

**SIĞIR VE KOYUNDAN ELDE EDİLEN FARKLI TİP HÜCRELERİN
DONDURULMASINDA KRIYO KORUYUCULARIN VE
ISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Ezgi SERTER

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT**

2019

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIĞIR VE KOYUNDAN ELDE EDİLEN FARKLI TİP HÜCRELERİN
DONDURULMASINDA KRİYO KORUYUCULARIN VE
ISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Ezgi SERTER

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Sezen ARAT

TEKİRDAĞ-2019

Her hakkı saklıdır.



Bu tez Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından NKUBAP.03.YL.17.134 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Sezen ARAT danışmanlığında, Ezgi SERTER tarafından hazırlanan “Sığır ve Koyundan Elde Edilen Farklı Tip Hücrelerin Dondurulmasında Kriyo Koruyucuların ve Isı Değişikliklerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU

İmza:

Üye: Prof. Dr. Sezen ARAT (Danışman)

İmza:

Üye: Dr.Öğretim Üyesi Devrim OSKAY

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIĞIR VE KOYUNDAN ELDE EDİLEN FARKLI TİP HÜCRELERİN DONDURULMASINDA KRIYO KORUYUCULARIN VE ISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ezgi SERTER

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

Hücrelerin biyobankalarda dondurularak saklanması bilimsel araştırmalar sırasında geriye dönebilme veya kaybolan türleri bu hücreleri klonlamada kullanarak geriye getirebilme olanağı sunar. Ancak dondurma işlemi hücreler için öldürücü olabilir ve bu yüzden donma ve çözünme sırasında hücrelerin herhangi bir zarara uğramaması amacı ile dondurma solüsyonu içerisine kriyoprotektan adı verilen çeşitli kimyasal maddeler eklenmektedir. Bunun yanı sıra dondurma hızı da çözüm sonrası hücre canlılığını etkileyen bir diğer faktördür. Sunulan bu tez çalışmasının amacı; kriyo koruyucuların ve ısı değişikliklerinin hücre canlılığına etkisinin araştırılması, hücrelerin zarar görmeden saklanabilmesi ve bu süreç boyunca canlılıklarının en üst seviyede korunabilmesi için onlara zarar vermeyecek koşulların hücre tipi bazında belirlenmesidir. Çalışmada koyun ve sığırdan primer kültür ile elde edilen farklı iki tip hücre hattı ile çalışılmıştır. Bu hücreler koyun ve sığır kulağından elde edilen kıkırdak hücreleri ve ovaryumlarından elde edilen granuloza hücreleridir. Yavaş dondurma tekniği, kriyoprotektan olarak seçilen DMSO ve Gliserolün farklı dozları (%5-10) denenmiştir. Dondurma sırasında kullanılan kriyoprotektanların farklı dozlarının, dondurma tüplerinin içinde bulunduğu malzemelerin (Mr. Frosty, karton kutu, köpük kutu), saklama süresi içinde meydana gelen ısı değişikliklerinin hücreler canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki etkileri akış sitometrisi ve MTT analizleri ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, DMSO uygulanan tüm deney gruplarında canlılık oranı gliserol uygulanan deney gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur. Karton veya köpük kutu içinde DMSO kullanılarak dondurulan hücrelerin canlılık oranlarının da benzer şekilde gliserol kullanılarak dondurulanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca saklama sırasında meydana gelen ısı değişikliği durumunda da canlılık oranlarının DMSO kullanılan gruplarda gliserole göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte akış sitometrisinde hücre canlılıkları düşük bulunan gliserol gruplarının 24 saat kültürü sonrasında MTT sonuçlarına bakıldığında bazı deney gruplarında proliferasyonun artmış olduğu gözlemlenmiştir. Tüm veriler ışığında çalışmada incelenen tüm koşullarda DMSO'nun hücreleri dondurmanın olumsuz etkisinden gliserole oranla daha iyi koruduğu sonucuna varılmıştır. Mr. Frosty, Köpük ve Kutu içerisinde dondurulan hücrelerde canlılık oranlarında çok büyük farklılıklar görülmemiş, hücre canlılığı üzerinde kritik faktörün kullanılan kriyoprotektan ve konsantrasyonu olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: : Hücre Kültürü, Kriyoprezervasyon, Yavaş Dondurma, Kriyoprotektan, MTT Analizi, Akış Sitometrisi

2019, 93 Sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

EXAMINATION OF THE EFFECTS OF CRYOPROTECTANTS AND TEMPERATURE CHANGES ON CELL VIABILITY IN FREEZING DIFFERENT TYPES OF CELLS OBTAINED FROM CATTLE AND SHEEP

Ezgi SERTER

Tekirdağ Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Sezen ARAT

Storage of biodegradable cells in a frozen way in biobanks gives opportunities to reversibility during scientific researches or bring the missing species back by using these cells in cloning. However, freezing process can be fatal for cells therefore, during the freezing and dissolution, it is added various chemicals which is named “cryoprotectants” to the freezing solution to avoid damage against cells. In addition, freezing speed is another factor which affects the cell viability after the solution. The purpose of this thesis is the investigation of the effects of cryoprotectants and temperature changes on cell viability, storage of cells without damage and the determination (in a base of cell type) of harmless conditions to protect their viabilities in highest level during process. In this process, it was worked with two different cell lines which is obtained with primer culture from cattle and sheep. These cells are the cartilage cells from cattle and sheep’s ear and the granulosa cells that are obtained from its ovaries. Slow freezing technique, the different dose of DMSO and glycerol (%5-10) which is chosen as cryoprotectant is tried. Different doses of cryoprotectants used during freezing, the materials in which the ice cream tubes are (Mr. Frosty, Cardboard Box, Foam Box), effects of heat changes occurring during storage on cell viability and proliferation are evaluated with low cytometry and MTT analysis. As a result, the vitality ratio applied DMSO in experimental groups is found higher than the groups that is applied glycerol. It is detected that the vitality ratio of the cells which is frozen by applying DMSO in carton or foam in box is higher which is similar to cells that frozen by the applying glycerol. It is also seen that the vitality ratio during heat change in storage time is higher as well in the groups that are applied DMSO than the groups that are used glycerol. For all that, the glycerol groups which found their cell vitality low in flow cytometry is observed that after the 24hours culturing, according to the MTT results the proliferation is higher in some experimental groups. In the light of all data, in all conditions that are examined, it is concluded that the DMSO protects the cells better from the negative effects of freezing than the glycerol. It is not seen significant differences in the viability of the cells frozen in the box, Mr. Frosty, and foam. It is concluded that the critical factor is using cryoprotectant and it’s concentration on cell viability.

Keywords: Cell Culture, Cryopreservation, Slow Freezing, Cryopretectants, MTT Analysis, Flow Cytometry

2019, 93 Pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. Hücre Kültürü ve Solüsyonlar	4
2.2. Hücre Kültürü Laboratuvarında Gereken Cihazlar	7
2.2.1. Laminar akımlı kabin	7
2.2.2 CO ₂ inkubatörü.....	8
2.2.3. Mikroskop.....	9
2.2.4. Isıtıcı tabla	9
2.2.5. Vakum pompası.....	9
2.2.6. Santrifüj	10
2.2.7. Su banyosu.....	10
2.2.8. Otoklav	11
2.2.9. -80°C derin dondurucu.....	11
2.2.10. Hassas terazi	12
2.2.11. Manyetik karıştırıcı.....	12
2.2.12. PH metre	12
2.3. Hücre Kültür Çeşitleri	13
2.3.1. Primer hücre kültürü.....	13
2.3.2. Hücre hattı	13
2.3.3. Hücre soyu.....	14
2.4. Gen Bankaları.....	14
2.5. Kriyoprezervasyon.....	16
2.6. Kriyoprotektanlar.....	17
2.7. Kriyoprezervasyon Yöntemleri	19
2.7.1. Yavaş dondurma (slow-freezing)	19
2.7.2. Hızlı dondurma (rapid freezing)	22

2.7.3. Vitrifikasyon (vitrification)	23
2.8. Hücre Canlılığı (Proliferasyon)	23
2.9. Hücre Ölümü	25
2.9.1. Apoptoz	26
2.9.2. Nekroz	28
2.10. Akış Sitometrisi (Flow Sitometri) Analizi	31
2.11. MTT Analizi	37
3. MATERYAL ve YÖNTEM	38
3.1. Materyal	38
3.1.1. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar	38
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	39
3.1.3. Kullanılan kitler	39
3.2. Deney Grupları	40
3.2.1. Kontrol deney grupları	40
3.2.2. DMSO ve gliserol karşılaştırması deney grupları (Mr. Frosty)	40
3.2.3. DMSO ve gliserol karşılaştırması deney grupları (karton kutu)	40
3.2.4. DMSO ve gliserol karşılaştırması deney grupları (köpük kutu)	40
3.2.5. Saklama sırasında ısı değişikliği deney grupları	40
3.2.6. Dondurma medyumunu final konsantrasyonları	41
3.3. Yöntemler	41
3.3.1. Primer kültür	41
3.3.2. Hücre kültürü (pasajlama)	46
3.3.3. Hücrelerin dondurulması	46
3.3.4. Hücrelerin çözülmesi	48
3.3.5. Hücre sayımı	48
3.3.6. MTT analizi	50
3.3.7. Akış sitometrisi analizi (flow sitometri)	52
3.3.8. İstatistiksel analizler	56
4. BULGULAR	57
4.1. Deney 1- DMSO ve gliserol karşılaştırması deney sonuçları (Mr. Frosty)	57
4.2. Deney 2- DMSO ve gliserol karşılaştırması deney sonuçları (karton kutu)	62
4.3. Deney 3- DMSO ve gliserol karşılaştırması deney sonuçları (köpük kutu)	64
4.4. Deney 4- Saklama sırasında ısı değişikliği deney sonuçları	66
4.5. Mr. Frosty (deney 1), karton kutu (deney 2), köpük kutu (deney 3) içinde dondurulan hücrelerin analiz sonuçları karşılaştırması	69

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
5.1. Tartışma	72
5.2. Sonuç	79
6. KAYNAKÇA.....	83
7. ÖZGEÇMİŞ	93



ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1: Apoptoz ve nekrozun karşılaştırması (Coşkun ve Özgür 2011)	30
Çizelge 3.1: Kullanılan cihazlar	38
Çizelge 3.2: Kullanılan kimyasallar	39
Çizelge 3.3: Kullanılan Kitler.....	39
Çizelge 4.1: Koyun granüloza hücrelerinde akış sitometrisi analiz sonuçları.....	57
Çizelge 4.2: Koyun granüloza hücrelerinde MTT analiz sonuçları.....	57
Çizelge 4.3: Koyun kıkırdak hücrelerinde akış sitometrisi analiz sonuçları	58
Çizelge 4.4: Koyun kıkırdak hücrelerinde MTT analiz sonuçları	59
Çizelge 4.5: Sığır granüloza hücrelerinde akış sitometrisi analiz sonuçları.....	60
Çizelge 4.6: Sığır granüloza hücrelerinde MTT analiz sonuçları.....	60
Çizelge 4.7: Sığır kıkırdak hücrelerinde akış sitometrisi analiz sonuçları	61
Çizelge 4.8: Sığır kıkırdak hücrelerinde MTT analiz sonuçları	61
Çizelge 4.9: Karton kutuda dondurulan koyun granüloza hücrelerinin akış sitometrisi analiz sonuçları.....	62
Çizelge 4.10: Karton kutuda dondurulan koyun granüloza hücrelerinin MTT analiz sonuçları	62
Çizelge 4.11: Karton kutuda dondurulan sığır granüloza hücrelerinin akış sitometrisi analiz sonuçları.....	63
Çizelge 4.12: Karton kutuda dondurulansığır granüloza hücrelerinin MTT analizi sonuçları.....	63
Çizelge 4.13: Köpük kutuda dondurulan koyun granüloza hücrelerinin akış sitometrisi analiz sonuçları.....	64
Çizelge 4.14: Köpük kutuda dondurulan koyun granüloza hücrelerinin MTT analiz sonuçları	65
Çizelge 4.15: Köpük kutuda dondurulan sığır granüloza hücrelerinin akış sitometrisi analiz sonuçları.....	65
Çizelge 4.16: Köpük kutuda dondurulan sığır granüloza hücrelerinin MTT analiz sonuçları	66
Çizelge 4.17: Koyun granüloza hücreleri ısı değişikliği deney grubu akış sitometrisi analiz sonuçları.....	67
Çizelge 4.18: Koyun granüloza hücreleri ışık değişikliği deney grubu MTT analiz sonuçları.....	67
Çizelge 4.19: Sığır granüloza hücreleri ısı değişikliği deney grubu akış sitometrisi analiz sonuçları.....	68
Çizelge 4.20: Sığır granüloza hücreleri ışık değişikliği deney grubu MTT analiz sonuçları.....	68
Çizelge 4.21: Koyun granüloza hücrelerinde Mr. Frosty, Kutu ve Köpük koruyucu kutularında akış sitometrisi analiz sonuçları.....	69
Çizelge 4.22: Koyun granüloza hücrelerinde Mr. Frosty, Kutu ve Köpük koruyucu kutularında MTT analiz sonuçları.....	69
Çizelge 4.23: Sığır granüloza hücrelerinde Mr. Frosty, Kutu ve Köpük koruyucu kutularında akış sitometrisi analiz sonuçları.....	70
Çizelge 4.24: Sığır granüloza hücrelerinde hücrelerinde Mr. Frosty, Kutu ve Köpük koruyucu kutularında MTT analiz sonuçları	71

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1: DMEM-F12 süzme ile sterilizasyonu	5
Şekil 2.2: DMEM-F12 pH ölçümü	7
Şekil 2.3: Laminar akımlı kabin (Class B)	8
Şekil 2.4: CO2 inkübatörü	8
Şekil 2.5: İnverted mikroskop	9
Şekil 2.6: Isıtıcı tabla	9
Şekil 2.7: Vakum pompası	9
Şekil 2.8: Santrifüj	10
Şekil 2.9: Su banyosu	10
Şekil 2.10: Otoklav	11
Şekil 2.11: -80°C derin dondurucu dolap	11
Şekil 2.12: Toz DMEM tartımı	12
Şekil 2.13: Besiyerinin karıştırılması	12
Şekil 2.14: Besiyeri pH ölçümü	12
Şekil 2.15: Dondurma tüpü ve Mr. Frosty	21
Şekil 2.16: Polistren köpük dondurma kutuları	21
Şekil 2.17: Köpük dondurma tüpü ve karton kutu	22
Şekil 2.18: Hücre döngüsünün şematik gösterimi (Anonim 2017b)	24
Şekil 2.19: Trypan blue ile ölü ve canlı hücrelerin ayrımı	25
Şekil 2.20: Apoptoz olaylarının şematik gösterimi (Gültekin ve ark. 2008)	27
Şekil 2.21: Apoptoz ve nekroz şematik gösterimi (Yalçın 2014)	29
Şekil 2.22: Sıvı sistemde hücrelerin tek tek lazerden geçişi (Güner 2018)	32
Şekil 2.23: Akış sitometrisi canlılık analiz sonuçlarının değerlendirilmesi	34
Şekil 2.24: Sığır kıkırdak hücrelerinin pozitif kontrol deney grubu	36
Şekil 3.1: Laboratuvara getirilen doku örnekleri	41
Şekil 3.2: Dokuların küçük parçalara ayrılması, petrilerin inkübatörde bekletilmesi	42
Şekil 3.3: Primer kültürde üreme gösteren sığır kıkırdak hücreleri	43
Şekil 3.4: Primer kültürde üreme gösteren koyun koyun kıkırdak hücreleri	43
Şekil 3.5: Sığır ve koyun kıkırdak doku parçasından üreme gösteren hücreler (ekimin 20. günü)	44
Şekil 3.6: Ovaryumdan granüloza hücre izolasyonu	44
Şekil 3.7: Ovaryumdan elde edilen sığır ve koyun granüloza hücreleri (ekimin 3. günü)	45
Şekil 3.8: Ovaryumdan elde edilen sığır ve koyun granüloza hücreleri (ekimin 5. günü)	45
Şekil 3.9: Mr. Frosty içerisinde hücrelerin dondurulması	47
Şekil 3.10: Karton kutu içerisinde hücrelerin dondurulması	47
Şekil 3.11: Köpük kutu içerisinde hücrelerin dondurulması.	47
Şekil 3.12: Hücrelerin Tripan Mavisi ve Thoma Lamı ile mikroskop altında sayımın yapılması	49
Şekil 3.13: Thoma Lamı görüntüsü (Dursun ve Ayturan 2017)	49
Şekil 3.14: Hücre sayım görüntüsü; A:Canlı hücre, B:Ölü hücre	50
Şekil 3.15: Karanlık ortam için alüminyum folyo ile sarılmış petri kabı	51
Şekil 3.16: ELISA cihazında renkleri değişen hücrelerin okutulması	51

Şekil 3.17: Santrifüj edilen hücreler (1000 rpm, 5 dakika)	52
Şekil 3.18: Santrifüj tüplerinin alüminyum folyo ile sarılması	53
Şekil 3.19: Saklama sırasında ısı değişikliği deney grubuna ait sığır kıkırdak hücresi akış sitometrisi analiz sonucu örneği	54
Şekil 3.20: DMSO ve gliserol karşılaştırması deney grubuna (Mr. Frosty) ait koyun granüloza hücresi akış sitometrisi analiz sonucu örneği.....	55
Şekil 3.21: Saklama sırasında ısı değişikliği deney grubuna ait sığır granüloza hücresi akış sitometrisi analiz sonucu örneği	55



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μl	: Mikrolitre
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
ATP	: Adenozin Trifosfat
B ₁₂	: Kobalamin (Asit)
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
CASPASE	: Programlı Hücre Ölümünü Başlatan Enzim
C°	: Santigrad Derece
CO ₂	: Karbondioksit
DMEM-F12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium-Besiyeri
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	: Gıda Tarım Örgütü
FBS	: Fetal Sığır Serum
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat
H ⁺	: Hidrojen İyonu
HCl	: Hidroklorik Asit
HEPA	: High Efficiency Particulate Arresting (Yüksek Etkinlikte Partikül Yakalayıcı)
HES	: Hidroksietil Starch
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
IC ₅₀	: %50 İnhibitör Konsantrasyonu
KCl	: Potasyum Klorür
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
ml	: Mililitre
ml	: Mililitre

mm	: Milimetre
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide analizi
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
O ₂	: Oksijen
OH ⁻	: Hidroksit
PH	: Power of Hydrogen
PI	: Propidyum İyodür
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Roter Per Minute (Bir dakakikadaki rotor devir sayısı)
SPSS	: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı
TAGEM	: Tarımsal Araştırma Genel Müdürlüğü
TNF	: Tümör Nekrozu Faktörü
UV	: Ultraviyole Işın

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yetişmemi sağlayan, bilgi birikimi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen, kendisini daima idol olarak gördüğüm değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Sezen ARAT'a teşekkürü borç bilir ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmam boyunca istatistiksel analiz hesaplarında yardımlarını hiç esirgemeyen, bir yerde hayata bakış açımı değiştiren, değerli hocam Prof. Dr. Eser Kemal GÜRCAN'a yardımları ve muhabbetleri ile geleceğe karşı yol gösterimi için sonsuz teşekkür ederim.

Her türlü küçük teknik aksaklıkta bile hemen yardıma koşan hocam Araş. Gör. Eyüp Erdem TEYKİN'e, eğitimim süresinde yetişmemi sağlayan tüm Tarımsal Biyoteknolojisi bölüm hocalarıma, desteğini daima hissettiğim, en karamsar olduğumda bile bakış açımı değiştirebilen, tezimi bir an önce yazmam için beni sürekli tetikleyen ve yazıp bitirmemde etkisinin büyük olduğu ve her konuda hiçbir yardımını esirgemeyen Semih YELGİN'e daima yanımda olan ve onu tanıdıktan sonra hayatımda çok güzel şeylerin gerçekleştiği bazen abla bazen de küçük kız kardeş gibi olan Çiğdem GÜLMEZ'e, yukarıda ismi geçen geçmeyen üzerimde emeği olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

En önemlisi bana daima sabretmeyi öğreten ve sabretmemi sağlayan, zayıf anlarımda beni her türlü destekleyip yüreklendiren, yüksak lisansa başlama kararım ve kendime inancım yokken bana inanıp beni yönlendiren, çok sevdiğim dünyanın en anlayışlı ailesi babam Mehmet SERTER'e, annem Nazmiye SERTER'e, kardeşim Hüseyin SERTER'e sonsuz teşekkürler ediyorum.

Ezgi SERTER

Mayıs, 2019

1.GİRİŞ

Hücre kültürleri sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik çalışmalarda, çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, aşı üretimi, kanser araştırmaları, toksikoloji denemeleri, kök hücre araştırmaları ve rejeneratif tedavi, farmasötik proteinlerin üretimi gibi birçok alan ve konuda faydalanılan temel biyolojik materyal olmuştur. Hücrelerin asıl potansiyeli onların geriye programlanabilme kapasitelerinin ortaya çıkmasından sonra çok daha iyi anlaşılmış ve bu bilgiler hücre çalışmalarına büyük bir ivme katmıştır. Hücrelerin klonlama amacıyla ilk başarılı kullanımının ardından (Wilmot ve ark. 1997), sığır (Cibelli ve ark. 1998, Vignon ve ark. 1998, Kato ve ark. 2000), fare (Wakayama ve ark. 1998), keçi (Baguisi ve ark. 1999), domuz (Onishi ve ark. 2000, Polejaeva ve ark. 2000), tavşan (Chesne' ve ark. 2002), kedi (Shin ve ark. 2002), sıçan (Zhou ve ark. 2003), at (Galli ve ark. 2003), katır (Woods ve ark. 2003), köpek (Lee ve ark. 2005), gelincik (Li ve ark. 2006), manda (Shi ve ark. 2007) deve (Wani ve ark. 2010) ve en son olarak da maymun (Liu ve ark. 2018) olmak üzere birçok memeli türü fetal veya erişkin somatik hücre kullanılarak klonlanmıştır. Farklılaştırılmış somatik hücre çekirdeklerini embriyonik veya germinal hücre soylarına yeniden programlama yeteneği, yaklaşık on yıl önce somatik genomların depolanması konusundaki orijinal ilgiyi tetiklemiştir (Mastromonaco ve ark. 2014). Ben-Nun ve ark. (2011) bir maymunun somatik hücresinden elde ettikleri indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden (iPSCs) embriyonik yapılar üretebildiler ve yakın zamanda nesli tükenmiş beyaz gergedanın fibroblastından da benzer kök hücreler üretildi. Bu hücrelerin istenen hücre tipine programlanabilmesi ile ilgili mevcut veriler bu gün olmasa bile gelecekte mümkün olabilecek uygulamaları garanti altına alabilmek için önceden bu biyolojik materyallerin saklanması gerekliliğini göstermektedir. Bu nedenle hücre kültürleri hayvanların gen kaynaklarının zarar görmeden uzun yıllar korunabilmesi, gen bankalarının kurulabilmesi ve hatta kaybolan türlerin klonlama veya geliştirilen daha yeni teknolojiler ile geri getirilebilmesi bakımından oldukça önem taşımaktadır (Leon-Quinto ve ark. 2009, Arat ve ark. 2011, Comizzoli 2017).

Dondurulmuş biyolojik materyallerin saklandığı gen bankaları (kriyo-bank, biyobankalar) gen kaynaklarının korunması için oluşturulan programların temel öğelerinden birini oluşturur. Birçok tür üzerine başarıyla sonuçlanan klonlama çalışmalarından sonra, somatik hücre nükleer transferi de tehlike altındaki memeliler için koruma programlarının ayrılmaz bir parçası olarak önerilmiştir (Wildt ve Wemmer 1999, Ryder 2002, Andrabi ve Maxwell 2007, Arat ve ark. 2011, Selokar ve ark. 2018). Klonlamanın nesli tükenmekte olan sığır ırklarının kurtarılmasında nasıl yardımda bulunacağına dair mükemmel bir örnek yıllar

önce bildirilmiştir (Wells ve ark. 1998). Bu nedenle, koruma programlarının bir parçası olan kriyobankaların sadece gamet ve embriyo bulundurmak yerine, somatik hücrelerinde (vücut hücresi) depolandığı yerler olması gerektiği vurgulanmaktadır (Leon-Quinto ve ark. 2009). Arat ve ark. (2011), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından hazırlanan Hayvan Genetik Kaynakları için ilk Küresel Eylem Planı (FAO 2007) ve gen kaynakları koruma klavuzu (FAO 2012) çerçevesinde önerildiği gibi hücre stoklarını da içeren hayvan gen kaynakları bankasının (<http://www.turkhyagen.gov.tr/>) Türkiye’de kurulmakta olduğunu ve bu bankada saklanan dondurulmuş materyaller ile ilk Boz ırk klon sığırlarını ürettiklerini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Hindistan’da kurulan somatik hücre bankasındaki dondurulmuş hücreler kullanılarak manda klonlanmıştır (Selokar ve ark. 2018).

Canlı organizmaların kriyoprezervasyonu (dondurarak koruma), hücre veya dokuların zarar görmeden uzun yıllar boyunca korunabilmesini amaçlar. Kriyobiyojoloji ismi; Yunanca anlamda kryos (buz), bios (hayat) ve aynı zamanda logos (bilim) gibi kelimelerden türetilmiş hücre ve dokuları dondurulmasını inceleyen bir bilim dalıdır. Kriyobiyojoloji düşük sıcaklığın organizmalar üzerindeki etkisini araştıran, dondurulup ve daha sonra çözündürülen tüm hücrelerin işlevsel özelliklerinin daha iyi bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olan bir bilimdir (Hoshino ve ark. 2009, Stolzin ve ark. 2012, Caputcu 2013).

Hücre dondurmanın amacı, ilerleyen dönemlerde ihtiyaç duyulabilecek hücrelerin saklanabilmesi için dondurulmuş hücre stoklarının oluşturulmasıdır (Heyligers ve Klein-Nulend 2005, Cui ve ark. 2007, Loi ve ark. 2008). Canlı hücrelerin dondurularak uzun yıllar saklanabilmesi ve gerekli olduğu durumlarda çözündürülerek hayata döndürülebilmesi, bilim dünyasını ilgilendiren en önemli konulardan biridir. Uygulanmakta olan tüm dondurma yöntemlerindeki temel prensip, donma ve çözünme sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşmasının önüne geçilmesini sağlayarak, hücrelerin buz kristallerinden zarar görmelerinin önüne geçmektir (Gage 1979). Hücrelerde oluşabilecek bu zararların önlenmesi için hücre içi sıvının, hücre duvarından geçebilen ve hücrelere olabildiğince zararsız olan kriyoprotektan (donmadan koruyan) maddeler ile yer değiştirmesi hedeflenmektedir (Cetinkaya ve Arat 2011, Stolzin ve ark. 2012). Kriyoprotektanlar, sistemdeki tüm çözünen maddelerin toplam konsantrasyonunu artırarak, herhangi bir sıcaklıkta oluşan buz miktarını azaltır. Gliserol, dimetil sülfoksit (DMSO), etandiol ve propandiyol gibi birçok bileşik bu özelliklere sahiptir (Adams 2007). Hücre içine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlar (glukoz, fruktoz, sorbitol, mannitol, sükröz, trehaloz vb. şekerler, albumin, serum gibi protein kaynakları) donmadan önce hücreleri dehidre ederek hücre içi buz kristalleri oluşumunu

azaltırlar, buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız hale getirirler veya hücre membranını korurlar (Adams 2007, Morris 2007). Hücre kültürlerinin dondurulmasında en çok kullanılan kriyoprotektanın DMSO ve gliserol olduğu ancak hücre içine daha iyi nüfuz etmesinden dolayı daha başarılı olan DMSO'nun tercih edildiği belirtilmektedir (Freshney 2005).

Çoğu hücre hatlarının -1 ila -5°C/dk ısı düşmesi ile yavaş dondurulması ve hızlı çözülmesi gerektiği bildirilmektedir. Soğutma hızı, hücre içi suyun kaçması için zaman sağlamak üzere optimize edilir ve böylece daha sonra oluşacak hücre içi buzun miktarı azaltılır (Morris 2007). Bu nedenle kriyoprotektanlar kadar dondurma hızı da kritiktir. Hücrelerin belirtildiği ısı aralığında yavaş dondurulmasını sağlayan kontrollü dondurma cihazlarının yanı sıra, bu iş için daha ekonomik ve pratik sistemler olarak kalın karton veya polistren kutular veya içinde alkol bulunan polistren dondurma kutuları (Mr. Frosty) istenen yavaş ısı düşüşünü sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak büyüklükler ve membran geçirgenliği hücreler arasında farklılık gösterdiği için seçilecek kriyoprotektan da dahil olmak üzere tüm kritik basamakların hücre tipine göre optimize edilmesi canlı hücre oranını olumlu etkiler.

Hücreler dondurulduktan sonra -80°C derin dondurucu içerisinde 6 ay ila 1 yıl arasında saklanabilir. Hücrelerin bu derecede sağlıklı bir şekilde saklanabilmesi için ısı derecesinde çok büyük değişiklikler istenmez. Ancak farklı sebeplerden dolayı oluşabilecek (elektrik kesintisi, dolap arızası, kapağın uzun süre açık bırakılması vb.) ısı değişiklikleri hücrelerin canlılığını olumsuz etkiler ve bazen meydana gelen bu sorun ancak hücre çözdürüldüğünde fark edilir.

Sunulan bu tez çalışmasında farklı dozlardaki kriyoprotektanlar ile hazırlanmış dondurma solüsyonlarının, yavaş dondurmaya sağlamak için kullanılan farklı kutuların ve saklama sırasında oluşabilecek ısı değişikliklerinin koyun ve sığır hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri akış sitometrisi ve MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) analizleri ile araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Hücre Kültürü ve Solüsyonlar

Hücre kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar 1900'li yıllardan başlayarak günümüze kadar gelmektedir. Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar ortamında kontrollü bir şekilde üretilmesi, yetiştirilebilmesi sürecini kapsamaktadır. Yapışan hücre kültürü ve süspanse hücre kültürü olarak iki farklı hücre kültür tipi mevcuttur. Yapışan hücre kültüründe hücreler içinde bulundukları kültür petri kaplarının yüzeylerine yapışma eğilimi gösterip tek tabaka halinde çoğalırken, süspanse hücre kültüründe hücreler, besiyeri içerisinde serbest halde bulunurlar ve kültür petri kaplarının yüzeyine yapışma özelliği göstermezler. Hücre kültüründe çalışma ortamının steril olması gerekmekte ve tüm çalışmalar laminar akımlı kabin içerisinde gerçekleştirilmektedir. Uygulamalar esnasında kullanılacak olan solüsyonların soğuk olmaması gerekir ve bunun için de uygulama öncesinde su banyosunda (37°C) bekletilmektedir. Hücrelerin, laboratuvar ortamında sağlıklı bir şekilde yaşamlarını devam ettirip çoğalabilmeleri için uygun pH, sıcaklık ve nemin sağlanabilmesi gerekmektedir. İn vitro hücre kültüründe en önemli avantaj sıcaklık, osmotik basınç, pH, O₂ ve CO₂ yoğunluğu gibi faktörlerin kültür ortamında kontrolünün başarılı bir şekilde sağlanıp, sabit tutulabilmesidir. Hücre kültüründe gerekli olan birçok fizyolojik koşulların gereksinimleri besiyerlerinden karşılanır (Arat ve ark. 2008, Deveci 2012, Koçaklı ve ark. 2015).

Besiyerleri, hücrelerin metabolik aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gerekli olan şartları sağlayan besleyici solüsyonlardır. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranışlar sergileyebilir, bu hücre tipine göre değişiklik gösterir ve hücrenin ihtiyaç duyduğu besin gereksinimleri hücre tiplerine göre farklılık göstermektedir. Hormonlar, serum veya aminoasit gibi farklı maddelerin, hücre tipi ihtiyacına göre gerekli miktarda kültür ortamına eklenmesi önemlidir (Harrison 1907).

İlk besiyeri 1955 yılında Eagle'ın Temel Besiyeri (Eagle's Minimal Essential Medium, EMEM) olarak karşımıza çıkmakta ve sığır, insan veya embriyo özütleri ile desteklenmiş ilk ticari besiyeri olarak bilinmektedir (Pombinho ve ark. 2004). İçeriğinde ise aminoasitler, glukoz, vitaminler (folik asit, nikotinamid, B₁₂, riboflavin), tuzlar (KCl, CaCl₂, MgSO₄, monosodyum fosfat ve NaCl) gibi faktörleri barındıran bir solüsyondur. Bu besiyeri Dulbecco tarafından değişikliğe uğratılmış ve içerik olarak orijinal formundan tam dört kat daha fazla vitamin, aminoasit ve aynı zamanda iki kat daha fazla glukoz ile

zenginleştirilmiştir. Tüm bunların yanısıra içeriğinde demir ve fenol kırmızısı barındırmaktadır. Fare, sığır, koyun, hamster, insan, maymun, sıçan gibi çok fazla hücre tiplerinde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanılmaktadır (Pombinho ve ark. 2004).

Besiyeri hazırlandıktan sonra süzme işlemi (Şekil 2.1) ile steril edilir ve kullanıma hazır hale gelmesi için içerisine serum ve antibiyotiğin eklenmesi gerekmektedir.



