



**T.C.**  
**İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAHVERENGİ ALABALIĞINDAN (*Salmo trutta*, Linneaus 1766)**  
**OOGONİYAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ**

**KAMURAN UMUT YARAŞ**

**SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY**  
**AĞUSTOS- 2017**

T.C.  
İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAHVERENGİ ALABALIĞINDAN (*Salmo trutta*, Linneaus 1766)  
OOGONİYAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ

KAMURAN UMUT YARAŞ

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY

AĞUSTOS-2017

T.C.  
İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAHVERENGİ ALABALIĞINDAN (*Salmo trutta*, Linneaus 1766)  
OOGONİYAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ**

**KAMURAN UMUT YARAŞ  
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Prof. Dr. Şehriban ÇEK** danışmanlığında hazırlanan bu tez **07/082017** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şehriban ÇEK  
Başkan

Prof.Dr. Funda TURAN  
Üye

Esin ATİK DOĞAN  
Üye

**Kod No:**

Doç. Dr. Mustafa DEMİRCİ  
**Enstitü Müdürü**

**Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.**

**07.08.2017**

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

**Kamuran Umut YARAŞ**

**KAHVERENGİ ALABALIĞI'NDAN (*Salmo trutta*, Linneaus 1766)  
OOGONİYAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ**

**ÖZET**

Bu tezde, dişi Dağ alabalıklarında, *Salmo trutta macrostigma*, (*Salmo trutta*, Linneaus 1766) oogoniyal kök hücre izolasyonu ve kültürü için pratik bir yöntem geliştirilmiştir. İlk olarak, oogoniyal kök hücre izolasyon ve kültüründe kullanılan *S.t. macrostigma* dişi balıklarının ortalama yaş, boy ve ağırlıkları sırasıyla 2,5-3 aylık, 14,65±1,66cm, boy 28,22±7,79g ağırlığında olarak kaydedilmiştir. İkincil olarak ovaryumların morfolojik ve histolojik durumları değerlendirilmiştir. Son olarak *S.t. macrostigma* oogoniyal kök hücreleri için izolasyon ve kültür şartları optimize edilmiştir. Perinukleolar aşamada olan gonadlarda en yoğun miktarda oogoniyal kök hücre olduğu saptanmıştır. Oogoniyanın yaşama oranı ve mitotik aktivitesi L-15 kültür vasatında, % 5'lik *S.t. macrostigma* serumu ile (kültür ortamı pH, 7,65; sıcaklık 20°C) geliştirilmiştir. Hücrelerin izolasyonu sonucunda, oogoniyal kök hücre yoğunluğu  $5,4*10^5 \pm 2,6*10^5$  hücre/ml olarak, oogoniyal kök hücre hacmi ise 13,5 ml olarak hesaplanmıştır. Tezde, *S.t. macrostigma* için taşıyıcı anaç teknolojisinde ve hücre gen transfer sistemlerinde kullanılabilir hücre hattı geliştirilmiştir. Oogoniyal kök hücre kültürü sonucunda transplantasyonda kullanılacak hücre miktarı  $2,7*10^6 \pm 1,3*10^6$  olarak önerilmiştir.

2017, 43 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Salmo trutta macrostigma*, Oogoniyal kök hücre, izolasyon, kültür, histoloji

## ABSTRACT

### **Oogonial Stem Cell Isolation and Culture From Brown trout (*Salmo trutta*, Linnaeus 1766)**

A practical technique for oogonial stem cell isolation and culture of the female Brown trout (*Salmo trutta macrostigma*, *S.t.macrostigma*) were elucidated in this thesis. Initially, appropriate age, size and weight of the female *S.t. macrostigma* for oogonial stem cell isolation and culture were identified as 2,5-3 month old, 14,65±1,66 cm, 28,22±7.79 g respectively. Secondly, morphological and histological ovary conditions were assessed. Finally, isolation and culture conditions for oogonial stem cells of *S.t. macrostigma* were optimized. The highest oogonial stem cells were measured in the perinucleolar stage of the ovary. Survival rate of oogonia and mitotic activities in L-15 culture media, with 5% serum of *S.t. macrostigma* (Culture media pH, 7,65; temperature 20°C) were developed. Density of oogonial stem cells were measured as  $5,4 \cdot 10^5 \pm 2,6 \cdot 10^5$  cells/ml. Whereas, oogonial volume was recorded as 13,5 ml. In the thesis, germ line chimera was developed for *S.t. macrostigma* in order to be used in surrogate reproduction technologies and gene transfer systems. After culture of oogonial stem cells it was suggested that  $2,7 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^6$  cells/ ml cell count should be used in transplantation technologies.

2017, 43 pages

**Key Words:** *Salmo trutta macrostigma*, Oogonial stem cell, isolation, culture, histology

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren hem mesleğe hem de hayata yaklaşımıyla bana örnek olan, bilgisini ve deneyimlerini her zaman cömertçe benimle paylaşan, tez çalışmamın tüm aşamalarında, büyük titizlik, sabır ve özveri ile bana destek veren, akademik görevlerine ve idari yükümlülüklerine rağmen bana desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, insani ve ahlaki değerleri ile de kendime örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Şehriban ÇEK'e derin saygı ve minnettarlığımı iletmek isterim.

Tez çalışmam esnasında her türlü yardımını esiremeyerek yanımda duran değerli hocam Yrd. Doç. Fatmagün AYDIN'na ve Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü'ne derin saygı ve minnettarlığımı iletmek isterim.

Tez çalışmam sırasında materyal temininde yardımcı olan Kılıç Balıkçılık'a bağlı olan Bafa Alabalık işletmeleri Genel Müdürü Taner ŞEKER'e yardımları ve destekleri için teşekkürlerimi iletmek isterim.

Laboratuar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Mehtap AYDIN, Dr. Serdar YANIK'a ve İskenderun Devlet Hastanesi'ne teşekkürlerimi ve minnettarlığımı iletmek isterim. Çalışmalarım sırasında, kullanmış olduğum tüm antibiyotiklerin teminini sağlayan sayın Dr. Halil İbrahim AYAZ'a bir borç bilirim.

Çalışmalarında Yardımlarını esirgemeyen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne teşekkürlerimi ve minnettarlığımı iletmek isterim.

Hayatım boyunca beni destekleyen ve bu günüme gelmemi sağlayan biricik aileme derin saygı, sevgi ve minnettarlığımı iletmek isterim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	5
2.1. Ovaryumun İşlevi ve Germ Kök Hücrelerinin Farklılaşması .....	5
2.2. Oogonial Kök Hücrelerin Özellikleri .....	6
2.3. Oogoniyal Kök Hücre İzolasyonunun Amacı .....	6
2.4. <i>Salmo trutta macrostigma</i> (Dumeril, 1858) Türlerinde Yapılan Çalışmalar .....	7
2.5. Oogoniyal Kök Hücre Transplantasyonu .....	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
3.1. Denemede Kullanılan Balıklar .....	10
3.2. Hücre Kültür Kapları .....	12
3.3. Hanks' Tuz Solusyonu .....	13
3.4. Soğutmalı Santrifüj.....	14
3.5. Trypan Blue .....	15
3.6. L-15 Leibovitz Medyumu (Vasatı).....	18
3.7. CO <sub>2</sub> ve O <sub>2</sub> Kontrollü İnkübatör.....	20
3.8. Otoklav .....	21
3.9. Gonad Histolojisi.....	22
3.10. Oogoniyal Kök Hücre İzolasyon .....	22
3.11. Oogoniyal Kök Hücre Kültürü .....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....	25
4.1. Oogoniyal Kök Hücre İzolasyonunda Gonadların Morfolojisi .....	25
4.2. Optimum Oogoniyal Kök Hücre İzolasyonunda Gonadların Histolojisi .....	27
4.3. Oogoniyal Kök Hücre Yoğunluğu .....	29
4.4. Oogoniyal Kök Hücre Hacmi .....	30
4.5. Oogoniyal Kök Hücre İzolasyonu .....	30
4.6. Oogoniyal Kök Hücre Kültürü .....	33
5. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	37
KAYNAKLAR .....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	43



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Anadolu Dağ Alabalığı ( <i>Salmo trutta magrostigma</i> ) .....	10
Şekil 3.2. 12' li Hücre Kültür Kapları .....	12
Şekil 3.3. HBSS (Hank's Tampon Tuz Solusyonu).....	13
Şekil 3.4. Soğutmalı Santrifüj .....	14
Şekil 3.5. Tripan Mavisi.....	15
Şekil 3.6. Ölü ve Canlı Hücrelerin sayıldığı Hemasitometre ( Thoma Lamı ) .....	16
Şekil 3.7. L-15 Medyumu (Vasatı) .....	18
Şekil 3.8. CO <sub>2</sub> 've O <sub>2</sub> Kontrollü İnkübatör.....	20
Şekil 3.9. Otoklav.....	21
Şekil 3.10. İvert Mikroskop Altında Kök Hücre Görüntüleme Çalışması.....	23
Şekil 4.1. Oogonial kök hücre izolasyonun yapılacağı gonadların morfolojik görünümü .....	25
Şekil 4.2.a. Kromatin nucleolus evrede olan gonadlarda, oogonia gösterilmektedir. Bloklar parafine gömülmüş, alınan kesitler ise hematoksilen ve eosin boyalar ile boyanmıştır. Oo, oogonia. Ölçek çubuğu=60 µm .....	28
Şekil 4.3.b. Perinükleolar evrede olan gonadlarda, oogonia gösterilmektedir. Kesitler hematoksilen ve eosin boyalar ile boyanmıştır. Oo, oogonia. Ölçek çubuğu=60 µm. ...	28
Şekil 4.4. İzolasyon Aşamasındaki Oogoniyal kök hücreler. ....	32
Şekil 4.5. Toma Lamında Canlı ve Ölü Oogoniyal Kök Hücrelerin Sayımı .....	33
Şekil 4.6. Oogoniyal Kök Hücre Kültürü 1.'inci gün.....	34
Şekil 4.7. Oogoniyal Kök Hücre Kültürü 3. Gün.....	35
Şekil 4.8. Kök Hücrelerin Bölünmeleri.....	35
Şekil 4.9. Oogoniyal Kök Hücre Kolonisi .....	36

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 3.1.Çalışmada kullanılan kültür vasatı (L-15) .....	19
Tablo 4.1.Eşey Kök Hücrelerinin En Yüksek Miktarda Bulunduğu Yaş, Boy ve Ağırlıkların kıyaslanması .....	26
Tablo 4.2.Oogonial Kök Hücre Hesaplamaları .....	32



## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
g	: Gram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
U/mg	: Unit/miligram
µg	: Mikrogram
HBBS	: Hanks' Balanced Salt solution
L-15	:Leibovitz-15 Medium
HES	: Hidro Elektrik Santralleri
PEH	:Primordial Eşey Hücreleri

