



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*) GERM
HÜCRE İZOLASYONU ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Sude ATMACA

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Yetiştiricilik Programı

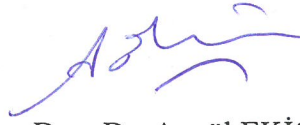
**DANIŞMAN
Doç. Dr. Aygül EKİCİ**

Aralık, 2017

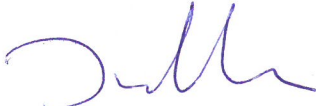
İSTANBUL

Bu çalışma, 22.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Yetiştiricilik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

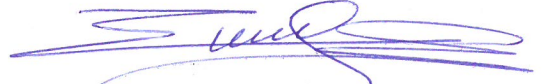
Tez Jürisi



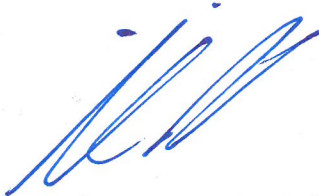
Doç. Dr. Aygül EKİCİ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



Prof. Dr. Devrim MEMİŞ
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



Prof. Dr. İsmihan KARAYÜCEL
Sinop Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ OKTAYOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 59902 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı değerli danışman hocam Doç. Dr. Aygöl EKİCİ'ye; benden yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. M. Didem ERCAN, Araş. Gör. Dr. Çiğdem ÜRKÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İnvert mikroskop çalışmalarımı gerçekleştirdiğim İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Hücre Biyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Füsün ÖZTAY'a; benimle laboratuvar tecrübelerini paylaşarak yardımcı olan doktora öğrencisi Özgecan KAYALAR'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi personeline, deneylerim sırasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Ece SÖNMEZ, İlker KESKİN ve Ege GÜNGÖR'e de çok teşekkür ederim.

En önemlisi beni her zaman destekleyen, öğrenim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen annem rahmetli Yıldız ATMACA, babam Ömer ATMACA'ya ve tezim ile ilgili çalışmalarım da en büyük manevi desteğim olan kardeşlerim Semih ATMACA, Sümeyye ATMACA ve Selim ATMACA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2017

Sude ATMACA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1.GÖKKUŞAĞI ALABALIĞININ GENEL ÖZELLİKLERİ	5
2.1.1.Gökkuşığı Alabalığının Üreme Biyolojisi	5
2.1.1.1. Testis Yapısı	5
2.2.KÖK HÜCRE.....	7
2.3.SPERMATOGENEZ	9
2.4.GERM HÜCRELERİ.....	11
2.4.1.Germ Hücre Göçü.....	14
2.4.2.Balıklarda Germ Hücre İzolasyonu	15
2.4.3.Germ Hücre İşaretleyicileri	17
2.4.4.Germ Hücre İzolasyonunda Kullanılan Yöntemler	17
2.4.4.1. Percoll Gradient Yöntemi	18
2.4.4.2. Akım Sitometrisi Yöntemi.....	19
2.4.4.3. Ficoll Gradient Yöntemi	20
2.4.5.Germ Hücre İzolasyonunun Kullanım Alanları	20
2.4.5.1.Germ Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu	20
2.4.5.2.Germ Hücrelerinin Transplantasyonu.....	21
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	25
3.1.MALZEME	25
3.1.1. Çalışma Yeri	25
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Balıklar	25
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Tamponlar	26

3.1.3.1. Percoll ile İzolasyonda Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Tamponlar	26
3.1.3.2. İmmunofloresan Uygulamalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Tamponlar.....	27
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihaz Ve Ekipmanlar.....	28
3.2. YÖNTEM.....	31
3.2.1 Balık Bakımı ve Muhafazası	31
3.2.2. Balıklardan Kan Alınması	31
3.2.3. Osmotik Basınç Ölçümü.....	32
3.2.4. Enzimatik Ayrım İle Testiküler Hücrelerin İzolasyonu	32
3.2.5. Percoll Gradient İle Gonad Hücrelerinin Ayrımı	34
3.2.6. Histoloji	36
3.2.7. İmmunofloresan İşaretleme	37
3.2.7.1. Percoll Gradient Katmanından Alınan Hücrelerin İmmunofloresan İşaretlenmesi.....	37
3.2.7.2. Doku Kesitlerinde İmmunofloresan İşaretleme Uygulamasına Ait İşlemler	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. OSMOTİK BASINÇ ÖLÇÜMLERİNE AİT BULGULAR.....	40
4.2. PERCOLL GRADIENT İLE GERM HÜCRE İZOLASYONUNA AİT BULGULAR	40
4.3. TESTİS DOKUSU HİSTOLOJİSİNE AİT BULGULAR.....	43
4.4. İMMUNOFLORESAN İŞARETLEME YÖNTEMLERİNE AİT BULGULAR	44
4.4.1. Percoll Gradient Katmanından Alınan Örneklerin İmmunofloresan İşaretlenmesine Ait Bulgular	44
4.4.2. Doku Kesitlerinde İmmunofloresan İşaretleme Uygulamasına Ait Bulgular	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Erkek gökkuşağı alabalığında testis yapısı.	7
Şekil 2.2: Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücreler.	8
Şekil 2.3: Erkeklerde sperm hücrelerinin büyüme ve olgunlaşma süreci (Wootton ve Smith, 2015).	9
Şekil 2.4: Alabalıkta spermatogonya proliferasyonunun kinematığı (Loir, 1999).	10
Şekil 2.5: Nil tilapyasında (<i>Oreochromis niloticus</i>) farklı evrelerdeki Tip A ve Tip B spermatogonya (Lacerda ve diğ., 2014).	11
Şekil 2.6: Embriyonik medaka (<i>Oryzias latipes</i>) germ hücrelerinde bölünme (Nishimura ve Tanaka, 2014).	13
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan gökkuşağı alabalığı.	25
Şekil 3.2: Micro-Osmometre cihazı.	28
Şekil 3.3: Çalkalamalı inkübatör.	29
Şekil 3.4: Soğutmalı santrifüj.	29
Şekil 3.5: Olympus CX 41 marka mikroskop ve görüntüleme sistemi.	30
Şekil 3.6: Çalışmada kullanılan Olympus BX 51 mikroskop ve görüntüleme sistemi.	30
Şekil 3.7: Balıkların muhafaza edildiği tanklar.	31
Şekil 3.8: Balıklardan kan alımı ve santrifüj sonrasında ait görüntü.	32
Şekil 3.9: Germ hücre izolasyonunda kullanılan testis dokusu.	33
Şekil 3.10: Testis dokularının tampon çözelti içerisinde yıkama ve parçalama işlemi.	33
Şekil 3.11: İnkübe edilen örneklerin filtrasyon işlemi.	34
Şekil 3.12: Percoll gradient katmanları; A: filtrasyon sonrası eklenen örnek, B: percoll gradient üst katmanı (%5), C: percoll gradient alt katmanı (%33).	35
Şekil 3.13: Santrifüj sonrası oluşan katmanlara ait görüntü.	36
Şekil 4.1: Percoll gradient oranlarının üst katman görüntüleri, A: %50-%10, B: %55-%10 (Spt; spermatid, D; debris, eGC; erken evre germ hücreleri).	41

- Şekil 4.2:** Percoll gradient oranlarının orta katman görüntüleri, A: %45-%10, B: %50-%10, C,D: %55-%10 (Spt; spermatid, eGC; erken evre germ hücreleri).....42
- Şekil 4.3:** Percoll gradient oranlarının dip katman görüntüleri, A: %45-%10, B: %50-%10, C:%55-%10 (Spt; spermatid, D;debris, E; eritrosit).43
- Şekil 4.4:** Alabalık testis dokusunda erken evre germ hücreleri, Spt; spermatid, Spg A; Tip A spermatogonya, Spg B; Tip B spermatogonya (100x).....44
- Şekil 4.5:** Testiküler hücre nükleuslarının immunofloresan boyamada DAPI ile boyandıktan sonra görüntüsü (oklar ile gösterilmiştir) (40x) (Nikon Eclipse TI).....45
- Şekil 4.6:** Testiküler hücrelerin doku kesitlerinde immunofloresan uygulaması sonucu DDX4-FITC ile boyandıktan sonraki görüntüleri (ok ile gösterilmiştir) (60x) (DDX4: 1-100 FITC: 1-400) (Nikon Eclipse TI).46



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1.1: Türkiye’de su ürünleri yetiştiricilik üretim miktarları ve gökkuşuğu alabalığı yetiştiricilik üretim miktarları (TÜİK, 2016).	2
Tablo 2.1: Balıklarda germ hücre izolasyonu üzerine yapılan çalışmalar.....	16
Tablo 3.1: Percoll ile izolasyonda kullanılan kimyasal malzemeler.	26
Tablo 3.2: İmmunofloresan uygulamalarda kullanılan kimyasal malzemeler.	27
Tablo 3.3: Doku kesitlerinin Hematoksilen-Eosin ile boyanma metodu (Culling, 1963; Hinton, 1990).....	37
Tablo 3.4: Doku kesitlerinde immunofloresan işaretleme uygulama prosedürü.....	38

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°	: Derece
±	: Artı Eksi
%	: Yüzde
μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
cm ³	: Santimetreküp
dk	: Dakika
g	: Merkezkaç Kuvvet
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
kg	: Kilogram
L	: Litre
M	: Molar
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
m ³	: Metreküp
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mOsm	: Mikroozmoz
NaCl	: Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum Dihidrojen Fosfat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
nM	: Nanomolar
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojenin Gücü
rpm	: Rotorun Dakikada Dönüş Hızı
sa.	: Saat
W	: Watt

Kısaltmalar	Açıklama
BSA	: Bovin Serum Albumin
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	: Deoxyribonuclease
eGC	: Erken Evre Germ Hücresi
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GFP	: Yeşil Floresan Protein
GH	: Germ Hücresi
HBSS	: Hank's Dengeli Tuz Çözeltisi
LH	: Lüteinize Edici Hormon
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PGH	: Primordial Germ Hücresi
RNA	: Ribo Nükleik Asit
Spt	: Spermatid
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*) GERM HÜCRE İZOLASYONU ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Sude ATMACA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Aygül EKİCİ

Bu çalışma, ülkemiz iç sularında yetiştiriciliği en fazla yapılan tür olan gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) testis dokusundan percoll gradient santrifüj yöntemi ile erken evre germ hücre izolasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilen ortalama 24,76±1,34 cm boy uzunluğunda ve ortalama 171,9±29,10 gram ağırlığındaki 15 adet erkek gökkuşığı alabalığı kullanılmıştır.

Balıklara ait testis dokusu enzimatik ayrıştırma amacıyla fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisinde % 0.5 trypsin kullanılarak 2 saat süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası örnekler 50 µm'lik filtreden geçirilmiş ve 40 µg/ml Deoxyribonuclease I (DNaz I) ve %1 Bovin Serum Albumin (BSA) eklenmiştir. DNaz, ölü hücrelerden Deoksiribo Nükleik Asitin (DNA) serbest bırakılmasından dolayı ortaya çıkan hücre süspansiyonunun pıhtılaşmasını engellemek ve BSA enzim aktivitesinin durdurulması amacıyla eklenmiştir. Filtrasyon işleminden sonra üç farklı percoll gradient grubu (%45 - %10, %50 - %10 ve %55- %10) oluşturulmuştur. Bu işlem sonrası oluşan her bir katmandaki örnek Olympus CX41 mikroskopta incelenmiştir.

Bu inceleme sonucunda santrifüj sonrası oluşan en üst katmanda; debris ve spermatidler, orta katmanda erken evre germ hücreleri ve az miktarda spermatidler, dip katmanda yer alan pelette ise eritrosit ve yoğun olarak spermatidler tespit edilmiştir. Orta katmanda tespit edilen erken evre germ hücreleri DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box Polypeptid 4 Primer Antikoru (DDX4),

anti-tavşan IgG- keçide üretilen Floresin İzotiyosiyanat Sekonder Antikoru (FITC) ve 4,6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) ile immunofloresan işaretlenmesi sonucunda yalnızca DAPI ile boyanan hücelere ait görüntüler tespit edilmiştir. DAPI tüm testiküler hücelere ait nukleusları boyama özelliğine sahip olduğundan hüceler arasında spesifik bir ayırım elde edilememiştir. Testis dokusundan alınan histolojik kesitlerin Hematoksilen-Eosin ile boyanması sonucunda, spermatogonya Tip A ve B ve spermatid hüceleri tespit edilmiştir. Doku kesitlerinin floresan boyanması sonucunda ise primer antikoru (DDX4) ve sekonder antikoru (FITC) ile işaretlenmiş erken evre germ hüceleri tespit edilmiştir.

Aralık 2017, 77 sayfa.

Anahtar kelimeler: gökkuşuğı alabalığı, erken evre germ hücresi, spermatogonya, percoll gradient, izolasyon



SUMMARY

M.Sc. THESIS

A STUDY on the ISOLATION of GERM CELL in RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

Sude ATMACA

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Aquaculture

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Aygül EKİCİ

This study was carried out to perform early stage germ cell isolation by percoll gradient centrifugation from the testis tissue of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) which is the most cultivated species in the inland waters of our country.

A total of 15 male rainbow trout with an average length of $24,76 \pm 1,34$ cm and an average weight of $171,9 \pm 29,10$ grams obtained from the Sapanca Inland Water Products Research and Application Unit of Faculty of Aquatic Sciences in Istanbul University were used in the study.

Testicular tissue of fishes was incubated with 0.5% trypsin in phosphate buffered saline (PBS) for 2 hours for enzymatic separation. After incubation, samples were passed through a 50 μ m filter and 40 μ g / ml Deoxyribonuclease I (DNase I) and 1% Bovine Serum Albumin (BSA) were added. DNase was added to prevent clotting of the cell suspension resulting from the release of Deoxyribose Nucleic Acid (DNA) from dead cells and BSA was added to stop the enzyme activity. After filtration, three different percoll gradients (45% - 10%, 50% - 10% and 55% - 10%) were formed. The sample on each layer after this procedure was examined under the Olympus CX41 microscope. As a result of this examination, the top layer formed after centrifugation; lipids, debris and spermatids, early-stage germ cells in the middle layer, and erythrocytes and spermatids in the bottom layer of the pellets. The early stage germ cells detected in the middle layer were stained with primer antibody DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box Polypeptid 4 (DDX4), secondary antibody anti-rabbit IgG (whole molecule) FITC antibody produced in goat, and 4,6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI). Immunofluorescence staining showed only staining with DAPI. Since DAPI has staining properties for all testicular cell

nuclei, no specific discrimination between cells has been obtained. Hematoxylin-eosin staining of histological sections from testicular tissue revealed spermatogonia types A and B and spermatid cells. Fluorescent staining of tissue sections revealed early stage germ cells labeled with the primary antibody (DDX4) and the secondary antibody (FITC).

December 2017, 77 pages.

Keywords: rainbow trout, early stage germ cell, spermatogonia, percoll gradient, isolation



1. GİRİŞ

Balık yetiştiriciliğine dair kayıtlı ilk bilgiler, yetiştiriciliğin M.Ö. 2000’li yıllarda Çin’de başlamış olduğunu bildirmektedir. Çin halkının yerleşik hayata geçmesi ile birlikte gıda ihtiyacından doğan yetiştiricilik faaliyetleri sonucunda ilk olarak sazan (*Cyprinus carpio*) yetiştiriciliği gerçekleştirilmiştir (Rabanal, 1988). M.Ö. 500’lü yıllarda ise Fan Lai’nin kitabı balık yetiştiriciliği üzerine yazılı en eski eserdir. Avrupa’da ise balık yetiştiriciliği, erken dönemlerde manastır ve sarayların kontrolü altında olan sulak alanlarda geçici olarak balık tutulmasına izin verilmesi ile başlamıştır. Daha sonra ise yetiştiricilik faaliyetlerinin önem kazanması ile sazan ve alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği gerçekleştirilmiştir. 1970’li yıllara gelindiğinde ise dünyada teknolojinin gelişmesi sonucunda balık yetiştiriciliğinde büyük pazarlarda rekabet artışı ile birlikte, piyasa değeri ve ihraç talebi yüksek olan türler üzerinde yetiştiricilik çalışmaları yoğunlaşarak farklı balık türleri de yetiştiricilik faaliyetlerine kazandırılmıştır (Rabanal,1988).

Gıda ve Tarım Örgütü’ne ait su ürünleri verilerine göre dünyada 2015 yılında 76.641.025 ton su ürünleri üretimi gerçekleştirilmiştir. Ülkemiz ise 2014 yılı verilerine göre 234 bin tondan fazla su ürünleri yetiştiriciliği ile dünyada 23’üncü ve Avrupa’da ise üçüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2016).

Türkiye’de toplam su ürünleri üretimi, 2016 yılında sadece yetiştiricilik üretimi denizlerde 157.510 ton, içsularda 202.898 ton olmak üzere toplam 360.408 ton’dur (Tablo 1.1) (TÜİK, 2016). Ülkemizde başlıca gökkuşuğu alabalığı, çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) türlerinin üretimine ait 2016 yılı verileri sırasıyla 107.013 ton (deniz+içsu), 58.254 ton ve 80.847 ton olarak gerçekleşmiştir. 2016 yılında sadece avcılık yolu ile elde edilen su ürünleri miktarı ise denizlerde 301.464 ton ve içsularda ise 33.856 ton olmak üzere toplam 335.320 ton’dur (TÜİK, 2016).

Gökkuşuğu alabalığı 1800’lü yılların sonunda Kuzey Amerika’dan Avrupa’ya getirilmiş ve yetiştiricilik çalışmalarına başlanarak yıllar içerisinde üretimi hızlı bir artış göstermiştir. Ülkemizde ise yetiştiriciliği 1970’li yıllarda kamu ve özel girişimciler tarafından başlatılmıştır. Bu balığın yetiştiricilik koşullarına kolaylıkla uyum sağlayabilmesi, hastalıklara toleranslı

olması gibi özellikleri nedeniyle günümüzde üretimi yaygın olarak yapılan balık türüdür (Laird ve Needham, 1988; Çağıltay, 2011).

Tablo 1.1: Türkiye’de su ürünleri yetiştiricilik üretim miktarları ve gökkuşağı alabalığı yetiştiricilik üretim miktarları (TÜİK, 2016).

Yıllar	Alabalık Yetiştiricilik Üretimi (ton)			Su Ürünleri Yetiştiricilik Üretimi (ton)		
	Deniz	İçsu	Toplam (ton)	Deniz	İçsu	Toplam (ton)
2010	7.079	78.165	85.244	88.573	78.568	167.141
2011	7.697	100.239	107.936	88.344	100.446	188.790
2012	3.234	111.335	114.569	100.853	111.557	212.410
2013	5.186	122.873	128.059	110.375	123.018	233.393
2014	5.610	107.983	113.593	126.894	108.239	235.133
2015	6.872	101.166	108.038	138.879	101.455	240.334
2016	5.716	101.297	107.013	151.794	101.601	253.395

Ülkemizde tüketim amacıyla yetiştiricilik çalışmalarının gerçekleştirildiği ilk tür olan gökkuşağı alabalığının yetiştirildiği suyun kalite parametresinin “Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik”de yüksek kaliteli su (sınıf I) özelliğinde olması gerektiği ifade edilmektedir (Anon. 2015, syf. 1). Bu özelliğe sahip su kaynağı olarak alabalık yetiştiriciliği uygulamalarında göl, kaynak suyu ve yeraltı suyu kullanılmaktadır (Çelikkale, 2002; Yıldız ve diğ., 2009). Günümüzde “sınıf I” kategorisine giren içme suyu özelliğindeki (Anon. 2015, syf. 1) su kaynaklarının sınırlı ve dolayısıyla değerli olması gökkuşağı alabalığı gibi yetiştiriciliğinde temiz su kaynaklarına gereksinim duyulan türlerin üretimini kısıtlamaktadır.

Günümüzde; özellikle insan etkisi nedeniyle canlı popülasyonlarının nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıyadır. Bu canlı popülasyonları içerisinde yer alan Salmonid ve alabalık türlerine ait üretim miktarlarının artması yanı sıra su kaynaklarının kirlenmesi ve iklim değişikliği gibi nedenlerden dolayı, popülasyonlarında azalma söz konusu olup hatta birkaç türünün de nesli tükenmiş durumdadır. Bu nedenle balık türlerinin neslinin devamlılığının sağlanması için nesli tükenmekte olan türlerin korunması amacıyla gerçekleştirilen uygulamalar giderek önem kazanmaktadır (Okutsu ve diğ., 2008; Lee ve diğ., 2015).