Şekil 2.1: DMEM-F12 süzme ile sterilizasyonu

Serum, hücrelerin büyüme ve çoğalmasını tetikleyen büyüme faktörleri, mineral, lipid ve hormonları bünyesinde barındırmaktadır. Ayrıca serum içerisinde bulunan matriks proteinleri ile hücrelerin yüzeye yapışmasını sağlamaktadır. Rutin çalışmalarda en fazla FBS (Fetal Bovine Serum) kullanılmaktadır. Hücre çeşidi ve uygulama alanına göre besiyerine eklenen serum oranı değişiklik gösterebilir. Standart bir somatik hücre kültüründe tercih edilen bu oran %10'dur. Farklı serum tipleri olarak; yetişkin sığır serumu, dana, insan ve at serumları sıralanabilir ve bu serumlar daha çok özel koşullara gereksinim duyan hücrelerde kullanılmaktadır (Jochems ve ark. 2002, Yaylalı 2007).

Antibiyotik ise, kültür ortamında karşımıza çıkabilecek herhangi bir kontaminasyon durumunu engellemek amacıyla kullanılır. Kontaminasyon, kültür ortamında istenmeyen bakteri ve mantarların bulunması halinde, hücre gelişimini ve çoğalmasını oldukça yavaşlatan ve çalışma verimliliğini yok eden olumsuz bir durumdur. Bunun önüne geçmek için steril çalışma ortamı oluşturulur ve tüm çalışmalar laminar akımlı kabin içerisinde

gerçekleştirilir. Besiyeri içerisine de standart somatik hücre kültüründe %1 oranında antibiyotik (10,000 U/ml penicillin G, 10,000 mg/ml streptomycin) eklenmektedir (Arat 2011, 2013).

Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre içi ve dışındaki osmotik basıncın dengede tutulabilmesini sağlayan bir tuz solüsyonudur. Bünyesinde çoğunlukla potasyum, sodyum, magnezyum, kalsiyum ve klor barındırmaktadır ve hücre metabolizmasını desteklemektedir. Bu çözelti hücreleri veya dokuları yıkamak için kullanılmak ile birlikte fizyolojik pH'ın ve aynı zamanda osmotik basıncın sağlanmasına yardımcı olmaktadır. Böylece hücreler için gerekli olan uygun ortamın sağlanmasına yardımcı olurken aynı zamanda tripsinin performansını arttırabilmek için, tripsin ekleme işleminden önce hücrelerin bulunduğu petri kabının yıkanmasında kullanılarak serum içeren kültür medyumunun tamamen uzaklaştırılmasını sağlar. Serum içerisinde tripsin inhibitörlerinin bulunması sebebiyle bu basamak pasajlama işlemi sırasında oldukça önemlidir (Jakoby ve Pastan 1979).

Trypsin, hücre pasajlamaları sırasında kullanılan bir serin proteaz tipi enzimdir. Pasajlama işlemleri sırasında hücrelerin yapışmış olduğu yüzeyden kalkmasını sağlar ve sıcaklık yardımı ile etkisini en yüksek seviyede göstermektedir. Trypsinin keşfedilmesinden önce hücrelerin yüzeyden kaldırılması için mekanik yöntemler uygulanmış ve 1950 yılında tripsinin keşfedilmesi ile birlikte, hücre pasajlama çalışmalarında en fazla kullanılan enzim haline gelmiştir (Freshney 2005). Hücrelerin yüzeyden ayrılma, kalkma hızı besiyerindeki serum oranına, hücre tipine, petri içerisindeki hücre yoğunluğuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir ve uygulanan tripsin hacminin en az iki katı kadar serum içeren besiyeri uygulanarak tripsinin inhibe edilmesi gereklidir. Aksi takdirde tripsin etkisi devam ettiği için zamanla hücre membranına zarar vermeye başlayacaktır (Arat ve ark. 2008).

Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin canlı vücudu dışında yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan koşulların (pH, sıcaklık, CO₂ ve O₂) sağlanmış olması gerekmektedir. Ph 7.2 ve 7.4 aralığı birçok hücre için en iyi gelişim aralığıdır (Şekil 2.2). Fakat çalışmanın öncesinde kullanılacak olan örneğe göre uygun pH'ın belirlenmesi ayrıca önem taşımaktadır. Kültür ortamında yer alan hidrojen iyonunun konsantrasyonunda oluşabilecek herhangi bir değişiklik hücrelerin çoğalmasını olumsuz olarak etkilemektedir (Butler ve Christie 1994).



Şekil 2.2: DMEM-F12 pH ölçümü

Kültür ortamının sıcaklığı, hücrelerin alındığı canlının vücut ısıyla belirlenmektedir. Sıcakkanlı canlılardan vücut ısısı değişmekle birlikte birçok türün hücreleri için 37°C uygun ısı olarak kabul edilmektedir. Düşük sıcaklıkta ise CO₂ çözünürlüğünün artmasına sebep olmakta ve bu durum da pH değişikliğini gerçekleştirmektedir. Bu değişiklikler ise hücre çoğalması üzerine olumsuz etki yaratmaktadır (Koçaklı ve ark. 2015).

Hücre kültüründeki istenilen değerdeki pH'nın (7.2-7.4) sabit bir değerde tutulması için CO₂'ye ihtiyaç duyulur. Bu sebeple hücreler, hücre tipine göre değişiklik göstermek ile birlikte %2-5 oranlarında CO₂ bulunan ortamda, inkübatör içerisinde kültüre edilmektedir. Kültür hücreleri oksijene tam bağımlı hücreler değildirler fakat bu durum hücre tipine göre değişiklik gösterebilir. Birçok hücre için düşük oksijen basıncı veya atmosfer basıncı yeterli olurken, geç dönem embriyoları için oksijen bakımından zengin ortam koşulları gerekmektedir (Laken ve Leonard 2001, Baicu ve Taylor 2002).

2.2. Hücre Kültürü Laboratuvarında Gereken Cihazlar

2.2.1. Laminar akımlı kabin

Kabinler HEPA (high efficiency particible) filtre sayesinde havada bulunan partiküllerin uzaklaştırılmasını sağlarlar ve böylece steril bir çalışma ortamı oluşturmaktadırlar. Kabinler özelliklerine ve koruyuculuklarına göre sınıflandırılmışlardır. İlk olarak horizontal (Class C) kabinler ortamın steril olmasını sağlarlar, çalışmayı yapan kişiyi korumazlar ve daha çok bitki doku kültürü laboratuvarlarında kullanılırlar. Bir diğer kabin çeşidi olan (Class B) vertikal kabinlerdir (Şekil 2.3). Bu kabinler steril edilen havanın çalışan kişinin ön kısmından aşağı doğru (şelale akar gibi) akıtılmasını sağlayarak iç ortam ve dış

ortamın birbirine karışmasını önlemekte ve çalışmayı yapan kişiyi korumaktadır. Daha çok bu kabinler hücre kültürü çalışmalarında ve zararlı organizmalar ile çalışıldığı durumlarda tercih edilmektedirler. Bu iki kabinden farklı olarak Class A türü kabinler özel odalarda yüksek kontaminasyon riski bulunan çalışmaların gerçekleştirilmesinde tercih edilmektedir, tamamen kapalı olarak uzaktan kumanda yardımı ile çalışmaların sürdürülebildiği kabinlerdir (Oktar 2009).



Şekil 2.3: Laminar akımlı kabin (Class B)

2.2.2 CO₂ inkibatörü



Şekil 2.4: CO₂ inkibatörü

Hücre kültürü işlemleri esnasında hücrelerin çoğalabilmesi için uygun sıcaklık aralığında bekletilmesi gerekmektedir. Hücrelerin çoğalması aynı zamanda %5-10 CO₂'li ortamda gerçekleşir ve genellikle 37°C uygun sıcaklık değeri olarak belirtilmektedir. Ortam neminin sağlanabilmesi için de inkübatörün alt kısmında bulunan su kabının daima dolu olmasına dikkat edilmelidir. İnkübatör kapağının fazla açık tutulmaması gerekir aksi takdirde ortamda nem ve sıcaklık kaybı oluşur ve kontaminasyon riski artar ki buda istenmeyen bir faktördür. Cihaz içi sterilizasyonu yüksek ısı veya uv ışın aracılığı ile yapılmaktadır (Oktar 2009).

2.2.3. Mikroskop



Hücre kültürü çalışmalarında daha çok inverted (ters) mikroskop kullanılmaktadır. Hücrelerin büyüme ve çoğalma durumları, morfolojik özellikleri, hücre sayımlar aynı zamanda herhangi bir kontaminasyon durumunun olup olmadığı incelenir. İnvertmikroskop objektifleri altta olması sebebiyle geniş bir çalışma mesefesi yaratarak petri kaplarındaki kültürlerin incelenmesine olanak sağlar.

Şekil 2.5: Inverted mikroskop

2.2.4. Isıtıcı tabla



Petri kapları içerisinde kültürü devam eden hücreler inkübatör içinde (37°C) bekletilir. Bu hücreler mikroskopta incelenmek istenildiği takdirde sıcaklık farkı olmaması ve hücrelerin ihtiyaç duyduğu ısının sağlanabilmesi için ısıtıcı tabla üzerine alınır ve petri kapları mikroskopta incelenebilir. Bu cihazın sıcaklık değeri ayarlanabilmektedir.

Şekil 2.6: Isıtıcı tabla

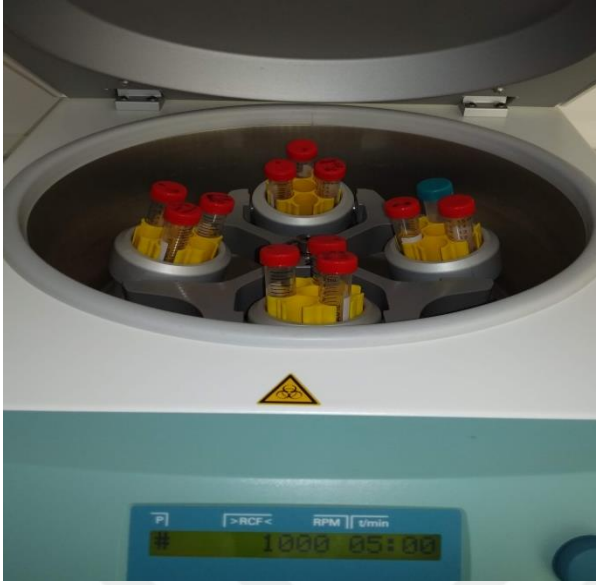
2.2.5. Vakum pompası



Vakum pompası işlemler sırasında ortamdan uzaklaştırılmak istenen sıvıların atılmasını sağlar. Vakum pompasının hortumunun ucuna pastör pipet takılır ve sıvı bu pipet yardımıyla çekilerek ortamdan uzaklaştırılır.

Şekil 2.7: Vakum pompası

2.2.6. Santrifüj



Ağırlıkları birbirinden farklı olan maddelerin (solüsyonlar, kan gibi) yerçekimi yardımı ile birlikte deney tüplerini çok hızlı devirlerde dönmesini sağlayarak solüsyonun ayrışmasını sağlar. Bu cihazı kullanırken dikkat edilmesi gereken faktör, tüplerinin içindeki sıvı miktarının eşit olmasıdır ve dengenin sağlanması için tüpler karşılıklı dizilmelidir. Hücre kültürü çalışmalarından santrifüj genellikle 1000 rpm devirde 5 dakika süre ile çalıştırılır (Bozkaya 2016).

Şekil 2.8: Santrifüj

2.2.7. Su banyosu



Laboratuvar çalışmalarında solüsyonlar +4°C'de muhafaza edilir. Hücre kültürü işlemlerinde kullanılacak solüsyonlar soğuk olmamalıdır. Bu nedenle solüsyonlar kullanılmadan önce sıcaklığı ayarlanan (37°C) su banyosu içinde bir süre bekletilip daha sonra kullanılır.

Şekil 2.9: Su banyosu

2.2.8. Otoklav



Otoklav, malzemelerin yüksek sıcaklık ve basınç altında buhar ile steril etmeye yarayan bir laboratuvar cihazıdır. Malzemelere özel paketlenme uygulanır ve otoklav içinde bulunan sepete yerleştirilir. Kazanın yan kısımlarından yüksek buhar verilerek bu malzemelerin sterilizasyonu sağlanır. Genelde hücre kültürü malzemelerinin sterilizasyonu 121°C sıcaklıkta ve 20 dakika sürede gerçekleştirilmektedir (Özbaş 2017).

Şekil 2.10: Otoklav

2.2.9. -80°C derin dondurucu



Laboratuvarlarda zarar görmeden düşük ısılarda saklanması gereken materyallerin muhafazasını sağlar. Hücre kültüründe dondurulan hücreler 24 saat boyunca bu cihazın içinde tutulur daha sonra sıvı azota alınır. Fakat sıvı azot yoksa hücrelerin muhafazası da -80°C derin dondurucu dolap içinde gerçekleştirilir.

Şekil 2.11: -80°C derin dondurucu dolap

2.2.10. Hassas terazi



Şekil 2.12: Toz DMEM tartımı

Hassas teraziler laboratuvarların temel cihazlarından biridir. İlaç sanayi, kozmetik gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Hassasiyet dereceleri ise 0.01 mg gibidir ve bu cihazlar 0.01 gram ile 1100 kg aralığında tartım yapabilme özelliğine sahiptir. Hassas terazi hücre kültürü çalışmalarında çeşitli solüsyonların hazırlanmasında kullanılmaktadır (Anonim 2017a).

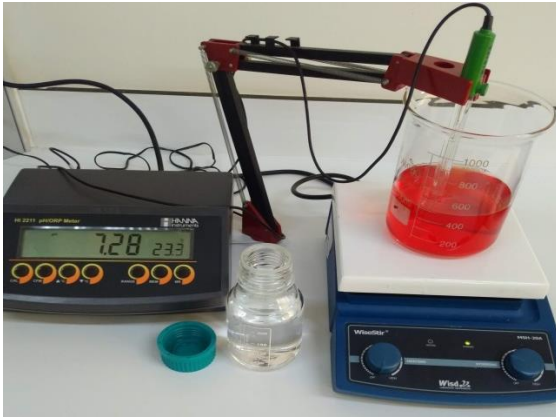
2.2.11. Manyetik karıştırıcı



Şekil 2.13: Besiyerinin karıştırılması

Çözelti hazırlamak için kullanılan bir cihazdır ve çözeltileri mıknatıs yardımı ile homojen olacak bir şekilde karışmasını sağlar. Ayrıca çözeltiyi karıştırırken tablası içinde bulunan ısıtıcılar sayesinde de gerektiği durumlarda çözeltiye ısı da verebilmektedir.

2.2.12. PH metre



Şekil 2.14: Besiyeri pH ölçümü

Sulu çözeltilerdeki H^+ ve OH^- konsantrasyonlarını gösteren bir cihazdır. Eğer bir çözeltide pH değeri 7 den büyük çıkarsa bazik, 7 den küçük çıkarsa asidik ve 7 değerine sahip bulunursa nötral olarak kabul edilmektedir. Hücre kültüründe kullanılacak solüsyonların 7.2-7.4 pH değerine ayarlanması için kullanılır (Anonim 2016).

2.3. Hücre Kültür Çeşitleri

2.3.1. Primer hücre kültürü

Primer (birincil) kültürler, sağlam veya parçalanmış dokulardan veya organ parçalarından elde edilir. Bir kültür genellikle alt kültüre alınana kadar (veya pasaj yapılana kadar) primer kültür olarak kabul edilir ve ilk alt kültür (pasaj) sonrası hücre çizgisi olarak adlandırılır. İlk alt kültürün ürünü ayrıca sekonder (ikincil) kültür bir kültür olarak da adlandırılabilir. Üçüncül kültür terimi neredeyse hiç kullanılmamaktadır (Davis 2011).

Primer kültürde hücrelerin donörden izole edilmesi explant kültür ve enzimatik parçalama olarak iki şekilde gerçekleşmektedir.

Explant kültür; dokulardan alınan parçaların kültür kaplarına küçük parçacıklar halinde kültür petri kaplarına ekiminin yapılması ve zamanla bu parçacıkların etrafında hücrelerin çoğalmaya başlamasıyla sonuçlanan bir yöntemdir. Hücrelerin çoğalmaya başlama süreci birkaç gün alabileceği gibi hücre tipine göre birkaç hafta da alabilmektedir. Enzimatik parçalama işlemi ise doku parçasına tripsin veya kollajenaz gibi enzimlerin eklenmesi ile gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu işlem sonrasında tekli hücrelerden oluşan bir solüsyon elde edilmekte ve bu solüsyonun kültür kabına ekilmesi ile birlikte hücre çoğalması amaçlanmaktadır (Masters 2000, Freshney 2005, Davis 2011).

Primer hücre kültürü yöntemi ile elde edilmiş olan hücreler, izole edildikleri dokunun özelliklerini birebir taşımaktadırlar. Bu hücrelerin belirli bir yaşama süreleri mevcuttur ve heterojen hücre popülasyonu gösterirler. Kontaminasyon riski yüksek olan bir hücre kültür yöntemidir, işlemler sırasında steriliteye fazlasıyla özen gösterilmesi gerekmektedir (Arat ve ark. 2008).

2.3.2. Hücre hattı

Bir hücre hattı, birinci alt kültürdeki bir primer kültürden türetilen bir hücre popülasyonudur. Sonlu (sonlu bir in vitro yaşam ömrüne işaret eden) veya devamlı (varsayılan bir sınırsız üretim potansiyelini gösteren) gibi sıfatlar, yalnızca bunları desteklemek için yeterli veri mevcut olduğunda kullanılır. Hücre hattı terimi, homojenliği ima etmez veya bir kültürün tanımlanma derecesini yansıtmaz (Davis 2011). Sınırlı yaşam süresine sahip hücre hatları türe, hücre soyu farklılıklarına, kültür koşullarına göre değişmekle birlikte genellikle 20 ile 80 popülasyon katlanması kadar çoğalabilirler (Freshney 2005).

Devamlı hücre hatları, diploid hücrelerin transformasyona uğraması ile veya kanserli dokulardan izole edilen hücrelerden elde edilen hücre hatlarıdır. Sınırsız çoğalabilme özelliğine sahip olan bu hücreler aynı zamanda sabit olmayan kromozom sayılarına sahiptir. Bu hücrelerin sonsuz sayıda pasajlarının yapılabilmesi mümkündür (Freshney 2005, Davis 2011).

2.3.3. Hücre soyu

Bu terim, spesifik özellikleri, fonksiyonel karakterleri veya markörlerin ekspresyonu bakımından seçilen karakterize edilmiş bir alt kültür hücre popülasyonunu tarif etmek için kullanılır. Bir hücre soyu tarif edilirken spesifik özellikleri açıklanmalıdır (Davis 2011).

2.4. Gen Bankaları

Kriyoprezervasyon, biyolojik materyalin yıllar boyunca zarar görmeden depolanmasını sağlamaktadır (Mazur 1984). Bu durum ise günümüzde evrende bulunan tüm genetik zenginliğin güvenli bir şekilde uzun yıllar depolanabileceği anlamına gelmektedir.

Nüfusun hızlı bir şekilde artış göstermesi ile birlikte, sanayileşmenin artması küresel ısınma, değişen çevre şartları, besin ihtiyaçlarının artması, bilinçsiz tüketim gibi sebeplere yol açmıştır. Buna bağlı olarak bitki ve hayvan genetik kaynakları fazlasıyla zarar görmeye başlamıştır. Birçok bitki ve hayvan türleri yok olmuş ya da yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Bunların üzerine genetik çeşitliliğin korunabilmesi amacıyla çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. 1992 yılında Birleşmiş Milletler tarafından “Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi” oluşturulmuştur. Üye ülkeler için ise tüm çeşitliliğin ve genetik kaynakların korunması fazlasıyla önemli duruma gelmiştir (Caputcu 2013).

Bilimciler nadir bitki ve hayvan türlerini tekrardan yetiştirmek veya genetik çeşitliliğini artırma amacı güderek gen bankalarındaki örnekleri kullanmaktadırlar. Bu gen bankalarında aynı zamanda özel genlere sahip olan organizmalar ve hücreler korunma altına alınmış vaziyettedir. Bu genlerden daha sonraki zamanlarda, örneğin bitki veya hayvanların yaşamlarını tehdit edecek herhangi bir unsur ile (salgın hastalık gibi) karşı karşıya kalındığında yararlanılmaktadır. Bilimcilerin bu bankalarda yer alan hücre veya dokuları, yeni tür ve ırklar oluşturmak sebebi ile kullandıkları literatürler arasında yer almaktadır. Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agricultural Organization, FAO), Birleşmiş Milletler altında Hayvan Genetik Kaynakları Grubu oluşturmuşlar ve hayvan genetik kaynaklarının kullanımı ve düzenlenmesi ile ilgili stratejiler belirlemişlerdir (FAO 2007, 2012).

İrkların sahip oldukları özel genleri araştırıp korumak ve kaybedilen çeşitliliğin tekrar oluşturulmasını sağlamak, genetik çeşitliliğin azalmasını veya yok olmasının önüne geçebilmek için ülkeler in vivo ya da in vitro gibi yöntemlerle genetik materyallerini koruma altına almaktadır (ERFP 2003). Yerel genetik kaynaklarının korunabilmesinde her ülkenin ulusal koordinatörleri sorumlu tutulmuştur. Svalbard Tohum Deposu milyarlarca bitki tohumuna ev sahipliği yapmakta ve Norveç'in kuzeyindeki bir adanın yeraltında bulunmaktadır. ABD'de bulunan San Diego Enstitüsü'nün Froozen Zoo (Dondurulmuş Hayvanat Bahçesi) projesiyle binlerce hayvanın hücreleri gen bankasında nesillerin tükenebilmesi riskine karşı saklanmaktadır. Yaban hayvanları gen bankası (www.frozenark.org) şu anda 5500 hayvan türüne ait somatik hücre, doku, DNA'yı kapsayan 48.000 örneği dondurulmuş olarak saklayan bir merkezdir ve birçok ülke bu bankanın üyesidir. En yeni katılımcı Yaban Hayatı Alman gen (Cryo-Brehm) bankasıdır (www.emb.fraunhofer.de/en/Uebersichtsindex/cellbank_cryo-brehm.html), ve somatik hücrelerin yanı sıra kök hücreleride saklamaktadır (Comizzoli 2017).

FAO'nun tavsiyesi doğrultusunda somatik hücre bankası ile ilgili çalışmalar başlamış olmakla birlikte evcil hayvanlar için biyobankalarda dondurulmuş üreme hücreleri ve embriyolar daha yaygın olarak tercih edilen materyallerdir (Groeneveld ve ark. 2016). ABD'de nesli tehlike altındaki hayvanların sperm ve embriyoları, Smithsonian ve SVF Biyoçeşitlilik Koruma Projesi adı altında dondurulmuş bir şekilde saklanmaktadır ve ABD Tarım Bakanlığı kapsamında, yaygın ve nesli tehlike altındaki türlere ait yaklaşık olarak bir milyon sperm, kan ve embriyo örnekleri korunma altına alınmış durumdadır. Evcil hayvanların somatik hücrelerinin saklandığı bankalara örnekler; Vietnam'daki (Groeneveld ve ark. 2008), Hindistan'daki (Selokar ve ark. 2018) ve Türkiye'deki (www.turkхайgen.gov.tr) gen (Arat ve ark. 2011) bankalarıdır.

Türkiye'de evcil türlerin genetik materyallerinin saklanabilmesi için TÜBİTAK-TÜRKHAYGEN-I Projesi çerçevesinde oluşturulan iki adet gen bankası mevcuttur. İlki TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nde, ikincisi Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde bulunmaktadır. TÜBİTAK KAMAG 1007 kapsamında 2007 yılında, hazırlanmış olan "Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının İn Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-I (TÜRKHAYGEN-I)" başlıklı proje ile dondurularak saklama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu proje kapsamında 13 koyun ırkı, 5 keçi ırkı, 6 sığır ırkı, Anadolu Mandası ve 5 at ırkı olmak üzere, 5 türe ait toplam 30 ırktan 1500 tane bireyin DNA, embriyo, sperma ve hücre bankaları oluşturulmuştur. Bu bankada yer alan 13 koyun ırkı; Karakaya Koyunu, Herik Koyunu, Gökçeada Koyunu, Karagül Koyunu,

İvesi Koyunu, Dağlıç Koyunu, Çineparı Koyunu, Hemşin Koyunu, Norduz Koyunu ve Sakız Koyunundan oluşmaktadır. Beş keçi ırkı ise Ankara Keçisi, Kilis Keçisi, Kıl Keçisi, Norduz Keçisi'dir. Bankada yer alan 6 sığır ırkı; Boz Sığırı, Yerli Kara Sığırı, Doğu Anadolu Kırmızısı Sığırı, Güney Anadolu Kırmızısı Sığırı, Zavot Sığırı, Yerli Güney Sarısı Sığırı'ndan oluşmaktadır. Gen bankasında yer verilen 5 at ırkı ise Ayvacık Midillisi, Canik, Malakan, Hınısın Kolu Kısası, Çukurova'dır. Ayrıca bu bankada saklanan hücrelerden sağlıklı klonlar da elde edilebilmiş, bu klonlardan doğan yavrularda hiçbir sağlık sorunu olmadığı ve herhangi bir genetik bozukluğun görülmediği belirtilmiştir (Arat ve ark. 2011, Sevim ve ark. 2017, Anonim 2018b).

2.5. Kriyoprezervasyon

Bazı durumlarda yaşamsal faaliyetlerin sınırlandırılabilmesi birçok bilimsel çalışmalar için önem arz etmektedir ve düşük sıcaklıklar ile birlikte bu yaşamsal faaliyetlerin yavaşlatılabilmesi ve hatta durdurulabilmesi mümkündür. Buda bizlere başta genetik materyaller olmak üzere etkili bir saklama olanağı sağlar. Dondurmadaki asıl amaç genetik kaynak çeşitliliğinin korunması ve sürdürülebilmesidir. Somatik hücre bankalarının oluşturulabilmesi ve hücrelerde pasaj sayısının ilerlemesine bağlı olarak gelişen fenotipik değişimlerin önüne geçilebilmesi onların dondurulması ile mümkündür (Arat 2013, Caputcu ve ark. 2013).

Kriyoprezervasyon tekniği ile ilgili ilk fikirler 1776 yılında ortaya çıkmıştır. Spallanzani bir çalışmasında dondurulmuş olan spermilerin çözündürme sonrası biraz da olsa motilitelerini koruyabildiklerini gözlemlemiştir. Montegazza, ilk kez insan sperminin dondurarak saklanabileceği fikrini 1886 yılında ortaya koymuştur. Polge ve ark. 1949 yılında ilk kez gliserol kullanarak insan spermini dondurmaya ve çözündürdükten sonra yüksek canlılık oranı elde etmeyi başarmışlardır. İlerleyen zaman içinde ilk dondurulmuş canlı hücre bankasının 1972 yılında oluşturulduğu bildirilmektedir (Polge ve ark. 1949, Cıncık 2003, Tunalı 2014).

Kriyoprezervasyon tekniğindeki amaç, hücrelerin ve dokuların en az hasarla, fonksiyon kaybına uğramadan uzun süreler boyunca çok düşük sıcaklıklarda muhafaza edilebilmesidir. Ökaryotik canlılara ait olan hücreler ve dokulardaki su içeriği oranının %80'den yüksek olması sebebi ile 0°C'nin altında bulunan sıcaklıklarda buz kristalleri oluşmaktadır (Day ve Stacey 2007). Hücre içerisinde gerçekleşen bu buz kristalleri çözündürme sırasında hücrelere zarar vermektedir (Seki ve Mazur 2011). Kriyoprezervasyon

teknığının başarılı olarak gerçekleştirilebilmesi için önem gösterilmesi gereken bazı noktalar mevcuttur. Donma esnasında suyun hücre içinden dış ortama geçebilmesi, düşük sıcaklıklarda meydana gelebilecek hasar ve soğuktan koruma amaçlı kullanılan kriyoprotektan türü ve dondurulacak olan örneğin fiziksel özelliklerinin yanısıra soğutma hızı da dondurmadaki başarıda önemli rol oynayan etmenlerdendir (Walker ve Repley 2008).

Hücrelerin dondurulması sırasında soğutma hızının herhangi bir termal şoktan meydana gelen hasarlara sebep olmayacak bir şekilde ayarlanması gerekmektedir. Dondurma işlemleri esnasında hücre içi ve hücre dışı gelişen faktörlerin önemi oldukça büyüktür. Sıcaklık, oda sıcaklığından 0°C'ye düştüğünde hücresel metabolizma yavaşlar. Sıcaklık değeri 0°C'den -20°C'ye düştüğünde hücre dışında buz kristallerinin oluşmaya başlar ve besiyerinde çözünmüş madde konsantrasyonunda artış meydana gelir. Hücre içerisindeki su dış ortama geçmeye başlaması sonucu hücrede su kaybı gerçekleşir ve büzüşme başlar. Eğer soğutma oranı yavaş olarak düşerse hücre içerisinde bulunan su osmotik olarak hücreden dış ortama geçer ve hücre büzüşerek dehidre olur. Eğer soğuma hızlı bir şekilde düşerse hücre içerisinde bulunan su dış ortama geçmeden donmaya başlar ve buz kristalleri oluşur. Bu durum ise hücrenin çözündürülme esnasında organellere ve membrana zarar vererek hücrenin ölümüne yol açar. Dondurma işlemleri sonucunda yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilme aralığı birçok bakteri ve prokaryotlarda görülmüştür fakat ökaryotik hücreler için kriyoprotektan maddeler kullanılmadan bu sıcaklık aralığını yakalayabilmek oldukça güçtür (Ryan 2004).

2.6. Kriyoprotektanlar

Hücrelerde -79°C'nin altında bulunan sıcaklıklarda metabolik aktiviteleri yavaşlamakta ve bu sıcaklık değeri -196°C'lere kadar indiğinde ise minimum seviyeye ulaşmaktadır. Hücrelerin donma hızı ile ortamda bulunan tuz konsantrasyonu doğru orantılıdır. Yani hücrenin hızlı dondurulduğu zaman ortamda bulunan tuz konsantrasyonu ani yükseliş göstermektedir. Bu olayın sonrasında osmotik basınçtaki oluşan artış sonucunda hücrelerde büzüşmeler ve takiben ölümler meydana gelmektedir. Aynı zamanda da sıcaklığın hızlı bir şekilde düşmesine bağlı olarak hücre içinde bulunan sıvıda buz kristalleri oluşmakta ve hücre parçalanarak ölmektedir. Kriyoprotektan maddelerin keşfedilmesi ile birlikte hücrelerin donma ve çözündürme işlemleri sonrasında oluşabilecek zararların önüne geçilmiştir. Kriyoprotektanların kullanımı ile birlikte kristalizasyon hızında yavaşlama gerçekleşir, osmotik basınçtaki ani artış engellenir ve ortamda bulunan tuz çözeltisinin düşük

ıslarda da izotonik kalması sağlanmış olur. Kriyoprotektanlar aynı zamanda su moleküllerini bağlayarak su kristalizasyonunu yavaşlatmak ve solütlere eş zamanlı donmayı sağlamak amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir (Kurt 2016, Bağış 2017).

Kriyoprotektan maddeler hücre membranından geçebilme özelliğine göre, hücre membranından geçebilen ve geçemeyen olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Hücre membranından geçebilen yani hücre içine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar, dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol (EG), 1.2 propanediol, 2.3 bütanediol, propilen glikol ve diğer bazı alkoller olarak sıralanabilir. Hücre membranından geçebilen kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahiptirler. Donma sürecinin başlamasından önce hücre içinde bulunan sıvı, kriyoprotektan madde ile yer değiştirir ve bu durum osmotik basınç farkından dolayı gerçekleşir. Böylece hücre hacminde meydana gelen değişiklikler azaltılmış olur hem de hücre içindeki buz kristallerinin oluşumu minimum seviyeye indirilerek hücrenin donma sırasında alabilecek olduğu zarar en aza indirgenmiş olur. Hücre içine girebilen bu maddelerin çoğu yüksek oranda suda çözünbilme yeteneğine ve ısı etkisine sahip olmasından dolayı suyun hidrojen bağlarını kopararak, suyun yapısını değiştirebilirler. Hücre içerisine girebilme yeteneğine sahip olan kriyoprotektanlar intrasellüler buz kristallerinin oluşmasını -40°C'ye kadar düşürmektedirler ve hücreyi solüsyonun toksik faktörlerinden korumaktadırlar. Hücre membranından geçiş yapamayan kriyoprotektanlar, hücre zarını osmotik basınç değişikliğine karşı korurlar ve hücrenin çözündürme işlemleri esnasında aşırı bir şekilde şişmesini önlerler. Aynı zamandan hücre zarından geçemeyen kriyoprotektanlar iki grupta toplanırlar. Bunlardan ilki, glikoz, sükroz, trehaloz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı şekerlerin oluşturduğu düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlardır. İkincisi ise, polivinil alkol; PVA, polivinil pirrolidon; PVP ve diğer bazı polimerlerin oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlardır. Düşük molekül ağırlıklı olan kriyoprotektan grubu, donma süresi sırasında hücreleri soğutmadan önce dehidre ederek hücre içi buz kristallerinin oluşmasını engellemektedirler. Yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar ise buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini değiştirebilirler böylece hücrelerin yine zarar görmesini engellemiş olurlar (Gordon 2003, Sağırkaya ve Bağış 2013, Tunalı 2014, Kurt 2016, Bağış 2017).

Hücre membranından geçiş sağlayamayan yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlara ek olarak albümin, serum, ficoll, antifriz protein (AFP) gibi bazı protein veya protein kaynakları da mevcuttur. Ancak bu proteinlerin penetrasyon özelliği, hücrelerin dondurma işlemleri gerçekleştirildikten sonra çözündürme sırasında dilüsyon şokuna neden olabilmektedir. Bu nedenle tek bir kriyoprotektif ajanın kullanılmasından ziyade birden

fazlasının karışım şeklinde kullanılmasının daha başarılı sonuçlar getireceği belirtilmektedir (Kurt 2016).