## 1. GİRİŞ

Canlı organizmalarda kök hücreleri, bölünerek kendilerini yenileme ve aynı zamanda özelleşmiş hücrelere dönüşebilen, farklılaşma yetenekleri olan hücrelerdir. Kendilerini yenileyebilme ve diğer hücrelere dönüşebilme yetenekleri, onları vücuttaki diğer hücrelerden farklı kılmaktadır. Fare embriyolarından ilk kök hücrelerin elde edilmesi ile birlikte, temel araştırmalarda, tıp alanında ve hayvan biyoteknolojilerindeki önemli kullanım potansiyellerinden dolayı, aktif araştırmaların odak noktası olmuştur. İnsan embriyonik kök hücreleri 1998 yılında Thomson ve arkadaşları tarafından elde edilmişken balık kök hücreleri üzerindeki araştırmalar 20 yıl önce başlamıştır (Çek ve ark. 2016). Balıklarda kök hücreler üç farklı kaynaktan elde edilmektedir. Bunlardan ilki balık embriyosundan, diğer bir ifade ile yumurta döllendikten bir süre sonra, orta-blastula aşamasında olan embriyodan elde ediliyor ve buna embriyonel kök hücre deniliyor (Yi ve ark. 2009). Mid-blastula aşamasına gelme süresi balık türleri arasında ve su sıcaklığına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Gökkuşaağı alabalığında, yumurta döllendikten sonra 6 saattir (Yoshizaki ve ark. 2010a). İkincisi ise, ileride sperm veya yumurta hücresi olabilecek üreme hücreleri olan Primordiyal eşey hücreleri (PEH) kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır (Lacerda ve ark. 2006). Kök hücrelerin bir diğer kaynağı ise ergin balıklarda bulunan ergin kök hücrelerdir. Ergin kök hücreler balık yaşadığı süre boyunca kendilerinin kopyalarını üreterek çoğalırlar. Bu hücreler buldukları dokulardaki yaşlanma, hastalanan veya ölen hücrelerin yerine yenilerini üreterek yedek hücre kaynakları olarak görev yapmaktadırlar. Zebra balıklarında böbreğin rejenerasyonu ise Diep ve ark. (2011) tarafından araştırılmıştır. Balıklarda kemik iliği kök hücreleri üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya literatürlerde rastlanmamıştır. Zebra balıkları üzerine yapılan çalışmalarda kan kök hücrelerinin kemik iliğinden ziyade böbrekler de depolandıkları De Jong ve ark. (2011) tarafından rapor edilmiştir. Sınır kök hücreleri, zebra balığında Grandel ve ark. (2006), retinal kök hücreler ise Otteson ve Hitchcock (2003) tarafından çalışılmıştır.

Balık kök hücrelerinin çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanılma potansiyelleri mevcuttur. Gen hedeflenmesi (Rocha ve ark. 2003; Sosa ve ark. 2010; Nwokwa, 2012), eşey hücre transplantasyonları (Lacerda ve ark. 2006; Yoshizaki ve ark. 2010a, 2010b, 2012) ve çekirdek transferi yolu ile yarı klonlama alanlarıdır (Yi ve ark. 2009).

Primordiyal germ hücreleri (PEH'leri), embriyogenez süresince, yalancı gonadlara (gonosit) gelmeden önce eşey hücreleri için kullanılan terimdir. Yalancı gonadlara ulaştıklarında, erkeklerde olgun sperm ve dişilerde ise olgun yumurtaya farklılaşırlar (Çek 2006; Lacerda ve ark. 2012). Primordiyal eşey hücreleri genetik materyali bir nesilden diğerine taşıyabilen tek embriyonik hücrelerdir. Bu nedenle gen bankaları oluşturmada, gametlerin saklanması ve korunmasında, özellikle de donör gametler aracılığı ile hücre hattı kimerizmini oluşturmada oldukça önemlidirler (Wong ve ark. 2011; Yoshizaki ve ark. 2012; Lacerda ve ark. 2012; Lee ve ark. 2015; Shang ve ark. 2015). Germ hücre transplantasyonu ilk kez Japon bilim insanları Yoshizaki ve ark. (2002) tarafından geliştirilmiştir. Germ hücreleri yumurta veya sperm üretimi için yalnızca gonadlarda kolonize olurlar. Bu hücreler pluripotent kök hücrelerine dönüşebilme yeteneğindedirler (Lacerda ve ark. 2008; Satio ve ark. 2008). Germ hücreleri morfolojik olarak embriyonik kök hücreleri ile benzerlik göstermektedir ve kültürlerinde embryoid yapılar oluşturabilmektedirler (Fan ve ark. 2008). Germ hücre transplantasyonları üç farklı şekilde yapılmaktadır. Birincisinde donörden izole edilmiş olan primordiyal germ hücreleri döllenmiş ve blastula aşamasında olan embriyolara transplante edilmektedir (Saito ve ark. 2008). İkinci yöntemde henüz yumurtadan çıkmış, yumurta keseli larvaların vücut boşluğuna, vericiden izole edilmiş olan primordiyal germ hücreleri, Yoshizaki ve ark. (2010a, b; 2012) tarafından transplante edilmiştir. Üçüncü yöntemde ise germ hücrelerin transplantasyonları ergin olan balıklara yapılmıştır (Lacerda ve ark. 2006; 2008; 2010; 2012; Shang ve ark. 2015). Aynı şekilde juvenil balıklardan izole edilmiş olan spermatogoniyal veya oogoniyal kök hücrelerin de transplantasyonları yapılmaktadır. Psenicka ve ark. (2015) mersin balıklarında germ hücrelerin izolasyon ve transplantasyonları ile ilgili yapmış oldukları ayrıntılı çalışmalarında, transplantasyon etkinliğini %60 olarak kaydetmişlerdir. Germ hücrelerinin transplantasyon sistemi ticari olarak önem taşıyan balık türlerinden gamet elde etmede kullanılabilir. Örneğin uskumrugillerden olan mavi yüzgeç orkinos (*Thunnus thynnus*) beş yılda eşeyssel olgunluğa erişmektedir. Yetiştiricilik şartlarında bunu gerçekleştirmek ayrıca zordur. Bunun yanında eşeyssel olgunluğa gelmiş bir orkinosun vücut ağırlığı birkaç yüz kilogramdır. Bu türden gamet elde etmek pahalı, zaman alıcı, haçerilerde fazla alan kapladığı için ekonomik değildir. Ancak yine uskumrugillerden olan kolyoz (*Scomber japonicus*) sadece bir yılda eşeyssel olgunluğa

erişmekte ve vücut ağırlığı 500g dır. Eğer mavi yüzgeç orkinosun germ hücreleri, kolyoza transplant edilirse daha kısa sürede küçük bir tankta orkinos gametlerini elde etmek mümkündür. Böylece orkinos gametlerinin daha kısa sürede, daha az masrafla, daha az işçi ve yer kullanarak üretilebileceği öngörülmektedir. Kolyoz burada bir bakıma kiralık (taşıyıcı) anaç olarak kullanılmış olur (Yoshizaki ve ark. 2012). Diğer bir uygulama alanı ise nesli tükenmekle karşı karşıya olan türlerin yumurta ve spermlerini üretmektir. Örneğin mersin balıkları 10 yılda eşeyssel olgunluğa gelmektedir. Akriba balık türlerinde daha kısa sürede eşeyssel olgunluk sağlanabilir. Primordiyal germ hücrelerinin uygulama alanlarına daha ayrıntılı olarak Okutsu ve ark. (2006; 2007) ve Yoshizaki ve ark. (2012) tarafından ele alınmıştır.

Bu tezin birincil amacı farklı boy, yaş ve ağırlıkta olan *S. trutta macrostigma* gonadlarını morfolojik ve histolojik olarak çalışmak ve oogoniyal kök hücre izolasyon ve kültürünün yapılabileceği optimum boy, yaş ve ağırlıkta olan *S. trutta macrostigma* bireylerini belirlemektir. Oogoniyal kök hücreler en yoğun hangi balıklarda kaydedilirse o boy, yaş ve ağırlıkta olan *S. trutta macrostigma*'lardan izolasyon işlemi yapılacaktır.

Çalışmada ileride erişilmek istenen sonuç ise, henüz kültür şartlarına adapte olamamış, strese karşı dayanıksız ancak oldukça lezzetli olduğundan dolayı tercih edilen ve ekonomik önemi büyük ( Gökkuşluğu alabalığı ile kıyaslandığında fiyatı 4 ile 10 kat daha yüksektir) olan dağ alabalığı gametlerini kısa sürede elde etmektir. Öncelikle oogoniyal kök hücrelerin en yoğun olarak bulunduğu dağ alabalığı, boyu, ağırlığı ve yaşı tespit edilecek, izleyen çalışmalarda oogoniyal kök hücrelerin izolasyon ve kültürü yapılarak bir sonraki doktora tezi aşamasında ise transplantasyon gerçekleştirilecektir. Dağ alabalığının, Kılıç gibi birkaç işletmede yetiştiriciliği yapılmaktadır ancak bu işletme sayıları sınırlıdır ve gökkuşluğu alabalığından daha geç bir sürede eşeyssel olgunluğa geldiği için pazar ağırlığına gelme süresi uzamaktadır. Bu uygulanacak olan yeni teknoloji ile ileride bu türe ait kök hücre transplantasyonu yapılabilecek ve bu süre kısalmak ve aynı zamanda bütünüyle %100 oranda dışı popülasyonlar elde edilebilecektir. Böylece, ülkemizde yetiştiriciliğe alınabilecek alternatif balık türlerinden biri olan dağ alabalığı ekonomiyeye kazandırılmış ve ülke ekonomisine katkıda bulunulacaktır. Kocabaş ve ark., (2012) dağ alabalığı, *S. trutta macrostigma* üzerine yapmış oldukları detaylı çalışmanın sonuçlarına göre bu türün neslinin tehlike altında olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar türün korunma altına

alınması gerektiğini önermişlerdir. Balıklarda sperm kriyoprezervasyonu başarılı iken özellikle büyük çaplı yumurtaların kriyoprezervasyonun da sorunlar mevcuttur (Salmonidae familyası türlerinde ciddi boyutlardadır). *S. trutta macrostigma* gibi büyük çaplı yumurtalara sahip olan balık türlerinde, yumurtanın dondurularak saklanması oldukça büyük problemler mevcuttur. Oogoniyal kök hücreyi kriyoprezervasyon tekniği ile saklamak daha kolaydır (Farlora ve ark. 2013). Kök hücre izolasyon ve kültürünün nesli tükenmekte olan çiklit türlerinin korunmasında kullanılabileceği Farlora ve ark. (2013) tarafından ileri sürülmüştür. *S. trutta macrostigma*'nın doğal stokları azalmakta ve aynı zamanda nesli tehlike altında olan bir türdür. Bu nedenle tezin bir diğer hedefi *S. trutta macrostigma* 'dan izole ve kültürü yapılan oogoniyal kök hücreleri doktora aşamasında kriyoprezervasyon saklayarak korumaktır. Kriyoprezervasyon aşamasından önce oogoniyal kök hücrenin izole edilmesi ve kültürünün yapılması gereklidir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Ovaryumun İşlevi ve Germ Kök Hücrelerinin Farklılaşması

