antijene karşı antikor üretilir. Üretilen bu poliklonal antikorlar kandan izole edilip saflaştırılır. Monoklonal antikorlar ise tek bir B lenfositine dayanan hücre klonlarının ürettiği antikorlardır. Monoklonal antikor üretimi farelerin spesifik antijenlerle aşılmasına ve B lenfositlerin myeloma hücrelerinin hibridoma oluşturmaya dayanmaktadır (Hayat 2002). Monoklonal antikor üretimi Şekil 2.1' de şematize edilmiştir.

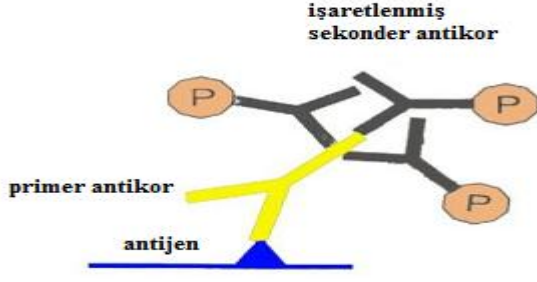


Şekil 2.1. Monoklonal antikor üretiminin şematize edilmesi

İmmünohistokimyasal karakterizasyonda direkt yöntem, indirekt yöntem, çözünebilir enzim immün kompleks yöntemi, avidin-biotin yöntemi kullanılabilir. Çalışmamızda indirekt yöntem ile immünohistokimyasal karakterizasyon gerçekleştirilmiştir.

2.1.1 İndirekt Yöntem ile İmmünohistokimyasal Karakterizasyon

Her hücre tipi kendine özgü proteinler sentezlemektedir. Bu yöntemde sentezlenen proteinler antijen olarak kabul edilmekte ve hücrelerdeki antijene önce işaretli olmayan primer antikor bağlanmaktadır. Ardından işaretlenmiş ikinci (sekonder) antikor primer antikora bağlanır (Şekil 2.2) ve böylece mikroskopta görüntü elde edilir (Hayat, 2002). Eğer boyama yapılan hücrelerde istenilen antijen bulunmuyorsa primer antikor bağlanamayacak ve görüntü oluşmayacaktır.



Şekil 2.2. İndirekt yöntemle immünohistokimyasal karakterizasyonun şematik gösterimi

2.2 İmmün Histokimyasal Karakterizasyonda Yararlanılan Hücre Organelleri ve Kısımları

2.2.1 Hücre İskeleti

Hücre iskeleti (sitoskeleton) mikrotübüller, aktin filamentleri (mikrofilamentler) ve ara filamentlerden oluşmaktadır.

Ara filamentler, hücreye mekanik destek sağlar ve yükün dağılmasına yardım eder. Mikrotübüller, etrafı zarla çevrili organellerin sitoplazmadaki konumlarının belirlenmesinde, taşınma ve sabitlenmesinde görevlidir. Aktin filamentleri, hücre yüzeyinin şeklinin belirlenmesinde ve hücre hareketinde rol alır. Bu yapılar hücre içinde düzgün seyirli veya ağ şeklinde bir çatı oluşturduklarında, hücre iskeleti olarak adlandırılırlar (www.nature.com/principles).

2.2.1.1 Hücre İskeletindeki Ara Filamentler (İplikler)

Hücre iskeletinin en kararlı elemanı olan kasılabılır olmayan filamentlere, aktin filamentlerinden (mikrofilamentlerden) daha kalın, mikrotübüllerden daha ince oldukları için ara (intermediyer) filament adı verilmiştir. Çekirdek zarının iç kısmında yer alan ara filamentler (çekirdek laminleri), hücre DNA'sı için koruyucu bir kafes teşkil eder. Ara filamentler, değişik yönlerde veya birbirlerine paralel seyrederek, hücreleri ve hücre çekirdeklerini destekleyen bir iskelet oluştururlar (şekil 2.3). Hücreye mekanik destek sağlamakta ve hücre bütünlüğünün korunmasında görev almaktadır. Sitoplazmadaki ara filamentler, köken aldıkları çekirdek laminleriyle sıkı bir ilişki içindedirler. Çekirdek laminleri, ökaryotik

hücrelerin çekirdek zarlarının iç kısmında bir ağ yapısı meydana getirir. Bu ağ yapısı, kromozomlar ve çekirdek porları için tutunma bölgeleridir ve filamentöz proteinlerden oluşmuştur. Ara filamentler, özellikle sitoplazma gibi mekanik basıya daha fazla maruz kalan yerlerde belirgindir. Bu filamentlerin ana işlevinin, hücrelere ve dokulara fiziki anlamda güç ve destek sağlamak olduğu düşünülmektedir. Ara filamentler evrimsel olarak korunmuş çeşitli proteinlerden oluşmaktadır ve dokuya, hücre tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedirler (Cooper 2007)

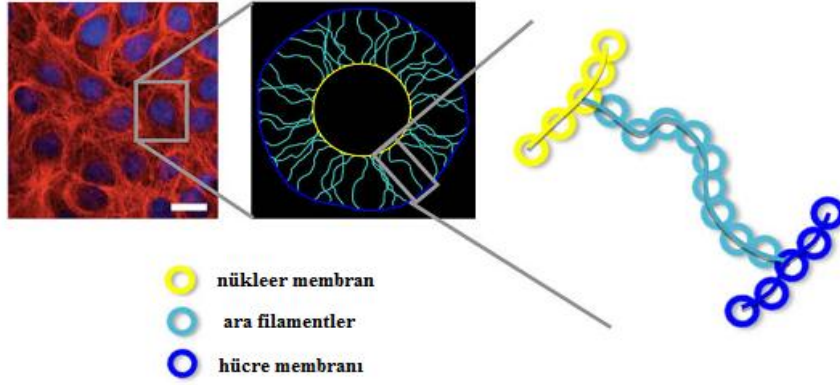
Stabil ve suda erimeyen proteinlerden oluşan ara filamentler 8-11 nm çapındadır. 65'ten fazla ara filament tespit edilmiş ve aminoasit dizisine göre 6 grupta toplanmıştır. Doku ve hücre tipine göre sentezlenen ara filamentler hücrelerin karakterizasyonunda önemli bir yere sahiptir (Cooper 2007, Lodish ve ark. 2000).

Vimentin ise yapılan gruplandırmaya göre tip 3 grubuna girer ve mezenşimal kökenli hücreler tarafından sentezlenir. Vimentin, organellerin yerini sabitlemeye yarar, hücreye esneklik sağlar ve hücre içinde kolesterol taşınmasında rol oynar. Vimentin ve mikrotübüller arasında sıkı ilişkiler vardır (Cooper, 2007; Lodish H. ve ark., 2000). Vimentin mezenşimal kökenli hücrelerde sentezlendiği için bu hücrelerin karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Cooper 2007, Lodish ve ark. 2000).

Sitokeratin epitel hücrelerinde keratin içeren ara filamentlerdir ve yapılan gruplandırmaya göre tip 1 grubuna dahildir. Epitelyal kökenli hücrelerin karakterizasyonunda kullanılır (Cooper 2007, Lodish ve ark. 2000).

Desmin kas hücrelerinde, Z diskinde aktin filamentlerinin bağlanmasında görev alan 469 amino asitten oluşan tip 3 ara filamentidir. Kas hücrelerinin karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Cooper 2007, Lodish ve ark. 2000).

Ara filamentlerden başka hücrede bulunan proteinler de karakterizasyonda kullanılabilir. Aktin, yuvarlak şekilli, yapısal bir proteindir. Aktin filamentleri hücreye mekanik destek sağlar, hücrenin şeklini belirler, hücrenin hareket etmesine olanak sağlar(aktin filamentlerden oluşan lamellipodia, filopod ve psödopod gibi yapılar aracılığıyla); bazı tip hücreler arası bariyerlerin oluşumunda, sitoplazma hareketinde ve hücre



Şekil 2.3. Deneysel Şekillerden esinlenerek çizilen hücre modelinin şematik gösterimi (Kreplak ve Fudge 2007)

bölünmesi sırasında hücrenin ekvatorunda boğum oluşmasında rol alırlar. Kas hücrelerinde, miyozin adlı proteinle birlikte, kasılma eyleminin gerçekleştirilmesinde görevlidir. Mezenşimal kökenli hücreler tarafından sentezlenmektedir (Cooper 2007, Lodish ve ark. 2000).

Ara filementlere ilave olarak elastin kıkırdak dokusu gibi esnek olan dokularda yer alan ve dokunun immünohistokimyasal karakterizasyonunda kullanılan bir proteindir (Cooper, 2007; Lodish H. ve ark., 2000).

2.3 Hücre Döngüsü (Siklusu)

Hücre, büyüklük bakımından belirli bir sınıra ulaştığı zaman kuramsal olarak ikiye bölünmesi gereklidir. Çünkü hücre genel olarak bir küre şeklinde düşünülürse, büyümede hacim/yüzey oranı r^3/r^2 'dir. Yani hacim yarıçapın kübüyle artarken, yüzeydeki büyüme yarıçapın karesine bağımlı kalır ve bir zaman sonra hücrenin yüzeyi gerek besin alışverişini gerek artık maddelerin atılımını ve gerekse gaz alışverişini bütün hücreye sağlayamayacak duruma gelir ve hücre, yüzeyini arttırmak amacı ile bölünmeye başlar. Ayrıca büyüyen hücrede sitoplazma/çekirdek oranı arttığından ve çekirdeğin etki alanı sınırlı olduğundan bu durum hücreyi ölüme sürükleyebilir, dolayısıyla hücreyi bölünmeye zorlar. Hücrenin içine yapay olarak iki çekirdek yerleştirildiğinde ya da çekirdek içindeki kromozom sayısı iki katına çıkarıldığında hücrenin hacmi normal büyüklüğünün iki misli olabilir. Bu, çekirdeğin sınırlı bir etkiye sahip olduğunu kanıtlar (Demirsoy 2006).

Bölünme büyümeyi, rejenerasyonu ve dokuların yenilenmesini sağlar. Bir hücreli canlılarda mitoz aynı zamanda üremeyi sağlar. Her canlıda ve aynı bireyin farklı dokularındaki hücrelerin mitozla bölünme hızı tamamen farklıdır. Örneğin bağırsak mukozasındaki, epidermisteki, kan hücrelerini üreten dokulardaki hücrelerin sürekli bölünmesine karşılık, diğer dokulardaki hücreler belirli zamanlarda, sinir ve retina hücreleri ise belirli bir süreden sonra hiç bölünmez (Ross ve ark. 2003, Freshney 2005)

Hücrelerdeki tüm yapıların iki katına çıkararak, daha sonra iki yavru hücreye verilmesini sağlayan mitoz bölünmeler arasındaki döngüye hücre döngüsü (hücre siklusu) denir. Hücre döngüsü iki aşamaya ayrılır: İnterfaz ve mitoz. İnterfaz ise kendi içerisinde üç alt gruba ayrılır: gap1 (G1 fazı), sentez (S fazı), gap2 (G2 fazı). Hayvanlarda hücre döngüsünün tamamlanması yaklaşık 20-24 saat kadar sürer. Bu sürenin yaklaşık bir saati mitoz bölünmeye ayrılmıştır. Geri kalan süre interfazdaki büyüme için kullanılır. En uygun beslenme ve sıcaklık koşullarında dahi herhangi bir hücre çeşidinin bölünme süresi sabittir. Uygun olmayan koşullarda bu süre uzayabilir. Fakat hücrenin hem optimumdan daha hızlı büyümesini hem de optimumdan daha kısa sürede döngüsünü tamamlaması olanaksızdır. Her hücrenin döngü süresi kusursuz bir zamanlamayla gelişecek şekilde programlanmıştır. Bu program iki aşamada yürütülür: İlkinde kromozomlardaki kalıtsal materyal iki katına çıkarılır, ikincisinde ise hücrenin diğer organelleri çoğaltılır. (Ross ve ark. 2003, Freshney 2005, Copeer 2007).

2.3.1 İnterfaz Evresi

İnterfaz kendi içerisinde üç alt gruba ayrılır: gap 1 (G1), sentez (S), ve gap 2 (G2)'dir.

2.3.1.1 G1 Evresi

G1, mitoz sonucunda oluşan hücrenin oluşumundan DNA'nın replike olduğu sentez (S) fazına kadar geçen süredir. Bu evrede ribonükleik asitler (RNA) ve organeller çoğaltılır, hücre bölünmesi için gerekli proteinler ve adenozintrifosfat (ATP) sentezlenir. Özellikle iş iplikleri için gerekli proteinler bu evrede hazırlanmış olur (Cooper 2007). Hücre çoğalması ve bunun kontrolü ile ilgili çalışmalarda G1 evresinin önemi büyüktür. G1'in geç bir noktasında bütün hücreler iki yoldan birini izler. Hücreler ya döngüden çıkarak dinlenme durumuna geçer ve G0 evresine girer yada DNA sentezine başlayarak döngüye devam eder (Cooper, 2007). G0 fazındaki hücrelerin metabolizması ve biyokimyası hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi

için minimum düzeye düşürülür, hücreler bu evrede günlerce, aylarca hatta yıllarca kalabilmektedirler (Ross 2003, Golitsin ve Krylov 2010).

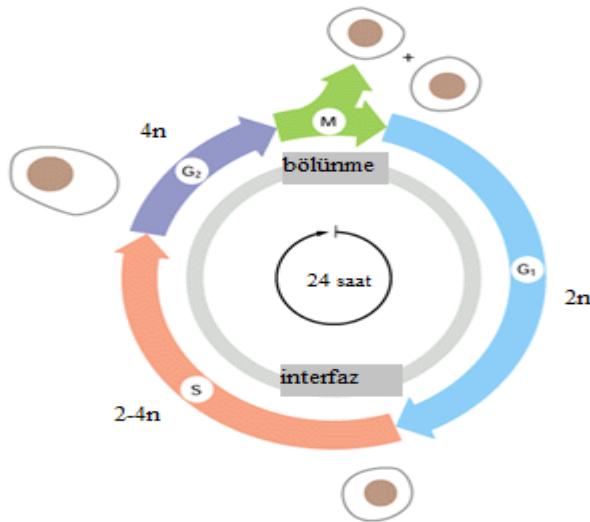
2.3.1.2 S Evresi

S fazı G1 fazının bitişini izler ve hücre döngüsünün interfaz safhasındaki en önemli olay S fazında gerçekleşir ki, bu evrede nükleustaki DNA iki katına çıkar (Şekil 2.4). Memeli hücrelerinde bu süre 6-8 saat sürer. DNA replikasyonunun gerçekleştiği evredir (Ross ve ark. 2003, Freshney 2005, Cooper 2007).

2.3.1.3 G2 Evresi

S evresininin bitişini izler. Bu evre yaklaşık olarak 3-5 saat sürer. Bu evrede her bir kromozomdan 2 kopya içerir ve bu yüzden $4n$ şeklinde ifade edilir (Cooper 2007). Bu evrede hücre büyümeye devam eder ve mitoz için gerekli olan proteinler sentezlenir. Ayrıca DNA'nın iki katına çıktığından emin olunur (Freshney 2005). G1 ve G2 fazları ile mitoz öncesi ve sonrasında hücreye büyüme zamanı sağlanmış olur (Ross 2003).

Hücre döngüsünde iki önemli geçiş vardır. Bunlardan biri G1 evresi ile kromozomların sentezlenmeye başladığı S evresi arasında, ikincisi ise G₂ evresi ile kromozomların yoğunlaştığı ve mitozla başladığı M evresi arasındadır (Ross 2003, Cooper 2007).



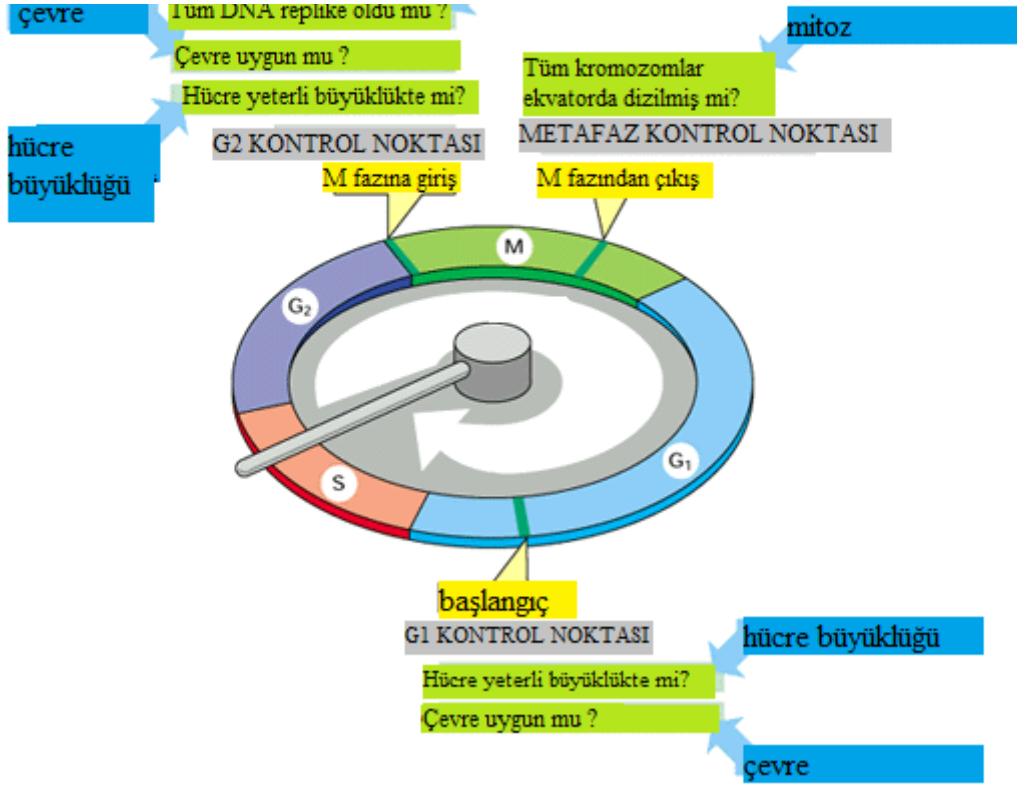
Şekil 2.4. Hücre döngüsünün şematik gösterimi (Alberts ve ark. 2002)

2.4 Hücre Döngüsünün Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü hücre içi sinyallerin yanında çevreden gelen hücre dışı sinyallerle de kontrol edilmektedir. Hücre dışı sinyallere örnek olarak büyüme faktörleri verilebilir. Ayrıca hücre büyümesi, DNA replikasyonu, mitoz gibi hücresel süreçler de hücre içi sinyalleri oluşturmakta ve hücre döngüsü sırasında etkili olmaktadır (Alberts ve ark. 2002, Cooper 2007).

Hücre döngüsünü kontrol eden moleküllerin miktarlarındaki ve aktivitelerindeki ritmik dalgalanmalar, hücre döngüsündeki ardışık olayların hızını belirler. Bu düzenleyici moleküller iki temel protein tipindedirler. Bunlardan bazıları, diğer proteinleri fosforile ederek onları aktive yada inaktive eden protein kinaz enzimleridir (Lodish ve ark. 2000, Ross ve ark. 2003, Cooper 2007). G1 evresi sonunda yer alan kontrol noktası G1 evresinden S evresine geçişi kontrol eder (Cooper 2007). Belirli protein kinazlar G1 ve G2 kontrol noktalarında “devam et” sinyali veren moleküllerdir (Freshney 2005, Cooper 2007) G1 evresinden S evresine geçişi kontrol eden ve G1 evresi sonunda yer alan kontrol noktası önemli role sahiptir (Copeer ve ark., 2007; Alberts B. ve ark., 2002). Bu düzenleyici nokta bira mayası olan *Saccharomyces cerevisiae*'de keşfedilmiş ve hem DNA replikasyonunu hem de hücre bölünmesini kontrol ettiği için sınır noktası olarak belirlenmiştir. Hücreler sınır noktası kabul edilen G1 kontrol noktasından geçtikten sonra S evresine girerler (Planas-Silva ve Weinberg 1997, Lodish ve ark. 2000, Cooper ve ark. 2007). Fakat 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 yada dinlenme evresi olarak adlandırılan G0 evresine girer (Ross ve ark. 2003, Cooper 2007). G0 evresinde hücrenin metabolizması ve biyokimyası hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli olan minimum düzeye düşürülür. (Ross, 2003) G0 evresindeki hücreler büyümeyi durdurmuş ve protein sentez hızını azaltmış olmalarına rağmen, metabolik olarak aktiftir (Alberts ve ark. 2002, Cooper 2007).

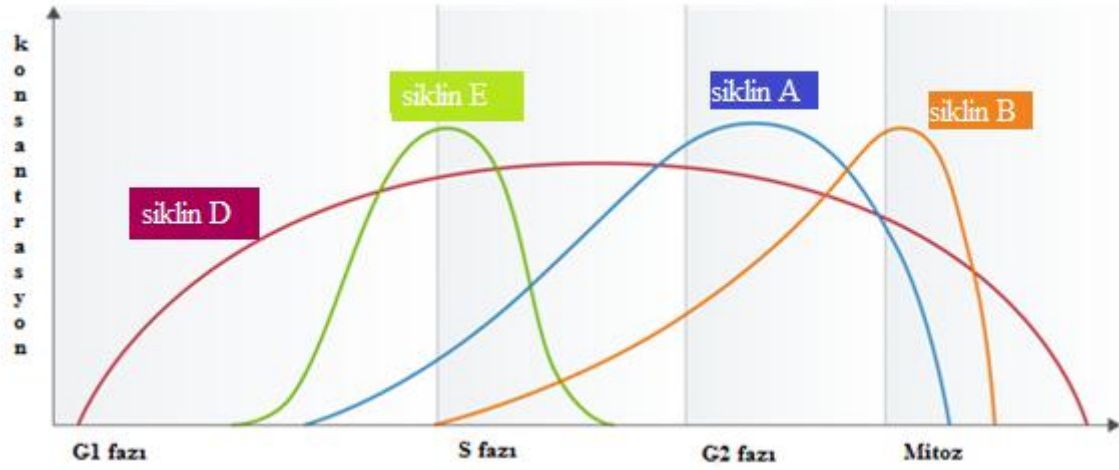
G1 kontrol noktasının yanında G2 kontrol noktası da hücre içi ve dışı sinyallerden etkilenir ve böylece hücre döngüsünde hücrenin G1 evresinden S evresine, G2 evresinden M evresine geçişi kontrol edilir (Cooper 2007). G2 fazında replike olmamış ya da hasarlı DNA mevcutsa, hücre uygun koşullar sağlanıncaya kadar M evresine geçemez (Planas-Silva ve Weinberg 1997, Copeer 2007). S kontrol noktası ise DNA replike olmadan önce DNA



Şekil 2.5. Hücre döngüsü kontrol noktaları (Alberts ve ark., 2002)

içeriğinin kontrol edilmesini ve hasar var ise tamir edilmesini sağlar (Lodish ve ark. 2000, Freshney 2005, Copeer 2007).

Hücre döngüsünün kontrolü G1, S, M noktalarında protein kinazlar ile sağlanmaktadır (Şekil 2.5). Büyümekte olan bir hücrede hücre döngüsünü yürüten kinazlar sabit bir derişimde bulunurlar ve çoğu zaman inaktif durumdadırlar. İnaktif formdaki kinazın aktif hale geçmesi için bir sikline bağlanması gerekir. Bir siklin-bağımlı kinazın (cyclin-dependent kinase, CDK) aktivitesi onun siklin partnerinin derişimindeki değişikliklere göre artar ya da azalır (Şekil 2.6). Siklin düzeyi interfaz boyunca (G1, S, G2) hızla artar ve daha sonra mitoz sırasında aniden düşer (Planas-Silva ve Weinberg 1997, Alberts ve ark., 2002, Cooper 2007, Golitsin ve Krylov 2010).



Şekil 2.6. Hücre döngüsü sırasında siklin seviyelerinin şematik olarak gösterimi (Malumbres ve Barbacid 2009)

Hücre döngüsü evreleri siklinler (siklin D, E, A), siklin-bağımlı kinazlar ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKI) gibi düzenleyici proteinlerin aktivasyonları ve ekspresyonları ile düzenlenir. Siklinler CDK'lar ile bağlanarak holoenzimleri oluşturur ve spesifik katalitik alt ünitelerin aktivasyonunu gerçekleştirir. Holoenzimlerin temel fonksiyonu retinoblastoma proteininin (Rb) fosforlanmasıdır, böylece retinoblastoma fosforilasyonu E2F (transkripsiyon faktörü) ailesi üyesi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna öncülük eder. E2F salınması, S evresinin ilerlemesini düzenleyen çeşitli genlerin eksprese olmasını sağlar. Retinoblastoma proteinleri de G0 evresinden G1 evresine geçişin düzenlenmesinde anahtar rol oynar ve aktivitesi siklin D1-CDK4 kompleksi ile düzenlenir. Siklin D-CDK4/6 erken G1 evresinde siklin E-CDK2 ise S evresine geçişte önemlidir. G1 fazı siklin grupları tarafından desteklenir. G1 fazının ortasında siklin D, sonlarına doğru ise siklin E aktiftir. Siklin/CDK holoenzimlerinin kinaz aktiviteleri CDKI tarafından negatif olarak düzenlenir (Planas-Silva ve Weinberg 1997, Hashitoma ve ark. 2004, Cooper ve ark. 2007, Zhou ve ark. 2013).

Çizelge 2.1. CDK ve siklinlerin hücre döngüsünde aktif olduğu evreler

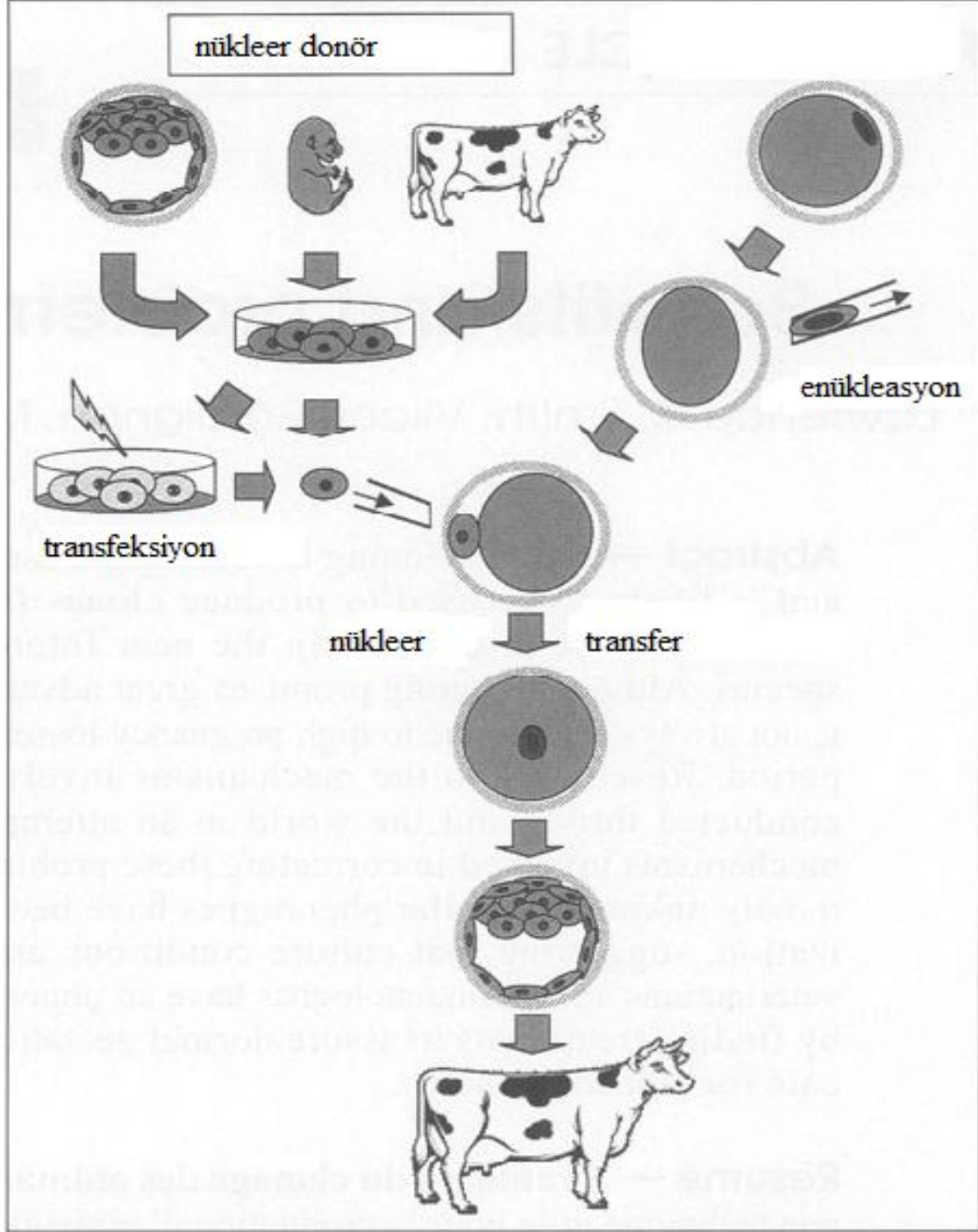
CDK	Siklin	Hücre Döngüsü Faz Aktivitesi
CDK4	siklin D1, D2, D3	G ₁ fazı
CDK6	siklin D1, D2, D3	G ₁ fazı
CDK2	siklin E	G ₁ /S faz geçişi
CDK2	siklin A	S fazı
CDK1 (cdc2)	siklin A	G ₂ /M faz geçişi
CDK1 (cdc2)	siklin B	Mitoz
CDK7	siklin H	CAK, tüm hücre döngüsü fazları

2.5 Hücre Senkronizasyonu

Senkronizasyon, eş zamanlama veya eşleme, eşgüdümlü çalışan parçalı sistemlerin zamanlamalarının eşleştirilmiş olduğunu ifade eder. Hücre senkronizasyonu ise bir kültürdeki hücre döngüsünün farklı aşamalarında bulunan hücrelerin çeşitli moleküler ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak aynı evreye getirilmesidir (Grdina ve ark. 1987). Bir kültürdeki hücreler farklı fazlarda olabilirler. Genetik olarak birbirinin aynı bireylerin yaratılması anlamına gelen nükleer transferde temel materyaller oosit (metefaz II evresinde) ve G1/G0 de tutulan donör hücrelerdir. Bu teknoloji donör anneden alınan döllenenmemiş yumurtanın nükleusunun çıkarılması ve kopyalanmak istenen organizmadan alınan hücrenin nükleusunun, bu içi boşaltılmış yumurtaya aktarılması yolu ile tüm organizmayı kopyalama ilkesine dayanmaktadır (Şekil 2.7) (Ekinci ve ark. 2005). Bugüne kadar fibroblastlar, meme bezi hücresi, kumulus hücresi, oviduct hücresi, lokositler, granüloza hücresi, üreme hücresi, kas hücresi, karaciğer hücresi, kıkırdak hücresi gibi çok değişik erişkin hücre tipleri klonlama çalışmalarında kullanılmış, farklı başarı oranları ile sonuçlanmıştır (Brem ve Kuhholzer 2002, Arat ve ark. 2011) .

NT çalışmalarındaki en önemli faktör farklılaşmış somatik donör hücrelerin yeniden programlanabilmesidir. Bu mekanizmada destekleyici rol oynayan diğer kritik faktör ise donör hücrelerin hücre siklus fazıdır (Oh ve ark. 2009). Donör hücrelerin buldukları hücre döngüsü evresi NT başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Boquest ve ark. 1999). NT çalışmalarında donör hücrelerin G0/G1 evresinde olması tercih edilir. Yapılan birçok NT çalışması bu dönemdeki hücrelerin yeniden programlanmaya daha uygun olduğunu ve daha yüksek oranda normal embriyo gelişimi ile sonuçlandığını göstermiştir (Wilmut ve ark. 1997, Baguisi ve ark. 1999, Kubota ve ark. 2000, Polejaeva ve Campbell 2000, Arat ve ark. 2001a, Gibbons ve ark. 2002). Hücre tiplerinin G0/G1 evresine gelme oranları ile ilgili de birçok çalışma yapılmıştır. Halen günümüzde donör hücreler G0/G1 evresine getirilerek kullanılmaktadır (Hayes ve ark. 2005). Donör hücreleri G0/G1 evresine getirebilmek için farklı yöntemler denenmiştir. Hücreleri istenen döneme getirmek için uygulanan serum açlığı (düşük serum varlığında kültür) yöntemi ile hücreler yeteri kadar beslenemedikleri için dinlenme evresine yani G0 evresine geçerler (Wilmut ve ark. 1997) veya hücreler kültür kaplarını kapladıklarında birbirleri ile temas ettikleri için (kontakt inhibisyon) S evresine geçemezler ve G1'de kalırlar (Cibelli ve ark.

1998, Arat ve ark. 2001b, Arat ve ark. 2002) veya spesifik CDK2 inhibitörü olan roskovitinin besiyerine uygulanması ile de hücre siklusu düzenlenir ve hücreler G1 evresinde engelenir. Roskovitinin ortamdaki kaldırılması ile hücreler S evresine girip hücre döngüsünü tamamlarlar (Arat ve ark. 2001, Gibbons ve ark. 2002, Oh ve ark. 2009, Çaputçu, 2013).



Şekil 2.7. Nükleer transfer işleminin şematik gösterimi
(<http://www.cs.washington.edu/building/art/JacobLawrence>)

2.6 Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz)

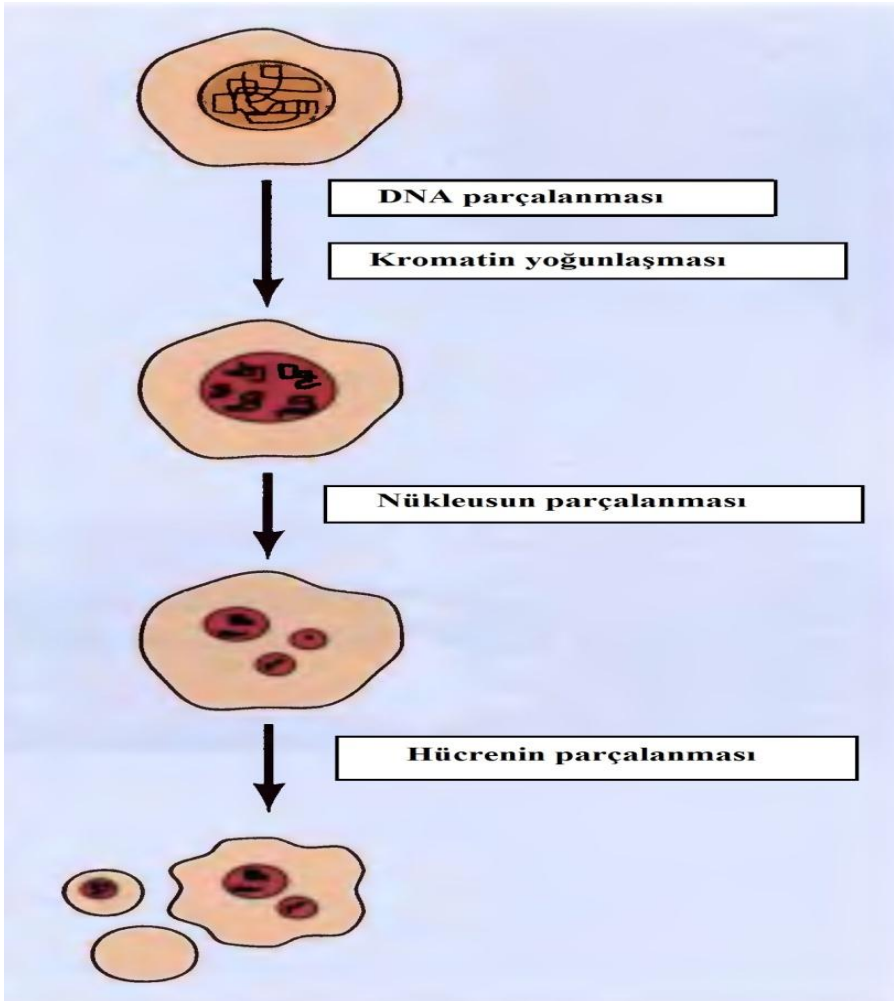
Ökaryot organizmalarda yaşam, belli başlı kısımlardan oluşmaktadır. Bunlar doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Yaşamın bu şekilde sürdürülebilmesi için canlıyı oluşturan hücrelerin sayısal dengesi çok önemlidir. Canlıda yeni hücreler oluşurken, varolan hücrelerin bir kısmı da hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta, böylelikle denge korunmaktadır. Varolan bu hücreler fizyolojik, programlanmış hücre ölümü olan apoptoz ve patolojik hücre ölümü nekroz gibi çeşitli hücre ölüm tipleriyle yok olmaktadır (Thompson 1995, Ameisen 1996).

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskobunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdaki daha farklı hücre ölümü gösterilmiş ve buna, Yunanca'da ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen "apoptozis" adı verilmiştir (Cohen 1993).

Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptoz ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (Schwartzman ve Cidloski 1993). Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptoz, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayırımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (Cooper 2007).

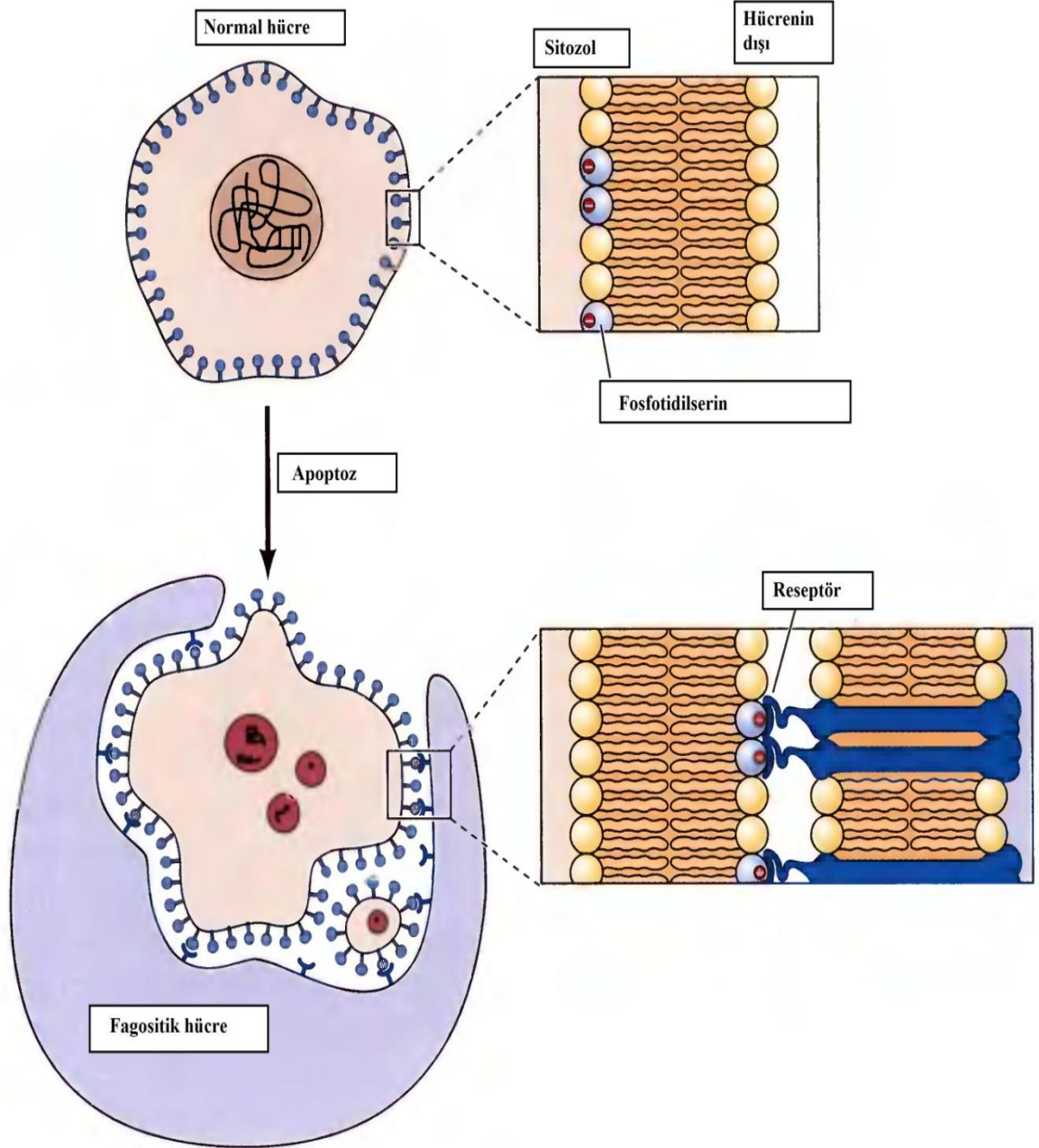
Apoptoz genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla düzenlenir. Hücre apoptoz için sinyal aldıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve yoğunlaşmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer parçalanır, dağılır. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır, kromatini yoğunlaşır piknotik bir görünüm alır. Apoptoza uğrayan bir hücrede laminlerin ve aktin filamentlerinin yapısının bozulması sonucu sitoplazma çekilmeye ve küçülmeye başlar. Kromatin ve çekirdekte

bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte yoğunlaşma başlar ve çoğu zaman kromatinin çekirdek zarının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle at nalı biçiminde görülür. Çekirdek de hücre gibi büzülür ve bazen zarla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. DNA'sı nükleozomlarından kesilir, bu nedenle jel elektroforezinde tipik merdiven bant görünümü alır. Nükleer porlar kromatinin zara komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar. Hücre büzülme ve küçülmeye devam eder ve makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği zarla çevrili küçük parçalara ayrılır. Ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimcikler meydana gelir. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır (Şekil 2.8). Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Ross ve ark. 2003, Cooper 2007, Campbell ve ark 2003).