Bu amaçla genetik kaynakların korunmasında kullanılan en yaygın metod canlı bireylerin muhafazasıdır. Ancak, bu strateji birçok riski de beraberinde getirmektedir. Bunlar;

işletmelerde yaşanan kazalar, hastalık gelişimi, genetik sürüklenme gibi olumsuzlukları ortaya çıkarmaktadır. Zaman içerisinde teknolojideki gelişmelere paralel olarak genetik kaynakların korunması ve üretimi yapılan türlerin miktar ve çeşitliliğinin artırılması amacıyla gerçekleştirilen yardımcı üreme teknikleri içerisinde yer alan ovulasyonun indüklenmesi, *in vitro* gametogenez, sperm kriyoprezervasyonu, gen transferi, kromozom manipülasyon teknikleri gibi uygulamaların yanı sıra günümüzde germ hücre transplantasyonu çalışmaları da önem kazanan konulardan biri olmuştur (Yoshizaki ve diğ., 2003; Okutsu ve diğ., 2008; Kawasaki ve diğ., 2015; Lacerda ve diğ., 2013; Mylonas ve diğ., 2010). Bu uygulamalar içerisinde yer alan uzun süreli muhafaza tekniği olarak kriyoprezervasyon genetik kaynakların korunması ve yeni hatların geliştirilmesi amacıyla en yaygın olarak kullanılacak bir yöntemdir (Tiersch, 2008). Ancak balık türleri içerisinde neslin devamlılığını sağlayacak gen kaynaklarından sadece erkek balığa ait kalıtım materyalinin muhafazasına olanak sağlayan sperm kriyoprezervasyonu uygulaması başarı ile gerçekleştirilmektedir (Labbe ve diğ., 2013). Yumurta ve embriyo kriyoprezervasyonu üzerinde sürdürülebilir uygulamaların geliştirilememesi nedeniyle gen kaynaklarının korunmasında sperm kriyoprezervasyonu tek başına yetersiz kalmaktadır (Yoshizaki ve diğ., 2003; Kobayashi ve diğ., 2007; Okutsu ve diğ., 2007). Bu nedenle her iki gamet tipine farklılaşma özelliği gösteren germ hücrelerinin izolasyonu ve kriyoprezervasyonu çalışmaları günümüzde gen kaynaklarının korunması çalışmalarında kullanılmaktadır (Brinster, 2002; Yoshizaki ve diğ., 2003; Kobayashi ve diğ., 2007; Okutsu ve diğ., 2007). İzolasyonu ve kriyoprezervasyonu yapılan germ hücrelerinin farklı balık türlerine transplantasyonu günümüzde yukarıda belirtilen amaçların gerçekleştirilmesi için yapılan güncel çalışmalardır. Balık türlerinde gerçekleştirilen bu uygulama taşıyıcı anaç balık üretim teknolojisine olanak sağlamaktadır. Bu teknoloji ile sperm ve yumurta hücresine farklılaşma özelliğinde olan germ hücresinin donör balıktan elde edilerek alıcı olan taşıyıcı anaç balığa aktarımı gerçekleştirilmektedir. Böylelikle alıcı balığın gonadlarında, donör balığa ait germ hücreleri aktarılmış olduğundan, donör balığa ait germ hücrelerinin gelişimi gerçekleşecektir. Bu teknoloji ile birlikte kriyoprezervasyonu yapılan spermatogonyanın alıcı balığa aktarımı sağlanmakta ve böylelikle fonksiyonel sperm ve yumurta üretimi gerçekleşmektedir (Yoshizaki ve diğ., 2011). Bu uygulama genetik kaynakların muhafazasının yanısıra, yetiştiriciliği yapılamayan türlerin yetiştiricilik çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacıyla da kullanılacak bir uygulamadır (Okutsu ve diğ., 2008; Yoshizaki ve diğ., 2011).

Günümüzde üreme biyoteknolojisi konusu içerisinde yer alan uygulamalardan biri olan germ hücre teknolojisi, genetik kaynakların korunması yanısıra büyük boyuttaki balıklara ait sperm ve yumurta hücrelerinin daha küçük boyuttaki balıkların gonadlarında geliştirilebilmesi amacıyla kullanılabilir önemli bir uygulamadır (Yoshizaki ve diğ., 2012; Yoshizaki ve diğ., 2011). Ayrıca su ürünleri sektörüne yeni türlerin kazandırılması amacıyla kullanılabilir bir uygulamadır.

Dünyada çeşitli balık türleri üzerinde izolasyon, kriyoprezervasyon ve transplantasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi yanısıra ülkemizde henüz bu konuda yapılmış bir çalışma yoktur. Gerçekleştirilen bu yüksek lisans tez çalışmasında model tür olarak tercih edilen gökkuşaklı alabalığı testis dokusuna ait hücrelerin, percoll gradient metodu kullanılarak ayrımı ve germ hücrelerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu hücrelerin Hematoksilen–Eosin histolojik boyama metodu ve immunofloresan boyama metodları ile tespiti gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. GÖKKUŞAĞI ALABALIĞININ GENEL ÖZELLİKLERİ

Salmonidae familyasına ait olan *Oncorhynchus mykiss* (gökkuşığı alabalığı), Kuzey Amerika kökenli bir balık türü olup vücudu tıknaz yapıda, çok sayıda beneklere sahip oluşu ve *Linea lateralis*'in gökkuşağı rengine sahip oluşu ile kolayca ayırt edilir. Abdomen bölgesi gümüşü beyaz ve parlaktır. Vücudun dorsali ise koyu yeşilden kahverengi yeşile kadar değişim gösterir. Kuyruk yüzgeci çatalı kaudal ve adipöz yüzgecinde çok sayıda siyah noktalar vardır (Çelikkale, 2002; Tekelioğlu, 1993).

2.1.1. Gökkuşığı Alabalığının Üreme Biyolojisi

Gökkuşığı alabalığı, besin durumuna ve su sıcaklığına bağlı olarak 3-4 yaşında cinsel olgunluğa ulaşır. Su sıcaklığına bağlı olarak yılın farklı dönemlerinde yumurtlama gerçekleşir. Yumurtlama ve büyüme için gerekli olan optimum su sıcaklık değerleri 9- 14°C arasındadır. Su sıcaklığına bağlı olarak yılın erken döneminde yumurtlayanlar Temmuz ve Ağustos, orta dönemindekiler Kasım ve Aralık, geç dönemdekiler Mart ve Nisan aylarında üremeye hazırdırlar. Üreme dönemlerinde dişilerde karın daha şişkin olup papilla etrafı kırmızı renkli görünümündedir. Dişiler, vücut ağırlığının kg'ı başına 2000 yumurta üretilmekte ve yumurta çapı (3-7 mm) nispeten büyüktür (FAO, 2016). Üreme zamanı erkeklerde alt çene öne doğru uzar, bir kanca şeklinde yukarı kıvrılır ve vücut dişilere göre daha yassıdır. Üreme zamanı yaklaştığında yanıl çizgi boyunca daha koyu ve parlak kırmızı bir şerit taşırlar (Çelikkale, 2002; Çağiltay, 2011). Balığın üremesi; fotoperiyot, su sıcaklığı ve yumurtlama ortamı substratı gibi çevresel manipölasyonlarla kontrol edilmektedir. Bu bağlamda gökkuşağı alabalığında ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde fotoperiyoda bağlı olarak ilkbaharda gametogenez tamamlanır, sonbaharda ise son olgunlaşma, ovulasyon ve spermasyon süreci gerçekleşir (Cabrita ve diğ. 2009).

2.1.1.1. Testis Yapısı

Omurgalılarda üreme, üreme organları olan testis ve yumurtalık içerisinde gelişen iki farklı gametin (sperm ve yumurta) fonksiyonuna bağlı olarak gerçekleşir (Nishimura ve Tanaka, 2014). Gonadlar, bağ dokusundan yapılmış bir stroma içinde ilk cinsiyet şeritleri denilen parmak şeklinde uzantılardan oluşmaktadırlar (Karayücel ve Karayücel, 2016; Timur, 2013; Timur, 2008). Gonad adını verdiğimiz üreme organları vücut boşluğunun dorsal çeperine

mezenterlerle bağlı olup testisi bağlayan mezenter mezorkiryum, ovaryumu bağlayana ise mezovaryum adı verilir. Birçok teleost balıkta gonadların duvarı oviduct ve sperm kanalı oluşturmak üzere arkaya doğru uzanır ve genelde posterior olarak genital açıklığa ulaşınca birleşirler. Her iki testisin son bölümü ürogenital papillaya açılan merkezi efferent kanalda birleşir (Karayücel ve Karayücel, 2016; Timur, 2013). İki üreme organı birbirinden oldukça farklılık göstermekte ancak her ikisi de gelişimsel olarak ortak hücre soylarından, destek hücrelerinden, interstisyel hücrelerden ve germ hücrelerinden meydana gelir (Nishimura ve Tanaka, 2014).

Testis büyüklüğü kemikli balıklar arasında farklılık göstermekle birlikte vücut ağırlığının %0,2'si ile %10'u arasında değişiklik göstermektedir. Diğer omurgalılarda da olduğu gibi birçok kemikli balıkta testisler çift yapıda olup, bilateral olarak karın boşluğu ve yüzme kesesi arasında, böbreklerin altında, vücudun her iki yanında uzunlamasına yer alır. Vücut boşluğunun her iki tarafına ve hava kesesine mezenterium ile asılı vaziyette bulunan testis dokusu beyaz krem renkli, içerisinde spermatozoanın meydana geldiği tübül veya kese şeklindeki lobüllerden oluşmuş bir yapı gösteren yassı bir organdır (Şekil 2.1) (Karayücel ve Karayücel, 2016; Timur, 2013). Alabalıklarda anastomaz tübüler tip testis yapısı bulunmaktadır. Bu testis yapısında bağ dokusu, testiküler kapsül boyunca germ hücrelerini içeren Sertoli hücreleri ile kaplı düzensiz epitelyum ile sarıdır (Karayücel ve Karayücel, 2016). Anastomaz tübüler tip testis yapısında spermatogonyal germ hücreleri (Tip A spermatogonya) lobül boyunca bulunur. Bu testis yapısı bağ dokusunun uzantılarına bağlı olarak türden türe değişkenlik gösterebilir (Billard, 1986). Testisteki bu testiküler üniteleri saran bir bağ doku bulunur. Spermatogenez işleminin gerçekleştiği lobüllerin etrafı ince bir bağ dokusu ile sarılmıştır. Bu bağ doku tabakası spermatogonyaların meydana geleceği germ hücreleri ve destek olan Sertoli hücrelerini içerir (Timur, 2013).

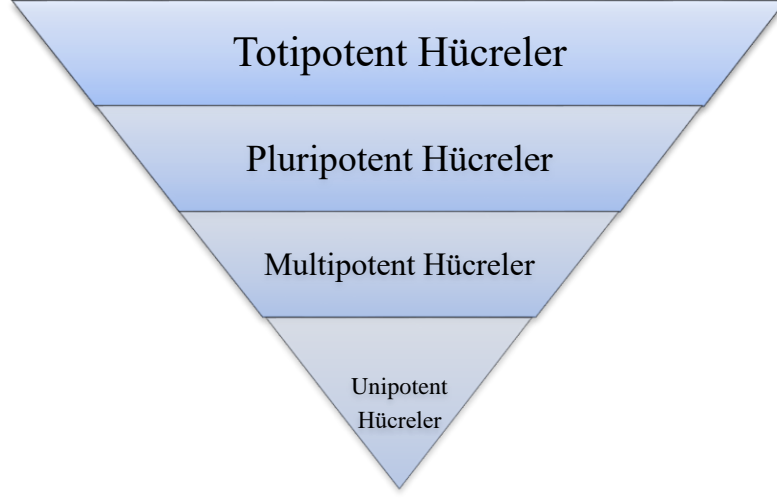


Şekil 2.1: Erkek gökkuşuğu alabalığında testis yapısı.

2.2. KÖK HÜCRE

Kök hücre; bölünme hızları yüksek olan, uzun süre bölünerek kendini yenileyebilen, bir yada daha fazla hücre tipine farklılaşma yeteneğinde olan hücrelerdir (Özel ve diğ., 2008; Can, 2014).

Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücreler dört başlık altında toplanmaktadır. Bu gruplandırmanın en üst sırasında yer alan totipotent hücreler tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahip olan ilk embriyonel hücreler olması nedeni ile embriyoyu ve embriyoya ait ekstra embriyonik membran ve dokuları oluşturabilecek hücrelerdir. Bu hücrelerin bir alt basamağında yer alan pluripotent hücreler, ekstraembriyonik yapılar dışında embriyoya ait üç germ yaprağından gelişen tüm hücreleri oluşturma özelliğindedirler. Pluripotent hücrelerin bir alt basamağında yer alan multipotent kök hücreler ise sadece yer aldıkları dokuya özgü hücreleri değil aynı zamanda farklı dokulara ait hücreleri de oluşturmaktadırlar. Bu özelliğe sahip olmalarından dolayı bu olay *plastisite* olarak adlandırılmaktadır. En alt bölümde yer alan unipotent kök hücreler yada progenitor hücreler ise tek bir hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir (Taş, 2005; Can, 2014; Çek ve diğ., 2016; Özel ve diğ., 2008) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücreler.

İki haploid gametin (spermatozoon ve oosit) döllenmesi ile meydana gelen zigotun mitoz bölünmeleri ile oluşan hücreler (blastomerler) en yüksek farklılaşma kapasitesine sahip olan, tüm hücre tiplerini oluşturabilecek (totipotent) hücrelerdir (Can, 2014; Çek ve diğ., 2016). Bu bağlamda totipotent kök hücreler önce embriyo, daha sonra da tüm dokuların oluşmasına öncülük ederler.

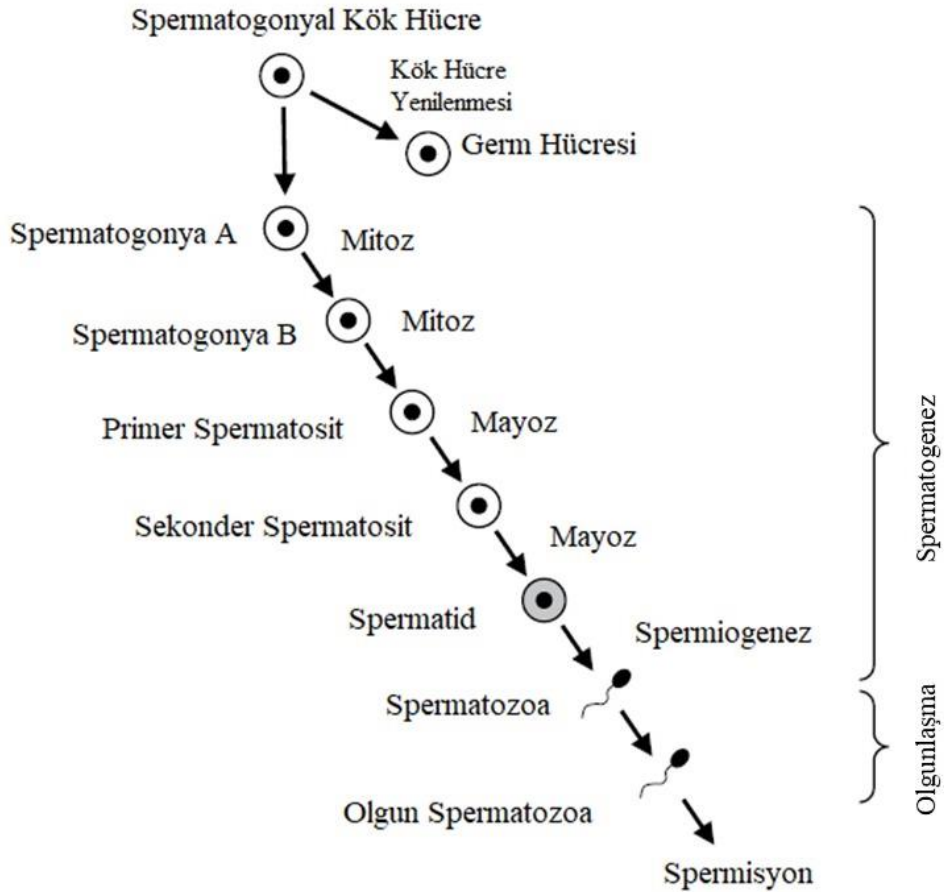
Organizmada üç tip hücre bulunmaktadır. Bunlar; kök hücreler, farklılaşmanın çeşitli aşamalarında bulunan somatik hücreler ve germ hücreleridir. Germ hücreleri embriyonik gelişimin erken safhasında primordial germ hücre (PGH) olarak şekillenir. PGH'ler üç haftalık embriyoda ortaya çıkar ve gonad hücreleri olarak gelişim gösterirler. Memelilerde zigotun birbirini izleyen 5-6 kez bölünmesi ile blastokist oluşur. İnsanlarda 5-6 günlük blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen özel pluripotent hücrelere embriyonik kök hücreler (EKH) denir (Özel ve diğ., 2008; Can, 2014). *In vitro* koşullarda EKH'ler germ hücreleri ve birçok somatik hücre türünü oluşturabilme özelliğine sahiptir (Can, 2014).

Spermatogonyal kök hücreler ise spermatogenezin temelini oluşturmak ve genetik bilgiyi gelecek kuşağa aktarmak için oldukça önemlidir (Nagano ve Yeh, 2013; Valli ve diğ., 2014; Yoshida, 2012). Memelilerde ve balıklarda yapılan araştırmalara göre spermatogonyal kök hücreler, aynı zamanda somatik dokulara farklılaşma yeteneği ile pluripotent hücrelere tekrar programlanabilen ve embriyonik kök hücrelere (EKH) alternatif olarak dönüştürülebilme potansiyelinden dolayı da benzersiz kök hücreler olarak ifade edilmektedir (Lacerda ve diğ., 2014; Conrad ve diğ., 2008; Oatley ve Brinster, 2012; Thoma ve diğ., 2011).

2.3. SPERMATOGENEZ

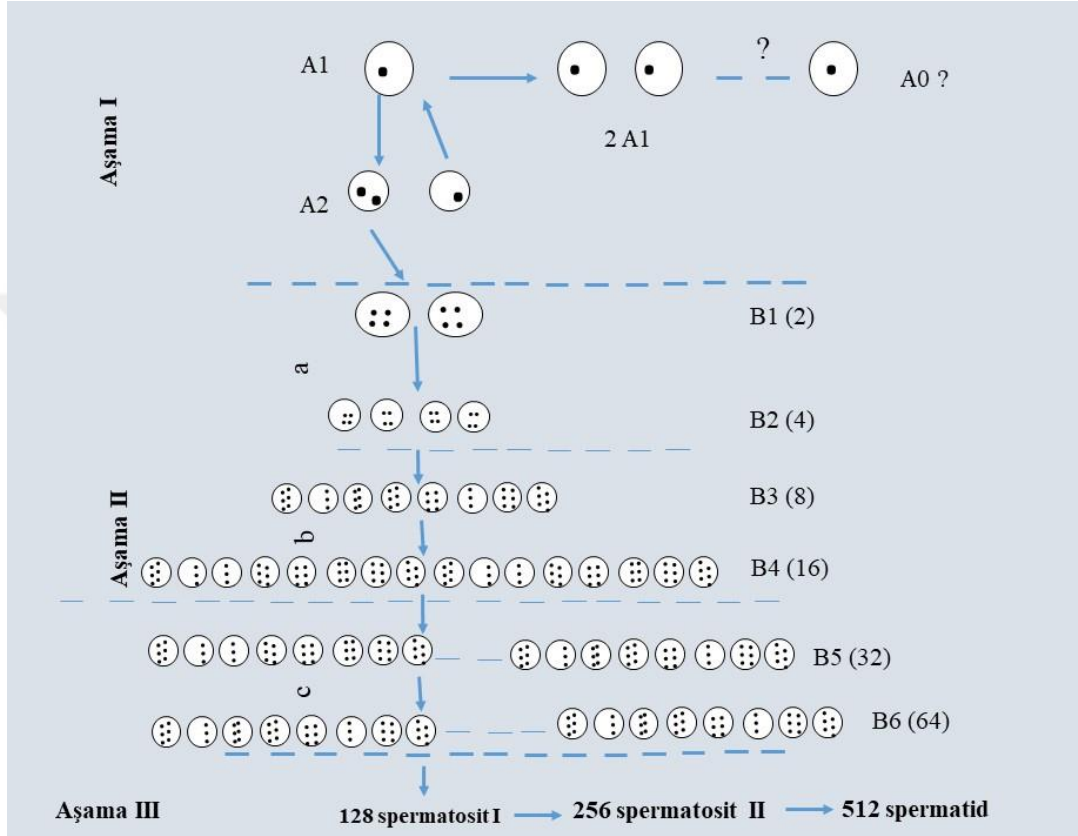
Birçok omurgalıda olduğu gibi, kemikli balıklarda da spermatogenez, hipofiz bezi, Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Lüteinize Edici Hormon (LH) tarafından salgılanan cinsiyet bezlerini uyarıcı hormonlar (gonadotropinler) tarafından düzenlenir. Spermatogenez sürecinde FSH'nin etkisi, spermatogenezin erken safhalarında ve LH'nin etkisi ise daha sonraki safhalarda görülür (Wootton ve Smith, 2015).

Spermatogenez de germ hücrelerinin gelişimi sırasında, hücreler; farklılaşmış spermatogonya, primer spermatozoid hücreleri, sekonder spermatozoid hücreleri, spermatidler ve sperm hücreleri olmak üzere adlandırılırlar (Şekil 2.3). Bu süreçte mayoz başlangıcı, spermatogonya ve spermatozoid hücreleri arasındaki farklılaşmayı başlatan aşamadır (Wootton ve Smith, 2015).



Şekil 2.3: Erkeklerde sperm hücrelerinin büyüme ve olgunlaşma süreci (Wootton ve Smith, 2015).

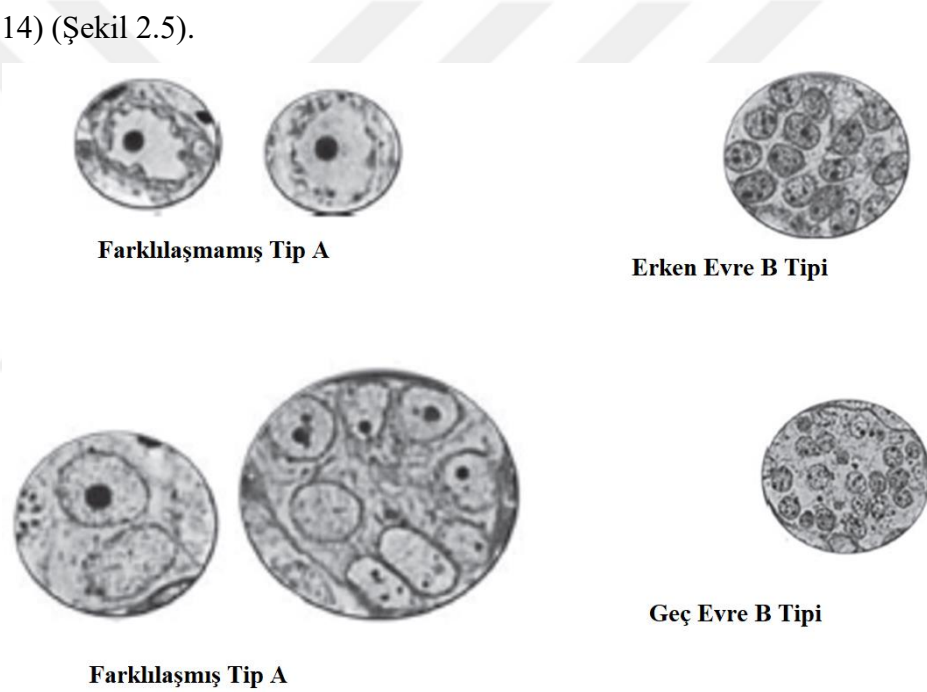
Loir (1999), teleostlarda testis içerisinde spermatogonyanın üreme ve farklılaşmasını kontrol eden mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi ve farklı spermatogonya türlerini tanımlayabilmek için gökkuşağı alabalığı testis dokusunda bulunan hücreleri kültür ortamında çoğaltarak spermatogonya proliferasyon kinematikiğini şematize etmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Alabalıkta spermatogonya proliferasyonunun kinematikiği (Loir, 1999).