Kemikli balıklarda dişi üreme organına ovaryum adı verilmiştir. Genellikle bir çift lobdan oluşan ovaryumlar, peritonel boşluğun dorsal duvarına mezoovarium adı verilen iplikçikler ile bağlıdır (Hoar ve Randall, 1969). Diğer bütün canlılarda olduğu gibi balıklarda da ovaryumların en önemli işlevi neslinin devamı için döllenabilir kalitede olan yumurta üretebilmektir. Ovaryumlarda medulla ve korteks olmak üzere başlıca iki farklı doku mevcuttur. Medulla bağ dokusu, kan damarları, kas ve sinir hücrelerini içerirken korteks primordiyal germ hücrelerini, oositleri, hormon üreten somatik hücreleri içermektedir (Hoar ve Randall 1969; Cumaranatunga, 1985). Ovaryumlar eğer bütünü ile periton tarafından çevrilmiş ise, olgun yumurtalar merkez ovaryum kanalına oradan da genital açıklık aracılığı ile dışarıya bırakılıyor ise bu tip ovaryumlara kapalı anlamına gelen cystovarian adı verilmiştir. Eğer ovaryumlar periton tarafından kısmen çevrili ve olgun yumurtalar vücut boşluğuna bırakılıyor ise açık anlamına gelen gymnovarian adı verilmiştir (Hoar ve 1969; Dodd ve Sumpter, 1984). *S.t macrostigmanın* da dahil olduğu Salmonidae familyası üzerine yapılan çalışmalarda, ovaryum türünün gymnovarian olduğu kanıtlanmıştır (Hoar ve Randall 1969; Dodd ve Sumpter, 1984).

Dişi balıkları gonadlarındaki oogenez az sayıdaki kök hücre diğer bir ifade ile Primordiyal eşey hücreleri, (PEH'leri) popülasyonundan kaynağını almaktadır (Çek, 2006). Primordiyal eşey hücreleri (PEH'leri) terimi embriyogenez aşamasında, gonositlere gelmeden önceki eşey hücrelerine verilen isimdir. Primordiyal eşey hücreleri (PEH'leri), embriyogenez süresince, yalancı gonadlara (gonositlere) gelmeden önce eşey hücreleri için kullanılan terimdir. Bu hücreler eşey kök hücre hattının öncüleridir ve cinsiyetlerin farklılaşmasından sonra oogoniyal veya spermatogoniyal ya farklılaşmaya programlanmışlardır (Yoshizaki ark. 2003). Gonositlere ulaştıklarında, erkeklerde olgun sperm ve dişilerde ise olgun yumurtaya farklılaşırlar (Çek, 2006). PEH'leri genetik materyali bir nesilden diğerine taşıyabilen tek embriyonik hücrelerdir. Bu nedenle gen bankaları oluşturmada, gametlerin saklanması ve korunmasında, özellikle de donör gametler aracılığı ile hücre hattı kimerizmini oluşturmada oldukça önemlidirler (Wong ve ark. 2011; Yoshizaki ve ark. 2012; Lacerda ve ark. 2012).



Oogenez oogoniyal kök hücrelerin bölünmesi ve çoğalması ile başlar. Oogoniyal kök hücreler histolojik olarak diğer somatik hücrelerden kolayca ayırt edilebilmektedir. Bu hücreler elips veya yuvarlak şekilli, oldukça belirgin bir çekirdeğe ve hücre çekirdeğinin merkezine yerleşmiş bir çekirdekçiğe sahiplerdir. Oogoniyal kök hücre çekirdeği çevresinde çok belirgin olmayan, hematiksilen ile hafif boyanmış sitoplazma mevcuttur (Çek, 2006).

## 2.2. Oogonial Kök Hücrelerin Özellikleri

Kök hücrelerin karakteristik özellikleri, sınırlı sayıda balık türünde çalışılmıştır. Medaka balığında *in vitro* ve *in vivo* da farklı üç embriyonik kök hücre hattı araştırılmıştır. *In vitro* da bu hücre hatlarının farelerdeki kök hücrelerin bütün özelliklerini taşıdığı gösterilmiştir. Bu özellikler: kendi kendisini yenileyebilme, istikrarlı büyüme, başka hücelere farklılaşma yeteneği, yüksek çekirdek-sitoplazma oranı, bir veya daha fazla sayıda belirgin çekirdekçik, yuvarlak veya çok şekilli olma, yüksek oranda alkalik fosfataz aktivitesi gösterme, normal diploid karyotip ve süspansiyon kültürlerde embryoid yapıya (embryoid cisimcik) benzer yapılar oluşturabilme yeteneği olarak sıralanmaktadır (MeiSheng ark. 2010). Zebra balıklarında Fan ve Collodi (2006), Çipura (*Sparus aurata*) da ise Béjar ark. (1999) tarafından benzer hücresel özellikler bildirilmiştir. Çek ve arkadaşları tarafından yapılan detaylı derlemede balık kök hücrelerinin genel özelliklerine değinilmiştir (Çek ark. 2016). Kemikli balıklarda oogoniyal kök hücrelerinin özellikleri ise birkaç balık türü ile sınırlı kalmıştır. Nakamura ve ark. (2011) oogoniyal hücre hattını Medaka balıklarında araştırmışlardır. Yoshizaki ve ark. (2012) Gökkuşığı alabalıklarında oogoniyal kök hücre hattının esnekliği üzerine çalışmışlardır. Oogoniyal kök hücrelerin basit bir şekilde spermatogoniyal kök hücre hattına dönüşebildiğini göstermişlerdir (Tanaka ve ark. ,2011).

## 2.3. Oogoniyal Kök Hücre İzolasyonunun Amacı

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanarak, son zamanlarda, gametogenezin altında yatan gelişimsel ve hücresel mekanizmaları incelemek için eşsiz bir platform sağlayan yeni bir germ hücresi nakli sistemi kullanılmıştır. Bu teknik kullanılarak, 6-9 aylık donörlerden izole edilen nakledilen yumurtalık germ hücrelerinin

cinsiyete göre farklılaşmamış embriyonik gonadları kolonize edebildiğini ve gametogenezi sürdürdüğü gösterilmiştir. Oogoniya içeren yumurtalık germ hücreleri ve dişi gökkuşağı alabalığından izole edilen erken oositler, her iki cinsiyetteki yumurtadan çıkan yavrularının periton boşluklarına nakledilmiştir. Transplante edilen yumurtalık germ hücreleri alıcı gonadlara doğru göç ettikleri, embriyonik gonadal somatik hücrelerle etkileşim içine girdikleri, hızla çoğaldıkları ve sonunda dişi alıcılardaki yumurtalara ve erkek alıcılardaki spermere dönüştükleri kaydedilmiştir (Yoshizaki ve ark. ,2010a, 2010b). Dahası, alıcı balıktan elde edilen vericiden türetilmiş yumurtalar ve spermeler fonksiyonel oldukları ve normal yavrular üretebildikleri gösterilmiştir. Bu bulgular, oogonia olan mitotik germ hücrelerinin yüksek oranda cinsel plastisiteye sahip olduğunu göstermektedir (Yoshizaki ve ark. ,2010a, 2010b).

#### **2.4. *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) Türlerinde Yapılan Çalışmalar**

Kocabaş (2009) yaptığı çalışmada kahverenkli alabalığın (*Salmo trutta* , Linneaus 1766) Türkiyede bulunan eko tiplerine değinmiştir. Bu ekotiplerin *S. trutta labrax*, *S. trutta fario*, *S. trutta abanticus*, *S. trutta macrostigma*, *S. trutta caspius* oldukları bildirilmiş ve bunların özelliklerine değinmiştir. Ülkemizde doğal alabalık stokları ele alındığında *salmo trutta* türüne ait oldukları, ancak farklı fenotipik özellikler gösterdikleri kanıtlanmıştır. Farklı fenotipik özelliklerinden dolayı, kök hücre çalışmalarının her bir ekotip üzerinde ayrıca yapılması gereklidir. Bu nedenle bu tezde kullanılan ekotip, neslinin tehlike altında olması ve yetiştiriciliğini ekonomik anlamda yapılamıyor olması nedenleri ile *Salmo trutta macrositgma* ekotipidir. Bu araştırmada elde edilen bulguların tamamı *Salmo trutta macrositgma* ekotipine aittir.

Duman ve ark. (2011), Munzur Çayında avlanan *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858)'nın et verimi ve kimyasal kompozisyonunu belirlemek amacıyla bir araştırma yapmışlardır. Araştırmaya göre kullanılan balıkların ortalama et verimi, I. yaş grubunda %58,04±0,04, II. yaş grubunda %58,98±, III. yaş grubunda %59,93±1,00 ve IV yaş grubunda ise %61,07±1,21 olarak bildirilmiş olup yaptıkları kimyasal analizler sonucu balıklarda ortalama nem, ham protein, ham yağ, ham kül ve karbonhidrat sırasıyla %78,87±0,78, %18,45±0,30, %2,65±0,77, %1,15±0,13 ve %0,98±0,09 olarak bildirmişlerdir.

Kocabaş ve ark. (2012) Anadolu dağ alabalıkları üzerine yaptıkları bir araştırmaya göre Türkiye, dünyanın en hızlı akan nehirlerinden bir kaçına sahip olmasına rağmen su rezervleri bakımından alt sıralarda yer aldığı ve yaklaşık 200 milyar m<sup>3</sup> su miktarına sahip olduğu bildirilmiştir. Dağ alabalığı olarak bilinen Anadolu alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*), Ülkemizin dört bir yanındaki yüksekliği 100-150 m ile 2300 m'ler arasında değişen, yaz döneminde su sıcaklığı 20°C ye kadar yükselebilen nehirlerde diğer *Salmo trutta* ekotiplerine nazaran, akarsuların daha hızlı aktığı kaynağa yakın bölümlerde ve dağlık bölgelerin yukarı kısımlarında doğal olarak yaşayan bir ekotip olduğunu bildirmişlerdir. Bu alabalık türünün alan kazanma, arazi kullanımı, kentleşme, tarım ve hidro elektrik santralleri (HES) gibi nedenlerden dolayı büyük ölçüde zarar gördüğü ve korunması için detaylı araştırmaların gerektiği ve önlemlerin alınmaması halinde trajik bir şekilde yok olabileceği raporlanmıştır. ALP ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Ceyhan Nehri, Fırınz Çayı'ndaki *Salmo trutta macrostigma*'nın bazı popülasyon özelliklerinin tanımlanması amacıyla bir çalışma yapılmıştır (Alp ve ark.,2005 ). 197 adet alabalıkta erkeklerin dişilere oranı 0,67:1,00 ve çatal boylar 8,0-48,5 cm arasında değişmiş ve çoğunluğu 11,0-17,0 cm boy grubunda yer aldığı bildirilmiştir. Total ağırlıklar 7,4-1441,0 g, yaş kompozisyonu ise 0 ile 9 arasında değiştiği kaydedilmiştir. Çalışmada kullanılan *salmo trutta macrostigma*'ların diyetlerinde ise toplam 15 adet besin çeşidi tesbit etmişlerdir ve bunların en çok *Coleoptera*, *Trichoptera*, *Ephemeroptera* *Plecoptera*, *Malacostraca*, *Diptera*, *Acarii*, *Heteroptera*, balık, balık yumurtası ve bitki tohumu gruplarına ait oldukları kaydedilmiştir (Alp ve ark.,2005 ).