Şekil 2.8. Apoptozdaki olayların şematik olarak gösterilmesi (Cooper 2007)

Apoptoz gerçekleşirken hücre zarında değişiklikler gözlenmekte, zar yapısında bulunan fosfotidilserinler hücre zarının ic yüzünden dış yüzüne yer değiştirmektedir. Zar bütünlüğü korunmasına rağmen, fosfotidilserinlerin yer değiştirmesinden dolayı zarda kabarcıklar meydana gelir (şekil 2.9) (Ross ve ark. 2003, Cooper 2007).



şekil 2.9. Hücre yüzeyindeki değişikliklerin fagositler tarafından fark edilmesinin ardından hücrenin fagositoz edilişi (Cooper 2007)

2.6.1 Apoptozun Düzenlenmesi

Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller; p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyer rol oynar. Bcl-2 ailesine ait proteinler, proapoptotik ve antiapoptotik grup olmak üzere birbirine zıt çalışan iki gruptan oluşur. Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler sitozolde yer alırlar. Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bu proteinler de mitokondri dışı zarında, endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında yer alırlar, por oluşumunu sağlayıp iyon taşınmasını düzenlerler. Özellikle hücredeki Ca^{++} oranını kontrol ederler.

Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını engelleyerek apoptozu inhibe ederler (Adams ve Cory 2001). p53 ise hücrede DNA hasarı olduğunda hücre döngüsünü G1 fazında durdurup hücreye DNA tamiri için zaman veren bir transkripsiyon faktörüdür. Hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas yapımını artırıp, Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılar ve apoptozu indükler (Vousden ve Lu 2002).

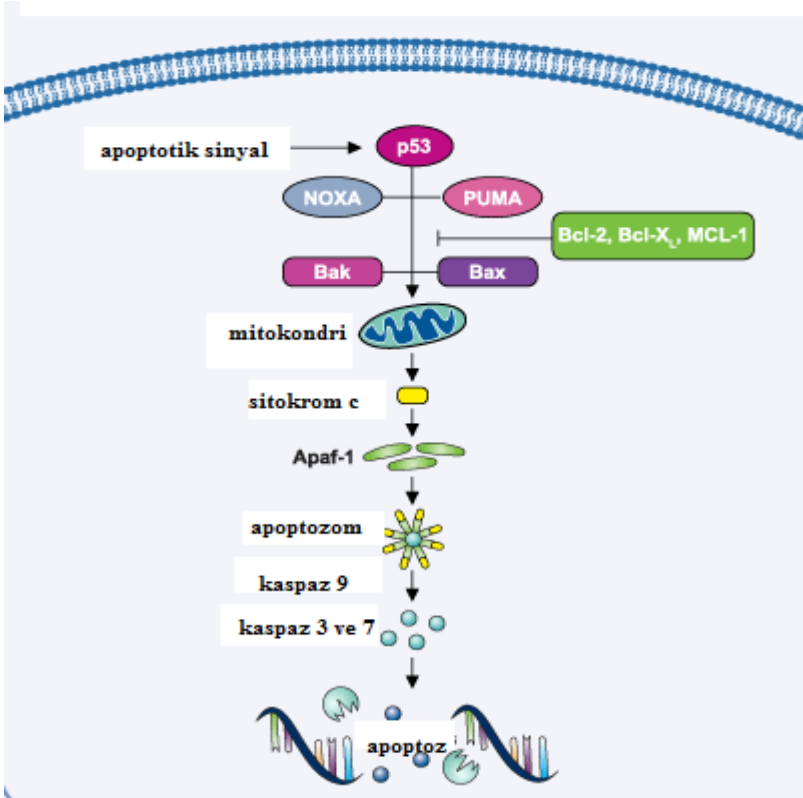
Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağımlıdır. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. 100 farklı hedef proteini keserek apoptozu neden olurlar. 3 tiptirler: Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2,8,9,10), efektör kaspazlar (kaspaz 3,6,7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz 1,4,5,11,12,13,14). DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar (Ross ve ark. 2003).

2.6.2 Apoptozun Mekanizması

Apoptoz hücrede intrinsik (mitokondriyal) yol ve ekstrinsik yol olmak üzere iki yolla gerçekleşir. Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (iskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir. Her iki sinyal yolunda da kaspazlar görev almaktadır (Ross ve ark. 2003).

2.6.2.1 İntrensik Yol

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid, bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktive eder. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri zarında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir. Böylelikle mitokondriyon membranındaki porlardan sitokrom-c, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonükleaz-G), Ca^{++} ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır. Sitokrom-c, oksidatif fosforilasyon için elektron taşıyıcı. Smac, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. IAF'ü ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller. AIF, çekirdeğe yerleşir ve onu parçalara ayırır. Endo-G de DNA'yı parçalar. Mitokondri porlarından salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde parçalanmasına neden olur (Şekil 2.10) (Adrian ve Martin 2001, Adams ve Cory 2001, Spierings ve ark., 2004).

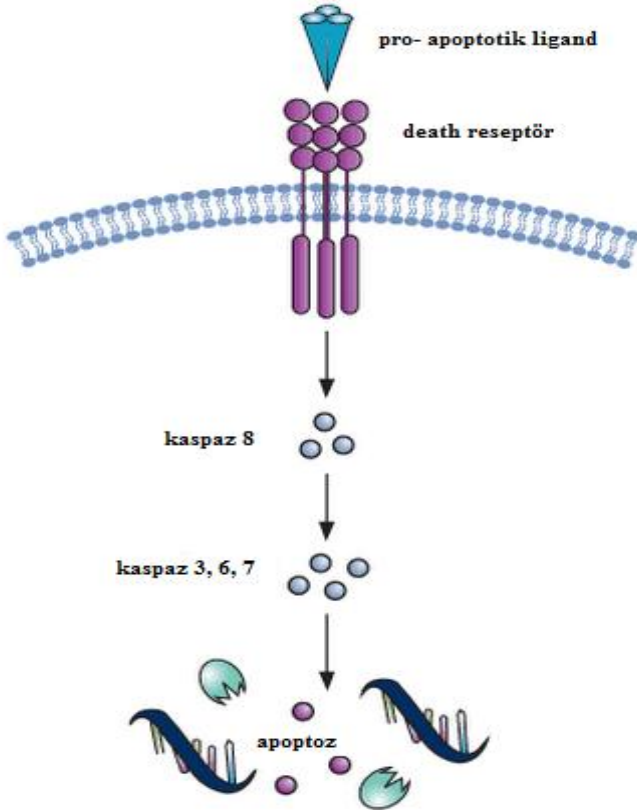


Şekil 2.10. Apoptoz mekanizmasında intrinsik yolun şematize edilmesi (<http://www.biooncology.com>)

2.7.2.2 Ekstrinsik Yol

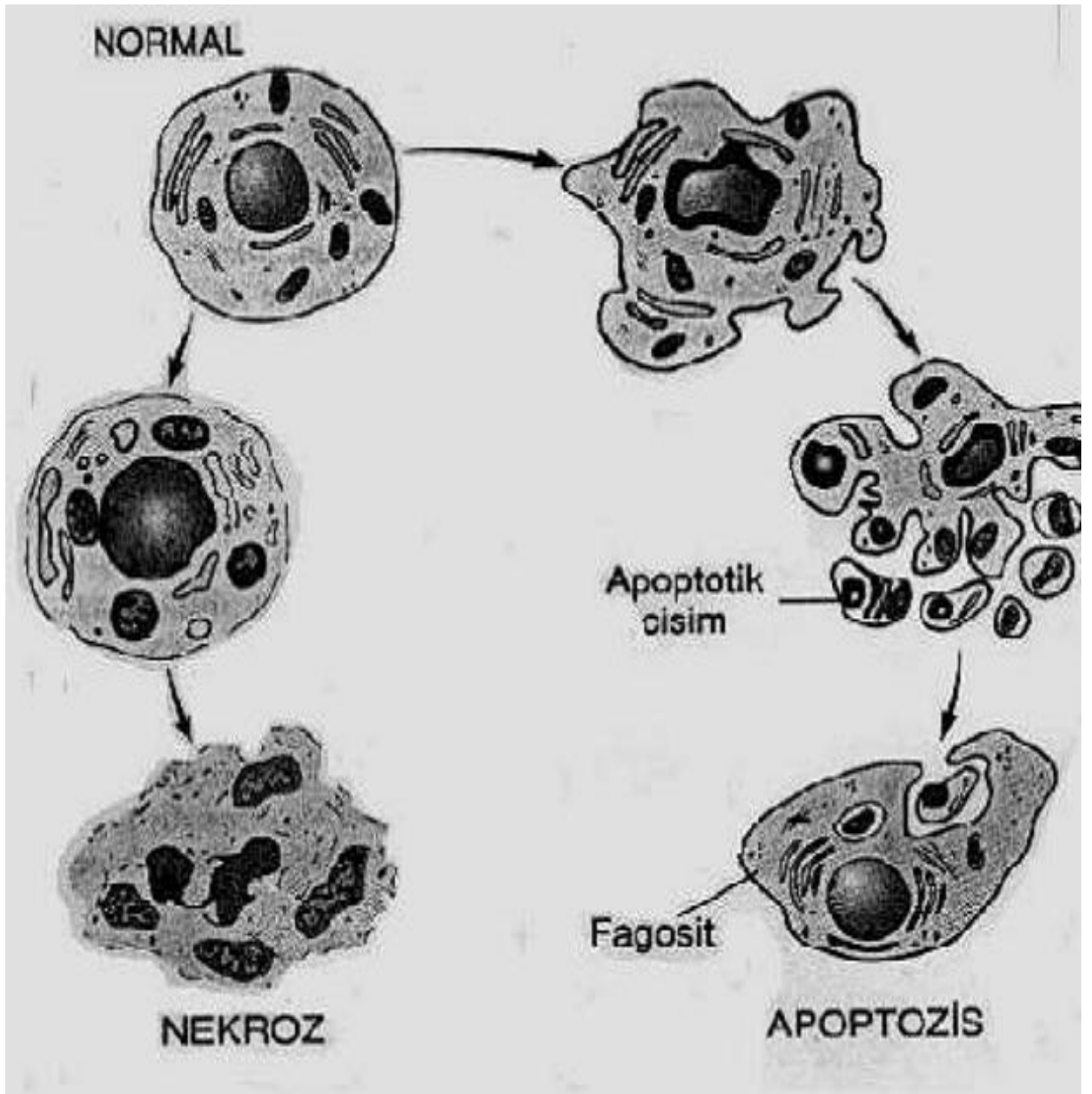
Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör, adaptör moleküller ve prokaspazla birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Ya doğrudan kaspaz-8, kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA parçalanmasına neden olur.

Ekstrinsik yollardan birisi de sfingolipit yoludur. Sfingomiyelin, hücre zarı yapı taşlarından biridir. Radyasyon, kemoterapi, ölüm reseptörleri ile aktive olan sfingomyelinaz, sfingomiyelini seramid'e dönüştürür. Seramid ise seramidaz ile sfingozine dönüşür. Sfingozin de Bid yapımını artırarak apoptozu tetikler (Adrian ve Martin 2001, Adams ve Cory 2001, Spierings ve ark. 2004)



Şekil 2.11. Apoptoz mekanizmasında ekstrinsik yol (<http://www.biooncology.com>)

Bir başka hücre ölüm şekli ise nekrozdur. Nekroz, dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal etmenlerle (iskemi, hipertermi, hipoksi, litik viral enfeksiyon, toksik maddeler, ağır metaller, şiddetli oksidatif stres, radyasyon) karşılaşıldığında ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Hücrelerin şişmesi ve lizis ile karakterizedir. Hücre zarında meydana gelen hasar hücre dışı iyonların ve suyun hücre içine girmesine, hücrenin şişmesine neden olur. Hücre zarı yırtılarak lizise neden olur. Bu nedenle nekrotik hücre ölümlerinde çevre dokuda büyük zarar ve yoğun enflamasyon görülür (Ross ve ark. 2003).



Şekil 2.12. Apoptoz ve nekrozun karşılaştırılması (Cohen 1993)

Bu çalışma ile hangi türün hangi hücre tipinde, hangi yöntemin en yüksek oranda senkronizasyonu sağladığı tespit edilmeye çalışılmış, aynı zamanda uygulamanın hücre canlılığı üzerindeki etkileri de incelenerek hücreye en az zarar veren yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Tüm çalışma hem taze hem dondurulmuş hücrelerde karşılaştırmalı yapılarak özellikle dondurulmuş hücrelerde sonuçlarda fark olup olmadığı araştırılmıştır. Dondurulmuş hücrelerin sonuçları özellikle hücre bankalarında saklanan hücrelerle yapılacak çalışmalar için ayrı bir önem taşımaktadır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Dokuların Alınması

Çalışma materyali mezbahada kesinlen sığır, koyun, keçi ve mandadan elde edilen farklı dokulardan oluşmaktadır. Her bir türden bir erkek bir dişi hayvana (toplam 8 hayvan) ait doku parçaları kullanılmıştır. Bu dokular erkek için kas, kulaktan alınan kıkırdak ve derinin dermisi iken, dişi için bu dokulara ovaryumdan elde edilen granüloza hücreleri de ilave edilmiştir.

Dokular temiz bistüri uçları ile alındıktan sonra %5 antibiyotik-antimikotik içeren tuzlu fosfat tampon (PBS) çözeltisi içerisinde ve soğuk ortamda muhafaza edilerek en geç 2 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Kullanılana kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.1.2 Kullanılan Aletler

-80 °C Derin dondurucu, Hettich, Almanya

Buzdolabı +4°C, Profilo, Türkiye

Akış Sitometrisi, Partec, Almanya

Akış Sitometrisi, BD FACSCalibur Flow Cytometer, ABD

Hassas terazi, AND GF-600, Hollanda

Isıtıcı tabla, WiseStir, Kore

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı, WiseStir, Kore

İnvert mikroskop, BOECO-BAB DCM 510, Almanya

Laminar Flow Kabin, Healforce HF Safe 1200, Çin

Otoklav, Alp CL40M, ABD

Ph Metre, Jenco 6173, ABD

Santrifüj, Hettich Universal 320, Almanya

Su banyosu, DAIHAN WB-11, Kore

Ultra saf su cihazı, Millipor Direct-Q 3 UV, ABD

Vakum pompası, KNF022 AN 18, ABD

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Antibiyotik- antimikotik, Gibco, ABD

Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma, ABD

DMEM-F12, Gibco, ABD

DPBS, Sigma, ABD

Etil alkol, Sigma, ABD

Fötal Sığır Serumumu, Sigma, ABD

Hidroklorik asit (HCL), Sigma, ABD

Izopropil alkol (2-propanol), Sigma, ABD

Keçi Serumumu, Sigma, ABD

NaCL, Sigma, ABD

Propidyum iyodit, Sigma, ABD

RNaz A, AppliChem, ABD

Roskovitin, Sigma, ABD

Sodyum bikarbonat (NaHCO₃), Sigma, ABD

Tripan blue, eBioscience, Almanya

Tripsin, Gibco, ABD

3.1.3.1 Kullanılan Antikorlar

Aktin, Sigma (A 2547), ABD

Vimentin Sigma, (C 9080) , ABD

Cytokeratin, Abcam (ab9749), ABD

Elastin Santa Cruz (sc-58756), ABD

Desmin Santa Cruz, (sc-58745), ABD

Sekonder antikor, anti Mouse IgG FITC, Santa Cruz, (sc-2010), ABD

3.1.3.2 Kullanılan Çözeltiler

%4 Paraformaldehit (PFA): 4 gram PFA tartılarak 100 ml DPBS içerisinde çözülür.

HBS Çözeltisi (High Salt Buffer): 14.61 gram sodyum klorür 1M Tris içerisinde çözülür ve 1 litreye tamamlanır.

Block Çözeltisi: 0,5 polivinilpropoid 48 ml HBS içerisinde çözülür. % 3keçi serumu ve %0,1 triton X100 hazırlanan çözeltiliye eklenir. +4° C'de saklanır. 48 saat içerisinde kullanılmalıdır.

Yıkama Çözeltisi: 50 ml HBS içerisinde %0.05 olacak şekilde Tween 20 eklenir ve +4° C'de saklanır.

3.1.3.3 Kullanılan kitler

Apoptoz Belirleme Kiti, eBioscience, Almanya

Kit 1.5 ml rh Annexin V-FITC, 50 ml bağlanma solüsyonu (4X), 3.2 ml propidyum iyodit içermektedir.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Primer Kültür

Hücre izolasyonu ve kültürü daha önce belirlenen protokollere uygun olarak yapılmıştır (Arat ve ark. 2011). Özetle; laboratuvara getirilen ve +4 °C'de saklanan dokular %5 antibiyotik-antimikotik içeren DPBS ile yıkandıktan sonra steril bistüri ucu ile küçük parçalara (1 mm³) ayrılarak 35 mm kültür petrilere ekilmiştir. Doku parçalarının yapışmasının ardından tüm dokuların yüzeyini kaplayacak şekilde %15 fetal buzağı serumu (FBS) ve %1 antibiyotik içeren hücre kültür medyumunu (DMEM/F12) ile kaplanmıştır. Ekim yapılan doku petrilere 37° C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilmiştir. Kültür başlangıcından 10-12 gün sonra doku parçalarından hücre çoğalmaları incelenerek, kültürün medyumunu değiştirilmiştir. Kültür kabını kaplayan hücreler büyük doku parçaları uzaklaştırıldıktan sonra %0.25 tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılıp 60 mm'lik kültür petrilere aktarılmıştır (Arat ve ark. 2011).

Ovaryumların folikülerinden aspire edilen granüloza hücreleri de 35 mm'lik kültür kaplarına ekildikten sonra, aynı kültür medyumunda kültür kaplarını kaplayana kadar kültüre edilmiş, ardından tripsinlenerek kaldırılmış ve 60 mm 'lik kültür petrilere aktarılmıştır (Arat ve ark. 2011).

3.2.2 Hücre Kültürü

Primer kültür sonrası konfluent olan petrilere doku parçaları aspirasyon yöntemi ile alınmıştır. Petrilere besiyeri çekildikten sonra petrilere Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuzu (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS) ile yıkanmış, %0.25 tripsin-EDTA solusyonu eklenerek 5 dakika boyunca 37° C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Ardından konulan tripsinin inaktive olması için tripsin miktarının 2 katı kadar %10 Föetal Sığır Serumu (FBS), %1 antibiyotik içeren DMEM/F12 eklenerek hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak 6 dk 1000 rpm'de santrifüj edilmiş, ardından %10 FBS, %1 antibiyotik içeren DMEM/F12 ile sulandırılarak 60 mm'lik kültür petrilere ekilmiştir. Aynı zamanda bir kısım hücreler dondurularak saklanmıştır (Arat ve ark. 2011).

3.2.3 Hücrelerin Karakterizasyonu

Hücre karakterizasyonu hücrelerin elde edildiği doku tipi ve hücrelerin çeşidi göz önüne alınarak seçilen monoklonal antikolar yardımı ile yapılmıştır. Primer kültür sonrası elde edilen kültürdeki hücrelerin her biri 96 kuyulu petrilere ekilerek, %4 paraformaldehit (PFA) ile oda sıcaklığında 20 dk fikse edilmiştir. Blok çözeltisi kullanılarak primer ve sekonder antikolar aşağıda belirtilen oranda hazırlanmıştır.

Aktin antikor, 1:200 seyreltme

Vimentin antikor, 1:200 seyreltme

Desmin antikor, 1:100 seyreltme

Elastin antikor, 1:50 seyreltme

Sitokeratin antikor, 1:200 seyreltme

Sekonder antikor, 1:75 seyreltme

Fikse edilen örnekler DPBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 45 dk blok çözeltisi içerisinde bekletilmiş, ardından HBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Primer antikorlar (aktin, vimentin, elastin, desmin, sitokeratin) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilen örnekler HBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra kuyulara sekonder antikor aktarılmış ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Yıkama solüsyonu ile yıkanan örnekler floresan ataçmanlı invert mikroskopta boyamalar kontrol edilmiştir (Çaputçu 2013).

3.2.4 Hücrelerin dondurulması

Doku parçalarından üreyen hücreler tripsinlenerek 60 mm'lik kültür petrilere aktarılmıştır. Kültür kaplarını kaplayan hücreler tekrar tripsinlenmiş, bir kısmı senkronizasyon çalışması yapmak için tekrar ekilirken, bir kısmı ise dondurulmuştur. Dondurma sıvısı olarak %80 FBS ve %20 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren ve +4° C'de saklanan dondurma medyumunu ve DMEM/F12 içinde süspanse olarak bulunan hücreler 1:1 oranında karıştırılarak dondurma tüplerine konmuştur. Hücreleri içeren dondurma tüplerindeki son derişim %40 FBS, %10 DMSO ve %50 DMEM/F12 olmuştur. Tüpler sıcaklığı 1° C/dk düşüren dondurma kaplarındaki gözlere yerleştirilmiş ve dondurma kabı -80° C derin dondurucuya konmuştur (Arat ve ark. 2011). Yapılan tüm analizlerde kullanılan hücrelerin pasaj sayısı 2 ile 6 arasındadır.

3.2.5 Senkronizasyon Deney Grupları

3.2.5.1 Kontrol Grubu (Grup 1)

Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS içeren DMEM/F12 medyumunda kültüre edilmiş, konfluent (%50 konfluent) olmadan, yani kültür kabını kaplamadan tripsin ile kaldırılmış, hücre siklus analizi ve hücre canlılık analizi için hazırlanmıştır (bölünen normal hücre grubu). Kültür kabının konfluensisi mikroskopta gözle incelenerek belirlenmiş, kültür kabını yarı yarıya kaplayan kültürler %50 konfluent olarak kabul edilmiştir.

3.2.5.2 Roskovitin-1 Hücre Grubu (Grup 2)

Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS içeren DMEM/F12 medyumunda kültüre edilmiş, konfluent olmadan (%50 konfluent) medyuma 15 µM roskovitin ilave edilerek 24 saat kültüre edilmiş, süre sonunda tripsin ile kaldırılmış, hücre siklus analizi ve hücre canlılık

analizi için hazırlanmıştır.

3.2.5.3 Roskovitin-2 Hücre Grubu (Grup 3)

Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS içeren DMEM/F12 medyumunda kültüre edilmiş, konfluent olmadan (%50 konfluent) medyuma 30 µM roskovitin ilave edilerek 24 saat kültüre edilmiş, süre sonunda tripsin ile kaldırılmış, hücre siklus analizi ve hücre canlılık analizi için hazırlanmıştır.

3.2.5.4 Erken Konfluent Grubu (Grup 4)

Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS içeren DMEM/F12 medyumunda kültüre edilmiş konfluent olmaları yani kültür kabını tamamen kaplaması sağlanmıştır (Kontakt inhibisyon). Ertesi gün hücreler tripsin ile kaldırılmış ve hücre siklus analizi ve hücre canlılık analizi için hazırlanmıştır.

3.2.5.5 Geç Konfluent Grubu (Grup 5)

Hücreler konfluent olmasının ardından 72 saat boyunca %10 FBS içeren medyunda kültüre edilmeye devam edilmiştir. Sürenin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılmış, hücre siklus analizi ve hücre canlılık analizi için hazırlanmıştır.

3.2.5.6 72 Saat Serum Açlığı Grubu (Grup 6)

Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS içeren DMEM/F12 medyumunda kültüre edilmiş ve konfluent olmadan (%50 konfluent) medyum %0.5 FBS içeren DMEM/F12 medyumuyla değiştirilmiştir. Bu düşük serumlu ortamda hücreler 72 saat kültüre edilmiştir. Sürenin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılmış, hücre siklus analizi ve hücre canlılık analizi için hazırlanmıştır.

3.2.5.7 120 Saat Serum Açlığı Grubu (Grup 7)

Hücreler kültür kabına ekilerek %10 FBS içeren DMEM/F12 medyumunda kültüre edilmiş ve konfluent olmadan (%50 konfluent) medyum %0.5 FBS içeren DMEM/F12

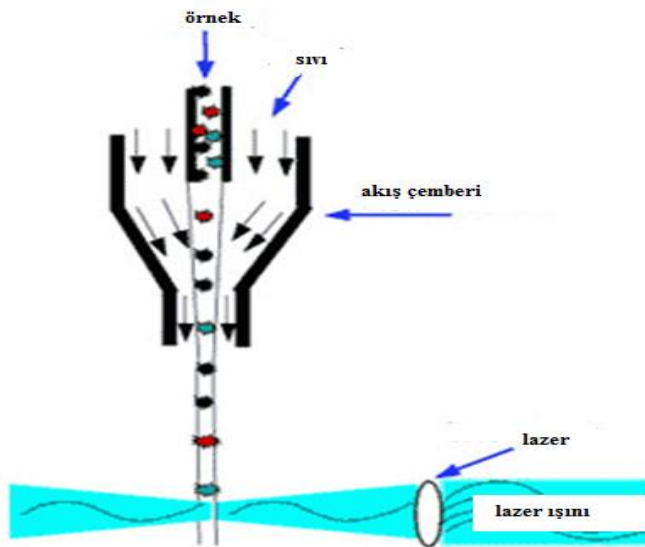
medyumuyla değiştirilmiştir. Bu düşük serumlu ortamda hücreler 120 saat kültüre edilmiştir. Sürenin sonunda hücreler tripsin ile kaldırılmış ve hücre siklus analizi ve hücre canlılık analizi için hazırlanmıştır.

Bu deney grupları 4 farklı türden (sığır, koyun, keçi, manda) elde edilen tüm hücre tiplerine (fibroblast, kas, kıkırdak, granüloza) ve aynı dokulardan elde edilen dondurulup çözülen hücrelere uygulanmıştır.

3.3. Analiz Yöntemleri

Hücre siklus analizinde de hücre canlılığı analizinde de akış sitometrisi kullanılmıştır. Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Akış sitometrisi ise akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir.

Akış sitometrisi başlıca akış (sıvı) sistemi, ışık kaynağı (lazer ışını), filtreler, sinyal dedektörleri, bilgisayar ve yazılım programlarından oluşmaktadır. Akış sitometrisinde hücreler, sıvının içerisinde bir ışık demetinin önünden tek tek geçerler (Şekil 3.1). Bir hücre lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan floresan ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur (Dunphy 2004).

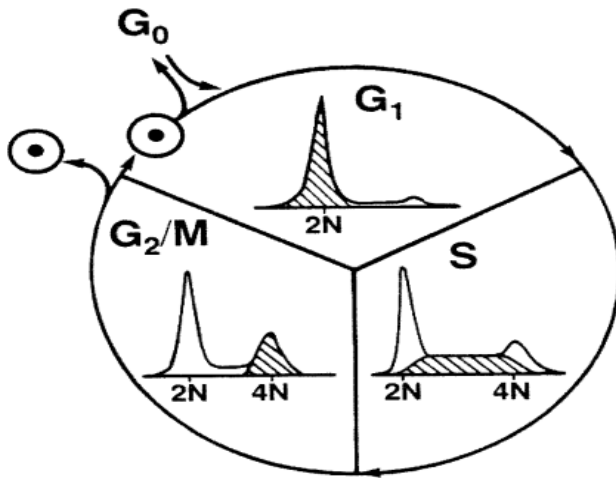


Şekil 3.1. Sıvı bir sistem içinde hücrelerin lazere taşınması ve tek tek lazerden geçişi (<http://www.bd.com.tr>)

Örnekler florokromlar ile boyandığında bu florokromlar lazer ışığından enerji absorbe ederler ve onu daha düşük bir enerjiyle ve uzun dalga boyunda yeniden dışarı verirler. Dışarı verilen bu ışığın miktarı hücrelerdeki florokromun miktarı ile orantılıdır. DNA boyamasında en çok kullanılan florokromlardan propidyum iyodit (PI) maksimum 488 nm dalga boyunda uyarılır ve maksimum 620 nm dalgaboyunda ışın yayar. Yansıyan ışın ve yeni dalga boylarının bir anlam ifade edebilmesi için cihazın detektörlerinde üretilen analog sinyaller analog-dijital dönüştürücüler tarafından bilgisayar analizi için dijital sinyaller haline getirilir.

3.3.1 Hücre Siklusu Analizi

Hücre siklusunun farklı aşamalarındaki hücreler DNA içeriklerine göre ayırt edilebilir. G1 evresinde hayvan hücrelerinin DNA içeriği 2C iken S fazının sonunda DNA içeriği 4C olur. Hücreler S fazında 2C-4C arasında DNA içeriğine sahiptir. G2 ve M fazlarında 4C olarak kalır, Sitokinez sonrası DNA miktarı tekrar 2C olur. (Cooper, 2007) Her siklus fazında bulunan DNA miktarının farklı olması bunların ölçüsünün yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Hücre içerisindeki DNA'nın propidyum iyodit ile boyanmasının ardından akış sitometrisi yöntem ile hücre siklus fazları kolaylıkla ölçülebilmektedir (Schippers ve ark. 2011) Deneysel olarak DNA miktarındaki bu değişim DNA'ya bağlanan propidyum iyodit gibi özel floresan boya ile akış sitometrisi ile tek bir hücredeki floresan yoğunluğunun ölçülmesi sayesinde saptanır ve hücreler G1, S ve G2/M fazlarında ayrılırlar (Şekil 3.2) (Cooper 2007).



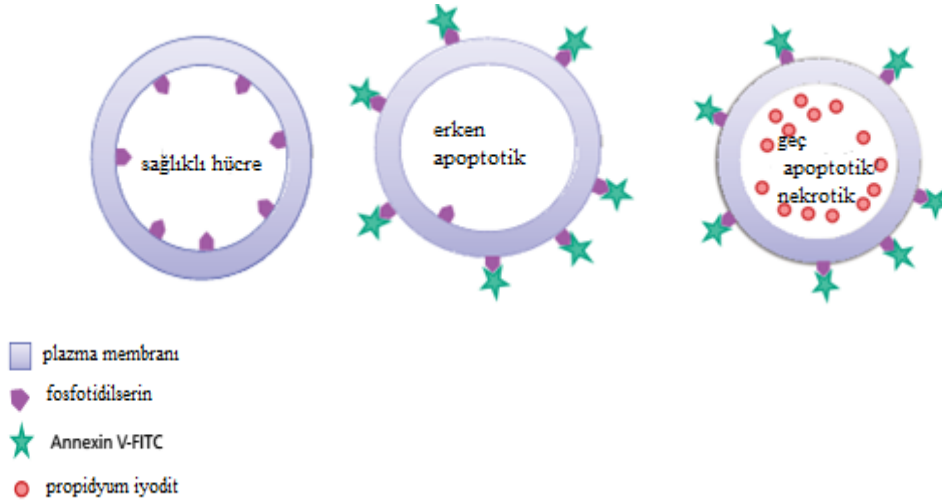
Şekil 3.2. Hücre döngüsünün her bir fazının akış sitometrisinde gösterimi (www.phoenixflow.com)

Hücrelerin siklus dönemlerini belirlemek amacıyla analiz edilecek hücreler %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu ile kültür kabından kaldırılmış ve santrifüj edilmiştir. Hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edilmiş ve 1 ml DPBS ile sulandırılmış, ardından 3 ml soğuk etanol (%70) ilavesi ile 4° C’ de 20 dk bekletilerek fikse edilmiştir. Fikse edilen hücreler DPBS ile tekrar yıkandıktan sonra hücre peletine hücrelerin geçirgenliği için 100 µg/ml RNaz A, %0,1 Triton X100 ilave edilmiş ve 500 µl DPBS içerisinde 20 µg/ml propidyum iyodit içeren boyama solüsyonu ile 37° C yarım saat bekletildikten sonra akış sitometri cihazı (Partec-CyFlow Space) ile analizler yapılmıştır. G0/G1, S, G2/M fazlarındaki hücrelerin oranı hesaplanmıştır (Gibbons ve ark. 2002, Dalman ve ark. 2010).

3.3.2.Hücrede Apoptoz ve Nekroz Analizi

Akış sitometrisinde apoptoz esnasında plazma zarındaki fosfolipitlerin yapılarında meydana gelen değişikliklere hassas antikoagulan protein olan annexin V kullanılarak apoptoz miktarı ve yüzdesi belirlenebilir (Shynkar ve ark. 2007, Çaputçu 2013). Apoptoz ve nekroz analizlerinde annexin V olarak bilinen ve 35-36 kDa büyüklüğünde, fosfatidilserine yüksek ilgisi olan Ca⁺² bağımlı fosfolipit bağlayıcı protein kullanılır ve bu protein apoptotik hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanır. Annexin V’e florokromlar ile bağlanır, bu sayede akış sitometrisinde apoptoza giden hücreleri belirlemede kullanılır.

Fosfatidilserinlerin yer değiştirmesi hücre membran zarının bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Annexin V, hücrenin dış yüzeyine yer değiştiren fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir maddeden FITC ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. Propidyum iyodit (PI) zar bütünlüğü bozulmamış hücrelerden geçemezken, hasarlı yada ölü olan hücrelerde bozulmuş olduğu için geçebilir, böylece annexin V ve PI boyası birlikte kullanılarak erken ve geç apoptozu belirlemede kullanılır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sağlıklı ve apoptotik hücrelerde apoptoz belirleme işaretleri (<http://www.bd.com.tr>)

Analiz edilecek hücreler %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu ile kültür kabından kaldırılmış, santrifüj tüplerine aktararak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sulandırılan hücreler hemositometre kullanılarak sayılmıştır. Hücre peleti soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra kit içerisinde bulunan bağlama tamponunun (1X)'dan 200 µl eklenerek hücreler (hücre yoğunluğu $2-5 \times 10^5$ /ml olacak şekilde) süspansiyon haline getirilmiştir. Bu hücre süspansiyonundan 195 µl alınarak üzerine 5 µl annexin V-FITC eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler 200µl bağlama tamponu (1X) ile yıkanmış ve 190 µl Binding Buffer (1X) ile tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Bu süspansiyona 10 µl propidyum iyodit (20µg/ml) ve 100 µg/ml RNaz A eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler soğuk DPBS ile yıkandıktan sonra her tüpe 500 µl DPBS eklenerek BD FACS Calibur Flow Cytometer cihazında analizi yapılmıştır.

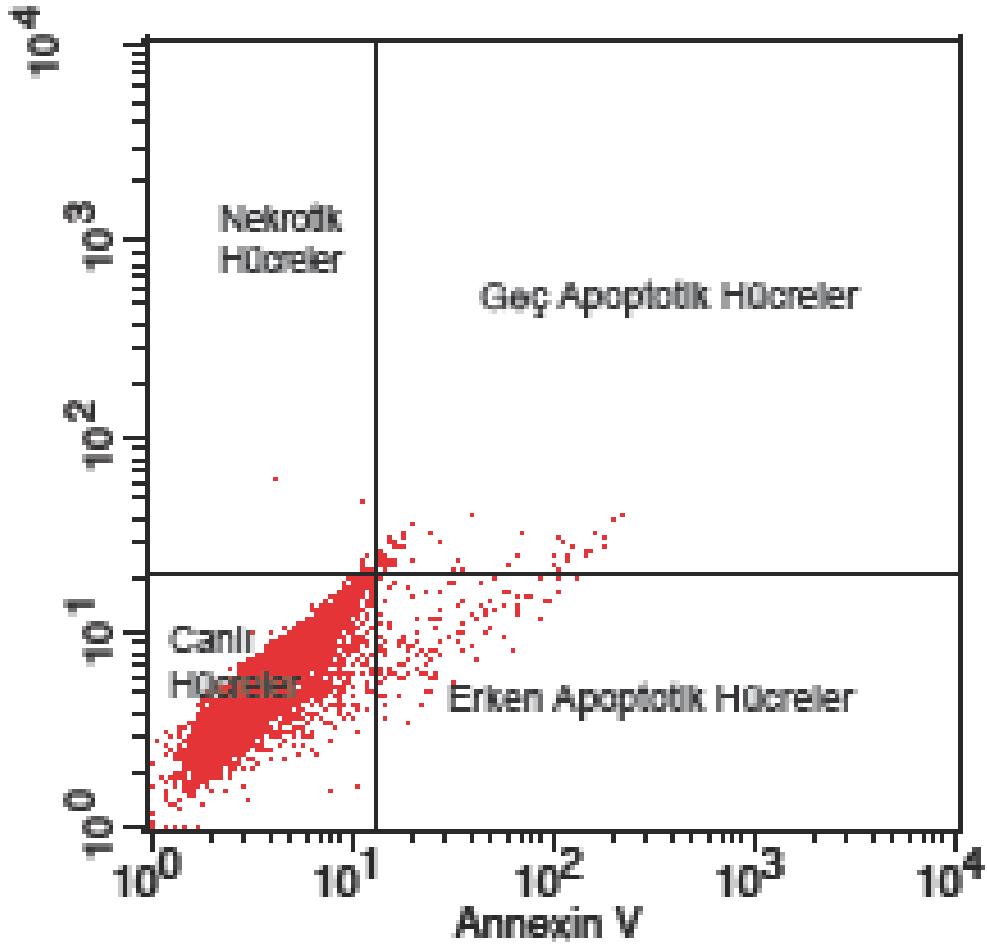
Analiz sonucu aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir:

Nekrotik Hücreler: PI pozitif, Annexin V negatif

Canlı Hücreler: PI negatif, Annexin V negatif

Geç Apoptotik Hücreler: PI pozitif, Annexin V pozitif

Erken Apoptotik Hücreler: PI negatif, Annexin V pozitif



Şekil 3.4. Akış sitometrisi FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit analiz sonucu örneği

3.3.3. İstatistiksel Analizler

Yapılan bu çalışmada her bir grup üzerine yapılan deneyler birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrar edilmiş, hem siklus hem de hücre canlılık analizlerinin üçer tekrarı istatistiksel analizde kullanılmıştır. Hücrelerin canlılık ve siklus analizleri yapıldıktan sonra SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) programı kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. SPSS programında One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi kullanılarak deney grupları arasındaki fark Duncan önemlilik testine göre değerlendirilmiştir ($P < 0.05$).

4.BULGULAR

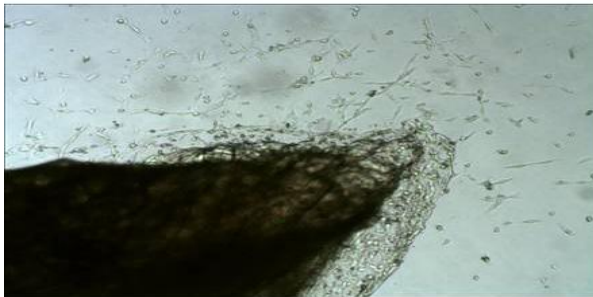
4.1 Primer Kültür

Her bir türden (sığır, koyun, keçi, manda) alınan çeşitli dokulardan (kulak, kas, ovaryum) primer kültür yapılarak hücreler elde edilmiştir. Alınan kulak dokusundan deri fibroblastları ve kıkırdak hücreleri, kas dokusundan kas hücreleri elde edilirken, ovaryum foliküllerinin aspirasyonu ile granüloza hücreleri elde edilmiştir. Primer kültür oluşturulduktan sonra her gün periyodik olarak kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilmiştir.

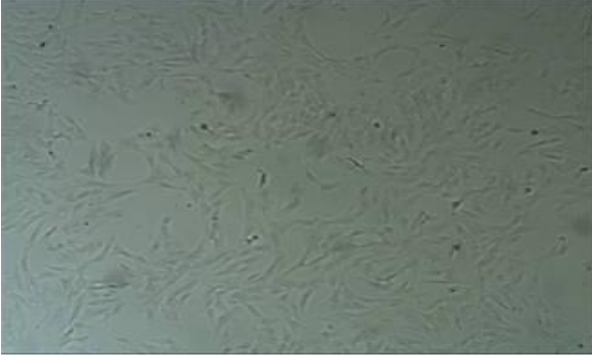
Sığırdan ve koyundan alınan dokularla oluşturulan primer kültürlerde ekimin 7. günü fibroblast, kıkırdak ve kas hücrelerinde çoğalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.4). Hücre tiplerinin üremeleri karşılaştırıldığında her iki tür için de fibroblastların üremesinin kıkırdak ve kas hücrelerine oranla daha hızlı olduğu, en yavaş üreyen hücre tipinin ise kas hücreleri olduğu görülmüştür. Granüloza hücrelerinin ise ekimin ertesi günü üremeye başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Primer kültürde üreme gösteren sığır kıkırdak hücreleri



Şekil 4.2. Primer kültürde üreme gösteren sığır kas hücreleri



Şekil 4.3. Ovaryumdan elde edilen sığır granüloza hücreleri.



Şekil 4.4. Primer kültürde üreme gösteren sığır kas hücreleri

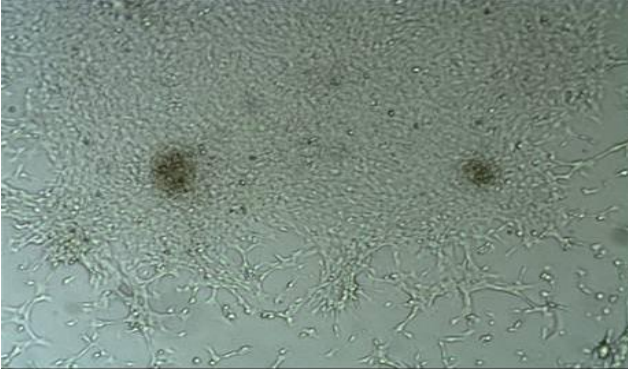
Keçiden alınan dokularla oluşturulan primer kültürlerde ekimin 20. günü fibroblast ve kıkırdak hücrelerinde üreme gözlenirken, 22. günü kas hücrelerinde üreme olduğu gözlemlenmiştir. Hücre tiplerinin üremeleri karşılaştırıldığında hem erkek hem dişi için de fibroblastların üremesinin kıkırdak ve kas hücrelerine oranla daha hızlı olduğu, en yavaş üreyen hücre tipinin ise kas hücreleri olduğu görülmüştür. Granüloza hücrelerinin ise ekimin ertesini günü üremeye başladığı tespit edilmiştir.