Kriyoprotektan maddelerden DMSO ve gliserol daha yaygın kullanılmakta ve DMSO gliserole göre daha çok tercih edilmektedir (Morris 2007). Bunun sebebi ise DMSO'nun gliserole oranla hücre içi penetrasyonun daha iyi olmasıdır ve hücre çözündürüldüğü zaman DMSO da canlılığın daha yüksek oranlarda gözlemlenmesidir. Genel olarak hücre dondurma işlemleri sırasında kriyoprotektanların kullanıldıkları oran %5-15 aralığındadır (Freshney 2005). Kriyoprezervasyon uygulamalarında başarılı sonuçlar vermeleri nedeniyle memeli hücre hatları biyobankalar için oldukça önemli kaynak olmuşlardır (Caputcu 2013).

2.7. Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Hücre dondurma işlemlerinde dikkat edilmesi gereken en önemli sıcaklık aralığı +15°C ile -5°C değerleri arasındadır. Dondurma sürecinde bu sıcaklık değerlerine dikkat edilmediği takdirde buz kristallerinin oluşması söz konusu olabilmektedir. Buz kristalleri oluşumunun hücrelere getirebileceği zararı en aza indirmek için belirtilmiş olan bu sıcaklık değerleri arasında hızlı bir şekilde hareket edilmesinin gerektiği bildirilmiştir (Lieberman 2002). Laboratuvar ortamında dondurulan genetik materyallerin çözündürüldükten sonra canlılıklarını koruyabilme başarısı, dondurulmak istenen genetik materyalin kalitesine, kullanılan malzemelere, tercih edilen yöntem ve kriyoprotektan çeşidine, son olarak da yöntemi uygulayan kişinin becerisine bağlıdır. Tüm dondurma işlemleri boyunca sterilitenin sağlanabilmesi de başarıda ayrıca önem sağlamaktadır. Kriyoprezervasyonun gerçekleştirilebilmesi için yavaş dondurma (slow-freezing), hızlı dondurma (rapid-freezing), ve vitrifikasyon (vitrification) olmak üzere üç farklı yöntem mevcuttur (Bağış 2017).

2.7.1. Yavaş dondurma (slow-freezing)

Yavaş dondurma tekniği ile birçok somatik hücre hattı, yetişkin ve embriyonik kök hücreler, umbilikal kord, eritrosit, lökosit ve implantasyon öncesi embriyolar olmak üzere birçok hücrenin dondurulması başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Seki ve Mazur 2009).

Kriyoprotektan maddeler sayesinde yavaş dondurma yöntemi ile birlikte dondurmadan kaynaklanan zarar azaltılabilmekte veya önlenebilmektedir. Hücreleri dondurmak için kullanılan soğutma hızı, hücrelerin dehidre kalmasına izin verecek kadar yavaş olmalı, fakat aşırı dehidrasyon hasarını önleyecek kadar hızlı olmalıdır. Bu yöntemde kullanılan ve hücre

içine girebilen küçük molekül ağırlıklı kriyoprotektan maddeler donma ve çözülme esnasında hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engeller ve böylece hücre yapısı korunur (Bağış 2017).

Kontrollü soğutmanın sağlanabilmesi için çeşitli yollar mevcuttur. Çoğu kültür hücrelerinin dondurulmasında ısı düşmesi dakikada 1-5°C olacak şekilde gerçekleştiriliyorsa yüksek oranda başarı sağlandığı literatürler arasında yer almaktadır. Daha büyük hücreler veya daha az geçirgen zarlara sahip olan hücreler, dehidrasyonları daha uzun süreceğinden daha yavaş donma hızı gerektirebilir.

Kontrollü soğutmanın gerçekleştirilebilmesini sağlayan yavaş dondurma makineleri vardır. Yavaş dondurmaya sağlayan cihazların soğutma oranları 0.2-2°C/dakika olacak şekilde ayarlanabilir durumdadır. Bu cihaz sayesinde sıcaklık değerleri -30°C ile -70°C'ler arasında herhangi bir sıcaklık derecesine ulaşınca kadar cihaz sayesinde kademeli bir şekilde yavaş soğutma (0.2-2°C/dakika) gerçekleştirilmektedir. Buz kristalleri oluşumunun başlaması ile birlikte, küçük buz kristalleri büyüyerek daha büyük kristaller oluşturma yönünde eğilim gösterirler ve hücreler için ölümcül etki yaratan bu durumun ortadan kaldırılabilmesi için yavaş soğutma oranları uygulanarak dondurma işlemleri boyunca hücrelerin dehidre olmaları sağlanmış olur (Bağış 2017). Dondurma işlemleri tamamen bittiğinde ve istenilen sıcaklık değerine ulaşıldığında hücreler sıvı azot tankına alınmakta ve muhafazaları burada gerçekleşmektedir.

Mr. Frosty, ısının 1°C/dakika düşmesini sağlayan ve içerisinde dondurma tüplerinin yerleştirilebileceği girintiler ve bu girintiler ile kap duvarı arasında alkol barındıran polikarbonattan yapılmış dondurma kabıdır. İçindeki alkol daha homojen bir ısı transferi ve soğutması elde etmek için bir banyo görevi görür. Hücrelerin bulunduğu solüsyon dondurma tüplerine alınır ve bu tüpler Mr. Frosty gözlerine yerleştirildikten sonra 24 saat boyunca -80°C derin dondurucu içerisinde bekletilir (Şekil 2.15). Böylece sıcaklığın yavaş bir şekilde düşmesi sağlanmış olur ve daha sonra tüpler Mr. Frosty içerisinden çıkarılarak daha uzun süreli depolama için sıvı azot tanklarına alınırlar (Freshney 2005, Morris 2007).



Şekil 2.15: Dondurma tüpü ve Mr. Frosty

Yalıtılmış köpük kutu (Şekil 2.16), köpük tüp ve karton kutu (Şekil 2.17), gibi muhafazalar, ultra-soğuk dondurucularda dondurma bölmeleri olarak yaygın şekilde kullanılır. Hücrelerin bulunduğu dondurma tüpleri, belirtilen muhafazalar içine yerleştirilir, daha sonrasında içinde dondurma tüplerinin olduğu bu muhafazalar -80°C derin dondurucuda 24 saat boyunca bekletilir. Bu basit cihazların birçok hücre hattında iyi çalıştığı ancak her zaman kontrollü, tekrarlanabilir veya düzgün soğutma vermediği, bu yüzden çözüldükten sonra dondurma tüpleri arasında canlılıkta ciddi farklılıkların olabileceği belirtilmektedir (Freshney 2005, Morris 2007).



Şekil 2.16: Polistren köpük dondurma kutuları



Şekil 2.17: Köpük dondurma tüpü ve karton kutu

2.7.2. Hızlı dondurma (rapid freezing)

Hızlı dondurma yönteminde DMSO, gliserol, etilen glikol, propandiol gibi hücre membranından geçebilen kriyoprotektanlardan bir tanesi (2-4.5M) ile süktroz, laktoz, trehaloz, galaktoz gibi hücre membranından geçemeyen kriyoprotektanlardan bir tanesinin (0.25-0.5M) karışımından oluşan dondurma solüsyonunun kullanılması ile gerçekleştirilir (Bağış, 2017). Dondurma işleminde bu solüsyon kullanılarak hücrelerin -170°C ya da -196°C sıcaklıklara kadar hücrelerde buz kristalleri oluşturmada soğutulmasına olanak sağlar. Hızlı dondurma yönteminde dondurma hızı yaklaşık olarak dakikada $1200-1250^{\circ}\text{C}$ sıcaklığı arasındadır. Örnekler osmatik basınç olarak dengelendikten (ekilibrasyondan) sonra kısmen dehidre olurlar. Daha sonra örneklerin sıvı azot buharında kısa bir süre bekletilmesi gerçekleştirilir ve ardından sıvı azota aktarılırlar (Rayos ve ark. 1994, Cseh ve ark 1997, Park ve ark. 2000). Hızlı dondurma yönteminde aşağıda açıklanmış olan vitrifikasyon yönteminden farklılık olarak hücre dışındaki ortamda bulunan sıvı donar ve bununla birlikte dondurma solüsyonunun ozmolaritesinde artışın oluşması gözlemlenebilir. Bunun sonucunda ise hücre içinde bulunup donma riski olan su miktarında azalma gerçekleşir yani sıvı hücre dışına geçer. Burada buz kristallerinin oluşma riski uygun çözündürme işleminin gerçekleştirilebilmesine bağlıdır. Çözündürme işlemi 37°C su banyosunda biraz bekletilerek uygulanır. Uygun koşullar sağlandığında çözündürme işlemi sırasında buz kristallerinin şekillenmesi ve hücreye zarar vermesi önlenir (Palasz ve Mapletoft 1996, Bağış 2017).

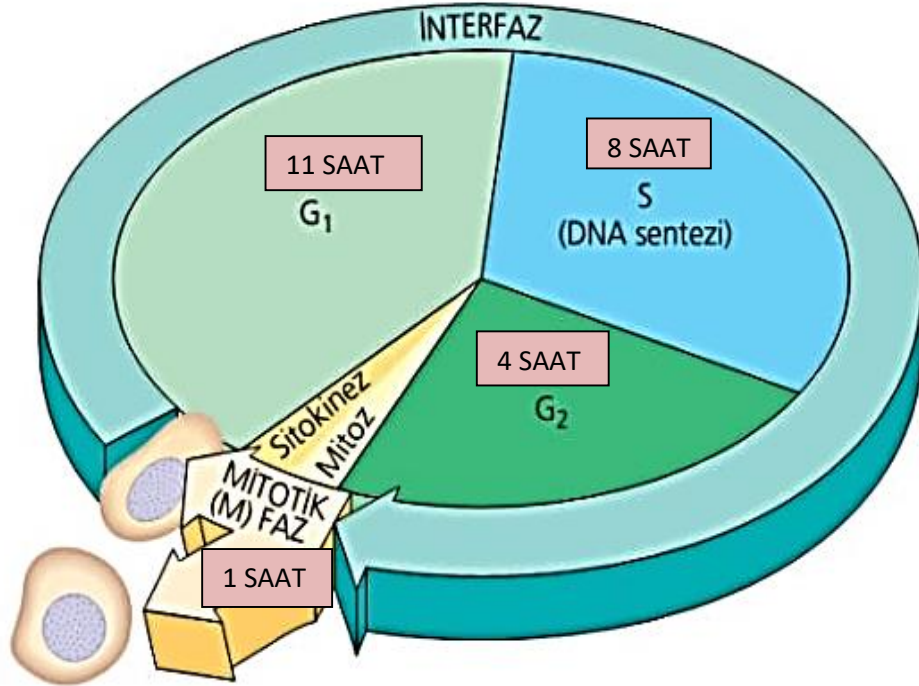
2.7.3. Vitrifikasyon (vitrification)

Vitrifikasyon, hücre dondurulmasından daha çok embriyoların dondurulmasında kullanılan ve başarılı olan bir yöntemdir ve ilk defa fare embriyolarında başarı ile gerçekleştirilmiştir (Rall 1985). Düşük ısılarda hücre içerisinde tamamen vitröz veya camsı bir durumun oluşturulması ile uygulanan kriyoprezervasyon yöntemidir. Vitrikasyon ile dondurmadaki amaç, dondurma işlemleri sırasında oluşma riski bulunan buz kristallerini ortadan kaldırmaktır. Bunun içinde yüksek soğutma ortamına ihtiyaç duyulur ve -100°C sıcaklığı altındaki ısılarda soğutma işleminin gerçekleştirilmesi ile buz kristalleri henüz daha oluşmadan suyun sıvı halden camsı yapıya geçişi sağlanmış olur. Çözündürme işlemleri sırasında da camsı yapının buz kristaline dönmeden erimesinin sağlanabilmesi için yine yüksek derecelerde çözündürme sıcaklığına ihtiyaç duyulmaktadır (Sağırkaya ve Bağış 2003, Bağış 2017).

2.8. Hücre Canlılığı (Proliferasyon)

Doğa üzerinde yaşam bulmuş olan tüm canlılar hücrelerden oluşmaktadır ve hücreler ise organik ve inorganik moleküller haricinde bünyesinde %70 oranında su bulunduran yapı birimleridir. Normal dokularda hücrelerin bölünebilmesi ve çoğalabilmesi o organizmanın devamlılığı için oldukça önemli bir eylemdir. Hücrelerin çoğalması mitoz bölünme ile gerçekleşir ve bölünme; büyümeyi, gelişmeyi, rejenerasyonu ve dokuların yenilenmesini beraberinde getirir. Mitoz bölünme tek hücreli canlılarda üremenin gerçekleşmesini sağlar. Hücrelerin çoğalması, artması proliferasyon olarak adlandırılmaktadır. Hücrelerin çoğalabilmesi için gerekli sinyaller başlatıldığında proliferasyon süreci başlar ve beraberinde protein sentezi ve organellerin çoğalması gibi durumlar meydana gelir. Hücrelerin bölünebilmeleri için gerekli olan tüm bilgiler çekirdekte bulunan DNA molekülünde depolanmış haldedir. Proliferasyon sürecinde hücre çekirdeğinde bulunan kromozomlarda eşlenme gözlenir ve bölünmenin ileri safhalarında birbirlerinden ayrılma göstererek iki yeni hücreye geçiş yaparlar ve bu durum bazı genler ve enzimler yardımı ile kontrol edilmektedir. Hücrelerin çoğalması durumu hücre siklusu olarak da adlandırılmaktadır ve hücre siklusu birçok hücrenin yaşamı boyunca devam etmektedir. Bazı hücrelerin bölünerek çoğalabilmesi sürekli olarak gerçekleşirken bazı hücrelerde bu durum nadir olarak gözlenir ve bu hücreler oluştuktan sonra bölünme yetisini kaybederler, sinir hücreleri örnek olarak verilebilir. Çoğalma durumu hücre tipine göre farklılık göstermektedir (Türker 2017, Anonim 2018a).

Hücre döngüsü interfaz ve mitoz olmak üzere iki aşamaya ayrılır. İnterfaz ise kendi içerisinde üç gruba ayrılım gösterir. Bunlar; gap 1 (G1 fazı), sentez (S fazı), gap 2 (G2 fazı)'dır. Hayvanlarda hücre döngüsünün tamamlanabilmesi için gerekli olan süre yaklaşık olarak 20 ile 24 saat aralığıdır. Bu sürenin ise yaklaşık olarak bir saati mitoz bölünme için ayrılmıştır. Bunun dışında kalan süreler interfazdaki büyüme için değerlendirilir. Hücre tiplerinin bölünme süreleri sabittir. Hücrelerin bölünmesi için gerekli olan şartların en uygun seviyelerde olduğunda bile bölünme süresi değişiklik göstermez. Fakat hücre bölünmesi için şartlar uygun değilse (sıcaklık vb.) bölünme süresi biraz uzayabilir. Hücrelerin döngü süreleri planlanmış ve programlanmış bir şekilde gerçekleşmektedir (Şekil 2.18). İki aşamada gerçekleşir. İlk olarak kromozomlarda bulunan kalıtsal materyaller iki katına çıkarılır, daha sonra ise hücrenin diğer organellerinin çoğaltılması gerçekleşir (Ross ve ark. 2003, Freshney 2005, Copeer 2007).

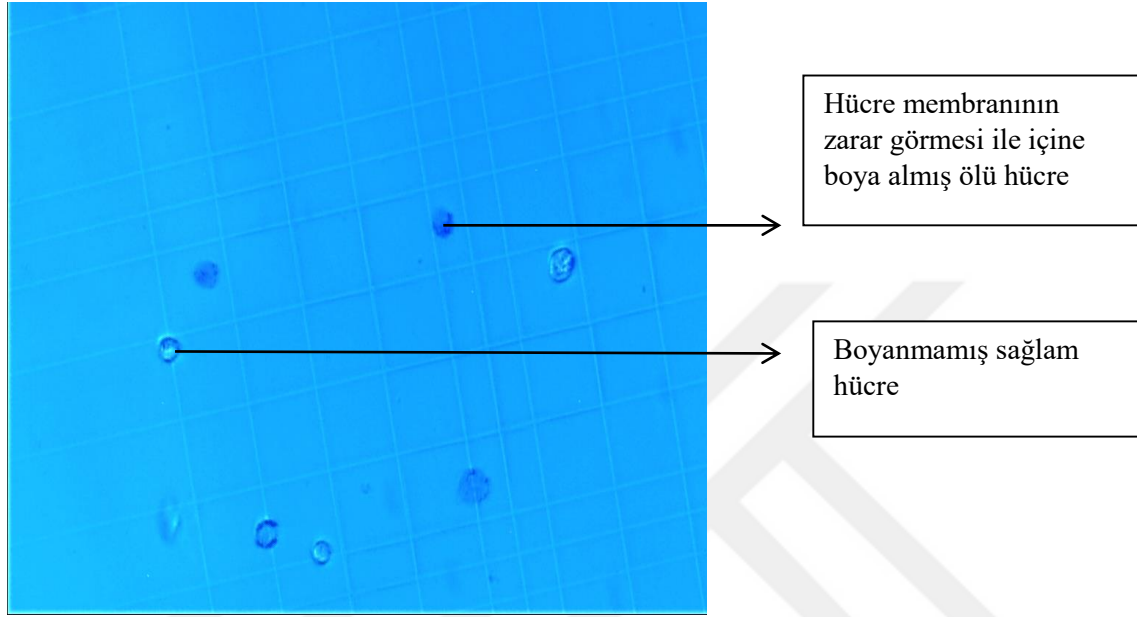


Şekil 2.18: Hücre döngüsünün şematik gösterimi (Anonim 2017b)

Hücre canlılığının bir göstergesi olan proliferasyonun tespit edilebilmesi bilimsel çalışmalar açısından oldukça önem taşımaktadır ve birçok alandaki çalışmalara ışık tutar. Bunlardan bazıları; büyüme faktörlerinin analizi, ilaç denemeleri, sitotoksik çalışmalar, kozmetik, toksik ajanların etkilerinin belirlenmesi olarak sıralanabilir. Proliferasyon tespiti için farklı analiz yöntemleri mevcuttur. Bunlardan biri tetrazolium tuzlarından yararlanılarak

metabolik aktivitesi olan hücrelerin tespitine dayalı bir yöntem olan MTT testidir (Tokur ve Aksoy 2017).

Bu tez çalışmasında deney gruplarında 24 saat kültür sonrası proliferasyonun incelenip hücre canlılığının değerlendirilmesi aşamasında bu analiz yöntemi uygulanmıştır. Hücre canlılığı daha basit olarak tripan mavisi ile boyama sonrası hücrelerin hemositometre de sayılması ile de değerlendirilebilir (Şekil 2.19) (Arat 2013).



Şekil 2.19: Trypan blue ile ölü ve canlı hücrelerin ayrımı

2.9. Hücre Ölümü

Organizmalar canlılığın gerekliliği olarak belli bir noktaya kadar geldiklerinde ölümleri gerçekleşir ve bu ölümler farklı şekillerde meydana gelmektedir. Organizmaları meydana getiren hücrelerde yaşamları boyunca sürekli ölümler gerçekleşir. Bazı hücreler seneler boyunca canlı kalmayı başarabilirken bazıları sadece birkaç saat hayatta kalabilmekte ve bu sebeple yaşam süreleri hücrenin tipine göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca doğma, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümün gerçekleşeceği yaşamsal bir döngü söz konusudur ve döngünün oluşmasında hücrelerin sayılarının dengeli olması önemlidir. Canlıda yeni hücreler oluşup çoğalırken, sayısal dengenin sağlanabilmesi için hücrelerin bir kısmı ölür. Hücre ölümleri genel olarak iki şekilde meydana gelmektedir. Bunlar; fizyolojik, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz ve patolojik hücre ölümü olarak tanımlanan nekrozdur (Thompson 1995, Ameisen 1996).

Tarihte hücre ölümüyle ilgili bilgiler 1920 yılına dayanmaktadır. O yıllarda ışık mikroskobu ve yeni boya yöntemlerinin keşfedilmesi ile birlikte nekroz kavramı ortaya

çıkıştır. Sonrasında 1972 yılında iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı hücre ölümü gerçekleştiği gözlemlenmiş ve buna Yunanca’da yaprakların ağaç gövdesinden ayrılması anlamına gelen “apoptozis” adı verilmiştir (Cohen 1993, Anonim 2011).

Fizyolojik hücre ölümü ifadesi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır ve yine ilk olarak Wyllie ve Kerr tarafından glukokortikoidlere maruz kalan timüs hücreleri üzerinde yapılan deneysel bir araştırmalar ile birlikte gösterilmiştir (Tomatır 2003).

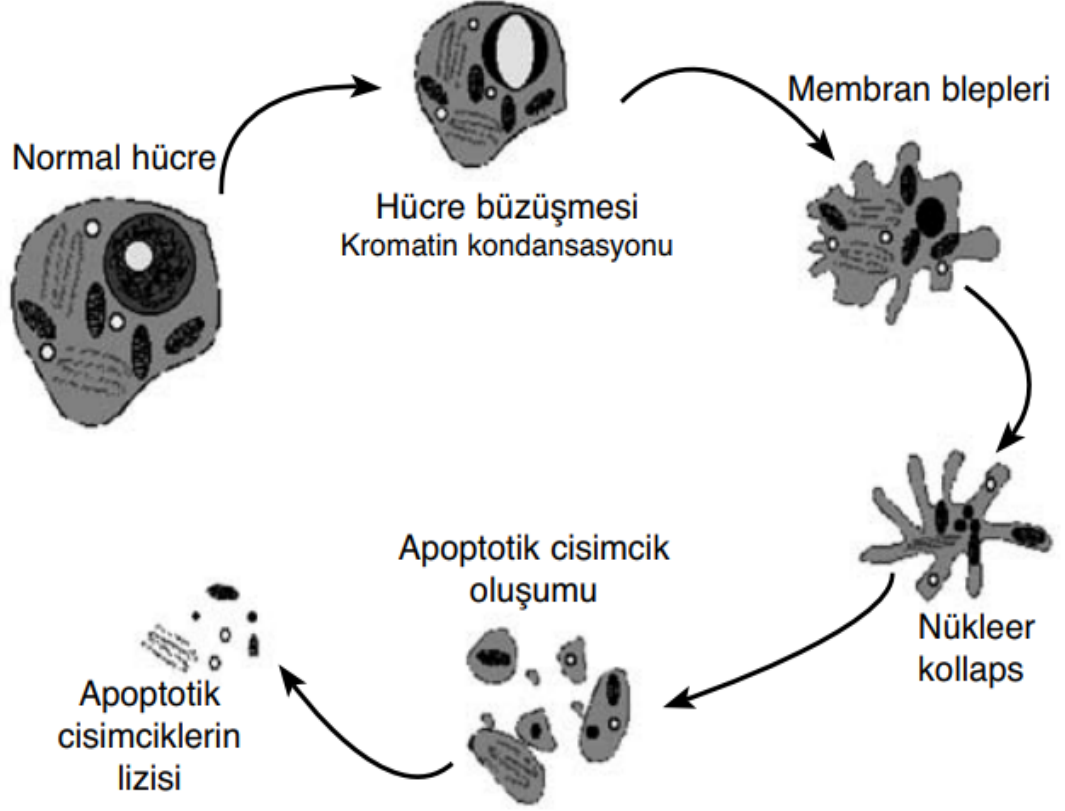
2.9.1. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda herhangi bir hücreye artık ihtiyaç duyulmuyorsa o hücre için programlı hücre ölümü (apoptoz) başlatılır ve hücre bölünmesi ile birlikte artan hücre sayıları, hücre ölümleri ile dengelenmektedir. Apoptoz; gelişmiş organizmalarda fonksiyonu bozulmuş olan ve gereksinim duyulmayan hücrelerin, çevrelerine herhangi bir zarar vermeden programlı ölümüdür ve yaşam süresi boyunca apoptotik mekanizma devam etmektedir. (Güleş ve Eren 2008, Mis ve Yeltekin 2014).

Apoptoz genel olarak; RNA, protein sentezi, ve enerjiye gereksinim duyan, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri ve organizmada homeostaziye koruyan programlı hücre ölümüdür. Hücre intiharı ve fizyolojik hücre ölümü gibi terimler apoptoz ile aynı anlama gelmektedir (Schwartzman ve Cidloski 1993).

Apoptozun başlaması için ilk olarak hücreye sinyal gelmesi gerekir ve daha sonrasında hücre içinde birçok biyokimyasal ve morfolojik değişimler gerçekleşir. Sinyal ile başlayan apoptozda ilk olarak hücreler küçülüp yoğunlaşmaya başlar ve bunu takiben hücre iskeleti dağılır, aynı zamanda çekirdek zarında yer yer parçalanmalar meydana gelir. Çekirdek DNA’sının parçalanması ile birlikte kromotini yoğunlaşır. Apoptoza uğrayan bir hücrede laminlerin ve aktif filamentlerinin yapısı bozulur, bunun sonucunda ise sitoplazmada küçülme meydana gelir. Kromotin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması ile birlikte çekirdekte yoğunlaşmalar gerçekleşir. Hücre gibi çekirdek de büzüşmeye başlar ve zarla çevrili olarak birkaç parçaya ayrılması söz konusu olabilir. Hücre büzülüp küçülmeye devam ederken, makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği zarla çevrili bir şekilde küçük parçalara ayrılması gerçekleşir, fakat hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korumaya devam eder. İçlerinde stoplazma, organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da bulunan apoptotik cisimcikler oluşur. Hücre zar ile çevrili tomurcuklar halinde

kopmaya başlar ve apoptotik cisimciklere ayrılır (Şekil 2.20). Bu apoptotik cisimcikler makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınır ve fagosite edilerek (sindirilerek) ortadan kaldırılır (Ross ve ark. 2003, Cooper 2007, Campbell ve ark. 2003, Eren 2015).



Şekil 2.20: Apoptoz olaylarının şematik gösterimi (Gültekin ve ark. 2008)

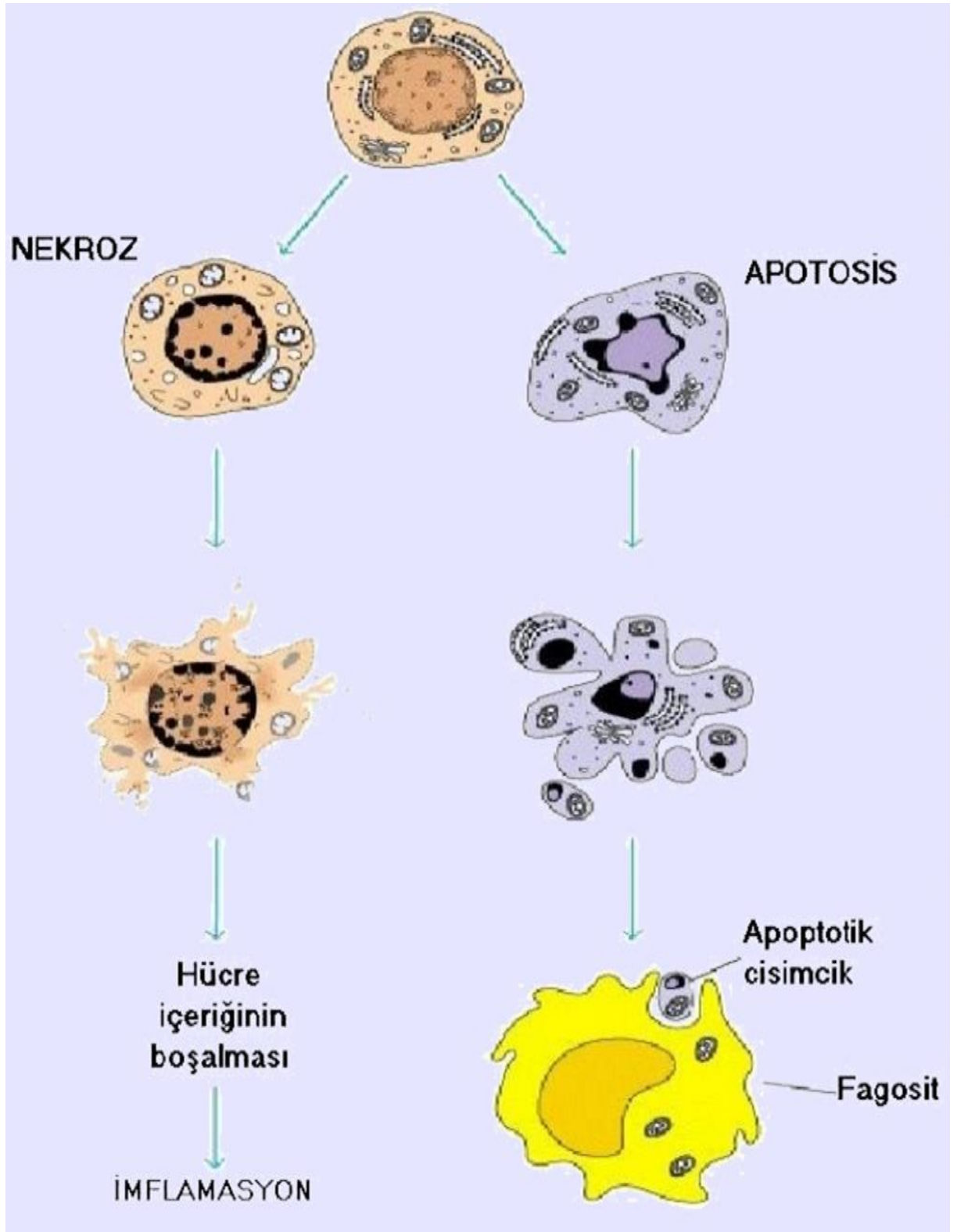
Apoptotik hücrelerde, plazma membranında değişikliklerle meydana gelir ve normalde hücre zarının iç yüzeyinde olan fosfotidilserin, aminofosfolipid transferaz enzimi ile zarın dış yüzeyine geçer, böylelikle fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfotidilserin ile bağlanarak fagositozun uyarılmasını sağlar (Cohen 1998, Mis ve Yeltekin 2014).

Apoptozun başlaması için temel olan iki yol vardır. Bunlar intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik yol'dur. Apoptozun başlamasını sağlayan hücre içindeki sinyaller; DNA hasarı, pH azalması, hücre içi Ca^{++} düzeyinde artış, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve son olarak da hipoksidir. Apoptozun tetiklenmesinde hücre dışından gelen sinyaller ise; büyüme faktörlerindeki yetersizlik, sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (iskemi, kemoterapötik ilaçlar, toksinler, UV, radyasyon), ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS-FAS

ligand aracılığı ile apoptoz)’dur. Hücre içinden veya hücre dışından gelen iki sinyal yolunda da kaspazların görevi söz konusudur (Ross ve ark. 2003).

2.9.2. Nekroz

Nekroz olayı rastgele gelişen düzensiz bir süreçtir ve herhangi bir gen tarafından programlanmamış bir olaydır. Apoptozdaki gibi hücre sel büzüşme gerçekleşmez, onun yerine hücrelerde şişme meydana gelir ve bu şişme de nekrozun erken belirtisidir. Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal sinyaller ile (iskemi, hipoksi, hipertermi, litik viral enfeksiyon, toksik maddeler, şiddetli oksidatif stres, ağır metaller, radyasyon) birlikte patolojik bir durum olan nekroz tetiklenmesi gerçekleşir. Nekrozun gerçekleşmesi esnasında mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde artış meydana gelirken nonapoptotik proteazlar aktifleşir, adenosin trifosfat (ATP) üretiminde azalma meydana gelir ve Ca^{++} kanalları açılır. Enerji depolarında gerçekleşen ani azalma sonucunda hücre zarının geçirgenliği bozulur ve bu durumda sodyum ile suyun hücre içerisine geçişi gerçekleşir. Bunun sonucunda ise hücrede şişme meydana gelirken mitokondrilerde de şişme gözlenir ve diğer organeller plazma içinde yayılarak dağılır. Bu gerçekleşen şişme sonucunda osmotik basıncın artması ile birlikte hücre zarı bütünlüğünü kaybederek patlar ve hücre parçalanıp dağılır. Hücre ölümü ile birlikte hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa yayılma göstermesi yangı (iltihaplanma, inflamasyon) olayına sebep olmaktadır (Nicotera ve ark. 2004, Golstein ve Kroemer 2007, Coşkun ve Özgür 2011). Apoptoz ve nekrozun şematik gösterimi Şekil 2.21’de ve kıyaslaması Çizelge 2.1’ de verilmiştir.