## 2.5. Oogonyyal Kök Hücre Transplantasyonu

Okutsu ve ark. (2015) transplante edilen yetişkin testiküler germ hücrelerinin, cinsiyete göre farklılaşmamış embriyonik gonadlarda kolonize olabildiğini ve gametogenezi devam ettirdiğini göstermişlerdir. Yetişkin erkek gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) 'den izole edilen spermatogonial kök hücreleri içeren testiküler germ hücreleri, her iki cinsiyette yeni taranan embriyoların periton boşluğuna nakledilmiş ve donör hücrelerin davranışı gözlemlenmiştir. Testiküler germ hücreleri erkek alıcılarda spermatozoa ve diş alıcılarda tam işlevli yumurta olarak ayırım yapmaktadır. Ayrıca alıcı balıktan elde edilen donörden elde edilen sperm ve yumurtalar

normal yavrular üretebilmiştir. Bu bulgular, balık testiküler germ hücrelerinin, muhtemelen spermatogonial kök hücrelerin, balığın olgunluğa erişmesinden sonra dahi yüksek seviyede gelişimsel plastisite ve cinsel bipotansa sahip olduğunu göstermektedir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Denemede Kullanılan Balıklar



Şekil 3.1. Anadolu Dağ Alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*)

Classis : Osteichthyes

Subclassis : Actinopterygii

Subdivisio : Teleostei

Ordo : Salmoniformes

Subordo : Salmonoidei

Familya : Salmonidae

Subfamilya : Salmonidae

Genus : Salmo

Species : *Salmo trutta*

Subspecies : *Salmo trutta macrostigma*

Bu çalışmada kullanılan Dağ alabalıkları Kılıç Su ürünlerine ‘ ne bağlı olan Bafa işletmesinden Ocak 2014’ de temin edilmiştir (Kahramanmaraş, Türkiye). Farklı boy, yaş ve ağırlıklarda olan 100 adet balık canlı olarak Mustafa Kemal Üniversitesi Deniz

Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, akvaryum ünitesinde her biri 1000litre kapasitesinde olan 2 adet tanka stoklanmıştır. Belirli aralıklar la 100 adet balığın gonadları morfolojik ve histolojik olarak disekte edilerek incelenmiştir. Araştırma sonucunda oogoniyal kök hücre izolasyon ve kültürü için en uygun boy, yaş ve ağırlıkta olan 24 adet dişi balık kullanılmıştır. 24 dişi *S. trutta macrostigma* gonadları enzim ile bileşenlerine ayrılması için başlıca iki guruba ayrılmıştır. Her bir gurup 4 tekerrür içermektedir ve her bir tekerrürde 3 adet balık bulunmaktadır. Birinci guruptaki ovaryumlar %0.25tripsin-EDTA, ikinci guruptaki ovaryumlar ise %0.05 trpsin-EDTA ile muamele edilmişlerdir.



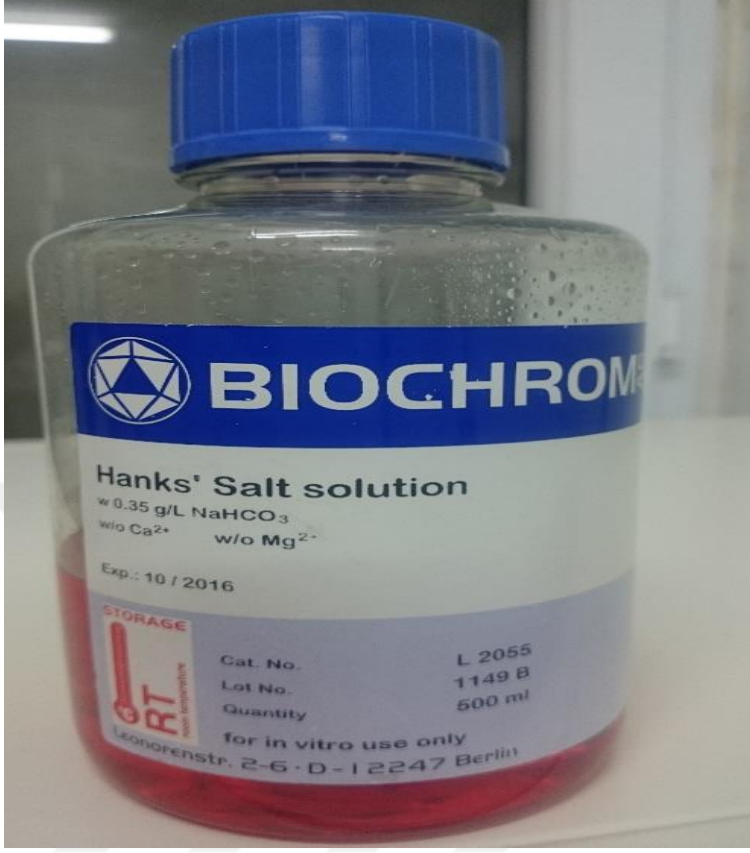
### 3.2. Hücre Kültür Kapları



Şekil 3.2. 12'li Hücre Kültür Kapları

Kök hücre kültürü için özel 12 bölmeli hücre petripleri kullanılmıştır. Petri kapların tabanlarında hücre kolonilerini tutunabileceği attachment faktör ihtiva etmektedir. Altılık ve 24 lük hücre kültür petripleri de çalışmada denenmiş ancak en başarılı incelemenin yapılabildiği hücre kültür petriplerinin 12'lik olanlar olduğu gözlemlenmiş ve çalışma süresince bu kültür petripleri kullanılmıştır. 24'lük kültür kaplarında kontaminasyonun daha yoğun olduğu ve kültürü seyreltme aşamasında ciddi anlamda zaman kaybı olduğu gözlemlenmiştir.

### 3.3. Hanks' Tuz Solusyonu



Şekil 3.3. HBSS (Hank's Tampon Tuz Solusyonu)

Dengeli Tuz Çözeltisi kalsiyum klorür ve Magnezyum klorür, galik asit ( $\geq\%$  98) ve propil galat ( $\geq\%$  98) Gonadların parçalanmasından hücreleri yıkama işlemine kadar Hank'ın Tampon Tuz Solusyonu, antibiyotik ve antifungan takviyesiyle kullanılmıştır, antibiyotik ve antifungan eklemesinden sonra pH 7.65'e ayarlanmıştır.



### 3.4. Soğutmalı Santrifüj



Şekil 3.4. Soğutmalı Santrifüj

Tripsin / EDTA çözeltisi (% 0.05 tripsin / 1 mM ve %0.025 mM) ve hücreler santrifüjleme ile toplandı. Süspansiyon halindeki hücrelerin falcon tüplerinde alt kısımda toplanması için kullanılmıştır.

### 3.5. Trypan Blue

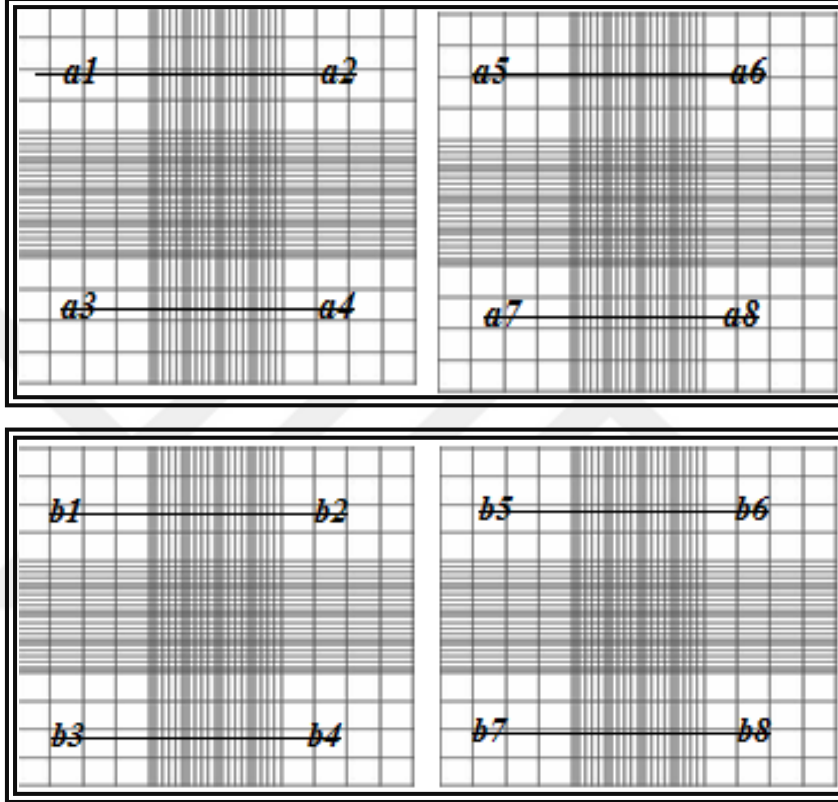


Şekil 3.5. Tripan Mavisini

Hasar görmemiş hücrelerin zarları bileşikler konusunda çok seçicidirler ve bu nedenle tripan mavisini almazlar veya yabancı bir maddenin zardan geçişine izin vermezler. Boyayı tutan tüm hücrelerde uygulanabilir olduğu kabul edilmiştir. Zarar görmüş membranlara sahip hücreler mavi renk ile kolayca boyanır. Bu nedenle, tripan mavisini, yaşayan hücreler ile zarar görmüş veya ölmüş olan hücrelerin birbirlerinden ayırt edilmesinde kullanılmaktadır ( Tran S-L ve ark., 2011). Çalışmada hasar görmüş hücrelerin, sağlıklı olan hücrelerden ayırt edilmesinde kullanılmıştır. Hasarlı olan hücrelerin zarları yarı-geçirgen bir zar gibi davranıp boyayı içlerine alarak koyu mavi bir renge boyanmaktadır. Sağlıklı ve canlı hücreler ise boyanmadıklarından dolayı parlak beyaza yakın bir renkte görünmektedir.

### 3.6 Thoma Lamı

Thoma lamında her iki bölümde 4 adet büyük kare ve bunların içinde 16 adet küçük kare bulunmaktadır. Trypan mavisi ile hazırlanan süspansiyon içindeki ölü ve canlı hücrelerin sayımında kullanılmıştır.