Farklılaşmamış spermatogonya Tip A balık testisinden izole edilmiş en büyük germ hücreleridir (Lacerda ve diğ., 2014). Lacerda ve diğ. (2014), Nil tilapyasına (*Oreochromis niloticus*) ait farklılaşmamış tip A spermatogonyanın morfolojik özelliklerini; büyük nükleuslu ve belirgin olarak görülen bir veya iki nükleusa, düşük nükleer heterokromatin içeriği, düzensiz nükleer yapı, çok miktarda perinükleer nüaj (ribonükleoproteinler ve RNA içeren), nükleusa yakın yüksek yoğunlukta mitokondrinin varlığı ve bu mitokondrinin pürüzsüz endoplazmik retikulum ile çevrili olduğunu ifade etmektedirler. Farklılaşmış spermatogonya A hücreleri ise, mitoz bölünmelerden sonra sitokinezi tamamlanmamış olan (sitoplazmik köprüler) 2 ile 8 sist bulunduran germ hücreleridir. Farklılaşmış tip A spermatogonyanın morfolojik özelliklerini ise; bir veya daha fazla nükleolus içeren nükleusa sahip, az miktarda heterokromatin, oval nükleusun etrafını düzenli bir şekilde saran yuvarlak yapı, çok az nüaj içeren yada hiç

içermeyen fazla miktarda sitoplazmik hacimde olarak tanımlanmıştır. Erken evre B tipi spermatogonya, mitotik hücre döngülerinin sayısına bağlı olarak sist içeren 16 yada daha fazla germ hücreleridir. Erken evre B tipi spermatogonyanın morfolojik özellikleri; hücre boyutunda ve nükleer hacminde azalma, iki ya da daha fazla nükleolus içeren nükleus oval ve yuvarlak biçimli, yüksek miktarda heterokromatin içeriğine ve spermatogonya A'ya göre daha küçük hacimde sitoplazmaya sahip hücre olarak tanımlanır. Geç evre B tipi spermatogonya hücreleri ise primer spermatositlerin oluşumundan önceki son hücre tipini temsil ederler. Geç evre B tipi spermatogonyaların morfolojik özellikleri ise; genellikle yuvarlak nükleus olup erken evre B tipi spermatogonyadan daha küçüktür, heterokromatin maksimum yoğunluğa ulaşır, nükleusu yuvarlaktır ve sitoplazma hacmi önceki hücrelerden daha küçük olarak belirlenmiştir (Lacerda ve diğ., 2014) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Nil tilapyasında (*Oreochromis niloticus*) farklı evrelerdeki Tip A ve Tip B spermatogonya (Lacerda ve diğ., 2014).

2.4. GERM HÜCRELERİ

Germ hücreleri, somatik hücrelerden farklı olarak fonksiyonel gametlere farklılaşma ve döllenme süreci ile gelecekteki nesillere genetik bilginin aktarımını gerçekleştirme özelliğindedirler (Brinster, 2002). Birçok organizmada olduğu gibi balıklarda da germ hücreleri embriyonik gelişimin erken safhalarında PGH olarak şekillenir (Braat ve diğ., 1999). Primordial germ hücresi (PGH), germ hücre gelişiminde ilk şekillenen hücre tipi olduğundan germ hücrelerinin ilk oluşum aşamasında kritik öneme sahiptirler (Okutsu ve diğ., 2006).

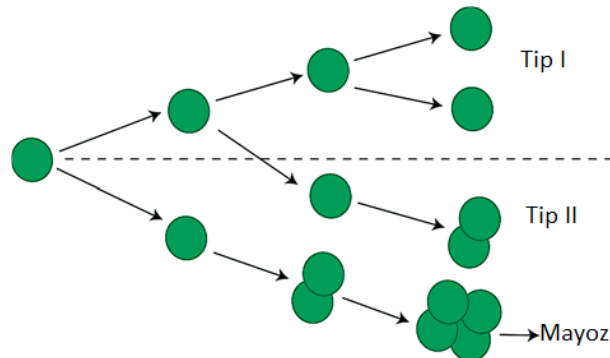
Germ hücreleri, ilkel gelişim aşamasında diğer hücrelerden ayrıldıkları ve gelecekte gonadın oluşacağı bölgeye (genital sırt) göç etmeleri açısından özel hücrelerdir (Nishimura ve Tanaka, 2014). “Germ hücresi” terimi, germ hattına ait tüm evrelerdeki hücreleri tanımlamak için kullanılır ve gelişimlerine, farklılaşma durumlarına ve davranışlarına göre çeşitli safhalara ayrılarak isimlendirilirler (Raz, 2003). Henüz gonada ulaşmamış olan erken dönem germ hücrelerine ilkel germ hücreleri (Can, 2014) veya PGH adı verilir (Nishimura ve Tanaka, 2014). Germ hücreleri; yumurtalıklarda gelişim gösteren ve gamet gelişimini sağlayan, cinsiyeti belirlemede rol oynayan kök hücrelerdir (Braat ve diğ., 1999; Xu ve diğ., 2010). Belirli türlerde PGH'ler gonada mitotik uyku periyoduna girebilir. Bu periyotta pasif olan germ hücrelerine *prospermatogonia* ya da *gonosit* adı verilir. Seksüel olgunlaşma süresince gonositler, oogonia ya da spermatogonya'yı oluşturur ve bu aşamada son farklılaşma olan, dişide yumurta ve erkekte spermelere dönüşmek için mayoza girer (Braat ve diğ., 1999; Xu ve diğ., 2010). Temel bilimlerde, hücre göç mekanizmalarının incelenmesinde, uygulamalı bilimlerde ise nesli tükenmekte olan ve ticari değere sahip yetiştiriciliği yapılan türler için dişi ve erkek bireyden aktarılan genetik materyali koruyan, kriyoprezervasyona en uygun hücre tipi olmalarından dolayı değerlidirler. Örneğin, PGH yada spermatogonyanın ksenojenik (türler arası) transplantasyonu üretim zorluğu olan türlerin yönetilmesi, cinsel olgunluğa ulaşma süresi yıllar alan türlerin daha kısa sürede üretilmesi için çözüm oluşturabilecek bir tekniktir. Bu çalışmalarda germ hücrelerinin alıcı gonada aktarılarak donöre ait fonksiyonel gamet üretimini gerçekleştirmek için uygun olduğu bildirilmektedir (Okutsu ve diğ., 2008).

Klonal mitotik bölünmelerle sadece germ hücreleri üreten ilk embriyonik hücreler PGH'dir ve genellikle morfolojik olarak çevresindeki somatik hücrelerden ayırt edilemeyen PGH öncüllerine, varsayımsal PGH'ler (vPGH'ler) denir (Nieuwkoop ve Sutasurya, 1979; Hong ve diğ., 2016). vPGH, bir PGH ve bir somatik hücre oluşturmak üzere bölünürler. Bu nedenle PGH öncüllerinin sayısı başlangıçtaki PGH sayısı ile eşittir (Hong ve diğ., 2016). Seksüel farklılaşma meydana geldiğinde, germ hücreleri erkek ve dişi gonadlarda farklı yol izler (Raz, 2003).

PGH'ler olgunlaşmamış testisküler hücreler içerisinde bulunan en büyük hücrelerdir. PGH'nin morfolojik özellikleri somatik hücrelerden belirgin bir şekilde farklılık göstermekle birlikte çok daha fazla granüllü bir yapı sergilerler. “Nüaj materyali” gelişimin ilerleyen safhalarında PGH tespitinde ayırt edici özelliğe sahiptirler. Morfolojik olarak spermatogonyalar küresel yapıda bulunur ve genellikle bir ya da üç büyük küresel nukleusa sahiptir (Weisel, 1943). Alabalık

spermatogonya hücrelerinin çapı $5.8\mu\text{m}$ ile $12.4\mu\text{m}$ arasında değişmekle birlikte ortalama $7.7\mu\text{m}$ 'dir (Weisel,1943). Primer spermatozitleri ve daha sonraki spermatogonyayı birbirinden ayırmak zordur, çünkü her ikisinde de nukleus çapı yaklaşık $6.8\mu\text{m}$ 'dir (Weisel, 1943). Spermatozidler ise küresel yapıda olan haploid hücrelerdir, nukleus çapları $3.4\mu\text{m}$ 'dir ve spermatozidlere ait nukleuslar yoğun olarak koyu renkte boyanırlar (Weisel,1943; Karayücel ve Karayücel, 2016).

PGH'lerin oluşumu gelişimin erken döneminde gerçekleşmektedir. Örneğin; medaka balıklarında (*Oryzias latipes*) 32-64 hücre safhasındaki her bir blastomerin PGH üretim kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Hong ve diğ., 2016). Tek bir ilkel gonad yapısı iki bilateral gonad dokusuna bölünürken germ hücreleri tomurcuklanarak çoğalmaya başlar. Primordiadaki germ hücreleri bölünme tiplerine göre tip I ve tip II hücreler olarak karakterize edilirler (Saito ve diğ., 2007). Tip I hücrelerindeki bölünme tipik kök hücrelerine benzeyen kendi kendini yenileyen bölünmeye benzerlik gösterir. Tip I germ hücresi her biri destekleyici hücreler tarafından çevrelenen iki bağlı hücreye bölünür. Tip II hücrelerinde gözlemlenen germ hücrelerinin bölünmesinde, germ hücreleri eşzamanlı ve ardışık olarak bölünür, hücreler arası köprüler ile bağlanır ve daha sonra mayoz bölünme görülür (Şekil 2.5) (Nishimura ve Tanaka, 2014). Erkek medaka balıklarında, germ hücreleri hem embriyonik hem de larva aşamaları boyunca tip I germ hücreleri olarak bölünmeye devam eder. Medaka balığı erkek bireylerinde germ hücreleri, testiküler yapıda lobüller oluştuğunda kuluçka sonrası yaklaşık 30-45 güne kadar tip II bölünme görülmemiştir (Şekil 2.6) (Sato ve Egami, 1972; Sato, 1974; Nishimura ve Tanaka, 2014).



Şekil 2.6: Embriyonik medaka (*Oryzias latipes*) germ hücrelerinde bölünme (Nishimura ve Tanaka, 2014).

2.4.1. Germ Hücre Göçü

Dişi ve erkeklerde, germ hücrelerinin ortaya çıkışı, çoğalması ve olgunlaşması embriyonik gelişimin erken safhalarından itibaren canlının yaşamı boyunca devam etmektedir (Can, 2014). PGH'ler ilk olarak döllenmeden sonraki segmentasyon periyodunda tespit edilmiştir. Göç eden hücrelerin uzunlamasına ve iğ biçiminde olduğu, sabit hücrelerin ise yuvarlak-elips şekilli olduğu tespit edilmiştir (Koç ve Yüce, 2012).

Germ hücreleri, yumurta ve sperm hücrelerini oluştururken somatik hücreler ise germ hücrelerini destekleyerek bu hücrelerin gelişmesini ve aktivitesini düzenler. PGH'ler genetik veya dış çevresel sinyaller sonucunda doğrudan spermatogonya veya oogonya olarak şekillenir. Çevredeki somatik hücrelerde germ hücreleri tarafından, daha ileri gonadal farklılaşma için uygun bir hormonal ortam sağlamak üzere indüklenirler. Alternatif olarak, PGH'leri çevreleyen somatik hücreler ilk olarak genetik veya çevresel sinyalleri alarak PGH'lerin farklılaşması bu somatik hücrelerden türetilen sinyallere yanıt olarak gerçekleşir (Devlin ve Nagahama, 2002).

PGH'lerin göçü, mekanik olarak üç farklı şekilde gerçekleşir (Kurokawa ve diğ., 2006; Herpin ve diğ., 2008). Bunlardan birincisi; erken gastrulasyon evresinde PGH'ler kemotaksik göç nedeniyle kemokin reseptörü CXCR4'e ve onun ligandı SDF1A'ya ait bölgelere doğru aktif olarak göç ederler. İkincisi; geç gastrulasyon ve erken somitogenez evrelerinde, PGH hareketi, somatik hücrelerin birbirlerine yaklaşma hareketine bağlıdır. Üçüncüsü ise; bilateral olarak hizalandıktan sonra CXCR4 ile SDF1B reseptörleri arasındaki etkileşimlerle yönetilen PGH'ler, gonadal somatik öncüllerin ortaya çıktığı lateral plaka mezoderminin arka ucuna doğru aktif olarak göç etmeyi sürdürürler (Nakamura ve diğ., 2006; Nishimura ve Tanaka, 2014).

Sudak balığı (*Sander lucioperca*) embriyolarında gerçekleştirilen bir çalışmada yeşil floresan protein (GFP) -nos3 3'UTR mRNA ile işaretlenen PGH'lerin döllenmeden 54 saat sonra posteriordan anteriora doğru göç ettiği tespit edilmiştir. PGH'ler döllenmeden sonraki 64'üncü saatte embriyonun ventral bölgesinde lokalize oldukları ve 70'inci saatte ise posteriora doğru göç ettikleri gözlemlenmiştir. Döllenmeden sonraki 78'inci saatte PGH'lerinin embriyonun ventral tarafındaki germinal hattın her iki yanında lokalize oldukları tespit edilmiştir. Döllenmeden sonraki 90'ıncı saatte ise PGH'leri yumurta sarısı boyunca germinal hatta yer

alırlar ve 125'inci saatte germinal hattın her iki yanında lokalize oldukları belirtilmiştir (Güralp ve diğ., 2017).

Balık büyüdüktan sonra PGH'ler gonadın gelişeceği bölgeye doğru göç ederek bu bölgede konumlanırlar (Güralp ve diğ., 2017). PGH göç yollarının incelendiği çalışmalarda; sudak balığı ile japon balığında göç yollarının birbirleriyle benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Güralp ve diğ., 2017). Ancak, PGH'nin konumlanması açısından incelendiğinde ise sudak ve japon balığında farklılık olduğu, sudak ile ringa (*Clupea pallasii*) balıkları arasında ise benzerlik gözlemlenmiştir (Güralp ve diğ., 2017). Bu durum PGH'lerin kökeni ve göç yollarının hayvanlar arasında olduğu gibi teleostlar arasında da farklılık gösterdiğini belirtmektedir (Richardson ve Lehmann 2010; Saito ve diğ., 2014). Türler arasında gözlemlenen bu farklılığın kemoatraktan siyallerinin kombinasyonu ve dağılımı ile ilgili olabileceği belirtilmektedir (Güralp ve diğ., 2017).

2.4.2. Balıklarda Germ Hücre İzolasyonu

Balık germ hücresi izolasyonu konusunda 1961 yılında Gamo ve 1982 yılında ise Hamaguchi tarafından medaka balığı üzerinde başlayan çalışmalar daha sonraki yıllarda gökkuşağı alabalığı, Nil tilapyası, dev gurami (*Osphronemus gouramy*), rohu labeo'su (*Labeo rohita*), celebes gökkuşağı balığı (*Marosatherina ladigesii*), Sibiryaya mersin balığı (*Acipenser baerii*), kadife balığı (*Tinca tinca*), sudak balığı, kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) ve gölge balığı (*Thymallus thymallus*) üzerinde gerçekleştirilmiştir (Gamo, 1961; Hamaguchi, 1982; Takeuchi ve diğ., 2002; Kobayashi ve diğ., 2004; Okutsu ve diğ., 2006; Lacerda ve diğ., 2006; Lacerda ve diğ., 2010; Andriani ve diğ., 2010; Panda ve diğ., 2011; Andriani ve diğ., 2012; Andriani, 2012; Andriani, 2013; Linhartova ve diğ., 2014; Güngör, 2015; Psenicka ve diğ., 2015; Lujic ve diğ., 2017).

Yakın geçmişte birçok araştırmacı balıklarda germ hücre izolasyonu alanında farklı teknikler kullanarak çalışmıştır. Bu araştırmacıların kullanmış oldukları yöntemler Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Balıklarda germ hücre izolasyonu üzerine yapılan çalışmalar.

Balık Türü	İzolasyon Türü	Kullanılan Enzimler	Germ Hücre Tespit Yöntemi	Kaynak
Gökkuşuğu alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Enzimatik Ayırıştırma, Akım Sitometrisi	Trypsin	Vasa-GFP,	Takeuchi ve diğ., 2002, Kobayashi ve diğ., 2004
Nil tilapyası (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Percoll Gradient	Kollajenaz Trypsin	PKH26	Lacerda ve diğ., 2006
Albino transgenik gökkuşuğu alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Enzimatik Ayırıştırma	Trypsin	GFP	Okutsu ve diğ., 2006
Nil tilapyası (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Percoll Gradient	Kollajenaz	PKH26	Lacerda ve diğ., 2010
Dev gurami (<i>Osphronemus gouramy</i>)	Enzimatik Ayırıştırma	Trypsin	Trypan Blue	Andriani ve diğ., 2010
Rohu labeo'su (<i>Labeo rohita</i>)	Ficoll Gradient	Kollajenaz	Manyetik aktif hücre ayırma (MACS) Immunofloresan Etiketleme	Panda ve diğ., 2011
Dev gurami (<i>Osphronemus gouramy</i>)	Enzimatik ayırıştırma	Trypsin	Trypan Blue PKH26	Andriani ve diğ., 2012 ve Andriani, 2012
Celebes gökkuşuğu balığı (<i>Marosatherina ladigesii</i>)	Enzimatik Ayırıştırma	Kollajenaz Trypsin	Trypan Blue	Andriani, 2013
Kadife balığı (<i>Tinca tinca</i>)	Percoll Gradient	Kollajenaz Trypsin	Immunofloresan Etiketleme Immunoblotlama	Linhartova ve diğ., 2014
Sudak balığı (<i>Sander lucioperca</i>)	Percoll Gradient, Akım Sitometrisi	Trypsin	Histoloji	Güngör, 2015
Sibirya mersin balığı (<i>Acipenser baerii</i>)	Percoll Gradient	Kollajenaz Trypsin	Immunofloresan Etiketleme Immunoblotlama Transplantasyon	Psenicka ve diğ., 2015
Kahverengi alabalık (<i>Salmo trutta</i>) ve gölge balığı (<i>Thymallus thymallus</i>)	Enzimatik ayırıştırma	Kollajenaz	Transplantasyon	Lujic ve diğ., 2017

2.4.3.Germ Hücre İşaretleyicileri

Teleostlarda germ hattı hücre gelişimlerinin spesifik germ hücre işaretleyicileri ile işaretlenerek hücrelerin belirlenmesi ve göç yollarının izlenmesi amacıyla da çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalarda kullanılan işaretleyiciler PGH'nin ve spermatogonyaların genital sırtta ve gonad dokusundaki dağılımının incelenmesine ve transplantasyon sonrası alıcı türde göç yollarının belirlenmesine, *in vitro* çoğalmalarının incelenmesine olanak sağlar (Robles ve diğ., 2016). Teleostlardaki PGH'ler, granül benzeri yapılar veya nüaj üzerinde lokalize olan RNA-bağlayıcı proteinler (nanos, vasa-DDX4 ve tudor) sayesinde, sitoplazmik belirleyicilerin dağılımı ile morfolojik olarak tanımlanır ve işlevsel olarak belirlenir (Aoki ve diğ., 2008; Nishimura ve Tanaka, 2014). Medaka'da, nanos3 germ hücreleri için bugüne kadar incelenmiş ilk işaretleyicidir ve bu işaretleyici kullanılarak PGH'ler ilk olarak gastrulasyon aşamasında tanımlanabilmiştir (Kurokawa ve diğ., 2006; Nishimura ve Tanaka, 2014).

PGH'lerin tespitinde kullanılmak üzere moleküler bir işaretleyici gereklidir. Vasa, (ATP-bağlı RNA helikaz) *Drosophila*'dan insana kadar olan geniş bir canlı grubunun germ hücre hattında özellikle eksprese olduğu bilinmektedir (Raz, 2000). Vasa dizisi; yalnız teleost balıklarda değil evrimsel olarak uzak olan diğer vertebralılarda da oldukça yüksek bir korunmuşluk derecesine sahiptir (Raz, 2000). Bu durum gümüşi havuz balığı (*Carassius auratus gibelio*) gibi farklı balık türlerinde de vasa proteinini tanıyan rekombinant antikorların oluşturulmasına olanak sağlamıştır (Xu ve diğ., 2005). Bu nedenle Yoshizaki ve diğ. (2000) tarafından vasa cDNA'sı gökkuşağı alabalığından PGH'nin moleküler işaretleyicisi olarak kullanılmak üzere klonlanmıştır. Shinomiya ve diğ. (2000) tarafından ise medaka (*Oryzias latipes*) balığında germ hücre göçünün tespiti amacıyla vasa geni kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda vasa geninin germ hücre işaretleyicisi olarak kullanılabilceği tespit edilmiştir.