Mandadan alınan dokularla oluşturulan primer kültürlerde ekimin 10. günü üreme olup olmadığı kontrol edilmiş, üreme gözlenememiştir. Ekimin 20. günü tekrar kontrol edilen kültürlerde üremenin olmadığı gözlemlenmiş, ardından yapılan araştırmalar sonucu manda türü ile yapılan bazı çalışmalarda yüksek glikoz içeren besiyerinin kullanıldığı görülmüş, bunun üzerine kültüre yüksek glikozlu besiyeri ile devam edilmiştir. Besiyerinin değiştirilmesinin ardından ekimin 27. günü erkek mandanın fibroblast ve kıkırdak hücrelerinde, 35. günü dişi mandanın fibroblast ve kıkırdak hücrelerinde, 45. gün erkek mandanın kas hücrelerinde üreme olduğu gözlemlenmiştir. Dişi mandanın kas dokusundan oluşturulan

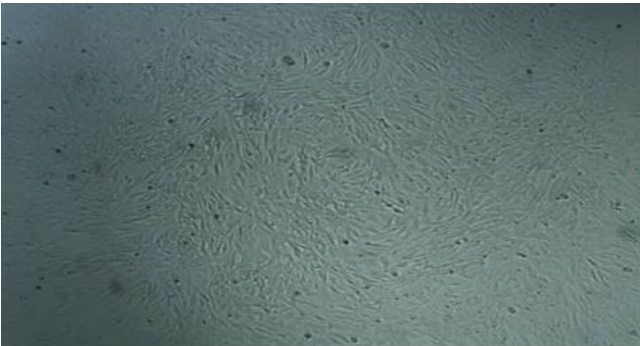
primer kültürde ise 50 gün geçmesine rağmen üreme gözlenememiştir. Manda ırkının soyunun tükeniyor olması ve kesiminin belirli illerde, belirli sayıda yapılması nedeniyle dişi mandanın kas dokusu tekrar alınamamış, deneyden çıkartılmasına karar verilmiştir. granüloza hücrelerinin ise ekimin ertesini günü remeye başladığı tespit edilmiştir.



şekil 4.5. Primer kültürdeki sığır kas hücrelerinin üremesi. (yaklaşık 30 günlük kültür)



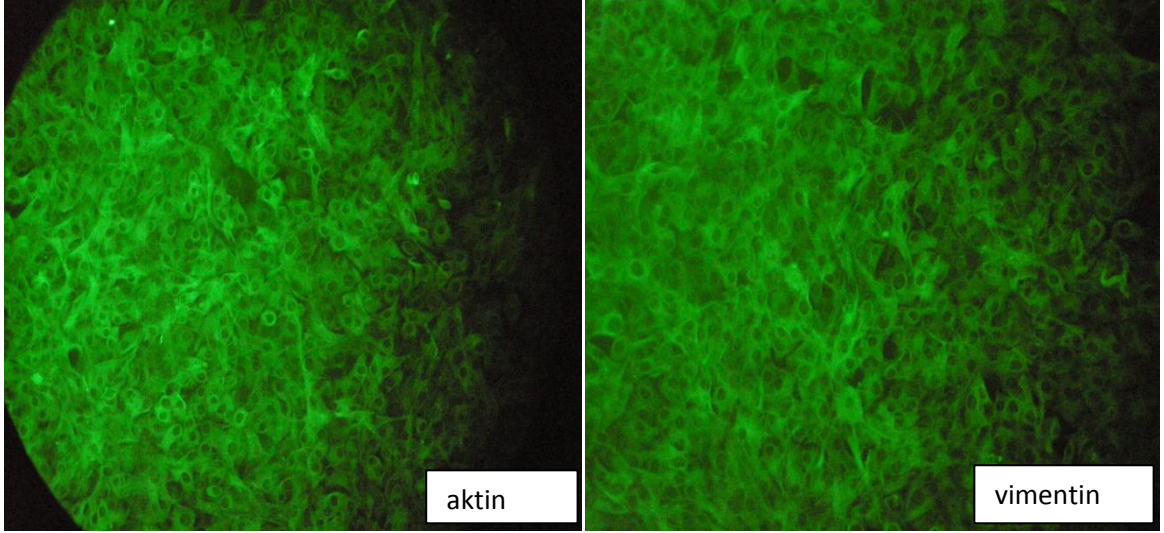
şekil 4.6. Primer kültürdeki sığır kıkırdak hücrelerinin üremesi. (yaklaşık 10 günlük kültür)



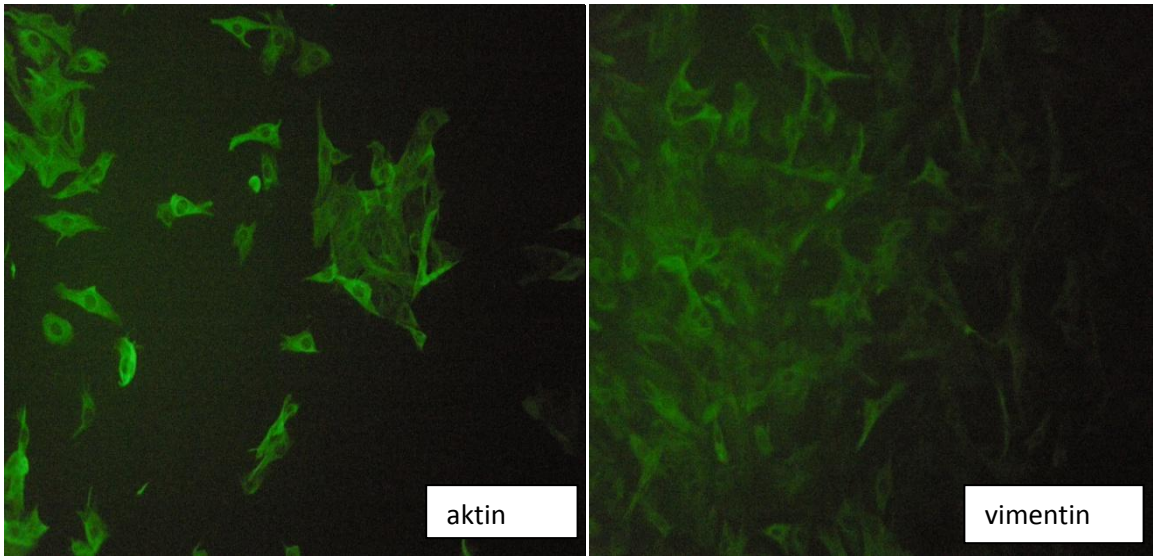
şekil 4.7. Primer kültürdeki sığır fibroblast hücrelerinin üremesi. (yaklaşık 10 günlük kltr)

4.2 HÜCRE KARAKTERİZASYONU

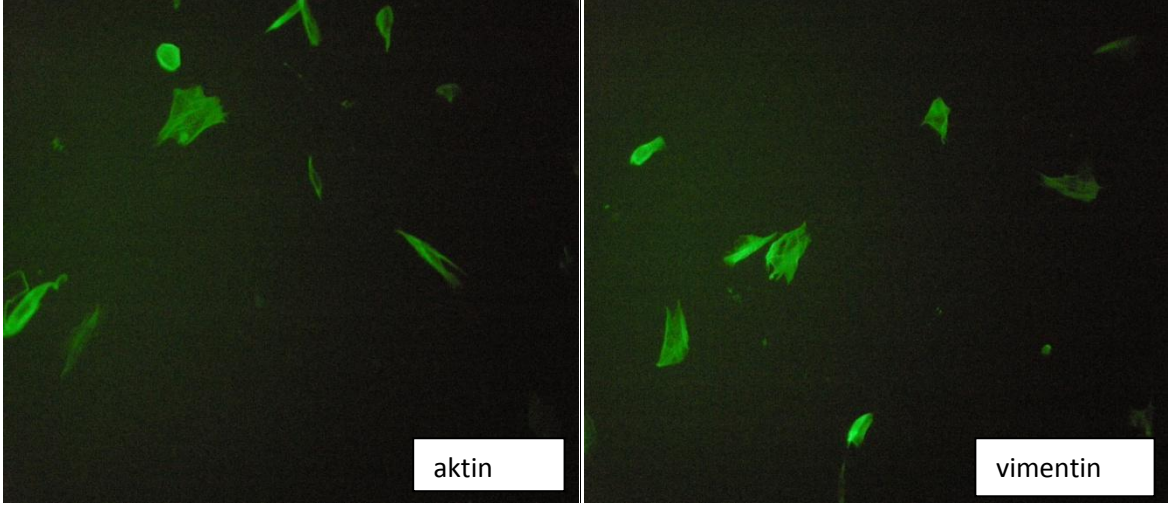
4.2.1 Hücrelerin Aktin ve Vimentin Antikoru ile Boyanması



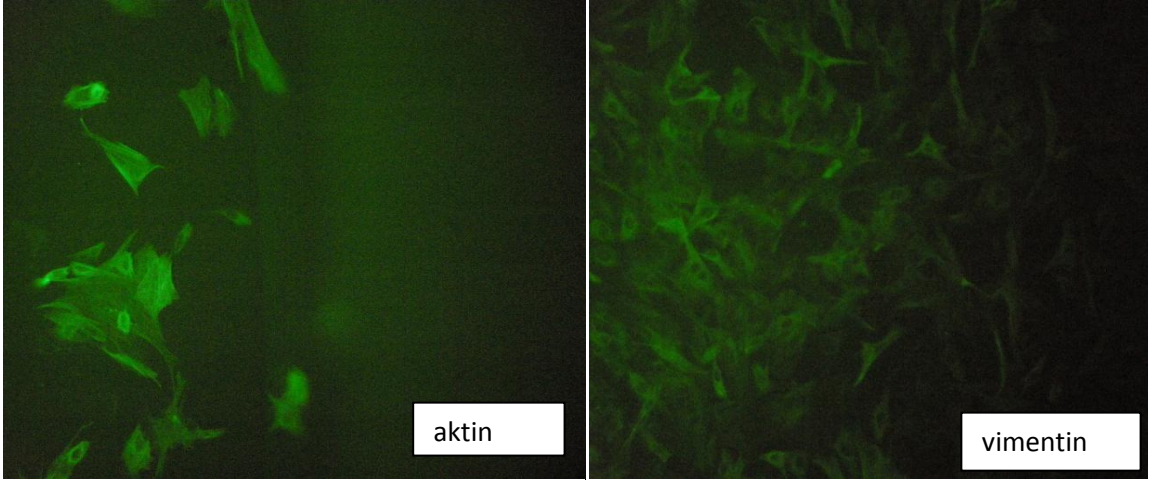
Şekil 4.8. Sığır granüloza hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



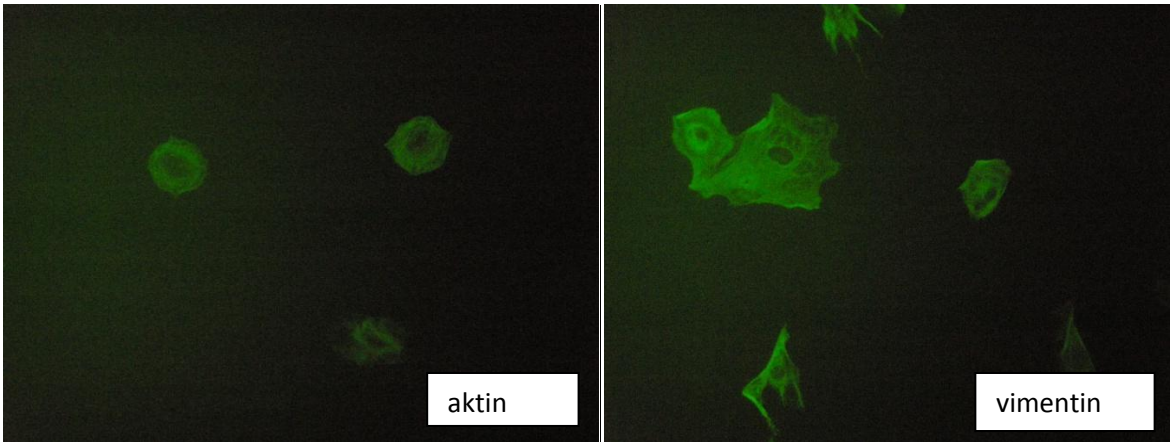
Şekil 4.9. Sığır kıkırdak hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



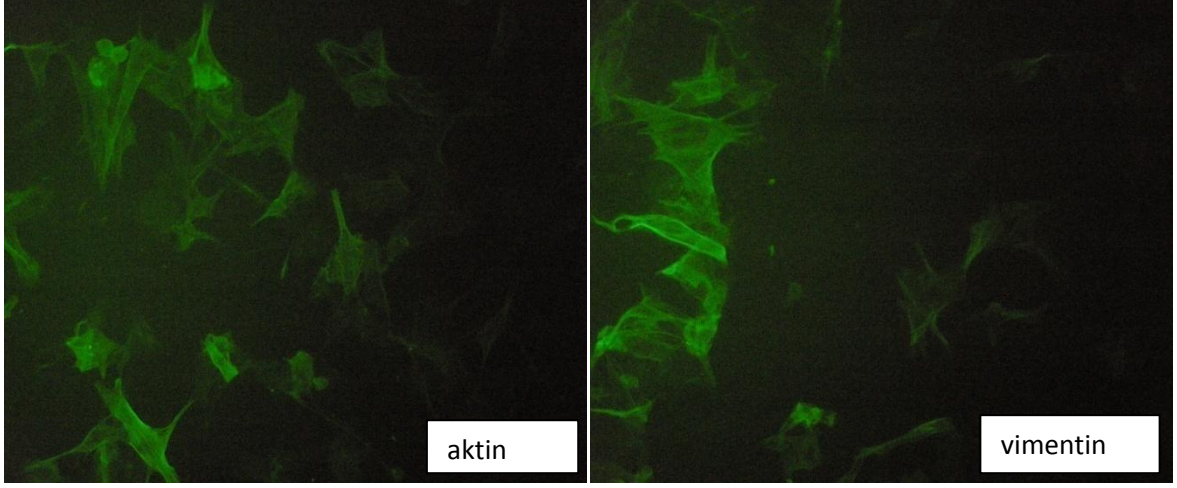
Şekil 4.10. Sığır fibroblastlarının aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



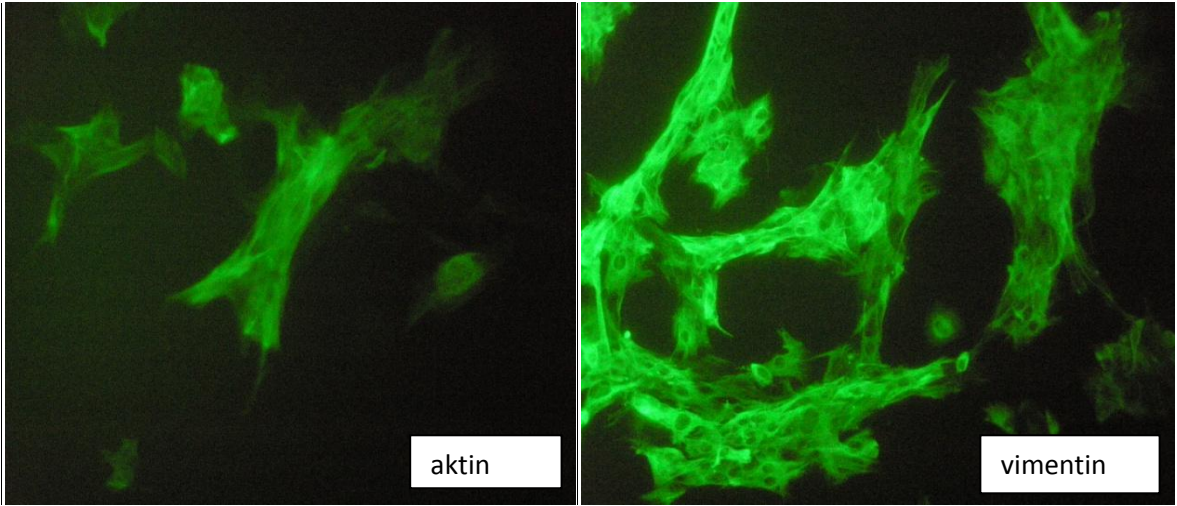
Şekil 4.11. Sığır kas hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



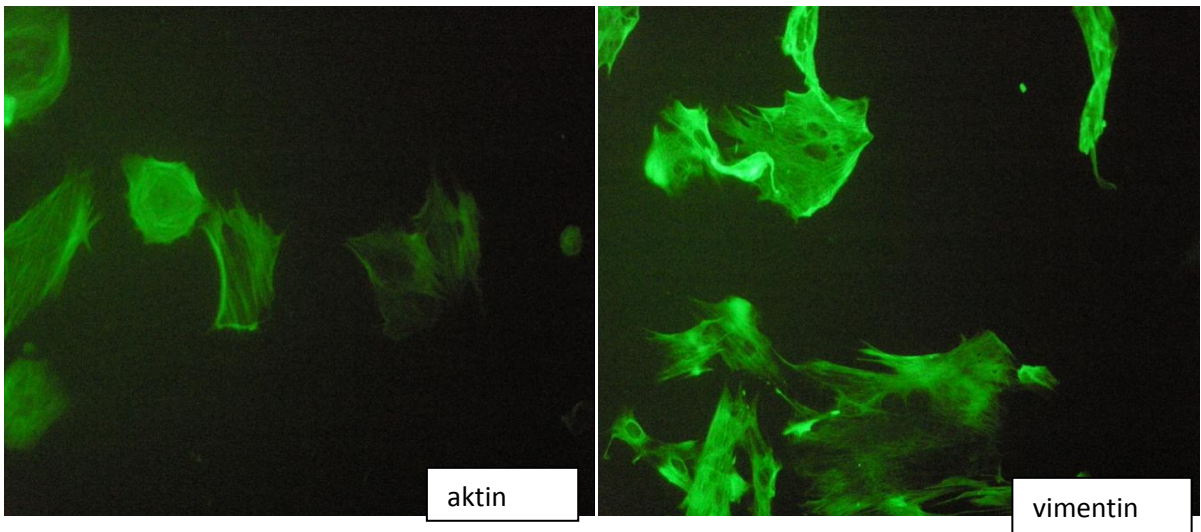
Şekil 4.12. Manda granüloza hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



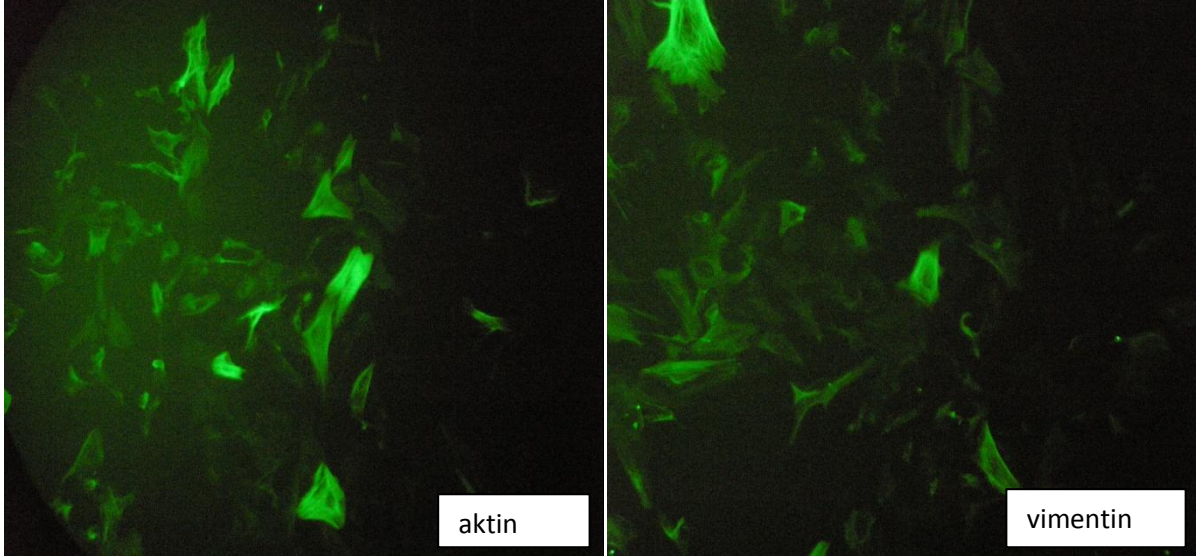
Şekil 4.13. Manda kıkırdak hücrelerinin aktin ve vimentin antikoruna ile boyanması (10X)



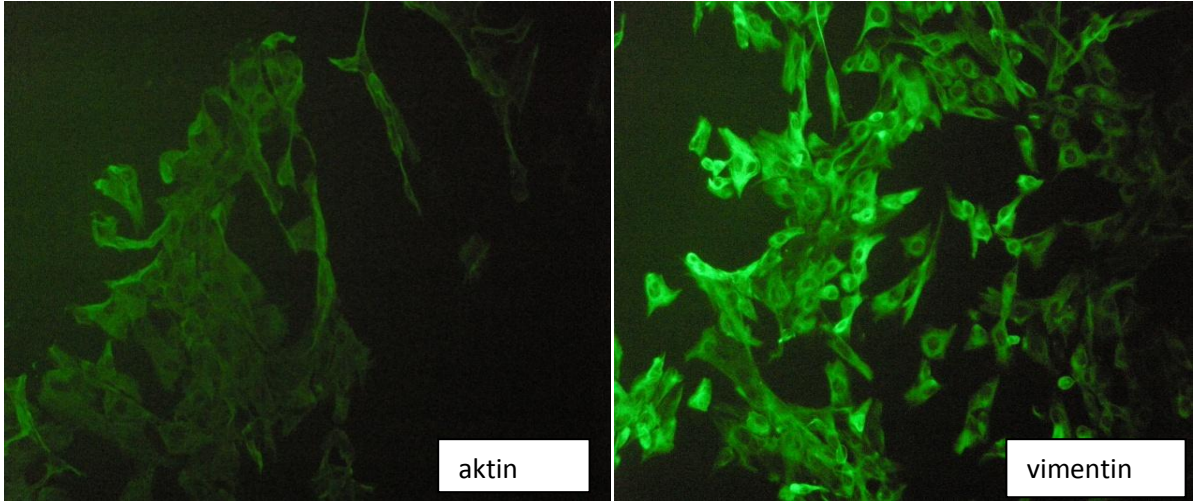
Şekil 4.14. Manda fibroblastlarının aktin ve vimentin antikoruna ile boyanması (10X)



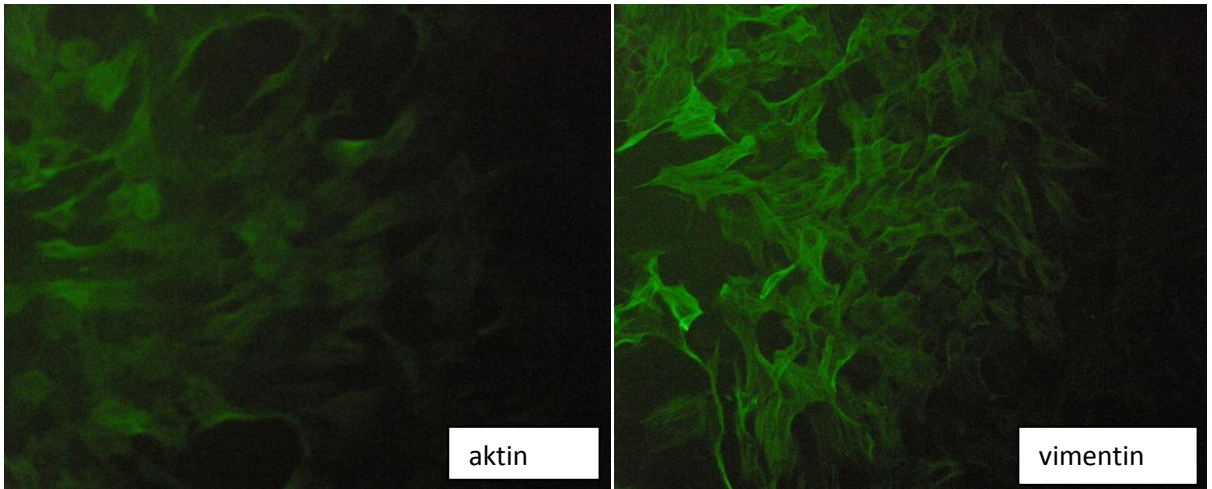
Şekil 4.15. Manda kas hücrelerinin aktin ve vimentin antikoruna ile boyanması (10X)



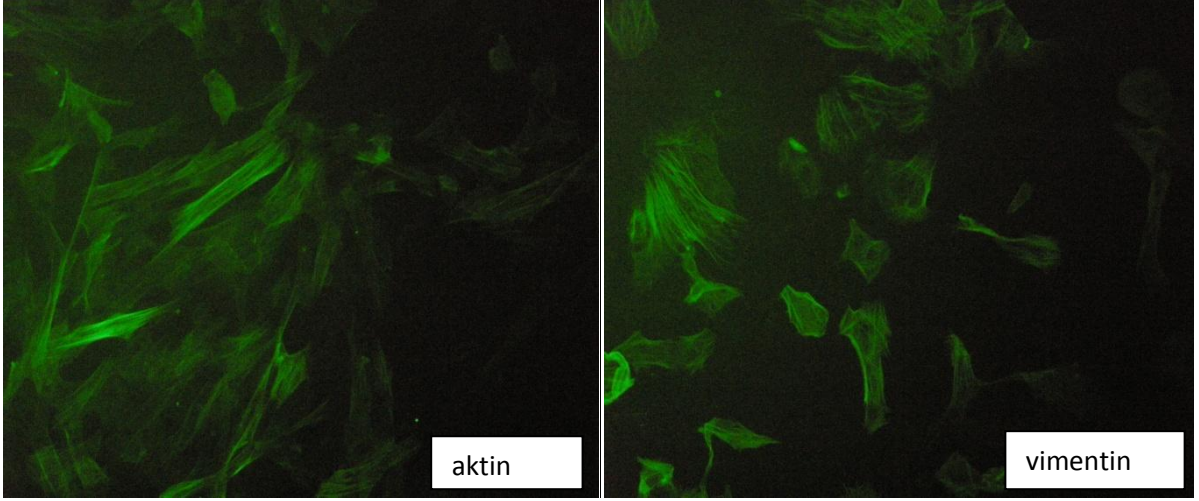
Şekil 4.16. Keçi granüloza hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



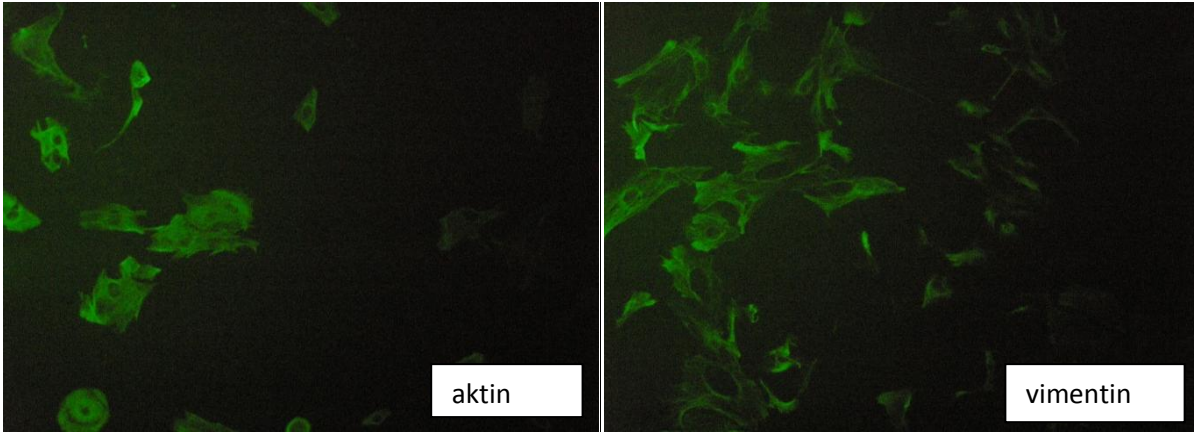
Şekil 4.17. Keçi kıkırdak hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



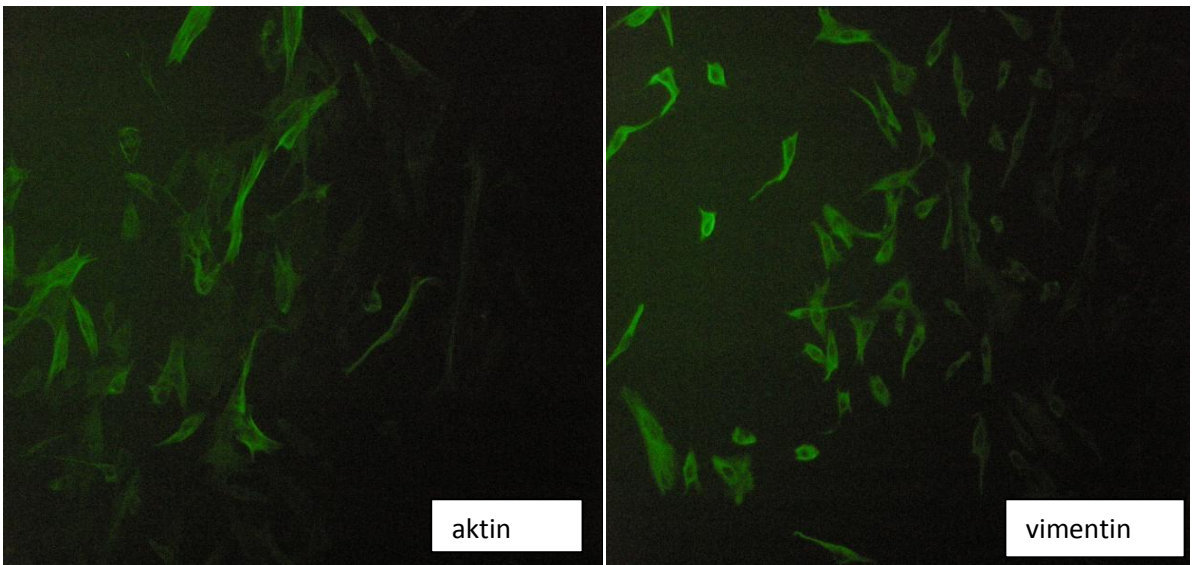
Şekil 4.18. Keçi fibroblastlarının aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



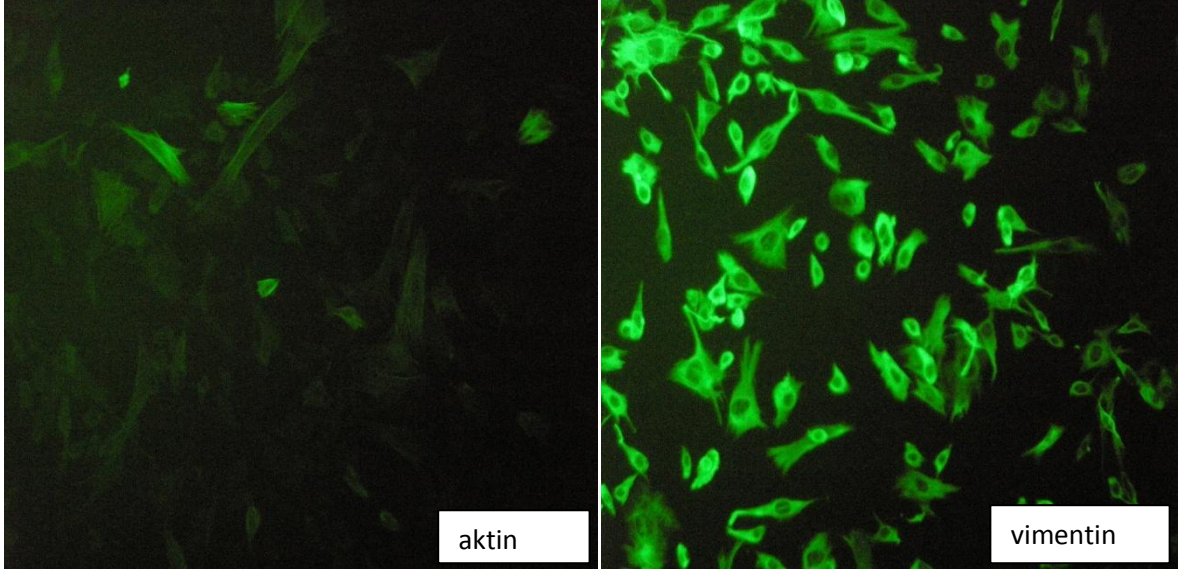
Şekil 4.19. Keçi kas hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



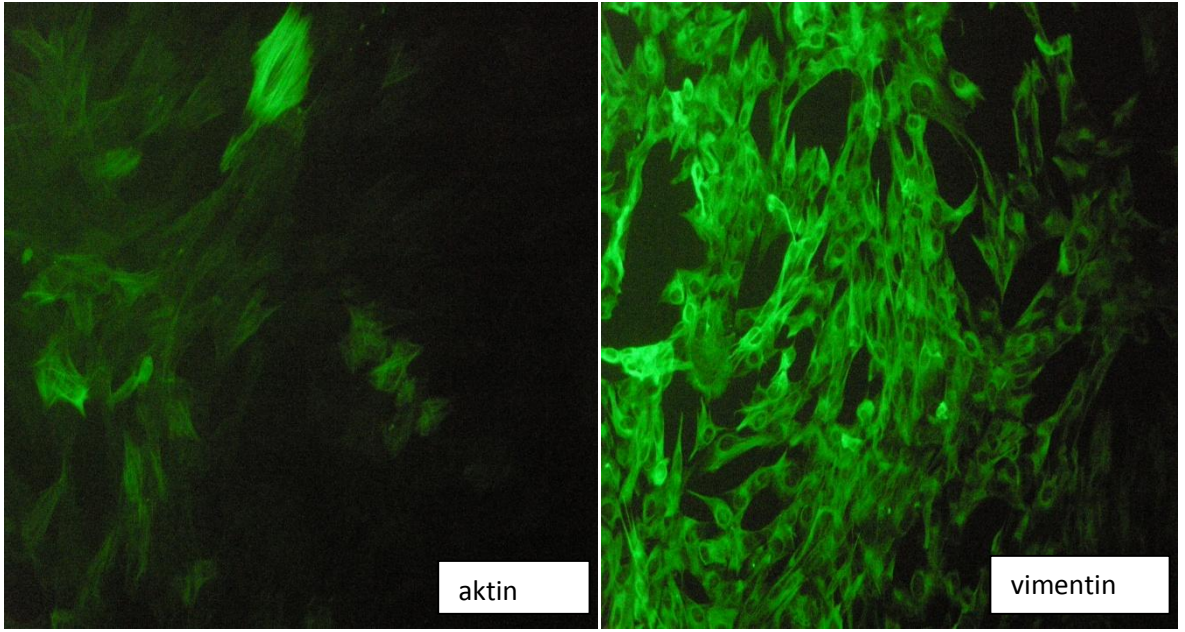
Şekil 4.20. Koyun granüloza hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



Şekil 4.21. Koyun kıkırdak hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)



Şekil 4.22. Koyun fibroblast hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)

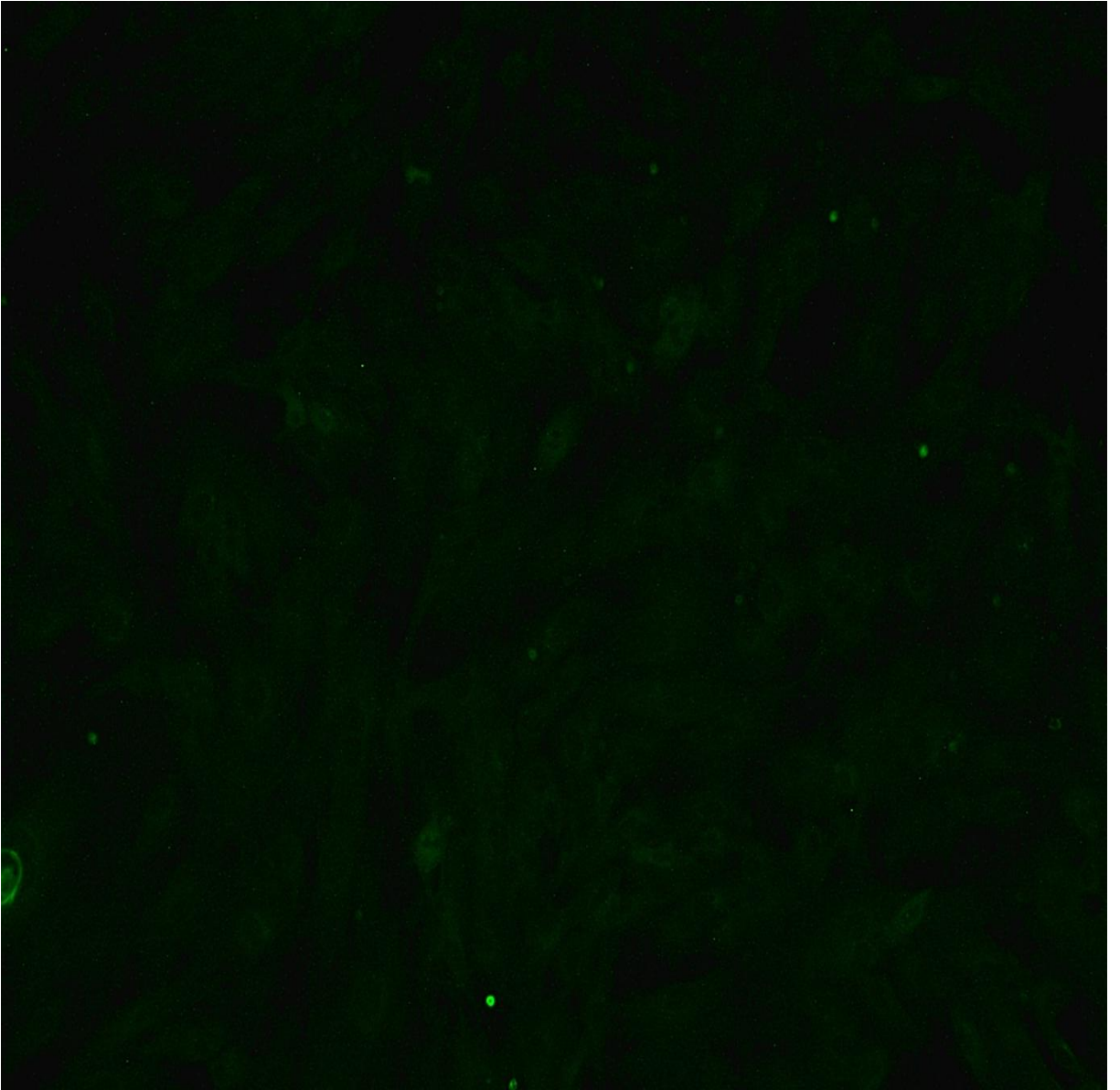


Şekil 4.23. Koyun kas hücrelerinin aktin ve vimentin antikoru ile boyanması (10X)

Aktin ve vimentin antikoru ile tüm türlerde (sığır, koyun, keçi, manda) ve hücre tiplerinde (kas, kıkırdak, fibroblast, granüloza) beklenildiği gibi pozitif boyanma elde edilmiştir.

4.2.2 Hücreslerin elastin, desmin, sitokeratin antikoru ile boyanması

Primer kültür sonrası elde edilen hücreler elastin, desmin, sitokeratin antikoru ile boyanmış, fakat her tür (sığır, koyun, keçi, manda) için uygun primer antikorum bulunmaması ve seçilen primer antikorum farklı canlılarda farklı epitoplara bağlanması nedeni ile elastin ve desmin antikoru ile sonuç alınamamıştır. Sitokeratin antikoru ile boyanan sığır granüloza hücrelerinde zayıf bir pozitif boyanma tespit edilmesine rağmen tatmin edici bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 4.24). Koyun, keçi, mandaya ait granüloza hücrelerinde ise boyanma gözlenmemiştir.



Şekil 4.24. Sığır granüloza hücrelerinin sitokeratin antikoru ile boyanması (10X)

4.3 Hücree siklus analizi

4.3.1 Hücree sayısı optimizasyonu

Analiz gruplarını oluşturmadan önce bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Hücree 60 mm kùltür kabına 4×10^5 olarak ekilmiş (şekil 4.25), kùltür kabını tamamen kapladıkları yani %100 konfluent olduklarında hücree sayılmış ve sayının $35-36 \times 10^5$ olduğu bulunmuştur (şekil 4.27). Aynı sayıda ekilen hücree 3 veya 3. gün sonunda 16×10^5 hücreeye ulaşmış ve bu %50 konfluent kabul edilmiştir (şekil 4.26).