Şekil 3.6. Ölü ve Canlı Hücrelerin sayıldığı Hemasitometre ( Thoma Lamı )

Canlı oogniyal hücreler a ile ölü hücreler b ile adlandırıp aşağıdaki formüllere uyararak excel’de hesaplamaları yapılmıştır. Tezde kullanılan thoma lamında iki yönde de bölüm olduğundan ortalama ölü ve canlı hücre sayıları 8’e bölünerek hesaplanmıştır.

$$\text{Ortalama canlı hücre sayısı} = \frac{a1+a2+a3+a4+a5+a6+a7+a8}{8}$$

$$\text{Ortalama ölü hücre sayısı} = \frac{b1+b2+b3+b4+b5+b6+b7+b8}{8}$$

$$\text{Canlı hücre yüzdelik oranı} = \frac{\text{Ortalama canlı hücre sayısı}}{\text{Ort. canlı hücre sayısı} + \text{Ort. ölü hücre sayısı}} \times 100$$

$$\text{Seyreltme faktörü} = \frac{\text{Toplam hacim (Örnek x Seyreltme sıvısı)}}{\text{Örneğin hacmi (hücre süspansiyonu)}}$$

$$\text{Hücre Yoğunluğu} = \frac{\text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü}}{\text{Kare hacmi (ml)}} \times 10^4$$

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \text{Hücre yoğunluğu} \times \text{Hacim}$$

$$\text{Hücre hacmi} = \frac{\text{Toplam Hücre Sayısı}}{\text{Seyreltme Faktörü}}$$



### 3.6. L-15 Leibovitz Medyumu (Vasatı)



Şekil 3.7. L-15 Medyumu (Vasatı)

Hücre süspansiyonu kültür kaplarına ekleme işlemi sırasında ilave işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu özel solüsyon içerisinde hücreler için gerekli besinleri ve mineralleri ihtiva etmektedir. L-15 Medium (Leibovitz) aslen sodyum bikarbonat gerektiren karbondioksit (CO<sub>2</sub>) içermeyen sistemlerde kullanılmak üzere formüle edilmiştir. L-15, fizyolojik pH kontrolünü sürdürmeye yardımcı olması için glikoz için ikame edilmiş olan tuzların tamamı, serbest baz amino asitler ve galaktoz tarafından tamponlanır (Anonim, 2017). Çalışmada hücre kültürü için besin ortamı olarak kullanılmıştır ve içeriği 3.1. nolu tabloda verilmiştir.

Tablo 3.2.Çalışmada kullanılan kültür vasatı (L-15)

25mM HEPES
Antibiyotikler (50µg/ml penisilin, 50µg/ml streptomisin)
2,5µg/ml Fungizon
1,0µg/ml NaHCO <sub>3</sub>
0,3µg/ml L- glutamin
%10'lik FBS
%5'lik Balık serumu
25µg/ml insülin
1ng/ml bFGF (temel fibroblast büyüme faktörü)

### 3.7. CO<sub>2</sub>' ve O<sub>2</sub> Kontrollü İnkübatör



Şekil 3.8. CO<sub>2</sub>'ve O<sub>2</sub> Kontrollü İnkübatör

Oogoniyal kök hücrelerin gelişebilmesi ve koloni oluşturmaları için 20°C sıcaklık %5 oranında CO<sub>2</sub> bulunan %95 oranında nem ihtiyacını karşılamak için kullanılmıştır. Aynı zamanda ortamın kontaminasyonunu önlemek için filtrasyona sahip, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, nemi, sıcaklığı, oogoniyal kök hücre için optimum seviyede tutmak amacı ile kullanılmıştır.

### 3.8. Otoklav



Şekil 3.9. Otoklav

Tipik bir sterilizasyon en az 121 °C, 1,5 atm altında 12 dakikada yapılmaktadır (Dion ve ark. 2013). Kullanılan cam ve metal materyallerin sterilizasyonunda kullanılmıştır. 121° C derecede 1,5 atm altında 20 dakika boyunca sterilizasyon yapılmıştır.



### 3.9. Gonad Histolojisi

Çalışma İskenderun Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi fakültesi akvaryum ünitesinde ve laboratuvarında yürütülmüştür. Temin edilen 24 adet örneğin ağırlıkları (dijital terazide), uzunlukları (1mm hassasiyetindeki kumpasta) tespit edilmiştir. Balıkların ortalama ağırlıkları;  $28,22 \pm 7,79$  g, ortalama uzunlukları;  $14,65 \pm 1,66$  cm'dir. Balıklar 2-phenoxethanol (%0,004) ile öldürüldükten sonra gonadları disekte edilmiştir. Gonadlar sırasıyla %10 nötr tampon formalinle fikse edildikten sonra etil alkol ile dehidrasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra parafin emdirme işlemi yapılmış ve doku kasetlere yerleştirilip parafine gömülmüştür. Blok haline gelen kitle mikrotom ile kesilip tıraşlanmıştır. Doku örneği hemotoksilen ve eosin boyaları kullanılarak boyandıktan sonra, örnekler ışık mikroskopunda incelenmiş ve oogoniyal germ hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir Çek ve ark., (2001), Çek ve Yılmaz (2009).

### 3.10. Oogoniyal Kök Hücre İzolasyon

2-3 aylık donör *S. trutta macrostigmalar* %0.04'lük 2-phenoxethanol (Sigma Kimyasal, UK) ile disekte edilerek ve olası herhangi bir kontaminasyonu önlemek amacıyla tüm balık vücudu %70'lik isopropanol ile sterilize edilmiştir. Dağ Alabalığı steril edilmiş diseksiyon seti kullanılarak disekte edilip ovaryumlar steril petri kabı içinde HBSS içerisine konulmuştur. HBSS (fenol kırmızı içerir ancak kalsiyum veya magnezyum içermez,  $1,0 \mu\text{g/ml NaHCO}_3$ , 100ünite/ml penisilin,  $100 \mu\text{g/ml}$  streptomisin,  $100 \mu\text{g/ml}$  centamisin ve  $100 \mu\text{g/ml}$  fungizon içerir). Kullanılan tüpler, kapaklar ve diseksiyon seti sürekli bek alevine tutularak olası bir kontaminasyon önlenmiştir. Gonadlar çeker ocak (uv sistemi ve bek alevi mevcut) içerisinde kan damarları ve peritondan temizlenir (Çeker ocak kullanılmadan 15 dakika önce uv açılmış ve çalışma başlayana kadar açık tutularak çeker ocak içi steril hale getirilmiştir). Daha sonra gonadlar 3 kez 100ünite/ml penisilin,  $100 \mu\text{g/ml}$  streptomisin,  $100 \mu\text{g/ml}$  centamisin ve  $100 \mu\text{g/ml}$  fungizon içeren HBSS ile yıkanmıştır. Bu işlemin ardına aynı petri kabı bleach solüsyonunda (pH 7.4 olacak şekilde; 1/10 clorox bleach , 9/10 ultra safsu) içerisine 2 dakika bekletilip hemen ardından 3 kez 100ünite/ml penisilin,  $100 \mu\text{g/ml}$  streptomisin,  $100 \mu\text{g/ml}$  centamisin ve  $100 \mu\text{g/ml}$  fungizon içeren HBSS ile durulanmıştır.

### 3.11. Oogoniyal Kök Hücre Kültürü



Şekil 3.10. İvert Mikroskop Altında Kök Hücre Görüntüleme Çalışması

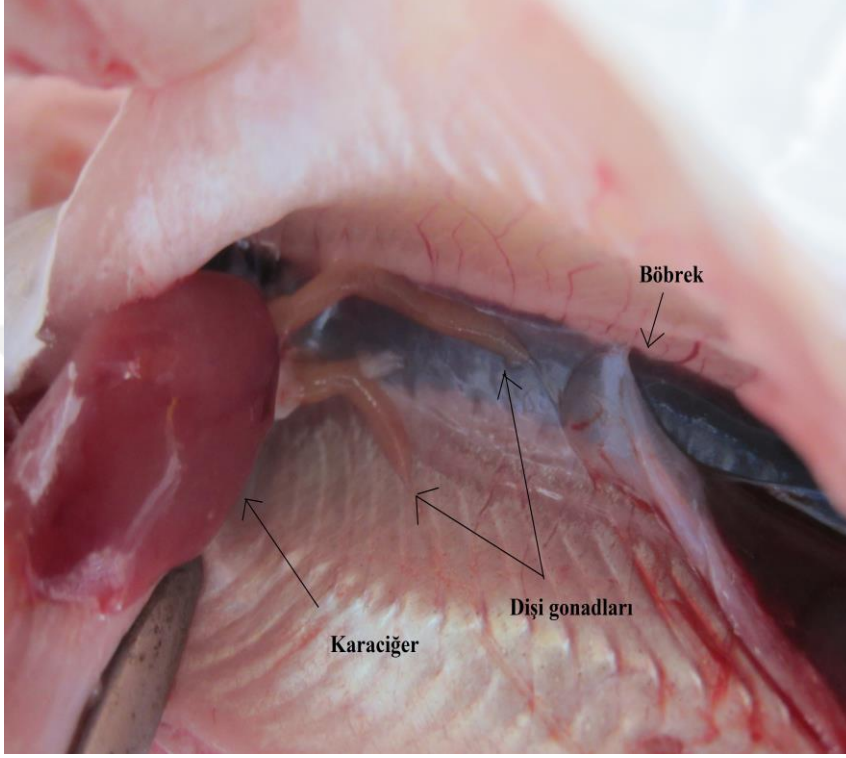
Gonadlar önceden sterilize edilmiş bisturi sapları ile oldukça küçük parçalara kıyılmış ve 3 kez 100ünite/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin, 100µg/ml centamisin ve 100µg/ml fungizon içeren HBSS ile yıkanmıştır. Yıkanan doku parçaları %0,25'lik tripsin içeren EDTA çözeltisi 12ml 'lik HBSS içerisine transfer edilerek ve buz üzerinde 30 dk. süresince inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyondan sonra manyetik karıştırıcı ile 60dk süresince 22°C de karıştırılıp, süspansiyon hücreler göz açıklığı 40µm olan filtre ile süzülerek, 10dk süresince 500rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj ardından hücreler, 3 kez 100ünite/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin, 100µg/ml centamisin ve 100µg/ml fungizon içeren HBSS ile yıkanmıştır. Yıkanan hücre süspansiyonundan 20µl alınarak her bir kültür kabına transfer edilip ve 60µl kültür vasatı(L-15) eklenmiştir. Hücre sayımı Thoma lamı ile yapılır. Hücre sayımı için hücre jelatininden alınan 20µl ile trypan mavisinde aynı ölçüde alınarak hücre boyaması yapılmış ve 2µl alınarak toma lamında canlı hücre sayımları invert mikroskopta yapılmıştır. Her bir balıktan elde edilmiş hücreler bir kültür kabına olacak şekilde işlem yapılmıştır. Soğutmalı inkübatör (11°C ve nem sağlayan saf su ve içinde bakır levha)

CO<sub>2</sub> li inkübatörde (18°C- 24°C %5 CO<sub>2</sub> ve nem sağlayan saf su içinde bakır levha) ve normal inkübatörde(18°C ve nem sağlayan saf su içinde bakır levha) inkübe edilmiştir. Hücreler her gün, mikroskop altında kontrol Günlük incelemeler yapılmış ve değişimler ve oluşmuş kontaminasyonlar incelenmiştir ve görüntüler alınmıştır. İncelenen materyaller kontaminasyon olduğuna karar verildikten sonra hidroklorik asit ile yıkanarak imha edilmiştir. Her kullanılan bölge çalışma ve sonrasında alkol ile dezenfekte edilmiştir (Shang ve ark. 2015) .