2.4.4.Germ Hücre İzolasyonunda Kullanılan Yöntemler

Balıklardan germ hücrelerinin izolasyonunda yapılan çalışmalarda ilk basamak enzimatik ayrıştırma'dır. Enzimatik ayrıştırma basamağında yoğun olarak kullanılan enzimler, tripsin ve kollajenaz enzimleridir. Enzimatik olarak ayrıştırılan testiküler doku örneklerinden germ hücrelerinin izolasyonu; percoll gradient, akım sitometrisi veya ficoll gradient yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. İzole edilen germ hücreleri kriyoprezervasyon veya transplantasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılır.

2.4.4.1. Percoll Gradient Yöntemi

Percoll, polivinilpirolidon (PVP) ile kaplı silika parçacıklarının koloidal süspansiyonudur. Oluşturduğu yoğunluk gradientler ile “hücre ayırma ortamı” olarak tanımlanır ve hücrelerin ayırımında kullanılır (Anon. 2014, syf. 7). Percoll, 1977 yılından itibaren farklı alanda çalışan çok sayıda araştırmacı tarafından yoğunluk gradient ortamı olarak kullanılmaktadır. Bu teknikte, gradient ortamının yoğunluk aralığı, numune parçacıklarının tüm yoğunluklarını kapsar. Her bir parçacık, gradient yoğunluğunun parçacığın yoğunluğuna eşit olduğu (izopiknik- eş hacimli pozisyon) gradientte bir denge konumuna çökecektir. Bu nedenle, bu tip ayırmada, parçacıklar boyuttan bağımsız olarak yalnızca yoğunluk farklarına dayanarak ayrılır (Anon. 2014, syf. 9).

Percoll, sahip olduğu fiziksel özellikler ile hücreler (kan ve diğer hücre tipleri), organeller, virüsler ve diğer hücre dışı partiküllerin ayırımında kullanılmaktadır. Çalışmalarda percoll uygulamasının ilk basamak olarak kullanımı çalışmalar için zamandan tasarruf sağlar. Percoll; düşük viskoziteye sahip olması, toksik olmaması, steril veya tekrar steril edilebilir olması, biyolojik materyallerle uyumlu olması, purifiye materyallerden kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi, iso-osmotik olması gibi nedenlerden dolayı biyolojik partiküller için iyi bir gradient ortam sağlamaktadır (Anon. 2014, syf. 7).

Percoll gradient uygulaması birçok farklı alanda kullanılmasının yanı sıra yardımcı üreme teknikleri içerisinde kullanılan metotlardan biridir. İnsan ve memeli hayvanlarda, ölü ve zarar görmüş spermatozoanın uzaklaştırılması yanısıra mikroorganizmaların ortadan kaldırılması amacıyla uygulanan çeşitli yıkama yöntemlerinde de kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda amaç üretim başarısını arttırmak ve sağlıklı popülasyonların elde edilmesidir (Bielanski, 1997). Yardımcı üreme tekniklerinden olan sperm dondurulması uygulamalarında dondurma çözme sonrası hareketli spermatozoa ayırımının gerçekleştirilmesi (Ercan ve Ekici, 2016) ve membranı zarar gören spermatozoanın ortamdan uzaklaştırılması amacıyla da kullanılmaktadır (Li ve diğ., 2010).

Germ hücre izolasyonu çalışmalarında ise gametleri oluşturan hücrelerin ayırımında uygulama alanına sahiptir. Bir çok balık türünde percoll gradient yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş başarılı izolasyon çalışmaları mevcuttur (Lacerda ve diğ., 2006, 2010; Linhartova ve diğ., 2014; Psenicka ve diğ., 2015; Güngör, 2015).

2.4.4.2. Akım Sitometrisi Yöntemi

Sitometri, aynı boyuttaki biyolojik veya biyolojik olmayan taneciklerin fiziksel veya kimyasal özelliklerinin tespiti amacıyla kullanılan bir ölçme yöntemidir. Günümüzde klinik ve araştırma laboratuvarlarında geniş bir kullanım alanına sahip olan akım (flow) sitometrisi ilk olarak 1940'lı yılların başında "ışık yayılımı" veya "elektiriksel direnç" ölçümlerine dayalı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalarda sıvı bir süspansiyondaki kan hücrelerinin yanı sıra aerosollardaki küçük partikül ve bakterilerin sayımı ve büyüklüğü belirlenmiştir (Shapiro, 2003). 1960'lı yılların başında hücresel nükleik asit ve proteinin kantitatif akım sitometrisinde ışık emilim ölçümleri kullanılmıştır. Modern klinik hematoloji laboratuvarlarında ise akım sitometrileri eritrosit, lökosit ve trombositlerin sayımında elektiriksel direnç, ışık saçılımı ve ışık absorpsiyon ölçümlerinin kombinasyonlarına dayalı olarak kullanılmıştır (Shapiro, 2003). İlk floresan akım sitometri cihazı 1960'lı yılların sonunda geliştirilmiş ve günümüzde çok sayıda klinik ve araştırma laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Akım sitometri cihazı; sıvı sistemi, ışık kaynağı (lazer ışını), filtreler ve sinyal dedektörleri, bilgisayar ve yazılım programları ve ayırma mekanizması bileşenlerinden oluşmaktadır (Shapiro, 2003). Analiz edilecek örnek akıcı sistemdeki merkezi kanala aktarılır örnek içerisinde tek sıra halinde bulunan hücreler lazer ile aydınlatılan bölme önünde dizilir. Böylece hücre içeriği diğer hücreler ile karışmadan analiz edilir (Karaboz ve diğ., 2008).

Akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilen işlemler hızlı olup kısa bir sürede çok sayıda hücre analiz edilebilir. Heterojen bir örnekte yer alan hücrelerin fiziksel olarak ayırt edilmesi gerçekleştirilebilmektedir (Shapiro, 2003). Bu ayırım sonucunda saf olarak elde edilen hücreler spesifik çalışmalarda amaca uygun olarak kullanılır.

Bu yöntem ile; hücrelerin boyut, şekil, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) ve Ribo Nükleik Asit (RNA) içeriğine ait veriler elde edilebilmektedir. Bu verilerin elde edilmesi amacıyla hedef yapı, floresan madde ile işaretlenmiş bir antikör veya özel bir boya kullanılarak işaretlenir. En sık kullanılan boyalar, propidyum iyodür (PI), 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), erhidyum, Hoechst, mitramisin ve akridin turuncu'dur. Bu florokromların çoğu DNA ve RNA'ya bağlanabilme özelliğindedir. Daha sonraları ise floresan işaretleyici boya olarak GFP kullanılmıştır (Shapiro, 2003).

Yukarıda ifade edilen boyalar ve florokromlar kullanılarak akım sitometri cihazı ile DNA içeriğine bağlı olarak hücrenin ploidi seviyesi (n , $2n$,...) tespit edilebilir. Bu sayede balıklarda

spermatogenez sürecinde farklı ploidi seviyelerindeki hücreler tespit edilerek diğer hücre tiplerinden ayrımı gerçekleştirilebilir.

Balıklarda spermatogenez süresince gözlemlenen; spermatogonya Tip A (2n), spermatogonya Tip B (2n), primer ve sekonder spermatisitler (n), spermatid (n) ve spermatozoon (n) hücre tiplerinde ploidi seviyesi farklılık göstermektedir (Wootton ve Smith, 2015). Akım sitometri cihazından ploidi seviyelerine göre saflaştırılan hücreler balıklarda uygulanan transplantasyon çalışmalarında kullanılabilir (Yoshizaki ve diğ., 2010).

2.4.4.3. Ficoll Gradient Yöntemi

Ficoll, Boyum (1968) tarafından geliştirilen basit ve hızlı bir santrifüj prosedürüne dayalı, insan periferik kanından mononükleer hücrelerin izolasyonu amacıyla kullanılan, steril, kullanıma hazır yoğunluk gradient ortamıdır. Düşük viskoziteye sahip olması, toksik olmaması, steril olması, biyolojik materyallerle uyumlu olması gibi nedenlerden dolayı biyolojik partiküller için iyi bir gradient ortam sağlamaktadır. Ficoll gradient yöntemi birçok immünolojik araştırmada kullanılmaktadır. Ayrıca, insan kanından, kemik iliğinden ve göbek kordonu kanından canlı mononükleer hücrelerin izolasyonu çalışmaları için yoğun olarak kullanılmaktadır (Anon. 2010, syf. 2).

Balıklarda, ficoll gradient işlemi percoll gradient uygulaması kadar yaygın olmamasına rağmen spermatogonyal kök hücrelerin diğer testiküler hücrelerden ayrımının gerçekleştirilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Panda ve diğ., 2011).

2.4.5. Germ Hücre İzolasyonunun Kullanım Alanları

2.4.5.1. Germ Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu

Kriyoprezervasyon uygulaması kültür balıkçılığında yaygın olarak, sperm uzun süreli muhafazası ve böylelikle üretimin yıl boyu yapılabilmesi (Lahnsteiner, 2000), balık çiftlikleri arasında sperm taşımacılığı ve laboratuvar çalışmalarına olanak sağlaması amacıyla kullanılmaktadır (Chao ve Liao, 2001). Ayrıca bu uygulama; önemli genotiplerin (nesli tükenmekte olan türler, model canlılar gibi) korunması ve yeni hatların geliştirilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Tiersch, 2008). Bu teknik ile sadece erkek balığa ait kalıtım materyalinin uzun süreli muhafazası sağlanmaktadır.

Sperm kriyoprezervasyonu çalışmalarının başlangıcı 1600'lü yıllara kadar uzansa da dondurma işlemlerinin başarısı 1950'lerin sonuna kadar yani büyükbaş hayvanlarda suni tohumlama yapabilmek için uzun dönem sperma saklama gereği ortaya çıkana kadar test edilememiştir (Walters ve diğ., 2009). 1953 yılında ringa balığı (*Clupea harengus*) spermasının kriyoprezervasyonundan sonra çok sayıda balık türü üzerinde başarılı çalışmalar yapılmıştır (Suquet ve diğ., 1995; Bozkurt ve diğ., 2005; Tekin ve diğ., 2007; Ekici ve diğ., 2012; Yamaner, 2012).

Balık yumurtaları ise 0.3-9.5 mm çapındaki boyutları ve memeli yumurtaları ile karşılaştırıldığında nispeten yüksek yumurta sarısı içeriği ve düşük membran geçirgenliği nedeniyle kriyoprezervasyon çalışmalarında henüz başarı elde edilememiştir (Chao, 2001). Balık yumurta ve embriyosunun dondurulmasındaki sorunlar nedeniyle, her iki gamete farklılaşma yeteneğinde olan germ hücre izolasyonu ve kriyoprezervasyonu çalışmaları günümüzde önem kazanmıştır (Yoshizaki ve diğ., 2002; Yoshizaki ve diğ., 2003; Kobayashi ve diğ., 2007; Okutsu ve diğ., 2008). PGH'ler morfolojik özellikleri açısından somatik hücrelerden farklılık göstermekle birlikte PGH'ler ~20µm çapa, 6-10 µm büyüklüğünde çekirdeğe ve nispeten küçük bir sitoplazmaya sahiptirler (Hamaguchi, 1982; Yoshizaki ve diğ., 2002; Yoshizaki ve diğ., 2003).

Sperm kriyoprezervasyonunda sadece erkek balığa ait kalıtım materyalinin muhafazası gerçekleştirilebiliyorken (Labbe ve diğ., 2013) germ hücrelerinin seksüel plastisitesi ve küçük boyutlu olması nedeni ile dişi ve erkek balığa ait kalıtsal karakterleri içeren genetik materyalin kriyoprezervasyonu sağlanabilir (Okutsu ve diğ., 2006).

2.4.5.2. Germ Hücrelerinin Transplantasyonu

Germ hücre transplantasyonu; zootekni ve biyoloji alanında birçok uygulamaya sahiptir (Lacerda ve diğ., 2013). Bu uygulama, germ hücre gelişimi ve farklılaşması ile ilgili süreçlerin araştırılması, genetik olarak modifiye edilmiş germ hattı hücreleri ile transgenik canlıların üretimi ve hedef türlerin yerine geçen vekil ebeveynler için taşıyıcı anaç sistemleri oluşturulmasını kapsayan konuları inceler (Yoshizaki ve diğ., 2010).

Büyük hacimli ve yetiştiricilik şartları zor olan ticari öneme sahip balık türlerinin ksenojenik germ hücre transplantasyon çalışmaları ile daha küçük hacimli balık türlerinde fonksiyonel gamet üretimi gerçekleştirilerek başarılı üretim uygulamaları germ hücre transplantasyonu ile

gerçekleştirilebilir. Örneğin, mavi yüzgeçli atlantik orkinos (*Thunnus thynnus*) yetiştiricilik şartları zor olan ve cinsel olgunlaşma süreci yaklaşık 3-5 yıl olan bir türdür. Fakat bu türe ait fonksiyonel sperm ve yumurtanın cinsel olgunluğa 1-2 yıl gibi kısa sürede ulaşan ve yetiştiricilik şartlarında yönetimi daha kolay olan kolyoz (*Scomber japonicus*) türüne transplantasyonu ile *Thunnus thynnus* türüne ait yavru bireyler daha kısa sürede üretilebilir (Yoshizaki ve diğ., 2012).

Transplantasyon uygulamaları sadece yetiştiriciliği yapılan türler için değil aynı zamanda balıkların çeşitliliği ve genetik kaynakların korunması amacıyla da kullanılabilir. Bu avantajlar göz önünde bulundurulduğunda germ hücre teknolojisi su ürünleri konusundaki biyoteknolojik çalışmalar için uygulama alanına sahiptir. Germ hücre transplantasyonunun balıklardaki ilk uygulamaları ise gökkuşağı alabalığı larvasının sölomik kavitesine yeşil floresan protein (GFP) geni ile işaretlenmiş germ hücrelerinin aktarımı ile başlamıştır. Aktarılan hücreler proliferasyona uğrayarak farklılaşmış ve allojenik (aynı türden farklı bir bireye ait) gonadlarda olgun yumurta ve sperm olarak gelişim göstermiştir. Sonuçta donör kökenli fenotipe sahip normal döllerin üretimi gerçekleştirilmiştir (Takeuchi ve diğ., 2003). Bu tarihten sonra farklı balık türlerine ve farklı gelişim safhalarındaki türlere transplantasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Balıklarda uygulanan germ hücre transplantasyonu; embriyo, larva ve olgun balığa olmak üzere üç farklı aşamadaki canlıya gerçekleştirilmektedir (Lacerda ve diğ., 2013). Bu uygulamalardan birincisi olan embriyoya transplantasyon işlemi, tür içi uygulamaların yanı sıra ksenojenik transplantasyon çalışmaları da mevcuttur. PGH'lerin ksenojenik transplantasyonu Saito ve diğ. (2008) tarafından; japon balığı (*Carassius auratus*) ve çopra balığı (*Misgurnus anguillicaudatus*) türüne ait PGH'lerin blastula safhasındaki zebra balığına transplantasyonu sonrasında, donöre ait sperm üreten kimeraların üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamalardan ikincisi olan larvaya transplantasyon işlemi, GFP ile işaretli transgenik gökkuşağı alabalığı modelinin üretimi PGH'lerin canlı olarak izolasyonunu da içeren çalışmalara imkan vermiştir (Yoshizaki ve diğ., 2000, 2002; Takeuchi ve diğ., 2002). Bu transplantasyon metodunda izole edilen PGH'ler mikroenjeksiyon yöntemi ile donör balığın peritoneal kavitesine transplante edilir (Yoshizaki ve diğ., 2011). Takeuchi ve diğ. (2003) yaptıkları çalışmada donör olarak vasa-GFP ile işaretlenmiş transgenik gökkuşağı alabalığı PGH'lerini masu salmonu (*Oncorhynchus masou*) larvalarına ksenojenik transplantasyonunu

gerçekleştirmişlerdir. Ksenojenik transplantasyon sonucunda masu salmonundan transgenik gökkuşığı alabalığına ait bireylerin üretimi gerçekleştirilebilmiştir. Germ hücre transplantasyon uygulamalarının üçüncüsü olan olgun balığa germ hücre transplantasyonunda ise Lacerda ve diğ. (2006), olgun balığa spermatogonya transplantasyonunu Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*) bireylerinde spermatogonyanın olgun balığın ürogenital papillasına transplantasyonu ile gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemde, alıcı balık sitostatik ilaç ile muamele edilerek endojen spermatogenez baskılanmıştır. Daha sonra spermatogonyal hücreler alıcı balığın ürogenital papillaya açılan testislerine sperm kanalından enjekte edilir.

Yoshizaki ve diğ. (2005), gökkuşığı alabalığı, zebra balığı ve honnibe sarı ağız balığı (*Nibeamitsukurii*) türlerinden elde edilen *vasa* 3-UTR RNA'ları içeren GFP kimerik RNA'lar, çeşitli Salmonid türlerine ait döllenmiş yumurtaların sitoplazmalarına mikroenjeksiyon yöntemi ile aktarılmıştır. Elde edilen tüm embriyoların, PGH'lerinde spesifik işaretleme gözlemlenmiş ve somatogenez aşamasından 50 gün sonra dahi hücrelerin gözlemlenebildiği tespit edilmiştir. Bu tekniğin PGH transplantasyonunda uygulanması için, kimerik RNA ile etiketlenmiş PGH'ler, Salmonid larvalarının peritonal boşluğuna mikroenjeksiyon yöntemi ile enjekte edilmiştir. Çalışma sonucunda masu salmonu (*Oncorhynchus masou*) ve kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) donörlerinden alınan PGH'lerin alıcı gökkuşığı alabalığında ksenojenik genital sırta başarılı bir şekilde dahil olduğu bildirilmiştir.

Okutsu ve diğ. (2006), albino transgenik gökkuşığı alabalığına ait GFP ile işaretli germ hücrelerinin gökkuşığı alabalığı dişi ve erkek bireylerine transplantasyonu sonucunda transplante edilen testiküler germ hücrelerinin embriyonik gonadlarda kolonize olarak fonksiyonel sperm ve yumurta üretimini tespit etmişlerdir.

Okutsu ve diğ. (2008), triploid masu salmon dişi ve erkek bireylerinde peritonal boşluğa GFP işaretli gökkuşığı alabalığı spermatogonya hücrelerinin transplantasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma ile transplantasyondan 2 yıl sonra alıcı masu salmonu bireylerinin donör kaynaklı sperm ve yumurta üretimi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir.

Nesli tükenme tehlikesi altında olan Çin mersin balığı (*Acipenser sinensis*) türüne ait germ hücrelerinin intraperitonal olarak Yangtze mersin balığı (*Acipenser dabryanus*) türüne başarılı bir şekilde transplantasyonu gerçekleştirilmiştir (Ye ve diğ., 2017). Yapılan histolojik inceleme sonucunda *Acipenser sinensis* türüne ait ilkel germ hücrelerinin *Acipenser dabryanus*

bireylerinde yumurtadan çıktıktan 16 gün sonra peritoneal duvara göç ettiği ortaya konmuştur (Ye ve diğ., 2017).



3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, T.C. İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 5/11/15 tarih ve 2015/88 sayılı izni ile yürütülmüştür.

3.1. MALZEME

3.1.1.Çalışma Yeri

Çalışma İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince bu balıklar Birimde bulunan 195 cm çapında, 90 cm derinliğinde ve 2 m³ su hacmine sahip fiberglas tanklarda muhafaza edilmiştir. Testis dokusundan enzimatik ayrıştırma basamağı yine bu Birimde yer alan Biyoteknoloji Laboratuvarında ve diğer laboratuvar çalışmaları ise Su Bilimleri Fakültesi Biyoteknoloji ve Histopatoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.Çalışmada Kullanılan Bahıklar

Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimine ait; ortalama toplam boy $24,8 \pm 1,34$ cm uzunluğunda ve ortalama $171,9 \pm 29,10$ gram ağırlığında 13-14 aylık 15 adet gökkuşığı alabalığı kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan gökkuşığı alabalığı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Tamponlar

3.1.3.1. Percoll ile İzolasyonda Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Tamponlar

Gökkuşuğu alabalığı testis dokusundan germ hücrelerinin izolasyonunda kullanılan malzemeler marka ve ürün bilgileri ile birlikte Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Percoll ile izolasyonda kullanılan kimyasal malzemeler.

Kimyasal Malzeme	Marka	Ürün Numarası
Tricaine methanesulfonate (MS 222)	Sigma Aldrich	A5040
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) Tablet	Oxoid	BR0014G
Percoll	Sigma Aldrich	P1644
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich	A7511
Trypsin	Sigma Aldrich	T1426
Poly-L-lysine	Sigma Aldrich	P8920
Deoxyribonuclease I (DNaz I)	Applichem	A3778
50 µm Filtre	Partec CellTrics	04-0042-2327
Hank’s Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS)	Sigma Aldrich	H6648
Fizyolojik Tuzlu Su (%0.9 NaCl)	Polifarma	-

Fosfat tamponlu tuz (PBS) çözeltisi

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS), 100 ml saf suda 1 tablet olacak şekilde üretici firmanın ürün bilgilendirmesine göre sulandırılmıştır.

Trypsin

Trypsin, 1 mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde 1 mM HCl içerisinde üretici firmanın ürün bilgilendirmesine göre sulandırılmıştır.

Deoxyribonuclease I (DNaz I)

DNaz I, 5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde üretici firmanın ürün bilgilendirmesine göre 150 mM NaCl içerisinde sulandırılmıştır.

Poly-L-lysine

Poly-L-lysine, %1’lik konsantrasyonda olacak şekilde saf su ile sulandırılarak kullanılmıştır.