Şekil 2. 21: Apoptoz ve nekroz şematik gösterimi (Yalçın 2014)

Çizelge 2.1: Apoptoz ve nekrozun karşılaştırması (Coşkun ve Özgür 2011)

ÖZELLİKLER	APOPTOZ	NEKROZ
Göstermiş Oldukları Biyokimyasal Özellikler	Enerji (ATP) gereksinimi vardır. (Jel elektroforezinde ladder)DNA kırıkları merdiven şekline bürünür. Programlıbir şekilde gerçekleşmektedir.	Enerji (ATP) gereksinimi yoktur. (Jel elektrofrezinde smear) DNA rastgele bir şekilde parçalanır. İyon dengesi bozulur.
Göstermiş Oldukları Morfolojik Özellikler	Erken evrede fosfotidilserin translokasyonu meydana gelir. Apoptotik cisimciklerin oluşumu gözlenir. Blebler oluşur. Hücre büzülerek küçülür. Organeller zarar görmez. Hücre zarı bozulmamıştır. Kromatin kondensasyonu gerçekleşmektedir.	Fosfotidilserin translokasyonu gözlenmez. Hücre lizisi meydana gelir. Büyük vakuallerin oluşumu söz konusudur. Hücrede şişme gözlenir. Organellerin parçalanması söz konusudur. Hücre zarı bozulur.
Göstermiş Oldukları Diğer Özellikler	Hücreler teker teker veya birkaç hücrenin bir arada ölümü gerçekleşir. Fizyolojik şartlarda da oluşabilir. Makrofajlar tarafından ise fagositte edilirler. İnflamasyon görülmez.	Hücrelerin ölümü gruplar halinde gerçekleşir. Patolojik etkilerin sonucunda oluşur. Lizozomal enzimlerin salınımı söz konusudur. İnflamasyona sebep olur.
Sebebiyet Veren Faktörler	Hücrelerin Yaşlanması Radyasyon HIV Ölüm Reseptörleri Aktivasyonu Kanser İlaçları Büyüme Faktörleri Eksikliği Sitotoksik T Lenfositler	Toksik Maddeler Ağır Metaller İskemi Hipertermi Şiddetli Oksidatif Stres Hipoksi Litik Viral Enfeksiyon

Son yıllarda bilim insanları tarafından gerçekleştirilen çalışmalar ve araştırmalar doğrultusunda, morfoloji ve biyokimyasal özellikleri bakımından apoptoz ve nekroz hücre ölümüne benzemeyen farklı hücre ölüm tipleri de fark edilmiştir. Otofajik hücre ölümü başlığı altında ve kısaca bir vakual içine alınan hücre içi makro moleküllerin ve organellerin primer lizozomlarla kaynaşıp parçalanmaları ile sonuçlanan bir mekanizma söz konusudur. Apoptoz hücre ölümündeki gibi apoptotik cisimcik oluşumu gözlenmez ve çekirdek yoğunlaşması çok daha sonralarda gerçekleşir (Gozuacık ve Kimchi 2007).

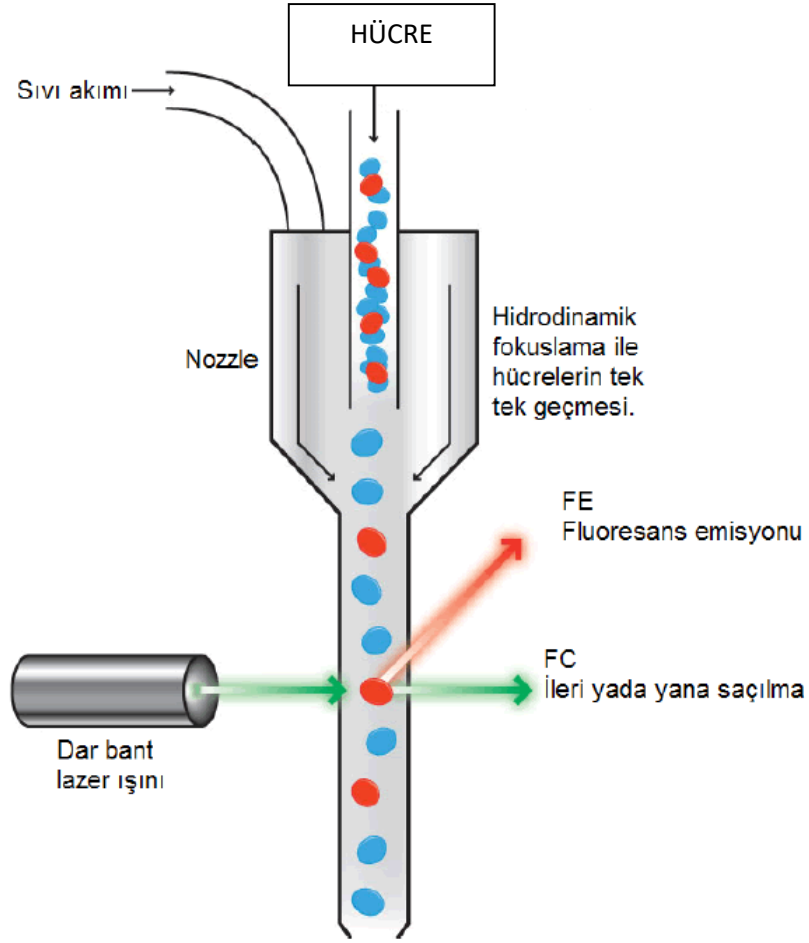
Bu tez çalışmasında DMSO ve gliserolün farklı dozları ile dondurulan hücrelerde, dondurma yönteminin ve kullanılan kriyoprotektanların hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiş ve hücrelere en az zarar veren, daha yüksek canlılık oranı sağlayan koşulların belirlenmesi hedeflenmiştir. Farklı koşulların hücre üzerindeki etkisi belirlemek için onların hücrede nekroz veya apoptoza ne oranda sebep olduğu ve çözüm sonrasında hücrelerin bu kayıpları ne oranda telafi ederek proliferasyon olduğu incelenmiştir. Bu tez çalışmasının sonuçları, çalışılan hücre tiplerinin sağlıklı bir şekilde dondurularak saklanabilmesi için uygun koşulların belirlenmesini sağlaması bakımından önemli olduğu kadar daha farklı tipteki hücrelerin dondurulması için yol gösterici olması açısından da önem taşımaktadır.

2.10. Akış Sitometrisi (Flow Sitometri) Analizi

Sitometri hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel veya kimyasal karakterlerinin ölçülmesi olarak tanımlanabilir. Akan bir sıvının içinde bulunan hücrelerin özelliklerinin incelenmesi de akış sitometrisi olarak ifade edilmektedir (Eren 2015).

Akış sitometrisi cihazı; akış sistemi (sıvı), ışık kaynağı (lazer ışını), bilgisayar ile yazılım programları, filtreler ve sinyal dedektörleri ve ayırma mekanizması (cell sorting) gibi birçok sistemin bir araya gelmesi ile oluşan bir cihazdır. Bu cihaz ile birlikte hücreler, sıvının içinde bir ışık demetinin önünden tek sıra akışı ile geçmektedir (Şekil 2.22) (Kanev ve Muranlı 2016).

Her bir hücre yada partikül lazer demetlerinin içinden geçerken sapıtılan lazer ışını ve aynı zamanda hücreler tarafından yayılan floresan ışığının birleştirilip, optik filtrelerle aynalar tarafından farklı dalga boylarına ayrılması ile analog sinyallere dönüştürülmektedir. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar şeklinde ekrana aktarılır. Histogram ise ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının oluşturduğu görsel sunumudur (Dunphy 2004, Karaboz ve ark. 2008).



Şekil 2.22: Sıvı sistemde hücrelerin tek tek lazerden geçişi (Güner 2018)

Apoptoz hücre membranında değişikliğe sebep olur ve böylece normalde hücre membranının sitoplazmik kısmında bulunan fosfolipidlerden biri olan fosfatidilserin yer değiştirerek membranın dış yüzeyine çıkar. Annexin-V fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için hücre ile muamele edilen FITC (yeşil floresan) işaretli Annexin-V sayesinde membrandaki erken değişikliklerin tespiti ile apoptoz belirlenebilir (Shynkar ve ark. 2007). Nekrotik olan hücrelerin belirlenmesi için ise propidium iyodür (PI) ikinci bir boya olarak eklenmektedir. PI zar bütünlüğü bozulmamış hücre membranından geçiş sağlayamaz. Hücrelerin Annexin-V FITC ve aynı zamanda non-vial boya olan PI ile boyanması sonucunda geç apoptotik ve nekrotik hücreler ile birlikte canlı hücreler ve erken apoptotik hücrelerin akış sitometrisi yöntemi ile birbirlerinden ayrımı yapılabilmektedir (Overbeeke ve ark. 1998, Diaz ve ark. 2008, Rieger ve ark. 2011).

Analiz sonucu aşağıdaki şekilde değeriendirilmektedir.

Canlı Hücreler: PI ile boyanmaz. Annexin V ile boyanmaz.

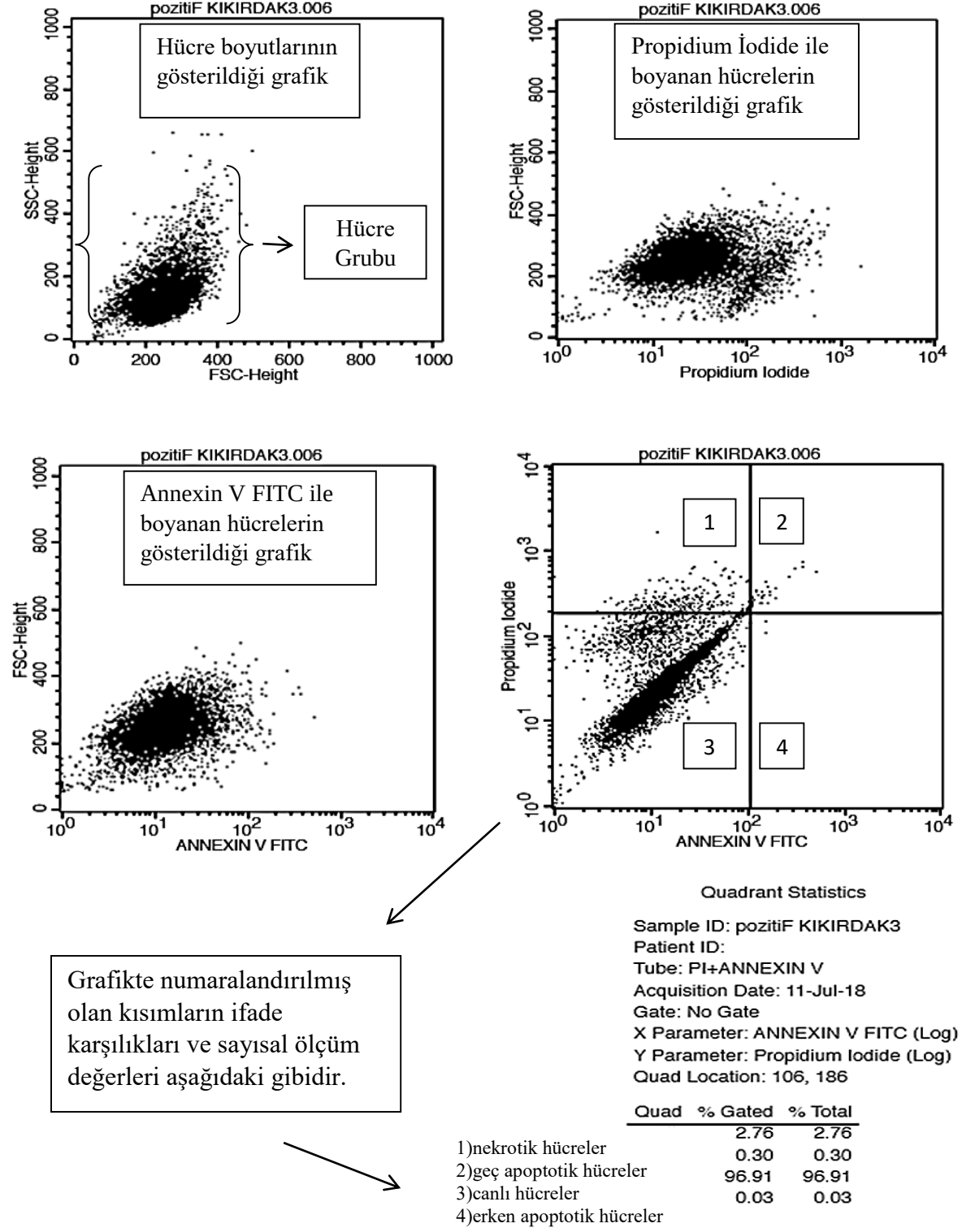
Erken Apoptotik Hücreler: PI ile boyanmaz, Annexin V ile iyi boyanırlar.

Geç Apoptotik Hücreler: PI ve Annexin V ile boyanır ancak çok geç dönemde Annexin V ile boyanma hiç gerçekişmeyebilir.

Ölü Hücreler: PI ile boyanır, Annexin V ile boyanmaz.

Akış sitometrisi analizi sonunda deney grupları cihazda okutulduktan sonra sonuçlar bilgisayar programı üzerinde alınabilmektedir. Bu program üzerinde sonuçların değeriendirilmesi ise aşağıdaki şekilde (Şekil 2.23) gösterildiğı gibi yapılmaktadır.





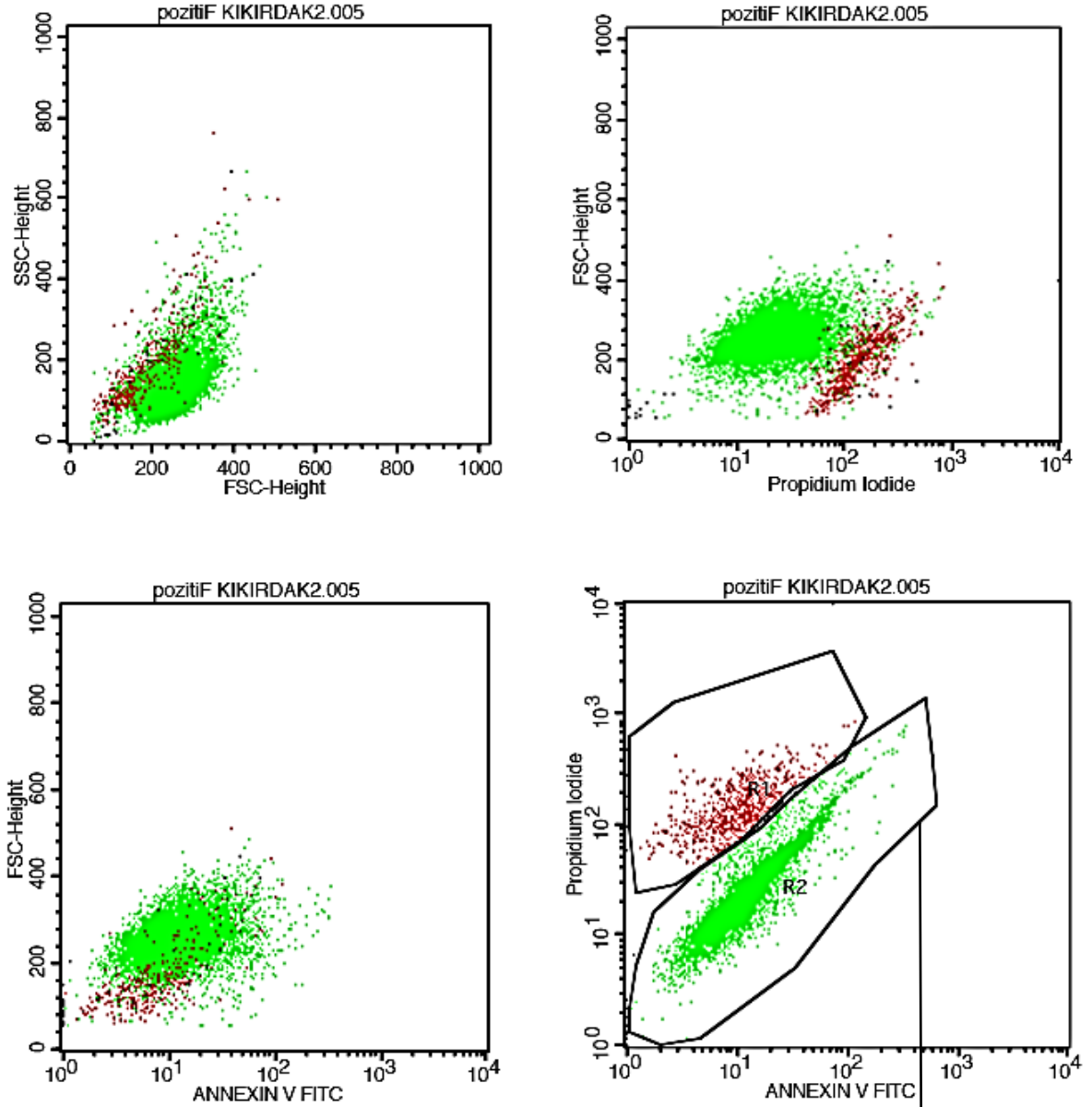
Şekil 2.23: Akış sitometrisi canlılık analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

(Görselde koyun kıkırdak hücresinin pozitif kontrol analiz sonucu gösterilmiştir.)

BD FACS Calibur Flow Sitometri cihaz programında sonuçlar iki şekilde alınabilmektedir. Birincisi yukarıdaki örnekteki gibi grafikler ile sonuçların değerlendirilmesi, ikincisi ise hücre grubu sınırlarını işaretleyerek (kapı alınarak) kalan sınırlar içindeki ifade edilen sonuçların değerlendirilmesi şeklindedir. (Şekil 2.24).

Bu tez çalışmasında grafikler ile sonuç alma yöntemi tercih edilmiştir, çünkü kapı alarak sonuç çıkarıldığı takdirde sadece nekrotik ve canlı hücrelerin net bir şekilde ayrımı yapılabilmektedir. Geç apoptotik ve erken apoptotik hücrelerin sonuçlarının net bir şekilde ayrımı yapılamadığı için tercih edilmemiştir.





Gate Statistics

Sample ID: pozitif KIKIRDAK2
 Patient ID:
 Tube: PI+ANNEXIN V
 Acquisition Date: 11-Jul-18
 Gate: No Gate
 X Parameter: Propidium Iodide (Log)
 Y Parameter: FSC-Height (Linear)

Gate	% Gated	% Total
NEKROTIİK	7.91	7.91
CANLI	91.55	91.55

Kapılar

Şekil 2.24:Sığır kıkırdak hücresinin pozitif kontrol deney grubu

2.11. MTT Analizi

MTT analizi yöntemi, uygulanmış olan kimyasal ajanın/ilacın farklı konsantrasyonlarda hücreler üzerinde yarattığı sitotoksik etkilerinin yani hücre canlılığının ve proliferasyonun sayısal veriler doğrultusunda değerlendirilmesinde ve aynı zamanda IC₅₀ (%50 inhibitör konsantrasyonu) hesaplanmasında tercih edilen bir yöntemdir. MTT sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur. Tetrazolyum tuzları, organik yapıda heterosiklik bileşiklerdir ve tetrazolyum tuzlarının elektron alması sonucu indirgenmeleri, formazan adı verilen bir yapıya dönüşmelerini gerçekleştirerek, renk değişikliği oluşumunu sağlamaktadırlar (Tokur ve Aksoy 2017). Tetrazolyum halkasının kırılması ancak aktif mitokondriler tarafından gerçekleştirilebilir ve bunun sonucunda da renk değişimi yalnızca canlı hücrelerde gözlemlenebilir. Canlılıklarını yitirmiş hücrelerde ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yetilerini kaybetmeleri sonucunda renk değişim olayı gözlenmez (Mossman 1983, Tokur ve Aksoy 2017).

MTT canlılıklarını koruyan hücrelerin mitokondriyal enzimlerine bağlanması sonucunda suda çözünemeyen mor renkte kristaller oluşturur ve oluşan bu kristaller DMSO, izopropanol gibi organik çözücülerin eklenmesi ile çözölmektedir. Proliferasyonun yüksek olduğu hücrelerin ve canlı hücrelerin mor renkle boyandıkları gözlenirken, sitotoksik kimyasal ajanın/ilacın etkisi ile birlikte canlılığı azalmış olan hücreler veya ölen hücreler açık mor renkte ya da pembe olarak gözlemlenmektedirler. Oluşan bu renkler ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda ölçölerek sayısal veriler elde edilip değerlendirilmektedir (Tokur ve Aksoy 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma materyali 20.11.2017 tarihinde Tekirdağ Büyükşehir Belediyesi mezbahasında kesilen sığır ve koyunların, farklı dokularından elde edilen kıkırdak ve granüloza hücrelerinden oluşmaktadır.

3.1.1. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar çizelge 3.1 de verilmiştir ve çalışma Namık Kemal Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Hayvan Biyoteknolojisi Laboratuvarında (memeli hücre kültürü laboratuvarı) tamamlanmıştır.

Çizelge 3.1: Kullanılan cihazlar

CİHAZ	MODEL
-80 °C Derin Dondurucu	Wisd Simple Freez U400
Akış Sitometrisi	BD FACSCalibur
Buzdolabı +4 °C	Beko
Hassas Terazı	AND GF-600
Isıtıcı Tabla	Enda
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Wisestir MHS-20A
İnkübatör	Panasonic
İnvert Mikroskop	BOECO BAB DCM 510
Laminar Flow Kabin	Heal Force HFsafe-1200
Otoklav	Alp CL40M
Ph Metre	Jenco 6173Ph
Santrifüj	Hettich Universal 320
Su Banyosu	DAIHAN 1 lt WB-11
Ultra Saf Su Cihazı	Millipor Direct-Q 3 UV with Pump
Vakum Pompası	KNF N022AN.18
Eliza Cihazı	Termo Scientific-Multiskan GO

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar çizelge 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.2: Kullanılan kimyasallar

KİMYASAL	MARKA
Antibiyotik	BIOCHROM-A 2213
Antibiyotik-Antimikotik	Sigma-A5955
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich-D2650
DMEM-F12	Gibco-32500-0235
DPBS	Sigma-D56522
Etil alkol	Sigma
Fötal Bovine Serum (FBS)	Sigma-F9665
Gliserol	Sigma-Aldrich-G 2025
Hidroklorik asit (HCL)	Sigma
Izopropil alkol (2-propanol)	Sigma
NaOH	Sigma
RNaseA	Thermo Scientific- EN0531
Sodyum Bikarbonat	Sigma
Teksol %96	Sigma
Tripan Blue	BIOCHROM
Tripsin	Gibco-25200-056
Tetrazolium Tuzu-MTT	Sigma-M 5655

3.1.3. Kullanılan kitler

Çalışmada kullanılan kitler çizelge 3.3 de verilmiştir.

Çizelge 3.3: Kullanılan Kitler

KİT	MARKA
Apoptoz Belirleme Kiti (Annexin V-FITC, PI)	eBioscience

3.2. Deney Grupları

3.2.1. Kontrol deney grupları

Negatif kontrol olarak primer kültür ile elde edilen, sığır ve koyuna ait olan (kıkırdak, granüloza) hücreler kriyoprotektan kullanılmadan dondurulmuş işlemin sonunda çözülerek akış sitometrisi ve MTT analizleri yapılmıştır.

Pozitif kontrol olarak, primer kültür ile elde edilen, sığır ve koyuna ait olan (kıkırdak, granüloza) hücreler dondurma işlemine tabi tutulmadan inkübatörde %10 FBS, %1 antibiyotik içeren DMEM-F12 medyumda kültüre edilmiş ve konfluent olduklarında diğer deney grupları ile birlikte akış sitometrisi ve MTT analizleri yapılmıştır.

3.2.2.DMSO ve gliserol karşılaştırması deney grupları (Mr. Frosty)

Bu deney gruplarda koyun ve sığira ait granüloza ve kıkırdak hücreleri DMSO ve gliserolün %5, %10 konsantrasyonlarında Mr. Frosty içinde -80°C’de derin dondurucuda 24 saat bekletilerek dondurulmuş ve daha sonra çözülerek analiz edilmiştir.

3.2.3.DMSO ve gliserol karşılaştırması deney grupları (karton kutu)

Bu deney gruplarda koyun ve sığira ait granüloza hücreleri DMSO ve gliserolün %5, %10 konsantrasyonlarında karton kutu içinde -80°C’de derin dondurucuda 24 saat bekletilerek dondurulmuş ve daha sonra çözülerek analiz edilmiştir.

3.2.4.DMSO ve gliserol karşılaştırması deney grupları (köpük kutu)

Bu deney gruplarda koyun ve sığira ait granüloza hücreleri DMSO ve gliserolün %5, %10 konsantrasyonlarında köpük kutu içinde -80°C’de derin dondurucuda 24 saat bekletilerek dondurulmuş ve daha sonra çözülerek analiz edilmiştir.

3.2.5. Saklama sırasında ısı değişikliği deney grupları

Sığır ve koyuna ait granüloza hücreleri DMSO’nun iki farklı konsantrasyonu kullanılarak Mr. Frosty içinde -80°C’de 24 saat bekletilerek dondurulmuş ve daha sonra dondurulmuş hücreler iki gruba ayrılıp bir kısmı karton kutu ve bir kısmı Mr. Frosty içerisine yerleştirilmiştir. İçinde dondurulmuş hücrelerin bulunduğu karton kutu ve Mr. Frosty 24 saat

boyunca -20°C’de bekletilmiş ve sonrasında tekrar -80°C derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Bu hücreler çözüldükten sonra analiz edilmiştir.

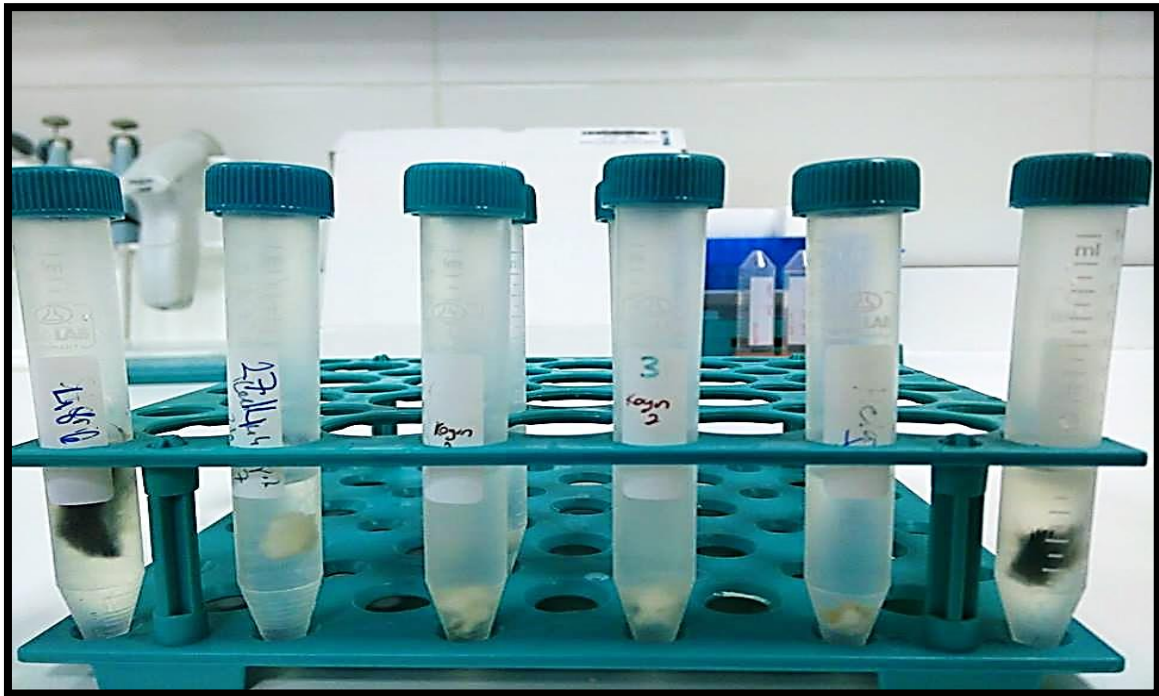
3.2.6. Dondurma medyumunu final konsantrasyonları

- %5 DMSO içeren dondurma medyumunu (%5 DMSO, %55 DMEM, %40 FBS)
- %10 DMSO içeren dondurma medyumunu (%10 DMSO, %50 DMEM, %40 FBS)
- %5 gliserol içeren dondurma medyumunu (%5 GLİSEROL, %55 DMEM, %40 FBS)
- %10 gliserol içeren dondurma medyumunu (%10 GLİSEROL, %50 DMEM, %40 FBS)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Primer kültür

Dokular steril bistüri uçları ile alınmış ve özellikle kulak dokusu alınmadan önce parçanın alınacağı bölge %10’luk çamaşır suyu ve ardından %70 alkolle temizlenmiş, daha sonrasında içinde %5 antibiyotik-antimikotik içeren tuzlu fosfat tampon (PBS) çözeltisinin bulunduğu 15 ml santrifüj tüplerine yerleştirilerek ve soğuk ortamda muhafaza edilerek en geç iki saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.1). Laboratuvara getirilen dokular içinde %2 antibiyotikli PBS bulunan tüplere aktarılmış ve işlem sırası gelene kadar +4 bekletilmiştir.



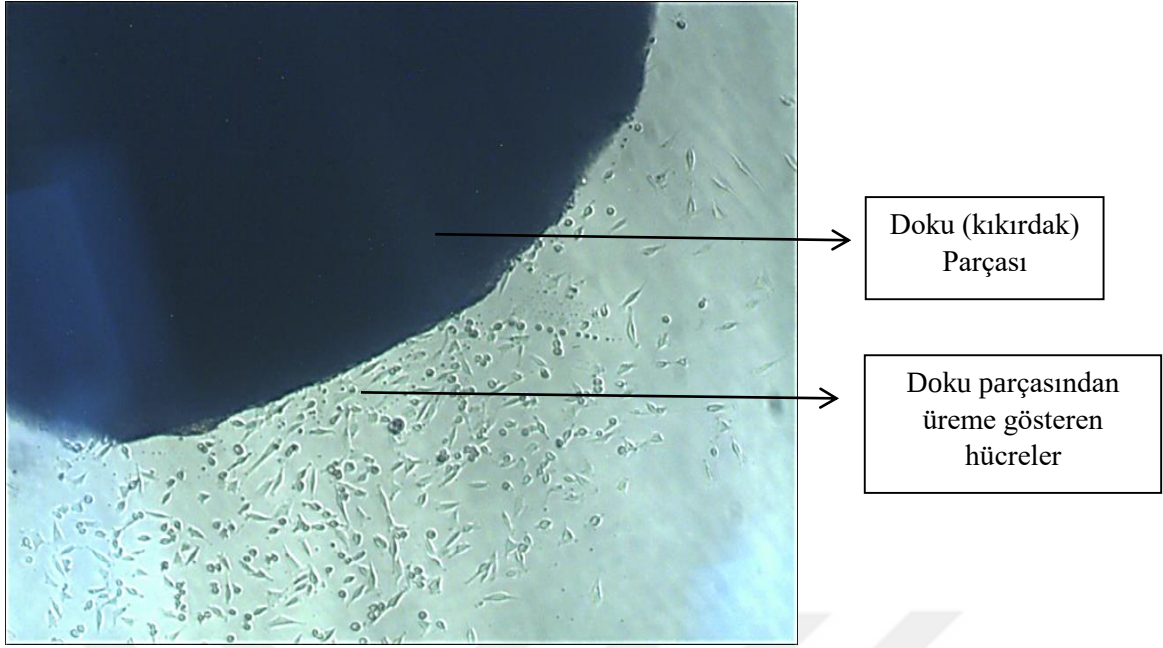
Şekil 3.1: Laboratuvara getirilen doku örnekleri

Ekim işlemi ilk önce sıgır kıkırdak dokusuyla başlamıştır. Kabin içerisine alınan doku steril bistüri ucu yardımı ile küçük parçalara ayrılarak (1 mm^3) 35 mm hücre kültürü için özel olan petrilere ekilmiştir. Doku parçalarının yapışması için bir süre (2-3 dakika) beklenmiş ve ardından dokuların yüzeyini kaplayacak şekilde %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM-F12 (hücre kültür medyum) ile kaplanmıştır (Şekil 3.2). Bu şekilde sıgır ve koyuna ait olan kıkırdak dokularının primer kültürleri yapılmıştır. Ekimleri kültür petri kapları içerisinde gerçekleştirilen kıkırdak doku parçacıkları 37°C ve %5 CO_2 içeren inkübatör içerisine alınmıştır (Arat ve ark. 2011).