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Oogoniyal Kök Hücre İzolasyonunda Gonadların Morfolojisi



Şekil 4.1. Oogoniyal kök hücre izolasyonunun yapılacağı gonadların morfolojik görünümü

Tezde yapılan histolojik araştırmaların sonuçlarına dayanarak, optimum oogoniyal kök hücre izolasyonunun yapılabileceği gonadların morfolojik görünümü Şekil 4.1 de verilmiştir. Araştırma sonuçlarına dayanarak en yoğun miktarda germ hücresinin bulunduğu *S. trutta macrostigma* bireylerinin yaş, boy ve ağırlıkları sırasıyla 2+, 3 aylık,  $14,65 \pm 1,66$  cm boy ve  $28,22 \pm 7,79$  g ağırlığında olarak saptanmıştır. Dişi *S. trutta macrostigma* bireylerinin gonadları açık pembe ve saydamdırlar. Hafif pütürlü, kan damarları ve diğer oluşumlar gözle fark edilemeyecek şekildedir. Dişi *S. trutta macrostigma*'lar için optimum oogoniyal kök hücrenin izolasyonunun yapılabileceği yaşın 2+, 3 aylık, boyun  $14,65 \pm 1,66$  cm ve ağırlığın ise  $28,22 \pm 7,79$  g olması gerektiği önerilmiştir. Gonadların morfolojik görünümleri ise Şekil 4.1.de olduğu gibi önerilmiştir.

Yoshizaki ve ark.'nın (2010) yaptığı çalışmada 11 – 12 aylık 10<sup>0</sup> C sıcaklıkta büyümüş erkek gökkuşuğu alabalıklarından elde edilen testisler kullanılmıştır, Shinya ve ark (2010) yaptıkları çalışmada 9-10 aylık erkek bireyler, 2013 yılında yaptıkları çalışmada 11-12 aylık (Total boy:13.9±1.4 cm ve Total ağırlık: 42.4±11.5 g ) transgenik erkek gök kuşuğu alabalıklarını kullanmışlardır. Hayashi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada 10-15 aylık transgenik gök kuşuğu alabalıklarını kullanmışlardır. Farlora ve ark. (2013) nil tilapyası ( *Oreochromis niloticus*) üzerine yaptıkları çalışmada 5-12 aylık transgenik erkek nil tilapyelerinden elde edilen testisleri kullanmışlardır. Takeuchi ve ark. (2009) Nibe mitsukurii (*Perciformes, Sciaenidae*) üzerine yaptıkları çalışmada 3,6 ve 16 aylık erkek bireylerden elde ettikleri testisleri kullanmışlardır. Aşağıdaki tabloda farklı yazarlar tarafından önerilen farklı boy ve ağırlıklar verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi yapılan araştırmalarda spermatogoniyal kök hücreler izole edilmiştir. Oogoniyal kök hücre izolasyonunun yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yeni çalışma ile kıyaslandığında yaş boy ve ağırlıkların yeni çalışmada oldukça küçük olarak saptandığı görülmüştür.

Tablo 4.1.Eşey Kök Hücrelerinin En Yüksek Miktarda Bulunduğu Yaş, Boy ve Ağırlıkların kıyaslanması

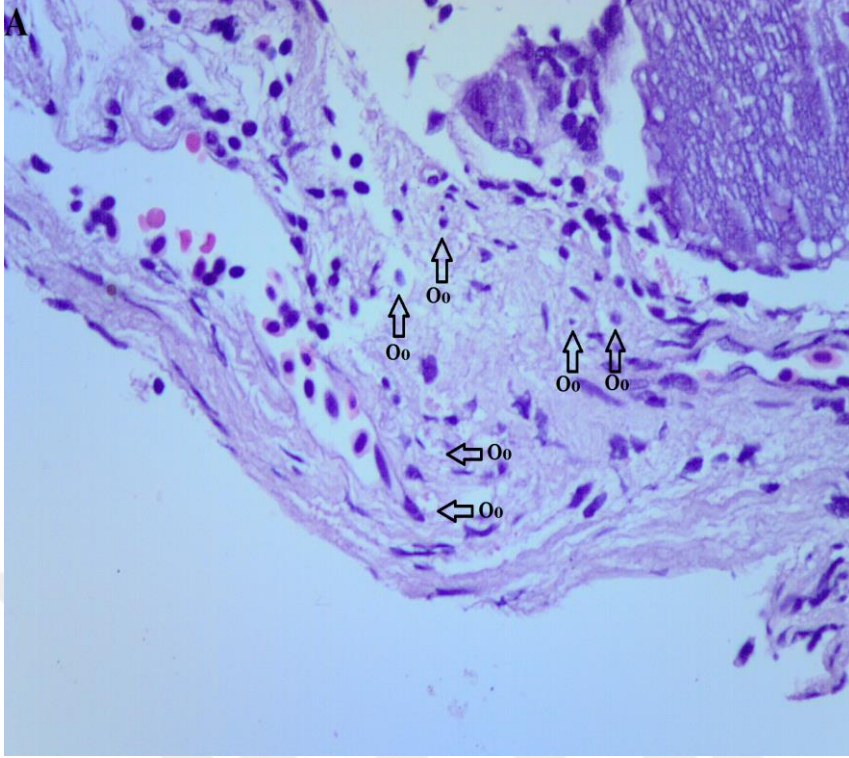
Araştırmacılar	Tür	sex	Yaş	Total Boy (ortalama cm )	Total Ağırlık (ortalama g)
Yoshizaki (2010)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	E	11-12 ay	-	-
Takeuchi (2009)	<i>Perciformes Sciaenidae</i>	E	3-6-16 ay	-	-
Shinya (2013)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	E	11-12 ay	13.9±1.4	42.4±11.5
Hayashi(2014)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	E	10-15 ay	-	-
Farlora(2013)	<i>Oreochromis niloticus</i>	E	5-12 ay	-	-
Tezde	<i>Salmo trutta macrostigma</i>	D	2,5-3 ay	14,65±1,66	28,22±7,79

## 4.2. Optimum Oogoniyal Kök Hücre İzolasyonunda Gonadların Histolojisi

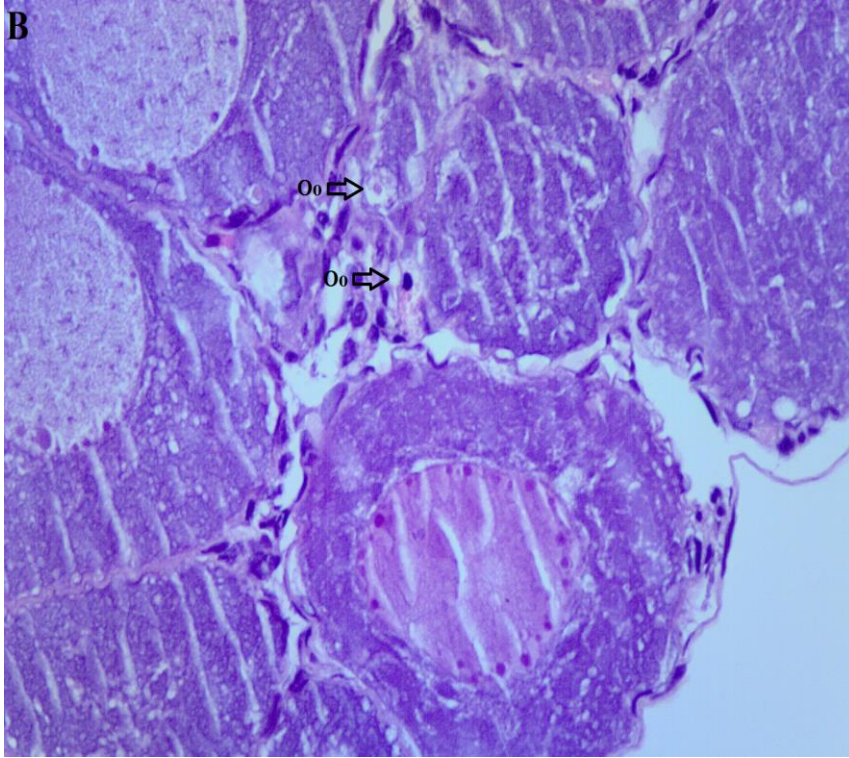
Bu çalışmada kullanılan dişi *S trutta macrostigma* bireylerinden elde edilen gonadların histolojik incelemeleri yapılmıştır. Sonuç olarak perinukleolar aşamada olan 2,5, -3 aylık bireylere ait gonadlarda en yoğun miktarda oogoniyal kök hücre olduğu saptanmıştır ve ortalama gonad ağırlıkları  $0,25\pm 0,07$  g olarak llmştir. Dişi *S trutta macrostigma* bireylerinde eşeylerin farklılaşma aşaması tam olarak 2+ aylık olan bireylerde tespit edilmiştir. Bu aşamada oogoniyal kök hücreler diğer aşamalardan daha yoğun olarak tespit edilmiştir. ek (2006)'nın kemikli bir akvaryum balığı türü üzerinde yapmış olduğu erken gonadal gelişim ve eşeylerin farklılaşması araştırmasında dişi gonadların erkek gonadlardan daha erken farklılaştığı kanıtlanmıştır. Literatürlerde yapılan çalışmalarda spermatogoniyal kök hücre izolasyon ve kültürü üzerine yoğun olduğu için, gökkuşağı alabalıklarında daha geç yaş, boy ve ağırlıklarda spermatogoniyal kök hücreler kaydedilmiştir.

Güngör'n (2015) yaptığı çalışmada 18 ve 14 aylık erkek sudak balıklarından elde ettiği testislerde yapmış olduğu incelemelerde 14 aylık olan balık testislerinde gözle görülür şekilde fazla miktarda spermatogoniyal kök hücre bulunduğunu bildirmiştir. Bu oran 14 aylık balıklarda %98,4 iken 18 aylık bireylerde %45,4 bulunduğunu tespit etmiştir. Bu bulgu, benim tezimdeki bulgular ile uyum içerisindedir, daha erken dönemlerde, eşeylerin tam farklılaştığı dönemlerde daha yoğun, daha yüksek oranlarda kök hücre bulunmaktadır.