şekil 4.25. Ekimden 1 gün sonra sığır fibroblastların mikroskoptaki görüntüsü. (4×10^5 hücre)



şekil 4.26. Ekimden 3 gün sonra sığır fibroblastların mikroskoptaki görüntüsü. (%50 konfluent)

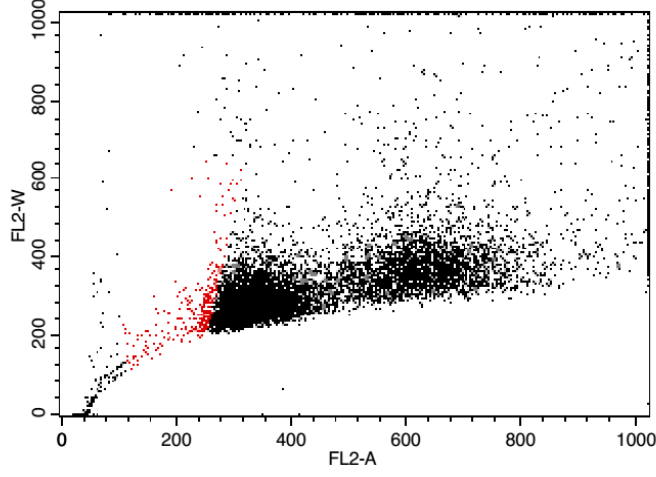


Şekil 4.27. Ekimin 6-7. günü sığır fibroblastların mikroskoptaki görüntüsü. (%100 konfluent)

4.3.2 PI Boyama Optimizasyonu

Literatür taraması sonucu bulunan protokellerde boya solüsyonunda PI konsantrasyonunun 20 $\mu\text{g/ml}$ ile 50 $\mu\text{g/ml}$ arasında değiştiği görülmüştür. Miktarın sonuçları ne ölçüde etkilediği üzerinde bir çalışma yapılarak uygulanacak PI konsantrasyonu belirlenmiştir. Fibroblast ve kıkırdak hücreleri konfluent olduktan sonra fikse edilip aşağıda belirtildiği şekilde protokole uygun olarak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

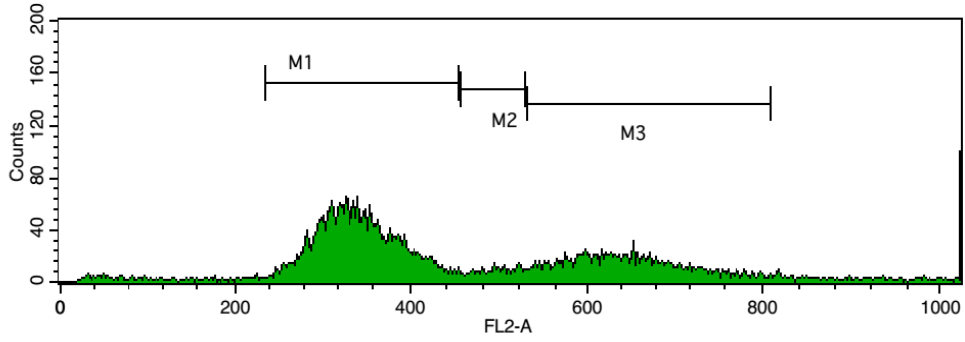
Fibroblastlar	(1 milyon hc/500 μl)	—————>	50 $\mu\text{g/ml}$ PI ile boyandı.
Fibroblastlar	(1 milyon hc/500 μl)	—————>	30 $\mu\text{g/ml}$ PI ile boyandı.
Fibroblastlar	(1 milyon hc/500 μl)	—————>	20 $\mu\text{g/ml}$ PI ile boyandı.
Kıkırdak hücreleri	(1 milyon hc/500 μl)	—————>	50 $\mu\text{g/ml}$ PI ile boyandı.
Kıkırdak hücreleri	(1 milyon hc/500 μl)	—————>	30 $\mu\text{g/ml}$ PI ile boyandı.
Kıkırdak hücreleri	(1 milyon hc/500 μl)	—————>	20 $\mu\text{g/ml}$ PI ile boyandı.



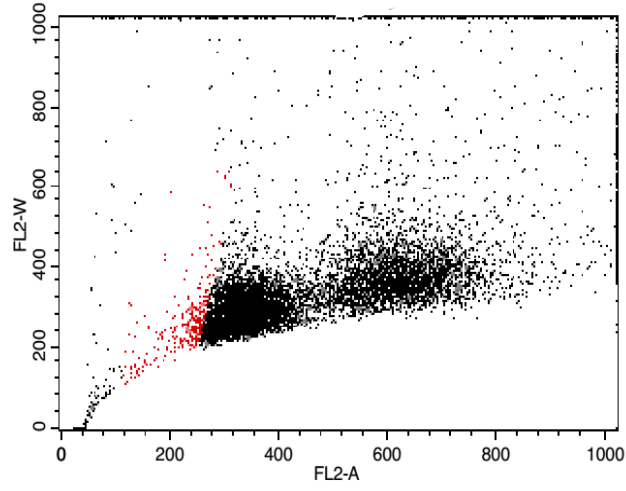
Histogram Statistics

File: KIKIRDAK Sample ID: KIKIRDAK
 Acquisition Date: 31-Aug-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-A (Linear) File Unique ID: 13A16614

Marker	Left, Right	% Total	Mean	CV
All	0, 1023	100.00	473.94	43.64
M1	233, 453	56.56	339.94	13.16
M2	455, 529	4.71	495.49	4.31
M3	531, 808	28.71	643.22	10.19



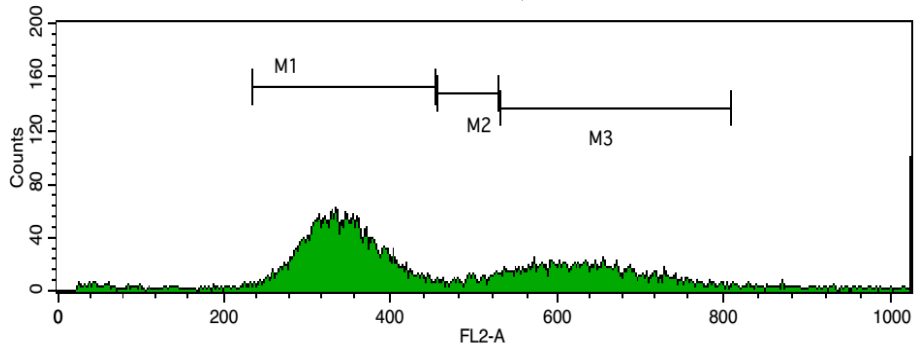
Şekil 4.28. 50 µg/ml PI ile boyanan kıkırdak hücrelerine ait analiz sonucu



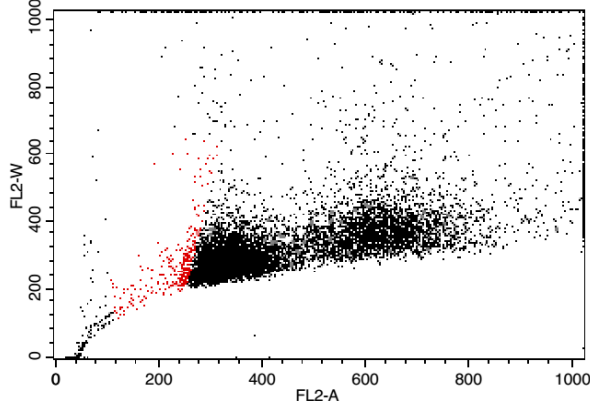
Histogram Statistics

File: KIKIRDAK Sample ID: KIKIRDAK
 Acquisition Date: 31-Aug-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-A (Linear) File Unique ID: 0CDE14D

Marker	Left, Right	% Total	Mean	CV
All	0, 1023	100.00	473.71	43.17
M1	233, 453	56.18	340.30	12.84
M2	455, 529	4.72	497.59	4.36
M3	531, 808	29.39	638.65	10.29



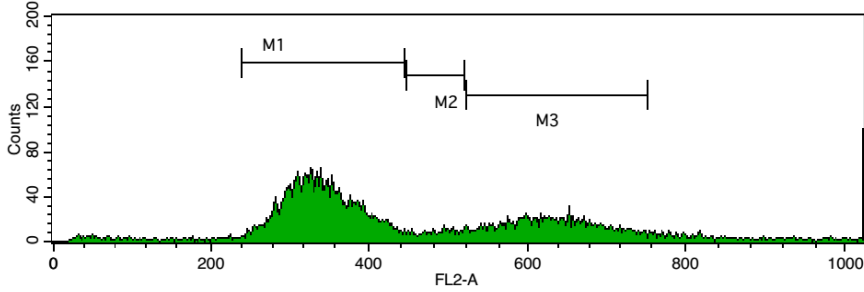
Şekil 4.29. 30 µg/ml PI ile boyanan kıkırdak hücrelerine ait analiz sonucu



Histogram Statistics

File: 3 KIKIRDAK 2. GRUP-2.014 Sample ID: 3 KIKIRDAK 2
Acquisition Date: 31-Aug-13 Gate: No Gate
Gated Events: 10000 Total Events: 10000
X Parameter: FL2-A (Linear) File Unique ID: 13A16614

Marker	Left, Right	% Total	Mean	CV
All	0, 1023	100.00	473.94	43.64
M1	238, 444	55.87	338.93	12.79
M2	446, 520	4.58	484.89	4.57
M3	522, 751	27.25	629.88	9.10



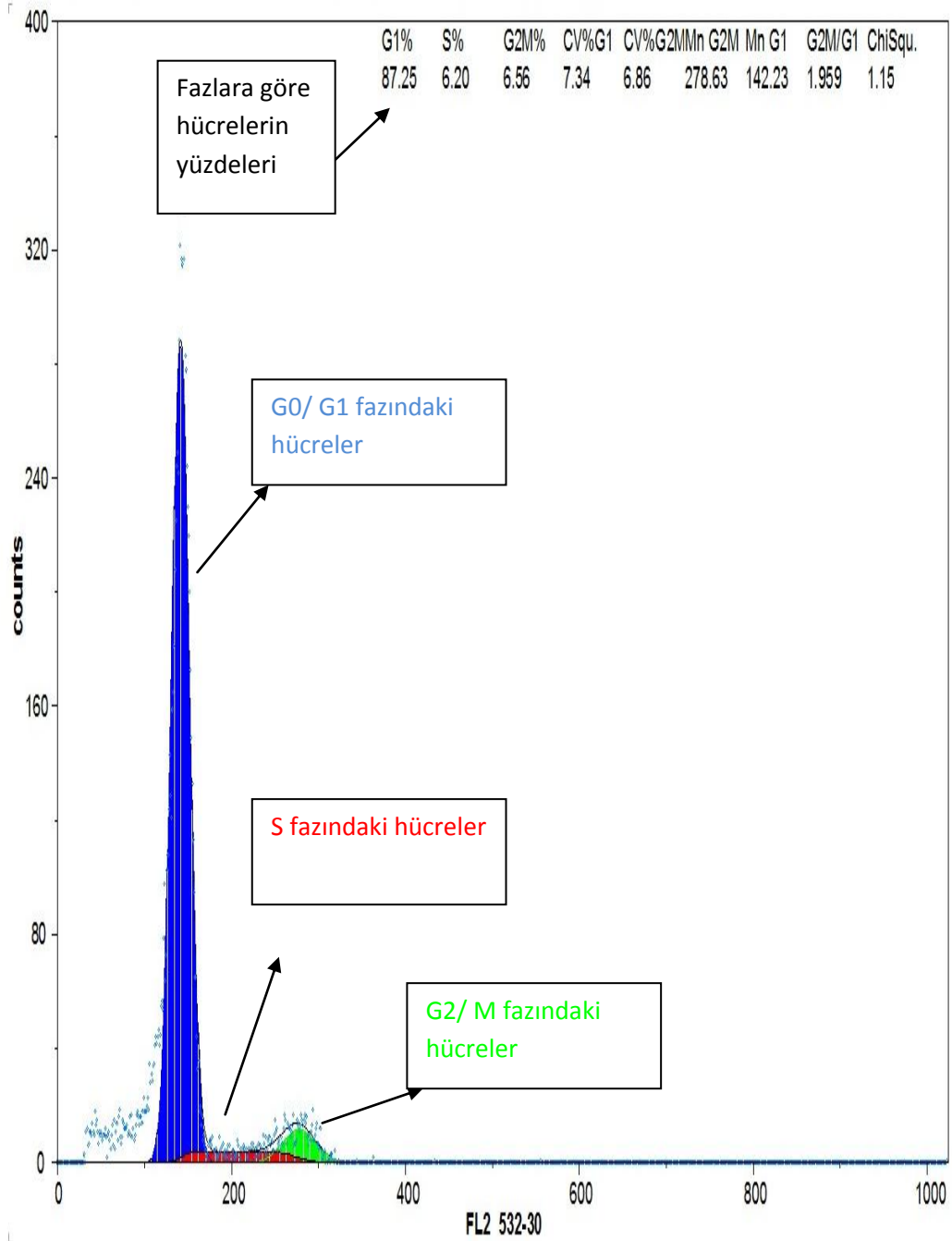
Şekil 4.30. 20 µg/ml PI ile boyanan kıkırdak hücrelerine ait analiz sonucu

Grafiklerde: M1 → G0/G1 evresini
M2 → S evresini
M3 → G2/M evresini göstermektedir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda denenen boya miktarlarının sonucu etkilemediği 20 µg/ml PI'nin yeterli olduğu tespit edilmiştir.

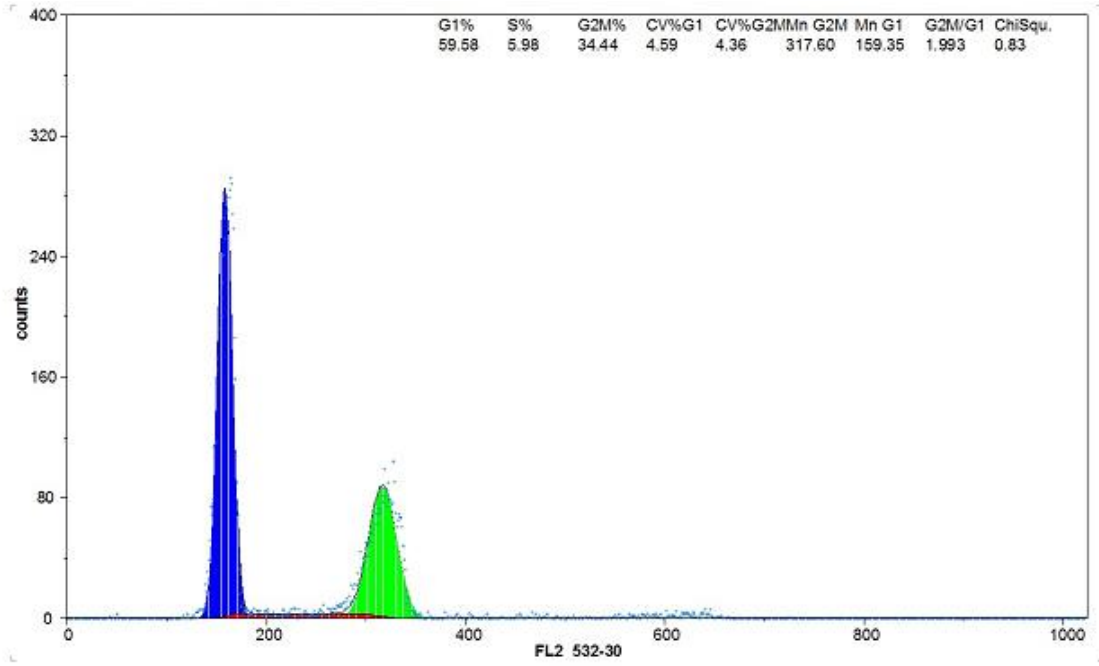
4.3.3 Hücre Siklus Analiz Sonuçları

PI ile boyanan hücreler Partec Akış sitometrisi cihazında okutulmuş ve hücre siklus analizleri yapılmıştır. Partec Akış sitometrisi cihazının hücre siklus analizi için oluşturulan program kullanılarak piklerin hangi evrede olduğu belirlenmiş ve bu evrelerin yüzdeleri hesaplanmıştır.

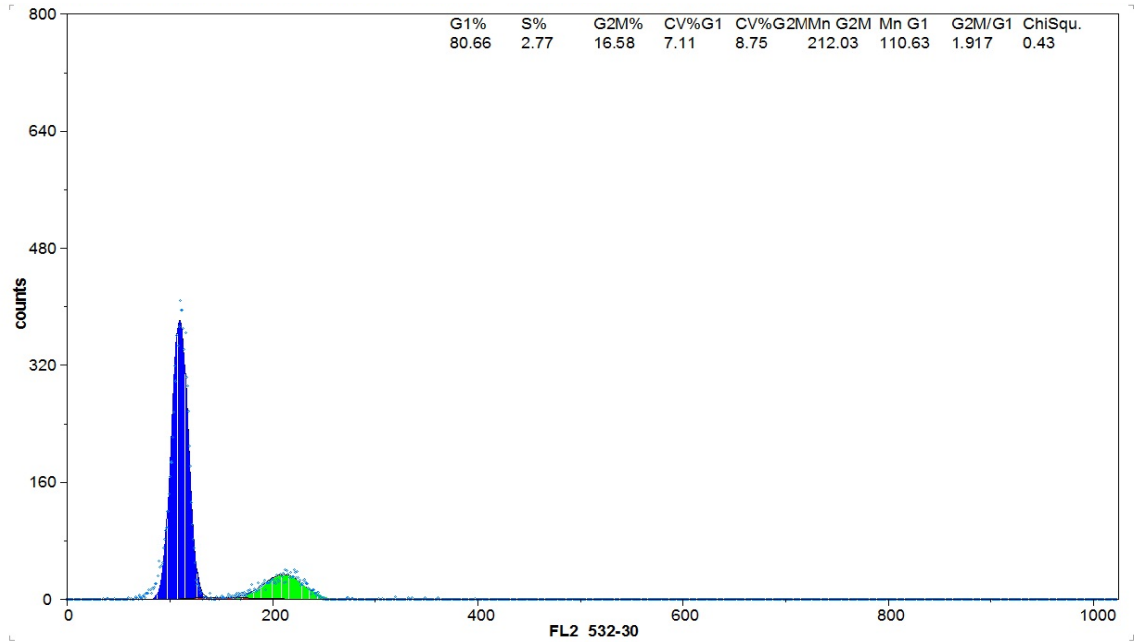


Şekil 4.31. Hücre siklus analizi programı kullanılarak fazların yüzdelerinin belirlenmesi

Yapılan hücre siklus analizlerinden iki tanesi örnek olarak aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.32. Fibroblastların kontrol grubu



Şekil 4.33. Fibroblastlarda geç konfluent grubu

Çizelge 4.1. Erkek sığır taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S(%)	G2/M (%)
1	54.32±3.54 ^e	23.13±4.34 ^a	23.65±3.64 ^a
2	61.01±0.47 ^d	21.16±3.20 ^{a,b}	15.16±3.20 ^b
3	61.05±2.08 ^d	25.49±1.08 ^a	15.49±1.08 ^b
4	78.10±0.10 ^b	7.15±0.17 ^c	7.15±0.17 ^c
5	80.77±1.41 ^a	4.98±0.87 ^{c,d}	4.98±0.87 ^d
6	69.53±0.24 ^c	14.79±0.45 ^b	14.79±0.45 ^{b,c}
7	81.37±1.01 ^a	4.30±0.43 ^d	4.30±0.43 ^d

Erkek sığır taze fibroblastlarda tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0’da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları (P<0.05) grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 gün serum açlığı)’ de elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. Erkek sığır donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	51.56±0.86 ^f	31.42±0.69 ^a	28.32±0.14 ^b
2	53.46±0.50 ^g	10.68±0.28 ^c	35.63±0.66 ^a
3	75.44±0.39 ^d	5.35±0.06 ^f	18.56±0.29 ^c
4	69.67±0.29 ^e	11.58±0.31 ^b	18.76±0.35 ^c
5	82.30±0.24 ^b	7.49±0.22 ^e	10.29±0.08 ^e
6	79.54±0.31 ^c	8.47±0.11 ^d	11.56±0.32 ^d
7	87.55±0.27 ^a	2.12±0.05 ^g	10.44±0.41 ^e

Erkek sığır donmuş fibroblastlarda tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı grup 7 (120 gün serum açlığı)' de elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3. Erkek sığır taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	51.48±0.15 ^g	29.63±0.23 ^a	19.43±0.10 ^e
2	59.79±0.19 ^f	19.69±0.31 ^b	20.55±0.16 ^b
3	63.61±0.52 ^e	6.35±0.12 ^f	29.69±0.26 ^a
4	67.43±0.40 ^d	12.59±0.22 ^c	20.72±0.30 ^b
5	77.68±0.20 ^a	9.59±0.31 ^e	12.62±0.20 ^e
6	75.05±0.21 ^c	10.71±0.50 ^d	14.61±0.36 ^d
7	76.49±0.36 ^b	2.61±0.14 ^g	20.33±0.17 ^b

Erkek sığır taze kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 5 (geç konfluent)' de elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.4. Erkek sığır donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	67.47±0.42 ^{e,f}	23.48±0.37 ^a	9.48±0.10 ^d
2	64.95±0.69 ^f	15.67±0.31 ^b	19.55±1.54 ^b
3	68.19±0.09 ^e	9.54±0.31 ^d	22.04±0.13 ^a
4	78.78±0.16 ^d	11.10±0.08 ^c	10.22±0.10 ^{c,d}
5	82.46±0.34 ^c	5.69±0.28 ^f	11.84±0.10 ^c
6	87.22±0.24 ^b	6.32±0.11 ^e	6.55±0.25 ^f
7	90.26±0.13 ^a	2.52±0.40 ^g	7.18±0.18 ^e

Erkek sığır donmuş kas hücrelerinde grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' de elde edilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.5. Erkek sığır taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	51.05±0.41 ^g	22.17±0.15 ^a	27.70±0.21 ^a
2	64.03±0.14 ^e	12.99±0.18 ^b	23.83±0.15 ^c
3	59.59±0.37 ^f	17.70±0.40 ^a	24.28±0.37 ^c
4	67.32±0.11 ^d	9.55±0.33 ^d	25.13±0.59 ^b
5	77.49±0.39 ^a	9.56±0.33 ^d	12.51±0.33 ^f
6	74.69±.46 ^c	11.89±0.37 ^c	13.58±0.43 ^e
7	76.22±0.19 ^b	7.39±0.40 ^e	16.30±0.07 ^d

Çizelge 4.6. Erkek sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	53.37±0.24 ^g	23.16±0.66 ^a	21.76±0.31 ^f
2	76.29±0.12 ^e	3.71±0.23 ^e	19.79±0.26 ^b
3	61.35±0.11 ^f	10.34±0.07 ^b	28.58±0.13 ^a
4	79.91±0.04 ^d	7.00±0.20 ^c	13.03±0.03 ^d
5	82.85±0.66 ^c	4.66±0.33 ^d	12.45±0.34 ^e
6	86.18±0.18 ^a	1.55±0.21 ^f	13.55±0.34 ^c
7	85.12±.010 ^a	1.55±0.22 ^f	13.47±0.31 ^{c,d}

Erkek sığır taze kıkırdak hücrelerinde grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 5 (geç konfluent)' de elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

Erkek sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları (P<0.05) grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.6).

Dişi sığır taze fibroblastlarda tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.7).

Dişi sığır donmuş fibroblastlarda tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. Dişi sığır taze fibroblastlardahücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	65.20±0.17 ^f	23.46±0.35 ^a	11.49±0.19 ^c
2	73.06±0.13 ^d	17.49±0.38 ^e	7.79±0.15 ^f
3	76.96±0.3 ^c	13.52±0.32 ^{b,c}	9.34±0.22 ^e
4	69.76±0.28 ^e	9.41±0.17 ^c	20.48±0.08 ^a
5	73.61±0.37 ^d	12.98±0.06 ^b	13.63±0.20 ^b
6	81.65±0.33 ^b	8.53±0.32 ^d	9.94±0.03 ^d
7	84.43±0.45 ^a	5.42±0.33 ^f	9.51±0.072 ^e

Çizelge 4.8. Dişi sığır donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	62.34±0.15 ^g	21.92±0.07 ^a	15.46±0.33 ^c
2	72.64±0.22 ^c	11.52±0.19 ^c	15.70±0.37 ^{b,c}
3	64.44±0.34 ^f	21.60±0.29 ^a	15.44±0.31 ^c
4	69.55±0.27 ^e	14.29±0.24 ^b	16.21±0.02 ^b
5	71.19±0.22 ^d	10.69±0.29 ^d	18.03±0.06 ^a
6	75.57±0.19 ^b	9.91±0.05 ^e	14.50±0.38 ^d
7	79.38±0.22 ^a	6.53±0.25 ^f	14.48±0.40 ^d

Çizelge 4.9. Dişi sığır taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	68.42±0.44 ^c	13.70±0.24 ^a	17.53±0.34 ^a
2	84.44±0.33 ^d	3.27±0.19 ^{c,d}	12.62±0.38 ^b
3	84.34±0.31 ^d	3.55±0.39 ^c	11.51±0.20 ^c
4	83.93±1.25 ^d	5.44±0.38 ^b	11.69±0.31 ^c
5	86.25±0.11 ^c	2.99±0.19 ^d	10.71±0.30 ^d
6	92.29±0.30 ^b	1.52±0.27 ^e	6.83±0.09 ^e
7	94.90±0.05 ^a	1.95±0.01 ^e	3.33±0.43 ^f

Dişi sığır taze kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.10. Dişi sığır donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	76.59±0.31 ^e	10.18±0.15 ^a	12.80±0.29 ^b
2	89.47±0.18 ^a	0.66±0.32 ^f	9.75±0.20 ^d
3	86.84±0.14 ^b	3.53±0.07 ^d	9.66±0.25 ^d
4	82.47±0.53 ^d	5.65±0.24 ^c	11.81±0.12 ^c
5	84.42±0.37 ^c	8.55±0.36 ^b	15.47±0.17 ^a
6	84.15±0.13 ^c	3.12±0.07 ^d	9.76±0.25 ^d
7	89.63±0.31 ^a	2.50±0.33 ^e	8.20±0.31 ^e

Dişi sığır donmuş kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0’da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları (P<0.05) grup 2 (roskovitin-1) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)’ den elde edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.11. Dişi sığır taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	52.96±0.12 ^g	23.50±0.34 ^a	23.45±0.27 ^c
2	59.12±0.08 ^e	16.32±0.41 ^c	24.40±0.32 ^b
3	55.75±0.32 ^f	17.73±0.27 ^b	26.66±0.23 ^a
4	64.10±0.20 ^d	16.26±0.09 ^c	19.08±0.10 ^d
5	79.22±0.05 ^a	7.61±0.32 ^f	13.04±0.03 ^g
6	68.21±0.09 ^c	15.30±0.07 ^d	16.42±0.27 ^f
7	70.35±0.17 ^b	12.47±0.34 ^e	16.95±0.04 ^e

Çizelge 4.12. Dişi sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	53.55±0.38 ^f	20.25±0.12 ^c	25.68±0.19 ^b
2	63.34±0.12 ^d	23.60±0.37 ^a	12.34±0.15 ^e
3	63.16±0.14 ^d	5.69±0.34 ^g	31.42±0.19 ^a
4	71.31±0.13 ^b	13.60±0.37 ^e	15.31±0.04 ^c
5	74.37±0.17 ^a	11.50±0.28 ^f	14.55±0.24 ^d
6	62.38±0.14 ^e	22.27±0.17 ^b	14.67±0.30 ^d
7	70.14±0.16 ^c	14.36±0.20 ^d	15.41±0.37 ^c

Dişi sığır taze kıkırdak hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0’da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 5 (geç konfluent)’ den elde edilmiştir (Çizelge 4.11).

Dişi sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0’da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 5 (geç konfluent)’ den elde edilmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.13. Dişi sığır taze granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	65.03±0.14 ^e	8.89±0.40 ^b	25.36±0.17 ^a
2	73.48±0.36 ^b	4.92±0.11 ^e	22.42±0.42 ^b
3	72.46±0.3 ^c	6.64±0.34 ^d	19.59±0.30 ^d
4	79.34±0.14 ^a	7.52±0.37 ^c	13.54±0.32 ^e
5	79.39±0.14 ^a	11.56±0.32 ^a	9.31±0.15 ^f
6	70.20±0.11 ^d	8.37±0.22 ^b	20.35±0.16 ^c
7	72.63±0.26 ^c	4.64±0.33 ^e	22.39±0.49 ^b

Sığır taze granüloza hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları ($P<0.05$) grup 4 ve 5 (erken ve geç konfluent)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.14. Dişi sığır donmuş granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	59.25±0.20 ^f	21.59±0.13 ^a	19.41±0.16 ^c
2	75.48±0.31 ^c	6.14±0.13 ^c	18.39±0.10 ^d
3	79.15±0.03 ^a	1.83±0.42 ^g	19.18±0.13 ^c
4	72.52±0.15 ^e	4.18±0.01 ^f	23.28±0.18 ^a
5	76.28±0.08 ^b	5.33±0.15 ^d	18.49±0.40 ^d
6	72.22±0.76 ^e	4.79±0.19 ^e	22.33±0.17 ^b
7	73.59±0.26 ^d	7.48±0.20 ^b	19.38±0.01 ^c

Çizelge 4.15. Erkek koyun taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	60.98±8.93 ^c	15.97±5.02 ^a	23.04±11.04 ^{a,b}
2	60.05±12.25 ^c	10.15±5.77 ^b	29.79±6.57 ^a
3	62.54±1.50 ^{b,c}	14.14±1.54 ^{a,b}	23.32±2.66 ^{a,b}
4	60.13±0.26 ^c	11.49±0.39 ^{a,b}	28.33±0.43 ^a
5	80.02±.07 ^a	2.35±0.20 ^c	17.36±0.14 ^b
6	60.29±0.60 ^c	12.30±0.19 ^{a,b}	27.41±0.10 ^a
7	71.82±0.58 ^b	1.60±0.33 ^c	26.52±0.38 ^{a,b}

Sığır donmuş granüloza hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.14).

Erkek koyun taze fibroblastlarda sadece grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' de farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 5 (geç konfluent)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.15).

Erkek koyun donmuş fibroblastlarda tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.16).

Erkek koyun taze kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.16. Erkek koyun donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	62.55±0.43 ^f	16.49±0.37 ^b	20.78±0.10 ^d
2	65.40±0.27 ^e	3.90±0.05 ^f	30.76±0.09 ^a
3	68.26±0.34 ^d	9.83±0.13 ^d	28.53±0.20 ^b
4	67.23±0.09 ^d	17.76±0.18 ^a	16.62±0.22 ^f
5	68.40±1.30 ^c	12.89±0.10 ^c	19.20±0.26 ^e
6	70.00±0.05 ^b	5.73±0.26 ^e	24.24±0.26 ^c
7	75.51±0.43 ^a	3.87±0.15 ^f	20.61±0.16 ^d

Çizelge 4.17. Erkek koyun taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	54.35±0.59 ^g	22.72±0.29 ^a	23.52±0.32 ^b
2	59.78±0.33 ^f	11.68±0.28 ^b	28.45±0.29 ^a
3	62.63±0.26 ^e	7.59±0.30 ^c	28.97±0.11 ^a
4	74.75±0.22 ^d	6.60±0.36 ^d	14.49±0.38 ^c
5	84.48±0.39 ^c	7.31±0.11 ^c	7.65±0.41 ^d
6	88.60±0.29 ^b	5.37±0.26 ^e	5.69±0.28 ^f
7	91.38±0.31 ^a	3.04±0.11 ^f	6.27±0.11 ^e

Çizelge 4.18. Erkek koyun donmuş kas hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	63.59±0.43 ^g	17.30±0.22 ^b	19.20±0.19 ^b
2	65.66±0.32 ^f	14.69±0.32 ^c	19.76±0.20 ^a
3	78.72±0.16 ^d	9.65±0.11 ^d	12.08±0.02 ^c
4	75.10±0.11 ^e	18.65±0.10 ^a	7.27±0.06 ^f
5	79.62±0.15 ^c	8.62±0.32 ^e	11.55±0.21 ^d
6	88.43±0.40 ^b	3.55±0.31 ^f	8.64±0.33 ^e
7	92.56±0.07 ^a	3.78±0.16 ^f	4.32±0.18 ^g

Erkek koyun donmuş kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0’da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)’ den elde edilmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.19. Erkek koyun taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	52.25±0.27 ^f	19.53±0.46 ^a	14.84±0.15 ^d
2	55.16±0.15 ^e	4.75±0.13 ^c	28.48±0.37 ^b
3	55.70±0.21 ^d	4.41±0.20 ^c	29.42±0.42 ^a
4	69.39±0.24 ^b	2.23±0.55 ^d	12.53±0.46 ^f
5	69.67±0.18 ^b	5.38±0.23 ^b	16.38±0.31 ^c
6	59.51±0.21 ^c	5.38±0.10 ^b	13.55±0.38 ^e
7	84.52±0.16 ^a	2.00±0.10 ^d	13.24±0.09 ^e

Erkek koyun taze kıkırdak hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.19).

Erkek koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde grup 2 (roskovitin-1) hariç diğer tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. Erkek koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	68.75±0.27 ^d	19.51±0.17 ^a	11.02±0.03 ^e
2	69.36±0.24 ^d	7.65±0.21 ^c	16.37±0.22 ^b
3	56.76±0.27 ^e	17.65±0.28 ^b	23.42±0.48 ^a
4	77.54±0.10 ^c	5.93±0.04 ^e	15.77±0.28 ^c
5	79.48±0.20 ^b	4.33±0.27 ^f	15.73±0.15 ^c
6	80.13±0.08 ^b	4.09±0.02 ^f	15.90±0.02 ^c
7	81.92±0.92 ^a	6.34±0.22 ^d	12.54±0.17 ^d

Çizelge 4.21. Dişi koyun taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	50.30±0.66 ^d	27.29±0.21 ^a	22.54±0.38 ^b
2	51.33±0.72 ^d	21.48±0.22 ^b	27.62±0.15 ^a
3	66.64±1.32 ^c	16.30±0.21 ^c	17.05±0.03 ^c
4	84.62±0.08 ^a	7.23±0.11 ^d	8.27±0.16 ^f
5	82.63±0.15 ^b	7.11±0.05 ^d	8.27±0.16 ^f
6	82.79±0.27 ^{a.b}	6.78±0.25 ^e	10.65±0.10 ^e
7	82.71±2.18 ^{a.b}	6.11±0.04 ^f	11.68±0.20 ^d

Dişi koyun taze fibroblastlarda grup 2 (roskovitin-1) hariç diğer tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları (P<0.05) grup 4 (erken konfluent), grup 6 ve 7 (72 ve 120 saat serum açlığı) den elde edilmiştir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.22. Dişi koyun donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	65.37±0.27 ^f	13.77±0.21 ^b	20.83±0.12 ^b
2	63.31±0.15 ^e	17.22±0.95 ^a	19.57±0.71 ^b
3	56.62±0.33 ^g	9.79±0.11 ^c	33.53±0.32 ^a
4	90.45±0.19 ^c	2.65±0.09 ^e	6.76±0.19 ^e
5	81.56±0.22 ^d	6.52±0.39 ^d	12.74±0.11 ^c
6	96.38±0.26 ^a	1.29±0.21 ^f	2.48±0.05 ^f
7	92.29±0.26 ^b	0.55±0.20 ^g	7.15±0.03 ^d

Dişi koyun donmuş fibroblastlarda grup 2.3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları grup 6 (72 saat serum açlığı)' dan elde edilmiştir (Çizelge 4.22).

Dişi koyun taze kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.23).

Dişi koyun donmuş kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.24).

Çizelge 4.23. Dişi koyun taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	62.06±1.32 ^f	18.66±0.17 ^a	19.45±1.05 ^a
2	73.69±2.10 ^b	11.27±0.15 ^c	4.46±0.09 ^e
3	88.21±0.21 ^e	2.34±0.22 ^b	9.55±0.12 ^b
4	93.73±0.15 ^b	0.44±0.38 ^d	5.59±0.22 ^d
5	90.63±0.16 ^d	2.62±0.24 ^b	6.90±0.06 ^c
6	93.31±0.22 ^c	0.39±0.22 ^d	6.54±0.37 ^c
7	95.40±0.21 ^a	0.46±0.06 ^d	4.11±0.06 ^e

Çizelge 4.24. Dişi koyun donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	49.79±1.96 ^g	17.37±0.27 ^c	32.65±1.73 ^a
2	50.06±1.32 ^f	26.9±0.58 ^a	25.98±0.58 ^b
3	51.39±0.25 ^e	21.38±0.24 ^b	31.50±0.36 ^a
4	76.85±0.05 ^c	15.71±0.19 ^{c,d}	8.40±0.21 ^d
5	75.20±0.09 ^d	15.93±0.06 ^{c,d}	10.02±0.03 ^c
6	92.72±0.12 ^b	3.80±0.14 ^e	3.73±0.26 ^e
7	94.68±0.37 ^a	2.44±0.28 ^f	3.13±0.09 ^e

Çizelge 4.25. Dişi koyun taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	60.41±1.01 ^c	20.65±0.70 ^a	19.03±1.12 ^a
2	61.26±10.44 ^c	19.34±0.26 ^a	20.51±0.26 ^a
3	66.90±1.50 ^c	14.16±2.24 ^b	19.00±2.02 ^a
4	76.98±0.70 ^b	9.63±0.13 ^c	15.59±0.26 ^b
5	83.49±0.07 ^a	3.44±0.23 ^d	12.86±0.28 ^{c,d}
6	81.34±0.75 ^a	5.86±0.16 ^e	14.41±0.29 ^{b,c}
7	80.70±0.13 ^a	8.63±0.12 ^c	11.73±0.16 ^d

Çizelge 4.26. Dişi koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	69.72±0.26 ^e	23.32±0.57 ^a	7.48±0.22 ^e
2	72.74±0.20 ^{d,e}	7.57±0.36 ^b	21.26±0.33 ^a
3	74.41±0.33 ^d	14.03±0.03 ^d	11.55±0.28 ^b
4	87.63±0.22 ^b	3.85±0.22 ^d	9.37±0.22 ^c
5	85.73±0.23 ^c	5.21±0.10 ^c	9.48±0.14 ^c
6	89.32±0.29 ^a	1.18±0.09 ^f	9.66±0.11 ^c
7	89.26±0.20 ^a	2.52±0.37 ^e	8.66±0.22 ^d

Dişi koyun taze kıkırdak hücrelerinde grup 2 ve 3 (roskovitin-1ve 2) hariç diğer tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları (P<0.05) grup 5 (geç

konfluent). grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.25).

Dişi koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde grup 2 (roskovitin-1) hariç diğer tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları ($P<0.05$) grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.27. Dişi koyun taze granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	56.84±3.41 ^a	22.38±2.64 ^a	20.07±0.88 ^b
2	67.62±1.56 ^c	2.52±0.70 ^e	29.86±2.24 ^a
3	69.06±2.89 ^c	2.92±0.84 ^{d,e}	29.68±3.09 ^a
4	87.58±0.28 ^a	4.63±0.31 ^{c,d}	8.25±0.14 ^d
5	78.58±0.15 ^b	5.50±0.18 ^{b,c}	15.40±0.32 ^c
6	85.45±0.28 ^a	6.55±0.23 ^{b,c}	7.64±0.29 ^d
7	84.67±0.35 ^a	7.27±0.23 ^b	7.95±0.03 ^d

Koyun taze granüloza hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları ($P<0.05$) grup 4 (erken konfluent) grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.27).

Koyun donmuş granüloza hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.28. Dişi koyun donmuş granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	60.60±0.22 ^e	20.25±0.36 ^a	19.51±0.37 ^a
2	78.53±0.29 ^d	12.54±0.37 ^b	9.21±0.19 ^e
3	83.72±0.06 ^{b,c}	2.81±0.15 ^f	13.56±0.16 ^b
4	83.29±0.24 ^{b,c}	3.84±0.16 ^e	13.51±0.21 ^b
5	84.11±1.51 ^b	5.52±0.12 ^d	9.65±0.28 ^e
6	82.66±0.11 ^c	6.33±0.21 ^c	11.38±0.34 ^d
7	85.66±0.31 ^a	2.33±0.32 ^g	12.48±0.31 ^c

Çizelge 4.29. Erkek keçi taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	60.24±3.44 ^e	21.09±0.40 ^a	18.57±0.16 ^d
2	65.59±5.94 ^d	8.32±0.14 ^b	27.23±0.36 ^a
3	65.65±1.34 ^d	6.66±0.08 ^c	27.76±0.28 ^a
4	74.11±3.39 ^{b,c}	4.24±0.14 ^d	22.53±0.35 ^b
5	74.33±0.16 ^{b,c}	8.48±0.16 ^b	18.11±0.13 ^d
6	79.08±1.21 ^{a,b}	1.81±0.22 ^e	19.01±0.48 ^c
7	81.57±2.50 ^a	4.49±0.18 ^d	14.65±0.37 ^e

Erkek keçi taze fibroblastlarda tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranları (P<0.05) grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı) den elde edilmiştir (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.30. Erkek keçi donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	63.66±1.15 ^c	16.00±1.00 ^a	19.66±0.57 ^d
2	65.59±5.94 ^c	6.83±0.38 ^d	28.21±0.28 ^a
3	67.42±2.61 ^c	9.75±0.03 ^b	23.61±0.35 ^b
4	74.11±3.39 ^b	8.73±0.23 ^c	17.29±0.31 ^e
5	74.00±0.61 ^b	3.08±0.04 ^f	22.22±0.15 ^c
6	79.08±1.21 ^{a,b}	4.15±0.04 ^e	16.70±0.28 ^f
7	81.77±2.41 ^a	0.98±0.22 ^g	16.98±0.32 ^{e,f}

Erkek keçi taze kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0’da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)’ den elde edilmiştir (Çizelge 4.31).