3.1.3.2. İmmunofloresan Uygulamalarda Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Tamponlar

Gökkuşığı alabalığına ait germ hücrelerinin tespiti amacıyla percoll gradient sonrası oluşan hücre katmanlarından alınan örneklerin immunofloresan etiketlemede ve testis dokusuna ait kesitlerde gerçekleştirilen floresan uygulama analizlerinde kullanılan malzemelere ait marka ve ürün bilgileri Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: İmmunofloresan uygulamalarda kullanılan kimyasal malzemeler.

Kimyasal Malzeme	Marka	Ürün Numarası
Tween 20	Sigma Aldrich	P7949
4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma Aldrich	D9542
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box Polypeptid 4 (DDX4) antikoru	GeneTex	GTX116575- 40261
Anti-tavşan IgG- keçide üretilen floresin izotiyosiyanat FITC antikoru	Sigma Aldrich	F0382
Kapaticı Mountat, Permafluor	Thermo Scientific	TA-030-FM
Triethylenediamine (Dabco 33)	Sigma Aldrich	D2522
Triton X-100	Sigma Aldrich	X100

4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), 300 nM konsantrasyonda olacak şekilde PBS ile sulandırılarak kullanılmıştır.

Primer Antikor

DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box Polypeptid 4 (DDX4), bloklama tamponunda 1:100 oranında olacak şekilde sulandırılmış ve primer antikor olarak kullanılmıştır.

Sekonder Antikor

Anti-tavşan IgG- keçide üretilen floresin izotiyosiyanat (FITC), bloklama tamponunda 1:400 oranında olacak şekilde sulandırılmış ve sekonder antikor olarak kullanılmıştır.

Fiksasyon Tamponu

Fiksasyon tamponu olarak kullanılan %10’luk nötral formalin; 90 ml saf su içerisinde 10 ml formalin, 0.35 g NaH₂PO₄ ve 0.65 g Na₂HPO₄ çözdürülerek hazırlanmıştır.

Permeabilizasyon Tamponu

Permeabilizasyon tamponu olarak kullanılan %0.25'lik Triton X-100, PBS içerisinde hazırlanmıştır.

Bloklama Tamponu

Bloklama tamponu olarak kullanılan; %1 Bovin Serum Albumin (BSA) ve %0.05 Tween 20, PBS içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

Yıkama Solüsyonu

Yıkama solüsyonu olarak kullanılan; %0.1'lik Tween 20, PBS içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

Sitrat Tamponu

Sitrat tamponu (0.01M, pH 6); 1 lt saf su içerisinde 2,1 g sitrik asit monohidrat çözdürülerek hazırlanmıştır.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihaz Ve Ekipmanlar

Hassas Terazi

Kullanılan kimyasalların tartımı amacıyla Isolab marka hassas (0.001 g) terazi kullanılmıştır.

Osmometre

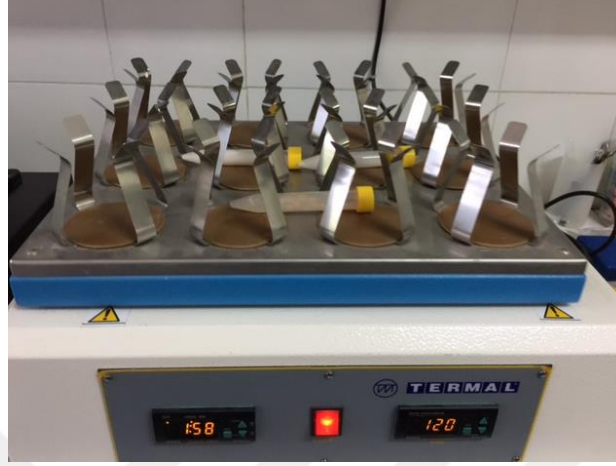
Kan serum örneklerinin osmotik basıncının tespiti için Micro-Osmometre (Fiske) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Micro-Osmometre cihazı.

Çalkalamalı İnkübatör

Testiküler doku örneklerinin enzimatik ayrıştırılması amacıyla Termal marka çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır (Şekil 3.3)



Şekil 3.3: Çalkalamalı inkübatör.

Soğutmalı Santrifüj

Percoll gradient metodu uygulaması sırasında hücrelerin percoll gradient içerisinde katmanlara ayrılması için Hettick marka (model, Universal 32 R) masaüstü soğutmalı santrifüj kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Soğutmalı santrifüj.

Preparatların İncelenmesi Amacıyla Kullanılan Mikroskoplar

Percoll gradient katmanlarından alınan örnekler Olympus CX 41 mikroskop ve Olympus U-TV1X-2 kamera ile görüntülenerek kaydedilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Olympus CX 41 marka mikroskop ve görüntüleme sistemi.

Histolojik kesitlerin görüntülenerek fotoğraflanması amacıyla Olympus BX 51 mikroskop ve Olympus DP 72 kamera kullanılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Çalışmada kullanılan Olympus BX 51 mikroskop ve görüntüleme sistemi.

Percoll gradient sonrası oluşan katmanlardan orta katmanda yer alan testiküler hücrelerin ve doku kesitlerinde immunofloresan boyama çalışmalarına ait preparatlarda bulunan germ hücrelerinin tespiti amacıyla Nikon marka Eclipse TI model invert mikroskop kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1 Balık Bakımı ve Muhafazası

Çalışmamızda kullanılan balıklar fiberglas tankta stoklanmıştır (Şekil 3.7). Balıklar ticari olarak satışı yapılan %45 ham protein ve %20 yağ içeren ticari ekstrude alabalık yemi (5 mm) ile günde 3 defa *ad-libitum* olarak beslenmişlerdir.



Şekil 3.7: Balıkların muhafaza edildiği tanklar.

3.2.2. Balıklardan Kan Alınması

Balıklar, anestezi amacıyla kullanılan tricaine methanesulfonate (MS 222) içerisinde yüksek dozda (200 mg/l) uzun süre tutularak ölmeleri sağlanmıştır (Carter ve diğ., 2011). Bu işlemden hemen sonra kaudal venadan 5 ml kan örneği alınarak jelli kan tüpüne (C. D. Rich) aktarılmış ve 4°C’de 2500 rpm’de 10 dakika süre ile santrifüj yapılarak kanın serum ve plazma kısmı ayrılmıştır (Şekil 3.8).



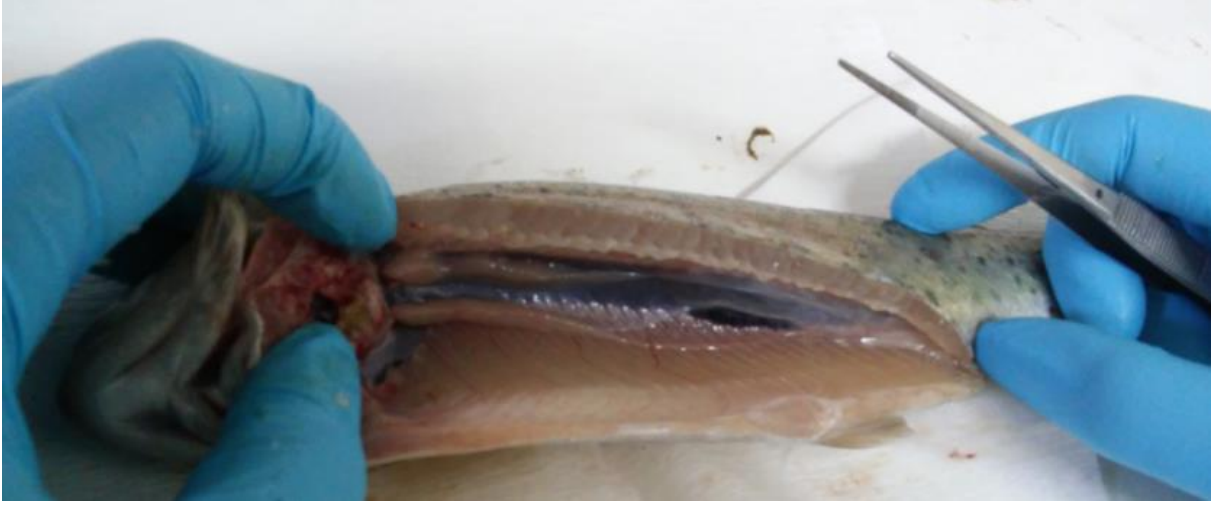
Şekil 3.8: Balıklardan kan alımı ve santrifüj sonrasına ait görüntü.

3.2.3. Osmotik Basınç Ölçümü

Santrifüj sonrası elde edilen serum örneklerinden 20 µl alınarak micro-osmometre cihazında osmolalitesi tespit edilmiştir.

3.2.4. Enzimatik Ayrım İle Testiküler Hücrelerin İzolasyonu

Balıklardan kan alma işlemi sonrasında abdominal insizyon yapılarak iki parçalı testis dokusu çıkarılmış (Şekil 3.9) ve her bir doku ayrı ayrı petri kutularına aktarılmıştır. Bu aşamadan sonra testis dokuları üç ayrı grup tampon [(fosfat tamponlu tuz (PBS) çözeltisi, fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl) ve Hank's dengeli tuz çözeltisi (HBSS)] kullanılarak yıkanmıştır. PBS, ile yıkanan testis dokusuna ait örnekler üzerine 10 ml PBS eklenmiş ve doku makas kullanılarak parçalara ayrılmıştır. Bu işlem diğer tampon grupları [(HBSS, fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl)] için de ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10). Bu üç farklı tampon her biri ayrı ayrı olacak şekilde percoll gradient basamağında percoll'ün sulandırılmasında da kullanılmıştır.

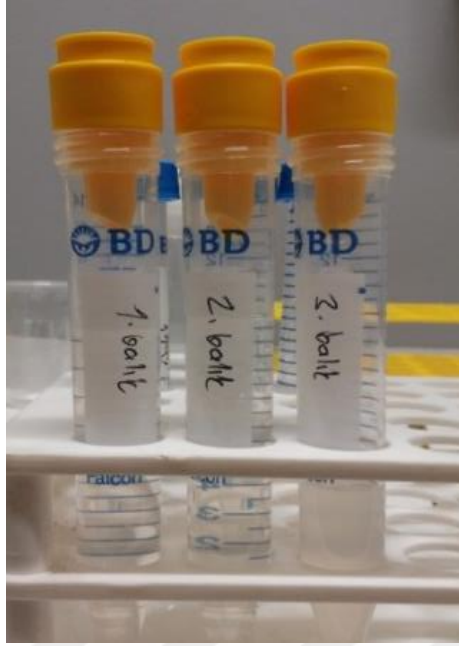


Şekil 3.9: Germ hücre izolasyonunda kullanılan testis dokusu.



Şekil 3.10: Testis dokularının tampon çözelti içerisinde yıkama ve parçalama işlemi.

Her bir tampon çözelti içerisindeki doku parçaları üzerine, hücre glikoproteinlerinin hücre dışı matrisini bozmak ve oluşan kalıntı matrisin oranlarını azaltmak amacıyla (Jones ve Werb, 1980) % 0.5 tripsin eklenmiştir (Takeuchi ve diğ., 2002). Bu işlemi takiben, örnekler 20°C'de 2 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde inkübasyona tabi tutulmuştur (Takeuchi ve diğ., 2002). İnkübasyon işlemi sonrası homojen olan bu süspansiyon 50 µm'lik filtreden geçirilerek filtrasyon işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: İnkübe edilen örneklerin filtrasyon işlemi.

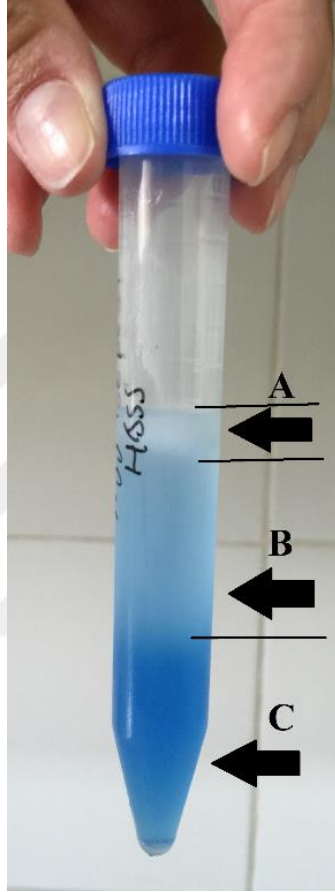
Filtrasyon işlemi sonrası elde edilen 4 ml'lik örnek üzerine ölü hücrelerden serbest DNA bırakılmasından dolayı ortaya çıkan hücre süspansiyonunun pıhtılaşmasını engellemek amacıyla (Crabbe ve diğ., 1997), 40 µg/ml DNaz I eklenmiştir. Bir sonraki aşamada ise enzim aktivitesinin durdurulması amacıyla %1 Bovin Serum Albumin (BSA) eklenmiştir.

3.2.5. Percoll Gradient İle Gonad Hücrelerinin Ayrımı

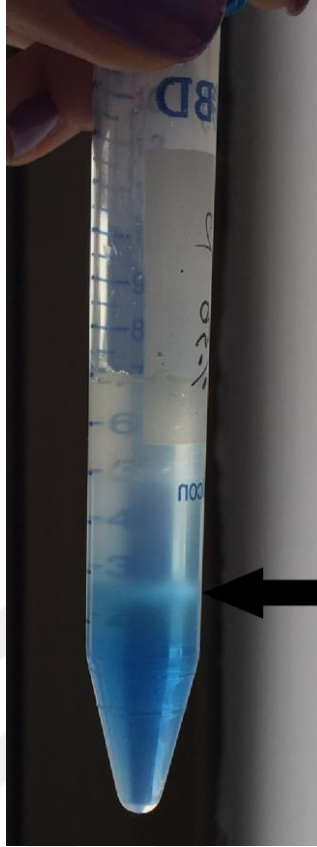
Enzimatik ayrıştırma işlemi sonrası erken evre germ hücrelerinin diğer testiküler (spermatidler ve sperm) ve somatik hücrelerden ayrılması amacıyla percoll gradient adımı uygulanmıştır.

Percoll, gradient oranlarının oluşturulması amacıyla HBSS, PBS ve fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl) tamponları ile ayrı ayrı sulandırılmıştır. Böylelikle çalışma süresince percoll, üç farklı tampon ile sulandırılarak üç ayrı deneme grubu oluşturulmuştur. Her bir grupta germ hücrelerinin ayrımının gerçekleştirilmesi amacıyla farklı oranlarda alt ve üst gradient katman oluşturulmuştur. Bu tamponlardan birincisi olan HBSS ile alt katman-üst katman oranları, sırasıyla, %33-%5, %30-%10 ve %45-%10 olacak şekilde hazırlanmıştır. İkinci grupta tampon olarak kullanılan, PBS tamponu ile alt katman-üst katman oranları, sırasıyla, %30-%10, %30-%5, %33-%5, %45-%10, %50-%10 ve %55-%10 olacak şekilde hazırlanmıştır. Üçüncü grupta tampon olarak kullanılan fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl) tamponu ile alt katman-üst katman oranları, sırasıyla, %30-%10, %45-%10 olacak şekilde hazırlanmıştır (Linhartova ve diğ., 2014,

Psenicka ve diğ., 2015; Güngör, 2015). Filtrasyon işlemi sonrası DNaz ve BSA eklenen örneklerden 1'er ml alınarak farklı tamponlar kullanılarak hazırlanan bu percoll gradient katmanlarının üzerine yavaşça aktarılmıştır. Percoll gradient katmanları üzerine aktarılan her bir grup örnek daha sonra 4°C'de 30 dakika 500 g olacak şekilde santrifüj edilmiştir (şekil 3.12).



şekil 3.12: Percoll gradient katmanları; A: filtrasyon sonrası eklenen rnek, B: percoll gradient üst katmanı (%5), C: percoll gradient alt katmanı (%33).



Şekil 3.13: Santrifüj sonrası oluşan katmanlara ait görüntü.

Santrifüj işleminden sonra oluşan üç percoll gradient katmanından (Şekil 3.13) alınan 3 ml'lik hücre süspansiyonu percoll'ün sulandırılmasında kullanılan tampon ile tekrar 500 g'de, 4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında testiküler hücrelerden oluşan çökelti 1.5 ml'lik mikrotüplere aktarılarak 0.5 ml kullanılan tampon ile seyreltilmiş, her bir katmandan elde edilen testiküler hücrelerden lam üzerine 15 µl alınarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.2.6. Histoloji

Germ hücre izolasyonunun da gerçekleştirildiği balıklara ait testis dokusundan alınan yaklaşık 0,5 cm³'lük örnekler %10 nötral tamponlu formalin fiksatifinde tespit edildikten ve yıkandıktan sonra alkol-kloroform serilerinden geçirilerek doku sıvılarından uzaklaştırılmıştır. Doku sıvılarından uzaklaştırılan örnekler, sıvı parafin serilerinden de geçirildikten sonra doku örnekleri parafine gömülmüştür. Leica RM 2125 RT marka manuel mikrotom kullanılarak testis dokusuna ait parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak lam üzerine aktarılmıştır. Spermatogenez sürecinin ve bu süreçteki hücre tiplerinin belirlenmesi amacıyla

örnekler Hematoksilen-Eosin ile boyandıktan sonra (Culling, 1963; Hinton, 1990) entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmiştir.

Doku kesitlerinin Hematoksilen-Eosin ile boyama işlemi Tablo 3.3’de bulunan malzemeler ile belirtilen sürelerde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3: Doku kesitlerinin Hematoksilen-Eosin ile boyanma metodu (Culling, 1963; Hinton, 1990).

Basamaklar	Kullanılan Kimyasallar	Süre
1	Ksilen I	10 dk.
2	Ksilen II	10 dk.
3	Ksilen III	10 dk.
4	% 90 Alkol	5 dk.
5	% 70 Alkol	5 dk.
6	% 50 Alkol	5 dk.
7	Akan suda	10 dk.
8	Hematoksilen	5 dk.
9	Akan suda	2 dk.
10	Asit Alkol	1-2 defa daldırılır
11	Akan suda	5-7 dk.
12	Scot’s Top Water	5 dk.
13	Eosin	3 dk.
14	Saf Alkol	5 dk.
15	Ksilen I	10 dk.
16	Ksilen II	10 dk.
17	Ksilen III	10 dk.

3.2.7. İmmunofloresan İşaretleme

3.2.7.1. Percoll Gradient Katmanından Alınan Hücrelerin İmmunofloresan İşaretlenmesi

Germ hücrelerinin somatik hücrelerden ayrımı için immunofloresan etiketlemede standart prosedür kullanılmıştır (Linhartova ve diğ., 2014; Psenicka ve diğ., 2015). Percoll gradient ile santrifüj sonrası elde edilen katmanlardan orta katmanda oluşan testiküler hücrelerden lam üzerine 50 µl alınarak immunofloresan işaretleme işlemlerinde kullanılmıştır. Lam üzerindeki örnekler fiksasyon tamponunda 10-20 dakika tutularak fikse edilmiştir. Ardından PBS ile üçer kez 5 dakika süre ile yıkanmış ve yıkama sonrasında permeabilizasyon tamponu ile 2-10 dakika

süre ile muamele edilmiştir. Bu işlemlerden sonra; örnekler üçer kez 5 dakika süre ile yıkama solüsyonunda yıkanmıştır. Daha sonra +4°C’de 1 gece boyunca primer antikor (DDX4) ile inkübe edilmiştir. Üçer kez 5 dakika süre ile yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve sekonder antikor (FITC) ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonrası örnek üçer kez 5 dakika süre ile yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Hücre nükleuslarının işaretlenebilmesi amacıyla 300 nM konsantrasyondaki DAPI ile oda sıcaklığında 10 dakika süre ile boyama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra örnekler Dabco 33 ile kapatılarak invert mikroskop (Nikon Eclipse TI) altında incelenmiştir.

3.2.7.2. Doku Kesitlerinde İmmunofloresan İşaretleme Uygulamasına Ait İşlemler

%10 nötral tamponlu formalin fiksatifinde tespit edilen doku örnekleri standart doku işleme prosedüründe parafin bloklara gömüldükten sonra Leica RM 2125 RT marka manuel mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında alınan kesitler poly-L-lysine kaplı lamlara aktarılmıştır. Poly-L-lysine, örnekler içerisinde bulunan hücrelerin uygulama için katı yüzeylere yapışmasını kolaylaştırmak amacıyla kullanılmıştır. Doku kesitlerine ait immunofloresan uygulama metodu, immunohistokimya prosedürleri (Yılmaz ve diğ., 2015; Kayalar ve Öztay 2014; Övet ve Öztay 2014; Psenicka ve diğ., 2015) modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4). Daha sonra örnekler kapatıcı (Mountat, Permafluor) ile kapatılarak invert mikroskop (Nikon Eclipse TI) altında incelenmiştir.

Tablo 3.4: Doku kesitlerinde immunofloresan işaretleme uygulama prosedürü.

Basamaklar	Kullanılan Kimyasallar	Süre
1	Ksilol I	µdk.
2	Ksilol II	15 dk.
3	%100 Alkol I	5 dk.
4	%100 Alkol II	5 dk.
5	%90 Alkol I	5 dk.
6	%90 Alkol II	5 dk.
7	%80 Alkol I	5 dk.
8	%80 Alkol II	5 dk.
9	%70 Alkol I	5 dk.
10	%70 Alkol II	5 dk.
11	Saf Su	5 dk.
12	Sitrat Tamponu (0.01M, pH6, Mikrodalga,650W)	15 dk.
13	Soğutmaya bırakılır	20 dk.

Tablo 3.4(Devam): Doku kesitlerinde immunofloresan işaretleme uygulama prosedürü.