Şekil 4.2.a. Kromatin nucleolus evrede olan gonadlarda, oögonia gösterilmektedir. Bloklar parafine gömülmüş, alınan kesitler ise hematoksilin ve eosin boyalar ile boyanmıştır. Oo, oögonia. Ölçek çubuğu=60 µm .



Şekil 4.3.b. Perinukleolar evrede olan gonadlarda, oögonia gösterilmektedir. Kesitler hematoksilin ve eosin boyalar ile boyanmıştır. Oo, oögonia. Ölçek çubuğu=60 µm.

### 4.3. Oogoniyal Kök Hücre Yoğunluğu

Bu çalışmada 2+, 3 aylık dişi *S trutta macrostigma* bireylerinden elde edilen gonadlarındaki kök hücre yoğunluğu  $5.4 \cdot 10^5 \pm 2.6 \cdot 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır. Bu bize daha erken dönemlerde daha yüksek kök hücre yoğunluğuyla karşılaşıldığını göstermektedir. Böylelikle daha fazla ekim yapabilmek daha fazla transplantasyon işlemi gerçekleşebilecektir.

Yoshizaki ve ark. (2010) yaptığı 11-12 aylık erkek gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) gonadlarındaki kök hücre sayımdan elde ettikleri kök hücre ekim yoğunluğu  $0.6-1 \cdot 10^4$  olarak bildirilmiştir.

Takeuchi ve ark. (2009) Nibe mitsukurii (*Perciformes, Sciaenidae*) zerine yaptıkları çalışmada yoğunluk yaklaşık olarak 10 milyon /0.4ml olarak bildirilmiştir.

Shikina ve ark. (2013) yaptığı çalışmada 11-12 aylık erkek gök kuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) testislerinden elde ettikleri hücre ekim yoğunluğu  $0.6-1 \cdot 10^4$  cm<sup>2</sup> olarak bildirilmiştir.

Yazawa ve ark. (2013) pasifik mavi yüzgeçli ton balığı (*Thunnus orientalis*) zerine yaptıkları çalışmada Takeuchi ve ark.(2009) kullandığı yöntemle elde ettikleri hücre yoğunluğu  $5 \cdot 10^5$  hücre /ml olarak bildirmişlerdir.

Hayashi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada 10 – 15 aylık transgenik gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmış ve hücre yoğunluğu  $1 \cdot 10^6$  /ml olarak bildirilmiştir.

Nakajima ve ark. (2014)' nın yaptıkları çalışmada elde ettikleri hücre süspansiyonda  $2 \cdot 10^4$  adet hücre içerdiği bildirilmiştir.



#### 4.4. Oogoniyal Kök Hücre Hacmi

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda yaptığımız hesaplamalar sonucu oogoniyal kök hücre hacmini 13.5 ml olarak hesaplanmıştır. Daha nceki çalışmalarda oogoniyal kök hücre hacmi ile ilgili detaylı bir bilgi ile karşılaşılmamıştır.

#### 4.5. Oogoniyal Kök Hücre İzolasyonu

Oogoniyal kök hücre izolasyonunda oogoniyal kök hücre olduğunu düşündüğümüz oldukça az sayıda hücre görülmüştür (şekil 4.3 ve 4.4). şekilde oogoniyal kök hücrenin genetik materyalini taşıyan hücre çekirdeği oldukça canlı, hücre hattının belirgin olduğu saptanmıştır (şekil 4.3 ve 4.4). Hücre ekirdeği çevresindeki sitoplazma ise tripan mavisi ile boyanmamış ancak kirlili beyaz renk olarak kaydedilmiştir. Çalışma sırasında kullanılan %0.25'lik tripsin ile daha fazla miktarda canlı hücre kaydedilmiş, %0.05'lik tripsin ile ayrıştırmada ise daha az sayıda hücre görülmüştür. %0.05'lik tripsin ile ayrışma yeterince iyi yapılamamıştır. İzolasyon aşamasındaki şekil 4.4 ve 4.5'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada yaşları 2-3 aylık dişi balıklardan elde edilen ovaryumlar HBSS (1,0µg/mlNaHCO<sub>3</sub>, 100nite/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin, 100µg/ml centamisin ve 100µg/ml fungizon içerir). Kullanılan karışımın pH 7.65 olarak hazırlanmış olup hücrelerin ayrıştırılmasında %0.25'lik tripsin EDTA zeltisi ve %0.05'lik tripsin-EDTA ile sağlanmış olup 40µm'luk hücre filtresi ile süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerden rnek alınarak tripan mavisiyle boyanmış canlı ve l hücre sayımları yapılmıştır ve Tablo 4.1 'de veriler gösterilmiştir.

Yoshizaki ve ark. (2010) yaptığı çalışmada testisler 1 ° C'de 2 saat boyunca 1 mM Ca<sup>2+</sup> ve % 5 sığır fetüsü serumu ihtiva eden PBS içerisinde 0.43 birim/ml tripsin kullanılarak ayrıştırılmıştır. Ayrışan testis hücreleri, 25 mM HEPES, antibiyotikler (50 mg / ml amfisilin, 50 U / ml penisilin) ile takviye edilmiş Leibovitz'in L-15 ortamı (pH 7.8) ile üç kez yıkanmıştır ve enzim aktivitesini ortadan kaldırmak iin% 10 FBS eklenmiştir. Elde edilen hücre karışımını süzmek için 42 mikron hücre filtresi kullanılmıştır. Okutsu ve ark (2015) yaptıkları izolasyonda ise izole edilen testisler kıyılıp ve inkübe edilmiştir PBS içinde 1 ml% 0.5 tripsin ile (pH 8.2) 20 ° C'de 2 saat%

5 FBS ve 1 mM Ca<sup>2</sup> ihtiva eder. Sırasında İnkübasyon, nazik pipetleme fiziksel olarak dağılmış Testisin bozulmamış bölümleri. Nihai hücre Süspansiyon, 40µm'lik hücre filtresi ile süzme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Shikina ve ark. (2013) yaptığı çalışmada 11-12 aylık (TL:13.9±1.4 cm ve TW: 42.4±11.5 g ) transgenik erkek gök kuşağı alabalıklarından elde ettikleri testisler %43 U/ml tripsin , eden 1mM Ca<sup>2</sup> %5 fetal bovin serum ihtiva eden PBS içerisinde 10° C 2 saat inkube edilmiş ve her yarım saate bir pipet vasıtası ile nazikçe fiziksel ayrışma sağlanmıştır. Santrifüj sonrası enzimatik etkiyi eleminize etmek için 50 U/ml amfisilin, 50 U/ml penisilin , 50 µg/ml streptomisin 25mM/ml HEPES ihtiva eden L-15 ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkanan hücreler 42 µm'lik hücre filtresinden geçirilmiştir.

Farlora ve ark. (2013) nil tilapyası ( *Oreochromis niloticus*)üzerine yaptığı çalışmada 5-12 aylık transgenik erkek nil tilapylarından elde edilen testisler kullanılmıştır. İzole edilen testisler minik parçalara ayrıldıktan sonra %0.5 tripsin ile pH 8.2 olan PBS (%5 fetal bovin serumu, %0.05 DNase içeren ) içerisinde 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır, İnkübasyon süresince nazikçe pipetle ayrıştırma sağlanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 42µm hücre filtresinden geçirilerek ayrışma sağlamayan hücreler uzaklaştırılmıştır ardından L-15 ile yeniden askıya alınmıştır.

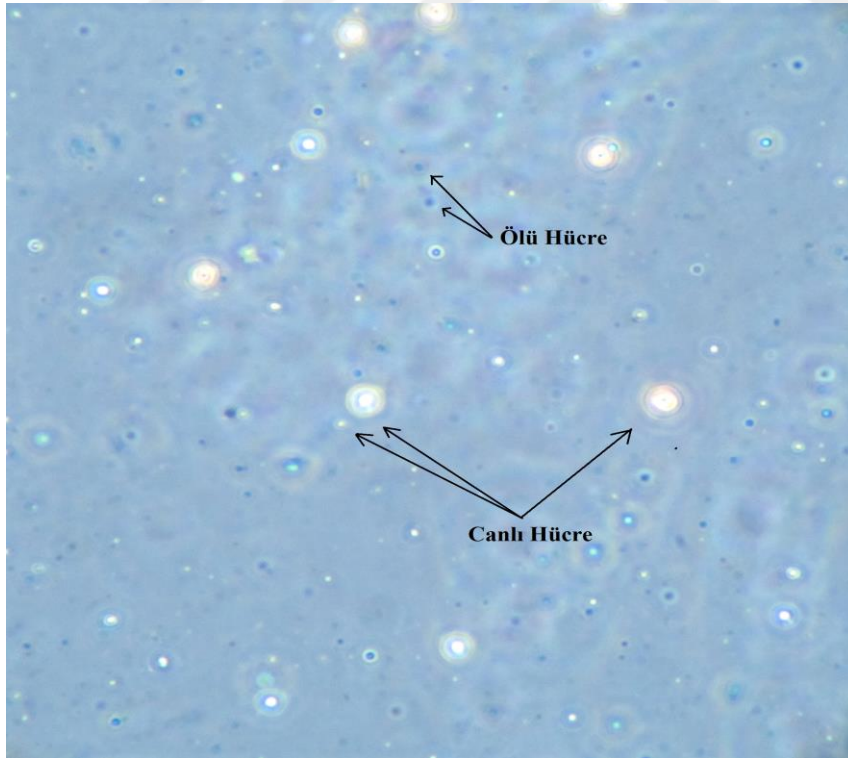
Nakajima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gök kuşağı alabalığına ait immature testisler kullanılmıştır. Testisler minik parçalar haline getirildikten sonra 1ml %0.5 tripsin PBS (pH 8.2) %5 fetal bovin serum, 1mM CaCl<sub>2</sub> , 15U/ml DNase ile birlikte 10° C'de 2 saat inkübasyona alınmış ve süreç boyunca nazik pipet hareketleriyle fiziksel diseksiyon sağlanmıştır. Daha sonra enzimatik etkiyi eleminize etmek için iki kez L-15 (pH7,8)%10 fetal bovin serum, 2mM HEPES, 50 mg/ml streptomisin ,50 mg/ml amfisilin ve 50 U/ml penisilin ile durulanmıştır. Durulanan hücreler 42µm hücre filtresinden geçirilerek büyük ve ayrılmamış hücrelerden arındırılmıştır.

Takeuchi ve ark. (2009) Nibe mitsukurii (*Perciformes, Sciaenidae*) üzerine yaptıkları çalışmada 3,6 ve 16 aylık erkek bireyler kullanılmıştır. İzole edilen testisler minik parçalara ayrıldıktan sonra 1ml %0.25 tripsin ile L-15 (%5 fetal bovin serum ve %0.05 DNazl içerir) içerisinde 25° C 'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon süresince nazik pipetleme yapılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 42 µm'lik hücre filtresi kullanılarak ayrılmamış hücrelerden arındırılmıştır.