Çizelge 4.31. Erkek keçi taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	57.34±1.07 ^g	23.61±2.17 ^a	19.08±1.02 ^b
2	62.91±1.41 ^f	10.62±1.26 ^b	26.46±0.27 ^a
3	67.58±0.45 ^e	6.62±1.57 ^c	25.79±1.13 ^a
4	83.36±1.13 ^c	5.88±0.02 ^{c,d}	11.11±0.09 ^c
5	86.53±0.23 ^b	5.44±0.22 ^{c,d}	8.33±0.09 ^d
6	75.12±.89 ^d	4.16±0.05 ^e	5.05±0.07 ^e
7	91.48±3.92 ^a	3.27±0.20 ^e	4.53±0.35 ^e

Erkek keçi donmuş kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.32).

Erkek keçi taze kıkırdak hücrelerinde ($P<0.05$) sadece grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı) olmak üzere iki senkronizasyon uygulaması kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir (Çizelge 4.33).

Çizelge 4.32. Erkek keçi donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	72.77±1.29 ^d	13.16±0.09 ^a	13.84±0.14 ^e
2	64.14±0.86 ^f	12.53±0.36 ^b	23.36±0.50 ^a
3	65.74±0.68 ^e	11.60±0.32 ^c	23.18±0.18 ^a
4	75.22±0.28 ^c	4.38±0.47 ^e	20.46±0.04 ^b
5	76.58±0.47 ^c	5.24±0.18 ^d	18.22±0.11 ^c
6	82.29±1.14 ^b	3.06±0.07 ^f	14.43±0.34 ^d
7	84.95±0.37 ^a	2.87±0.08 ^f	12.14±0.13 ^f

Çizelge 4.33. Erkek keçi taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	64.00±4.66 ^b	14.72±0.63 ^a	21.00±1.21 ^c
2	64.26±2.02 ^b	8.51±0.07 ^e	26.77±0.58 ^a
3	63.72±1.98 ^b	9.47±0.07 ^d	26.44±0.08 ^a
4	62.10±1.46 ^b	12.61±0.68 ^b	24.41±0.46 ^b
5	65.33±3.20 ^a	8.20±0.26 ^e	26.21±0.24 ^a
6	66.94±1.55 ^a	9.42±0.11 ^d	24.10±0.10 ^b
7	66.62±1.39 ^a	10.50±0.34 ^c	15.47±0.44 ^d

Çizelge 4.34. Erkek keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	47.36±1.20 ^d	21.72±2.16 ^a	30.91±1.00 ^c
2	50.29±1.24 ^c	10.23±3.47 ^{c.d}	39.52±2.23 ^a
3	50.56±0.58 ^c	13.14±0.12 ^b	36.61±0.76 ^b
4	65.98±0.32 ^b	7.55±0.06 ^d	22.53±0.18 ^d
5	67.43±2.87 ^b	7.36±0.07 ^d	21.86±0.10 ^d
6	73.56±0.65 ^a	9.86±0.08 ^{c.d}	16.88±0.08 ^e
7	75.16±0.25 ^a	12.65±0.19 ^{b.c}	12.23±0.15 ^f

Çizelge 4.35. Dişi keçi taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	70.46±1.21 ^e	15.26±0.09 ^a	15.26±0.71 ^c
2	71.83±0.69 ^{d.e}	6.89±0.05 ^d	22.24±0.19 ^a
3	73.23±2.05 ^d	7.05±0.06 ^{c.d}	19.27±0.16 ^b
4	82.24±0.66 ^c	8.39±0.16 ^b	9.40±0.05 ^d
5	83.41±0.37 ^c	6.34±0.12 ^e	9.66±0.25 ^d
6	85.84±0.66 ^b	7.22±0.15 ^c	6.20±0.16 ^e
7	88.68±1.33 ^a	6.29±.30 ^e	4.30±0.17 ^f

Dişi keçi taze fibroblastlarda tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiştir, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.35).

Çizelge 4.36. Dişi keçi donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	72.70±0.35 ^c	15.25±0.05 ^a	11.79±0.34 ^e
2	68.39±0.28 ^d	14.38±0.31 ^b	17.25±0.22 ^b
3	71.77±2.36 ^c	7.28±0.15 ^c	20.23±0.14 ^a
4	84.23±0.30 ^b	3.55±0.37 ^e	12.63±0.25 ^d
5	85.62±2.30 ^b	6.52±0.32 ^d	14.37±0.18 ^c
6	94.04±0.16 ^a	2.89±0.09 ^f	3.43±0.46 ^f
7	96.01±0.83 ^a	3.22±0.19 ^{d,e}	1.10±0.37 ^g

Dişi keçi donmuş fibroblastlarda grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranları (P<0.05) grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.36).

Çizelge 4.37. Dişi keçi taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	71.19±0.78 ^d	12.43±0.11 ^c	16.54±0.30 ^b
2	67.25±0.17 ^d	15.32±0.02 ^a	17.12±0.08 ^a
3	69.29±0.64 ^d	13.60±0.37 ^b	16.31±0.08 ^b
4	78.88±1.78 ^c	4.27±0.20 ^e	13.25±0.28 ^d
5	82.32±0.82 ^{b,c}	6.27±0.23 ^d	14.10±0.09 ^c
6	85.67±5.68 ^{a,b}	3.21±0.24 ^f	11.93±0.09 ^e
7	88.10±0.30 ^a	4.18±0.05 ^e	7.31±0.12 ^f

Çizelge 4.38. Dişi keçi donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	72.18±0.24 ^e	12.24±0.17 ^b	15.49±0.30 ^b
2	68.27±1.07 ^f	12.79±0.11 ^a	18.30±0.07 ^a
3	70.09±0.24 ^{e,f}	11.32±0.08 ^c	18.60±0.30 ^a
4	78.88±2.32 ^d	10.26±0.20 ^d	11.02±0.07 ^d
5	82.15±3.14 ^c	7.43±0.48 ^e	9.54±0.06 ^e
6	85.31±1.02 ^b	6.22±0.09 ^f	14.55±0.27 ^c
7	92.69±1.15 ^a	2.27±0.28 ^g	5.14±0.09 ^f

Dişi keçi taze kas hücrelerinde grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranları ($P<0.05$) grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.37).

Çizelge 4.39. Dişi keçi taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	72.04±0.73 ^d	5.64±0.30 ^d	22.67±0.27 ^c
2	64.96±2.98 ^f	9.22±0.18 ^a	25.51±0.32 ^b
3	68.21±0.60 ^e	0.92±0.26 ^f	31.51±0.35 ^a
4	75.34±0.35 ^c	7.18±0.010 ^c	18.04±0.02 ^d
5	78.14±0.42 ^b	8.21±0.15 ^b	14.28±0.12 ^f
6	80.13±0.17 ^b	2.24±0.13 ^e	17.45±0.15 ^e
7	85.57±0.38 ^a	8.17±0.05 ^b	6.25±0.17 ^g

Dişi keçi donmuş kas hücrelerinde grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.38).

Çizelge 4.40. Dişi keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	53.37±0.41 ^d	23.4033±0.39 ^a	23.64±0.17 ^c
2	52.67±2.45 ^d	15.5567±0.31 ^b	31.52±0.35 ^b
3	52.88±2.21 ^d	10.3900±0.07 ^c	36.57±0.17 ^a
4	72.69±0.80 ^c	8.2733±0.16 ^d	18.31±0.16 ^e
5	74.13±0.34 ^{b,c}	6.5900±0.31 ^f	19.45±0.14 ^d
6	75.17±0.45 ^{a,b}	7.3100±0.10 ^e	17.39±0.14 ^f
7	77.15±0.12 ^a	5.1667±0.10 ^g	17.18±0.14 ^f

Dişi keçi taze kıkırdak hücrelerinde grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.39).

Dişi keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranları ($P<0.05$) grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.40).

Keçi taze granüloza hücrelerinde grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.41).

Çizelge 4.41. Dişi keçi taze granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	79.08±0.72 ^e	3.98±0.76 ^c	16.93±0.03 ^b
2	76.50±0.06 ^f	5.26±0.07 ^b	18.23±0.04 ^a
3	75.38±0.27 ^g	6.32±0.08 ^a	18.30±0.35 ^a
4	85.54±0.33 ^d	3.32±0.19 ^d	11.13±0.14 ^c
5	88.18±0.23 ^b	2.24±0.10 ^e	9.57±0.16 ^e
6	86.46±0.13 ^c	3.15±0.02 ^d	10.39±0.15 ^d
7	91.29±0.06 ^a	2.08±0.04 ^e	6.62±0.08 ^f

Keçi donmuş granüloza hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.42).

Çizelge 4.42. Dişi keçi donmuş granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	72.68±0.14 ^g	7.30±0.20 ^a	18.41±0.06 ^b
2	74.32±0.08 ^f	6.30±0.10 ^{a,b}	19.37±0.08 ^a
3	75.28±0.07 ^e	5.22±0.08 ^b	19.49±0.06 ^a
4	79.73±0.28 ^d	4.40±0.16 ^c	15.86±0.24 ^c
5	85.29±0.15 ^b	3.24±0.22 ^e	11.46±0.35 ^e
6	81.30±0.17 ^c	3.62±0.05 ^d	15.07±0.21 ^d
7	87.92±0.54 ^a	2.66±0.24 ^f	9.41±0.31 ^f

Çizelge 4.43. Erkek manda taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	75.43±0.45 ^e	12.25±0.59 ^a	12.30±0.87 ^b
2	78.32±0.18 ^d	4.82±0.41 ^b	16.85±0.58 ^a
3	79.36±1.07 ^d	3.15±0.83 ^c	17.47±0.55 ^a
4	86.54±2.36 ^c	3.15±0.1.27 ^c	10.31±1.10 ^c
5	92.51±0.13 ^b	1.67±0.34 ^{d,e}	5.81±0.39 ^d
6	87.57±1.08 ^c	2.78±0.90 ^{c,d}	9.61±0.40 ^c
7	95.10±0.51 ^a	1.13±0.03 ^e	3.86±0.62 ^e

Erkek manda taze fibroblastlarda tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.43).

Çizelge 4.44. Erkek manda donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	75.85±0.94 ^e	13.33±0.14 ^a	14.80±7.49 ^a
2	78.74±0.93 ^d	7.97±0.65 ^b	13.28±0.54 ^a
3	76.36±0.11 ^e	13.47±0.33 ^a	10.43±0.03 ^{a,b}
4	89.08±1.23 ^c	5.23±1.28 ^c	5.68±0.31 ^{b,c}
5	93.46±0.43 ^a	3.27±0.52 ^d	3.25±0.80 ^c
6	91.32±1.06 ^b	2.55±0.49 ^d	6.11±0.84 ^{b,c}
7	93.20±0.28 ^a	1.24±1.04 ^e	5.55±0.83 ^{b,c}

Erkek manda donmuş fibroblastlarda grup 3 (roskovitin-2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranları ($P<0.05$) grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.44).

Çizelge 4.45. Erkek manda taze kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	53.96±0.81 ^e	23.78±1.64 ^a	22.25±2.22 ^c
2	55.36±0.14 ^d	17.10±0.26 ^c	27.54±0.35 ^a
3	54.90±0.55 ^d	19.93±0.18 ^b	25.16±0.36 ^b
4	74.14±0.14 ^c	11.44±0.53 ^d	14.41±0.40 ^d
5	79.50±0.26 ^b	9.44±0.09 ^e	11.05±0.32 ^e
6	78.62±0.72 ^b	10.35±0.29 ^{d,e}	11.02±1.01 ^e
7	83.99±0.54 ^a	4.10±0.10 ^f	11.90±0.55 ^e

Çizelge 4.46. Erkek manda donmuş kas hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	55.94±0.59 ^f	17.17±0.71 ^a	27.08±0.83 ^a
2	57.74±0.48 ^e	15.83±0.47 ^c	26.42±0.51 ^a
3	57.55±0.64 ^e	16.20±0.94 ^{a,b}	26.25±0.62 ^a
4	75.18±0.66 ^d	11.31±0.85 ^d	13.50±0.48 ^{c,d}
5	79.54±0.48 ^b	6.09±0.73 ^e	14.36±0.85 ^c
6	77.89±0.70 ^c	5.78±0.27 ^e	16.32±0.98 ^b
7	82.92±0.56 ^a	4.41±0.39 ^f	12.66±0.36 ^d

Erkek manda taze kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.45).

Erkek manda donmuş kas hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.46).

Çizelge 4.47. Erkek manda taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	78.58±0.57 ^d	11.90±0.43 ^a	9.51±0.24 ^b
2	77.62±0.29 ^e	9.54±0.07 ^b	12.84±0.33 ^a
3	78.04±0.23 ^{d,e}	9.66±0.62 ^b	12.29±0.44 ^a
4	90.30±0.20 ^c	2.45±0.23 ^d	7.24±0.21 ^c
5	92.23±0.25 ^b	1.81±0.25 ^e	5.95±0.49 ^d
6	90.79±0.28 ^c	3.35±0.34 ^c	5.85±0.63 ^d
7	94.81±0.70 ^a	1.19±0.06 ^f	3.98±0.66 ^e

Çizelge 4.48. Erkek manda donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	59.24±0.51 ^f	15.36±1.58 ^a	25.40±1.25 ^a
2	61.37±9.54 ^e	12.83±0.22 ^c	25.79±0.31 ^a
3	60.97±0.45 ^e	14.10±1.08 ^{a,b}	24.93±1.29 ^a
4	76.16±0.18 ^d	10.20±0.35 ^d	13.62±0.51 ^b
5	83.80±0.19 ^c	8.37±0.20 ^e	7.81±0.27 ^c
6	84.80±0.37 ^b	2.51±0.60 ^f	12.67±0.22 ^b
7	90.08±0.50 ^a	1.09±0.21 ^g	8.82±0.69 ^c

Erkek manda taze kıkırdak hücrelerinde grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.47).

Erkek manda donmuş kıkırdak hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.48).

Çizelge 4.49. Dişi manda taze fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	77.54±1.23 ^d	7.24±3.33 ^{a,b}	15.20±3.31 ^b
2	76.48±0.17 ^{d,e}	8.30±0.14 ^a	15.15±0.39 ^b
3	75.14±0.61 ^e	3.89±1.41 ^c	20.96±0.79 ^a
4	80.22±1.36 ^c	8.59±1.74 ^a	11.18±0.59 ^c
5	91.25±0.54 ^a	4.78±0.11 ^{b,c}	3.96±0.60 ^d
6	85.54±0.29 ^b	4.33±0.22 ^c	10.12±0.52 ^c
7	92.14±0.18 ^a	4.12±0.02 ^c	3.73±0.19 ^d

Dişi manda taze fibroblastlarda grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) hariç diğer deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranları ($P<0.05$) grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.49).

Dişi manda donmuş fibroblastlarda tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranları ($P<0.05$) grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.50).

Çizelge 4.50. Dişi manda donmuş fibroblastlarda hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	76.90±0.37 ^d	12.06±0.20 ^a	11.03±0.56 ^b
2	78.39±0.67 ^c	7.55±1.84 ^{b,c}	14.04±1.24 ^a
3	78.72±0.24 ^c	7.19±0.09 ^c	14.08±0.29 ^a
4	81.35±1.36 ^b	8.76±0.91 ^b	9.88±0.64 ^b
5	91.38±0.79 ^a	2.93±0.62 ^e	5.65±1.31 ^c
6	82.53±0.32 ^b	4.84±0.35 ^d	12.62±0.67 ^a
7	92.34±0.17 ^a	2.34±0.15 ^e	5.31±0.31 ^c

Çizelge 4.51. Dişi manda taze kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	59.99±0.83 ^e	19.25±1.22 ^a	20.76±1.95 ^a
2	78.48±0.19 ^d	13.50±0.47 ^b	8.02±0.32 ^c
3	79.29±0.25 ^d	6.46±0.31 ^c	14.23±0.56 ^b
4	86.63±0.84 ^c	4.15±0.15 ^d	9.20±0.99 ^c
5	87.72±0.90 ^c	3.80±1.34 ^{d,e}	8.46±01.75 ^c
6	90.17±01.01 ^b	2.39±0.26 ^f	7.42±1.27 ^{c,d}
7	91.85±0.48 ^a	2.54±0.14 ^{e,f}	5.60±0.62 ^d

Dişi manda taze kıkırdak hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.51).

Dişi manda donmuş kıkırdak hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş,

ancak en yüksek G1/G0 oranı (P<0.05) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.52).

Çizelge 4.52. Dişi manda donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	69.58±1.15 ^e	17.13±1.24 ^a	13.29±1.57 ^{a,b}
2	73.56±2.93 ^d	11.38±0.15 ^c	15.05±02.78 ^a
3	70.81±0.67 ^e	15.82±0.42 ^b	13.36±0.37 ^{a,b}
4	79.28±0.58 ^{b,c}	7.51±0.38 ^e	13.20±0.24 ^{a,b}
5	81.38±1.16 ^b	3.97±0.10 ^f	14.64±1.15 ^a
6	78.21±0.22 ^c	10.12±0.48 ^d	11.65±0.58 ^{b,c}
7	86.99±0.35 ^a	2.31±0.30 ^g	10.70±0.25 ^c

Çizelge 4.53. Dişi manda taze granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	58.30±0.15 ^f	19.94±0.79 ^a	21.74±0.68 ^a
2	65.40±0.34 ^e	16.77±0.18 ^b	17.82±0.47 ^b
3	64.88±0.36 ^e	15.98±0.30 ^{b,c}	19.13±0.66 ^b
4	74.18±1.46 ^d	15.38±0.08 ^c	10.43±1.54 ^{c,d}
5	77.19±0.25 ^b	13.54±0.39 ^d	9.26±0.60 ^{d,e}
6	75.45±0.17 ^c	13.65±0.22 ^d	10.89±0.36 ^c
7	81.22±0.87 ^a	9.75±0.73 ^e	9.02±0.29 ^e

Dişî manda taze granüloza hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.53).

Dişî manda donmuş granüloza hücrelerinde tüm deney gruplarında farklı senkronizasyon uygulamaları kontrol grubuna göre hücreleri G1/G0'da senkronize etmiş, ancak en yüksek G1/G0 oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' den elde edilmiştir (Çizelge 4.54).

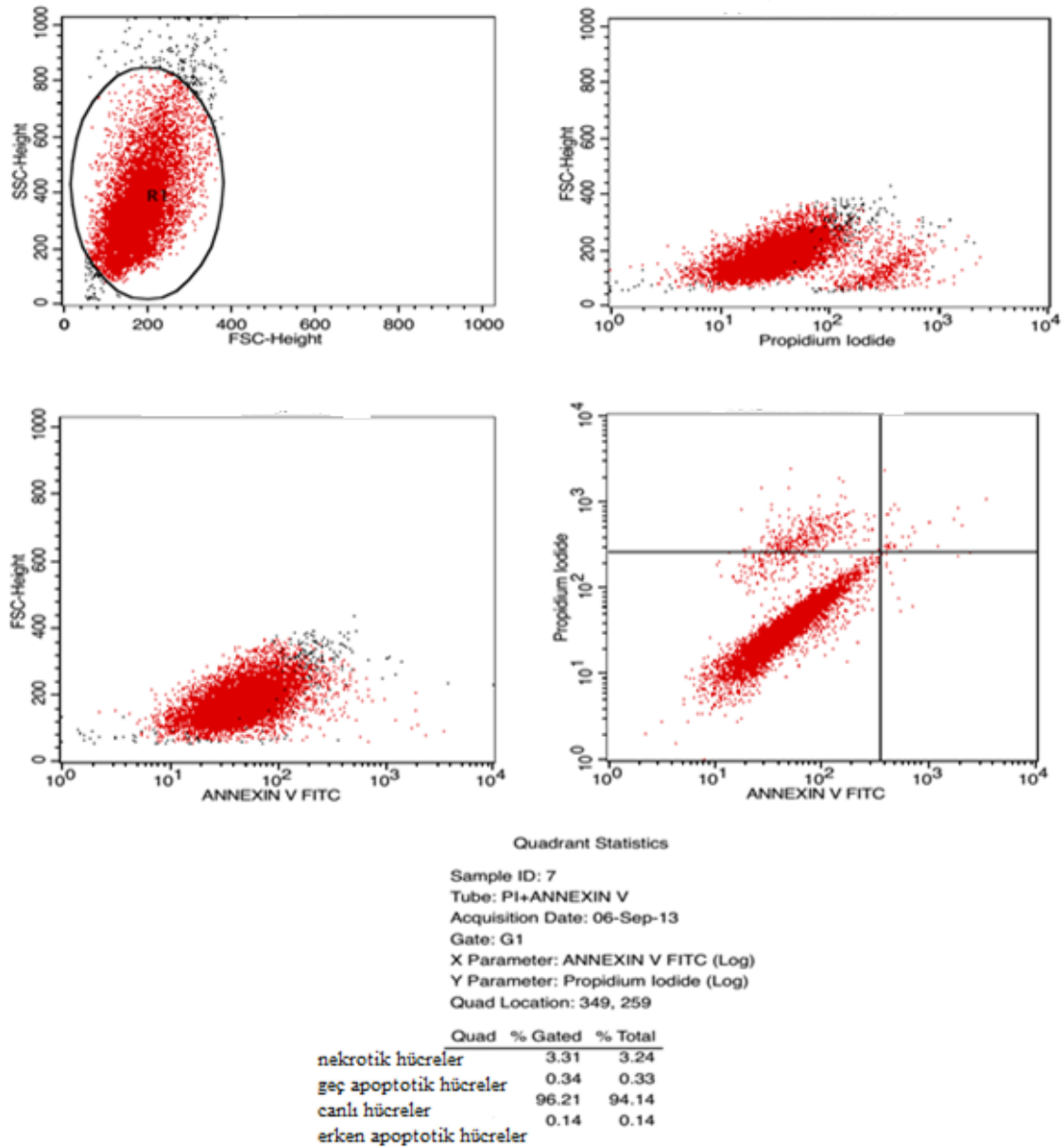
Çizelge 4.54. Dişî manda donmuş granüloza hücrelerinde hücre siklus analiz sonuçları

GRUP	G1/G0 (%)	S (%)	G2/M (%)
1	59.20±0.27 ^f	13.10±0.53 ^a	27.69±0.28 ^a
2	61.97±0.12 ^e	12.83±0.57 ^a	25.18±0.69 ^b
3	61.91±0.06 ^e	13.02±0.57 ^a	25.07±0.53 ^b
4	78.45±0.39 ^d	6.75±0.48 ^b	14.79±0.87 ^c
5	82.68±0.21 ^b	5.39±0.26 ^d	11.92±0.11 ^d
6	80.31±0.70 ^c	5.41±0.49 ^d	14.27±0.38 ^c
7	86.23±0.90 ^a	3.62±0.34 ^e	10.17±1.12 ^e

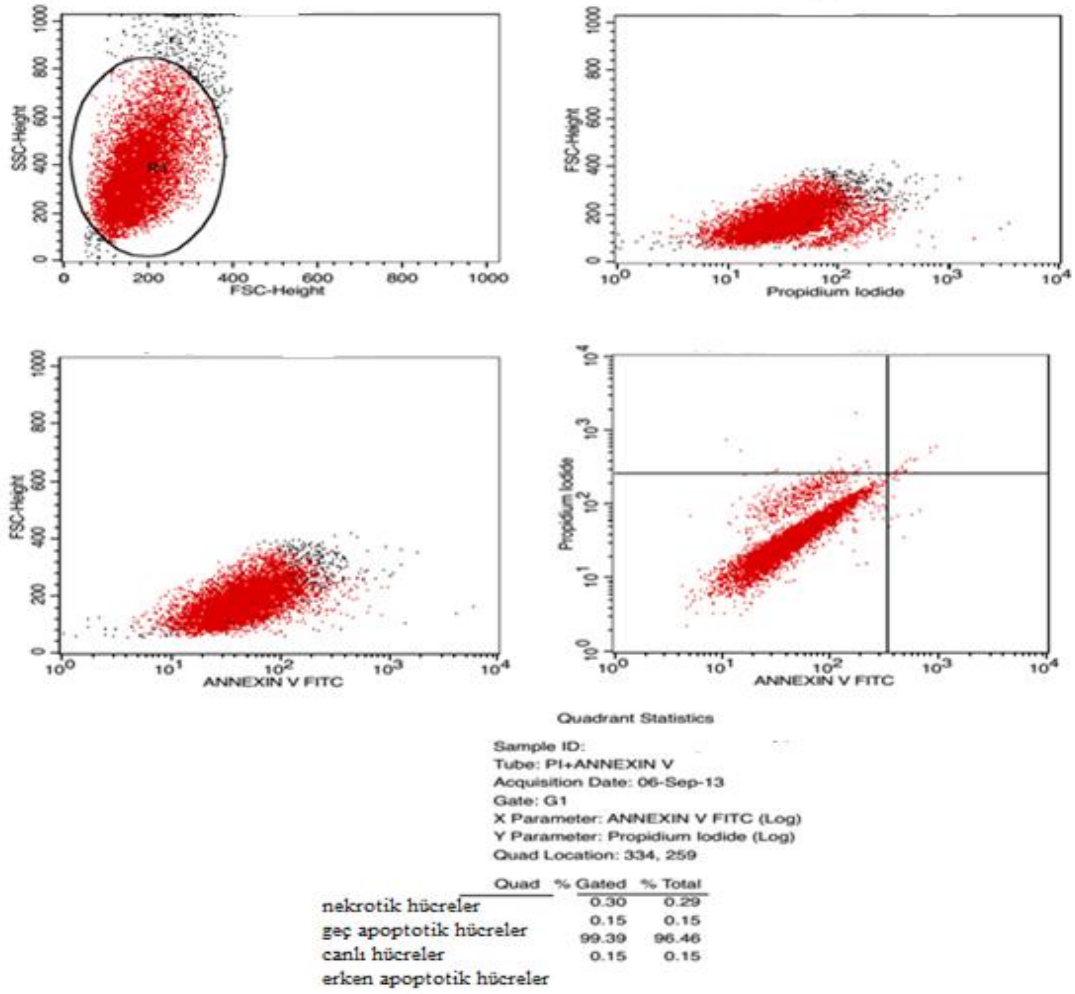
4.4 Hücrede Apoptoz ve Nekroz Analizi

4.4.1 RNaz Optimizasyonu

Yapılan literatür taraması sonucunda Annexin V/Propidyum iyodit ile yapılan apoptoz analiz çalışmalarında eklenen RNaz'ın yanlış pozitif sonuçları ortadan kaldırdığı görülmüş ve bunun üzerine kendi hücre gruplarımızda RNaz'ın etkisi araştırılmıştır.



Şekil 4.34. RNaz eklenmeyen boyama sonucu



Şekil 4.35. RNaz eklenen boyama sonucu

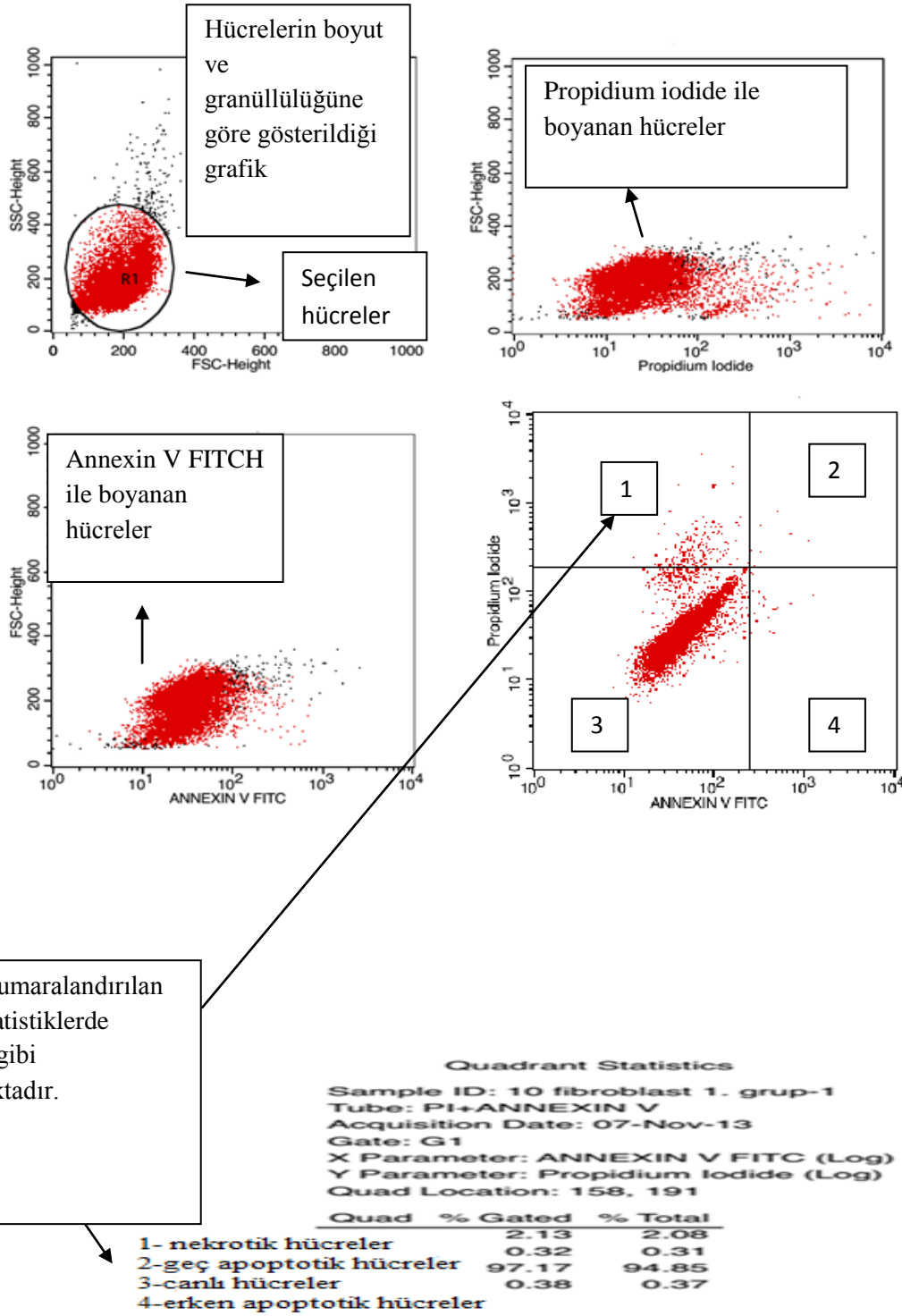
Çizelge 4.55. AnnexinV boyama protokolünde RNaz kullanımının etkisi

Hücre tipi	RNaz A	Canlı hücre (%)	Nekrotik hücre (%)	Geç apoptotik (%)	Erken Apoptotik (%)
Kıkırdak	Yok	96.21	3.31	0.34	0.14
Kıkırdak	Var	99.39	0.3	0.15	0.15
Fibroblast	Yok	96.56	2.82	0.45	0.17
Fibroblast	Var	98.32	1.29	0.24	0.15

Çizelgede de görüldüğü gibi RNaz eklenen ve eklenmeyen boyama işleminde hücre canlılığında anlamlı farklılıklar gözlenmiş, RNaz kullanılması uygun görülmüştür.

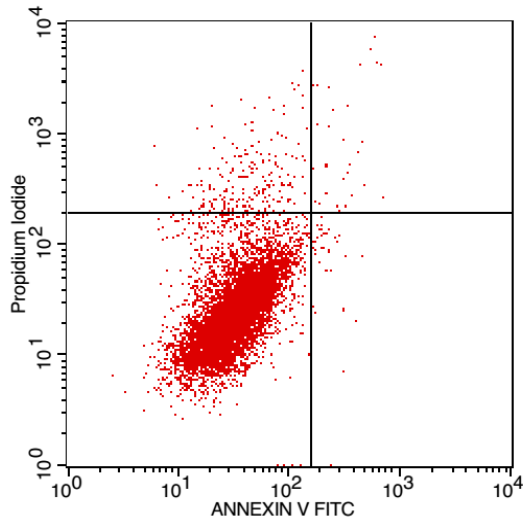
4.4.2 Apoptoz ve nekroz analiz sonuçları

Sonuçlar aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir.



Şekil 4.36. Canlılık analiz sonuçlarının değerlendirilmesinin gösterimi

BD FACS Calibur cihazı kullanılarak yapılan hücre canlılık analizlerinden iki tanesi örnek olarak aşağıda verilmiştir.

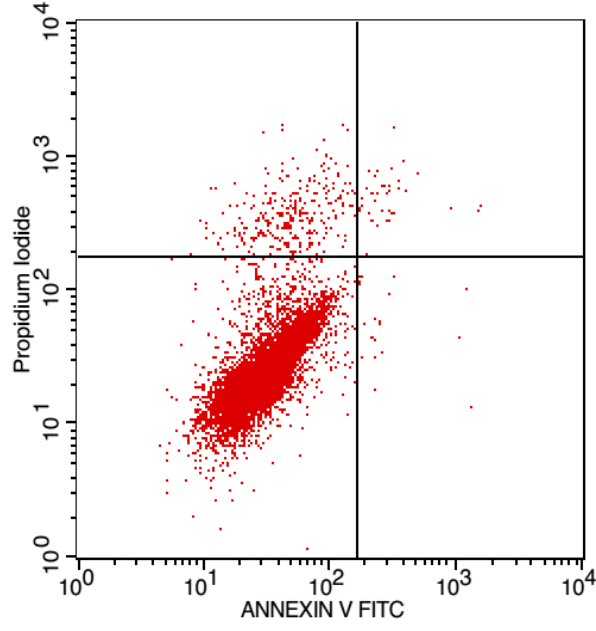


Quadrant Statistics

Sample ID: 10 fibroblast 1. grup-1
Tube: PI+ANNEXIN V
Acquisition Date: 07-Nov-13
Gate: G1
X Parameter: ANNEXIN V FITC (Log)
Y Parameter: Propidium Iodide (Log)
Quad Location: 158, 191

	Quad	% Gated	% Total
nekrotik hücreler		2.13	2.08
geç apoptotik hücreler		0.32	0.31
canlı hücreler		97.17	94.85
erken apoptotik hücreler		0.38	0.37

Şekil 4.37. Sığır fibroblastlarının kontrol grubu



Quadrant Statistics

Sample ID: 11. fibroblast 4.grup-1
 Tube: PI+ANNEXIN V
 Acquisition Date: 08-Nov-13
 Gate: G1
 X Parameter: ANNEXIN V FITC (Log)
 Y Parameter: Propidium Iodide (Log)
 Quad Location: 165, 175

	Quad	% Gated	% Total
nekrotik hücreler		3.01	2.80
geç apoptotik hücreler		0.40	0.37
canlı hücreler		96.38	89.73
erken apoptotik hücreler		0.21	0.20

Şekil 4.38. Sığır fibroblastlarında erken konfluent grubu

Çizelge 4.56. Erkek sığır taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.37±0.22 ^b	2.06±0.15 ^b	0.05±0.03 ^b	1.06±0.10 ^b
2	95.15±1.21 ^c	1.19±0.15 ^b	0.15±.00 ^a	2.55±1.15 ^a

3	96.30±0.47 ^b	1.66±0.48 ^b	0.08±0.04 ^b	1.42±0.11 ^b
4	94.99±0.27 ^c	2.39±0.05 ^b	0.12±0.07 ^a	2.42±0.37 ^a
5	92.08±0.40 ^e	4.00±2.22 ^a	0.07±0.04 ^b	2.16±1.84 ^a
6	98.11±0.21 ^a	1.44±0.14 ^b	0.04±0.02 ^b	0.28±0.03 ^c
7	96.21±0.22 ^b	1.75±0.12 ^b	0.08±0.04 ^b	1.04±0.12 ^b

Erkek sığır fibroblastlarda kontrol grubu da dahil olmak üzere nekrotik hücre sayısında senkronizasyon grupları arasındaki tek fark grup 5 (geç konfluent)' de olmuş, diğerlerine göre nekrotik hücre oranı istatistiksel olarak ($P<0.05$) yüksek çıkmıştır. Ayrıca grup 2,4 ve 5' de erken apoptotik hücre oranı da yüksek bulunmuştur. Hücre canlılık oranının en düşük olduğu grup 5. grup iken yine diğer gruplara oranla canlılık oranı istatistiksel olarak ($P<0.05$) düşük olan diğer iki grup da grup 2 (roskovitin-1) ve grup 4 (erken konfluent) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.56).

Aynı hücrelerin donmuş olanlarında ise istatistiksel olarak en yüksek geç ve erkek apoptotik hücre oranı grup 6 (72 saat serum açığı)' da bulunurken, aynı zamanda en düşük canlı hücre oranı ($P<0.05$) da yine aynı grupta görülmüştür. Nekrotik hücre oranı ise grup 2 (roskotivin-1)' de istatistiksel olarak ($P<0.05$) diğer gruplardan yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.57).

Çizelge 4.57. Erkek sığır donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	95.45±0.83 ^b	3.85±0.83 ^b	0.02±0.05 ^{b,c}	0.40±0.08 ^c
2	94.19±1.64 ^b	5.43±1.48 ^a	0.14±0.11 ^{b,c}	0.22±0.11 ^c
3	95.32±1.07 ^b	3.07±0.82 ^{b,c}	0.49±0.36 ^{b,c}	1.08±0.29 ^b
4	97.42±0.25 ^a	2.24±0.22 ^{c,d}	0.11±0.03 ^c	0.21±0.03 ^c
5	97.98±0.30 ^a	1.31±0.09 ^d	0.30±0.10 ^{b,c}	0.41±0.26 ^c

6	92.04±1.34 ^c	2.45±0.09 ^{c.d}	2.47±0.85 ^a	3.03±0.46 ^a
7	95.12±0.68 ^b	2.73±0.05 ^{b.c}	0.85±0.29 ^b	1.29±0.37 ^b

Çizelge 4.58. Erkek sığır taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	94.73±1.26 ^b	2.43±1.16 ^c	0.79±0.19 ^a	2.05±0.14 ^a
2	90.87±0.22 ^c	7.81±0.17 ^a	0.93±0.04 ^a	0.38±0.02 ^b
3	91.42±0.88 ^c	5.57±1.12 ^b	0.77±0.09 ^a	2.23±0.30 ^a
4	97.03±1.27 ^a	2.22±1.20 ^{c.d}	0.29±0.15 ^c	0.45±0.09 ^b
5	94.90±0.57 ^b	4.40±0.64 ^b	0.34±0.05 ^c	0.34±0.13 ^b
6	97.09±0.17 ^a	1.50±0.07 ^{c.d}	0.82±0.07 ^a	0.57±0.17 ^b
7	98.08±0.09 ^a	0.74±0.12 ^d	0.58±0.00 ^b	0.58±0.05 ^b

Erkek sığır taze kas hücrelerinde istatistiksel olarak en yüksek ($P<0.05$) nekrotik hücre oranları sırasıyla grup 2 (roskovitin-1), grup 3 (roskovitin-2) ve grup 5 (geç konfluent)' de görülürken, en düşük hücre canlılık oranları ($P<0.05$) roskovitin gruplarında (grup 1 ve 2)' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.58).

Çizelge 4.59. Erkek sığır donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	94.12±0.65 ^{c.d}	4.38±1.51 ^a	0.44±0.02 ^e	1.04±0.19 ^b
2	95.43±0.17 ^{b.c}	2.15±0.06 ^b	0.96±0.03 ^b	1.45±0.09 ^b
3	90.98±0.58 ^e	5.03±0.36 ^a	0.77±0.13 ^c	3.21±0.65 ^a
4	96.98±0.29 ^b	1.42±0.12 ^{b.c}	0.70±0.08 ^c	0.89±0.43 ^b

5	99.65±0.05 ^a	0.28±0.02 ^c	0.04±0.03 ^d	0.01±0.01 ^c
6	91.87±0.73 ^e	5.35±0.36 ^a	1.29±0.11 ^a	1.41±0.83 ^b
7	93.01±2.54 ^{d,e}	5.30±1.19 ^a	1.56±0.20 ^a	1.45±0.15 ^b

Çizelge 4.60. Erkek sığır taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	97.80±0.18 ^b	1.64±0.18 ^b	0.30±0.04 ^{d,e}	0.24±0.02 ^d
2	98.12±0.17 ^b	1.13±0.13 ^c	0.22±0.03 ^{e,f}	0.52±0.07 ^c
3	94.13±0.12 ^d	1.21±0.11 ^c	1.00±0.02 ^c	3.63±0.19 ^a
4	94.72±0.23 ^d	2.84±0.14 ^a	1.33±0.07 ^b	1.09±0.07 ^b
5	92.88±0.26 ^c	2.67±0.20 ^a	3.84±0.17 ^a	0.59±0.03 ^c
6	99.25±0.03 ^a	0.50±0.06 ^d	0.08±0.03 ^f	0.15±0.04 ^d
7	97.45±0.24 ^b	1.69±0.16 ^b	0.38±0.06 ^d	0.48±0.09 ^c

Erkek donmuş kas hücrelerinde ise senkronizasyon grupları arasında en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2), grup 6 (72 saat serum açlığı) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)'de bulunurken yine geç ve erken apoptotik hücre oranları da serum açlığı gruplarında (grup 6 ve 7) diğerlerinden yüksek ($P<0.05$) olmuştur. Donmuş kas hücrelerinin kontrol grubunda da nekrotik hücre oranının benzer şekilde yüksek bulunması donmanın kas hücreleri üzerindeki genel bir olumsuz etkisine işaret etmektedir. Deney grupları içinde en düşük hücre canlılık oranları ($P<0.05$) grup 3, grup 6 ve grup 7'de görülmüştür (Çizelge 4.59).