14	Yıkama Tamponu	2 kez 5'er dk.
15	Bloklama Tamponu	Oda Sıcaklığında 10 dk.
16	Primer Antikor (DDX4)	+4°C'de 15 saat
17	Yıkama Tamponu	2 kez 5'er dk.
18	Sekonder Antikor (FITC)	Oda sıcaklığında 1 saat
19	Yıkama Tamponu	2 kez 5'er dk.
20	4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Oda Sıcaklığında 10 dk.
21	Yıkama Tamponu	2 kez 5'er dk.
22	Kapama (Mountat, Permafluor)	

4. BULGULAR

4.1. OSMOTİK BASINÇ ÖLÇÜMLERİNE AİT BULGULAR

Çalışmada kullanılan balıklardan alınan kan örneklerinin osmotik basınçları ortalama $334 \pm 10,54$ mOsm/kg olarak hesaplanmıştır.

4.2. PERCOLL GRADIENT İLE GERM HÜCRE İZOLASYONUNA AİT BULGULAR

Çalışmamızda percollün sulandırılmasında HBSS, PBS ve fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl) tamponları kullanılmıştır. Bu tamponlarda farklı oranlarda kullanılan percoll gradient işlemi ortamı üzerine testiküler hücre süspansiyonunun eklenmesini takiben gerçekleştirilen santrifüj işlemi sonucunda yalnızca PBS tamponunun kullanıldığı gradient ortamında başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

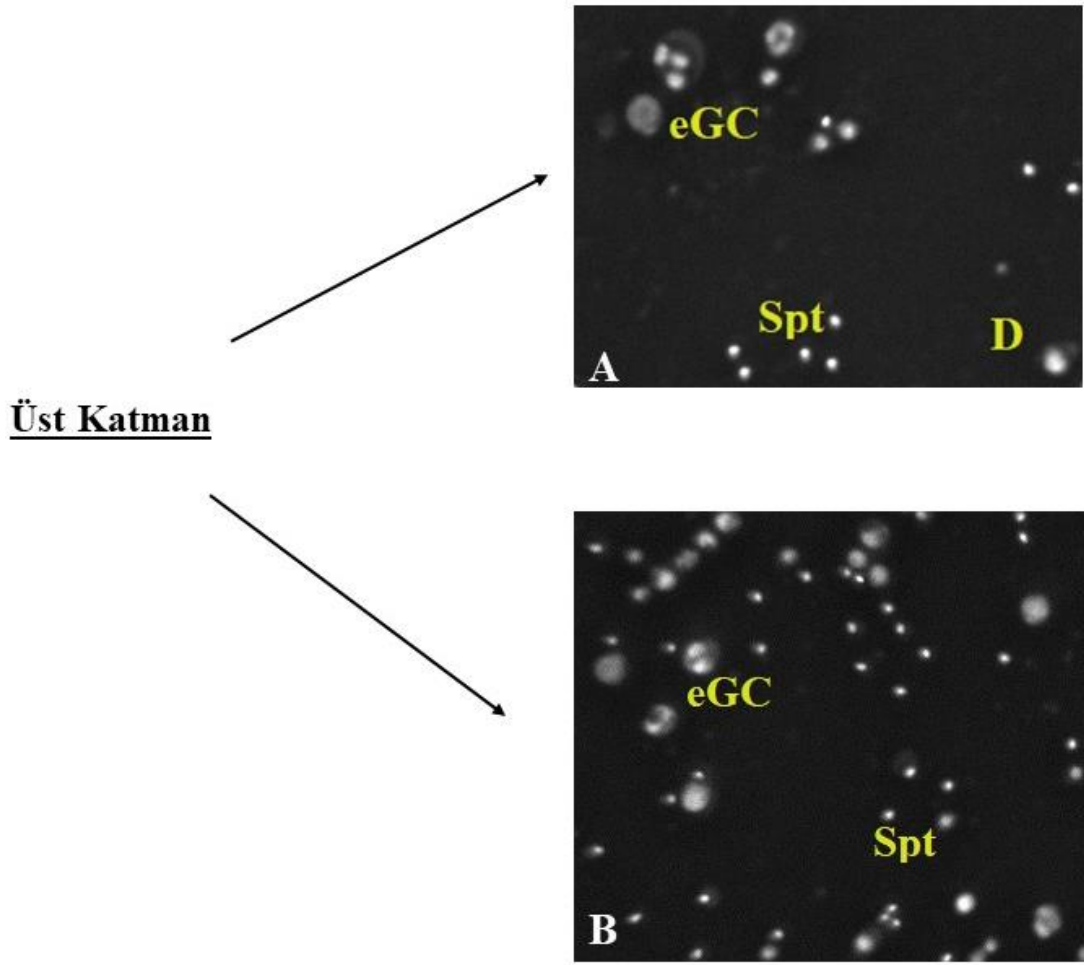
HBSS tamponunun kullanıldığı grupta alt katman ve üst katman percoll gradient oranları, sırasıyla, %33-%5, %30-%10 ve %45-%10 olacak şekilde ve fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl) tamponunun kullanıldığı grupta ise alt katman ve üst katman oranları, sırasıyla, %30-%10, %45-%10 olacak şekilde kullanıldığında testiküler hücrelerin percoll gradient içerisinde ayrımı gerçekleştirilememiştir. PBS tamponu ile alt katman ve üst katman oranları, sırasıyla, %30-%10, %30-%5, %33-%5 olacak şekilde kullanıldığında testiküler hücrelerin ayrımı gerçekleştirilememiştir.

Her üç grup tampon için yukarıda belirtilen percoll gradient oranları kullanıldığında başarılı sonuç elde edilememiştir. Sadece, PBS ile hazırlanan grupta %45-%10'luk percoll gradient ortamında testiküler hücrelerin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle daha sonra gerçekleştirilen deneylerde PBS ile hazırlanan percoll gradient ortamı testiküler hücrelerin ayırımında kullanılmış ve alt-üst katmanlara ait gradient oranları manipüle edilmiştir.

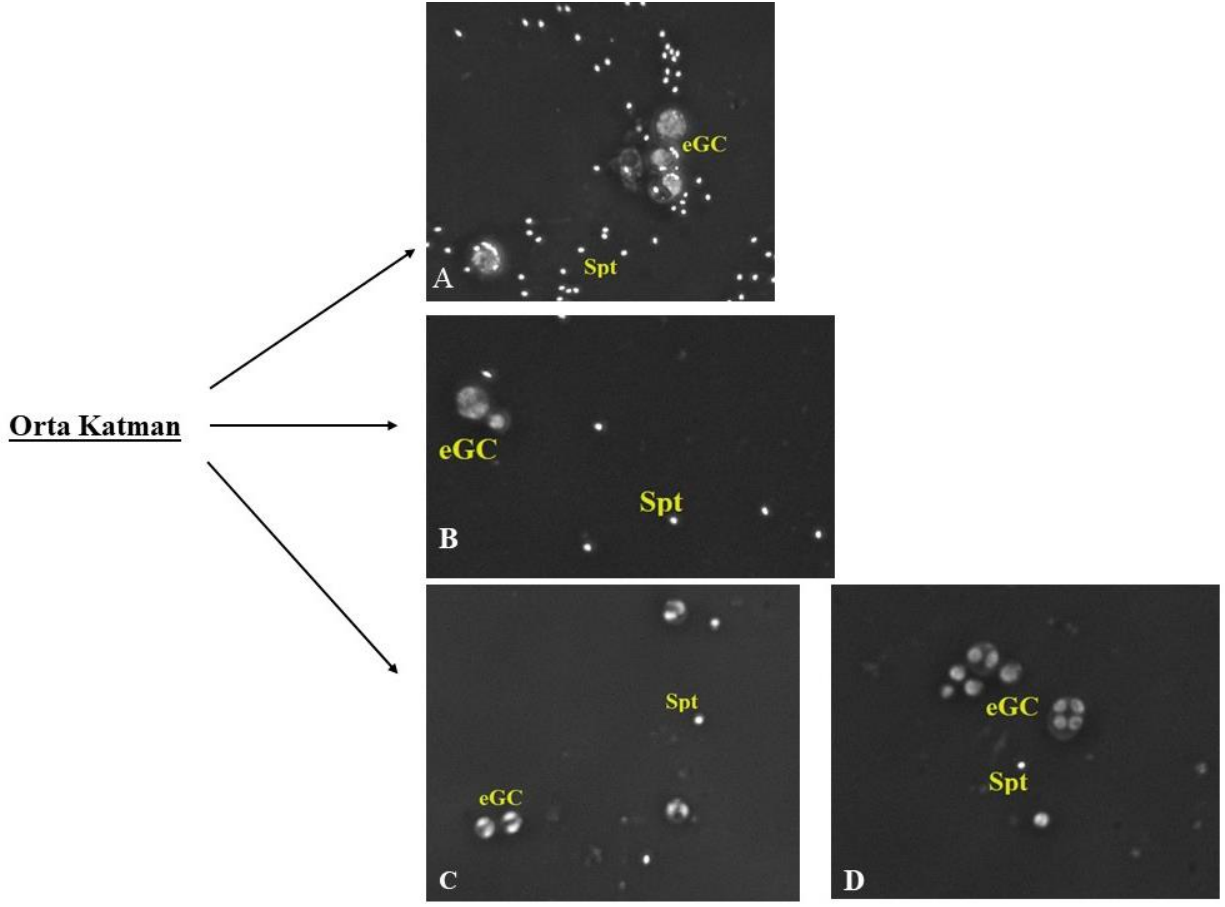
Bu manipülasyonlar sonucunda PBS tamponu ile hazırlanan percoll gruplarında %45-%10'un yanı sıra %50-%10 ve %55-%10 oranlarında da başarılı germ hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda PBS tamponu ile hazırlanan percoll gradient katmanlarına (üst, orta ve dip) ait örneklerden 15 µl alınarak mikroskop altında incelenerek fotoğraflanmıştır. Bu katmanlarda gözlemlenen testiküler hücrelerden erken evre germ hücrelerinin, küresel yapıda ve bir yada daha fazla sayıda küresel nükleusa sahip olduğu spermatidlerin ise, küresel yapıda ve yoğun sitoplazmaya sahip olduğu tespit edilmiştir.

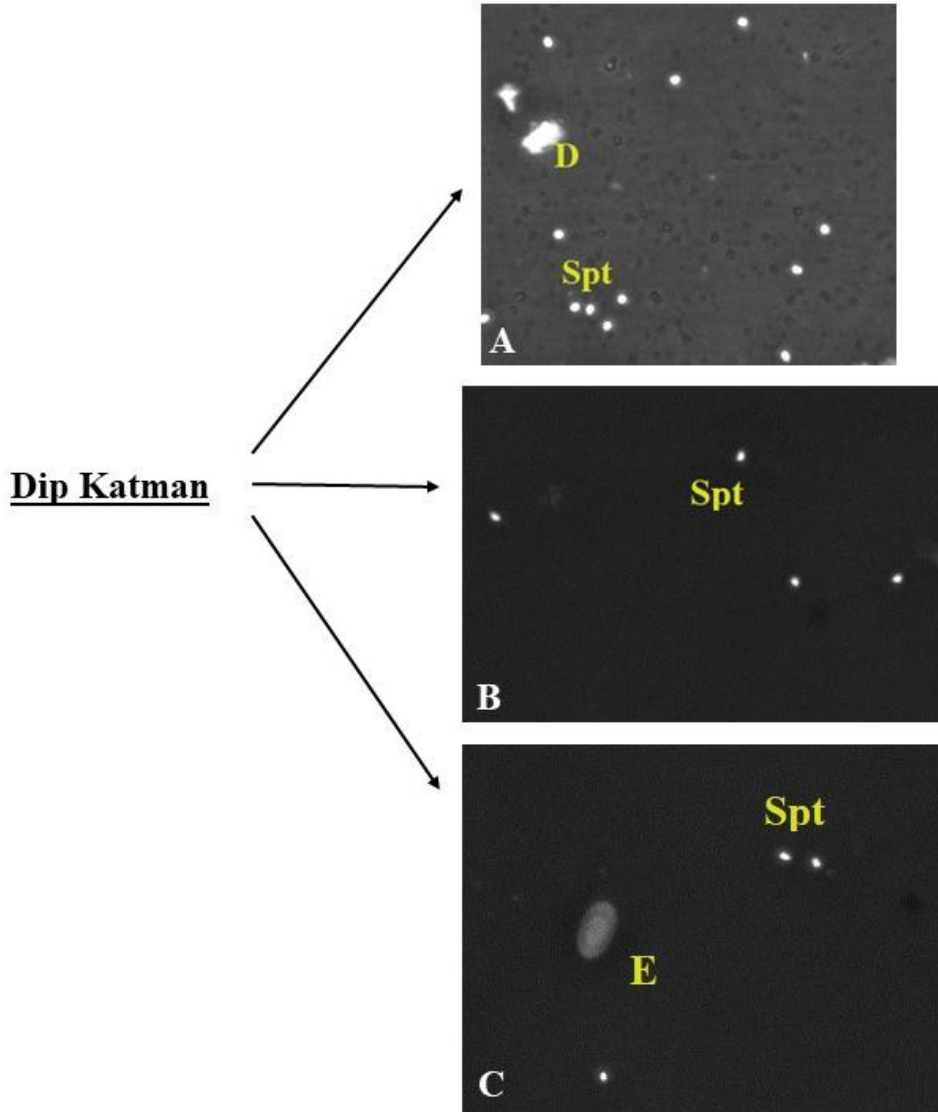
%50-%10 ve %55-%10 percoll gradient üst katmanında debris, spermatidler ve az miktarda erken evre germ hücreleri, %45-%10, %50-%10 ve %55-%10 oranlarına ait orta katmanda ise erken evre germ hücreleri ve az miktarda spermatid tespit edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Dip katmanda yer alan pelette ise eritrositler, spermatidler ve debris tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.1: Percoll gradient oranlarının üst katman görüntüleri, A: %50-%10, B: %55-%10 (Spt; spermatid, D; debris, eGC; erken evre germ hücreleri).



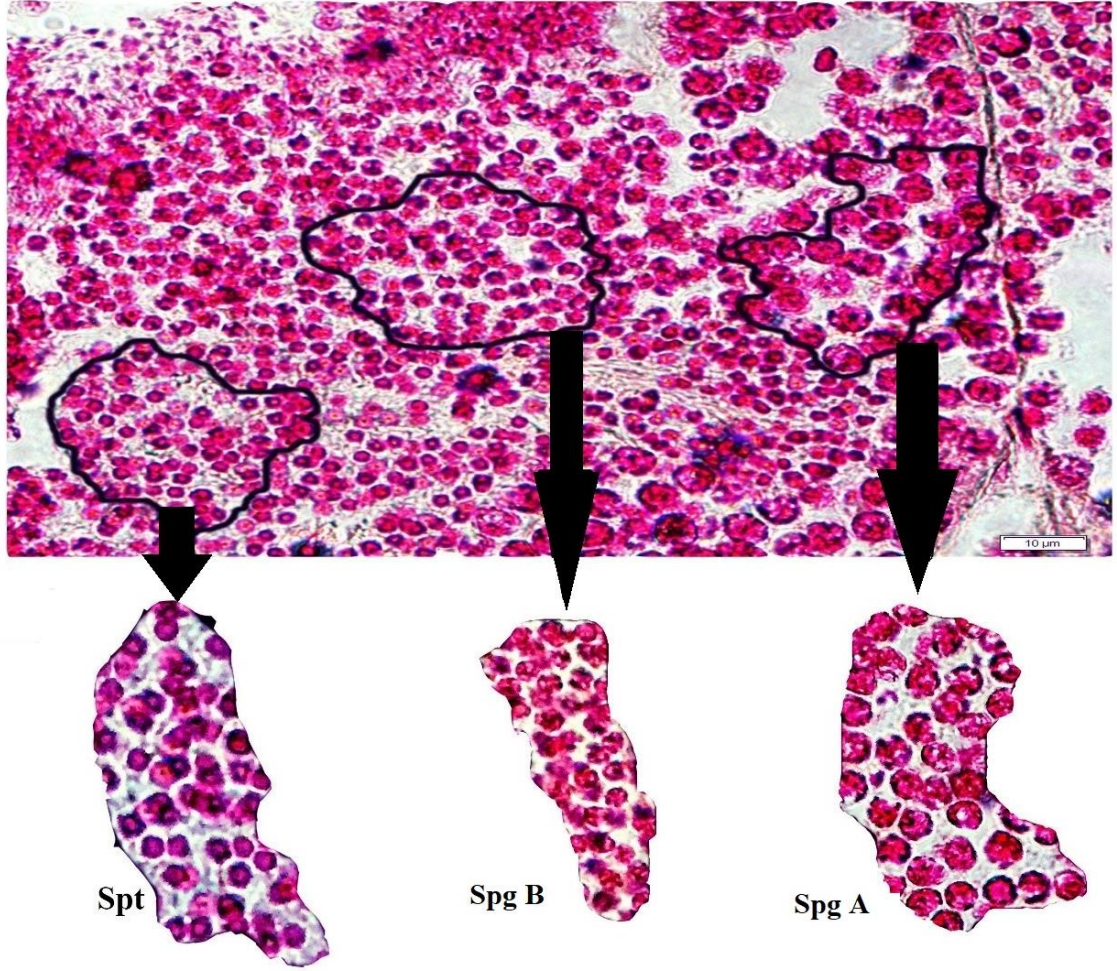
Şekil 4.2: Percoll gradient oranlarının orta katman görüntüleri, A: %45-%10, B: %50-%10, C,D: %55-%10 (Spt; spermadid, eGC; erken evre germ hücreleri).



Şekil 4.3: Percoll gradient oranlarının dip katman görüntüleri, A: %45-%10, B: %50-%10, C:%55-%10 (Spt; spermatozoid, D;debris, E; eritrosit).

4.3. TESTİS DOKUSU HİSTOLOJİSİNE AİT BULGULAR

Gökkuşaağı alabalığı testis dokusuna ait histolojik kesitlerde Tip A ve Tip B spermatogonya ve spermatozoid olmak üzere üç farklı hücre formu gözlemlenmiştir. Bu hücre formlarından Tip A spermatogonyanın 5-6 μm ve Tip B spermatogonyanın ise 3 μm çapında ve küresel yapıda olup bir yada daha fazla nükleusa sahip oldukları tespit edilmiştir. Küresel yapıda olan ve nükleusu koyu renkte boyanan spermatozoidlerin ise Tip A ve Tip B spermatogonyaya göre daha küçük morfolojiye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).

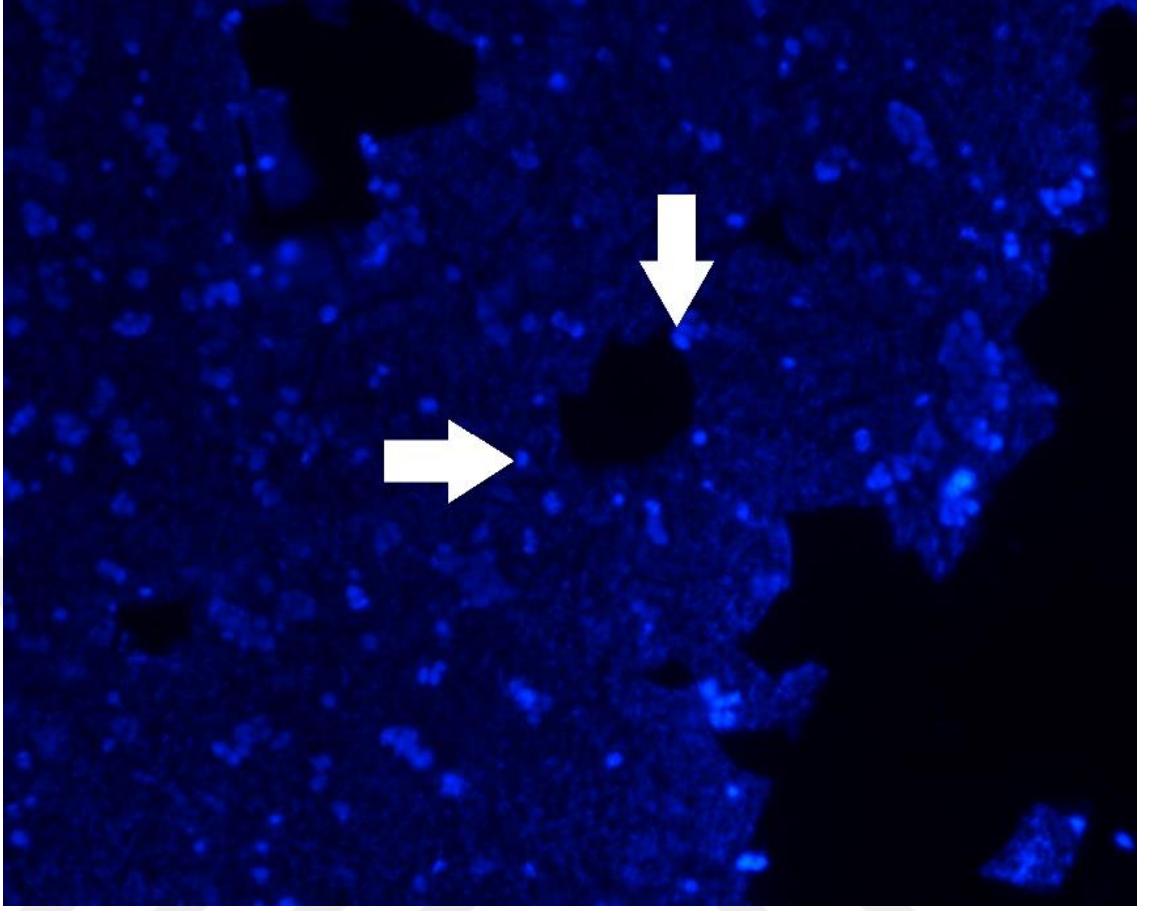


Şekil 4.4: Alabalık testis dokusunda erken evre germ hücreleri, Spt; spermatid, Spg A; Tip A spermatogonya, Spg B; Tip B spermatogonya (100x).