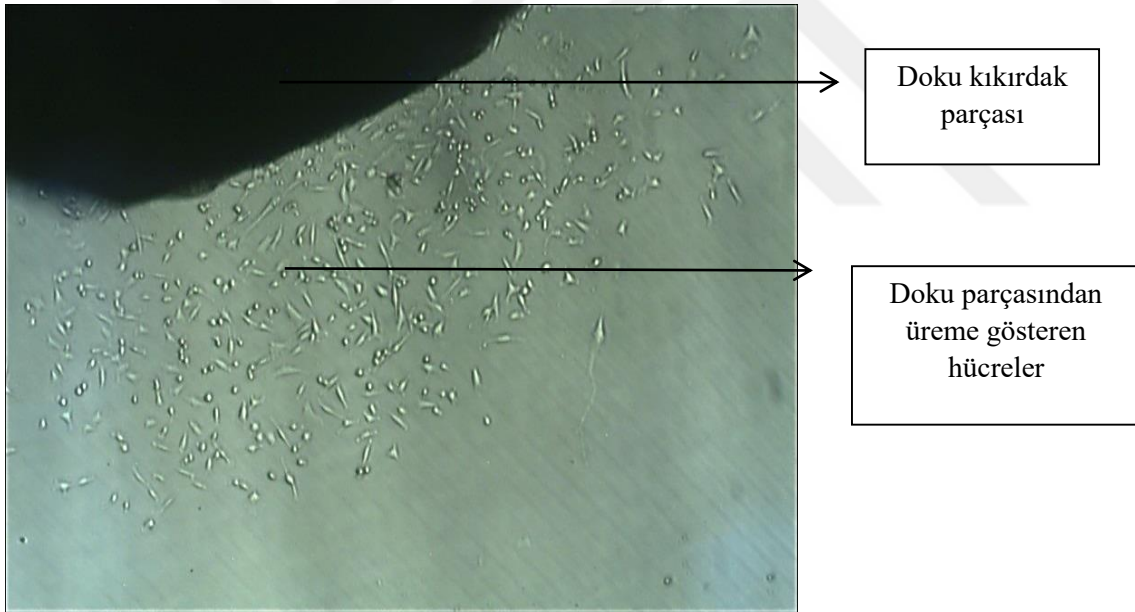


Şekil 3.2: Dokuların küçük parçalara ayrılması, petrilere ekilmesi ve inkübatörde bekletilmesi

Primer kültüründe sterilitenin fazlasıyla önem verilmesine rağmen kontaminasyon gelişme riski çok fazladır. Yapılan bu deneyde ekimin beşinci gününde sıgır kıkırdak petrisinin bir tanesinde kontaminasyon gözlemlendiği için bu petri hemen imha edilmiştir. Tekrar oluşabilecek kontaminasyon riskine karşı %1 antibiyotik-antimikotikli medyum hazırlanmış ve diğer örneklerin medyumları %1 antibiyotik-antimikotikli medyum ile değiştirilmiştir. Kültür sürecinin devamında herhangi başka bir kontaminasyon oluşmamıştır. Ekim yapıldıktan yaklaşık 9 gün sonra kıkırdak dokularının etrafında hücrelerin yayılma gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

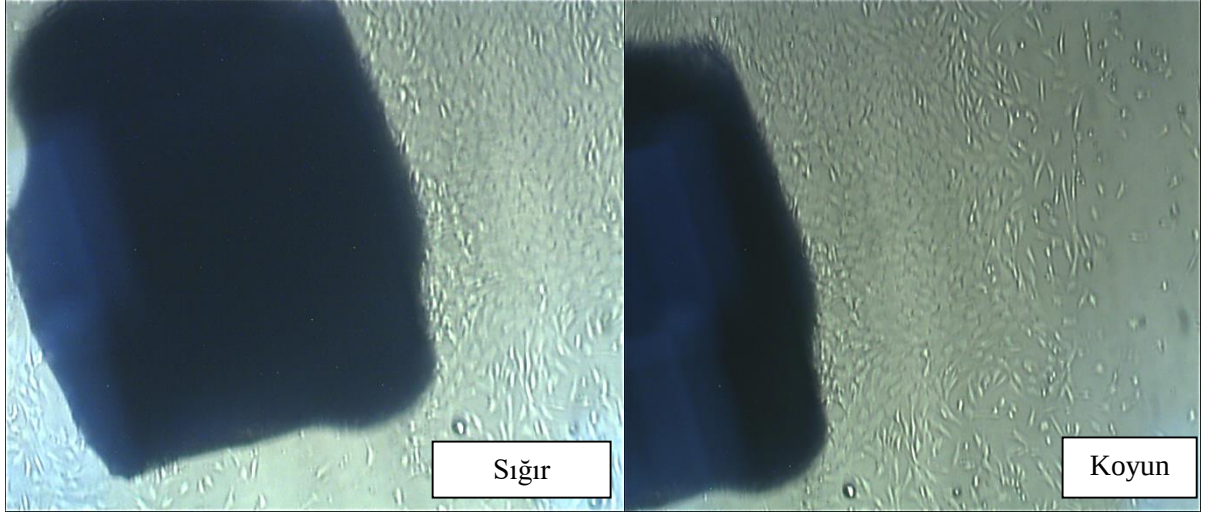


Şekil 3.3:Primer kültürde üreme gösteren sığır kıkırdak hücreleri



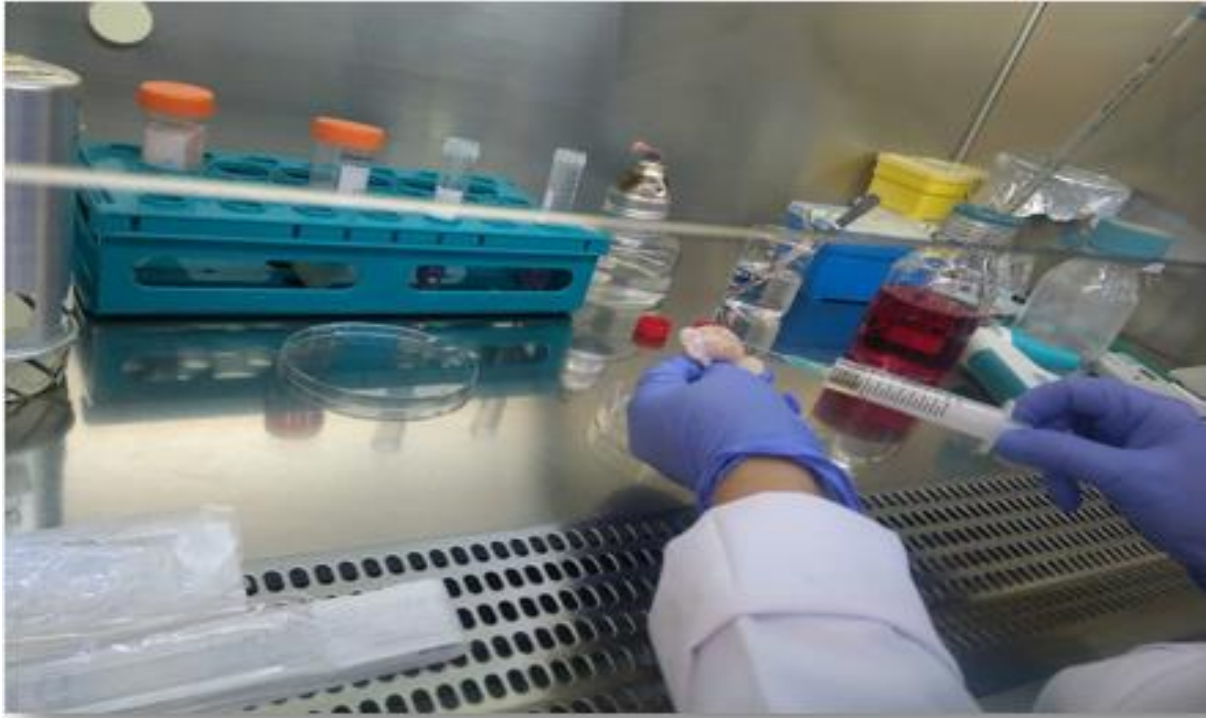
Şekil 3.4:Primer kültürde üreme gösteren koyun koyun kıkırdak hücreleri

Kıkırdak hücrelerinin ekimlerinin yapılmasından yaklaşık 20 gün (Şekil 3.5) sonra doku parçaları petri kaplarından uzaklaştırılmış, işlemler yapışan hücreleri kaldırmamak amacıyla oldukça yavaş şekilde gerçekleştirilmiştir. Ekimden 25 gün sonra konfluent olan petri kapları 60 mm'lik petri kaplarına pasajlanmıştır (Arat ve ark. 2011).



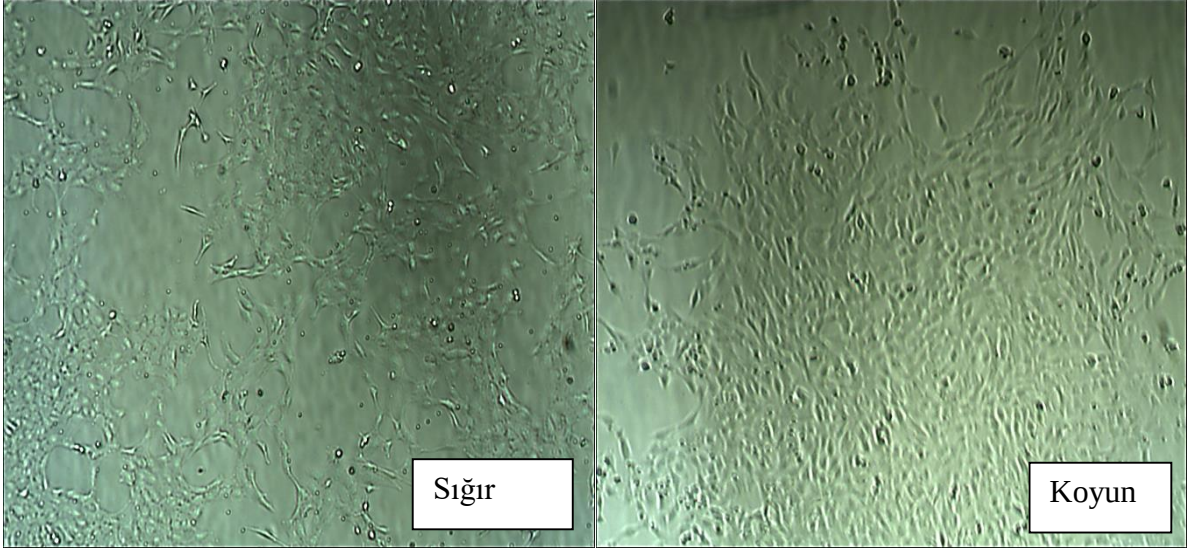
Şekil 3.5:Sığır ve koyun kıkırdak doku parçasından üreme gösteren hücreler (ekimin 20. günü)

Sığır ve koyunun ovaryum foliküllerinin aspirasyonu ile granüloza hücreleri elde edilmiştir. Ovaryumlardan enjektör yardımı ile alınan sıvı (Şekil 3.6), içinde hücre kültür medyumunu bulunan 15 ml santrifuj tüpüne aktarılmış ve santrifuj sonrası çöken hücreler, 35 mm'lik hücre kültür kaplarına bölünmüş ve %1 antibiyotik-antimikotik, %10 FBS ve içeren DMEM-12 kültür medyumunda inkübatöre (%5CO₂, 37°C) kaldırılmıştır (Arat ve ark. 2011).

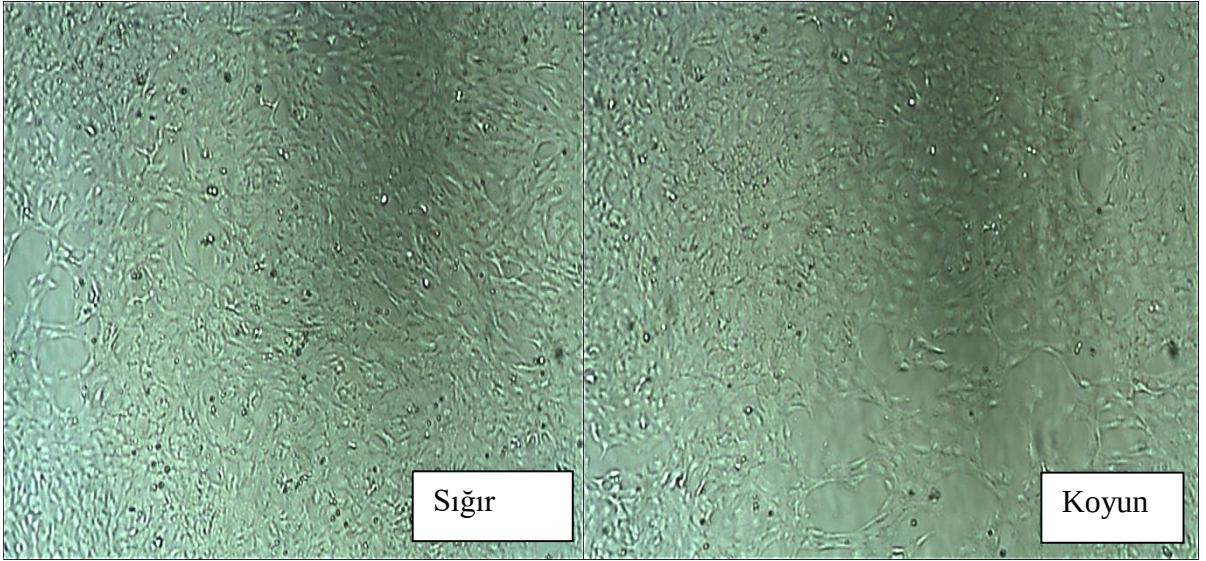


Şekil 3.6: Ovaryumdan granüloza hücre izolasyonu

Ekimin ertesi günü petri kaplarının dPBS ile yıkaması yapılmıştır. Granüloza hücreleri kıkırdak hücrelerine göre çok daha hızlı çoğalma göstermişlerdir (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8).



Şekil 3.7: Ovaryumdan elde edilen sığır ve koyun granüloza hücreleri (ekimin 3. günü)



Şekil 3.8: Ovaryumdan elde edilen sığır ve koyun granüloza hücreleri (ekimin 5. günü)

Granüloza hücreleri tamamen konfluent (kültür kabının yüzeyinin tamamen kaplanması) olduklarında 60 mm'lik kültür petrilere alınmışlardır. Bu süreç ekimden sonraki 6-10 gün süre arasında kültür petrilерinin konfluent olma durumuna göre tamamlanmıştır.

3.3.2. Hücre kültürü (pasajlama)

Primer kültür sonrası konfluent olan petrilere doku parçaları aspirasyon yöntemi ile uzaklaştırılmıştır. Petri içindeki besiyeri çekildikten sonra DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ile yıkanmış ve ardından %0.25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 5 dakika boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskop altında incelenmiş ve hemen ardından tripsini inaktive etmek için, eklenen tripsin miktarının en az iki katı kadar %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM-F12 ile sulandırılmıştır. Hücreler yavaş bir şekilde pipetlenerek tek hücre süspansiyonu elde edilmiş ve 15 mm'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Burada dikkat edilecek husus petri kaplarında hücre bırakmadan hepsini santrifüj tüpünün içine alabilmektir. Sonrasında tüpler 5 dakika boyunca 1000 rpm de santrifüj edilmiştir. Kabin içerisine alınan tüplerin dibinde santrifüj sonrası çöken hücre peleti gözlemlenmiş ve üstte kalan supernatant vakum pompası yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Hücreler %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM-F12 ile sulandırılmış ve içinde 5 ml DMEM-F12 bulunan 60 mm'lik petri kaplarına ekilmiştir (Arat 2011, 2013).

3.3.3. Hücrelerin dondurulması

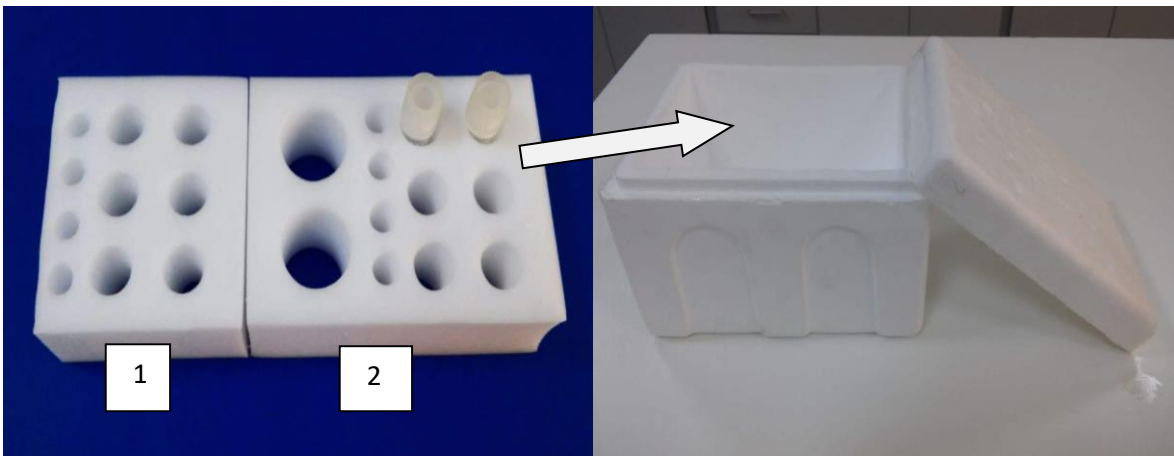
Pasajları yapılan hücreler tamamen konfluent olduklarında bir kısmı kontrol grubu için tekrar ekilirken bir kısmı deney grubuna uygun olarak dondurulmuştur. Hücreler 60 ml'lik petri kaplarını tamamen kapladığında 5 ml dPBS ile yıkanarak, 0.5 ml %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenmesi ile 5 dakika boyunca inkübatörde bekletilerek petri kaplarından kaldırılmıştır. Kabin içerisine alınan petrilere tripsinin inaktive edilmesi için eklenen tripsin miktarının en az iki katı kadar kültür medyumunu eklenerek santrifüj tüplerine alınmış ve 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısımda kalan süpernatant atılarak hücreler, 0.5 ml besiyeri ile sulandırılmış ve kriyotüplere aktarılmıştır. Bu kriyotüplerin her birinin üzerine daha önce deney gruplarına göre farklı konsantrasyonlarda 2x olarak hazırlanan ve +4°C bekletilen dondurma solusyonlarından 0.5 ml ilave edilmiş ve hücreler 1 ml dondurma medyumunu içinde yine deney gruplarında belirtildiği gibi Mr. Frosty (Şekil 3.9), karton kutu (Şekil 3.10) veya köpük kutu (Şekil 3.11) içine alınıp -80 °C derin dondurucuda 24 saat bekletilerek dondurulmuştur (Arat 2011, 2013).



Şekil 3.9: Mr. Frosty içerisinde hücrelerin dondurulması



Şekil 3.10: Karton kutu içerisinde hücrelerin dondurulması



Şekil 3.11: Köpük kutu içerisinde hücrelerin dondurulması.

Köpük kutu içerisinde hücrelerin dondurulması, Şekil 3.11’de gösterildiği gibi 1 numaralı köpük, 2 numaralı köpük üzerine kapak olarak geçirilerek köpük kutu içerisine alınmıştır ve daha sonra diğerlerinde olduğu gibi -80°C derin dondurucuda 24 saat bekletilerek dondurma işlemi tamamlanmıştır.

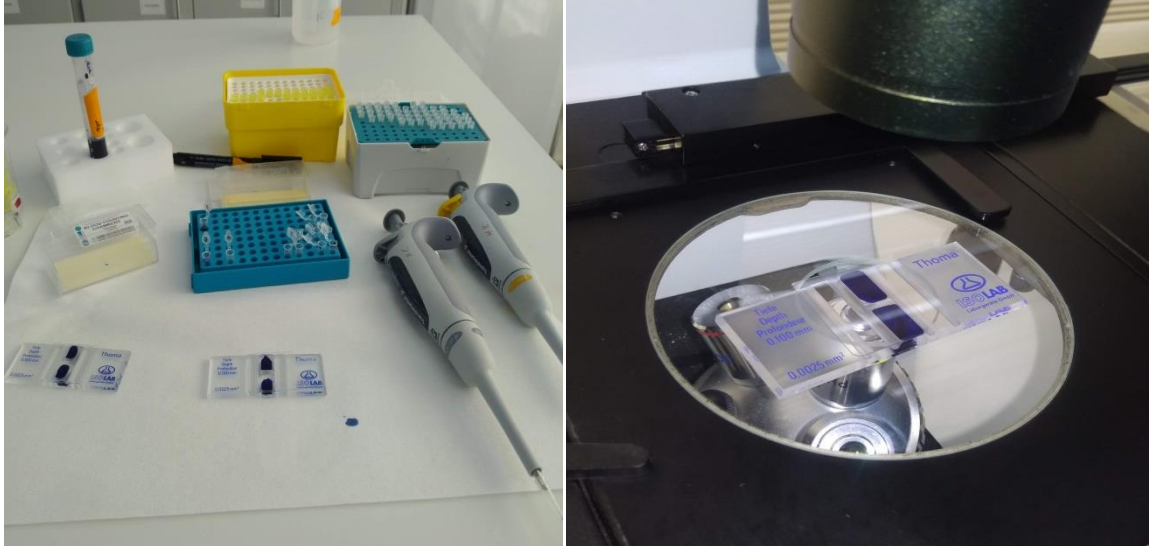
Hücrelerin dondurulduğu dondurma medyumunun final konsantrasyonları bölüm 3.2.6’da verilmiştir.

3.3.4. Hücrelerin çözülmesi

Daha önce anlatıldığı şekilde dondurulmuş ve -80 °C derin dondurucuda bekleyen kriyotüpler, laboratuvara getirilerek hemen 37°C su banyosunda 30-50 saniye bekletilmesi ile çözündürülmüştür. Çözündürme işlemi tamamlanan hücreler santrifüj tüplerine alınarak 5 dakika boyunca 1000 rpm’de santrifüj edilmiş ve üst kısımda kalan süpernatant atılmıştır. Hücreler, 1 ml medyum ile sulandırılmış ve her bir deney grubuna ait hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra bir kısmı MTT analizi için alınarak 96 kuyulu petri kaplarına ekilmiş ve geri kalanı akış sitometrisi analizi için Anexin-V ile boyanmıştır.

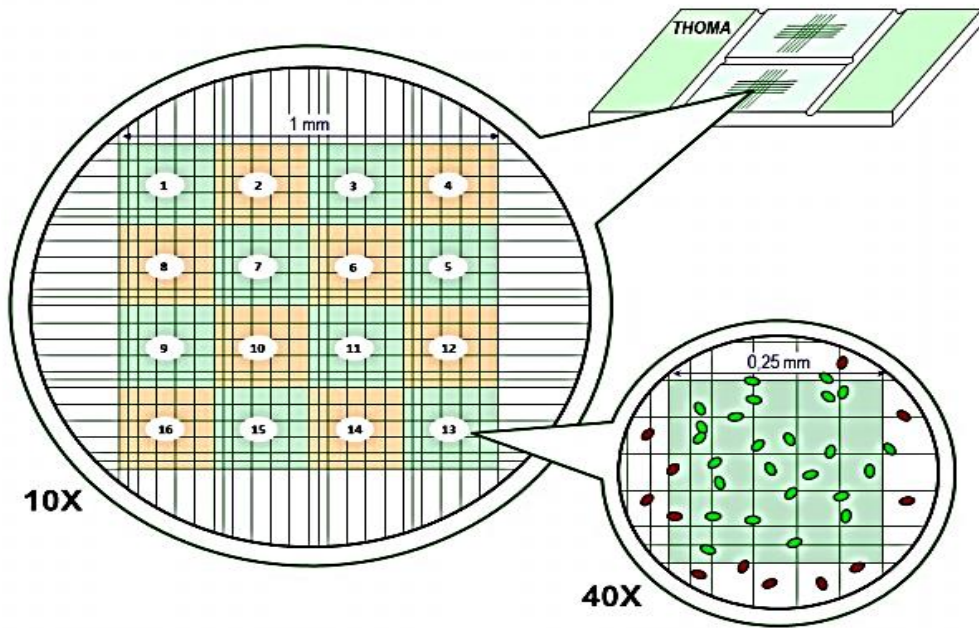
3.3.5. Hücre sayımı

Dondurma işlemi uygulanmayan pozitif kontrol grubunu oluşturan kültürdeki hücreler ilk olarak %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu ile petri kaplarından kaldırılmış ve 1000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sonrasında üst kısımda kalan süpernatant atılarak hücreler 1 ml medyum ile sulandırılmıştır. Bahsedildiği gibi 1 ml medyum ile sulandırılmış pozitif kontrole ve donmuş çözölmüş deney gruplarına ait hücreler, pipetleme yapılarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra küçük eppendorf tüpleri içerisine her bir örnekten 10 µl hücre süspansiyonu alınarak üzerine 90 µl tripan mavisi eklenmiş ve örnekler böylelikle %10 seyreltilerek thoma lamı ile mikroskop altında sayım yapılmıştır (Şekil 3.12) (Arat 2013).



Şekil 3.12: Hücrelerin Tripan Mavisi ve Thoma Lamı ile mikroskop altında sayımın yapılması

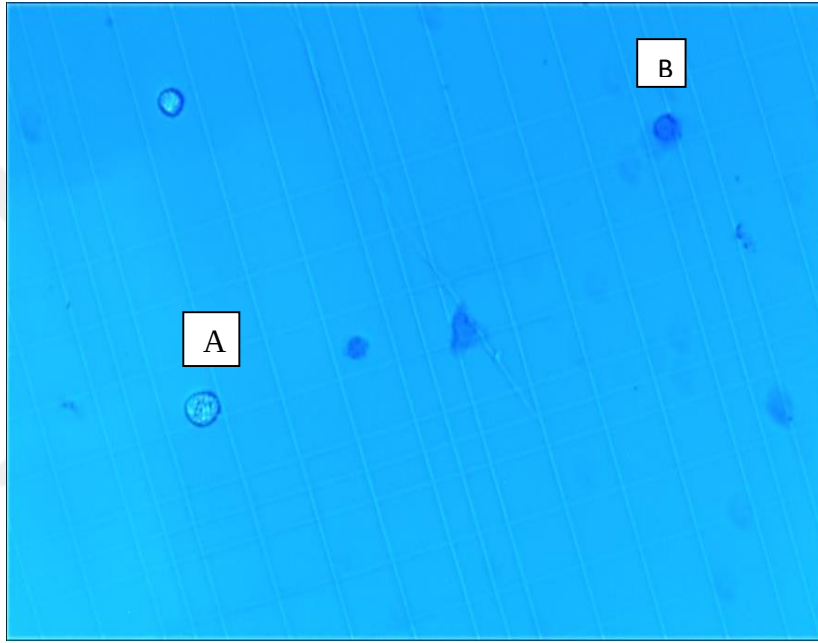
Thoma lamı; bir büyük kare içerisinde on altı orta boy kareden oluşur ve her orta boy karenin içerisinde de yirmi beş adet küçük kare mevcuttur (Şekil 3.13). Homojen hale getirilmiş hücreler thoma lamına aktarıldıktan sonra, mikroskop altında ilk olarak 10x objektif büyütmesinde büyük kare bulunmuş ve daha sonra 40x objektif büyütmesinde 16 orta boy karenin bulunduğu alan görme alanına getirilip ve içindeki hücrelerin sayımı yapılmıştır (Arat 2013).



Şekil 3.13: Thoma Lamı görüntüsü (Dursun ve Ayturan 2017)

Alandaki hücreler çok kalabalık olduğu durumda çapraz olarak sekiz orta boy kare belirlenip sayımı yapılmış ve çıkan sayı sekize bölünüp on altı ile çarpılmıştır. Bir başka sayım yöntemi olarak da köşelerden dört ve ortadan bir karenin belirlenip, sadece bu karelerin içindeki hücrelerin sayılması ve bulunan sayının beşe bölünüp on altı ile çarpılması şeklinde yapılmaktadır. Hangi şekilde olursa olsun 16 orta boy karenin sayımı ile elde ettiğimiz değer aşağıdaki formülde N yerine yazılmış ve seyreltme faktörü olarak hücrelerin tripan mavisi seyreltme oranı kullanılmıştır (Arat 2013).

$$N \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10.000 = \text{Hücre/ml}$$



Şekil 3.14: Hücre sayım görüntüsü; A:Canlı hücre, B:Ölü hücre

3.3.6. MTT analizi

Her deney grubuna ait örneklerin hücre sayıları belirlendikten sonra, 96 kuyulu petri kabına her bir örnekten 15.000/kuyu hücre olacak şekilde üçer kuyuya ekim yapılmıştır. Her bir örnek için pozitif kontrol hücreleri de aynı sayıda üçer kuyuya ekilmiştir. Ayrıca üçer kuyuda boş bırakılmıştır. Böylece donmuş çözölmüş bir kriyotüp içindeki hücreler için 96 kuyucuklu petride, 3 adet örnek, üç adet pozitif kontrol, üç adet boş kuyu oluşturulmuştur. Ekimi tamamlanan petri kapları 24 saat boyunca inkübatörde kültüre bırakılmıştır ve bu bekleme süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası eklenerek (işlem karanlıkta yapılır) hücreler 37°C’de 3 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Karanlık ortam hücre kültür kabının alüminyum folyo ile sarılması ile sağlanmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15: Karanlık ortam için alüminyum folyo ile sarılmış petri kabı

Daha sonra canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülebilmesi için her bir kuyuya 100 μ l DMSO eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika süre boyunca karanlıkta bekletilmiş ve renk değişimleri 540 nm dalga boyunda ELISA cihazında okutulmuştur (Şekil 3.16).



Şekil 3.16: ELISA cihazında renkleri değişen hücrelerin okutulması

ELISA cihazında okutulduktan sonra elde edilen sayısal verilere aşağıdaki formül uygulanarak hücre proliferasyon oranları hesaplanmıştır (Kılıç ve ark. 2012).

$$\text{Hücre Proliferasyon Yüzdesi} = \frac{A-B}{C-B} \times 100$$

A: Deney grubundaki değer

B: Boş kuyu değeri

C: Pozitif kontrol grubundaki değer

Sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi bütün deney grupları tamamlandıktan sonra yapılmış ve istatistiksel hesaplamalarda her değer teker teker hesaplanarak hücre proliferasyonu değerlendirilmiştir.

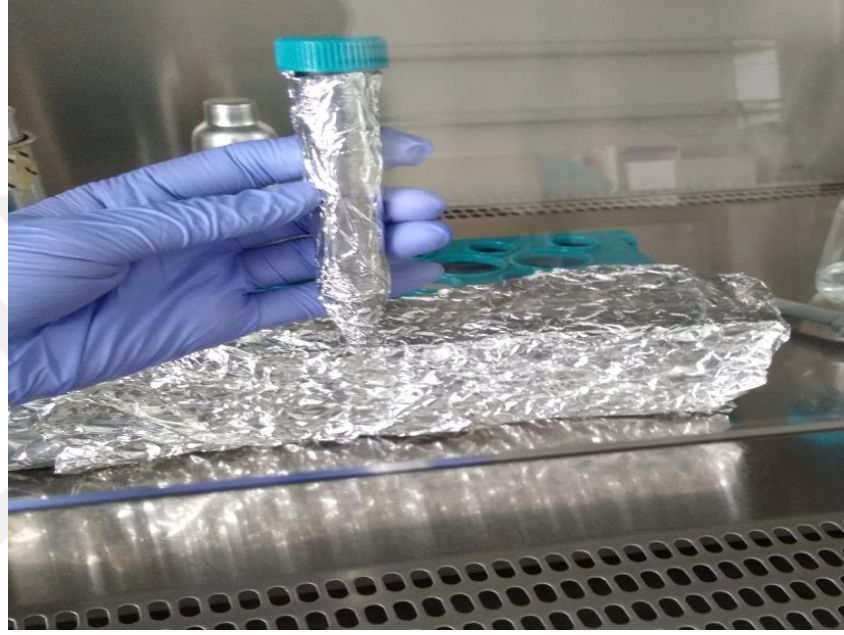
3.3.7. Akış sitometrisi analizi (flow sitometri)

Sayım için 1 ml medyum içinde bulunan ve bir kısmı MTT analizi için alınmış olan hücreler, 5 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilmiş, medyum atılmış ve hücre peleti soğuk PBS (1 ml) ile sulandırılmış ve tekrar santrifüj (Şekil 3.17) edilmiştir. Soğuk PBS ile yıkama işlemi iki kez tekrarlanmıştır.



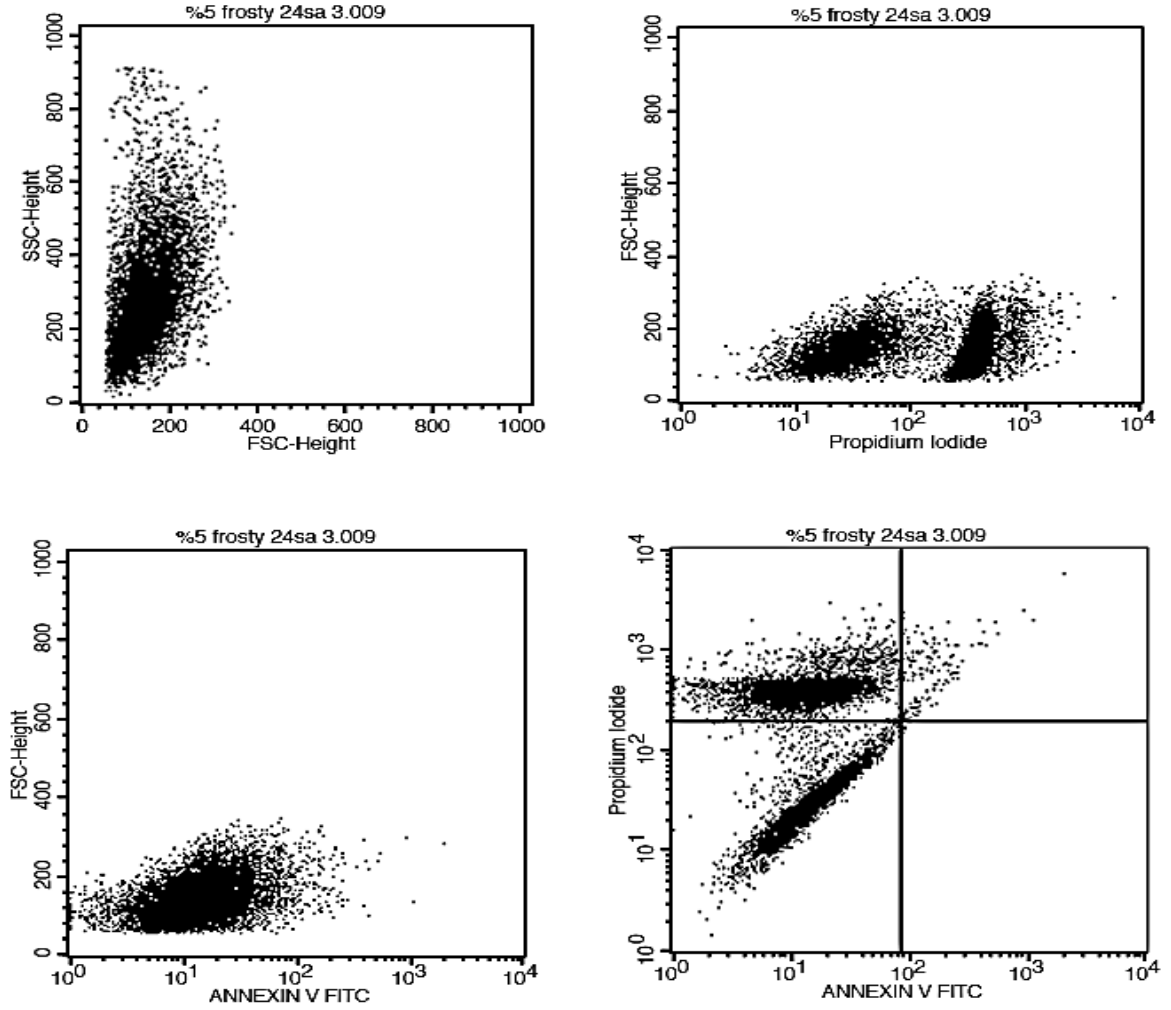
Şekil 3.17: Santrifüj edilen hücreler (1000 rpm, 5 dakika)

Santrifüjden çıkan hücrelerdeki süpernatant atılarak hücreler üzerine 195 µl Binding Buffer ve 5 µl Annexin V FITC eklenerek 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu aşamalarda dikkat edilmesi gereken unsur işlemlerin karanlıkta gerçekleştirilmesidir. Karanlık ortamın sağlanması için laboratuvar ve kabin ışıklarının kapatılması haricinde santrifüj tüpleri alüminyum folyo ile sarılmış (Şekil 3.18) ve tüpler kutu içerisine alınmıştır.