Erkek sığır taze kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 4 ve 5 (erken ve geç konfluent)' de görülürken, en yüksek ($P<0.05$) geç apoptotik hücre oranı grup 5'de, en yüksek erken apoptotik hücre oranı ise grup 3 (roskovitin-2)' de görülmüştür. En düşük hücre canlılık oranları ($P<0.05$) ise grup 3 (roskovitin-2), grup 4 ve 5 (sırasıyla erken ve geç konfluent) gruplarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.60).

Çizelge 4.61. Erkek sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.03±0.25 ^a	2.51±0.20 ^d	0.52±0.10 ^b	0.93±0.01 ^c
2	93.90±0.35 ^{b,c}	4.47±0.22 ^b	0.39±0.10 ^c	1.23±0.06 ^b
3	96.42±0.62 ^a	1.81±0.64 ^d	0.18±0.02 ^d	1.58±0.11 ^a
4	93.33±0.56 ^c	6.50±0.56 ^a	0.06±0.03 ^e	0.10±0.02 ^d
5	96.22±1.16 ^a	3.65±1.16 ^{b,c}	0.04±0.02 ^e	0.08±0.02 ^d
6	93.98±0.04 ^{b,c}	5.97±0.03 ^a	0.02±0.01 ^e	0.02±0.00 ^d
7	94.66±0.40 ^b	2.76±0.36 ^{c,d}	1.57±0.04 ^a	1.01±0.01 ^c

Sığır erkek donmuş kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 4 (erken konfluent), grup 6 (72 saat serum açlığı), grup 2 (roskovitin-1) ve grup 5 (geç konfluent), en düşük canlı hücre oranları ($P<0.05$) ise grup 2, grup 4, grup 6 ve 7'de görülmüştür. Donmuş kıkırdak hücrelerinin de uygulamalara tazelerden daha hassas olduğu dikkat çekmektedir ve serum açlığından taze hücreler etkilenmezken donmuş hücreler olumsuz etkilenmiştir (Çizelge 4.61).

Çizelge 4.62. Dişi sığır taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	84.42±0.66 ^c	11.56±0.57 ^a	3.60±0.30 ^b	0.41±0.03 ^b
2	84.80±0.55 ^c	7.55±0.43 ^b	6.40±0.14 ^a	1.75±1.06 ^{a,b}
3	81.57±0.62 ^d	13.67±0.65 ^a	3.37±0.08 ^b	1.38±0.47 ^{a,b}
4	86.34±0.73 ^b	12.76±0.94 ^a	0.29±0.01 ^d	0.61±0.57 ^b
5	84.63±0.30 ^c	8.06±0.17 ^b	5.07±0.15 ^a	2.24±0.15 ^a

6	82.25±0.96 ^d	12.14±0.21 ^a	3.60±0.15 ^b	1.49±0.53 ^{a,b}
7	89.25±0.42 ^a	6.54±0.66 ^b	2.85±0.14 ^c	1.35±1.23 ^{a,b}

Dişi sığır taze fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranları (P<0.05) grup 3 (roskovitin-2), grup 4 (erken konfluent) ve grup 6 (72 saat serum açlığı)' da görülürken, en yüksek geç apoptotik hücre oranı (P<0.05) grup 2 (roskovitin-2) ve grup 5 (geç konfluent)'te en düşük canlılık oranları grup 3 ve grup 6' da tespit edilmiştir. Ancak bu hücre hattında tüm gruplarda diğerlerine oranla düşen canlılık oranı kültür koşullarındaki veya hücre hattındaki bir sorun olabileceği izlenimi vermiştir (Çizelge 4.62).

Aynı hücre hattının dondurulmuş örneğinde yapılan çalışmada en yüksek nekrotik hücre oranı (P<0.05) grup 3 (roskovitin-2) ve grup 5 (geç konfluent)' de görülürken, en yüksek (P<0.05) geç apoptotik hücre oranı grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) de tespit edilmiştir. En düşük hücre canlılığı (P<0.05) grup 3 (roskovitine-2)' de belirlenmiştir. Bu hattın taze örneğinin tüm gruplarındaki donmuş örneğe oranla düşük olan hücre canlılığı taze örneğin kültürü sırasında meydana gelen genel bir duruma bağlanmıştır (Çizelge 4.63).

Çizelge 4.63. Dişi sığır donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	95.07±0.29 ^c	2.29±0.14 ^b	1.67±0.35 ^b	0.96±0.40 ^b
2	94.31±0.17 ^d	2.59±0.14 ^b	2.37±0.45 ^a	0.28±0.30 ^c
3	92.20±0.19 ^e	3.71±0.25 ^a	2.38±0.09 ^a	1.70±0.06 ^a
4	96.17±0.12 ^b	1.44±0.11 ^c	1.25±0.02 ^{b,c}	1.13±0.15 ^{a,b}
5	94.12±0.17 ^d	3.34±0.62 ^a	1.49±0.24 ^{b,c}	1.05±0.67 ^b
6	97.01±0.26 ^a	1.21±0.15 ^c	1.10±0.29 ^c	0.67±0.13 ^{b,c}
7	95.23±0.22 ^c	2.07±0.05 ^b	1.73±0.18 ^b	0.96±0.34 ^b

Çizelge 4.64. Dişi sığır taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	93.60±0.52 ^e	4.91±0.29 ^a	0.43±0.09 ^{a,b}	1.05±0.15 ^{a,b}
2	95.04±0.18 ^d	3.97±0.09 ^b	0.32±0.03 ^b	0.66±0.10 ^{b,c}
3	95.33±1.27 ^{c,d}	3.33±0.87 ^b	0.43±0.13 ^{a,b}	0.90±0.46 ^{a,b,c}
4	96.86±0.72 ^{a,b}	0.98±0.21 ^d	0.56±0.09 ^a	1.58±0.87 ^a
5	97.91±0.09 ^a	1.10±0.13 ^d	0.30±0.06 ^b	0.67±0.11 ^{b,c}
6	96.52±0.43 ^{b,c}	2.76±0.59 ^c	0.55±0.14 ^a	0.16±0.02 ^c
7	95.86±0.62 ^{b,c,d}	2.92±0.46 ^c	0.51±0.04 ^a	0.69±0.18 ^{b,c}

Dişi sığır kas hücrelerinin deney gruplarında en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2)' de görülmüş, ancak bu oran kontrol grubunda daha yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur. Bu açıdan bakıldığında hiçbir uygulamanın hücrelerin canlılığında önemli bir düşüşe sebep olmadığı kanısı yaratmıştır (Çizelge 4.64).

Dişi sığır donmuş kas hücrelerinin senkronizasyon gruplarında en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 4 (geç konfluent) ve grup 6 (72 saat seum açlığı)' da, en yüksek erken apoptotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2)' de tespit edilmiştir. En düşük canlılık oranları ($P<0.05$) grup 3 ve grup 6' da görülmüştür (Çizelge 4.65).

Çizelge 4.65. Dişi sığır donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	95.21±0.22 ^b	2.57±0.28 ^b	0.66±0.22 ^{c,d}	1.40±0.04 ^c
2	94.47±0.50 ^{b,c}	2.23±0.47 ^b	1.22±0.18 ^{a,b}	2.07±0.13 ^b
3	93.09±0.27 ^{c,d}	3.02±0.35 ^b	0.92±0.36 ^{b,c}	2.96±0.16 ^a

4	94.23±1.49 ^{b,c}	4.80±1.56 ^a	0.55±0.10 ^{c,d}	0.40±0.03 ^{d,e}
5	97.23±0.91 ^a	2.17±0.87 ^b	0.29±0.04 ^d	0.29±0.04 ^e
6	92.73±0.51 ^d	4.70±0.49 ^a	1.40±0.27 ^a	1.15±0.41 ^c
7	97.08±0.53 ^a	1.70±0.43 ^b	0.52±0.05 ^d	0.69±0.18 ^d

Çizelge 4.66. Dişi sığır taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	94.66±0.67 ^b	4.86±0.66 ^c	0.25±0.05 ^b	0.23±0.00 ^c
2	94.58±0.43 ^b	4.74±0.36 ^c	0.45±0.09 ^b	0.20±0.02 ^c
3	96.06±0.08 ^a	3.44±0.11 ^c	0.27±0.07 ^b	0.22±0.05 ^c
4	92.10±0.64 ^c	7.00±0.55 ^a	0.65±0.11 ^b	0.24±0.03 ^c
5	91.12±0.54 ^c	5.74±2.27 ^b	1.69±0.57 ^a	1.77±1.07 ^b
6	93.49±0.29 ^c	5.95±0.30 ^b	0.34±0.06 ^b	0.21±0.02 ^c
7	91.71±1.76 ^c	1.30±0.20 ^d	1.41±0.35 ^a	5.57±1.27 ^a

Dişi sığır taze kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 4 (erken konfluent), grup 5 (geç konfluent), grup 6 (72 saat serum açlığı) ve 7 (120 saat serum açlığı)' de tespit edilmiş, en yüksek erken apoptotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 7' de görülmüştür. En düşük canlılık oranları ($P<0.05$) grup 4,5,6 ve 7'de bulunmuştur (Çizelge 4.66).

Çizelge 4.67. Dişi sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	93.76±1.04 ^b	5.30±1.37 ^b	0.68±0.33 ^a	0.25±0.09 ^d
2	91.64±1.03 ^{c,d}	7.08±0.66 ^a	0.70±0.18 ^b	0.57±0.18 ^c
3	90.82±0.57 ^d	2.64±0.45 ^c	1.93±0.54 ^b	4.60±0.18 ^a

4	92.33±1.23 ^c	7.12±0.84 ^a	0.25±0.09 ^b	0.08±0.02 ^d
5	92.04±0.05 ^{c,d}	4.93±0.33 ^b	1.61±0.16 ^a	1.41±0.14 ^b
6	97.12±0.29 ^a	1.96±0.22 ^c	0.74±0.04 ^b	0.17±0.05 ^d
7	95.80±0.44 ^a	2.06±0.11 ^c	0.50±0.12 ^b	1.62±0.31 ^b

Çizelge 4.68. Dişi sığır taze granuloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	94.96±0.12 ^{a,b}	2.55±0.59 ^b	0.63±0.13 ^{b,c}	1.85±0.63 ^a
2	95.19±1.66 ^{a,b}	3.75±1.46 ^{a,b}	0.34±0.19 ^{c,d}	0.60±0.22 ^{b,c,d}
3	94.23±0.96 ^{a,b}	4.07±0.93 ^{a,b}	0.42±0.04 ^{c,d}	1.27±0.10 ^{a,b,c}
4	94.77±0.21 ^{a,b}	4.57±0.13 ^{a,b}	0.35±0.02 ^{c,d}	0.29±0.12 ^d
5	96.74±0.60 ^a	2.74±0.26 ^{a,b}	0.23±0.07 ^d	0.41±0.11 ^{c,d}
6	93.00±3.55 ^b	4.91±2.51 ^a	1.03±0.34 ^a	1.05±0.75 ^{a,b,c,d}
7	93.48±0.53 ^b	4.20±0.34 ^{a,b}	0.81±0.19 ^{a,b}	1.50±0.076 ^{a,b}

Dişi sığır donmuş kıkırdak hücrelerinin senkronizasyon gruplarında en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 1 (roskovitin-1) ve grup 4 (erken konfluent)' de en düşük hücre canlılık oranları ($P<0.05$) grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) grup 4 ve 5 (sırasıyla erken ve geç konfluent)' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.67).

Dişi sığır taze granuloza hücrelerinde senkronizasyon uygulamalarının hemen hepsi benzer nekrotik hücre ve canlı hücre oranı ($P<0.05$) ile sonuçlanmıştır (Çizelge 4.68).

Sığır donmuş granuloza hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2), grup 6 ve 7 (72 ve 120 saat serum açlığı)' de, en düşük canlılık oranı ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2)' de tespit edilmiştir. Grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120

saat serum açığı)' de canlı hücre oranı ($P<0.05$) kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Diğer senkronizasyon gruplarında benzer etkiler görülmüştür (Çizelge 4.69).

Çizelge 4.69. Dişi sığır donmuş granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.80±0.55 ^{a,b}	2.05±0.85 ^c	0.74±0.075 ^b	0.40±0.35 ^a
2	95.95±1.96 ^{b,c}	2.49±1.20 ^c	0.61±0.25 ^{b,c}	0.93±0.68 ^a
3	92.14±1.11 ^d	5.83±0.88 ^a	1.12±0.32 ^a	0.89±0.16 ^a
4	98.32±0.64 ^a	1.08±0.52 ^d	0.26±0.05 ^c	0.33±0.10 ^a
5	94.30±0.24 ^c	0.63±0.21 ^d	0.31±0.04 ^c	0.75±0.05 ^a
6	95.31±0.32 ^{b,c}	3.10±0.09 ^b	0.60±0.32 ^{b,c}	0.98±0.28 ^a
7	94.73±0.54 ^c	3.76±0.58 ^b	0.84±0.13 ^{a,b}	0.66±0.23 ^a

Çizelge 4.70. Erkek koyun taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	95.81±0.22 ^a	3.59±0.24 ^e	0.44±0.06 ^e	0.15±0.05 ^c
2	92.60±0.03 ^c	6.54±0.33 ^{a,b}	0.60±0.05 ^{d,e}	0.24±0.08 ^{b,c}
3	91.84±0.05 ^d	6.76±0.48 ^a	0.80±0.02 ^{b,c,d}	0.59±0.26 ^{a,b}
4	92.57±0.17 ^c	5.69±0.55 ^c	0.97±0.22 ^{b,c}	0.75±0.17 ^a
5	92.31±0.11 ^{c,d}	6.04±0.14 ^{b,c}	1.32±0.10 ^a	0.31±0.02 ^{b,c}

6	94.89±0.45 ^b	3.44±0.30 ^e	1.00±0.17 ^b	0.60±0.47 ^{a,b}
7	94.59±0.16 ^b	4.46±0.14 ^d	0.75±0.12 ^{c,d}	0.19±0.04 ^{b,c}

Çizelge 4.71. Erkek koyun donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	93.17±1.77 ^{b,c}	5.66±1.96 ^b	0.64±0.09 ^b	0.51±0.22 ^{b,c}
2	92.31±1.88 ^{c,d}	6.37±1.80 ^a	0.49±0.02 ^b	0.81±0.05 ^b
3	90.84±0.43 ^d	7.15±0.31 ^a	0.56±0.15 ^b	1.43±0.64 ^a
4	94.17±0.67 ^{b,c}	4.45±0.61 ^b	0.57±0.10 ^b	0.78±0.11 ^b
5	97.85±0.19 ^a	1.87±0.15 ^d	0.07±0.00 ^c	0.20±0.04 ^c
6	97.56±0.41 ^a	0.91±0.13 ^d	0.61±0.14 ^b	0.91±0.13 ^{a,b}
7	94.52±0.60 ^b	2.78±0.14 ^c	1.66±0.41 ^a	1.02±0.27 ^{a,b}

Çizelge 4.72. Erkek koyun taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.18±0.07 ^a	3.16±0.09 ^c	0.37±0.06 ^{b,c,d}	0.28±0.01 ^c
2	93.61±0.74 ^b	5.07±0.50 ^{a,b}	0.44±0.15 ^{b,c,d}	0.87±0.13 ^b
3	91.23±1.24 ^c	5.45±0.64 ^{a,b}	1.33±0.24 ^a	1.97±0.51 ^a
4	95.92±1.20 ^a	2.99±0.79 ^c	0.25±0.13 ^d	0.83±0.28 ^b

5	93.07±0.62 ^b	5.59±0.56 ^{a,b}	0.56±0.04 ^b	0.69±0.42 ^{b,c}
6	93.18±0.67 ^b	5.93±0.77 ^a	0.50±0.06 ^{b,c}	0.38±0.05 ^{b,c}
7	94.24±0.07 ^b	4.83±0.09 ^b	0.31±0.03 ^{c,d}	0.61±0.12 ^{b,c}

Erkek koyun taze fibroblastlarda nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 6 (72 saat serum açlığı) hariç tüm senkronizasyon gruplarında kontrole göre yüksek bulunmuştur. En düşük hücre canlılık oranı grup 3 (roskovitin-2)' de tespit edilmiş, ancak grup 2 (roskovitin 2), grup 4 ve 5 (sırasıyla erken ve geç konfluent)' de canlılık oranları ($P<0.05$) kontrole göre düşük çıkmıştır (Çizelge 4.70).

Erkek koyun donmuş fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) ve en düşük canlılık oranları ($P<0.05$) grup 2 ve 3 (roskovitin-1 ve 2)' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.71).

Erkek koyun taze kas hücrelerinde grup 4 (erken konfluent)'te tüm senkronizasyon gruplarında nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) kontrolden yüksek bulunmuş, yine grup 4 hariç tüm gruplarda canlılık oranının ($P<0.05$) kontrolden düşük olduğu tespit edilmiştir. Gruplar içinde en düşük canlılık oranı grup 3 (roskovitin-2)' de görülmüştür (Çizelge 4.72).

Erkek koyun donmuş kas hücrelerinde canlılık oranları üzerinde senkronizasyon gruplarının önemli bir olumsuz etkisi olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.73).

Çizelge 4.73. Erkek koyun donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	94.39±0.90 ^{b,c}	4.95±0.77 ^a	0.24±0.04 ^{d,e}	0.40±0.08 ^c
2	95.87±0.19 ^a	2.70±0.33 ^c	0.53±0.30 ^{c,d}	0.88±0.21 ^b
3	95.23±0.31 ^{a,b}	2.90±0.26 ^c	0.24±0.03 ^{d,e}	1.61±0.08 ^a
4	94.47±0.54 ^d	3.21±0.60 ^b	0.87±0.12 ^b	0.42±0.10 ^c

5	96.27±0.69 ^a	3.54±0.64 ^b	0.10±0.02 ^e	0.07±0.02 ^d
6	94.71±0.59 ^{b,c}	3.13±0.13 ^b	1.26±0.30 ^a	0.88±0.18 ^b
7	93.70±0.68 ^c	5.05±0.57 ^a	0.61±0.16 ^{b,c}	0.63±0.05 ^c

Çizelge 4.74. Erkek koyun taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.97±0.11 ^a	2.62±0.09 ^c	0.26±0.01 ^d	0.14±0.05 ^e
2	90.09±0.10 ^d	7.12±0.19 ^a	0.63±0.13 ^{c,d}	2.14±0.13 ^{a,b}
3	92.15±1.64 ^c	3.16±0.73 ^c	2.25±0.48 ^a	2.43±0.48 ^a
4	93.93±0.17 ^b	3.12±0.24 ^c	1.32±0.26 ^b	1.61±0.33 ^{b,c}
5	93.01±1.59 ^{b,c}	4.20±0.26 ^b	1.09±0.61 ^{b,c}	1.69±0.87 ^{a,b,c}
6	94.16±0.51 ^b	4.29±0.62 ^b	0.43±0.12 ^d	1.10±0.19 ^{c,d}
7	95.94±0.05 ^b	2.71±0.04 ^c	0.67±0.06 ^{c,d}	0.67±0.06 ^{d,e}

Erkek koyun taze kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2 (roskovitin-1), grup 5 (geç konfluent) ve grup 6 (72 saat serum açlığı)'da en yüksek geç apoptotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2)'de en yüksek erken apoptotik hücre oranı ($P<0.05$) ise grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin 1 ve 2)' de tespit edilmiştir. Hücre canlılık oranları ($P<0.05$) tüm senkronizasyon gruplarında kontrolden düşük çıkmış, ancak en düşük oranlar grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin 1 ve 2)' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.74).

Çizelge 4.75. Erkek koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	94.32±0.14 ^b	3.00±0.06 ^b	1.23±0.09 ^a	1.43±0.43 ^{a,b}
2	91.39±0.60 ^c	6.19±0.32 ^a	0.72±0.08 ^{b,c}	1.83±0.04 ^{a,b}

3	92.14±2.87 ^c	5.25±2.11 ^a	0.50±0.17 ^c	2.10±0.63 ^a
4	96.90±0.43 ^b	2.47±0.34 ^{b.c}	0.41±0.08 ^c	0.20±0.01 ^d
5	94.90±0.90 ^b	2.89±0.17 ^{b.c}	1.01±0.40 ^{a.b}	1.18±0.49 ^{b.c}
6	95.21±0.28 ^b	3.33±0.10 ^{b.c}	0.78±0.18 ^{b.c}	0.68±0.19 ^{c.d}
7	97.05±0.21 ^a	1.90±0.21 ^c	0.56±0.15 ^c	0.48±0.31 ^d

Çizelge 4.76. Dişi koyun taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	95.71±0.08 ^{c.d}	2.60±0.16 ^b	0.67±0.09 ^{b.c}	1.01±0.11 ^a
2	97.10±0.09 ^b	1.23±0.10 ^d	0.52±0.11 ^{c.d}	1.13±0.01 ^a
3	96.17±0.25 ^c	1.63±0.06 ^c	0.78±0.08 ^b	1.41±0.18 ^a
4	95.29±0.04 ^d	2.43±0.23438 ^b	1.07±0.19 ^a	1.19±0.06 ^a
5	94.03±0.33 ^e	3.35±0.16 ^a	1.12±0.07 ^a	1.48±0.09 ^a
6	98.11±0.10 ^a	1.54±0.09 ^c	0.07±0.02 ^e	0.27±0.02 ^b
7	95.71±0.93 ^{c.d}	2.54±0.20 ^b	0.44±0.08 ^d	1.30±0.86 ^a

Erkek koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin 1 ve 2)' de tespit edilmiş, canlılık oranları ($P<0.05$) grup 1 ve 2 (roskovitin-1 ve 2) hariç diğer uygulama gruplarında kontrolden düşük çıkmamıştır (Çizelge 4.75).

Dişi koyun taze fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranı ve en düşük canlı hücre oranı ($P<0.05$) grup 5 (geç konfluent)' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.76).

Çizelge 4.77. Dişi koyun donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	93.10±0.75 ^e	6.01±0.81 ^a	0.36±0.04 ^c	0.52±0.08 ^{b,c,d}
2	97.69±0.21 ^b	1.59±0.14 ^d	0.08±0.06 ^d	0.63±0.05 ^{b,c}
3	94.20±0.35 ^d	4.58±0.41 ^b	0.35±0.02 ^c	0.86±0.05 ^b
4	98.92±0.06 ^a	0.72±0.03 ^e	0.08±0.04 ^d	0.26±0.01 ^{c,d}
5	97.69±0.18 ^b	2.13±0.17 ^d	0.02±0.02 ^d	0.13±0.01 ^d
6	95.78±0.40 ^c	1.60±0.08 ^d	0.68±0.014 ^b	1.79±0.22 ^a
7	93.57±0.37 ^{d,e}	3.52±0.28 ^c	1.11±0.17 ^a	1.78±0.50 ^a

Çizelge 4.78. Dişi koyun taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	98.29±0.25 ^a	1.10±0.10 ^c	0.26±0.10 ^{b,c}	0.34±0.08 ^b
2	95.90±0.26 ^c	3.49±0.28 ^b	0.35±0.02 ^{b,c}	0.23±0.04 ^b
3	96.78±0.73 ^b	2.68±0.79 ^b	0.17±0.05 ^c	0.35±0.04 ^b
4	96.06±0.16 ^{b,c}	3.55±0.09 ^b	0.23±0.06 ^{b,c}	0.14±0.06 ^b
5	95.71±0.08 ^c	2.94±0.05 ^b	0.51±0.08 ^b	0.81±0.08 ^{a,b}
6	91.24±0.31 ^d	6.64±1.35 ^a	0.84±0.32 ^a	1.27±0.85 ^a
7	97.79±0.81 ^b	0.81±0.076 ^c	0.45±0.15 ^{b,c}	0.94±0.70 ^{a,b}

Koyun dişi donmuş fibroblastlarda grup 6 ve 7’de erken ve geç apoptotik hücre oranı ($P<0.05$) diğerlerinden yüksek bulunurken, hücre canlılığı üzerinde senkronizasyon uygulamalarının kontrol ile karşılaştırıldığında çok önemli bir olumsuz etkisi tespit edilmemiştir (Çizelge 4.77).

Dişi koyun taze kas hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı ve en düşük canlılık ($P<0.05$) grup 6 (72 saat serum açıklığı)' da tespit edilmiş, ancak tüm gruplarda canlılık oranında ($P<0.05$) az da olsa kontrole göre düşüş belirlenmiştir (Çizelge 4.78).

Dişi koyun donmuş kas hücrelerinde en yüksek erken apoptotik hücre oranı ve en düşük canlı hücre oranı ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2)' de tespit edilmiş, diğer gruplarda senkronizasyonun olumsuz etkisi görülmemiştir (Çizelge 4.79).

Çizelge 4.79. Dişi koyun donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	97.86±0.45 ^b	1.30±0.22 ^b	0.26±0.03 ^b	0.56±0.26 ^{b,c}
2	97.79±0.10 ^b	1.32±0.11 ^b	0.19±0.01 ^{b,c}	0.68±0.06 ^b
3	90.89±0.92 ^c	1.31±0.22 ^b	0.72±0.16 ^a	6.87±0.42 ^a
4	97.87±0.37 ^b	1.70±0.32 ^a	0.18±0.02 ^{b,c,d}	0.24±0.03 ^c
5	99.21±0.12 ^a	0.08±0.04 ^c	0.10±0.02 ^{c,d,e}	0.60±0.07 ^{b,c}
6	99.27±0.12 ^a	0.33±0.10 ^c	0.06±0.03 ^{d,e}	0.32±0.17 ^{b,c}
7	99.54±0.15 ^a	0.12±0.02 ^c	0.02±0.01 ^e	0.30±0.12 ^{b,c}

Dişi koyun taze kıkırdak hücrelerinde en yüksek erken apoptotik hücre oranı ve en düşük hücre canlılık oranı ($P<0.05$) grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin 1 ve 2)' de tespit edilmiş, bunu takiben grup 4. 5 (sırasıyla erken ve geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açıklığı)' de hücre canlılık oranları ($P<0.05$) az da olsa kontrolden düşük çıkmıştır (Çizelge 4.80).

Çizelge 4.80. Dişi koyun taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	97.16±0.17 ^b	2.05±0.28 ^b	0.17±0.02 ^c	0.60±0.09 ^e

2	91.63±0.45 ^f	2.13±0.17 ^b	1.28±0.23 ^a	4.94±0.34 ^a
3	92.80±0.55 ^e	1.57±0.29 ^{b.c}	1.45±0.16 ^a	4.16±0.23 ^b
4	94.11±0.56 ^d	1.74±0.60 ^b	1.47±0.15 ^a	2.34±0.65 ^d
5	94.16±0.20 ^d	1.98±0.15 ^b	0.58±0.03 ^b	3.26±0.12 ^c
6	98.10±0.08 ^a	1.08±0.08 ^c	0.22±0.06 ^c	0.59±0.04 ^e
7	96.01±0.32 ^c	2.97±0.33 ^a	0.64±0.02 ^b	0.38±0.13 ^e

Çizelge 4.81. Dişi koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	95.94±0.11 ^c	3.40±0.11 ^{b.c}	0.18±0.02 ^{b.c}	0.46±0.02 ^{c.d}
2	94.54±1.09 ^d	3.82±0.79 ^{a.b}	0.43±0.20 ^b	1.20±0.21 ^b
3	92.39±0.27 ^e	4.29±0.30 ^a	0.41±0.09 ^b	2.91±0.49 ^a
4	99.16±0.07 ^a	0.54±0.08 ^f	0.11±0.02 ^c	0.18±0.02 ^{c.d}
5	97.45±0.09 ^b	2.39±0.14 ^d	0.08±0.06 ^c	0.06±0.00 ^d
6	97.72±0.77 ^b	1.39±0.48 ^e	0.28±0.14 ^{b.c}	0.60±0.27 ^c
7	91.47±0.36 ^e	2.85±0.25 ^{c.d}	4.23±0.28 ^a	1.31±0.22 ^b

Dişi koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde grup 3 (roskovitin-2)' de en yüksek nekrotik ve erken apoptotik hücre oranı ($P<0.05$), grup 7 (120 saat serum açlığı)' de en yüksek ($P<0.05$) geç apoptotik hücre oranı ve kontrole göre daha yüksek erken apoptotik hücre oranı tespit edilmiş ve her iki grupta da hücre canlılık oranı en düşük çıkmıştır (Çizelge 4.81).

Çizelge 4.82. Dişi koyun taze granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
------	-------------------	----------------------	---------------------------	------------------------------

1	92.86±0.82 ^{b,c}	4.51±0.82 ^{b,c}	1.92±0.09 ^a	0.69±0.10 ^c
2	93.67±0.32 ^{a,b}	3.41±0.30 ^c	0.78±0.17 ^c	2.14±0.31 ^b
3	90.72±0.53 ^d	4.96±0.63 ^b	0.74±0.06 ^c	3.57±0.66 ^a
4	94.45±0.96 ^a	4.41±0.65 ^{b,c}	0.70±0.17 ^c	0.43±0.15 ^c
5	92.01±0.27 ^{c,d}	6.51±0.22 ^a	0.74±0.08 ^c	0.73±0.28 ^c
6	93.06±1.35 ^{a,b,c}	5.66±1.23 ^{a,b}	0.80±0.70 ^c	0.48±0.05 ^c
7	92.58±0.35 ^{b,c}	5.51±0.31 ^{a,b}	1.40±0.06 ^b	0.50±0.05 ^c

Koyun taze granüloza hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı (P<0.05) grup 5 (geç konfluent)' de, en yüksek erken apoptotik hücre oranı (P<0.05) grup 3 (roskovitin-2)' de tespit edilirken, en düşük canlılık oranı yine grup 3'de belirlenmiştir (Çizelge 4.82).

Çizelge 4.83. Dişi koyun donmuş granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.86±0.93 ^a	1.86±0.19 ^d	0.50±0.25 ^d	0.76±0.49 ^{c,d}
2	92.46±0.90 ^b	3.61±0.81 ^c	0.85±0.06 ^{b,c}	3.07±0.11 ^b
3	91.34±1.11 ^b	4.97±1.32 ^b	0.91±0.10 ^b	2.76±0.26 ^b
4	96.10±0.44 ^a	2.58±0.19 ^{c,d}	0.25±0.05 ^e	1.06±0.21 ^c
5	91.84±0.09 ^b	7.86±0.05 ^a	0.14±0.04 ^e	0.15±0.08 ^d
6	91.42±0.40 ^b	2.44±0.61 ^{c,d}	1.29±0.23 ^a	4.84±0.75 ^a
7	95.59±0.30 ^a	3.17±0.33 ^c	0.63±0.03 ^{c,d}	0.59±0.12 ^{c,d}

Dişi koyun donmuş granüloza hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı (P<0.05) grup 5 (geç konfluent)' de tespit edilirken diğer tüm gruplarda da oran (P<0.05) kontrole göre yüksek çıkmıştır. Grup 2, 3 (roskovitin-1 ve 2) ve grup 6 (72 saat serum açlığı)' da erken

apoptotik hücre oranı kontrolden yüksek bulunmuş ve en düşük canlı hücre oranı ($P<0.05$) ise grup 2,3,5 ve 6' da tespit edilmiştir (Çizelge 4.83).

Çizelge 4.84. Erkek keçi taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.32±0.75 ^a	2.89±0.67 ^c	0.37±0.04 ^c	0.41±0.04 ^{b.c}
2	91.30±0.53 ^{c.d}	6.92±0.66 ^a	1.16±0.12 ^a	0.62±0.08 ^{b.c}
3	92.09±0.18 ^{b..c}	6.46±0.43 ^a	0.67±0.08 ^b	0.76±0.21 ^b
4	96.23±0.78 ^a	3.24±0.78 ^{b.c}	0.25±0.07 ^{c.d}	0.27±0.08 ^c
5	95.41±0.19 ^a	4.13±0.17 ^b	0.21±0.06 ^d	0.24±0.04 ^c
6	90.87±0.52 ^d	6.79±0.59 ^a	0.33±0.06 ^{c.d}	1.80±0.51 ^a
7	92.74±0.44 ^b	5.91±0.41 ^a	0.70±0.07 ^b	0.63±0.07 ^{b.c}

Çizelge 4.85. Erkek keçi donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.26±0.23 ^b	2.86±0.21 ^{c.d}	0.34±0.01 ^{a.b}	0.54±0.03 ^c
2	93.97±0.26 ^c	5.02±0.38 ^b	0.46±0.07 ^{a.b}	0.54±0.13 ^c
3	92.97±0.23 ^{d.e}	4.70±0.43 ^b	0.72±0.72 ^a	1.60±0.09 ^a
4	97.26±0.05 ^a	2.40±0.05 ^e	0.12±0.03 ^b	0.20±0.02 ^d
5	93.30±0.23 ^d	6.36±0.27 ^a	0.10±0.03 ^b	0.22±0.02 ^d
6	96.05±0.31 ^b	3.06±0.20 ^c	0.26±0.07 ^{a.b}	0.61±0.03 ^{b.c}
7	92.84±0.15 ^e	5.96±0.38 ^a	0.73±0.05 ^a	0.69±0.06 ^b

Erkek keçi taze fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 2, 3 (sırasıyla roskovitine-1 ve 2) grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' de tespit edilirken. grup 5 (geç konfüent)' de nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) kontrolden yüksek bulunmuştur. En düşük canlı hücre oranı ($P<0.05$) grup 2,3,6 ve 7'de tespit edilmiştir (Çizelge 4.84).

Erkek keçi donmuş fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2, 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2), grup 5 (geç konfüent) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' de tespit edilmiş, yine en düşük canlılık oranları da ($P<0.05$) grup 2,3,5 ve 7' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.85).

Erkek keçi taze kas hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 4 ve 5 (sırayla erken ve geç konfüent) tespit edilirken, en düşük canlı hücre oranları ($P<0.05$) grup 4.5 ve grup 2 (roskovitin-1)' de bulunmuştur (Çizelge 4.86).

Çizelge 4.86. Erkek keçi taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	93.89±0.16 ^b	4.73±0.15 ^{b.c}	0.41±0.06 ^c	0.95±0.09 ^c
2	91.81±0.69 ^d	4.96±0.68 ^b	1.23±0.14 ^a	1.97±0.09 ^a
3	94.05±0.27 ^b	4.20±0.31 ^{b.c}	0.39±0.05 ^c	1.35±0.02 ^b
4	92.94±0.90 ^c	6.34±1.02 ^a	0.36±0.21 ^c	0.34±0.03 ^e
5	92.60±0.46 ^{c.d}	6.20±0.53 ^a	0.43±0.06 ^c	0.76±0.06 ^d
6	95.97±0.09 ^a	2.88±0.15 ^d	0.71±0.04 ^b	0.44±0.02 ^e
7	94.50±0.17 ^b	3.83±0.24 ^c	0.79±0.17 ^b	0.86±0.07 ^{c.d}

Erkek keçi donmuş kas hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 5 (geç konfüent)' de tespit edilirken, en yüksek erken nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) ise grup 2 (roskovitin-1)' de bulunmuştur. Ancak diğer tüm senkronizasyon gruplarında da nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) kontrolden yüksek çıkmıştır. En düşük canlı hücre oranları ($P<0.05$) ise grup 2,3 ve 5 (sırayla roskovitin-1, roskovitin-2 ve geç konfüent)' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.87).

Çizelge 4.87. Erkek keçi donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.51±0.21 ^a	1.69±0.10 ^d	0.76±0.19 ^b	1.02±0.15 ^c
2	91.48±0.42 ^e	4.98±0.51 ^b	0.81±0.08 ^b	2.72±0.28 ^a
3	93.56±0.07 ^{c,d}	3.68±0.17 ^c	1.26±0.22 ^a	1.48±0.07 ^b
4	95.39±0.50 ^b	3.61±0.37 ^c	0.30±0.08 ^c	0.68±0.06 ^d
5	92.98±0.25 ^d	6.06±0.24 ^a	0.35±0.04 ^c	0.60±0.01 ^{d,e}
6	95.05±0.39 ^b	3.86±0.27 ^c	0.69±0.05 ^b	0.39±0.10 ^e
7	94.07±0.24 ^c	4.03±0.11 ^c	1.13±0.07 ^a	0.76±0.12 ^d

Çizelge 4.88. Erkek keçi taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	93.32±0.55 ^b	5.14±0.49 ^b	0.64±0.07 ^{a,b}	0.56±0.09 ^c
2	92.27±0.52 ^c	6.77±0.50 ^a	0.59±0.15 ^b	0.35±0.11 ^c
3	93.56±0.29 ^b	4.38±0.10 ^c	0.82±0.05 ^a	1.23±0.25 ^b
4	94.84±0.22 ^a	4.53±0.26 ^{b,c}	0.35±0.09 ^c	0.26±0.06 ^c
5	94.23±0.14 ^a	4.60±0.31 ^{b,c}	0.77±0.07 ^{a,b}	0.39±0.12 ^c
6	94.47±0.29 ^a	3.03±0.47 ^d	0.78±0.11 ^{a,b}	1.71±0.23 ^a
7	94.39±0.04 ^a	4.67±0.21 ^{b,c}	0.67±0.14 ^{a,b}	0.26±0.11 ^c

Çizelge 4.89. Erkek keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI	NEKROTİK	GEÇ APOPTOTİK	ERKEN APOPTOTİK
------	-------	----------	---------------	-----------------

	HÜCRELER(%)	HÜCRELER(%)	HÜCRELER(%)	HÜCRELER (%)
1	97.39±0.13 ^a	1.77±0.01 ^e	0.34±0.04 ^{c,d}	0.49±0.09 ^e
2	93.78±0.25 ^d	5.23±0.09 ^a	0.23±0.04 ^d	0.74±0.14 ^d
3	92.52±0.43 ^e	3.89±0.34 ^b	0.87±0.12 ^a	2.70±0.04 ^a
4	96.68±0.08 ^b	2.63±0.11 ^d	0.22±0.06 ^d	0.46±0.04 ^e
5	94.51±0.33 ^c	3.44±0.18 ^c	0.93±0.07 ^a	1.11±0.16 ^c
6	94.20±0.49 ^{c,d}	3.83±0.33 ^{b,c}	0.59±0.06 ^b	1.36±0.16 ^b
7	96.54±0.31 ^b	2.50±0.26 ^d	0.39±0.03 ^c	0.55±0.09 ^{d,e}

Erkek keçi taze kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı (P<0.05) grup 2 (roskovitin-1) ve en yüksek erken apoptotik hücre oranı (P<0.05) grup 6 (72 saat serum açlığı)' da tespit edilirken, en düşük canlılık oranları (P<0.05) grup 2 ve 3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2)' de bulunmuştur (Çizelge 4.88).

Çizelge 4.90. Dişi keçi taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.32±0.24 ^a	1.60±0.26 ^d	0.97±0.20 ^a	1.09±0.09 ^a
2	93.74±0.43 ^b	5.63±0.42 ^{a,b}	0.40±0.04 ^c	0.21±0.04 ^e
3	92.26±0.34 ^c	6.34±0.30 ^a	0.67±0.06 ^b	0.72±0.05 ^b
4	96.48±0.12 ^a	2.91±0.12 ^c	0.37±0.04 ^c	0.23±0.04 ^e
5	93.43±1.78 ^{b,c}	5.92±1.55 ^a	0.36±0.15 ^c	0.27±0.12 ^{d,e}
6	94.33±0.55 ^b	4.63±0.49 ^b	0.59±0.09 ^b	0.44±0.07 ^c
7	96.90±0.08 ^a	2.33±0.05 ^{c,d}	0.34±0.05 ^c	0.41±0.11 ^{c,d}

Erkek keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı (P<0.05) grup 2 (roskovitin-1)' de tespit edilirken, diğer tüm senkronizasyon gruplarında da nekrotik

hücre oranları ($P<0.05$) kontrolden yüksek çıkmıştır. En yüksek erken apoptotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2)' de bulunmuş, en düşük hücre canlılık oranları da grup 2 ve 3'de tespit edilmiştir. Ancak diğer tüm senkronizasyon gruplarında da hücre canlılık oranları ($P<0.05$) kontrolden düşük çıkmıştır (Çizelge 4.89).

Dişi keçi taze fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2. 3 (sırasıyla roskovitin 1 ve 2), grup 5 (geç konfluent) ve grup 6 (72 saat serum açlığı)' da tespit edilmiş, yine en düşük canlı hücre oranları ($P<0.05$) da grup 2,3,5 ve 6' da bulunmuştur (Çizelge 4.90).

Çizelge 4.91. Dişi keçi donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	93.65±1.74 ^c	4.15±1.59 ^{a,b}	0.99±0.34 ^b	1.20±0.43 ^a
2	96.37±0.56 ^a	2.17±0.34 ^c	0.46±0.05 ^c	0.99±0.19 ^{a,b}
3	92.09±0.86 ^d	4.52±0.57 ^{a,b}	2.52±0.31 ^a	0.87±0.10 ^{a,b}
4	93.48±0.23 ^c	5.21±0.51 ^a	0.53±0.04 ^c	0.77±0.31 ^{b,c}
5	95.37±0.24 ^{a,b}	4.09±0.27 ^{a,b}	0.27±0.03 ^c	0.26±0.01 ^d
6	95.33±0.40 ^{a,b}	3.84±0.20 ^b	0.42±0.06 ^c	0.39±0.13 ^{c,d}
7	94.24±0.10 ^{b,c}	3.28±0.21 ^{b,c}	1.24±0.13 ^b	1.23±0.06 ^a

Dişi keçi donmuş fibroblastlarda en yüksek geç apoptotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2)' de tespit edilirken, yine en düşük canlı hücre oranı ($P<0.05$) da aynı grupta belirlenmiştir. Diğer gruplarda senkronizasyon uygulamasının olumsuz etkisi görülmemiştir (Çizelge 4.91).