4.4. İMMUNOFLORESAN İŞARETLEME YÖNTEMLERİNE AİT BULGULAR

4.4.1. Percoll Gradient Katmanından Alınan Örneklerin İmmunofloresan İşaretlenmesine Ait Bulgular

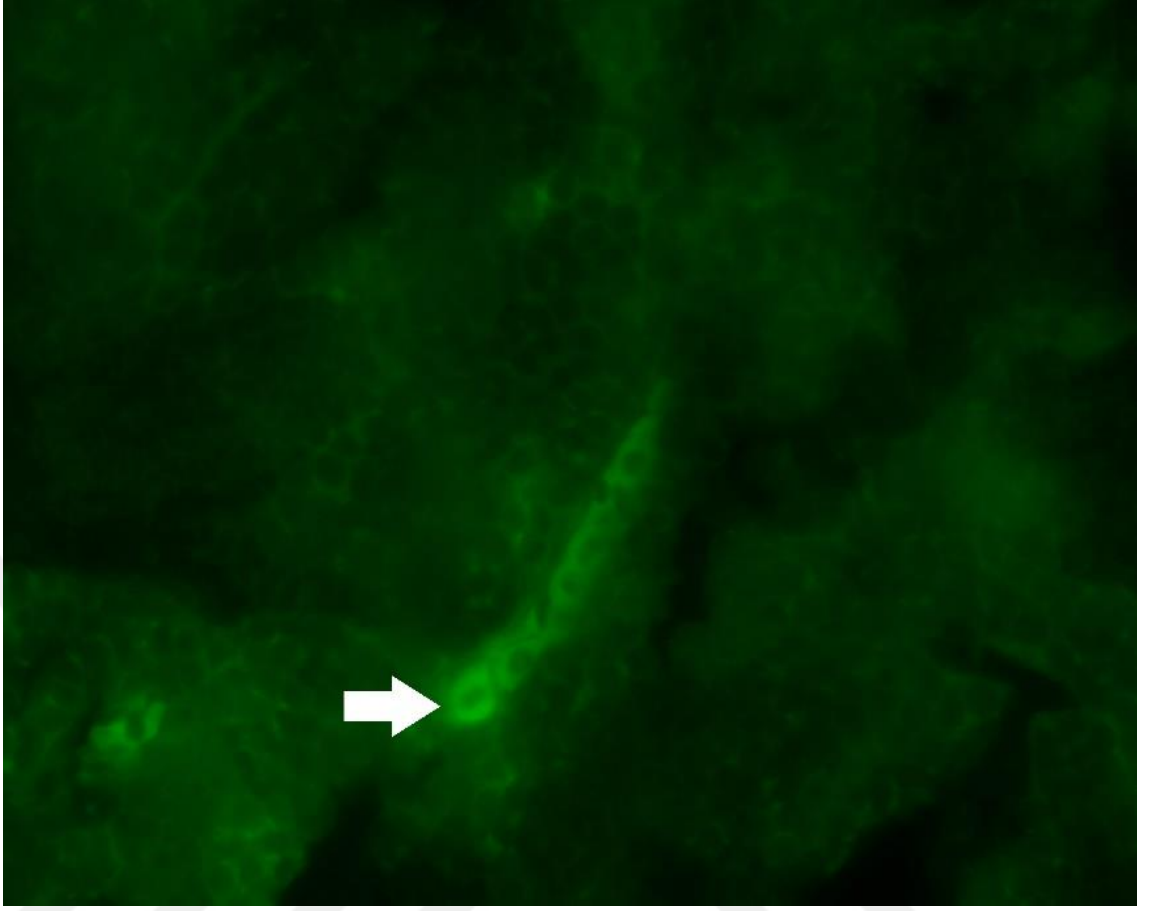
İzolasyon sonrasında tespit edilen erken evre germ hücrelerinin DDX4-FITC kullanılarak gerçekleştirilen işaretlemesi sonucunda başarı elde edilmemiş, bu örneklerde yalnızca DAPI ile işaretlenen hücrelere ait görüntü elde edilmiştir. DAPI, tüm testiküler hücrelere ait nükleusları boyama özelliğine sahip olduğundan dolayı spesifik bir ayırım elde edilememiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Testiküler hücre nükleuslarının immunofloresan boyamada DAPI ile boyandıktan sonra görüntüsü (oklar ile gösterilmiştir) (40x) (Nikon Eclipse TI).

4.4.2. Doku Kesitlerinde İmmunofloresan İşaretleme Uygulamasına Ait Bulgular

Gökkuşığı alabalığı testis dokusuna ait kesitlerin primer ve sekonder antikolar (DDX4-FITC) ile boyanması sonucunda tespit edilen yeşil renkte erken evre germ hücreleri invert mikroskop altında fotoğraflanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Testiküler hücrelerin doku kesitlerinde immunofloresan uygulaması sonucu DDX4-FITC ile boyandıktan sonraki görüntüleri (ok ile gösterilmiştir) (60x) (DDX4: 1-100 FITC: 1-400) (Nikon Eclipse TI).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Su ürünleri yetiştiriciliği uygulamalarında; genetik kaynakların korunması ve alternatif türlerin yetiştiriciliğinde kullanılma potansiyeline sahip olan germ hücre transplantasyon çalışmaları günümüzde ön plana çıkan konulardandır. Üzerinde çalışılan transplantasyon uygulamasının ilk basamağı olan germ hücre izolasyonu, bu tez çalışmasında gökkuşacağı alabalığına ait testis dokusu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada izolasyon metodu olarak kullanılan percoll gradient ile izolasyon kolay uygulanabilir ve ucuz bir yöntem olması nedeni ile tercih edilmiştir. Ülkemizde ilk defa gerçekleştirilen balıklardan germ hücre izolasyonunda model tür olarak gökkuşacağı alabalığı tercih edilmiştir.

İzolasyon çalışmalarında ilk olarak Bellve ve diğ. (1977) fare kullanarak testis dokusunda enzimatik ayırıştırma uygulaması ile spermatogonya izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Brinster ve Zimmermann (1994) ise Bellve ve diğ. (1977) tarafından uygulanan metodu modifiye ederek gerçekleştirdikleri izolasyon sonucunda, elde edilen hücrelerin kısır alıcı farelere transplantasyonu ile alıcı farelerde spermatogenez sürecinin başarılı bir şekilde olduğu tespit edilmiştir. Brinster ve Zimmermann (1994)'ın farelerde gerçekleştirdiği uygulamalardan sonra, Lacerda ve diğ. (2006) Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*) üzerinde yaptığı çalışmalarda Bellve ve diğ., (1997)'nin spermatogonyal hücrelerin ayırımında uyguladıkları metodu modifiye etmişlerdir. Lacerda ve diğ. (2006)'nin yaptığı çalışmada, enzimatik (kollajenaz, trypsin ve DNaz) ayırım sonrasında testiküler hücreler elde edilmiştir. Bu hücrelerin percoll gradient ile ayırımı sonucunda dört katman oluşmuştur. İlk iki katman da spermatogonya, üçüncü katmanda spermatositler ve spermatidler, alt katmanda yer alan pelette ise eritrositler ve spermatozoa tespit edilmiştir. Çalışmamızda gözlemlenen üç percoll gradient katmanında ise en üst katmanda; debris, spermatidler ve az miktarda erken evre germ hücreleri, orta katman da erken evre germ hücreleri ve az miktarda spermatidler, dip katmanda yer alan pelette ise debris, spermatidler ve eritrositler elde edilmiştir.

Psenicka ve diğ. (2015), erken evre germ hücrelerinin dişi ve erkek Sibirya mersinbalığı (*Acipenser baerii*) bireylerinden izolasyonu ve Sterlet mersin balığına (*Acipenser ruthenus*) transplantasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yapılan bu çalışmada ovaryum ve testiküler hücrelerin ayırıştırılmasında kullandıkları Leibovitz medyum (L-15), PBS ve HBSS tamponları ile başarılı izolasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise HBSS, fizyolojik

tuzlu su (%0.9 NaCl) ve PBS kullanılmış ancak sadece PBS tamponu ile gerçekleştirilen izolasyon çalışmasında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu bağlamda; tez çalışmasında gerçekleştirilen denemelerde tampon solüsyon olarak sadece PBS kullanılmıştır.

Linhartova ve diğ. (2014) kadife balığına (*Tinca tinca*) ait erken evre germ hücrelerinin percoll gradient yöntemi ile izolasyonunda testiküler doku örneklerini 25°C'de 1,5 saat süre ile %0.1 trypsin ve %0.1 kollajenaz enzimlerini kullanarak inkübe etmişlerdir. Hücrelerin ayırımında %30-%5 (sırasıyla, alt katman-üst katman) percoll gradient oranları uygulanmış ve izolasyonda başarı elde edilmiştir. Linhartova ve diğ. (2014)'nin gerçekleştirdiği bu çalışma sonucunda percoll gradientin üst katmanında %80 oranında lipidler ve debris, %20 oranında ise erken evre germ hücreleri; orta katmanında %62.2 oranında erken evre germ hücreleri, %18 oranında debris ve %17.3 oranında spermatid ve spermatozoa; dipte bulunan pelette ise %39.1 oranında kan hücreleri, %21.2 oranında spermatid ve spermatozoa, %20.7 oranında debris ve %19 oranında erken evre germ hücresi içerdiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da Linhartova ve diğ. (2014)'nin kullanmış olduğu sıcaklık, enzim oranları, inkübasyon süresi ve percoll gradient oranları kullanılmıştır. Ancak; Linhartova ve diğ. (2014)'nin kadife balığında gerçekleştirdiği izolasyon koşulları bu çalışmada gökkuşağı alabalığı erken evre germ hücre izolasyonunda gradient oluşumunu gerçekleştiremediğinden hücresel ayırım da tespit edilememiştir.

Güngör (2015) sudak balığına (*Sander lucioperca*) ait testis dokusu örneklerini %0.3 trypsin enzimi ile 25°C'de 1,5 saat süre ile inkübe ederek enzimatik ayrıştırma aşamasını gerçekleştirmiştir. Percoll gradient oranı %33-%5 (sırasıyla, alt katman- üst katman) olarak uygulanmış ve sonuçta üst katmanda %86 oranında lipidler ve debris, % 14 oranında erken evre germ hücreleri; orta katmanda %84.7 oranında germ hücreleri, %15.3 spermatid ve spermatozoa; dip katmanda yer alan pelette ise %1.57 oranında erken evre germ hücresi ve %98.43 oranında spermatid ve spermatozoa ayırımının başarı ile gerçekleştirildiği ifade edilmiştir. Bu tez çalışmasında ise Güngör (2015)'ün çalışmada uyguladığı sıcaklık, enzim oranları, inkübasyon süresi ve percoll gradient oranları kullanıldığında gradient oluşumunu sağlamadığından hücresel ayırım da gerçekleştirilememiştir.

Bu tez çalışmasında Güngör (2015) ve Linhartova ve diğ. (2014)'nin kullandığı izolasyon koşullarında başarı elde edilememesinin, balık türüne bağlı olarak farklı izolasyon koşullarına gereksinim duyulmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle izolasyon

koşullarında optimizasyonlar (inkübasyon sıcaklığı düşürülerek ve enzim oranı artırılarak) gerçekleştirilmiştir.

Lujic ve diğ. (2017) türler arası germ hücre transplantasyon çalışmasında kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) ve gölge balığına (*Thymallus thymallus*) ait germ hücrelerinin gökkuşacağı alabalığına transplantasyonu amacıyla yaptıkları çalışmada bu balıklara ait testiküler hücrelerin izolasyonunda enzimatik ayırım amacıyla kollajenaz enzimi (2 mg/ml) kullanarak başarılı germ hücre izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Lujic ve diğ. (2017)'nin çalışmasında izolasyon koşulları ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmemiştir. Bu tez çalışmasında ise %0.3 kollajenaz ve %0.1 trypsin enzimlerinin birlikte kullanımı sonucu başarı elde edilememiştir.

Takeuchi ve diğ. (2002) gökkuşacağı alabalığı PGH'nin enzimatik ayırımında %0.5 trypsin enzimini kullanarak 20°C'de 2 saat süre ile inkübasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da gökkuşacağı alabalığına ait testis dokusundan germ hücre izolasyonunda Takeuchi ve diğ. (2002)'nin çalışmasındaki izolasyon koşulları kullanılarak başarılı sonuçlar alınmıştır. Takeuchi ve diğ. (2002), germ hücrelerinin ayırımında percoll gradient yerine transgenik hat oluşturularak GFP ile işaretli hücreleri belirlemiştir. Bu tez çalışmasında germ hücrelerinin ayırımı amacıyla gerçekleştirilen percoll gradient aşamasında; Ercan ve Ekici (2016)'nin çalışmalarında kullanmış olduğu oranlar referans alınarak örnekler filtrasyon sonrası %45-%10, %50-%10 ve %55-%10 (sırasıyla, alt katman-üst katman) oranlarında percoll gradient ortamları oluşturularak santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Uygulanan bu percoll gradient oranlarında santrifüj sonrasında üç katman görüntülenmiştir. Bu katmanların en üstünde, debris ve spermatidler; orta katmanda erken evre germ hücreleri ve dip katmanda yer alan pelette ise eritrosit ve spermatidler tespit edilmiştir. Elde edilen bu başarı sonucunda gökkuşacağı alabalığı testis dokusundan germ hücrelerinin izolasyonu için manipüle edilerek uygulanan enzim oranlarının (%0.1 trypsin + %0.3 kollajenaz, %0.05, %0.1, %0.4, %0.6 trypsin) ve inkübasyon derecesinin (25°C) gökkuşacağı alabalığı için uygun olmadığı ve bu nedenle başarılı sonuçlar alınmadığı düşünülmektedir.

Andriani ve diğ. (2010), dev gurami (*Osphronemus gouramy*) akvaryum balığı türüne ait germ hücre transplantasyonu üzerine yapmış olduğu çalışmada %0.5 trypsin ve %0.5 trypsin ile birlikte DNaz (10 IU/ µL) içeren iki medyum kullanarak örnekler 1, 2, 3, 4 ve 5 saat olacak şekilde farklı sürelerde inkübe edilmiştir. Çalışma sonunda %0.5 trypsin, DNaz (10 IU/µL) içeren medyumda spermatogonya oranı diğer gruba göre daha yüksek bulunmuştur. %0.5

trypsin enzimi içeren medyumda spermatogonya canlılığı 2 saat süren inkübasyon süresinde azalma göstermiştir. %0.5 trypsin ve DNaz (10 IU/ μ L) içeren medyumda ise spermatogonya canlılığı 4 saat inkübasyon süresinde azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında ise Adriani ve diğ. (2010) kullanmış oldukları enzim oranları ve inkübasyon süresi kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu tez çalışmasında ise izole edilen erken evre germ hücrelerinin canlılık oranları tespit edilememiştir.

Andriani ve diğ. (2012) ve Andriani (2012), donör olarak dev gurami (*Osphronemus gouramy*) akvaryum balığına ait testis dokusundan testiküler germ hücre izolasyonu amacıyla %0.5 trypsin ve %3 DNaz enzimlerini kullanmıştır. 4°C'de %0.7 sodyum klorür (NaCl) solüsyonu içerisinde 6, 12, 24 ve 48 saat süre ile muhafaza edilen testis dokusundan izole edilen testiküler germ hücreleri, PKH26 membran floresan boyası ile etiketlenerek yumurtadan çıkan 3 günlük Nil tilapyası larvalarına transplante edilmiştir (Andriani, 2012). Transplantasyondan iki ay sonra, transplantasyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizler sonucunda nispeten kısa süre muhafaza edilen dev gurami testiküler dokusundan izole edilen germ hücrelerinin, transplantasyon için donör hücre kaynağı olarak başarılı oldukları belirtilmiştir (Andriani ve diğ., 2012; Andriani, 2012). Bu tez çalışmasında ise Andriani ve diğ. (2012) ve Andriani (2012)'nin yapmış oldukları çalışmalardaki enzim oranı (%0.5 trypsin) kullanılarak başarılı enzimatik ayrıştırma gerçekleştirilmiştir.

Andriani (2013), Telmatherinidae familyasına ait Celebes gökkuşağı balığı (*Marosatherina ladigesii*) akvaryum balığı türünde yapmış olduğu çalışmada, dişi ve erkek bireylerden germ hücre izolasyonunda %0.5 trypsin enzimi içeren ve %0.1 kollajenaz enzimi içeren iki farklı medyumda gonad dokusu örneklerini 2 saat süre ile inkübe etmişlerdir. Çalışma sonunda %0.1 kollejenaz içeren medyumda spermatogonya oranı daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında ise Andriani (2013)'nin kullanmış oldukları enzim oranı (%0.5 trypsin) ve inkübasyon süresi (2 saat) kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Erken evre germ hücrelerinin immunofloresan işaretlenmesinde primer (DDX4) ve sekonder (FITC) antikörlerine ait sulandırma oranları Linhartova ve diğ. (2014) tarafından (sırasıyla) 1:300 ve 1:700 olarak; Psenicka ve diğ. (2015) tarafından ise (sırasıyla) 1:300 ve 1:80 kullanmışlar ve erken evre germ hücrelerini tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise bu antikörlere ait sulandırma oranları (sırasıyla) 1:100 ve 1:400 olacak şekilde kullanılmıştır. Doku

kesitlerinin immunofloresan boyanmasında primer (DDX4) ve sekonder (FITC) antikor ile işaretlenen erken evre germ hücreleri invert mikroskop altında tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

Germ hücrelerinin vasa-GFP ile işaretlenerek transgenik hatlar oluşturulması ve hücrelerin akım sitometrisi yöntemi ile izolasyonu pahalı ve uygulanması uzun süreci gerektiren işlemlerdir. Percoll gradient metodunda ise testis dokusundan enzimatik ayrıştırma işlemi nispeten daha kolay olduğundan ve kısa bir süreçte gerçekleştiğinden daha yaygın bir şekilde tercih edilmektedir.

Sonuç olarak; percoll gradient metodu ile gökkuşuğu alabalığı germ hücrelerinin izolasyonunda, enzimatik ayrıştırma aşamasında kullanılan enzim oranları ve sıcaklık değerlerinde başarı elde edilmiştir. Ancak erken evre germ hücrelerinin daha yoğun olarak eldesi için percoll gradient oranlarında optimizasyona ihtiyaç duyulduğu anlaşılmıştır. Bu tez çalışması ile ülkemizde ilk defa percoll gradient santrifüj yöntemi ile balık testis dokusundan testiküler hücrelerin ve germ hücrelerinin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Her iki gamet tipine farklılaşma özelliğinde olan germ hücrelerinin izolasyonunda elde edilen bu başarı sonrasında ileride gerçekleştirilecek çalışmalarda bu hücrelerin kriyoprezervasyonu ve transplantasyonunun yapılması hedeflenmektedir. Kriyoprezervasyon ve transplantasyon uygulamaları ile balığa ait gen kaynaklarının korunması yanı sıra alternatif türlerin yetiştiriciliğine ait çalışmaların da gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Andriani, I., Djuwita, I., Sumantadinata, K., M., Zairin, Jr., Arfah, H., Alimuddin, 2010, “Morphological Characteristic Of Spermatogonia And Testes Dissociation : A Preliminary Study for the Germ Cell Transplantation in Giant Gouramy (*Osphronemus gouramy*)”, *Indonesian Aquaculture Journal*, Vol.5 No.2.
- Andriani, I., Djutiwa, I., Alimuddin, Sumantadinata, K., 2012, “Donor preparation for germ cell transplantation in giant gouramy: the viability of spermatogonia isolated from giant gouramy cold preserved testis”, *The 8th IMT-GT Uninet Biosciences Conference*, 22-24 November 2012, Banda Aceh, Volume 2 Number 1.
- Andriani, I., 2012, “Transplantation Of Spermatogonia Isolated From Giant Gourami Cold Preserved Testis Into Nile Tilapia Larvae”, *Presented in The 2nd Annual International Conference in conjunction with the 8th IMT-GT UNINET Bioscience Conference*, 22-24 November 2012, University of Syahkuala, Banda Aceh, Indonesia.
- Andriani, I., 2013, “Morphological Characteristic and Isolation of Germ Cell : A Preliminary Study for The Germ Cell Transplantation of Celebes Rainbow (*Marosatherina ladigesi*)”, *International Seminar of Fisheries and Marine (2nd ISFM 2013)*, Pekanbaru, 6-7 November.
- Anonim, 2010, GE Healthcare Life Sciences, *Isolation of mononuclear cells Methodology and Applications*, 18-1152-69, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden.
- Anonim, 2014, GE Healthcare Life Sciences, *Cell Separation Media Methodology and Applications*, 18-1115-69, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden.
- Anonim, 2015, Resmi Gazete Yönetmelikler, *Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik*, Sayı 29327, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2015/04/20150415-18.htm> [Ziyaret Tarihi: 25 Kasım 2017]
- Aoki, Y., Nagao, I., Saito, D., Ebe, Y., Kinjo, M., Tanaka, M., 2008, “Temporal and spatial localization of three germline-specific proteins in medaka”, *Developmental Dynamics*, 237: 800–807.
- Bellve, A., R., Cavicchia, J., C., Millette, C., F., O'Brien, D., A., Bhatnagar, Y., M., Dym, M., 1977, “Spermatogenic Cells Of The Prepuberal Mouse Isolation and Morphological Characterization”, *The Journal Of Cell Biology*, Vol. 74, 68-85.
- Bielanski, A., 1997, “A review on disease transmission studies in relationship to production of embryos by in vitro fertilization and to related new reproductive technologies”, *Biotech. Adv.*, 15, 633–656.
- Billard, R., 1986, “Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species (1)”, *Reproduction Nutrition Development*, 26 (4), pp.877-920.