Şekil 3.18: Santrifüj tüplerinin alüminyum folyo ile sarılması

Bekleme süresi sonunda tekrar santrifüj edilerek (1000 rpm, 5 dakika) üst kısımda kalan süpernatant atılmıştır. Sonrasında hücreler üzerine 190 µl Binding Buffer eklenmesinin ardından hafif pipetleme yapılarak 5 µl RNaseA ve 10 µl PI (Propidium Iodide) eklenmiş ve karanlık ortam şartları sağlanarak 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bekleme süresi sonunda tüpler tekrar santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücreler üzerine 500 µl dPBS eklenmesi ile birlikte hafif pipetleme yapılmasının ardından hücreler flow sitometri tüplerine alınmıştır. Üzeri alüminyum folyo ile kapatılan tüpler sırası ile BD FACS Calibur Flow Cytometer cihazında okutularak analiz tamamlanmıştır. Deney gruplarından örnekler aşağıda verilmektedir (Şekil 3.19, Şekil 3.20, Şekil 3.21).



Görselde ısı değişikliği deney grubundan bir örnek sunulmuştur. Bu örnek %5 DMSO içeren dondurma medyumunda dondurulmuş sığır kıkırdak hücrelerine aittir. Dondurma işlemi tamamlandıktan sonra ve donma süreci tamamen bittiğinde 24 saat boyunca -20°C’de bekletilmiş ve daha sonra tekrar -80°C’ye alınmıştır. Çözündürülüp analizler uygulanmış ve analiz sonuçları yandaki grafikteki gibidir.

Quadrant Statistics

Sample ID: %5 frosty 24sa 3

Patient ID:

Tube: PI+ANNEXIN V

Acquisition Date: 18-Oct-18

Gate: No Gate

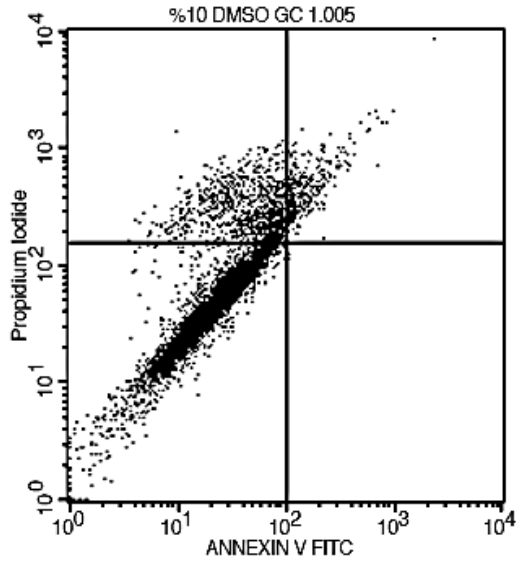
X Parameter: ANNEXIN V FITC (Log)

Y Parameter: Propidium Iodide (Log)

Quad Location: 85, 195

Quad	% Gated	% Total
nekrotik hücreler	48.99	48.99
geç apoptotik hücreler	1.48	1.48
canlı hücreler	49.42	49.42
erken apoptotik hücreler	0.11	0.11

Şekil 3.19: Saklama sırasında ısı değişikliği deney grubuna ait sığır kıkırdak hücresi akış sitometrisi analiz sonucu örneği

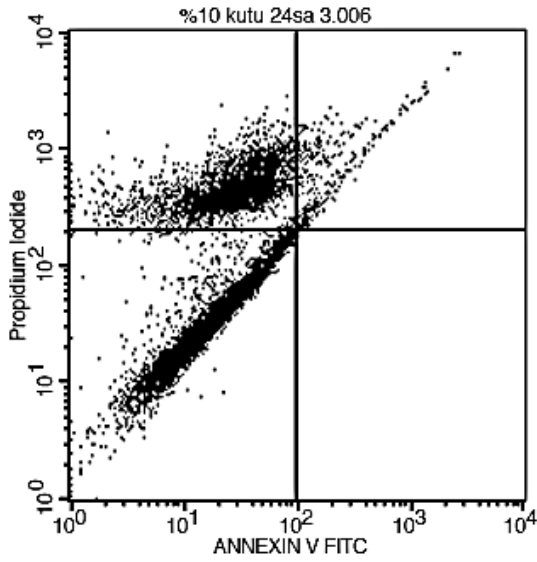


Quadrant Statistics

Sample ID: %10 DMSO GC 1
 Patient ID:
 Tube: PI+ANNEXIN V
 Acquisition Date: 06-Sep-18
 Gate: No Gate
 X Parameter: ANNEXIN V FITC (Log)
 Y Parameter: Propidium Iodide (Log)
 Quad Location: 102, 155

Quad	% Gated	% Total
nekrotik hücreler	11.92	11.92
geç apoptotik hücreler	3.83	3.83
canlı hücreler	84.22	84.22
erken apoptotik hücreler	0.03	0.03

Şekil 3.20: DMSO ve gliserol karşılaştırması deney grubuna (Mr. Frosty) ait koyun granüloza hücresi akış sitometrisi analiz sonucu örneği



Quadrant Statistics

Sample ID: %10 kutu 24sa 3
 Patient ID:
 Tube: PI+ANNEXIN V
 Acquisition Date: 18-Oct-18
 Gate: No Gate
 X Parameter: ANNEXIN V FITC (Log)
 Y Parameter: Propidium Iodide (Log)
 Quad Location: 97, 204

Quad	% Gated	% Total
nekrotik hücreler	39.57	39.57
geç apoptotik hücreler	3.39	3.39
canlı hücreler	56.93	56.93
erken apoptotik hücreler	0.11	0.11

Şekil 3.21: Saklama sırasında ısı değişikliği deney grubuna ait sığır granüloza hücresi akış sitometrisi analiz sonucu örneği

3.3.8. İstatistiksel analizler

Bu tez çalışmasında her bir grup üç kez üç tekerrür olacak şekilde birbirinden bağımsız olarak tekrar edilmiştir. Akış sitometrisi ve MTT analizleri tamamlandıktan sonra SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) programı yardımı ile istatistiksel analizler hesaplanmıştır. SPSS programında One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi kullanılarak deney grupları arasında bulunan fark Duncan önemlilik testine göre değerlendirilmesi yapılmıştır ($P<0.05$).



4. BULGULAR

4.1. Deney 1- DMSO ve gliserol karşılaştırması deney sonuçları (Mr. Frosty)

Bu deney gruplarında koyun ve sığıra ait granüloza ve kıkırdak hücreleri %5, %10 DMSO ve gliserol konsantrasyonlarında Mr. Frosty içinde -80°C’de derin dondurucuda 24 saat bekletilerek dondurulmuş ve daha sonra çözülerek analiz edilmiştir. Hiç kriyoprotektan kullanılmadan dondurulan hücreler negatif, dondurma işlemi uygulanmayan kültürdeki hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücrelerin akış sitometrisi ve MTT analiz sonuçları çizelge 4.1 ve çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Koyun granüloza hücrelerinde akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre*	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı (%)	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	K-GC	%5 DMSO	16.99±0.37 ^d	4.21±0.04 ^b	78.69±0.32 ^c	0.10±0.00 ^b
2	K-GC	%10 DMSO	8.13±0.95 ^e	8.63±0.94 ^a	83.11±1.05 ^b	0.13±0.05 ^b
3	K-GC	%5 GLISEROL	65.49±0.28 ^b	0.72±0.33 ^c	33.37±0.28 ^e	0.07±0.01 ^{b,c}
4	K-GC	%10 GLISEROL	26.72±0.34 ^c	1.71±0.11 ^c	71.46±0.33 ^d	0.09±0.01 ^{b,c}
5	K-GC	%0	90.34±0.05 ^a	5.02±0.05 ^b	4.40±0.11 ^f	0.23±0.01 ^a
6	K-GC	Pozitif Kontrol	6.15±0.07 ^f	1.21±0.13 ^c	92.60±0.20 ^a	0.02±0.00 ^c

*K-GC: koyun granüloza hücresi, ^{a-f} Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.2: Koyun granüloza hücrelerinde MTT analiz sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	K-GC	%5 DMSO	142.51±10.5 ^a
2	K-GC	%10 DMSO	121.57±6.79 ^a
3	K-GC	%5 GLISEROL	16.95±11.03 ^c
4	K-GC	%10 GLISEROL	45.54±5.98 ^b
5	K-GC	%0	4.88±1.69 ^c

^{a-c} Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Koyun granüloza hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu en yüksek canlılık oranı %10 DMSO ile alınırken (Çizelge 4.1), MTT analizinde aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası proliferasyon oranları DMSO'nun her iki konsantrasyonunda da benzer ve gliserol gruplarından yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2). Gliserol ile dondurulan hücrelerde ise çözüm sonrası hemen yapılan analiz sonucu en yüksek canlılık oranı %10 gliserol ile alınırken, aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası proliferasyon oranlarının düşmüş olduğu görülmüştür. Her iki analiz sonucuna göre DMSO ile dondurulan hücrelerin hem canlılık hem de proliferasyon oranlarının gliserol ile dondurulan hücrelerden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kriyoprotektan kullanılmayan negatif kontrol grubun canlılık ve proliferasyon oranları ise tüm grupların gerisinde kalmıştır. Kriyoprotektan gruplarının hepsinin canlılık oranları pozitif kontrol grubundan düşük çıkmış, ancak en yakın değer %10 DMSO konsantrasyonundan alındığı görülmüştür.

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.07-0.13 arasında değişmiştir. Kriyoprotektan grupları arasında en yüksek geç apoptotik hücre oranı %10 DMSO konsantrasyonunda (%8.6), en yüksek nekrotik hücre oranı %5 gliserol (%65) konsantrasyonunda tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3: Koyun kıkırdak hücrelerinde akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre*	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı (%)	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	K-KR	%5 DMSO	25.10±0.07 ^c	3.58±0.13 ^b	71.20±0.19 ^d	0.10±0.01 ^b
2	K-KR	%10 DMSO	7.19±0.11 ^d	3.39±0.17 ^b	89.38±0.24 ^b	0.02±0.00 ^c
3	K-KR	%5 GLISEROL	44.35±1.82 ^b	3.92±0.16 ^b	51.62±1.70 ^e	0.10±0.03 ^b
4	K-KR	%10 GLISEROL	22.02±0.34 ^c	2.49±0.24 ^b	75.29±0.64 ^c	0.09±0.01 ^{b,c}
5	K-KR	%0	86.55±0.92 ^a	10.11±1.11 ^a	3.10±0.22 ^f	0.23±0.03 ^a
6	K-KR	Pozitif Kontrol	4.24±1.48 ^d	0.46±0.14 ^c	95.23±1.63 ^a	0.05±0.00 ^{b,c}

*K-KR: koyun kıkırdak hücresi, ^{a-f} Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.4: Koyun kıkırdak hücrelerinde MTT analiz sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	K-KR	%5 DMSO	59.74±4.74 ^a
2	K-KR	%10 DMSO	78.12±11.88 ^a
3	K-KR	%5 GLISEROL	-8.56±7.56 ^c
4	K-KR	%10 GLISEROL	27.37±10.66 ^b
5	K-KR	%0	12.40±5.27 ^c

^{a-c}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Koyun kıkırdak hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu en yüksek canlılık oranı %10 DMSO ile alınırken (Çizelge 4.3), MTT analizinde aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası proliferasyon oranları DMSO'nun her iki konsantrasyonunda da benzer bulunmuştur (Çizelge 4.4). Gliserol ile dondurulan hücrelerde ise çözüm sonrası hemen yapılan analiz sonucu en yüksek canlılık oranı %10 gliserol ile alınırken, aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası proliferasyon oranlarının düşmüş olduğu görülmüştür. Her iki analiz sonucuna göre DMSO ile dondurulan hücrelerin canlılık ve proliferasyon oranlarının gliserol ile dondurulan hücrelerden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kriyoprotektan kullanılmayan grubun canlılık ve proliferasyon oranları ise %5 gliserol hariç tüm grupların gerisinde kalmıştır. Kriyoprotektan gruplarının hepsinin canlılık oranları pozitif kontrol grubundan düşük çıkmış, ancak en yakın değerin %10 DMSO konsantrasyonundan alındığı görülmüştür.

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.02-0.10 arasında değişmiştir. Kriyoprotektan grupları arasında geç apoptotik hücre oranı %2.49-3.92 arasında değişmiş ancak gruplar arasında istatistik fark tespit edilmemiş, en yüksek nekrotik hücre oranı %5 gliserol konsantrasyonunda (%44.35) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5: Sığır granüloza hücrelerinde akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre*	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı (%)	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	S-GC	%5 DMSO	25.18±1.31 ^c	7.39±0.82 ^a	67.36±1.57 ^c	0.05±0.02 ^c
2	S-GC	%10 DMSO	13.26±2.26 ^d	6.94±1.43 ^a	79.76±0.83 ^b	0.04±0.01 ^c
3	S-GC	%5 GLISEROL	58.37±0.56 ^b	0.86±0.05 ^b	40.65±0.52 ^d	0.11±0.01 ^b
4	S-GC	%10 GLISEROL	60.03±0.29 ^b	0.89±0.06 ^b	38.96±0.34 ^d	0.11±0.02 ^b
5	S-GC	%0	84.08±0.13 ^a	6.87±0.25 ^a	8.80±0.12 ^e	0.24±0.00 ^a
6	S-GC	Pozitif Kontrol	8.67±0.50 ^e	0.35±0.07 ^b	90.93±0.45 ^a	0.03±0.00 ^c

*S-GC: sığır granüloza hücresi, ^{a-e}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.6: Sığır granüloza hücrelerinde MTT analiz sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	S-GC	%5 DMSO	120.20±9.07 ^b
2	S-GC	%10 DMSO	89.39±6.88 ^c
3	S-GC	%5 GLISEROL	120.81±10.50 ^b
4	S-GC	%10 GLISEROL	149.41±11.00 ^a
5	S-GC	%0	6.11±3.21 ^d

^{a-d}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Sığır granüloza hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu en yüksek canlılık oranı %10 DMSO ile alınırken (Çizelge 4.5), aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası MTT analizinde en yüksek proliferasyon oranı %10 gliserol konsantrasyonunda bulunmuştur (Çizelge 4.6). Çözüm sonrası hemen yapılan analiz sonucuna göre DMSO ile dondurulan hücrelerin canlılık oranlarının gliserol ile dondurulan hücrelerden yüksek olduğu tespit edilirken, aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrasında gliserol gruplarının proliferasyon oranlarının DMSO gruplarını geçtiği veya benzer oranlara ulaştığı görülmüştür. Kriyoprotektan kullanılmayan grubun canlılık ve proliferasyon oranları ise tüm grupların gerisinde kalmıştır. Kriyoprotektan gruplarının hepsinin canlılık oranları pozitif kontrol grubundan düşük çıkmış, ancak en yakın değer %10 DMSO konsantrasyonundan alındığı görülmüştür.

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.04-0.11 arasında değişmiştir. Kriyoprotektan grupları arasında en yüksek geç apoptotik hücre oranları DMSO gruplarında (%7.39, %6.9), en yüksek nekrotik hücre oranları gliserol gruplarında (% 58.37, %60) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7: Sığır kıkırdak hücrelerinde akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre*	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı (%)	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	S-KR	%5 DMSO	16.49±0.22 ^b	8.68±0.49 ^b	74.73±0.32 ^b	0.09±0.00 ^{b,c}
2	S-KR	%10 DMSO	19.96±0.75 ^b	7.06±0.19 ^b	72.92±0.67 ^b	0.05±0.01 ^{b,c}
3	S-KR	%5 GLISEROL	69.97±0.13 ^a	2.37±0.34 ^c	27.87±0.74 ^c	0.11±0.02 ^b
4	S-KR	%10 GLISEROL	70.57±0.32 ^a	1.82±0.47 ^c	27.48±0.29 ^c	0.12±0.00 ^b
5	S-KR	%0	67.21±0.42 ^a	27.29±1.15 ^a	5.15±0.76 ^d	0.33±0.04 ^a
6	S-KR	Pozitif Kontrol	8.69±2.96 ^c	0.75±0.23 ^c	90.51±3.20 ^a	0.03±0.00 ^c

*S-KR: sığır kıkırdak hücresi, ^{a-c}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.8: Sığır kıkırdak hücrelerinde MTT analiz sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	S-KR	%5 DMSO	187.92±16.31 ^{a,b}
2	S-KR	%10 DMSO	241.43±50.90 ^a
3	S-KR	%5 GLISEROL	146.77±17.49 ^b
4	S-KR	%10 GLISEROL	221.60±6.45 ^{a,b}
5	S-KR	%0	32.10±1.99 ^c

^{a-c} Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Sığır kıkırdak hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu en yüksek canlılık oranları %5 ve %10 DMSO ile alınırken her iki grup arasında istatistiksel fark tespit edilmemiştir (Çizelge4.7), gliserol gruplarında canlılık oranları ise düşük bulunmuştur. Ancak aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası MTT analizlerinde DMSO ve gliserol gruplarının proliferasyon oranları birbirine yakın bulunmuştur (Çizelge 4.8). Kriyoprotektan kullanılmayan grubun canlılık ve proliferasyon oranları ise tüm grupların gerisinde kalmıştır. Kriyoprotektan gruplarının hepsinin canlılık oranları pozitif kontrol

grubundan düşük çıkmış, ancak en yakın değerlerin DMSO konsantrasyonlarından alındığı görülmüştür.

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.05-0.12 arasında değişmiş, ancak gruplar arasında istatistik fark tespit edilmemiştir. Kriyoprotektan grupları arasında en yüksek geç apoptotik hücre oranları DMSO gruplarında (%7, %8.6), en yüksek nekrotik hücre oranları gliserol gruplarında (%69.9, % 70.57) tespit edilmiştir.

4.2. Deney 2- DMSO ve gliserol karşılaştırması deney sonuçları (karton kutu)

Bu deney gruplarda koyun ve sığira ait granüloza hücreleri %5, %10 DMSO ve gliserol konsantrasyonlarında karton kutu içinde -80 °C’de derin dondurucuda 24 saat bekletilerek dondurulmuş ve daha sonra çözülerek analiz edilmiştir. Dondurma işlemi uygulanmayan kültürdeki hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücrelerin akış sitometrisi ve MTT analiz sonuçları çizelge 4.9-4.12 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.9: Karton kutuda dondurulan koyun granüloza hücrelerinin akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı (%)	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	K-GC	%5 DMSO	21.37±1.22 ^c	6.51±0.18 ^c	72.05±1.40 ^c	0.05±0.00 ^b
2	K-GC	%10 DMSO	12.77±0.63 ^d	3.81±0.31 ^d	83.38±0.44 ^b	0.03±0.01 ^b
3	K-GC	%5 GLISEROL	37.57±1.10 ^b	8.67±0.12 ^a	53.66±1.11 ^d	0.09±0.01 ^a
4	K-GC	%10 GLISEROL	44.39±0.83 ^a	7.48±0.10 ^b	48.07±0.72 ^e	0.04±0.00 ^b
5	K-GC	Pozitif Kontrol	6.15±0.07 ^e	1.21±0.13 ^e	92.60±0.20 ^a	0.02±0.00 ^b

^{a-e}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.10: Karton kutuda dondurulan koyun granüloza hücrelerinin MTT analiz sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	K-GC	%5 DMSO	107.23±2.22 ^b
2	K-GC	%10 DMSO	92.82±6.84 ^b
3	K-GC	%5 GLISEROL	96.76±6.62 ^b
4	K-GC	%10 GLISEROL	211.44±31.90 ^a

^{a,b}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Koyun granüloza hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu en yüksek canlılık oranı %10 DMSO ile alınırken (Çizelge 4.9), aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası MTT analizinde en yüksek proliferasyon oranı %10 gliserol konsantrasyonunda bulunmuştur (Çizelge 4.10). Çözüm sonrası hemen yapılan analiz sonucuna göre DMSO ile dondurulan hücrelerin canlılık oranlarının gliserol ile dondurulan hücrelerden yüksek olduğu tespit edilirken, aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrasında en yüksek proliferasyon oranı %10 gliserol konsantrasyonundan alınmış, diğer grupların canlılık oranları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Kriyoprotektan gruplarının hepsinin canlılık oranları pozitif kontrol grubundan düşük çıkmış, ancak en yakın değerler %10 DMSO konsantrasyonundan alındığı görülmüştür.

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.03-0.09 arasında değişmiştir. Kriyoprotektan grupları arasında en yüksek geç apoptotik hücre oranları %5 gliserol (%8.6), en yüksek nekrotik hücre oranı %10 gliserol grubunda (%44) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11: Karton kutuda dondurulan sığır granüloza hücrelerinin akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	S-GC	%5 DMSO	11.72±0.21 ^c	2.74±0.11 ^a	85.45±0.29 ^b	0.07±0.01 ^b
2	S-GC	%10 DMSO	8.91±0.02 ^d	2.16±0.06 ^b	88.80±0.08 ^a	0.13±0.00 ^a
3	S-GC	%5 GLISEROL	61.09±0.14 ^a	1.35±0.12 ^c	37.45±0.03 ^d	0.10±0.01 ^{a,b}
4	S-GC	%10 GLISEROL	52.50±0.25 ^b	2.24±0.01 ^b	46.79±1.51 ^c	0.13±0.00 ^a
5	S-GC	Pozitif Kontrol	8.67±0.50 ^d	0.35±0.07 ^d	90.93±0.45 ^a	0.03±0.00 ^c

^{a-d}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.12: Karton kutuda dondurulansığır granüloza hücrelerinin MTT analizi sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	S-GC	%5 DMSO	71.18±2.83 ^b
2	S-GC	%10 DMSO	123.19±17.35 ^a
3	S-GC	%5 GLISEROL	27.23±9.79 ^c
4	S-GC	%10 GLISEROL	44.98±7.84 ^{b,c}

^{a-c} Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

P<0.05

Sığır granüloza hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu (Çizelge 4.11), ve 24 saat kültür sonrası MTT analizi sonucunda (Çizelge 4.12), en yüksek canlılık ve proliferasyon oranları %10 DMSO konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Her iki analiz sonucuna göre DMSO ile dondurulan hücrelerin canlılık ve proliferasyon oranlarının gliserol ile dondurulan hücrelerden yüksek olduğu bulunmuştur. Kriyoprotektan gruplarının %10 DMSO hariç canlılık oranları pozitif kontrol grubundan düşük çıkmış ve %10 DMSO konsantrasyon grubu ile pozitif kontrol arasında istatistiksel fark bulunmamıştır.

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.03-0.13 arasında değişmiştir. Kriyoprotektan grupları arasında en yüksek geç apoptotik hücre oranları %5 DMSO (%2.74), en yüksek nekrotik hücre oranları %5 (%61) gliserol gruplarında tespit edilmiştir.

4.3. Deney 3- DMSO ve gliserol karşılaştırması deney sonuçları (köpük kutu)

Bu deney gruplarda koyun ve sığira ait granüloza hücreleri %5, %10 DMSO ve gliserol konsantrasyonlarında köpük kutu içinde -80°C'de derin dondurucuda 24 saat bekletilerek dondurulmuş ve daha sonra çözülerek analiz edilmiştir. Dondurma işlemi uygulanmayan kültürdeki hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücrelerin akış sitometrisi ve MTT analiz sonuçları çizelge 4.13-4.16 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.13: Köpük kutuda dondurulan koyun granüloza hücrelerinin akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı (%)	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	K-GC	%5 DMSO	17.78±0.97 ^c	7.97±0.37 ^a	74.13±1.14 ^b	0.11±0.00 ^b
2	K-GC	%10 DMSO	25.35±1.33 ^b	0.48±0.02 ^e	73.91±1.36 ^b	0.24±0.07 ^a
3	K-GC	%5 GLISEROL	52.36±0.23 ^a	5.59±0.17 ^b	41.91±0.08 ^d	0.12±0.00 ^b
4	K-GC	%10 GLISEROL	51.09±0.12 ^a	2.85±0.04 ^c	45.81±0.08 ^c	0.24±0.02 ^a
5	K-GC	Pozitif Kontrol	6.15±0.71 ^d	1.21±0.13 ^d	92.60±0.20 ^a	0.02±0.00 ^b

^{a-d}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.14: Köpük kutuda dondurulan koyun granüloza hücrelerinin MTT analiz sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	K-GC	%5 DMSO	128.46±17.19 ^a
2	K-GC	%10 DMSO	110.43±3.70 ^{a,b}
3	K-GC	%5 GLISEROL	71.88±0.63 ^c
4	K-GC	%10 GLISEROL	91.37±4.05 ^{b,c}

^{a-c} Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

P<0.05

Koyun granüloza hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu (Çizelge 4.13), en yüksek canlılık oranları DMSO ile dondurulan hücrelerden elde edilmiş, gliserol kullanılan hücrelerin canlılık oranları daha düşük bulunmuştur. DMSO nun iki konsantrasyonu arasında istatistiksel fark tespit edilmemiştir. Aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası MTT analizinde en yüksek proliferasyon oranları yine DMSO ile dondurulan hücrelerden elde edilmiş, ancak gliserol ile dondurulan hücrelerin proliferasyon oranlarının da arttığı görülmüştür. Kriyoprotektan gruplarının hepsinin canlılık oranları pozitif kontrol grubundan düşük çıkmış, ancak en yakın değerlerin DMSO konsantrasyon gruplarından alındığı görülmüştür (Çizelge 4.14).

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.11-0.24 arasında değişmiştir. Kriyoprotektan grupları arasında en yüksek geç apoptotik hücre oranları %5 DMSO (%7.9), en yüksek nekrotik hücre oranları gliserol gruplarında (%51-52) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15: Köpük kutuda dondurulan sığır granüloza hücrelerinin akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı (%)	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	S-GC	%5 DMSO	13.68±1.39 ^c	3.00±0.11 ^a	83.14±1.46 ^{a,b}	0.16±0.03 ^a
2	S-GC	%10 DMSO	15.44±0.30 ^c	2.93±0.13 ^a	81.43±0.17 ^b	0.19±0.03 ^a
3	S-GC	%5 GLISEROL	58.46±5.67 ^a	1.11±0.11 ^c	40.29±5.82 ^d	0.13±0.03 ^a
4	S-GC	%10 GLISEROL	48.73±1.03 ^b	1.99±0.23 ^b	49.04±1.23 ^c	0.22±0.01 ^a
5	S-GC	Pozitif Kontrol	8.67±0.50 ^c	0.35±0.07 ^d	90.93±0.45 ^a	0.03±0.00 ^b

^{a-d} Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.16: Köpük kutuda dondurulan sığır granüloza hücrelerinin MTT analiz sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	S-GC	%5 DMSO	46.52±3.75 ^a
2	S-GC	%10 DMSO	46.54±4.80 ^a
3	S-GC	%5 GLISEROL	23.51±1.96 ^b
4	S-GC	%10 GLISEROL	27.24±3.20 ^b

^{a,b}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Sığır granüloza hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu (Çizelge 4.15), en yüksek canlılık oranları DMSO ile dondurulan hücrelerden elde edilmiş, gliserol kullanılan hücrelerin canlılık oranları daha düşük bulunmuştur. DMSO nun iki konsantrasyonu arasında istatistiksel fark tespit edilmemiştir. Aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası MTT analizinde en yüksek proliferasyon oranları yine DMSO ile dondurulan hücrelerden elde edilmiş, ancak hem DMSO hemde gliserol ile dondurulan hücrelerin proliferasyon oranlarının düştüğü belirlenmiştir. Kriyoprotektan gruplarının hepsinin canlılık oranları pozitif kontrol grubundan düşük çıkmış, ancak en yakın değerlerin DMSO konsantrasyon gruplarından alındığı görülmüştür (Çizelge 4.16).

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.13-0.22 arasında değişmiştir. Kriyoprotektan grupları arasında en yüksek geç apoptotik hücre oranları DMSO gruplarında (% 2.93-3), en yüksek nekrotik hücre oranı %5 gliserol grubunda (% 58.46) tespit edilmiştir.

4.4. Deney 4- Saklama sırasında ısı değişikliği deney sonuçları

Isı değişikliği deney gruplarında sığır ve koyuna ait granüloza hücreleri genelde tercih edilen ve daha iyi sonuç verdiği belirtilen kriyoprotektan (DMSO) ile dondurulmuştur. DMSO'nun iki farklı konsantrasyonu kullanılarak Mr. Frosty içinde -80°C'de 24 saat bekletilerek dondurulan hücreler daha sonra iki gruba ayrılıp bir kısmı karton kutu ve bir kısmı Mr. Frosty içersine yerleştirilmiştir. Daha sonra içinde dondurulmuş hücrelerin bulunduğu karton kutu ve Mr. Frosty 24 saat boyunca -20°C'de bekletilmiş ve sonrasında tekrar -80°C derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Dondurma işlemi uygulanmayan kültürdeki hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu hücrelerin çözüldükten sonraki analiz sonuçları çizelge 4.17-4.20 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.17: Koyun granüloza hücreleri ısı değişikliği deney grubu akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı (%)	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	K-GC	%5 DMSO Mr. Frosty	48.80±0.37 ^b	1.66±0.10 ^{b,c}	49.43±0.41 ^d	0.10±0.00 ^{a,b}
2	K-GC	%10 DMSO Mr. Frosty	24.42±0.18 ^d	6.09±0.68 ^a	69.40±0.16 ^b	0.09±0.00 ^b
3	K-GC	%5 DMSO Kutu	76.26±0.24 ^a	1.98±0.15 ^c	21.62±0.37 ^e	0.13±0.01 ^a
4	K-GC	%10 DMSO Kutu	39.29±0.27 ^c	4.12±0.37 ^b	56.46±0.27 ^c	0.11±0.00 ^{a,b}
5	K-GC	Pozitif Kontrol	6.15±0.07 ^e	1.21±0.13 ^d	92.60±0.20 ^a	0.02±0.00 ^c

^{a-e}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.18: Koyun granüloza hücreleri ısı değişikliği deney grubu MTT analiz sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	K-GC	%5 DMSO Mr. Frosty	40.00±8.11 ^{a,b}
2	K-GC	%10 DMSO Mr. Frosty	56.67±3.73 ^a
3	K-GC	%5 DMSO Kutu	32.32±0.72 ^b
4	K-GC	%10 DMSO Kutu	54.79±7.53 ^{a,b}

^{a,b}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Koyun granüloza hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu (Çizelge 4.17), en yüksek canlılık oranları % 10 DMSO ile dondurulan ve Mr. Frosty’de muhafaza edilen hücrelerden elde edilmiştir. Aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası MTT analizinde %5, %10 DMSO ile dondurulan ve Mr. Frosty’de muhafaza edilen ve %10 DMSO ile dondurulan ve karton kutu içinde muhafaza edilen hücrelerin proliferasyon oranları benzer çıkmış, en düşük oran %5 DMSO ile dondurulan ve karton kutu içinde muhafaza edilen hücrelerden elde edilmiştir. Kriyoprotektan gruplarının hepsinin canlılık oranları pozitif kontrol grubundan düşük çıkmış, ancak en yakın değer %10 DMSO konsantrasyonundan alındığı görülmüştür (Çizelge 4.18).

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.09-0.13 arasında değişmiştir. Kriyoprotektan grupları arasında en yüksek geç apoptotik hücre oranları %10 DMSO ile dondurulan ve Mr. Frosty’de muhafaza edilen hücrelerde (%6) ve %10 DMSO ile dondurulan ve karton kutuda muhafaza edilen hücrelerde (%4), en yüksek nekrotik hücre

oranı %5 DMSO ile dondurulan ve karton kutuda muhafaza edilen hücrelerde (%76) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.19: Sığır granüloza hücreleri ısı değişikliği deney grubu akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre	Kriyoprotektan	Nekrotik Hücre Oranı (%)	Geç Apoptotik Hücre Oranı	Canlı Hücreler Oranı	Erken Apoptotik Hücre Oranı
1	S-GC	%5 DMSO Mr. Frosty	64.48±0.09 ^b	0.63±0.09 ^{b,c}	36.74±0.14 ^d	0.13±0.01 ^{a,b}
2	S-GC	%10 DMSO Mr. Frosty	21.45±0.42 ^d	1.51±0.12 ^a	76.95±0.50 ^b	0.08±0.00 ^c
3	S-GC	%5 DMSO Kutu	66.30±0.70 ^a	0.84±0.06 ^b	32.70±0.74 ^e	0.15±0.00 ^a
4	S-GC	%10 DMSO Kutu	37.12±0.69 ^c	1.40±0.14 ^a	61.36±0.83 ^c	0.11±0.01 ^{b,c}
5	S-GC	Pozitif Kontrol	8.67±0.50 ^e	0.35±0.07 ^c	90.93±0.45 ^a	0.03±0.00 ^d

^{a-e}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. P<0.05

Çizelge 4.20: Sığır granüloza hücreleri ışık değişikliği deney grubu MTT analiz sonuçları

Gruplar	Hücre	Kriyoprotektan	Proliferasyon
1	S-GC	%5 DMSO Mr. Frosty	17.67±2.14 ^b
2	S-GC	%10 DMSO Mr. Frosty	46.44±4.31 ^a
3	S-GC	%5 DMSO Kutu	21.05±1.49 ^b
4	S-GC	%10 DMSO Kutu	42.73±3.36 ^a

^{a,b}Sütunlarda farklı harflerle belirtilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

P<0.05

Sığır granüloza hücrelerinin çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi analiz sonucu (Çizelge 4.19), en yüksek canlılık oranları % 10 DMSO ile dondurulan Mr. Frosty’de muhafaza edilen hücrelerden elde edilmiştir. Aynı hücrelerin 24 saat kültür sonrası MTT analizinde %10 DMSO ile dondurulan ve Mr. Frosty’de muhafaza edilen hücreler ile %10 DMSO ile dondurulan ve karton kutu içinde muhafaza edilen hücrelerin proliferasyon oranları benzer çıkmış, en düşük oranlar %5 DMSO ile dondurulan ve Mr. Frosty’de muhafaza edilen hücreler ve %5 DMSO ile dondurulan ve karton kutu içinde muhafaza edilen hücrelerden elde edilmiştir. Kriyoprotektan gruplarının hepsinin canlılık oranları pozitif kontrol grubundan düşük çıkmış, ancak en yakın değer %10 DMSO konsantrasyonundan alındığı görülmüştür (Çizelge 20).