Dişi keçi taze kas hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2), grup 5 (geç konfluent) ve grup 7(120 saat serum açlığı)' de, en yüksek geç apoptotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2 (roskovitin-1) ve grup 6 (72 saat serum açlığı)' da, en yüksek erken apoptotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2 ve 6' da tespit edilmiştir. En düşük canlı hücre oranı ($P<0.05$) grup 7' de tespit edilirken grup 3,5,6 ve 7' de belirlenmiştir (Çizelge 4.92).

Çizelge 4.92. Dişi keçi taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	95.14±0.86 ^a	3.30±0.93 ^c	0.62±0.22 ^{b,c}	0.93±0.24 ^c
2	94.84±0.13 ^a	1.84±0.01 ^d	1.35±0.03 ^a	1.97±0.09 ^a
3	93.85±0.12 ^b	4.61±0.14 ^b	0.47±0.20 ^{c,d}	1.05±0.09 ^c
4	95.35±0.19 ^a	3.58±0.28 ^c	0.50±0.07 ^{c,d}	0.57±0.06 ^d
5	93.04±0.80 ^{b,c}	6.03±0.86 ^a	0.35±0.05 ^d	0.56±0.01 ^d
6	92.86±0.64 ^c	3.97±0.19 ^{b,c}	1.31±0.06 ^a	1.67±0.12 ^b
7	91.80±0.31 ^d	6.25±0.36 ^a	0.81±0.08 ^b	1.12±0.13 ^c

Çizelge 4.93. Dişi keçi donmuş kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	95.58±0.50 ^a	2.96±0.35 ^c	0.61±0.06 ^c	0.83±0.15 ^{d,e}
2	94.86±0.41 ^{a,b}	3.48±0.69 ^{b,c}	0.64±0.17 ^c	0.67±0.14 ^c
3	93.41±0.42 ^{c,d}	4.51±0.56 ^a	1.11±0.11 ^b	0.97±0.06 ^{c,d}
4	95.06±0.78 ^a	3.45±0.74 ^{b,c}	0.61±0.07 ^c	0.87±0.05 ^{d,e}
5	94.06±0.45 ^{b,c}	4.05±0.22 ^{a,b}	0.69±0.05 ^c	1.19±0.28 ^{b,c}
6	93.87±0.27 ^c	3.05±0.08 ^c	1.27±0.08 ^{a,b}	1.80±0.13 ^a
7	92.94±0.13 ^d	4.27±0.07 ^{a,b}	1.41±0.12 ^a	1.36±0.05 ^b

Dişi keçi donmuş kas hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2), grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' de, en yüksek geç apoptotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 3, grup 6 (72 saat serum açlığı) ve grup 7' de tespit edilmiştir. En yüksek erken apoptotik hücre oranları ($P<0.05$) ise grup 5.6 ve 7' de

bulunmuştur. En düşük hücre canlılık oranları ($P<0.05$) grup 3,5,6 ve 7' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.93).

Çizelge 4.94. Dişi keçi taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	97.26±0.19 ^a	2.48±0.14 ^c	0.12±0.03 ^d	0.12±0.02 ^d
2	93.39±0.96 ^b	5.41±1.10 ^a	0.51±0.07 ^{b,c}	0.69±0.22 ^{b,c}
3	93.48±0.03 ^b	5.04±0.08 ^a	0.66±0.07 ^a	0.81±0.07 ^b
4	93.63±0.38 ^b	5.51±0.41 ^a	0.59±0.10 ^{a,b}	0.25±0.12 ^d
5	94.29±0.98 ^b	5.35±0.77 ^a	0.15±0.08 ^d	0.20±0.12 ^d
6	94.21±0.17 ^b	3.74±0.02 ^b	0.40±0.02 ^c	1.64±0.17 ^a
7	94.09±0.15 ^b	5.14±0.16 ^a	0.22±0.01 ^d	0.53±0.04 ^c

Dişi keçi taze kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2,3,4,5 ve 7'de tespit edilirken tüm senkronizasyon gruplarında hücre canlılık oranları ($P<0.05$) kontrolden düşük bulunmuştur (Çizelge 4.94).

Keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı ve en düşük canlı hücre oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' de tespit edilmiş. diğer gruplar da senkronizasyon uygulaması olumsuz etki oluşturmamıştır (Çizelge 4.95).

Keçi taze granüloza hücrelerinde grup 2,3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2), grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' de nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2, grup 4 (erken konfluent) ve grup 5'de geç apoptotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2,3,5,6 ve 7' de erken apoptotik hücre oranları ($P<0.05$) kontrolden yüksek bulunmuştur. Tüm gruplarda hücre canlılık oranları kontrolden düşük olarak tespit edilmiş, grup 2,3 ve 5'in diğerlerinden daha düşük canlılık oranına ($P<0.05$) sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.96).

Çizelge 4.95. Dişi keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	94.92±0.76 ^b	3.57±0.28 ^{b.c}	0.49±0.15 ^a	0.67±0.06 ^a
2	95.61±0.13 ^{a.b}	3.77±0.01 ^{b.c}	0.32±0.13 ^{a.b}	0.30±0.06 ^b
3	95.28±0.47 ^{a.b}	4.17±0.57 ^b	0.11±0.03 ^c	0.20±0.04 ^c
4	95.86±0.18 ^a	3.73±0.22 ^{b.c}	0.26±0.04 ^{b.c}	0.14±0.06 ^{c.d}
5	95.67±0.19 ^a	3.70±0.59 ^{b.c}	0.19±0.04 ^{b.c}	0.09±0.05 ^d
6	95.94±0.25 ^a	3.46±0.13 ^c	0.46±0.10 ^a	0.14±0.06 ^{c.d}
7	94.08±0.14 ^c	5.08±0.14 ^a	0.44±0.06 ^a	0.39±0.02 ^b

Çizelge 4.96. Dişi keçi taze granuloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.29±0.09 ^a	2.11±0.01 ^d	0.35±0.06 ^e	1.24±0.14 ^d
2	92.62±0.44 ^e	3.13±0.02 ^a	1.21±0.02 ^{a.b}	2.35±0.04 ^a
3	93.52±0.06 ^d	2.86±0.16 ^b	0.94±0.02 ^c	2.12±0.01 ^a
4	95.33±0.02 ^b	2.11±0.01 ^d	1.09±0.11 ^{b.c}	1.46±0.09 ^{c.d}
5	94.21±0.09 ^c	2.37±0.04 ^c	1.33±0.10 ^a	1.68±0.29 ^{b.c}
6	95.23±0.05 ^b	2.11±0.06 ^d	0.75±.18 ^d	1.81±0.07 ^b
7	95.11±0.01 ^b	2.36±0.17 ^c	0.93±0.05 ^c	1.58±0.23 ^{b.c}

Çizelge 4.97. Dişi keçi donmuş granuloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
------	-------------------	----------------------	---------------------------	------------------------------

1	95.69±0.62 ^a	2.24±0.34 ^c	0.83±0.12 ^{b,c,d}	1.01±0.57 ^b
2	93.35±0.13 ^d	3.60±0.28 ^a	1.31±0.12 ^a	1.35±0.09 ^{a,b}
3	94.38±0.16 ^c	2.86±0.11 ^b	0.99±0.04 ^b	1.68±0.29 ^a
4	95.21±0.08 ^b	2.36±0.21 ^c	0.66±0.15 ^{c,d}	1.46±0.31 ^{a,b}
5	94.19±0.05 ^c	2.85±0.01 ^b	0.89±0.05 ^{b,c,d}	1.35±0.01 ^{a,b}
6	95.19±0.03 ^b	2.34±0.42 ^c	0.63±0.06 ^d	1.68±0.37 ^a
7	94.13±0.20 ^c	2.94±0.04 ^b	0.93±0.32 ^{b,c}	1.50±0.20 ^{a,b}

Çizelge 4.98. Erkek manda taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	96.44±0.22 ^a	1.75±0.62 ^d	0.68±0.10 ^{a,b}	1.11±0.63 ^{a,b}
2	94.43±0.32 ^c	2.91±0.54 ^c	1.19±0.68 ^a	1.46±0.18 ^a
3	92.74±0.77 ^d	5.65±1.12 ^a	1.00±0.60 ^{a,b}	0.59±0.16 ^{b,c}
4	95.11±0.25 ^{b,c}	4.38±0.20 ^b	0.39±0.08 ^b	0.11±0.04 ^c
5	95.82±0.02 ^{a,b}	3.09±0.09 ^c	0.50±0.07 ^{a,b}	0.58±0.10 ^{b,c}
6	96.18±0.20 ^a	2.35±0.18 ^{c,d}	0.84±0.05 ^{a,b}	0.62±0.27 ^{b,c}
7	96.04±0.55 ^a	2.52±0.34 ^{c,d}	0.76±0.15 ^{a,b}	0.72±0.58 ^{b,c}

Keçi donmuş granüloza hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 2 (roskovitin-1)' de tespit edilirken tüm senkronizasyon gruplarında canlılık oranı ($P<0.05$) kontrolden düşük bulunmuştur. Senkronizasyon grupları arasında grup 4 (erken konfluent) ve grup 6 (72 saat serum açlığı)'nın diğerlerine oranla daha yüksek canlılık oranına ($P<0.05$) sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.97).

Erkek manda taze fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2)' de tespit edilmiş, grup 2 (roskovitin-1), grup 4 ve 5 (sırasıyla erken ve geç

konfluent)' de nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) kontrolden yüksek çıkmıştır. En düşük canlılık oranları ($P<0.05$) ise grup 2 ve 3' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.98).

Çizelge 4.99. Erkek manda donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	97.29±0.21 ^a	2.58±0.18 ^d	0.78±0.10 ^a	0.66±0.25 ^a
2	93.52±0.17 ^d	5.94±0.31 ^a	0.84±0.54 ^a	0.47±0.32 ^a
3	92.61±0.31 ^e	5.85±0.46 ^a	0.91±0.02 ^a	0.62±0.12 ^a
4	95.77±0.13 ^c	3.37±0.09 ^c	0.60±0.07 ^{a,b}	0.25±0.08 ^a
5	96.64±0.08 ^b	2.92±0.10 ^{c,d}	0.18±0.03 ^b	0.25±0.04 ^a
6	96.39±0.20 ^b	2.72±0.10 ^{c,d}	0.58±0.07 ^{a,b}	0.29±0.03 ^a
7	93.94±0.56 ^d	4.69±0.78 ^b	0.80±0.41 ^a	0.56±0.38 ^a

Erkek manda donmuş fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2,3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' de bulunmuş, yine en düşük canlılık oranları ($P<0.05$) da bu gruplarda tespit edilmiştir (Çizelge 4.99).

Erkek manda taze kas hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2,3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2) ve grup 5 (geç konfluent)' de tespit edilirken en düşük canlılık oranı ($P<0.05$) grup 3 ve 5' de belirlenmiştir. Diğer grupların da canlılık oranları ($P<0.05$) kontrolden düşük bulunmuştur (Çizelge 4.100).

Çizelge 4.100. Erkek manda taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
------	-------------------	----------------------	---------------------------	------------------------------

1	97.33±0.22 ^a	2.36±0.21 ^{a,b}	0.84±0.05 ^c	0.54±0.41 ^{a,b,c}
2	96.06±0.21 ^c	2.26±0.17 ^{b,c}	1.07±0.02 ^a	0.44±0.20 ^{b,c}
3	95.50±0.32 ^d	2.56±0.08 ^a	1.10±0.06 ^a	0.83±0.42 ^{a,b}
4	96.60±0.22 ^b	2.09±0.07 ^c	0.94±0.04 ^b	0.36±0.19 ^{b,c}
5	95.42±0.25 ^d	2.56±0.08 ^a	1.14±0.02 ^a	0.94±0.05 ^a
6	96.72±0.15 ^b	2.15±0.02 ^{b,c}	0.84±0.05 ^c	0.28±0.15 ^c
7	96.31±0.12 ^{b,c}	2.24±0.17 ^{b,c}	0.92±0.06 ^{b,c}	0.53±0.08 ^{a,b,c}

Erkek manda donmuş kas hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı (P<0.05) grup 5 (geç konfluent)' de en yüksek geç apoptotik hücre oranları (P<0.05) grup 3 (roskovitin-2), grup 5 ve 7 (120 saat serum açlığı)' de tespit edilmiştir. En yüksek erken apoptotik hücre oranı (P<0.05) grup 2 ve 3' de ve en düşük hücre canlılık oranı (P<0.05) grup 3' de bulunmuştur (Çizelge 4.101).

Çizelge 4.101. Erkek manda taze kas hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	97.22±0.30 ^a	2.44±0.32 ^{b,c}	0.43±0.24 ^d	0.33±0.24 ^b
2	95.49±0.23 ^d	2.15±0.03 ^{b,c}	0.96±0.01 ^{b,c}	1.39±0.22 ^a
3	94.65±0.18 ^e	2.55±0.39 ^b	1.17±0.01 ^a	1.62±0.21 ^a
4	96.47±0.27 ^b	2.54±0.35 ^b	0.83±0.01 ^c	0.41±0.01 ^b
5	95.53±0.22 ^d	3.10±0.04 ^a	1.04±0.04 ^{a,b}	0.32±0.19 ^b
6	96.90±0.04 ^a	1.92±0.05 ^c	0.93±0.03 ^{b,c}	0.24±0.02 ^b
7	95.95±0.04 ^c	2.65±0.43 ^{a,b}	1.09±0.10 ^{a,b}	0.36±0.33 ^b

Erkek manda taze kıkırdak hücrelerinde en yüksek geç apoptotik hücre oranı (P<0.05) grup 2,3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2), grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' de tespit edilmiş ve en düşük canlı hücre oranı (P<0.05) grup 3' de görülmüştür (Çizelge 4.102).

Çizelge 4.102. Erkek manda taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	98.36±0.20 ^a	1.38±0.21 ^a	0.40±0.14 ^b	0.15±0.05 ^c
2	95.56±0.06 ^e	2.97±0.02 ^a	1.15±0.010 ^a	0.31±0.03 ^c
3	94.64±0.11 ^f	3.24±0.16 ^a	1.15±0.03 ^a	0.96±0.23 ^a
4	97.10±0.20 ^b	2.32±0.14 ^a	0.43±0.10 ^b	0.14±0.01 ^c
5	96.12±0.29 ^d	3.47±0.18 ^a	0.28±0.07 ^b	0.1100±0.05 ^c
6	97.14±0.01 ^b	1.89±0.29 ^a	1.02±0.11 ^a	0.27±0.19 ^c
7	96.58±0.14 ^c	2.86±0.02 ^a	1.16±0.00 ^a	0.61±0.12 ^b

Çizelge 4.103. Erkek manda donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	98.99±0.20 ^a	0.61±0.11 ^e	0.02±0.075 ^c	0.10±0.07 ^b
2	97.49±0.07 ^b	1.57±0.06 ^{c.d}	0.62±0.07 ^b	0.31±0.04 ^{a.b}
3	95.86±0.76 ^d	3.41±0.25 ^b	1.15±0.00 ^a	0.43±0.50 ^{a.b}
4	98.36±0.11 ^a	1.09±0.06 ^{d.e}	0.26±0.05 ^c	0.28±0.06 ^{a.b}
5	94.48±0.69 ^e	5.18±0.66 ^a	0.22±0.03 ^c	0.11±0.01 ^b
6	97.00±0.20 ^{b.c}	1.97±0.23 ^c	0.55±0.02 ^b	0.47±0.07 ^{a.b}
7	96.41±0.14 ^{c.d}	3.01±0.48 ^b	1.16±0.02 ^a	0.65±0.48 ^a

Erkek manda donmuş kıkırdak hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları (P<0.05) grup 3 (roskovitin-2), grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' de,

en yüksek geç apoptotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 3 ve 7’de tespit edilmiştir. En düşük hücre canlılık oranı ($P<0.05$) grup 5’ de görülmüştür (Çizelge 4.103).

Çizelge 4.104. Dişi manda taze fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	98.45±0.07 ^b	1.13±0.04 ^c	0.25±0.01 ^c	0.16±0.07 ^c
2	98.48±0.13 ^b	1.20±0.07 ^c	0.20±0.05 ^c	0.11±0.02 ^{c,d}
3	99.01±0.04 ^a	0.71±0.03 ^{d,e}	0.21±0.05 ^c	0.07±0.04 ^{c,d}
4	96.45±0.27 ^d	2.86±0.25 ^a	0.40±0.06 ^b	0.27±0.01 ^b
5	97.56±0.34 ^c	2.04±0.15 ^b	0.21±0.03 ^c	0.05±0.02 ^d
6	98.74±0.03 ^{a,b}	0.91±0.02 ^{c,d}	0.26±0.03 ^c	0.08±0.02 ^{c,d}
7	98.36±0.35 ^b	0.52±0.30 ^e	0.60±0.12 ^a	0.51±0.10 ^a

Dişi manda taze fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 4 ve 5 (sırasıyla erken ve geç konfluent)’ de bulunmuş, ayrıca bu iki grupta canlı hücre oranı ($P<0.05$) diğer gruplardan düşük çıkmıştır (Çizelge 4.104).

Dişi manda donmuş fibroblastlarda en yüksek nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 2,3 (roskovitin-1 ve2) ve grup 5 (geç konfluent)’ de tespit edilmiş. bu gruplarda canlı hücre oranı ($P<0.05$) kontrolden düşük bulunmuştur (Çizelge 4.105).

Dişi manda taze kıkırdak hücrelerinde nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2), grup 5 (geç konfluent) ve grup 6 (72 saat serum açlığı)’ da kontrolden yüksek bulunmuş, en düşük hücre canlılık oranı ($P<0.05$) grup 5’de tespit edilmiştir (Çizelge 4.106).

Dişi manda donmuş fibroblastlarda nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 2,3 (sırasıyla roskovitin-1 ve 2), grup 5 (geç konfluent), grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)’ de kontrolden yüksek bulunmuş, grup 4 (geç konfluent) hariç diğer gruplarda hücre canlılık oranları ($P<0.05$) kontrolden düşük bulunmuştur (Çizelge 4.107).

Çizelge 4.105. Dişi manda donmuş fibroblastlarda hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	97.09±0.08 ^a	1.70±0.26 ^c	0.65±0.08 ^b	0.55±0.11 ^a
2	94.10±0.58 ^c	5.43±0.61 ^a	0.40±0.06 ^c	0.06±0.02 ^d
3	95.11±0.31 ^b	3.04±0.44 ^b	1.19±0.14 ^a	0.65±0.09 ^a
4	97.41±0.20 ^a	1.91±0.19 ^c	0.48±0.04 ^{b,c}	0.19±0.06 ^c
5	95.58±0.20 ^b	3.32±0.21 ^b	1.01±0.04 ^a	0.08±0.00 ^{c,d}
6	96.94±0.34 ^a	1.66±0.17 ^c	0.97±0.22 ^a	0.41±0.04 ^b
7	96.95±0.34 ^a	2.32±0.49 ^c	0.61±0.17 ^{b,c}	0.12±0.07 ^{c,d}

Çizelge 4.106. Dişi manda taze kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	97.17±0.17 ^{b,c}	2.61±0.21 ^{d,e}	0.17±0.04 ^c	0.04±0.01 ^c
2	96.98±0.09 ^c	2.80±0.09 ^d	0.14±0.01 ^{c,d}	0.06±0.01 ^c
3	96.36±0.21 ^d	3.47±0.18 ^b	0.11±0.02 ^d	0.04±0.02 ^c
4	97.42±0.09 ^b	2.36±0.06 ^e	0.16±0.03 ^{c,d}	0.05±0.02 ^c
5	95.62±0.22 ^e	3.91±0.18 ^a	0.15±0.00 ^{c,d}	0.31±0.05 ^a
6	96.46±0.13 ^d	3.19±0.13 ^c	0.25±0.02 ^b	0.08±0.02 ^c
7	98.45±0.12 ^a	0.92±0.06 ^f	0.40±0.01 ^a	0.21±0.07 ^b

Çizelge 4.107. Dişi manda donmuş kıkırdak hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	98.32±0.20 ^a	0.80±0.19 ^c	0.45±0.05 ^{a,b}	0.43±0.08 ^{a,b}
2	96.89±0.47184 ^{b,c}	2.41±0.09 ^b	0.35±0.03 ^{b,c}	0.34±0.41 ^{a,b,c}
3	96.28±0.62003 ^c	2.71±0.56 ^b	0.51±0.07 ^a	0.49±0.01 ^a
4	98.80±0.29 ^a	0.79±0.14 ^c	0.26±0.11 ^{c,d}	0.14±0.05 ^{b,c}
5	96.36±0.10 ^c	3.46±0.13 ^a	0.09±0.02 ^e	0.07±0.026 ^c
6	96.45±0.17 ^c	3.25±0.19 ^a	0.23±0.05 ^d	0.08±0.04 ^c
7	97.15±0.09 ^b	2.55±0.26 ^b	0.16±0.01 ^{d,e}	0.21±0.16 ^{a,b,c}

Çizelge 4.108. Dişi manda taze granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	98.23±0.08 ^a	1.49±0.52 ^c	0.31±0.06 ^b	0.41±0.22 ^b
2	97.18±0.02 ^b	2.30±0.12 ^b	0.37±0.15 ^{a,b}	0.13±0.04 ^b
3	96.27±0.17 ^d	3.25±0.14 ^a	0.39±0.18 ^{a,b}	0.12±0.07 ^b
4	96.57±0.58 ^{c,d}	2.69±0.35 ^b	0.44±0.17 ^{a,b}	0.40±0.25 ^b
5	94.54±0.37 ^e	3.40±0.18 ^a	0.61±0.17 ^a	1.44±0.04 ^a
6	97.31±0.21 ^b	2.41±0.23 ^b	0.58±0.14 ^{a,b}	0.32±0.26 ^b
7	97.02±0.09 ^{b,c}	2.41±0.20 ^b	0.36±0.01 ^{a,b}	0.22±0.26 ^b

Manda taze granüloza hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2) ve grup 5 (geç konfluent)' de bulunurken, diğer grupların da nekrotik hücre oranları kontrolden yüksek çıkmıştır. En düşük hücre canlılık oranı grup 5 (geç konfluent)' de tespit edilirken, grup 3 (roskovitin-2) ve grup 4 (erken konfluent)' de canlılık oranları ($P<0.05$) diğer gruplardan düşük bulunmuştur (Çizelge 4.108).

Manda donmuş granüloza hücrelerinde en yüksek nekrotik hücre oranları ($P<0.05$) grup 3 (roskovitin-2), grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açlığı)' de tespit edilmiş, en yüksek geç apoptotik hücre oranı ($P<0.05$) grup 7 (120 saat serum açlığı)' de bulunmuştur. En düşük hücre canlılık oranları ($P<0.05$) grup 3,5 ve 7' de tespit edilmiştir (Çizelge 4.109).

Çizelge 4.109. Dişi manda donmuş granüloza hücrelerinde hücre canlılık analiz sonuçları

GRUP	CANLI HÜCRELER(%)	NEKROTİK HÜCRELER(%)	GEÇ APOPTOTİK HÜCRELER(%)	ERKEN APOPTOTİK HÜCRELER (%)
1	97.52±0.40 ^a	2.42±0.30 ^b	0.46±0.07 ^b	0.43±0.37 ^a
2	96.46±0.37 ^b	2.80±0.19 ^{a,b}	0.66±0.09 ^{a,b}	0.29±0.09 ^a
3	95.53±0.24 ^c	3.14±0.02 ^a	0.90±0.04 ^a	0.42±0.25 ^a
4	96.66±0.22 ^b	2.49±0.16 ^b	0.66±0.15 ^b	0.31±0.11 ^a
5	95.89±0.73 ^{b,c}	3.19±0.19 ^a	0.91±0.03 ^a	0.42±0.23 ^a
6	96.59±0.23 ^b	2.53±0.34 ^b	1.01±0.15 ^b	0.21±0.14 ^a
7	95.59±0.40 ^c	3.10±0.36 ^a	1.24±0.14 ^a	0.43±0.35 ^a

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nükleer transferi takiben oluşan embriyonun gerek in vitro gerekse in vivo gelişimi üzerine etki eden birçok faktör vardır. Bunların içerisinde en önemlisi hücre nükleusu ile oosit sitoplazması arasındaki senkronizasyondur. Dönör (verici) nükleusun başarı ile yeniden programlanması için maturasyonu uyaran faktörü en yüksek oranda taşıyan metafaz II oosit içine transfer edildiğinde G0 veya G1 fazında olması gerekir. Bu hassas senkronizasyon doğru kromozom yoğunlaşması sağlar ve doğru ploidiye sahip embriyoların gelişmesini güçlendirir. İlk başarılı nükleer transfer girişimi olarak tarihi geçen Wilmut ve ark (1997)'nin erişkin vücut hücresinden bir kuzu elde etmesi nükleer transfer için verici hücrenin hücre siklus döneminin anahtar rol oynadığını göstermiştir. Böylece bu çalışmada kullanılan G0 fazının nükleer transferin başarısının sorumlusu olduğu kabul edilmiştir (Wilmut ve ark. 1997, Kato ve ark. 1998, Wells ve ark. 1999, Kato ve ark. 2000). Ancak kısa süre sonra yapılan çalışmalar G0 fazının şart olmadığını ve G1 fazındaki hücrelerin de kullanılabilceğini göstermiştir (Cibelli ve ark. 1998, Vignon ve ark. 1998, Kasinathan ve ark. 2001, Urakawa ve ark. 2004). Sonrasında birçok laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda her iki hücre fazındaki hücreler kullanılarak çeşitli türlerde başarılı sonuçlar alınmıştır (Bosch ve ark. 2004).

Kültürdeki hücreleri istenen döneme getirmek için uygulanan serum açlığı ile hücreler yeteri kadar beslenemedikleri için dinlenme fazına yani G0 fazına geçerler. İlk başarılı NT çalışmasında bu yöntem kullanılmıştır (Wilmut ve ark. 1997). Başarılı sonuçlar veren G1 evresi için hücreler kültür kaplarını kapladıklarında birbirleri ile temas ettikleri için fazına geçemezler ve G1'de kalırlar. Bu yöntem ile sinkronize edilen hücrelerin kullanıldığı çeşitli NT çalışmalarında başarılı sonuçlar alınmıştır (Cibelli ve ark. 1998, Arat ve ark. 2001b, Arat ve ark. 2002, Hayes ve ark. 2005, Gerger ve ark. 2010). Bir başka yöntem ise roskovitin, dimetil sulfoksit, sikloheksimid gibi çeşitli kimyasallar kullanılarak hücrelerin G1 fazında bloklanmasıdır ve bazı NT çalışmalarında da bu yöntem kullanılmıştır (Arat ve ark. 2001b, Gibbons ve ark. 2002, Hashem ve ark. 2006, Goissis ve ark. 2007). Bu senkronizasyon ajanlarının kullanımı hücre siklusunu düzenlemede etkili olmakla birlikte DNA hasarına sebep olarak hücre hasarı veya ölümü ile sonuçlanabilen toksik etkileri beraberinde getirebilir (Koo ve ark. 2009). Benzer bir durumunda serum açlığı sonucu görüldüğüne dikkat çeken ve gerek embriyonal dönem, gerekse doğum sonrası ölümlerin bu yöntemin sebep olduğu DNA hasarlarına veya apostozise bağlı olabileceğini iddia eden çalışmalar da vardır (Kato ve ark. 1998, Wells ve ark. 1998a, Hill ve ark. 1999, Gibbons ve ark. 2002). Ancak hücre kültüründe

serum açıklığının apoptoza sebep olduğunu gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır ve erişkin hücre (Peng ve ark. 2013, Dalman ve ark. 2010) ile yapılmış birkaç çalışma dışında çoğu fetal hücrelerde yapılmıştır (Peura 2001, Kues ve ark. 2002, Cho ve ark. 2005). Buna karşın serum açıklığının herhangi bir olumsuz etkisine rastlanmadığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur (Lima-Neto ve ark. 2010).

Hücre bölünmesine gitmeden önce çoğalan hücreler değişik fazlardan geçerler G1 fazında hücreler RNA ve protein sentez ederler. S fazının başında diploid bir hücre her kromozomdan iki kopya içerir. Bu DNA içeriği 2N diye ifade edilir. S fazında DNA sentezi yapılır ve bu fazın sonunda hücresel DNA miktarı iki katına çıkar (4N). G2 fazı S fazından sonra oluşur ve hücre bölünmesinden önceki RNA ve protein sentez fazıdır. M fazı o kadar kısadır ki bu fazda hücreler DNA içeriği bazında G2 fazındakilerden ayırt edilemez. Her iki fazda da DNA miktarı 4N dir. Hücre bölünmesinden sonra oluşan yeni hücreler diploiddir. Bu hücreler, yeni bölünmeler için hücre siklusuna devam edebilir ancak bazen de G0 olarak da bilinen istirahat fazına girerler. G0 ve G1 fazındaki hücreler 2N DNA içeriğine sahip olduğundan DNA bazında birbirinden ayrılamazlar. Böylece akış sitometrisi cihazı DNA yi boyayan PI' ın farklı miktarda DNA miktarına sahip hücrelerde yaydığı ışığın yoğunluğuna göre örnekdeki hücre popülasyonunun siklus fazlarına göre iki pik vererek ayrılmasını sağlar (Schippers ve ark. 2011). Nükleer transfere başlamadan önce verici nükleusun senkronizasyonunu sağlamak için yapılan çalışmalarda hücrelerin hücre siklus karakteristiğini belirlemek için akış sitometrisi kullanılmaktadır (Gibbons ve ark. 2002, Katsk ve ark. 2002, Cho ve ark. 2005, Hayes ve ark. 2005, Shi ve ark. 2007, Selokar ve ark. 2012).

Ayrıca apoptoz esnasında hücre zarındaki fosfolipitlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler antikoagulan protein olan annexin V kullanılarak akış sitometrisinde apoptoz miktarı ve yüzdesi belirlenebilir (Shynkar ve ark. 2007). Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de annexin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak PI eklenmektedir. Annexin V-FITC ve non-vital boya olan PI birlikte hücre boyanmasında kullanıldığında, canlı hücreler, erken apoptotik hücreler ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin birbirinden ayırt edilmesine izin verir (Rieger ve ark. 2011, Overbeeke ve ark. 1998). Apoptoz embriyo gelişimi üzerinde önemli rol oynar. Preimplantasyon aşamasında gerçekleşen apoptozun hem *in vivo* hem de *in vitro* embriyo kayıplarında önemli rol oynadığı bilinmektedir. NT ile üretilen sığır blastosistlerinin apoptoz oranı *in vivo* üretilen embriyoların apoptoz oranından daha fazladır (Hao ve ark. 2003). Böylece kullanılan yöntemin hücreyi apoptoza

götürmesinin NT üzerinde olumsuz yönde etkili olacağı düşünülmüş ve tüm deney gruplarındaki hücrelerde apoptoz ve nekroz analizi yapılmıştır.

Mevcut çalışmada hem hücre siklusu hemde hücre canlılığı akış sitometrisi cihazı ile analiz edilmiştir. Son araştırmalar annexin V/PI protokolünde PI'ın sitoplazma içinde RNA'yı da boyayarak %40'lara varan hatalı pozitif sinyaller verdiği gösterilmiş ve bu durumun düzeltilmesi için RNaz kullanıldığında canlı hücre oranının %70.9'dan %84.9'a çıktığı nekrotik hücre oranının %18.8 den %3.3'e düştüğü görülmüştür (Rieger ve ark. 2010, 2011). Mevcut çalışmada da bir seri ön deneme yapılmış ve benzer şekilde RNaz kullanımına bağlı olarak canlı hücre oranı kıkırdak hücrelerinden %96.21'den %99.39'a, fibroblastlarda %96.56'dan %98.32'ye çıkmıştır. Bu sonuç üzerine annexin V/PI protokolüne RNaz ilave edilmiştir.

Sığır deri fibroblastları ile yapılan bir çalışmada 72 saat ve 120 saat serum açlığı uygulamasında G1/G0 oranının benzer olduğu ve bu oranın aynı zamanda 4 gün konfluensi (geç konfluent) uygulanan grup ile de benzer olduğu rapor edilmiştir (%82.39, %89.56, %88.22), ancak bu çalışmada canlılık oranı incelenmemiştir (Hayes ve ark. 2005). Deri fibroblastının kullanıldığı başka bir çalışmada serum açlığı uygulamasının G1/G0 hücre oranını %64.9'dan %84.5'e çıkardığı rapor edilmiştir (Kubota ve ark. 1999). Bu sonuçlar mevcut çalışmada en yüksek G1/G0 oranı ile sonuçlanan grup 5 (geç konfluent) ve 7 (120 saat serum açlığı) ile benzerdir. Ayrıca bir başka çalışmada mevcut çalışmaya benzer olarak 3 ve 5 gün konfluensi ve serum açlığı, 1 ve 2 gün roskovitin uygulamasından daha yüksek G1/G0 oranı ile sonuçlanmıştır (Sun ve ark. 2008). Fetal sığır fibroblastının serum açlığı, roskovitin ve konfluensi ile muamele edildiği bir çalışmada en yüksek G1/G0 oranları (sırasıyla %82.9, %82.8, %86.9) konfluensi grubundan elde edilmiştir (Cho ve ark. 2005). Ayrıca bu çalışmada canlılık oranları sırasıyla %70.5, %74.6, ve %76.6 ile mevcut çalışmadan oldukça düşük bulunmuştur. Bu durum kültür koşullarının farklılığına, veya hücre hattına bağlı olabilir veya fetal hücrelerin erişkinlerden daha hassas olmasından kaynaklanabilir. Erişkin deri fibroblastı ile yapılan başka bir çalışmada G1/G0 oranı serum açlığında % 93.3 ve konfluenside %90.3 bulunmuştur (Cheong ve ark. 2003). Mevcut çalışmada ise erkek sığır taze fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5'de (geç konfluent) %80.77 G1/G0 oranına karşılık hücre canlılık oranı %92.08, grup 7'de (120 saat serum açlığı) %81.37 G1/G0 oranına karşılık hücre canlılık oranı %96.21 olarak grup 5'den istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Erkek sığır donmuş fibroblastlarda senkronizasyon sonuçları

hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de %87.55 G1/G0 oranına karşılık hücre canlılık oranı %95.12 ile kontrol grubu ile aynı değerde bulunmuştur. Bu deney grubunda ikinci olarak yüksek (%82.30) G1/G0 hücre oranı veren grup 5'de canlılık oranı %97.98 ile grup 7'den istatistiksel olarak yüksektir. Dişi sığır taze fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açlığı) hem G1/G0 oranı (%84.43) hemde hücre canlılık oranı (%89.25) tüm deney gruplarından istatistiksel olarak yüksektir. Dişi sığır donmuş fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açlığı) G1/G0 oranı (%79.38) diğer gruplardan yüksek bulunurken bu grubun hücre canlılık oranı (%95.23) kontrol grubu ile istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır.

Sığır granüloza hücreleri ile yapılan bir çalışmada 4 günlük konfluent grup ile 72 saat ve 120 saat serum açlığı gruplarından benzer G1/G0 oranları (sırasıyla %85.65, %91.34, %89.37) alındığı bildirilmiştir (Hayes ve ark. 2005). Kumulus hücreleri ile yapılan bir çalışmada bu oranlar serum açlığında %91.2 konfluenside %92.6 olarak bildirilmiştir (Cheong ve ark. 2003). Mevcut çalışmada ise en yüksek oranlar konfluent ve roskovitin gruplarından elde edilmiştir. Bu çalışmada sığır taze granüloza hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 4 ve 5'de (sırasıyla erken ve geç konfluent) G1/G0 oranları (sırasıyla %79.34, %79.39) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları (sırasıyla %94.77, %94.74) kontrolden (%94.96) farklı bulunmamıştır. Sığır donmuş granüloza hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 3'de (roskovitin-2) G1/G0 oranı (%79.15) istatistiksel olarak en yüksek, ancak hücre canlılık oranı (%92.14) kontrolden (%96.80) istatistiksel olarak düşük bulunmuştur. Bu deney grubunda ikinci olarak yüksek (%76.28) G1/G0 hücre oranı veren grup 5'de (geç konfluent) canlılık oranı (%94.30) yine kontrol grubundan düşük bulunurken, üçüncü olarak yüksek (%75.48) G1/G0 hücre oranı veren grup 2'de (roskovitin-2) canlılık oranı (%95.95) kontrol ile benzer bulunmuştur. Benzer şekilde dondurulmuş granüloza hücreleri ile yapılan bir çalışmada serum açlığına (%76.7) karşılık roskovitin (%82.4) uygulaması ile daha yüksek G1/G0 oranı elde edilmiştir (Gibbons ve ark. 2002).

Sığırlarda nükleer transfer için kas hücrelerinin kullanıldığı sadece birkaç çalışma vardır (Vignon ve ark 1998, Shiga ve ark 1999). Sığır erişkin kas hücreleri ile yapılan bir senkronizasyon çalışmasında serum açlığı %89.5 ve konfluensi %89.3 G1/G0 oranı ile sonuçlanmıştır (Cheong ve ark. 2003). Mevcut çalışmada erkek sığır taze kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5'de (geç konfluent)

%77.68 G1/G0 oranına karşılık hücre canlılık oranı %94.90 ile kontrol grubu ile aynı değerde bulunmuştur. Bu deney grubunda ikinci olarak yüksek (%76.49) G1/G0 hücre oranı veren grup 7'de (120 saat serum açıklığı) canlılık oranı %98.08 ile grup 5'den istatistiksel olarak yüksektir. Erkek sığır donmuş kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açıklığı) %90.26 G1/G0 oranına karşılık hücre canlılık oranı %93.01 ile kontrol grubu ile aynı değerde bulunmuştur. Bu deney grubunda üçüncü olarak yüksek (%82.46) G1/G0 hücre oranı veren grup 5'de (geç konfluent) canlılık oranı %99.65 ile tüm deney gruplarından istatistiksel olarak yüksektir. Dişi sığır taze kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açıklığı) G1/G0 oranı (%94.90) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%95.86) kontrolden yüksek çıkmıştır. Bu deney grubunda üçüncü olarak yüksek (%86.25) G1/G0 hücre oranı veren grup 5'de (geç konflent) canlılık oranı (%97.91) tüm deney gruplarından istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Dişi sığır donmuş kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında hem grup 2 (roskovitin-1) ve hem de grup 7'de (120 saat serum açıklığı) G1/G0 oranları (sırasıyla %89.47, %89.63) istatistiksel olarak en yüksek, ancak grup 7 de hücre canlılık oranı (%97.08) grup 2'den (%94.47) istatistiksel olarak yüksek çıkmıştır.

Sığır kıkırdak hücreleri nükleer transfer amacıyla ilk defa bir çalışmada kullanılmış ve hücreler G1/G0 fazına kontak inhibisyon ile getirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada kıkırdak hücrelerinden sağlıklı bir dişi klon buzağı üretilmiştir (Arat ve ark. 2011). Kıkırdak hücrelerinin ne senkronizasyonu ne de nükleer transferde kullanımı ile ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmada erkek sığır taze kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5'de (geç konfluent) %77.49 G1/G0 oranına karşılık hücre canlılık oranı %92.88 ile kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Bu deney grubunda ikinci olarak yüksek (%76.22) G1/G0 hücre oranı veren grup 7'de (120 saat serum açıklığı) canlılık oranı %97.45 ile grup 5'den istatistiksel olarak yüksektir. Erkek sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6'da (72 saat serum açıklığı) %86.18 G1/G0 oranına karşılık hücre canlılık oranı %93.98 ve grup 7'de %85.12 G1/G0 oranına karşılık hücre canlılık oranı %94.66 ile kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Bu deney grubunda üçüncü olarak yüksek (%82.85) G1/G0 hücre oranı veren grup 5'de (geç konflent) canlılık oranı %96.22 ile grup 6 ve 7'den istatistiksel olarak yüksektir. Dişi sığır taze kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5'de (geç konfluent) G1/G0 oranı

(%79.22) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%91.12) kontrolden istatistiksel olarak düşük çıkmıştır. Bu deney grubunda %60'ın üzerinde G1/G0 hücre oranı veren tüm gruplarda canlılık oranı kontrolden düşük olmuştur. Dişi sığır donmuş kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5'de (geç konfluent) G1/G0 oranı (%74.37) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%92.04) kontrolden istatistiksel olarak düşük çıkmıştır. Bu deney grubunda en yüksek canlılık oranları grup 6 ve 7 (sırasıyla %97.12, %95.80) de tespit edilmiş ancak bu deney gruplarında senkronizasyon oranları (%62.38, %70.14) grup 5'den düşük olmuştur.