- Boyum, A., 1968, "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood" (Paper IV), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21 Suppl, 97, 77–89.
- Bozkurt, Y., Seçer, S., Tekin, N., Akçay, E., 2005, "Cryopreservation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Mirror Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm with Glucose Based Extender", *Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, Cilt I, Sayı I, 21-25.
- Braat, A., K., Speksnijder, J., E., Zivkovic, D., 1999, "Germ line development in fishes", *The International Journal of Developmental Biology*, 43: 745-760.
- Brinster, R., L., Zimmermann, J., W., 1994, "Spermatogenesis following male germ-cell transplantation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, pp. 11298-11302.
- Brinster, L., R., 2002, "Germline Stem Cell Transplantation and Transgenesis", *Science*, 296(5576), 2174–2176.
- Cabrita, E., Robles, V., Herraiz, P., 2009, *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*, CRC Press Taylor and Francis Group, New York, ISBN: 13:978-0-8493-8053-2.
- Can, A., 2014, *Kök Hücre*, Akademisyen Tıp Kitabevi, Ankara.
- Carter, K., M., Woodley, C., M., Brown, R., S., 2011, "A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish", *Reviews Fish Biology Fisheries*, 21, 51–59.
- Chao, N., H., Liao, I., C., 2001, "Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos", *Aquaculture*, 197, 161–189.
- Culling, C., F., A., 1963, *Handbook of Histopathological Techniques (Including Museum Technique)*, Second Edition, Butter Worths, London.
- Crabbe, E., Verheyen, G., Tournaye, H., Van Steirteghem, A., 1997, "The use of enzymatic procedures to recover testicular germ cells", *Human Reproduction*, 12(8), 1682-1687.
- Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Wiesner, T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Bühring, H., J., Mattheus, U., Mack, A., Wagner, H., J., Minger, S., Matzkies, M., Reppel, M., Hescheler, J., Sievert, K., D., Stenzl, A., Skutella, T., 2008, "Generation of pluripotent stem cells from adult human testis", *Nature*, 456, 344–349.
- Çağiltay, F., 2011, *İçsu Balıkları Yetiştiriciliği*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, ISBN: 978-605-5426-28-6.
- Çek, Ş., Shang, M., Perera, D., A., Su, B., Dunham, R., A., 2016, "Balık Kök Hücreleri: Sınıflandırma, Kaynakları, Karakteristik Özellikleri ve Uygulama Alanları", *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 2(2): 107-119.
- Çelikkale, M., S., 2002, *İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği* (3. Basım), KTÜ, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Genel Yayın No:124, Fakülte Yayın No:2,Cilt 1, Karadeniz Teknik Üniversitesi Matbaası, Trabzon.

- Devlin, H., R., Nagahama, Y., 2002, "Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences", *Aquaculture* 208, 191–364.
- Ekici, A., Baran, A., Yamaner, G., Özdaş, Ö., B., Sandal, A., İ., Güven E., Baltacı, M., A., 2012, "Effects of Different Doses of Taurine in the Glucose-Based Extender During Cryopreservation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Semen", *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26(4), 3113-3115.
- Ercan, M., D., Ekici, A., 2016, "Reducing bacterial density in the semen of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by applying gradient centrifugation and swim-up washing methods", *Aquaculture Research*, 47, 3845–3851.
- FAO, Fisheries and Aquaculture Department, 2016, *Cultured Aquatic Species Information Programme*, http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en [Ziyaret Tarihi: 15 Kasım 2017]
- Gamo, H., 1961, "On the origin of germ cells and formation of gonad primordia in the medaka (*Oryzias latipes*)", *Japanese J. Zool.*, 13, 101–129.
- Güralp, H., Pocherniaieva, K., Blecha, M., Policar, T., Psenicka, M., Saito, T., 2017, "Migration of Primordial Germ Cells During Late Embryogenesis of Pikeperch *Sander lucioperca* Relative to Blastomere Transplantation", *Czech J. Anim. Sci.*, 62, (3): 121–129.
- Güngör, E., 2015, "Isolation of early stages of germ cells in pikeperch (*Sander lucioperca*)", Diploma Thesis Msc, University of South Bohemia in České Budějovice Faculty of Fisheries and Protection of Waters Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Czech Republic.
- Hamaguchi, S. 1982. "A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*", *Cell and Tissue Research*, 227, 139-151.
- Herpin, A., Fischer, P., Liedtke, D., Kluever, N., Neuner, C., 2008, "Sequential SDF1a and b-induced mobility guides medaka PGC migration", *Dev. Biol.*, 320: 319–327.
- Hinton, D., E., 1990, *Histological Techniques. In: Methods for Fish Biology*, Edited by Schreck, C., B., Moyle, P., B., American Fisheries Society, Exxon Company, USA.
- Hong, N., Li, M., Yuan, Y., Wang, T., Yi, M., Xu, H., Zeng, H., Song, J., Hong, Y., 2016, "Dnd Is a Critical Specifier of Primordial Germ Cells in the Medaka Fish", *Stem Cell Reports*, Vol. 6, 411–421.
- Jones, P., A., Werb, Z., 1980, "Degradation of connective tissue matrices by macrophages : Influence of matrix composition on proteolysis of glycoproteins, elastin, and collagen by macrophages in culture", *J. Exp. Med.*, 152: 1527-1536.
- Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S., 2008, "Flow Sitometri ve Kullanım Alanları", *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi)*, Cilt: 06, Sayı: 2, 01-18.

- Karayücel, İ., Karayücel, S., 2016, *Balıklarda Üreme* (1. Basım), Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, ISBN: 978-605-320-441-1.
- Kayalar, Ö., Öztay, F., 2014, “Retinoic acid induced repair in the lung of adult hyperoxic mice, reducing transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) mediated abnormal alterations”, *Acta Histochemica*, 116 (2014) 810–819.
- Kawasaki, T., Siegfried, K., R., Sakai, N., 2015, “Differentiation of zebrafish spermatogonial stem cells to functional sperm in culture”, *Development*, 30, 15;143(4):566-74.
- Kobayashi, T., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., 2004, “Isolation of Highly pure and Viable Primordial Germ Cells From Rainbow Trout by GFP-Dependent Flow Cytometry”, *Molecular Reproduction and Development*, 67:91-100.
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2007, “Generation of Viable Fish From Cryopreserved Primordial Germ Cells”, *Molecular Reproduction And Development*, 74:207–213.
- Koç, N., D., Yüce, R., 2012, “A light- and electron microscopic study of primordial germ cells in the zebra fish (*Danio rerio*)”, *Biol. Res.*, 45, 331-336.
- Kurokawa, H., Aoki, Y., Nakamura, S., Ebe, Y., Kobayashi, D., Tanaka, M., 2006, “Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*”, *Development, Growth & Differentiation*, 48: 209–221.
- Labbe, C., Robles, V., Herraes, M., P., 2013, *Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation*, Advances in Aquaculture Hatchery Technology, Woodhead Publishing Limited, İngiltere.
- Lacerda, S. M. S. N., Batlouni, S. R., Silva, S. B. G., Homem, C. S. P., França, L., R., 2006, “Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model”, *Animal Reproduction*, 3 (2), 146- 159.
- Lacerda, S.M.S.N., Batlouni, S.R., Costa, G.M.J., Segatelli, T.M., Quirino, B.R., Queiroz, B.M., Kalapothakis, E., França, L.R., 2010, “A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model”, *Plos One*, Volume 5, Issue 5.
- Lacerda, S., M., S., N., Costa, G., M., J., Campos-Junior, P., H., A., Segatelli, T., M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., França, L., R., 2013, “Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction”, *Fish Physiol. Biochem.*, 39:3–11.
- Lacerda, S., M., S., N., Costa, G., M., J., França, L., R., 2014, “Biology and identity of fish spermatogonial stem cell”, *General and Comparative Endocrinology*, 207, 56–65.
- Lahnsteiner, F., 2000, “Semen Cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike”, *Aquaculture Research*, 31, 245-258.
- Laird L., M., Needham, T., 1988, *Salmon and Trout Farming*, Ellis Horwood Limited, England.

- Lee, S., Seki, S., Katayama, N., Yoshizaki, G., 2015, "Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish", *Scientific Reports* 5, Article number: 16045.
- Li, P., Dzyuba, B., Hulak, M., Rodina, M., Boryshpolets, S., Li, Z-H, Linhart, O., 2010, "Percoll Gradient Separation of Cryopreserved Common Carp Spermatozoa to Obtain a Fraction with Higher Motility, Velocity and Membrane Integrity", *Theriogenology*, 74, 1356-1361.
- Linhartová, Z., Rodina, M., Guralp, H., Gazo, I., Saito, T., Pšenička, M., 2014, "Isolation and Cryopreservation of Early Stages of Germ Cells of Tench (*Tinca tinca*)", *Czech Journal of Animal Science*, 59 (8), 381- 390.
- Loir, M., 1999, "Spermatogonia of Rainbow Trout: I. Morphological Characterization, Mitotic Activity, and Survival in Primary Cultures of Testicular Cells", *Molecular Reproduction And Development*, 53:422–433.
- Lujić, J., Marinović, Z., Sušnik, Bajec, S., Djurdjevič, I., Snoj, A., Urbányi, B., Horváth, A., 2017, "Interspecific Transplantation Of Brown Trout And Grayling Germ Cells Into Rainbow Trout: Conservation Of Valuable Balkan Trout Genetic Resources", *6th International Workshop on the Biology of Fish Gametes*, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, Czech Republic, ISBN 978-80-7514-056-2, 52.
- Mylonas, C., C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010, "Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction", *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165, 516–534.
- Nagano, M., C., Yeh, J., R., 2013, "The identity and fate decision control of spermatogonial stem cells: where is the point of no return?", *Curr. Top. Dev. Biol.*, 102, 61–95.
- Nakamura, S., Kobayashi, D., Aoki, Y., Yokoi, H., Ebe, Y., 2006, "Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in medaka embryos", *Dev. Biol.*, 295: 678–688.
- Nieuwkoop, P., D., Sutasurya, L., A. 1979, *Primordium Germ Cells in the Chordates*, Cambridge University Press.
- Nishimura, T., Tanaka, M., 2014, "Gonadal Development in Fish", *Sexual Development*, 8:252–261.
- Oatley, J., M., Brinster, R., L., 2012, "The germline stem cell niche unit in mammalian testes", *Physiol. Rev.*, 92, 577–595.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki G., 2006, "Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish", *Developmental Biology*, vol. 103, no. 8, 2725–2729.
- Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2007, "Production Of Trout Offspring From Triploid Salmon Parents", *Science*, 14;317(5844):1517.
- Okutsu, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2008, "Spermatogonial Transplantation in Fish: Production of Trout Offspring from Salmon Parents", *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress, pp. 209–219.

- Övet, H., Öztay, F., 2014, “The Copper Chelator Tetrathiomolybdate Regressed Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice, by Reducing Lysyl Oxidase Expressions”, *Biological Trace Element Research*, 162:189–199.
- Özel, H., B., Ozan, E., Dabak, Ö., 2008, “Embriyonik Kök Hücreler”, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 28:333-341.
- Panda, R., P., Barman, H., K., Mohapatra, C., 2011, “Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from *Labeo rohita* testis for in vitro propagation”, *Theriogenology*, 76, 241–251.
- Psenicka, M., Saito, T., Linhartova, Z., Gazo, I., 2015, “Isolation and transplantation of sturgeon early- stage germ cells”, *Theriogenology*, 83, 1085- 1092.
- Rabanal, R., H., 1988, “History of Aquaculture”, ASEAN/UNDP/FAO Regional Small-Scale Coastal Fisheries Development Project, Manila, Philippines.
- Raz, E., 2000, “The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development”, *Genome Biology*, 1(3):reviews, 1017.1–1017.6.
- Raz, E., 2003, “Primordial Germ-Cell Development: The Zebrafish Perspective”, *Nature Reviews- Genetics*, Volume 4.
- Richardson, B., E., Lehmann, R., 2010, “Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 37–49.
- Robles, V., Riesco, M., F., Psenicka, M., Saito, T., Valcarce, D., G., Cabrita, E., Herráez, P., 2016, “Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications”, *Aquaculture*, 632041; No of Pages 17.
- Saito, D., Morinaga, C., Aoki, Y., Nakamura, S., Mitani, H., 2007, “Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: insights from germ cell-depleted mutant *zenzai*”, *Dev. Biology*, 310: 280–290.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., 2008, “Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation”, *Biol. Reprod.*, 78, 159–166.
- Saito, T., Psenicka, M., Goto, R., Adachi, S., Inoue, K., Arai, K., Yamaha, E., 2014, “The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons”, *PLoS ONE*, 9, e86861.
- Satoh, N., Egami, N., 1972, “Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development”, *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 28: 385–395.
- Satoh, N., 1974, “An ultrastructural study of sex differentiation in the teleost *Oryzias latipes*”, *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 32: 195–215.
- Shapiro, H., M., 2003, “*Practical Flow Cytometry (4th ed.)*”, A John Wiley & Sons, INC., Publication, Newyork.

- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., 2000, "The vasa-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*", *Develop. Growth Differ.*, 42, 317-326.
- Suquet, M., Billard, R., Cosson, J., Normant, Y., Fauvel, C., 1995, "Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*) : determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact", *Aquaculture*, 133, 83-90.
- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y., Kuwana, T., 1993, "Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*)", *Theriogenology*, Volume 40, Issue 3, 509-519.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Kobayashi, T., Takeuchi, T., 2002, "Mass Isolation of Primordial Germ Cells from Transgenic Rainbow Trout Carrying the Green Fluorescent Protein Gene Driven by the vasa Gene Promoter", *Biology Of Reproduction*, 67, 1087-1092.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., 2003, "Generation of Live Fry from Intraperitoneally Transplanted Primordial Germ Cells in Rainbow Trout", *Biology of Reproduction*, 69, 1142-1149.
- Taş, A., 2005, "*Fare embriyonik kök hücrelerin kültürü, farklılaşması ve karakterizasyonu*", Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Tekelioğlu, N., 1993, *İç Su Balıkları Yetiştiriciliği (Soğuk ve Sıcak İklim Balıkları)*, Çukurova Üniversitesi Su ürünleri Yüksekokulu Yayınları No:2, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Basımevi, Adana.
- Tekin, N., Seçer, S., Akçay, E., Bozkurt, Y., Kayam, S., 2007, "Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant", *J. Appl. Ichthyol.*, 23, 60-63.
- Thoma, E., C., Wagner, T., U., Weber, I., P., Herpin, A., Fischer, A., Schartl, M., 2011, "Ectopic expression of single transcription factors directs differentiation of a medaka spermatogonial cell line", *Stem Cells Dev.*, 20, 1425-1438.
- TÜİK, 2016, *Su Ürünleri İstatistikleri Veri Tabanı*, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005 [Ziyaret Tarihi: 15 Kasım 2017]
- Tiersch, T., R., 2008, "Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen", *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, suplemento especial p.15-19.
- Timur, G., 2008, *Balık Anatomisi* (1.Basım), Nobel Yayın Dağıtım, Nobel Yayın no:1332, Ankara, ISBN: 978-605-395-129-2.
- Timur, G., 2013, *Balık Histolojisi ve Embriyolojisi* (1. Basım), İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 5155, Fen Bilimleri Enstitüsü yayınları, İstanbul, 15, ISBN:978-975-404-942-8.

- Valli, H., Phillips, B., T., Shetty, G., Byrne, J., A., Clark, A., T., Meistrich, M., L., Orwig, K., E., 2014, "Germline stem cells: toward the regeneration of spermatogenesis", *Fertil Steril*, 101, 3–13.
- Yamaner, G., 2012, *Farklı Sulandırıcılarla Dondurulan Rus Mersin Balığı (Acipenser gueldenstaedtii 1833) Spermalarının Kalitesi Üzerine Bir Araştırma*, Doktora Tez, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yetiştiricilik.
- Ye, H., Li, C., J., Yue, H., M., Du, H., Yang, X., G., Yoshino, T., Hayashida, T., Takeuchi, Y., Wei, Q., W., 2017, "Establishment of intraperitoneal germ cell transplantation for critically endangered Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*", *Theriogenology*, 94, 37-47.
- Yıldız, M., Doğan, K., Şener, E., Bayır, A., 2009, "Structural, technological and productivity analyses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in the Marmara region Turkey", *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 21-25.
- Yılmaz, Ö., Öztay, F., Kayalar, Ö., 2015, "Dasatinib attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice", *Growth Factors*, 33(5–6): 366–375.
- Yoshida, S., 2012, "Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis", *Reproduction*, 144, 293–302.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Sakatani, S., Takeuchi, T., 2000, "Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter", *The International Journal of Developmental Biology*, 44: 323-326.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., Ihara, S., Takeuchi, T., 2002, "Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life", *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 3–12.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., Takeuchi, T., 2003, "Primordial germ cell: a novel tool for fish bioengineering", *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 453–457.
- Yoshizaki, G., Tago, Y., Takeuchi, Y., Sawatari, E., Kobayashi, T., Takeuchi, T., 2005, "Green Fluorescent Protein Labeling of Primordial Germ Cells Using a Nontransgenic Method and Its Application for Germ Cell Transplantation in Salmonidae", *Biology Of Reproduction*, 73, 88–93.
- Yoshizaki, G., Okutsu, T., Ichikawa, M., Hayashi, M., Takeuchi, Y., 2010, "Sexual plasticity of rainbow trout germ cells", *Anim. Reprod.*, v.7, n.3, p.187-196.
- Yohizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., Takeuchi, Y., 2011, "Spermatogonial Transplantation in Fish: A Novel Method for the Preservation of Genetic Resources", *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part D 6, 55-61.
- Yoshizaki, G., okutsu, T., Takeuchi, Y., 2012, *Germ Cell Transplantation in Fish: Basic Biology and biotechnological Applications*, Aquaculture Biotechnology, In:Fletcher, G., L., Rise, M., L., (ed.), Chapter 14, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, ABD.

- Zhang, T., Rawson, D., M., Pekarsky, I., Blais, I., Lubzens, E., 2007, *Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes*, The Fish Oocyte From Basic Studies to Biotechnological Applications, In: Babin P., J., Cerda J., Lubzens, E., (ed.), Chapter 14, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Walters, E., M., Benson, J., D., Woods, E., J., Critser, J., K., 2009, *The history of sperm cryopreservation*, Sperm Banking: Theory and Practice, Cambridge University Press, ISBN: 9780521611282.
- Weisel, G., F., 1943, "A Histological Study of the Testes of the Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*)", *Journal of Morphology*, Vol,73, No, 2.
- Wootton, R., J., Smith, C., 2015, *Chapter 4- Gametogenesis*, Reproductive Biology of Teleost Fishes (First Edition), John Wiley & Sons, Ltd., ISBN: 978-0-632-05426-8, 45-80.
- Xu, H., Gui, J., Hong, Y., 2005, "Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate", *Developmental Dynamics*, 233, 872– 882.
- Xu, H., Li, M., Gui, J., Hong, Y., 2010, "Fish germ cells", *Science China Life Science*, 53 (4), 435-446.
- Xu, H., Lim, M., Dwarakanath, M., Hong, Y., 2014, "Vasa Identifies Germ Cells and Critical Stages of Oogenesis in the Asian Seabass", *International Journal of Biological Sciences*, 10(2), 225-235.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Sude ATMACA
Doğum Yeri	Kadıköy
Doğum Tarihi	29.09.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0544 634 26 34
E-Posta Adresi	sudeatmaca@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Fakülte	Deniz Bilimleri Fakültesi
Bölümü	Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	11.07.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı
Programı	Yetiştiricilik Programı
Mezuniyet Tarihi	25.12.2017

Makale ve Bildiriler	
Ekici, A., Keskin, İ., Atmaca, S., “Panax Ginseng’in Zebra Balığı Sperm Motilitesi Üzerine Etkisi”, Eylül 2017, 19. <i>Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu</i> , Sinop, Türkiye.	
Ekici, A., Güngör, E., Atmaca, S., Keskin, İ., Ercan, M., D., “Taşıyıcı Anaç Balık Modeli”, Eylül 2017, 19. <i>Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu</i> , Sinop, Türkiye.	
Keskin, İ., Atmaca, S., Ekici, A., “The effects of ginger (<i>Zingiber officinale</i>) on zebrafish sperm motility”, Eylül 2017, 6 th <i>International Workshop on the Biology of Fish Gametes</i> , Vodňany, Çek Cumhuriyeti.	
Atmaca, S., Ekici, A., “Germ Cell Isolation Of Rainbow Trout Using Density Percoll Centrifugation”, Eylül 2017, 6 th <i>International Workshop on the Biology of Fish Gametes</i> , Vodňany, Çek Cumhuriyeti.	
Sevinc, B., M., Ozdemir, R., C., Atmaca, S., Ekici, A., “Broodstock And Sperm Quality Differences In Genetically Modified Zebrafish And Wild-Type Zebrafish	

(*Danio Rerio* Hamilton-Buchanan, 1822)”, Eylül 2015, *5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes*, Ancona, İtalya.

Ekici, A., Ozdemir, R., C., Atmaca, S., “Sperm Motion Kinematics And Sperm Motility Duration Of Convict Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*)”, Ekim 2014, *Aquaculture Europe*, Donostia–San Sebastián, İspanya.

Ekici, A., Kilitçioğlu, B., Atmaca, S., Ozdemir, R., C., Yamaner, G., “Spermatozoa Motility Characteristics Of Convict Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) in Long-Term Storage”, Eylül 2014, *FABA 2014 International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences*, Trabzon, Türkiye.

Ozdemir, R., C., Atmaca, S., Ekici, A., “Determination Of Gynogenesis Application With Biotechnological And Molecular Methods”, Mayıs 2014, *1st International Symposium on Aquatic Sciences and Technology*, Kıbrıs.

Topus, O., Atmaca, S., Ozderya, N., “The Sustainable Development and Management of Turkish Aquaculture”, Eylül 2011, *International Symposium Protection And Sustainable Managment Of The Black Sea Ecosystem Third Millenium Imperative 5th Edition*, Köstence, Romanya.

“Cryopreservation of fish germ cells”, 7-11 Mart 2016, *5th Aquagamete Training School*, Aquagamete Cost Action, Valensiya- İspanya.