Erken apoptotik hücre oranı kriyoprotektan grupları arasında %0.08-0.15 arasında değişmiştir. Kriyoprotektan grupları arasında en yüksek geç apoptotik hücre oranları %10 DMSO ile dondurulan ve Mr. Frosty’de muhafaza edilen hücrelerde (% 1.51) ve % 10 DMSO ile dondurulan ve karton kutu içinde muhafaza edilen hücrelerde (%1.4) tespit edilmiş ve aralarında istatistik fark bulunmamıştır. En yüksek nekrotik hücre oranları %5 DMSO ile dondurulan ve karton kutu içinde muhafaza edilen hücrelerde (%66.3) tespit edilmiştir.

4.5. Mr. Frosty (deney 1), karton kutu (deney 2), köpük kutu (deney 3) içinde dondurulan hücrelerin analiz sonuçları karşılaştırması

Önceki deney gruplarındaki DMSO ve gliserolün %5 ve %10 konsantrasyonlarının üç farklı muhafaza kutusu içinde -80°C derin dondurucuda dondurulan grupların karşılaştırması yapılmış ve çizelge 4.21- 4.24 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.21: Koyun granüloza hücrelerinde Mr. Frosty, Kutu ve Köpük koruyucu kutularında akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre*	Kriyoprotektan	Mr. Frosty Canlılık Oranı (%)	Kutu Canlılık Oranı (%)	Köpük Canlılık Oranı (%)
1	K-GC	%5 DMSO	78.69±0.32 ^{aC}	72.05±1.40 ^{bC}	74.13±1.14 ^{bB}
2	K-GC	%10 DMSO	83.11±1.05 ^{aB}	83.38±0.44 ^{aB}	73.91±1.36 ^{bB}
3	K-GC	%5 GLISEROL	33.37±0.28 ^{cE}	53.66±1.11 ^{aD}	41.91±0.86 ^{bD}
4	K-GC	%10 GLISEROL	71.46±0.33 ^{aD}	48.07±0.72 ^{bE}	45.81±0.08 ^{cC}
5	K-GC	Pozitif Kontrol	92.60±0.20 ^{aA}	92.60±0.20 ^{aA}	92.60±0.20 ^{aA}

*K-GC: koyun granüloza hücresi, istatistik farklar sütunlarda büyük harfler ile satırlarda küçük harfler ile gösterilmiştir. P<0.05

Çizelge 4.22: Koyun granüloza hücrelerinde Mr. Frosty, Kutu ve Köpük koruyucu kutularında MTT analiz sonuçları

Grup	Hücre	Kriyoprotektan	Mr. Frosty Proliferasyon Oranı	Kutu Proliferasyon Oranı	Köpük Proliferasyon Oranı
1	K-GC	%5 DMSO	142.51±10.51 ^{aA}	107.23±2.22 ^{aB}	128.46±17.19 ^{aA}
2	K-GC	%10 DMSO	121.57±6.79 ^{aA}	92.82±6.84 ^{bB}	110.43±3.70 ^{a.b A.B}
3	K-GC	%5 GLISEROL	16.95±11.03 ^{bC}	96.76±6.62 ^{aB}	71.88±0.63 ^{Ac}
4	K-GC	%10 GLISEROL	45.54±5.98 ^{bB}	211.44±31.90 ^{aA}	91.37±4.05 ^{b B.C}

*İstatistik farklar sütunlarda büyük harfler ile satırlarda küçük harfler ile gösterilmiştir. P<0.05

Koyun granüloza hücrelerinin üç farklı kutu kullanılarak dondurulduğu deneylerin akış sitometri sonuçlarına genel olarak bakıldığında DMSO nun gliserole göre daha yüksek canlılık oranı ile sonuçlandığı görülmüştür (Çizelge 4.21). DMSO'nun %5 konsantrasyonunda Mr. Frosty'de dondurulan hücrelerin canlılık oranlarının karton kutu ve köpük kutuda dondurululardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. DMSO nun %10 konsantrasyonunda ise Mr. Frosty ve karton kutuda dondurulan hücrelerin köpük kutuda dondurulanlara oranla daha yüksek canlılık oranına sahip oldukları tespit edilmiş, Mr. Frosty ve karton kutu içinde dondurulan hücrelerin % 10 DMSO konsantrasyonunda canlılık oranları yüksek olurken köpük kutu içinde dondurulanlarda DMSO nun her iki konsantrasyonundan da benzer sonuç alınmıştır. Hücrelerin 24 saat kültür sonrası yapılan MTT analiz sonuçları da genel olarak benzer çıkmıştır. Bununla birlikte gliserol konsantrasyonlarında Mr. Frosty'de dondurulan hücrelerin canlılık oranları oldukça düşükken karton ve köpük kutularda dondurulan hücrelerin canlılık oranlarının yükseldiği ve DMSO konsantrasyonlarına yetiştigi görülmüştür (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.23: Sığır granüloza hücrelerinde Mr. Frosty, Kutu ve Köpük koruyucu kutularında akış sitometrisi analiz sonuçları

Grup	Hücre*	Kriyoprotektan	Mr. Frosty Canlılık Oranı (%)	Kutu Canlılık Oranı (%)	Köpük Canlılık Oranı (%)
1	S-GC	%5 DMSO	67.36±1.57 ^{bC}	85.45±0.29 ^{aB}	83.14±1.46 ^{aA,B}
2	S-GC	%10 DMSO	79.76±0.83 ^{bB}	88.80±0.08 ^{aA}	81.43±0.17 ^{bB}
3	S-GC	%5 GLISEROL	40.65±0.52 ^{aD}	37.45±0.36 ^{aD}	40.29±5.82 ^{aD}
4	S-GC	%10 GLISEROL	38.96±0.34 ^{bD}	46.79±1.51 ^{aC}	49.04±1.23 ^{aC}
5	S-GC	Pozitif Kontrol	90.93±0.45 ^{aA}	90.93±0.45 ^{aA}	90.93±0.45 ^{aA}

*S-GC: sığır granüloza hücresi, istatistik farklar sütunlarda büyük harfler ile satırlarda küçük harfler ile gösterilmiştir. P<0.05

Çizelge 4.24: Sığır granüloza hücrelerinde hücrelerinde Mr. Frosty, Kutu ve Köpük koruyucu kutularında MTT analiz sonuçları

Grup	Hücre	Kriyoprotektan	Mr. Frosty Proliferasyon Oranı	Kutu Proliferasyon Oranı	Köpük Proliferasyon Oranı
1	S-GC	%5 DMSO	120.20±9.07 ^{aB}	71.18±2.83 ^{bB}	46.52±3.75 ^{cA}
2	S-GC	%10 DMSO	89.39±6.88 ^{aC}	123.19±17.35 ^{aA}	46.54±4.80 ^{bA}
3	S-GC	%5 GLISEROL	120.81±10.50 ^{aB}	27.23±9.79 ^{bC}	23.51±1.96 ^{bB}
4	S-GC	%10 GLISEROL	149.41±11.00 ^{aA}	44.98±7.84 ^{b B.C}	27.24±3.20 ^{bB}

*İstatistik farklar sütunlarda büyük harfler ile satırlarda küçük harfler ile gösterilmiştir.
P<0.05

Sığır granüloza hücrelerinin üç farklı kutu kullanılarak dondurulduğu deneylerin akış sitometri sonuçlarına genel olarak bakıldığında koyun hücrelerinde olduğu gibi DMSO nun gliserole göre daha yüksek canlılık oranı ile sonuçlandığı görülmüştür (Çizelge 4.23). Ancak DMSO'nun %5 konsantrasyonunda Mr. Frosty'de dondurulan hücrelerin canlılık oranlarının karton kutu ve köpük kutuda dondurulanlardan daha düşük olduğu belirlenmiştir. DMSO nun %10 konsantrasyonunda ise Mr. Frosty ve köpük kutuda dondurulan hücrelerin canlılık oranları benzer bulunurken en yüksek oran karton kutuda dondurulan hücrelerden elde edilmiştir. Mr. Frosty ve karton kutu içinde dondurulan hücrelerin % 10 DMSO konsantrasyonunda canlılık oranları %5 DMSO konsantrasyonunda dondurulan hücrelerden yüksek olurken köpük kutu içinde dondurulanlarda DMSO nun her iki konsantrasyonundan da benzer sonuç alınmıştır. MTT sonuçları da genel olarak benzer çıkmıştır (Çizelge 4.24). Ancak koyun hücrelerinden farklı olarak karton ve köpük kutuda gliserol kullanılarak dondurulan hücrelerin canlılık oranları oldukça düşükken Mr. Frosty'de dondurulan hücrelerin canlılık oranlarının yükseldiği ve %10 gliserol konsantrasyonunda dondurulan hücrelerin canlılık oranlarının DMSO ile dondurulan hücreleri geçtiği görülmüştür.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

Gen kaynaklarının korunabilmesi nesillerin kaybolma riskine karşı dünyanın geleceği için önemli bir faktördür. Biyolojik materyallerin dondurulup çözündürüldüğünde yaşamsal faaliyetlerin devam ettiğinin keşfedilmesi kaybolan türleri geri getirebilme fikrini beslemiştir. Böylece gen kaynaklarının zarar görmeden uzun yıllar boyunca muhafaza edilebilmesi amacıyla dondurulmuş materyallerin saklandığı gen bankaları kurulmuştur. Hücrelerin sağlıklı bir şekilde dondurulup uzun yıllar muhafaza edilebilmesi için kriyoprotektan adı verilen kimyasal maddeler sayesinde düşük sıcaklıklarda hücre içinde oluşabilecek su kristallerinin önüne geçilebilmektedir. Bu esnada dondurma hızı da oldukça önemli bir faktördür ve termal şoka neden olmayacak şekilde ayarlanması gerekmektedir. Kolay, uygun maliyetli ve güvenilir kriyoprezervasyon protokolleri hücreler ile ilgili daha sonraki çalışmaların başarılı ve etkili bir şekilde uygulanması için çok önemlidir.

Canlı materyallerin dondurulmasında yavaş dondurma, hızlı dondurma ve vitrifikasyon adı verilen farklı yöntemler kullanılmaktadır. Hücre dondurulmasında genelde tercih edilen yöntem yavaş dondurmadır (Freshney 2005, Morris 2007). Birçok laboratuvar, kontrollü yavaş bir dondurma yaklaşımı kullanarak iyi sonuçlar bildirmiştir. Bununla birlikte hücre dondurulmasında farklı yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmalar vardır. Duran ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, Hep-2 ve tavşan böbrek hücrelerine çeşitli dondurma yöntemleri denenmiş ve hücre canlılığına olan etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar hücrelerin dondurulmasında kriyoprotektan olarak %5-10 oranlarında DMSO, gliserol ve Rowe karışımlarını (içeriği %4.2 w/v sorbitol, %35 v/v gliserol) farklı dondurma yöntemlerinde denedikleri çalışmalarında, yavaş dondurma metodunda hücreleri ilk olarak +4°C'de 30 dakika, -20°C'de 30 dakika ve -70°C'de bir gece boyunca beklettikten sonra sıvı azota geçirmişler, orta hızda dondurma metodunda ilk önce +4°C'de 30 dakika, kristalizasyonun başlaması için -20°C'de 30 dakika boyunca beklettikten sonra sıvı azota bırakmışlar, hızlı dondurma metodunda ise hücreleri +4°C'de 30 dakika boyunca beklettikten sonra direkt sıvı azota aktarmışlardır. Yapılan bu çalışmada üç farklı dondurma yönteminden çıkan sonuçlar karşılaştırıldığında en yüksek hücre canlılığının yavaş dondurma metodu ile sağlanmış olduğu görülmüş, %10 konsantrasyonunda kullanılan DMSO, gliserol ve Rowe karışımı sonuçlarına bakıldığında en yüksek canlılık oranını DMSO'nun sağladığını belirtilmiştir. Cetinkaya ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada ise sığır kas ve kıkırdak hücrelerinin

dondurulmasında yavaş dondurma tekniği ve vitrifikasyon tekniğini karşılaştırılmıştır. Kriyoprotektan madde olarak DMSO tercih edilmiş ve %5-10 oranları denenmiştir. Araştırmacılar en iyi sonucun 1°C/dk ısı düşmesi ile yavaş dondurma yönteminden alındığını dondurma hızının daha yavaş gerçekleştiği gruplarda başarı azalırken, hızın artırıldığı gruplarda başarı oranının hücre tipine göre değişkenlik gösterdiğini belirtmişlerdir. DMSO konsantrasyonları karşılaştırıldığında ise %10 oranının uygulandığı grupların daha fazla başarı sağlamış olduğu belirtilmiştir. Cetinkaya ve Arat (2011)'ın yaptığı başka bir çalışmada kas ve kıkırdak hücreleri kontrollü dondurma makinesinde ısının 0.5, 1, 2 C/dk düşürülmesi ile yavaş dondurulmuş erişkin kıkırdak hücrelerinin canlılık oranları sırasıyla % 60.8, %78.3, %80 olarak bulunmuş ancak aralarında istatistiksel fark tespit edilmediği bildirilmiş ve vitrifikasyon uygulanan erişkin kıkırdak hücreleri ile de yavaş dondurma sonuçlarına benzer canlılık oranı elde edilmiştir. Ancak aynı çalışmada kas hücrelerinde en yüksek canlılık oranı (%74) 1°C/dk ısı düşmesi ile dondurulan hücrelerden elde edilirken, vitrifikasyon uygulanan hem kas, hemde fetal kıkırdak (sırasıyla %49, %33) hücrelerinde canlılık oranı düşmüştür. Naaldijk ve ark. (2013) uyguladıkları kontrollü hızlı dondurmanın, 1°C/dk kontrollü yavaş dondurmadan ve vitrifikasyondan daha düşük hücre verimi ile sonuçlandığını belirtmişlerdir. Ayrıca Xu ve ark. (2012) mezenkimal kök hücrelerde hızlı dondurmanın (5-10°C/dk) hücre iskeletine yavaş dondurmadan (1°C/dk) daha fazla zarar verdiğini belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında %5 ve %10 DMSO ve gliserol konsantrasyonları ile genelde daha iyi sonuç verdiği belirtilen 1°C/dk kontrollü yavaş dondurma yöntemi tercih edilmiş, diğer çalışmalarla benzer şekilde en yüksek canlılık oranı %10 DMSO konsantrasyonundan elde edilmiştir.

Hücrelerin kriyoprezervasyonunun uygun olmayan yavaşlıkta veya hızda yapılması hücreler için öldürücü olabilmektedir. Hücrenin canlılığı etkileyen faktörlerden bazıları, ekstra ve intraselüler solüsyondaki önemli değişikliklerin dondurma sırasında suyun uzaklaşmasına sebep olması ve bu sırada meydana gelen ısı transferleridir. Çoğu hücre hatları 1 ila 5°C/dk ısı düşmesi ile yavaş dondurulur. Bu hızdaki farklılık hücre tiplerine göre değişen hücre büyüklüğü, membran yapısı ve dayanıklılığı ile ilgilidir. Bu yavaş ısı düşüşü en iyi bir şekilde programlanabilir dondurma cihazları ile sağlanır. Ancak daha ucuz ve pratik yöntem kalın karton, polistren veya köpük kutu olarak gösterilmekle birlikte en iyi alternatifin ısıyı -80°C'ye kadar 1°C/dk düşüren polistren özel bir dondurma kutusu (Mr. Frosty) olduğu belirtilmektedir (Masters 2000, Freshney 2005, Morris 2007). Hücre dondurulması ile ilgili çeşitli çalışmalarda bu kutunun tercih edildiği görülmektedir (Gómez ve ark. 2008, Stacey ve Masters 2008, (Naaldijk ve ark. 2013, 2016)). Baust ve ark. (2007), hücrelerin kontrollü

dondurma makinesi kullanarak ısının -80°C 'ye kadar $1^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ düşürülmesi ile yavaş dondurulmasının, donmamış hücrelere kıyasla eşdeğer hücre verimi ile sonuçlandığını belirtirlerken, Naaldijk ve ark. (2013) Mr. Frostry'de dondurdukları hücrelerden elde ettikleri verimin kontrollü dondurma makinesinde donduralan hücrelere oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İki çalışmada da ısı $1^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ile -80°C 'ye kadar yavaş düşürülmüş ancak iki farklı cihaz kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında Mr. Frosty'nin yanı sıra karton ve köpük kutular içinde dondurma işlemi yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. İstatistiksel veriler doğrultusunda sonuçlar hücre canlılığı bazında karşılaştırıldığında ısının farklı oranlarda yavaş düşmesini sağlayan üç koruyucu kutu içinde dondurulan hücrelerin canlılık oranlarında büyük bir fark gözlenmemiştir. Fakat hücre tipi ve uygulanan kriyoprotektan çeşidine bağlı olarak canlılık yüzdeleri değişkenlik göstermiştir. Bu tez çalışması ve diğerlerinde yavaş dondurma sonuçlarındaki farklılık hücre tipi farkına, farklı kriyoprotektan karışımlarına, uygulamadaki farklılıklara bağlı olarak meydana gelmiş olabilir ancak Naaldijk ve ark. (2013)'nın da belirttiği gibi bu farklı ortamlarda donma dinamiğinin ayrıntılarını keşfetmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Naaldijk ve ark. (2013) hücre kriyoprezervasyonu üzerine yayınlanan verilerin birçoğunun çözüm sonrası hücre geri kazanımının ölçülmesi şeklinde yapıldığını ((Pasch ve ark. 1999, 2000), Rindler ve ark. 1999), ancak bunun farklı dondurma protokollerinin hücre üzerindeki etkisinin gözlemlenmesi için yeterli olmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar donma ile ilişkili hücre ölümünün, çözümden 24 saat sonra belirlenebildiğini (Borderie ve ark. 1998, Saraste ve Pulkki 2000) ve bir dondurma protokolü ile ilgili gözlenen belirgin faydaların, hücre çözüldükten hemen sonraki ve devam eden kültüründeki zaman noktası ile korelasyon göstermediğini ve bu yüzden kendi çalışmalarında hücreleri hem çözer çözmez tripan mavisi ile boyayarak hemde kültüre ettikten sonra MTT ile analiz etmişlerdir. Araştırmacılar primer fibroblast hücrelerini 8 farklı protokol ile hem kontrollü dondurma makinesi, hem de Mr. Frosty kullanarak yavaş olarak, veya vitrifikasyon yöntemi ile dondurdukları çalışmalarında çözüm sonrası canlılık oranları ile kültür sonrasında yapılan MTT analizi proliferasyon sonuçlarının korelasyon göstermediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada çözüm sonrası hemen tespit edilen verilere göre farklı bir protokolün, kültür sonrası elde edilen verilere göre ise farklı bir protokolün daha yüksek canlılık oranı verdiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında ise hücreler çözüm sonrası hemen akış sitometrisi analizi ile ve 24 saat kültür sonrasında da MTT ile analiz edilmiş ancak daha önceki çalışmadan farklı olarak her iki analiz sonuçlarının grupların büyük çoğunluğunda korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Sadece bazı deney

gruplarında çözüm sonrası hemen analiz edildiğinde düşük canlılık oranı veren gliserol dondurma gruplarının 24 saat kültür sonrası proliferasyon oranlarının arttığı görülmüştür. Bu çalışmanın diğerinden farklı olmasının sebebi çözüm sonrası uygulanan akış sitometrisi analiz yönteminin önceki çalışmada uygulanan tripan mavisi yönteminden daha hassas olması ve daha doğru ve güvenilir sonuç vermiş olması olabilir.

Başarılı bir dondurma işlemi için kullanılan kriyoprotektanın toksik etkili olmaması gerekir. Bu nedenle mevcut kriyoprotektanların farklı konsantrasyonlarının çeşitli hücre tiplerinde meydana getirebileceği zararlar ve onlara alternatif olabilecek yeni kriyoprotektanlar veya kombinasyonlar üzerinde çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Örneğin, Clapisson ve ark. (1999) periferik kan kök hücreleri ile çalışmışlar ve bu hücrelerin dondurulmasında Hidroksietil Nişasta (HES)'nin DMSO'dan daha az toksik etki göstermesi sebebi ile iki farklı dondurma grubu oluşturmuşlardır. Hücrelerin bir kısmı yalnızca %10 DMSO uygulaması ile dondurulmuş, bir kısmı da %3 HES+%5 DMSO çözeltisi uygulanarak dondurulmuştur. Çalışma sonrasında veri sonuçlarına göre %3 HES+%5 DMSO çözeltisinin, uygulandığı grup hem canlılık bakımından hem de Granülosit Makrofaj Koloni Oluşturan Birim (GM-CFU) aktivitesi bakımından daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Ancak başka bir çalışma tam tersi olarak HES'in daha toksik olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada Graham ve ark. (2015) tavukdan elde ettikleri kırmızı kan hücrelerinin dondurulmasında gliserol, DMSO ve HES çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarda etkilerini incelemişlerdir. Gliserol (%20), DMSO (%10), HES (%7.5, %11.5, %20) konsantrasyonlarını uygulayarak dondurmaya gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonrasında nekroz ve geç apoptoz değerlerine bakıldığında %10 DMSO konsantrasyonunda %3 ve %20, gliserol konsantrasyonunda %1 gibi düşük değerler gözlemlenirken HES konsantrasyonlarında %60-80 aralığında değerler bulunmuştur. Ayrıca taramalı elektron mikroskobu ile inceleme sonucu en fazla membran değişikliği %20 HES konsantrasyonunda ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar kriyoprotektan olarak HES'in tek başına kullanıldığında diğerlerine kıyasla başarısız olduğunu hücre tipi veya kullanılan yöntemin buna sebebiyet vermiş olabileceğini değerlendirilmişlerdir. Buna karşın Gomez ve ark. (2008) tarafından dondurulmuş hücrelerin nükleer transferdeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kedi fibroblast hücreleri %10 DMSO uygulanarak, Mr. Frosty içerisinde dondurulmuş, nekrotik ve apoptotik hücre oranlarının arttığı sonucuna varılmıştır. Naaldijk ve ark. (2016) insan deri fibroblastların ve keratinositlerin dondurulmasında %10 DMSO+%90 FCS, %5 DMSO+%95 FCS, %5 DMSO+%5 HES+%90 FCS, %10 HES+%90 FCS, %10 HES+%90 DMEM ve %10 DMSO+%90 DMEM gibi dondurma solüsyonları

uygulanmış ve canlılık üzerine ne gibi etkiler yarattığını araştırmışlardır. Çözündürüldükten sonra canlılık ve 3 gün kültür sonrasında hücre proliferasyonlarına bakılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Keratinositlerin dondurulmasında %10 HES veya %5 HES+%5 DMSO çözeltisi uygulamalarında her ikisinde uygun olabileceğini belirtirken insan deri fibroblastların dondurulmasında %5 HES+%5 DMSO solüsyonunun canlılık üzerinde daha fazla başarı sağladığını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında farklı konsantrasyonlarda DMSO ve gliserol kullanılarak farklı kutuların içinde dondurma işleminin yapıldığı tüm deney gruplarında erken apoptotik hücre oranı %1'in (%0.02-%0.24) altında bulunmuştur. DMSO konsantrasyonlarında geç apoptotik hücre oranı %0.48-%8.63 arasında değişmiştir. Bu oranlar gliserol gruplarında %0.72-%8.6 arasında bulunmuştur. Ancak nekrotik hücre oranları apoptotik hücre oranlarından yüksek bulunmuş ve en yüksek nekrotik hücre oranları gliserol gruplarında (%44.35-%70.57) görülmüştür. Bu oranlar DMSO grupların %8-%25 arasında değişmiştir. Çalışmamız değerlendirildiğinde DMSO birçok koşulda %10 konsantrasyonunda başarılı bulunmuştur. Apototik hücre oranlarına karşın nekrotik hücre oranlarının daha yüksek olması dondurma protokollerinin hücreye verdiği mekanik hasarın kriyoprotektanın verdiği toksik/apoptotik etkiden daha fazla olduğunu göstermektedir.

Uygulanan kriyoprotektanların dondurmadaki başarısı, dondurma protokolüne, yonteme, malzemelere ve dondurulan hücrenin tipine, hücrenin çözüm sonrası kriyoprotektana maruz kalma süresine bağlı olarak değişebilmektedir. Dondurma solüsyonlarında kullanılan kriyoprotektanlara uzun süre maruz kalma onun toksik etkisini artırabilir. Nitekim Alsalim ve ark. (2018) kültür ortamına %4 DMSO takviyesinin, 24 saat sonra, %2 DMSO takviyesinin 48 saat sonra hücre canlılığı üzerinde önemli olumsuz etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu konsantrasyonlarda DMSO uygulamasının süre arttıkça olumsuz etkisinde arttığını canlılık oranının %20'nin altına düştüğünü bildirmişlerdir. Choresca ve ark. (2010), benzer şekilde kültür medyumuna DMSO katılmasının 48 saat sonra yüksek oranda apoptotik hücre oranına sebep olduğunu, Koo ve ark (2009) aynı etkinin 24 saat sonra görüldüğünü bildirmişlerdir. Her iki çalışmada da hücreler sinkronizasyon amacıyla kullanılan DMSO'ya 37°C'de kültür ortamında uzun süre maruz kalmışlardır. Bu tez çalışmasında uygulanan %5 ve %10 DMSO konsantrasyonunun apoptotik hücre oranında artışa ve hücre canlılığında çok büyük azalmaya yol açmamasının sebebi hücrelerin DMSO'ya oda ısısında kısa süre maruz kalması ve hemen dondurulması, hızlı çözüm sonrasında da DMSO'nun kısa sürede ortamdan uzaklaştırılması olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilerin sonuçlarına bakıldığında DMSO'nun gliserole göre hücreleri, dondurmanın zararlı etkisinden daha fazla koruduğu görülmüştür. Uygulanan %10 dozu %5'e göre daha başarılı sonuçlar vermiştir. Günümüzde yapılan dondurma çalışmalarında da en fazla kullanılan kriyoprotektanlardan ikisi DMSO ve gliserol olmuştur. Bu iki kriyoprotektanın karşılaştırıldığı çalışmalarda DMSO'nun daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiş (Guan ve ark. 2006, Duran ve ark. 2001) ve bu nedenle gliserolün hücreler üzerinde daha az toksik etki gösterdiği bilinmesine rağmen DMSO'nun kullanılması önerilmiştir. Bu sonuçlar tez çalışmamızdaki sonuçlar ile uyumludur. Daha önceki çalışmalarda DMSO'nun daha iyi sonuç vermesinin sebebinin, hücre içerisine gliserole göre daha hızlı diffüze olabilmesi ve bunun sonucunda da daha yüksek kriyoprotektif etki göstermesi olduğu değerlendirilmiştir (McGann 1978, Anchoroguy ve ark. 1991, Rinkes ve ark. 1992, Freshney 2005).

Yapılan çalışmalarda yüksek canlılık oranları elde etmek için sukroz, trehaloz, sığır serum albumini (BSA), sığır serumu gibi çeşitli şekerler, proteinler ve protein kaynaklarının olumlu sonuçlar vermesi, onların hücre dondurulmasında kullanılan hücre içine giremeyen kriyoprotektan maddeler olarak adlandırılmalarını ve dondurma solusyonlarına dahil edilmelerini sağlamıştır. Kültüre edilen hücrelerin dondurulmasında standart kriyopreservasyon protokolleri çoğunlukla DMSO ve FCS içerir (Naadijk ve ark. 2016). Bazı araştırmalarda BSA'nın kriyoprezervasyonundaki rolü araştırılmış ve hücre kaynağına veya tipine bağlı olarak değişen sonuçlar elde edilmiştir (Shaw ve Trounsen 1989, Ollero ve ark. 1996, Borderie ve ark. 1998, Duran ve ark. 2001). Borderie ve ark. (1998) insan kornea keratosit hücrelerinin kriyo-prezervasyonunda albuminin iki farklı konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada %2'den %10'a kadar değişen albumin konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerinde etkili olmadığını tesbit ederken, Duran ve ark. (2001), primer tavşan böbrek ve HEp-20 devamlı hücrelerinin kriyoprezervasyonunda, 5, 10, 20 ve 30g/mL sığır serum albuminin etkisini araştırdıkları çalışmalarında en yüksek canlılık oranını %10 dimetil sülfoksit ve 30g/mL albumin içeren dondurma solüsyonundan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Kearney (1991) insan deri keratinosit ve fibroblast hücrelerinin kriyoprezervasyonunu serum varlığında değişik kriyoprotektan maddelerin etkisini araştırdıkları çalışmalarında ise farklı dondurma ve soğutma rejimleri uygulamışlar ve en iyi neticeyi dondurma metoduna bağlı olarak yüksek serum konsantrasyonuyla elde etmişlerdir. Ayrıca DMSO'nun kültür medyumuna katılmasının pH'yi yükselteceği ve bununla hücre canlılığını düşüreceği belirtilmektedir. Bu nedenle çok iyi pH kontrolü sağlayan ve hücreyi

donmanın sebep olduğu hasara karşı koruyan albumini yüksek oranda içeren serumun DMSO ile birlikte kullanımı önerilmekte, kriyoprotektan medyumunda serumun olmamasının hücre canlılığını düşüreceği belirtilmektedir (Morris 2007). Bu tez çalışmasında da DMSO ve gliserolün %5 ve %10 konsantrasyonunda kullanılmış, medyumdaki serum oranı standart %40 olarak uygulanmıştır. Serum içermeyen bir kriyoprotektan uygulama grubu olmadığı için serum etkisinin çalışmadığı bu tez çalışmasında yine de serumun kriyoprotektanlara destek olmuş olabileceği söylenebilir. Bununla birlikte serumun olduğu ancak kriyoprotektanın kullanılmadığı kontrol grubunda hücre canlılık ve proliferasyon oranının çok düşük olması başarılı bir kriyopreservasyon için DMSO ve gliserol gibi bir kriyoprotektana ihtiyaç olduğunu ve canlılık oranında da belirleyici faktörün bu iki madde olduğunu göstermektedir.

Avrupa hayvan hücre kültürleri koleksiyonu (ECACC) hücre bankasında dondurma işleminin programlanabilir dondurucularda yapıldığı, çoğunlukla çözüm sonrası canlılığın %85 den fazla ve normal olarak dondurma öncesindeki canlılık oranından çok az düşük olmasının beklendiği belirtilmektedir. Çözüm sonrası canlılığın %75 altına düşmesi başarısız bir dondurma işlemini gösterir ve kabul edilmez (Morris 2007). Bu tez çalışmasında hücre tipleri ve uygulanan farklı protokollere bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte en yüksek canlılık oranı %10 DMSO konsantrasyonundan elde edilmiş ve grupların büyük kısmında canlılık oranı %80'nin üstüne ve bazılarında %89'un üstüne çıkmıştır.

Kriyoprezervasyon sonrası hücrelerin mümkün olduğunca hızlı bir şekilde çözündürülmesi hücre canlılığı açısından son derece kritiktir. Hızlı çözme ile hücre ölümlerinin ve hasarlarının meydana geldiği kritik rekristalizasyon fazı çabuk bir şekilde geçildiğinden bu sırada oluşabilecek hücre kaybı veya hasarları minimuma indirilebilmektedir (Anchordoguy ve ark. 1987, Wolfe ve ark. 1994) ve bu yüzden hücre yavaş dondurulur ve hızlı çözülür şeklinde özetlenen temel bilgi klasik hücre kültürü kitaplarında yerini almıştır (Masters 2000, Freshney 2005, Morris 2007). Ancak bu temel prensibin bozulabileceği istenmeyen durumlar meydana gelebilir ve hücre tam tersine yavaş çözülürken aynı hücre tekrar yavaş bir şekilde donabilir. Bu durum hücrelerin saklandığı -80°C derin dondurucularda uzun süreli elektrik kesintilerinden sonra tekrar elektriğin gelmesi şeklinde meydana gelebilir ve hücreler fark edilmeden derin dondurucunun içinde yavaş olarak çözülür ve sonra tekrar donar. Bizim çalışmamızda ısı değişikliğinin incelendiği, bu sebeple -80°C'de donmuş olarak saklanan hücrelerin 24 saat boyunca -20°C bekletilip tekrar -80°C'ye alındığı deney grubunda hücre canlılığının ciddi bir şekilde etkilendiği görülmüştür. Koyun hücrelerinde çözüm sonrası canlılık oranı %21-69 arasında değişirken, sığır hücresinde bu oran %32-76 arasında

değişmektedir. Burada hücre canlılığına etki eden faktörün uygulanan kriyoprotektanın dozu ve içinde bekletildiği koruyucu kutu olduğu görülmüştür. En yüksek canlılık oranları her iki hücrede de %10 DMSO konsantrasyonu ile dondurulan ve Mr. Frosty içerisinde ısı değişikliğine uğrayan koyun ve sığır hücrelerinde tespit edilmiş ve sırası ile canlılık oranları %69 ve %76 olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında ısı değişikliğinden hücreleri korumanın en iyi yolu onları %10 DMSO konsantrasyonunda dondurmak ve mümkünse Mr. Frosty içerisinde saklamaktır şeklinde bir değerlendirme yapılabilir.