Dişi manda fetal fibroblastlarının serum açıklığı ve konfluensi ile senkronize edildiği bir çalışmada G1/G0 oranı serum açıklığında (%77.9) konfluensiden (%66) yüksek bulunmuş ve bu çalışmada hücre canlılık oranı incelenmemiştir (Shi 2007). Bu senkronizasyon oranı mevcut çalışmaya göre daha düşüktür. Bunun sebebi bu çalışmada fetal hücrelerin kullanılmış olması ve gerek serum açıklığı ve gerekse konfluensi süresinin 72 saat olması olabilir. Bir başka çalışmada manda fibroblastlarında serum açıklığı, konfluensi ve roskovitin ile senkronizasyon yapılmış, G1/G0 oranı serum açıklığında %76.80 ve konfluenside %85.99 bulunmuştur (Selokar ve ark. 2012). Bu sonuçlar mevcut çalışmanın sonuçlarından düşüktür ve bu fark serum açıklığı süresinin 24 ve konfluensi süresinin ise 72 saat olması olabilir. Ancak bu çalışmada 24 saat 30 µM roskovitin uygulaması mevcut çalışmadan farklı olarak %96.43 G1/G0 oranı ile diğer iki gruptan yüksek çıkmıştır. Bunun sebebi roskovitin uygulanan hücrelerin mevcut çalışmada %50 Selokar ve ark. (2012)'nin çalışmasında %60'ın üzerinde konfluent olması olabilir. Mevcut çalışmada ise erkek manda taze fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açıklığı)'de G1/G0 oranları (%95.10) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%96.04) kontrol (%96.44) ile benzer bulunmuştur. Deney grupları içerisinde ikinci en yüksek G0/G1 oranına (%92.51) sahip grup 5 (geç konfluent)'de canlılık oranı (%95.82) kontrol ile benzer bulunmuştur. Erkek manda donmuş fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açıklığı) de G1/G0 oranları (sırasıyla %93.46, %93.20) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları (sırasıyla %96.64, %93.94) kontrolden (%97.29) düşük bulunmuştur. Tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Dişi manda taze fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açıklığı)'de G1/G0 oranları (sırasıyla %91.25, %92.14) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları grup

5'de (%97.56) kontrolden (%98.48) düşük grup 7'de (%98.36) kontrol ile benzer bulunmuştur. Dişi manda donmuş fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5 (geç konfluent) ve grup 7 (120 saat serum açıklığı)' de G1/G0 oranları (sırasıyla %91.38, %92.34) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları grup 5'de (%95.58) kontrolden (%97.09) düşük, grup 7'de (%96.95) kontrol ile benzer bulunmuştur.

Manda granüloza hücrelerinin serum açıklığı ve konfluensi ile senkronize edildiği bir çalışmada G1/G0 oranı serum açıklığında (%76.6) konfluensiden (%63.2) yüksek bulunmuş ve bu çalışmada hücre canlılık oranı incelenmemiştir (Shi ve ark. 2007). Bu senkronizasyon oranı mevcut çalışmadaki orana göre daha düşüktür. Bunun sebebi gerek serum açıklığı ve gerekse konfluensi süresinin 72 saat olması olabilir. Mevcut çalışmada dişi manda taze granüloza hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açıklığı)' de G1/G0 oranı (%81.22) istatistiksel olarak gruplar içerisinde en yüksek, hücre canlılık oranı (% 97.02) kontrolden (%98.23) düşük bulunmuştur. Tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Dişi manda donmuş granüloza hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açıklığı)' de G1/G0 oranı (%86.23) istatistiksel olarak gruplar içerisinde en yüksek, hücre canlılık oranı (%95.59) kontrolden (%97.52) düşük bulunmuştur. Ancak tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir.

Manda hücrelerinin senkronizasyonu ve nükleer transferi ile ilgili çalışma çok azdır ve hiçbirinde ne kas, ne de kıkırdak hücreleri ile çalışılmamıştır. Mevcut çalışmada erkek manda taze kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açıklığı)' de G1/G0 oranı (%83.99) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%96.72) kontrolden (%97.33) düşük bulunmuştur. Tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Erkek manda donmuş kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açıklığı)' de G1/G0 oranı (%82.92) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%95.95) kontrolden (%97.22) düşük bulunmuştur. Hücre canlılık oranı (%96.90) kontrol ile benzer olan grup 6 (72 saat serum açıklığı)' da G1/G0 oranı %77.89 olarak bulunmuştur. Erkek manda taze kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon

sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranı (%94.81) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%96.58) kontrolden (%98.36) düşük bulunmuştur. Tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Erkek manda donmuş kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranı (%90.08) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%96.41) kontrolden (%98.99) düşük bulunmuştur. Hücre canlılık oranı (%98.36) kontrol ile benzer olan grup 4 (erken konfluent)' de G1/G0 oranı %76.16 olarak bulunmuştur. Dişi manda taze kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de hem G1/G0 oranı (%91.85) hem de hücre canlılık oranı (%98.45) istatistiksel olarak gruplar içerisinde en yüksek bulunmuştur. Dişi manda donmuş kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranı (%86.99) istatistiksel olarak gruplar içerisinde en yüksek, hücre canlılık oranı (%97.15) kontrolden (%98.32) düşük bulunmuştur. Hücre canlılık oranı (%98.80) kontrol ile benzer olan grup 4 (erken konfluent)' de G1/G0 oranı %79.28 olarak bulunmuştur.

Koyunlarda nükleer transfer çalışmalarında çoğunlukla kullanılan hücreler fibroblastlardır (Xue ve ark. 2011). Ancak bir çalışmada farklı cinsiyette ve tipte hücreler kullanılarak ve hepsinde hücre senkronizasyonu için serum açlığı yöntemi uygulanarak yapılan bir çalışmada kumulus, erkek ve dişi fibroblastlardan gelişen blastosist oranları arasında bir fark olmadığı gösterilmiştir (Hosseini ve ark. 2008). Koyun fetal fibroblastlarının kullanıldığı ve senkronizasyon için de serum açlığı ve konfluensi uygulandığı bir başka çalışmada her iki gruptan da canlı kuzu elde edildiği, ancak sayının serum açlığı grubunda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Melican ve ark. 2005). Bu sonuç her iki senkronizasyonun da benzer etkisi olduğunu göstermektedir. Bu çalışmaların hiçbirinde senkronizasyon sonuçları akış sitometrisi ile analiz edilmemiştir. Mevcut çalışmada erkek koyun taze fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5'de (geç konfluent) G1/G0 oranı (%80.02) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı ise (%92.31) kontrolden (%95.81) istatistiksel olarak düşük çıkmıştır. Bu deney grubunda ikinci yüksek canlılık oranı (%71.82) grup 7 (120 saat serum açlığı)' de tespit edilmiş ve bu grubun hücre canlılık oranı (%94.59) grup 5'den istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Erkek koyun donmuş fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açlığı) G1/G0 oranı (%75.51) istatistiksel olarak

en yüksek, hücre canlılık oranı ise (%94.52) kontrol ile benzer çıkmıştır. Bu deney grubunda ikinci yüksek G1/G0 oranı (%70.00) grup 6 (72 saat serum açlığı)' da tespit edilmiş ve bu grubun hücre canlılık oranı (%97.56) grup 7'den istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Dişi koyun taze fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 4 (erken konfluent), grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranları (sırasıyla %84.62, %82.79, %82.71) istatistiksel olarak en yüksek hücre canlılık oranları ise grup 4'de (%95.29) kontrol (%94.39) ile benzer, grup 6'da (%98.11) en yüksek, ve grup 7'de (%95.71) kontrol ile benzer bulunmuştur. Dişi koyun donmuş fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6'da (72 saat serum açlığı) G1/G0 oranı (%96.38) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı ise (%95.78) kontrolden (%93.10) yüksek çıkmıştır. G1/G0 oranı %90.45 olan grup 4'de (erken konfluent) hücre canlılık oranı (%98.92) gruplar içinde en yüksek bulunmuştur.

Koyunlarda kas ve kıkırdak hücrelerinin kullanıldığı bir nükleer transfer çalışmasına rastlanmamıştır. Mevcut çalışmada erkek koyun taze kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açlığı) G1/G0 oranı (%91.38) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı ise (%94.24) kontrolden (%96.18) istatistiksel olarak düşük çıkmıştır. Bu deney grupları içinde en yüksek canlılık oranı grup 4'de (%95.92) tespit edilirken bu deney grubunun G1/G0 oranı (%74.75) grup 7'den oldukça düşük olmuştur. Erkek koyun donmuş kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açlığı) G1/G0 oranı (%92.56) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı ise (%93.70) kontrol (%94.39) ile benzer bulunmuştur. Dişi koyun taze kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açlığı) G1/G0 oranı (%95.40) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı ise (%97.79) diğer tüm deney gruplarından yüksek, ancak kontrolden (%98.29) düşük çıkmıştır. Dişi koyun donmuş kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açlığı) G1/G0 oranı (%94.68) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı ise (%99.54) kontrolden (%97.86) istatistiksel olarak yüksek çıkmıştır.

Erkek koyun taze kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7'de (120 saat serum açlığı) G1/G0 oranı (%84.52) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı ise (%95.94) kontrol (%96.97) grubundan istatistiksel olarak düşük çıkmıştır. Bu hücre grubunda tüm senkronizasyon uygulamalarının hücre

canlılık oranında kontrole göre istatistiksel olarak düşüklüğe sebep olduğu görülmüştür. Erkek koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7’de (120 saat serum açlığı) hem G1/G0 oranı (%81.92), hem de hücre canlılık oranı (%97.05) tüm gruplardan istatistiksel olarak en yüksek çıkmıştır. Dişi koyun taze kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 5 (geç konfluent) 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)’ de G1/G0 oranları (sırasıyla %83.49, %81.34, %80.70) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları grup 6 ve 7’ de (sırasıyla %98.10, %98.01) kontrolden (%97.16) yüksek, grup 5’de (%94.16) kontrolden düşük bulunmuştur. Dişi koyun donmuş kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)’ de G1/G0 oranları (sırasıyla %89.32, %89.26) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları ise grup 6’da (%97.72) kontrolden (%95.94) yüksek grup 7’de (%91.47) kontrolden düşük bulunmuştur. Deney grupları içerisinde ikinci en yüksek G1/G0 oranına (%87.63) sahip grup 4’ün (erken konfluent) canlılık oranı (%99.16) istatistiksel olarak diğer tüm gruplardan yüksek bulunmuştur.

Koyunlarda serum açlığı uygulanan ve uygulanmayan granüloza hücreleri nükleer transferde kullanılmış, bunun sonucunda ne in vitro ne de in vivo embriyo gelişiminde bir fark tespit edilmemiştir. Hücre senkronizasyonunun analiz edilmediği bu çalışmada serum uygulamasının ne negatif, ne de pozitif etkisinin bulunmadığı ileri sürülmüştür (Peura ve ark. 2003). Mevcut çalışmada koyun taze granüloza hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 4 (erken konfluent) grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)’ de G1/G0 oranları (sırasıyla %87.58, %85.45, %84.67) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları ise grup 4’de (%94.45) tüm gruplardan yüksek, grup 6 ve 7’de (sırasıyla %93.06, %92.58) kontrol (%92.86) ile benzer çıkmıştır. Koyun donmuş granüloza hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)’ de G1/G0 oranı (%85.66) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%95.59) kontrol (%96.86) ile benzer çıkmıştır.

Keçi fibroblastları ile yapılan bir çalışmada 3 gün serum açlığının G1/G0 hücre oranını %66.23’den %82.91’e çıkardığı rapor edilirken (Zhou ve ark. 2013), benzer başka bir çalışmada (Dalman ve ark. 2010) 3 gün serum açlığı, erken konfluensi ve geç konfluensi gruplarında bu oran %90.1, %80.26 ve %91.53 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada canlı hücre oranı serum açlığında %91.90, erken ve geç konfluenside sırasıyla %95.61, %95.12 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar mevcut çalışmanın sonuçlarına benzerdir. Fötal fibroblastlar

ile yapılan bir çalışmada hücreler roskovitin, serum açlığı ve konfluensi uygulaması ile sinkronize edilerek nükleer transferde kullanılmış ve blastosist gelişiminin roskovitin ve konfluenside benzer olduğu ancak serum açlığı uygulanan hücrelerden düşük oranda blastosist elde edildiği bildirilmiştir (Akshey ve ark. 2011). Serum açlığının bu çalışmadaki düşük oranı fötal hücrelerin uygulamaya daha hassas olmasından kaynaklanabilir. Bu çalışmada G1/G0 oranı analiz edilmemiştir. Yine başka bir çalışmada deri fibroblastlarında 3 ve 5 gün serum açlığı sırasıyla %70.2 ve %83.4, konfluensi ise %77.6 G1/G0 oranları ile sonuçlanmıştır. Apoptotik hücre oranı da 5 günlük serum açlığında %11 ile deney grupları arasında en yüksek bulunmuştur (Yu ve ark. 2003). Mevcut çalışmada erkek keçi taze fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı) de G1/G0 oranları (sırasıyla %79.08, %81.57) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları (sırasıyla %90.87, %92.74) kontrolden (%96.32) düşük çıkmıştır. Deney grupları içerisinde ikinci en yüksek G0/G1 oranlarına (sırasıyla %74.11, %74.33) sahip grup 4 ve 5 (sırasıyla erken konfluent ve geç konfluent) de canlılık oranları (sırasıyla %96.23, %95.41) kontrol ile benzer bulunmuştur. Erkek keçi donmuş fibroblastlarında senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı) de G1/G0 oranları (sırasıyla %79.08, %81.77) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları grup 6 da (%96.05) kontrol (%96.26) ile benzer, grup 7 de (%92.84) kontrolden istatistiksel olarak düşük çıkmıştır. Deney grupları içerisinde ikinci en yüksek G0/G1 oranına (%74.11) sahip grup 4 (erken konfluent) te canlılık oranı (%97.26) diğer tüm gruplardan yüksek bulunmuştur. Dişi keçi taze fibroblastlarda senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı) de G1/G0 oranı (%88.84) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%96.90) kontrol ile (%96.32) benzer bulunmuştur. Hücre canlılık oranı kontrol ile benzer olan grup 4 (%96.48) te G1/G0 oranı %82.24 olarak bulunmuştur. Dişi keçi donmuş fibroblastlarda senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı) de G1/G0 oranları (sırasıyla %94.04, %96.01) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları (sırasıyla %95.33, %94.24) kontrol (%93.65) ile benzer ve kontrolden yüksek bulunmuştur. Deney grupları içerisinde ikinci en yüksek G0/G1 oranlarına (sırasıyla %84.23, %84.62) sahip grup 4 ve 5 (sırasıyla erken ve geç konfluent) de canlılık oranları (sırasıyla %93.48, %95.37) kontrol ile benzer ve kontrolden yüksek bulunmuştur.

Keçilerde kas hücrelerinin kullanıldığı sadece bir yayına rastlanmıştır ve bu çalışmada sağlıklı doğum ile sonuçlanan en uygun hücre tiplerinden biri olarak rapor edilmiştir (Ren ve ark. 2014). Ancak bu çalışmada hücre senkronizasyon analizi yapılmamıştır. Mevcut çalışmada erkek keçi taze kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranı (%91.48) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%95.50) kontrolden (%93.89) yüksek bulunmuştur. Deney grupları içerisinde ikinci en yüksek G1/G0 oranlarına (sırasıyla %83.36, %86.53) sahip grup 4 ve 5 (sırasıyla erken ve geç konfluent)' de canlılık oranları (%92.94, %92.60) kontrolden düşük bulunmuştur. Erkek keçi donmuş kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranı (%84.95) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%94.07) kontrolden (%96.51) düşük bulunmuştur. Tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Dişi keçi taze kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranları (sırasıyla %85.67, %88.10) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları (sırasıyla %92.86, %91.80) kontrolden (%95.14) düşük bulunmuştur. Hücre canlılık oranları (sırasıyla %94.84, %95.35) kontrol ile benzer olan grup 2 (roskovitin-1) ve grup 4 (erken konfluent)' te G1/G0 oranı sırasıyla %67.25 ve %78.88 olarak bulunmuştur. Dişi keçi donmuş kas hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranı (%92.69) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%92.94) kontrolden (%95.58) düşük bulunmuştur. Hücre canlılık oranı (sırasıyla %94.86, %95.06) kontrol ile benzer olan grup 2 (roskovitin-1) ve grup 4 (erken konfluent)' te G1/G0 oranı sırasıyla %68.27 ve %78.88 olarak bulunmuştur.

Keçilerde kıkırdak hücreleri ile ne senkronizasyon ne de nükleer transfer ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmada erkek keçi taze kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6 ve 7 (sırasıyla 120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranları (sırasıyla %66.94, %66.62) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (sırasıyla %94.47, %94.39) kontrolden (%93.32) yüksek bulunmuştur. Erkek keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranları (sırasıyla %73.56, %75.16) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (sırasıyla %94.20, %96.54) kontrolden (%97.39) düşük bulunmuştur. Tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Dişi keçi

taze kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranı (%85.57) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%94.09) kontrolden (%97.26) düşük bulunmuştur. Tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Dişi keçi donmuş kıkırdak hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 6 ve 7 (sırasıyla 72 ve 120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranları (sırasıyla %75.17, %77.15) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranları grup 6'de (%95.94) kontrolden (%94.92) yüksek ve grup 7'de (%94.08) kontrolden ve diğer deney gruplarından düşük bulunmuştur.

Keçilerde granüloza ve kumulus hücrelerinin nükleer transferi ile canlı doğumlar elde edilmiştir ve genelde hücrelerde serum açlığı ve konfluensi ile senkronizasyon yapılmıştır (Keefer ve ark. 2002, Lan ve ark. 2006). Mevcut çalışmada keçi taze granüloza hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranı (%91.29) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%95.11) kontrolden (%96.29) düşük bulunmuştur. Tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Keçi taze granüloza hücrelerinde senkronizasyon sonuçları hücre canlılık oranı ile karşılaştırıldığında grup 7 (120 saat serum açlığı)' de G1/G0 oranı (%87.92) istatistiksel olarak en yüksek, hücre canlılık oranı (%94.13) kontrolden (%95.69) düşük bulunmuştur. Tüm deney gruplarının hücre canlılık oranlarının kontrolden istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir.

Bir çalışmada farklı hücre tiplerinde uygulanan serum açlığı ve konfluensi yöntemleri akış sitometrisi ile analiz edilmiş, hücrelerin senkronize edilmesinde önerilen her uygulamanın farklı hücre tiplerinde farklı sonuçlar verebileceği, bazı hücre tiplerinde bu uygulamaların G1/G0 oranını çok fazla etkilemediği, bölünen hücrelerin zaten %60 dan fazlasının G1/G0 da olduğu, hatta bazı tip hücrelerde serum açlığının tam tersi etki gösterdiği ve konfluensinin de G1/G0 oranını yükseltmede hiçbir etkiye sahip olmadığı iddia edilmiştir. Bu nedenle de, her hücre tipi için en uygun stratejinin belirlenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Katska ve ark. 2002). Nükleer transfer başarısının çok belirgin bir şekilde hücre tipi, hücre kaynağı ve hatta ait olduğu canlılığın cinsiyetinden etkilendiğini gösteren çalışmalar (Lagutina ve ark. 2005) bu hücrelerin senkronizasyon uygulamalarına farklı yanıtlar vermesinden kaynaklanabilir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada farklı hücre tiplerinin kültürde farklı davranışlar sergilediği, bölünen ve hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerde G1/G0 oranının %47-79 arasında değiştiği, bu oranların hem hücre tipleri hem de hayvan türleri arasında değiştiği görülmektedir. Bu nedenle, farklı hücre tiplerinde aynı şekilde uygulanan farklı senkronizasyon yöntemlerinin etkilerinin hücre düzeyinde incelendiği bu çalışma çok yararlı bilgiler sunmaktadır. Genel olarak bakıldığında, benzer hücre tipleri ile yapılan çalışmalar ile uyumlu sonuçlar alınmıştır. Bazı senkronizasyon yöntemlerindeki sonuçların öncekilerden farklılığı mevcut çalışmadaki kültür koşullarından ve senkronizasyon yöntemlerinin uygulandığı hücrelerin başlangıç sayısından kaynaklanmış olabilir. Birçok çalışmada serum açlığı uygulaması hücreler %60-95 konfluent olduktan sonra, roskovitin uygulaması ise hücreler %60-70 konfluent olduktan sonra uygulanmaya başlamıştır. Mevcut çalışmada ise tüm gruplarda uygulamalar %50 konfluent kültürlerde başlamıştır. Genel olarak bakıldığında konfluensi ve serum açlığı uygulamasının birçok hücre tipinde roskovitine göre daha yüksek G1/G0 oranı ile sonuçlandığı görülmektedir. Grupların büyük bölümünde uygulamaların hücre canlılığı üzerinde benzer etkiler oluşturduğu ve sadece birkaç grupta erken ve geç apoptotik hücrenin toplam oranının %7'nin biraz üstünde olduğu görülmektedir. Apoptotik hücre oranının genelde düşük olması hücre canlılık oranındaki düşüşün apoptozize sebep olan DNA hasarından ziyade, kültürdeki manipulasyonlardan dolayı (tripsinleme, pasajlama, sıcaklık, pH, hücre dondurma çözme, pipetleme vb) hücre zarında meydana gelen hasara bağlı nekrotik hücre oluşumu olduğu izlenimini vermektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına bakılarak her hücre tipi için G1/G0 ve hücre canlılık oranı göz önüne alınarak bir veya birkaç alternatif senkronizasyon yöntemi seçilebilir. Bundan sonraki çalışmalarda seçilen yöntemlerle senkronize edilen hücrelerin nükleer transferde kullanılarak in vitro ve in vivo embriyo gelişiminin izlenmesi faydalı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Adams AM, Pratt SL, Gibbons JR, Arat S, Respass DS, Stice SL (2004). Production Of A Cloned Calf Using Kidney Cells Obtained From A 48-Hour Cooled Carcass. *Reprod Fertility Dev*, 16 (1,2): 133-142
- Adams JM, Cory S (2001). Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends Biochem Sci*, 26:61-66.
- Adrain C, Martin SJ (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 26:390-397.
- Akshey YS, Malakar D, Kumar De A, Kumar Jena M, Kumar Pawar S, Dutta R, Sahu S (2011). Effect Of Roscovitine Treated Donor Cells And Different Activation Methods On Development Of Handmade Cloned Goat (*Capra hircus*) Embryos. *Theriogenology*, 75:1516-1524.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). Molecular biology of the cell. *Science* 564:1654.
- Ameisen JS (1996). The origin of programmed cell death. *Science* 272:1278-1287
- Andrabi SMH, Maxwell WMC (2007). A Review Of Reproductive Biotechnologies For Conservation Of Endangered Mammalian Species *Anim Reprod Sci*, 99:223-243.
- Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Miyoshi K, Venable A, Waltenburg R, Stice S L (2001a). Bovine Cloning Using Adult Donor Cells Treated With Roscovitine. *Biol Reprod* 64(1): 173-175.
- Arat S, Rzucidlo SJ, Gibbons J, Miyoshi K, Stice SL (2001b). Production Of Transgenic Bovine Embryos By Transfer Of Transfected Granulose Cells Into Enucleated Oocytes. *Mol Reprod Dev*, 60:20-26.
- Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Respass DS, Tumlin M, Stice SL (2002). In Vitro Development Of Bovine Nuclear Transfer Embryos From Transgenic Clonal Lines Of Adult And Fetal Fibroblast Cells Of The Same Genotype. *Biol Reprod*, 66:1768-1774.
- Arat S, Caputcu A, 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 Programs Of Native Domestic Breeds: The Production Of The First Cloned Anatolian Grey Cattle. *Reprod. Fertil. Develop*, 23(8), 1012-1023.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Desrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y (1999). Production Of Goats By Somatic Cell Nuclear Transfer, *Nat Biotechnol*, 17:456-461.
- Bertolini M, Bertolini LR, Gerger RPC, Batchelder CA (2007). Developmental Problems During Pregnancy After *In Vitro* Embryo Manipulations. *Rev Bras Reprod Anim*, 31:391-405.
- Bosch P, Hodges CA, Stice SL (2004). Generation Of Transgenic Livestock By Somatic Cell Nuclear Transfer. *Biotechnolog'ia Aplicada*, 21:122-136.
- Brem G, Kuhholzer B (2002). The Recent History Of Somatic Cloning In Mammals. *Cloning Stem Cells*, 4:57-63.

- Campbell KH, Loi P, Otaegui PJ, Wilmut I (2003). Cell Cycle Co-Ordination In Embryo Cloning By Nuclear Transfer. *Rev Reprod*, 1:40-46.
- Campbell KHS (2002). A background to nuclear transfer A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *J Anat*, 200:267-275.
- Cheong HT, Park TM, Ikeda K, Takahashi Y (2003). Cell Cycle Analysis Of Bovine Cultured Somatic Cells By Flow Cytometry. *Lpn L Vet Res*, 51(2):95-103.
- Cho SR, Ock SA, Yoo JG, Mohana Kumar B, Choe SY, Rho GJ (2005). Effect Of Confluent, Roscovitine Treatment And Serum Starvation On The Cell-Cycle Synchronization Of Bovine Foetal Fibroblasts. *Reprod Domest Anim*, 40:171-176.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, De Leon FAP, Robl JM (1998). Cloned Transgenic Calves Produced From Non-Quiescent Fetal Fibroblasts. *Science*, 280:1256-1258.
- Cohen JJ (1993). Apoptosis. *Immunol Today*, 14:126-130.
- Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X (2006). Large Offspring Or Large Placenta Syndrome? Morphometric Analysis Of Late Gestation Bovine Placentomes From Somatic Nuclear Transfer Pregnancies Complicated By Hydrallantois. *Biol Reprod*, 75:122-130.
- Cooper, GM (2007). *The cell: a molecular approach -4th ed* Sinauer Associates, USA
- Çaputçu AT (2013). Değişik Doku Örneklerinin Farklı Saklama Sürelerinde Korunması ve Vitrifikasyon Yönteminin Primer Kültürler Üzerine Olan Etkisinin Farklı Yöntemler Uygulanarak Araştırılması. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Dalman A, Eftekhari-Yazdi P, Valojerdi MR, Shahverdi A, Gourabi H, Janzamin E, Fakheri R, Sadeghian F, Hasani F (2010). Synchronizing Cell Cycle Of Goat Fibroblasts By Serum Starvation Causes Apoptosis. *Reprod Dom Anim*, 45:E46-E53.
- Damjanov I, Linder J (1996). *Anderson's Pathology*, Volume 1, Chapter 9, Mosby.
- Demirsoy A (2006). Yaşamın Temel Kuralları (Cilt1/Kısım1). METEKSAN Yayınları, No.3, 156-159, ANKARA.
- Dunphy, CH (2004). Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch Pathol Lab Med*, 128(9):1004-1022.
- Edwards JL, Schrick FN, Mccracken MD (2003). Cloning Adult Farm Animals: A Review Of The Possibilities And Problems Associated With Somatic Cell Nuclear Transfer. *Am J Reprod Immunol*, 50:113-123.
- Ekinci MS, Akyol İ, Karaman M, Özköse E (2005). Hayvansal biyoteknoloji uygulamalarında güncel gelişmeler. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8:89-95.
- Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE (2006). Errors In Development Of Fetuses And Placentas From *In Vitro*-Produced Bovine Embryos. *Theriogenology*, 65:178-191.
- Freshney IR (2005). *Culture of Animal Cell. A Manual of Basic Technique*. 5 th Edition, Wiley-Liss.
- Gerger RPC, Ribeiro ES, Forell F, Bertolini LR, Rodrigues JL, Ambrósio CE, Miglino MA, Mezzalira A, Bertolini M (2010). *In Vitro* Development Of Cloned Bovine Embryos Produced By Handmade Cloning Using Somatic Cells From Distinct Levels Of Cell Culture Confluence. *Genetics And Molecular Research* 9 (1):295-302.

- Gibbons J, Arat S, Rzcudlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, Venable A, Stice SL (2002). Enhanced Survivability Of Cloned Calves Derived From Roscovitine-Treated Adult Somatic Cells. *Biol Reprod*, 66:895-900.
- Goissis MD, Caetano HV, Marques MG, De Barros FR (2007). Effects Of Serum Deprivation And Cycloheximide On Cell Cycle Of Low And High Passage Porcine Fetal Fibroblasts. *Reprod. Domest. Anim*, 42:660-663.
- Golitsin YN, Krylov MC (2010). *Cell Division: Theory, Variants and Degradation*. ISBN: 978-(1):60876,986-5.
- Grdina DJ, Meistrich ML, Meyn RE, Johnson TS, White RA (1987). Cell synchrony techniques. In Gray, J. W. and Darzynkiewicz, Z. (eds.) *Techniques in Cell Cycle Analysis*. Humana Press Clifton NJ, 367-403.
- Hao Y, Lai L, Mao J, Im GS, Bonk A, Prather RS (2003). Apoptosis and In Vitro Development of Preimplantation Porcine Embryos. *Biology Of Reproduction*, 69:501-507.
- Hashem MA, Bhandari DP, Kang SK, Lee BC (2006). Cell Cycle Analysis Of In Vitro Cultured Goral (*Naemorhedus Caudatus*) Adult Skin Fibroblasts. *Cell Biol Int*, 30:698-703.
- Hashitoma T, He Z, Ma WY, Schmid PC, Bode AM, Yang CS, Dong Z (2004). Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. *Cancer Res* 64(9):3344-3349.
- Hayat MA (2002). *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods For Light and Electron Microscopy*, Kean University Union.
- Hayes O, Ramos B, Rodriguez LL, Aguilar A, Badia T, Castro FO (2005). Cell Confluency Is As Efficient As Serum Starvation For Inducing Arrest In The G0/G1 Phase Of The Cell Cycle In Granulosa And Fibroblast Cells Of Cattle. *Animal Reproduction Science*, 87:181-192.
- Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Lebourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP (2002). Frequency And Occurrence Of Late-Gestation Losses From Cattle Cloned Embryos. *Biol Reprod*, 66:6-13.
- Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL (1999). Clinical And Pathologic Features Of Cloned Transgenic Calves And Fetuses (13 Case Studies). *Theriogenology*, 51:1451-1465.
- Hosseini SM, Moulavi F, Foruzanfar M, Hajian M, Abedi P, Rezazade-Valojerdi M, Parivar K, Shahverdi AH, Nasr-Esfahani MH (2008). Effect Of Donor Cell Type And Gender On The Efficiency Of In Vitro Sheep Somatic Cell Cloning. *Small Ruminant Research*, 78:162-168.
- <http://www.biooncology.com>
- <http://www.cs.washington.edu/building/art/JacobLawrence>
- <http://www.nature.com/scitable/topicpage/microtubules-and-filaments-14052932>
- <http://www.nature.com/principles>
- <http://www.phoenixflow.com>
- Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ, Robl JM (2001). Production Of Calves From G1 Fibroblasts. *Nat Biotechnol* 19:1176-1178.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1998). Eight Calves Cloned From Somatic Cells of a Single Adult Science, 282:2095-2098.

- Kato Y, Tani T, 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.
- Katska L, Bochenek M, Kania G, Rynska B, Smorag Z (2002). Flow Cytometric Cell Cycle Analysis Of Somatic Cells Primary Cultures Established For Bovine Cloning. *Theriogenology*, 58:1733-1744.
- Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H, Karatzas CN (2002). Production Of Cloned Goats After Nuclear Transfer Using Adult Somatic Cells. *Biol Reprod*, 66:199-203.
- Koo OJ, Hossein MS, Hong SG, Martinez-Conejero JA (2009). Cell Cycle Synchronization Of Canine Ear Fibroblasts For Somatic Cell Nuclear Transfer. *Zygote*, 17:37-43.
- Kreplak L, Fudge D (2007). Biomechanical properties of intermediate filaments: from tissues to single filaments and back. *Bioessays*, 29:26-30.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X (2000). Six Cloned Calves Produced From Adult Fibroblast Cells After Long-Term Culture. *Pnas* 97: 990-995.
- Kues WA, Carnwath JW, Paul D, Niemann H (2002). Cell Cycle Synchronization Of Porcine Fetal Fibroblasts By Serum Deprivation Initiates A Nonconventional Form Of Apoptosis. *Cloning Stem Cells*, 4:231-243.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchı R, Colleoni S, Ponderato N, Turini P, Crotti G, Galli C (2005). Somatic Cell Nuclear Transfer In Horses: Effect Of Oocyte Morphology, Embryo Reconstruction Method And Donor Cell Type. *Reproduction*, 130(4):559-567.
- Lan GC, Chang ZL, Luo MJ, Jiang YL, Han D, Wu YG (2006). Production Of Cloned Goats By Nuclear Transfer Of Cumulus Cells And Long-Term Cultured Fetal Fibroblast Cells Into Abattoir-Derived Oocytes. *Mol Reprod Dev*, 73:834-840.
- Leon-Quinto T, Simon MA, Cadenas R, Jones J, Martinez-Hernandez M, Moreno JM, Vargas A, Martinez F, And Soria B (2009). Developing Biological Resource Banks As A Supporting Tool For Wildlife Reproduction And Conservation: The Iberian Lynx Bank As A Model For Other Endangered Species. *Anim Reprod Sci*, 112(3-4):347-361.
- Lima-Neto JF, Fernandes CB, Alvarenga MA, Golim MA, Landim-Alvarenga FC (2010). Viability And Cell Cycle Analysis Of Equine Fibroblasts Cultured In Vitro. *Cell Tissue Bank* 11:261-268.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JN (2000). *Molecular Cell Biology*, 4th edition, New York.
- Malumbres M, Barbacid M (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 9(3):153-166.
- Melican D, Butler R, Hawkins N, Chen LH, Hayden E, Destremes M, Williams J, Lewis T, Behboodi E, Ziomek C, Meade H, Echelard Y, Gavin W (2005). Effect Of Serum Concentration, Method Of Trypsinization And Fusion/Activation Utilizing Transfected Fetal Cells To Generate Transgenic Dairy Goats By Somatic Cell Nuclear Transfer. *Theriogenology*, 63:1549-1563.
- Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Lee J, Kohda T, Ishio F (2002). Phenotypic Effect Of Somatic Cell Cloning In The Mouse. *Cloning Stem Cell*, 4:397-407.

- Oh HJ, Hong SG, Park JE, Kang JT, Kim MJ, Kang SK, Kim DY, Jang g, Lee BC (2009). Improved efficiency of canine nucleus transfer using roscovitine-treated canine fibroblasts. *Theriogenology*, 72(4):461-470.
- Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C (1998). Early Features Of Apoptosis Detected By Four Different Flow Cytometry Assays. *Apoptosis*, 3: 115-120.
- Peng X, Maruo T, Matsuo H, Takekida S, Deguchi J (2013). Serum Deprivation-Induced Apoptosis In Cultured Porcine Granulosa Cells Is Characterized By Increased Expression Of P53 Protein, Fas Antigen And Fas Ligand And By Decreased Expression Of Pcn. *Endocrinology*, 45:247-253.
- Peura TT (2001). Serum Starvation Can Cause Excessive Dna Damage In Sheep Fetal Fibroblasts. In: Program Of The 27th Annual Meeting Of The International Embryo Transfer Society. Omaha, Abstract 285.
- Peura TT, Hartwich KM, Hamilton HM, Walker SK (2003). No Differences In Sheep Somatic Cell Nuclear Transfer Outcomes Using Serum-Starved Or Actively Growing Donor Granulosa Cells. *Reprod Dev*, 15(3):157-165.
- Planas-Silva MD, Weinberg RA (1997). The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 9:768-772.
- Polejaeva IA, Campbell KH (2000). New Advances In Somatic Cell Nuclear Transfer:Application In Transgenesis. *Theriogenology*, 53:117-126.
- Ren Y, Wu H, Ma Y, Yuan J, Liang H, Liu D (2014). Potential Of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells And Skeletal Muscle-Derived Satellite Cells For Somatic Cell Nuclear Transfer Mediated Transgenesis In Arbas Cashmere Goats. *Plos One*, 9(4):E93583.
- Renard JP, Zhou Q, Lebourhis D, Chavatte-Palmer P, Hue I, Heyman Y, Vignon X (2002). Nuclear Transfer Technologies: Between Successes And Doubts. *Theriogenology*, 57: 203-222.
- Rieger AM, Hall BE, Luong LT, Schang LM, Barreda DR (2010). Conventional Apoptosis Assays Using Propidium Iodide Generate A Significant Number Of False Positives That Prevent Accurate Assessment Of Cell Death. *J Immunol Methods*, 358:81-92.
- Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR (2011). Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment Of Cell Death. *Journal Of Visualized Experiments (Jove)*, 50:2597, Doi: 10.3791/2597.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W (2003). *Histology: A text and Atlas with Cell and Molecular Biology*. 4th Edition, Wolters Kluwer Company.
- Ryder OA (2002). Cloning Advances And Challenges For Conservation. *Trends Biotechnol* 20: 231-232.
- Schippers KJ, Martens DE, Pomponi SA, Wijffels HR (2011). Cell Cycle Analysis Of Primary Sponge Cell Cultures In Vitro. *Cell Dev Biol Animal*, 47:302-331.
- Schwartzman R A, Cidloski JA (1993). Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death, *Endocrine Reviews* 14:133-144.
- Selokar NL, Saini M, Muzaffer M, Krishnakanth G, Saha AP, Chauhan MS, Manik R, Palta P, Madan P, Singla SK (2012). Roscovitine Treatment Improves Synchronization Of Donor

- Cell Cycle In G0/G1 Stage And In Vitro Development Of Handmade Cloned Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Embryos. *Cellular Reprogramming*, 14(2):146-154.
- Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, Liu Q (2007). Buffalos (*Bubalus Bubalis*) Cloned By Nuclear Transfer Of Somatic Cells. *Biology Of Reproduction* 77:285-291.
- Shiga K, Fujita T, Hirose K, Sasae Y, Nagai T (1999). Production Of Calves By Transfer Of Nuclei From Cultured Somatic Cells Obtained From Japanese Black Bulls. *Theriogenology*, 52:527-535.
- Shynkar VV, Klymchenko AS, Kunzelmann C, Duportail G, Muller CD, Demchenko AP, Freyssinet JM, Mely Y (2007). Fluorescent Biomembrane Probe For Ratiometric Detection Of Apoptosis, *J Am Chem Soc*, 129(7):2187-2193.
- Smith LC, Bordignon V, Babkine M, Fecteau G, Keefer C (2000). Benefits And Problems With Cloning Animals. *Can. Vet. J*, 4:919-924.
- Solter D (2000). Mammalian Cloning:Advances And Limitations. *Nat Rev Genet*, 1:199-207.
- Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem*, 52(6): 821-831.
- Sun XZ, Wang SH, Zhang YH, Wang HP, Wang LL, Ying L, Li R, Li N (2008). Cell-Cycle Synchronization Of Fibroblasts Derived From Transgenic Cloned Cattle Ear Skin: Effects Of Serum Starvation, Roscovitine And Contact Inhibition. *Zygote*, 16:111-116.
- Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Urakawa M, Ideta A, Sawada T, Aoyagi Y (2004). Examination Of Modified Cell Synchronization Method And Bovine Nuclear Transfer Using Synchronized Early G1 Phase Fibroblastcells. *Theriogenology*, 62:714-728.
- Vignon X, Chesne P, Le Bourhis D, Flechon JE, Heyman Y, Renard JP (1998). Developmental Potential Of Bovine Embryos Reconstructed From Enucleated Matured Oocytes Fused With Cultured Somatic Cells. *CR Acad Sci*, 321(9):735-745.
- Vousden KH, Lu X (2002). Live or let die: the cells response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2:594-604.
- Wani N A, Wernery U, Hassan FAH, Wernery R, Skidmore J A (2010). Production Of The First Cloned Camel By Somatic Cell Nuclear Transfer. *Biol Reprod*, 82:373-379.
- Wells DNA, Misica PM, Mcmillan WH, Tervit HR (1998a). Production Of Cloned Bovine Fetuses Following Nuclear Transfer With Cells From A Fetal Fibroblast Cell Line. *Theriogenology*, 49:330-337.
- Wells DNA, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH (1998b). Adult Somatic Cell Nt In Used To Preserve The Last Surviving Cow Of Enderby Island Cattle Breed. *Reprod Fertil Dev* 10:369-378.
- Wells DNA, Misica PM, Tervit HR (1999). Production Of Cloned Calves Following Nuclear Transfer With Cultured Adult Mural Granulosa Cells. *Biology Of Reproduction*, 60:996-1005.
- Wilmut I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997). Viable Offspring Derived From Fetal And Adult Mammalian Cells. *Nature*, 385:810-813.

- Xue L, Cheng L, Su G, Kang F, Wu X, Bai C, Zhang L, Li G-P (2011). Nuclear Transfer Procedures In The Ovine Can Induce Early Embryo Fragmentation And Compromise Cloned Embryo Development. *Animal Reproduction Science*, 126:179-186.
- Yu YS, Sun XS, Jiang, HN, Han Y, Zhao CB, Tan JH (2003). Studies Of The Cell Cycle Of In Vitro Cultured Skin Fibroblast In Goat:Work In Progress. *Theriogenology*,1277-1289.
- Zhou ZR, Zhong BS, Jia YJ, Wan YJ, Zhang YL, Fan YX, Wang LZ, You JH, Wang ZY, Wang F (2013). Production Of Myostatin-Targeted Goat By Nuclear Transfer From Cultured Adult Somatic Cells. *Theriogenology*, 79(2): 225-233.

ÖZGEÇMİŞ

Aysel EREN; 26.06.1989 tarihinde TEKİRDAĞ' da doğdu. İlköğrenimini Banarlı İlköğretim Okulu'nda, ortaöğrenimini Süleymanpaşa İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Tekirdağ Anadolu Lisesi'nde (TAL) tamamladı. Hacettepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında Biyolog unvanıyla mezun oldu. 2012-2013 Eğitim Öğretim yılının güz yarıyıl dönemin de Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2012 yılından günümüze yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.