5.2. Sonuç

Bu çalışma sığır ve koyun dokularından primer kültür yöntemiyle elde edilen kıkırdak ve granüloza hücreleri ile yapılmış, dondurmanın zararını azaltabilmek ve engelleyebilmek için kriyoprotektan olarak DMSO ve gliserol tercih edilmiş ve her ikisinin de %5-10 oranları kıyaslanmış ve tüm deney gruplarında yavaş dondurma tekniği uygulanmıştır. Koyun granüloza hücrelerinde DMSO ve gliserolün %5-10 oranlarının uygulandığı hücrelerde çözüm sonrası hemen yapılan akış sitometrisi sonuçlarına bakıldığında en yüksek canlılık oranı %5 ve %10 DMSO konsantrasyonunun uygulandığı gruplarda bulunmuştur ve canlılık oranlarının sırası ile (%78.69, %83.11) olduğu gözlemlenmiştir. Gliserolün uygulandığı deney gruplarında canlılık oranları DMSO ile kıyaslandığında daha düşük kalmıştır ve %5, %10 gliserol konsantrasyonunda canlılık yüzdeleri sırası ile (%33.37, %71.46) olarak bulunmuştur. Kriyoprotektan kullanılmadığı deney grubunda ise canlılık oranı neredeyse yok denecek kadar azdır ve bu durum kriyoprotektan önemini ortaya çıkarmaktadır. Hücre proliferasyon yüzdelere bakıldığında MTT analiz sonuçlarına göre proliferasyonun en yüksek olarak gözlemlendiği deney grubu yine DMSO grupları olmuştur ve dozlar arasında istatistiksel farka rastlanmamıştır. Gliserol uygulanan gruplarda ise canlılık oranının azaldığı görülmüştür (%16.95, %45.54). Koyun kıkırdak hücrelerine bakıldığında ise çözündürme sonrası en yüksek canlılık yüzdesini sağlayan faktör koyun granülozalarda da olduğu gibi %5-10 DMSO konsantrasyonu (%71.20, %89.38) olmuştur. Gliserol gruplarına bakıldığında %5-10 konsantrasyondaki canlılık oranları sırası ile (%51.62, %75.29) olarak bulunmuştur fakat bu canlılık oranları 24 saat kültür sonrasında düşmüştür ve %10 gliserol konsantrasyonunda proliferasyon, %5 konsantrasyonuna göre daha başarılı (%27.37) olsa da DMSO (%78.12) ile kıyaslandığında oldukça düşüktür. Koyun kıkırdak ve granüloza hücrelerinde genel olarak %10 DMSO konsantrasyonu gayet başarılı sonuçlar vermiştir. Kriyoprotektan uygulanmadan dondurulan hücrelerde ise hem çözüldükten sonraki canlılık yüzdesi hem de kültür sonrası proliferasyon yüzdesi yine oldukça düşük bulunmuştur.

Sığır granüloza hücrelerinde de çözüm sonrasında canlılık oranında başarı sağlayan faktör benzer olarak %10 DMSO konsantrasyonu olmuştur (%79.76). Sığır kıkırdak hücrelerinde ise çözüm sonrasında hücre canlılığı bakımından yine DMSO grupları, gliserol gruplarına göre daha başarılı bulunmuştur ve konsantrasyonlar arasında istatistiksel farka rastlanmamıştır. DMSO %5-10 konsantrasyonunda canlılıklar (%74.92, %72.92) oranlarında bulunurken gliserol konsantrasyonunda bu canlılık oranları oldukça düşüktür (%27.87, %27.48). Kriyoprotektan kullanılmadığı deney gruplarında canlılık yüzdesi her iki hücre tipinde de düşük bulunmuştur (%5, %8). Fakat 24 saat kültür sonrasında proliferasyon oranlarına bakıldığında istatistiksel veri sonuçlarına göre her iki hücre tipinde de hem DMSO hemde gliserol gruplarındaki canlılık oranlarının yükseldiği dikkat çekmiştir. Özellikle çözüm sonrasında canlılık yüzdeleri oldukça düşük bulunan gliserol gruplarında sığır granüloza ve kıkırdak hücreleri kültür sonrası kendini toparlamayı başarmış olsalar da %10 DMSO konsantrasyonu çözüm sonrası canlılık oranları baz alınarak genel anlamda daha başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Koyun granüloza hücrelerinde direkt olarak kutu ve köpük içerisinde dondurulmasının gerçekleştirildiği deney gruplarında çözülme sonrası hücre canlılık yüzdelerine bakıldığında en yüksek oran DMSO konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarında görülmüştür. Koyun granüloza hücrelerinde kutu içerisinde dondurma sonrasında en yüksek canlılık %10 DMSO konsantrasyonunda (%83.38) olarak bulunmuştur. Gliserol uygulanan gruplarda hücre canlılığı DMSO'ya göre daha düşüktür (%48, %53). Köpük kutu içerisinde dondurulan hücrelerde ise DMSO konsantrasyonları arasında istatistiksel farka rastlanmamıştır ve en yüksek canlılık oranları DMSO konsantrasyonlarında bulunmuştur (%73, %74). Karton kutu ve köpük içerisinde dondurulan hücrelerde 24 saat kültür sonrasında proliferasyon oranlarına bakıldığında gliserol gruplarının kendini toparlayıp canlılıklarını (%90, %211) artırdıkları görülmüştür. Sığır hücrelerinde ise hem karton hemde köpük içerisinde dondurulan hücrelerde canlılık oranının yüksek olmasını sağlayan faktör diğer bütün gruplarda da olduğu gibi DMSO olmuştur ve %5-10 konsantrasyonları arasında büyük bir fark gözlemlenmemiştir. DMSO konsantrasyonlarında canlılık oranları %85-88 arasında değişirken, köpük kutularda bu oran %81-83 arasında değişmektedir. Gliserol gruplarında canlılık oranları DMSO'ya kıyasla hem kutu hemde köpük deney grubunda da yine düşük bulunmuştur (%37-49). Genel olarak hücre canlılığında başarının sağlanması DMSO uygulaması ile sağlanmış hücrelerin içinde bulundukları ve ısıyı farklı şekilde yavaş düşüren kutuların etkisi görülmemiştir.

Dondurulmuş hücrelerin -80°C derin dondurucuda saklandığı süre içinde büyük ısı değişikliklerine maruz kalmasının ne gibi etkiler yaptığını araştırdığımız deney gruplarında canlılığın yüksek olduğu gruplar %10 DMSO konsantrasyonunun uygulandığı gruplar olmuştur ve Mr. Frosty içerisinde bekletilen hücrelerde canlılık yüzdesi karton kutuda bekletilenlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. DMSO'nun %10 konsantrasyonlarında Mr. Frosty veya kutu içerisinde -20°C'de bekletilen ve sonrasında tekrar bulundukları muhafazalar içerisinde -80°C derin dondurucuda dondurulan koyun granüloza hücrelerinde canlılık oranları sırası ile (%69.40, %56.46) olarak bulunmuştur. Sığır granüloza hücrelerinde ise yine %10 DMSO konsantrasyonlarında daha yüksek canlılık oranları bulunurken bu değerler Mr. Frosty ve kutu olmak üzere sırası ile (%76.95, %61.36) olarak tespit edilmiştir Fakat bu oranların 24 saat kültürün ardından düştüğü dikkat çekmiştir ve koyun granüloza hücrelerinde en yüksek proliferasyon oranı %10 DMSO konsantrasyonlarında Mr. Frosty ve kutu olmak üzere sırası ile (%54.79, %56.67), sığır hücrelerinde (%42.73, %46.44) olarak bulunmuştur. Isı değişiminin hücreler üzerinde oldukça olumsuz etkisi bu deney grubu ile birkez daha görülmüştür. Bu olumsuz etki sonucunda canlılık oranının yüksek olmasını sağlayan etmen ilk olarak hücrelerin içinde bulunduğu koruyucu kutu ve sonrasında hücrelerin dondurulduğu kriyoprotektan ve uygulanan konsantrasyonu olmuştur. Mr. Frosty içerisinde hücrelerin saklanması ve aynı zamanda %10 konsantrasyonunda DMSO uygulaması ile en yüksek canlılık oranı elde edilmiş, ısı değişikliğinin bu şartlar sağlandığında daha iyi tolere edilebildiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada hücre canlılık oranlarının yüksek olarak elde edilmesi önemli bir husustur. Çalışma genelinde apoptoz oranları genel olarak nekrotik hücre oranlarından daha düşük bulunmuştur. Apoptotik hücre oranlarının düşük bulunması hücre canlılık oranındaki düşüklüğün apoptozise neden olan DNA hasarından ziyade, kültürlerdeki manipülasyonların (pasajlama, tripsinleme, pipetleme) veya hücre dondurma ve çözme işlemlerinin hücre membranında oluşturduğu hasar sebebiyle nekrotik hücre oluşumuna bağlı olduğu izlenimini vermektedir. Nekrotik hücre oranının DMSO'ya kıyasla gliserol uygulanan gruplarda daha yüksek olması, DMSO'nun hücreleri donma ve çözülmenin verdiği mekanik etkiden daha iyi koruduğunu göstermektedir. Bunun sebebi olarak DMSO'nun gliserole göre hücre içerisine daha hızlı diffüze olabilmesi olabilir. Çalışmamızda DMSO'nun çok yüksek apoptotik etki göstermemiş olması dondurma ve çözüm işlemleri sırasında toksik etkisinde kaçınmak için hızlı davranılmasına ve çözüm sırasında DMSO'nun ortamdan hemen uzaklaştırılmasına bağlanabilir. Dondurmanın başarısı kriyoprotektan seçimi ve konsantrasyonunun yanı sıra

hücre kültür koşulları, medyumları, tripsin konsantrasyonu, uygulama süresi, hücrenin dış ortamda bekletildiği süre gibi birçok farklı etmene bağlı olarak değişebilir. Ayrıca hücre tipi de sonuçları etkileyen önemli bir faktördür. Bu nedenle her basamakta titiz davranılmalı ve her hücre tipi için farklı gereksinimler olabileceği düşünülerek dondurma protokolü optimize edilmelidir.



6. KAYNAKÇA

- Adams G (2007). The Principle of Freeze-Drying. Methods in Molecular Biology vol: 368, Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ikinci baskı, Ed: J.G. Day ve G.N. Stacey, 15-38.
- Alsalam H, Jafarpohor F, Zadegan F, Nasr-Esfahani M, Niasari-Naslaji A (2018). Epigenotoxic Effect of Dimethyl Sulfoxide on Buffalo somatic Cells and Buffalo-Bovine Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. Faculty of Vet. Med. Uni. of Tehran, Iran. Cell Journal, 20(4): 544-551.
- Ameisen JS (1996). The origin of programmed cell death. Science, 272: 1278-1287.
- Anchordoguy TJ, Cechini CA, Crowee JH, Crowee LM (1991). Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayer. Cryobiology, 28: 467-73.
- Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowee JH (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology, 24: 324-31.
- Andrabi SMH, Maxwell WMC (2007). A Review of Reproductive Biotechnologies For Conservation Of Endangered Mammalian Species. Anim Reprod Sci, 99:223-243.
- Anonim (2011). Programlı Hücre Ölümü (apoptosis), Hücre Ölümü (nekroz) ve Evrim. <https://evrimagaci.org/programli-hucre-olumu-apoptosis-hucre-olumu-nekroz-ve-evrim-257> (erişim tarihi, 20.10.2018).
- Anonim (2016). pH Metre Nedir? <https://inovatifkimyadergisi.com/ph-metre-nedir> (erişim tarihi, 20.10.2018).
- Anonim (2017a). Hassas Teraziler Özellikleri ve Kullanım Alanları. <http://www.fethiyehaber.com/hassas-terazi-ozellikleri-ve-kullanim-alanlari/> (erişim tarihi, 19.10.2018).
- Anonim (2017b). Hücre Döngüsü. <http://biyogram.blogspot.com/2017/09/hucre-dongusu-mitoz-bolunme.html> (erişim tarihi, 17.12.2018).
- Anonim (2018a). Proliferasyon Nedir? <https://www.haber365.com.tr/saglik-haberleri/proliferasyon-nedir-h89823.html> (erişim tarihi, 27.10.2018).
- Anonim (2018b) Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları Tanıtım Kataloğu <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/Katalog%20Türkçe.pdf>, (erişim tarihi, 02.01.2019).
- Arat S (2013). Hayvanlarda Hücre Kültürü. Ders Notları, Tekirdağ.

- Arat S, Caputcu AT, Akkoc T, Pabuccuoğlu S, Sagırkaya H, Cirit U, Nak Y, Koban E, Bağış H, Demir K, Nak D, Senunver A, Kilicaslan R, Tuna B, Cetinkaya G, Denizci M, Aslan O (2011). Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: The Production Of The First Cloned Anatolian Grey Cattle. *Reprod Fertil Develop*, 23: 1012-1023.
- Arat S, Taş A, Cetinkaya G (2008). Primer Hücre Kültürü Uygulamalı Kursu TÜRKHAYGEN-1 Projesi (TUBITAK-MAM-GMBE) Kurs Kitabı, http://www.turkhaygen.gov.tr/doc/cellculture_handbook.pdf (erişim tarihi, 09.02.2019).
- Baguisi, A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe 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.
- Bağış H (2017). Üreme Hücrelerinde Kriyoprezervasyon. *Güncel Biyoteknoloji ve Uygulamaları*, Ed: Munis Dünder, Haydar Bağış, Kayseri, Türkiye, 65-75.
- Baicu SC, Taylor MJ (2002). Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature, new parameters for comparing buffer capacity and efficiency. *Cryobiology*, 45:33-48.
- Baust JM, Vogel MJ, Snyder KK, Van Buskirk RG, Baust JG (2007). Activation of mitochondrial-associated apoptosis contributes to cryopreservation failure. *Cell Preserv Technol*, 5: 155.
- Ben-Nun I, Montague S, Houck M (2011). Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nature*, 8:2-6.
- Borderie VM, Lopez M, Lombet A, Carvajal GS, Cywiler C (1998). Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39 (8): 1511-1519.
- Bozkaya R (2016). Santrifüj Cihazı Nedir, Nasıl Çalışır? <https://www.muhendisbeyinler.net/santrifuj-cihazı-nedir-nasıl-calisir/> (erişim tarihi, 08.10.2018).
- Butler M, Christie A (1994). Adaptation of mammalian cells to non-ammonogenic media. *Cytotechnology*, 15:87-94.
- Campbell KH, Loi P, Otaegui PJ, Wilmut I (2003). Cell Cycle Co-Ordination In Embryo Cloning By Nuclear Transfer. *Rev Reprod*, 1:402-46.
- Caputcu AT (2013). Değişik Doku Örneklerinin Farklı Saklama Sürelerinde Korunması ve Vitrikasyon Yönteminin Primer Kültürler Üzerine Olan Etkisinin Farklı Yöntemler Uygulayarak Araştırılması. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye.
- Caputcu AT, Akkoc T, Cetinkaya G, Arat S (2013). Tissue Cryobanking for Conservation Programs: effect of tissue type and storage time after death. *Cell Tissue Bank*, 14:1-10

- Cetinkaya G, Arat S (2011). Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. *Cryobiology*, 63:292-297.
- Cetinkaya G, Tas A, Arat S (2009). Farklı Dondurma Hızlarının Primer Sığır Kas ve Kıkırdak Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi. XVI. Biyoteknoloji Kongresi - Antalya
- Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP (2002). Cloned rabbits production by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 366–369.
- Choresca CH Jr, Koo OJ, Hong SG, Oh HJ, Gomez DK, Kim JH, Lee BC, Park SC (2010). Effect of dimethyl sulfoxide on cell cycle synchronization of goldfish caudal fin derived fibroblasts cells. *Reprod Domest Anim.* 45(5):e73-7.
- Cıncık M (2003). Sperm Kriyoprezervasyonu. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(1): 100-106.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM (1998). Cloned transgenic calves from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256–1258.
- Clapisson G, Salinas C, Malacher P, Michallet M, Philip I, Philip T (1999). Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES)+dimethylsulfoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone. *Electronic Journal of Oncology*, 1, 97-102.
- Cohen JJ (1993). Apoptosis. *Immunol Today*, 14: 126-130.
- Cohen JJ (1998). Apoptosis To be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AA-AA-I)*, 1:1-19.
- Comizzoli P (2017). Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Anim. Reprod*, 14(1): 30-33.
- Cooper GM (2007). *The cell: a molecular approach* 4th ed Sinauer Associates, USA.
- Coşkun G, Özgür H (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Arşiv 20: 145.
- Cseh S, Corselli J, Nehlesen-Cannarella SL, Bailey LL, Szalay AA (1997). The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of Mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology*, 48(1):43-50.
- Cui X, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Rinker B (2007). Cryopreservation of composite tissues and transplantation: preliminary studies. *Cryobiology*, 55, 295-304.
- Davis JM (2011). *Basic Techniques and Media, the Maintenance of Cell Lines and Safety*, . *Animal Cell Culture: Essential Methods*, Ed: John M. Davis, John Wiley & Sons, Incorporated, 2011. ProQuest Ebook Central, <http://ebookcentral.proquest.com/lib/nku/detail.action?docID=675259>.
- Day JG, Stacey GN (2007). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2nd edn, Humana Press. New Jersey.
- Deveci E (2012). Hücre Kültürü. <https://www.dicle.edu.tr/Contents/51538c20-b249-427d-be1f-9527519c8db7.pdf> (erişim, tarihi, 01.11.2018).

- Diaz D, Prieto A, Reyes E, Barcenilla H, Monserrat J, Alvarez-Mon M (2008). Flow cytometry enumeration of apoptotic cancer cells by apoptotic rate. *Methods Mol Biol*, 414,23-33.
- Dunpy CH (2004). Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch Pathol Lab Med*, 128(9): 1004-1022.
- Duran N, Yarkın F, Allahverdiyev A (2001). Çeşitli Dondurma Yöntemlerinin HEP-2 ve Tavşan Böbrek Hücrelerinin Kriyoprezervasyonunda Hücre Canlılığına Etkisi. *Türk Hij. Den. Biyol. Dergisi*, 58(2): 53-60.
- Dursun Ş, Ayturan CZ (2017). Çevre Mikrobiyolojisi Dersi Laboratuvar Föyü. Konya, Türkiye.
- Eren E (2015). Çiftlik Hayvanlarına Ait Fibroblast, Kıkırdak, Granüloza ve Kas Hücrelerinde İmmunohistokimyasal Karakterizasyon ve Hücre Siklus Analizleri. Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, Türkiye.
- ERFP (2003). Guidelines form the constitution of national cryopreservation programmes for farm animals. Publication no 1 of the European Regional Focal Point on Animal Genetic Resources. Hiemstra, SC. (ed).www.hpa.hr/wp-content/uploads/2018/05/2004_ERFPguidelinesCryo_Hiemstra_-OK.pdf (erişim, tarihi, 20.10.2018).
- FAO (2007). Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration, Rome. <http://www.fao.org/3/a-a1404e.pdf> (erişim tarihi, 09.03.2019).
- FAO (2012). Cryoconservation of animal genetic resources <http://www.fao.org/3/i3017e/i3017e00.pdf>, (erişim tarihi, 09.03.2019).
- Freshney IR (2005). Culture of Animal Cell. A Manual of Basic Technique. 5th Edition. Wiley-Liss A John Wiley & Son, Inc. Publication, New Jersey.
- Gage AA (1979). What temperature is lethal for cells. *Dermatol. Surg. Oncol*, 5:456-460.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari GA (2003). Cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424, 635.
- Golstein P, Kroemer G (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32:37-43.
- Gomez MC, Pope CE, Kutner RH, Ricks DM, Lynos LA, Ruhe M, Dumas C, Lyons J, Lopez M, Dresser BL, Reiser J (2008). Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells*. 10(4):469-83.
- Gordon I (2003). Laboratory Production of cattle embryos. *Biotechnology in Agriculture Series No:27*. 2nd edition. CABI Publishing.
- Gozuacik D, Kimchi A (2007). Autophagy and cell death. *Curr Top Dev. Biol*. 78:217-25.
- Graham J, Meola D, Kini N and Hoffman A (2015). Comparison of the effects of glycerol, dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch solutions for cryopreservation of avian red blood cells. *American Journal of Veterinary Research*, 76(6): 487-493.
- Groeneveld E, Tinh NH, Kues W, Vien NT (2008). A protocol for the cryoconservation of breeds by low-cost emergency cell banks-A pilot study. *Animal* 2, 1-8.

- Groeneveld LF, Gregusson S, Guldbbrandtsen B, Hiemstra SJ, Hveem K, Kantanen J, Lohi H, Stroemstedt L, Berg P (2016). Domesticated animal bio-banking: Land of opportunity. PLoS Biol, 14, e1002523.
- Guan J, Urban JP, Li ZH, Ferguson DJ, Gong CY, Cui ZF (2006). Effects of rabbit cooling on articular cartilage. Cryobiology, 52(3);430-9.
- Güleş Ö, Eren Ü (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılması Gereken Yöntemler. Yenyüzyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2: 73-78.
- Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E (2008). Hücrede Apoptoz ve Sağkalım Mekanizmalarının Keşfedilmesi ve Yeni Potansiyel Tedavi Stratejileri. Türk Kardiyol Dern. Arş, 36(2): 120-130.
- Güner U (2018). Using flow cytometry in hydrobiology. <http://www.fisheriessciences.com/fisheries-aqua/using-flow-cytometry-in-hydrobiology.php?aid=691> (erişim tarihi, 20.10.2018).
- Harrison RG (1907). Observations on the living developing nerve fibers. Proc Soc Exp Biol Med. 4:140.
- Heyligers IC, Klein-Nulend J (2005). Detection of living cells in nonprocessed but deep-frozen bone allografts. Cell Tissue Bank, 6:25-31.
- Hoshino Y, Hayashi N, Taniguchi S, Kobayashi N, Sakai K, Otani T, Iritani A, Saeki K (2009). Resurrection of a Bull by Cloning from Organs Frozen without Cryoprotectant in a -80°C Freezer for a Decade. Duke Üniversitesi, USA Plos ONE, 4(1):e4142.
- Jakoby W, Pastan I (1979). Methods in Enzymology. Academic Press., San Diego.
- Jochims CE, Valk JB, Stafleu FR, Baumans V (2002). The use of fetal bovine serum, ethical or scientific problem. Altern Lab Anim. 30:219-27.
- Kanev M, Muranlı FDG (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. SAÜ Fen Bilimleri Dergisi 20. (1): 33-38.
- Karaboz İ, Kayar E, Akar S (2008). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 6(2):01-18.
- 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.
- Kearney JN (1991). Cryopreservation of cultured skin cells. Burns, 17 (5): 380-3.
- Kılıç D, Kesim S, Sümer Z, Öztürk A (2012). Üç Farklı Dolgu Materyalinin Fibroblast Ataşmasına Etkisinin in Vitro Olarak Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences), 21(2): 87-94.
- Koçaklı Z, Akıllıoğlu K, Doğan A (2015). Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 24(3): 390-401.
- Koo OJ, Hossein MS, Hong SG, Martinez- Conejero JA, Lee BC (2009). Cell cycle synchronization of canine ear fibroblasts for somatic cell nuclear transfer. Zygote, 17(1):37-43.

- Kurt FÖ (2016). Hücre Çözme, Dondurma ve Pasajlama. Yakın Doğu Üniversitesi Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu Notları, 2-66.
- Laken HA, Leonard MW (2001). Understanding and modulating apoptosis in industrial cell culture. *Curr Opin Biotechnol.* 12:175-9.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS (2005). Dogs cloned from somatic cells. *Nature*,436-641.
- 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.
- Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF (2006). Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Biol.* 293, 439–448.
- Lieberman J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 67: 1671- 1680.
- Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang X, Lu y, Wang Z, Poo M, Sun Q (2018). Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *US National Library of Medicine National Institutes of Health, Cell*,172(4):881-887.e7.
- Loi P, Matsukawa K, Ptak G, Clinton M, Fulka JJR, Nathan Y, Arav A (2008). Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. *Plos One*; 3(8): e2978.
- Masters JR (2000). *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, Oxford University Press, USA.
- Mastromonaco GF, González-Grajales LA, Filice M and Comizzoli P (2014). Somatic cells, stem cells, and induced pluripotent stem cells: how do they now contribute to conservation? *Adv Exp Med Biol*, 753:385427.
- Mazur P (1984). Freezing of living cell: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 247:125-142.
- McGann LE (1978). Different actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, 15(4): 380-90.
- Mis L, Yeltekin A (2014). Apoptosis. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 3(1): 102-112.
- Morris CB (2007). Cryopreservation of Animal and Human Cell Lines, *Methods in Molecular Biology* vo: 368, Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ikinci baskı, Ed: J.G. Day ve G.N.Stacey, 227-236.
- Mossman T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Naaldijk Y, Friedrich-Stöckigt, Sethe S, Stolzing A (2013). Comparison of different cooling rates for fibroblast and keratinocyte cryopreservation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10.1002/term.1815.
- Naaldijk Y, Johnson A, Friedrich-Stöckigt A and Stolzing A (2016). Cryopreservation of dermal fibroblasts and keratinocytes in hydroxyethyl starch-based cryoprotectants. *Naaldijk Et Al. BMC Biotechnology*, 16-85.

- Nicotera P, Bernassola F, Melino G (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23:2757-2765.
- Oktar N (2009). K562 Hücre Dizisinde Fosfin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkisinin MTT (3-[4,5-DIMETHYLTHIAZOLE-2- YL]-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE; THIAZOLYL BLUE) İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye.
- Ollero M, Blanco TM, Lopez Perez MJ, Cebrian Perez JA (1996). Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 680 (1-2): 154-64.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289, 1188–1190.
- Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperges C, Hanen C (1998). Early Features Of Apoptosis Detected By Four Different Flow Cytometry Assays. *Apoptosis*, 3:115-120.
- Özbaş E (2017). Otoklav Nedir? www.muhendisbeyinler.net/otoklav-nedir/. (erişim tarihi, 15.12.2018).
- Palasz AT, Mapletoft RJ (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14(2): 127-149.
- Park SP, Kim EY, Oh JH, Nam HK, Lee KS, Park SY, Park EM, Yoon SH, Chung KS, Lim JH (2000). Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum Reprod*, 15(8): 1787-1790.
- Pasch J, Schiefer A, Heschel I, Dimoudis N, Rau G (2000). Variation of the HES concentration for the cryopreservation of keratinocytes in suspensions and in monolayers. *Cryobiology*, 41: 89 –96.
- Pasch J, Schiefer A, Heschel I, Rau G (1999) Cryopreservation of keratinocytes in a monolayer. *Cryobiology*, 39: 158 –168.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH S (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407, 86–90.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666-667.
- Pombinho AR, Laizé V, Molha DM, Marques SM, Cancela ML (2004). Development of two bone-derived cell lines from the marine teleost *Sparus aurata*, evidence for extracellular matrix mineralization and cell-type-specific expression of matrix gla protein and osteocalcin. *Cell Tissue Res*. 315:393-406.
- Rall WF, Fahy GM (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos. *Nature*, 313: 573-574.
- Rayos AA, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H (1994). Quick freezing of unfertilized Mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J Reprod Fertil*. 100(1):123-129.

- Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR (2011). Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assesment Of Cell Death. *Journal Of Visualized Experiments (Jove)*, 50:2597, Doi: 10.3791/2597.
- Rindler V, Pasch J, Heschel I, Rau G (1999). Cryopreservation of suspended keratinocytes with hydroxyethylstarch. *CryoLett*20:3–12.
- Rinkes IH, Toner M, Ezzel RM, Tompkins RG, Yarmush ML (1992). Effect of dimethyl sulfoxide on cultured rat hepatocytes in sandwich configuration. *Cryobiology*, 29 (4): 443-53.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W (2003). *Histology: A text and Atlas with Cell and Molecular Biology*. 4th Edition, A Wolters Kluwer Company.
- Ryan J.(2004) General Guide for Cryogenically Storing Animal Cell Cultures, https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/t_cryoanimalcc.pdf (erişim tarihi, 04.02.2019).
- Ryder OA (2002). Cloning Advances and Challenges For Conservation. *Trends Biotechnol* 20;231-232.
- Sağırkaya H, Bağış H (2003). Memeli Embriyolarının Kriyoprezervasyonu. *Uludağ Üniversitesi J. Fac. Vet. Med.* 22, 1-2-3: 127-135.
- Saraste A, Pulkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45: 528–537.
- Schwartzman RA, Cidloski JA (1993). Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death, *Endocrine Reviews* 14: 133-144.
- Seki S, Mazur P (2009). The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology*, 59: 75-82.
- Seki S, Mazur P (2011). Stability of mouse oocytes at -80°C: the role of the recrystallization of intracellular ice. *Reproduction*, 141: 407-415.
- Selokar NL, Sharma P, Krishna A, Kumar D, Kumar D, Saini M, Sharma A, Vijavalakshmy K, Yadav PS (2018). Establishment of a Somatic Cell Bank for Indian Buffalo Breeds and Assessing the Suitability of the Cryopreserved Cells for Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell Reprogram.* Jun;20(3):157-163.
- Sevim Tüten E, Özdil F, Ünal Özkan E, Arat S (2017). Nükleer Transfer ile Elde Edilen Klon Sığır ve Yavrularının mtDNA ve Mikrosatellit Belirteçlerle Karakterizasyonu. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14 (02):150-157.
- Shaw JM, Trounsen A (1989). Effect of dimethyl sulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embriyos frozen with a rapid freezing technique. *Cryobiology*, 26 (5): 413-21.
- 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. *Biol. Reprod*,77, 285–291.2
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*,415-859.

- 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.
- Stacey GN, Masters JR (2008). Cryopreservation and banking of mammalian cell lines, *Nature Protocols*, 3(12): 1981-89.
- Stolzin A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S (2012). HES in cryopreservation-Mechanisms, benefits and problems. *Transfusion and Apheresis Science*, 46: 137-147.
- Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462.
- Tokur O, Aksoy A (2017). In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1): 112-118.
- Tomatır AG (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinikleri Dergisi J Med. Sci*, 23(6): 499-5028.
- Tunalı G (2014). Sprem kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü. *Erkek Üreme Sağlığı, Derleme, Androloji Bülteni*, 16(57): 123-128.
- Türker E (2017). Hücre Proliferasyonu ve Testleri. <https://docplayer.biz.tr/45643354-Hucre-proliferasyonu-ve-testleri.html> (erişim tarihi,27.10.2018).
- Vignon X, Chesne P, Le Bourhis D, Flechon JE, Heyman Y, Renard JB (1998). Developmental Potential Of Bovine Embryos Reconstructed From Enucleated Matured Oocytes Fused With Cultured Somatic Cells. *CR Acad Sci*, 321(9):735-745.
- Wakayama, T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369–374.
- Walker JM, Rapley R (2008). *Molecular Biomethods Handbook*, 2nd Edition Humana Press. Totowa, NJ. Pp 917-947.
- Wani NA, Wernery U, Hassan FAH, Wernery R, Skidmore JA (2010). Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 82: 373–379.
- Wells D. N. A, Misica, P.M, Tervit, H. R., and Vivanco, W. H. (1998). Adult somatic cell NT in used to preserve the last surviving cow of Enderby Island cattle breed. *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 369–378.
- Wildt DE, Wemmer C (1999). Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. *Biodivers. Conserv*, 8965-976.
- Wilmut I, Schnieke A, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810–813.
- Wolfe J, Yan Z, Pope J (1994). Hydration forces and membrane stresses. cryobiological implication and a new technique for measurement. *Biophys Chem*, 49: 51-8.
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ (2003). A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 301, 1063.

- Xu X, Liu Y, Cui Z, Wei Y, Zhang L (2012). Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation. *J Biotechnol*, 162: 224–231.
- Yalçın AD (2014) Apoptosis. <https://www.slideshare.net/ArzuDidemYALCIN/apoptosis-41886244> (erişim tarihi, 25.10.2018).
- Yaylalı C (2007). Tendon kılıfı fibroblastlarının hücre kültüründe tenositlere farklılaşması ve tenositlerin sentezlediği kollajen tiplerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi. Ankara, Türkiye.
- Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J (2003). Generation of fertile cloned rates by regulating oocyte activation. *Science*, 302-1179.



7. ÖZGEÇMİŞ

Ezgi SERTER, 12.03.1993 tarihinde Ödemiş/İZMİR’de doğdu. İlköğretim ve ortaöğretimini Kaymakçı Şehit Öğretmen Lokman Çeker İlköğretim Okulu’nda, lise öğretimini Ödemiş Kaymakçı Çok Programlı Anadolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2011 yılında Namık Kemal Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulu’nda bir yıl hazırlık eğitime başladı. Ardından 2012 yılında Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında lisans eğitime başladı ve 2016 yılında mezun oldu. Mezun olduğu aynı yıl Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladı ve 2016 yılı güz döneminden itibaren yüksek lisans eğitime devam etmektedir.