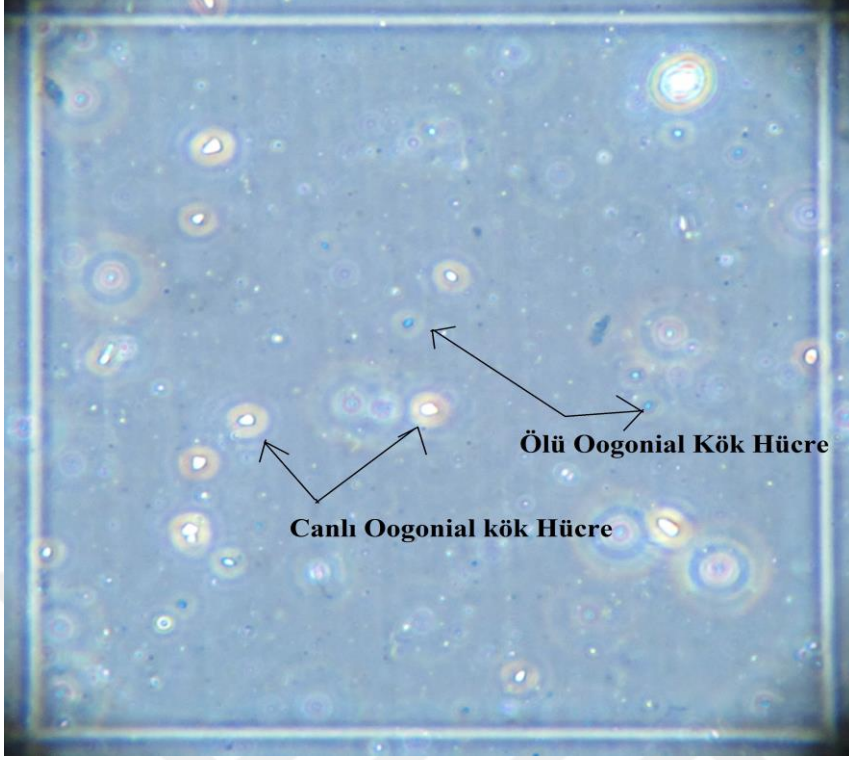
Yazawa ve ark. (2013) pasifik mavi yüzgeçli ton balığı (*Thunnus orientalis*) üzerine yaptıkları çalışmada 0-1 yaşında yaklaşık 4 kg ağırlığında, 1 yaşında yaklaşık 10 kg ağırlığında ve 3 yaşında yaklaşık 40 kg ağırlığında ki erkek bireyler kullanılmıştır. İzolasyonu Takeuchi ve ark. (2009)'larının açıkladıkları sistemle yapmışlardır.

Tablo 4.2.Oogonial Kök Hücre Hesaplamaları

Cinsiyet	Ortalama Canlı Hücre Sayısı	Ortalama Ölü Hücre Sayısı	Toplam Canlı Hücre Sayısı (%)	Hücre Yoğunluğu	Toplam Canlı Hücre Sayısı
D	34,625	7	83	$6,925 \cdot 10^5$	$3,463 \cdot 10^6$
D	11,875	2,75	81	$2,375 \cdot 10^5$	$1,188 \cdot 10^6$
D	19,125	3,75	83	$3,825 \cdot 10^5$	$1,912 \cdot 10^6$
D	16	3,375	82	$3,200 \cdot 10^5$	$1,600 \cdot 10^6$
D	44,25	9,625	82	$8,850 \cdot 10^5$	$4,425 \cdot 10^6$
D	36,25	7	83	$7,250 \cdot 10^5$	$3,625 \cdot 10^6$



Şekil 4.4. İzolasyon Aşamasındaki Oogonyal kök hücreler.



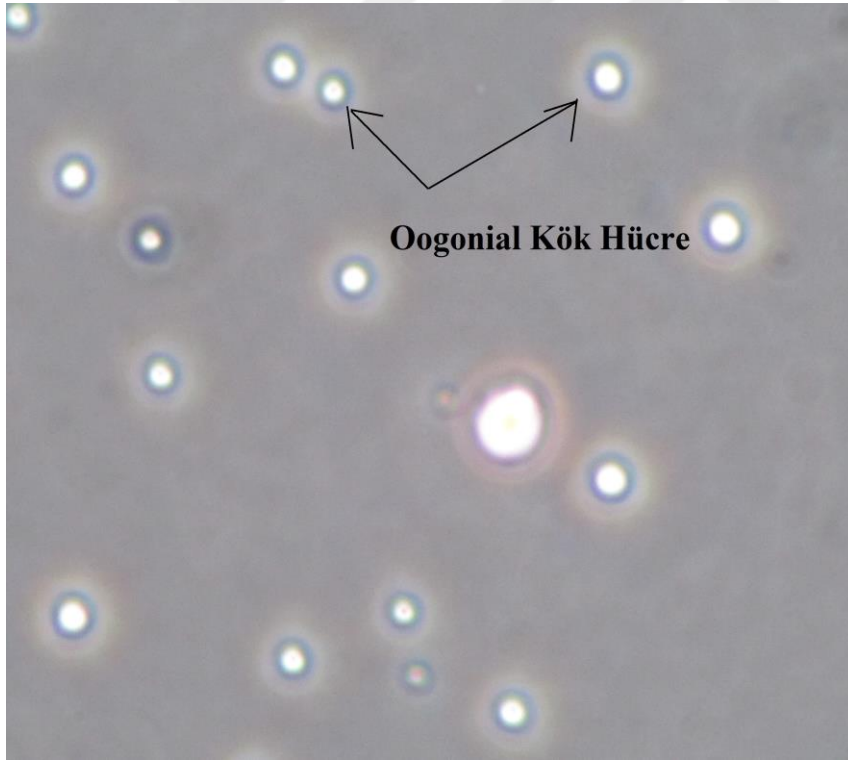
Şekil 4.5. Toma Lamında Canlı ve Ölü Oogoniyal Kök Hücrelerin Sayımı

#### 4.6. Oogoniyal Kök Hücre Kültürü

Tezde yıkanan hücre süspansiyonundan 20µl alınarak her bir kültür kabına transfer edilip ve 60µl kültür vasatı ( Leibovitz's L-15) eklenmiştir. İnkübatör (11°C ve nem sağlayan saf su ve içinde bakır levha) CO<sub>2</sub> siz CO<sub>2</sub> li inkübatörde (18°C- 24°C %5 CO<sub>2</sub> ve nem sağlayan saf su içinde bakır levha) inkübe edilmiştir. Hücreler her gün, mikroskop altında kontrol edilerek günlük incelemeler yapılmış ve görüntüler alınmıştır. Bu çalışmada kullanılan sıcaklık derecesi diğer yapılan çalışmalar ile kıyaslandığı zaman birkaç derece daha yüksektir. Aradaki sıcaklık farklılığı hücrelerin yaşamını negatif etkilememiştir. Şekil 4.6'da oogoniyal kök hücre kültürünün ilk gününde olan hücreler görülmektedir. Sayılarında hafif bir artış gözlenmektedir. Şekil 4.7'de sayıları artmış olan hücreler görülmektedir. Oogoniyal kök hücreler ile birlikte tanımlanamamış olan hücrelerde mevcuttur. Şekil 4.8'de bölünme aşamasında olan hücreler ile birlikte muhtemel bakteri kontaminasyonu kaydedilmiştir. Şekil 4.9 ise kültürün 5. Gününde koloni oluşturmuş hücreler saptanmıştır.

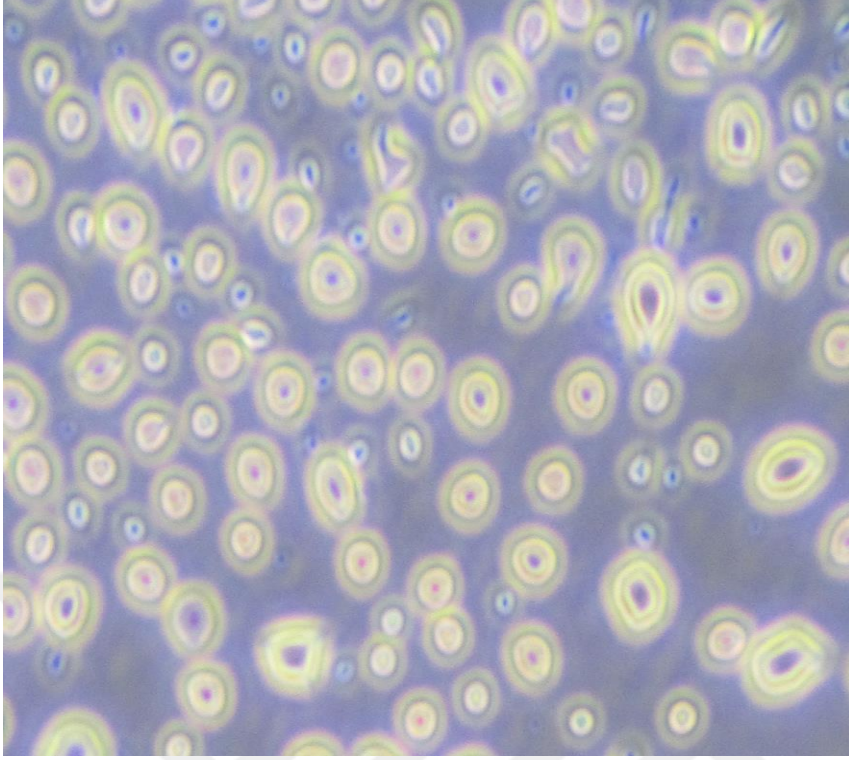
Shıkına ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada erkek gök kuşağı alabalığından elde ettikleri kök hücreleri 25mM HEPES, 20 µg/ml olacak şekilde L-aspartic, L-proline, L-cyctine, L- glutamic asit, 50 µM/ml 2-mercaptoethanol, 50 µM/ml askorbik asit ,0.5 bovin serum albümin, %1'lik fetal bovin serum ,%0.25 salmonoid serum,1ng/ml temel insan fibroblast büyüme faktörü, trout embriyonik ekstraktı, 50µg/ml amfisilin, 50U/ml penisilin, 50µg/ml streptomisin içeren L-15 medium sıvısında %0.1 jelatin kaplı 6 bölmeli hücre kabı içerisinde 10 ° C'de 5 gün boyunca kültüre alınmıştır.

Hayashi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada transgenik gök kuşağı alabalıklarından elde ettikleri kök hücreleri, Shıkına ve ark. 'nın tanımladıkları yöntem biraz modifiye edilerek kullanılmıştır.  $1.3 \cdot 10^4$  / ml kök hücre yoğunluğunda olan hücre süspansiyonu 25 mM HEPES ve antibiyotik içeren L-15 ortamında 96 bölmeli hücre kabı kullanılarak 3 gün yapılmıştır.

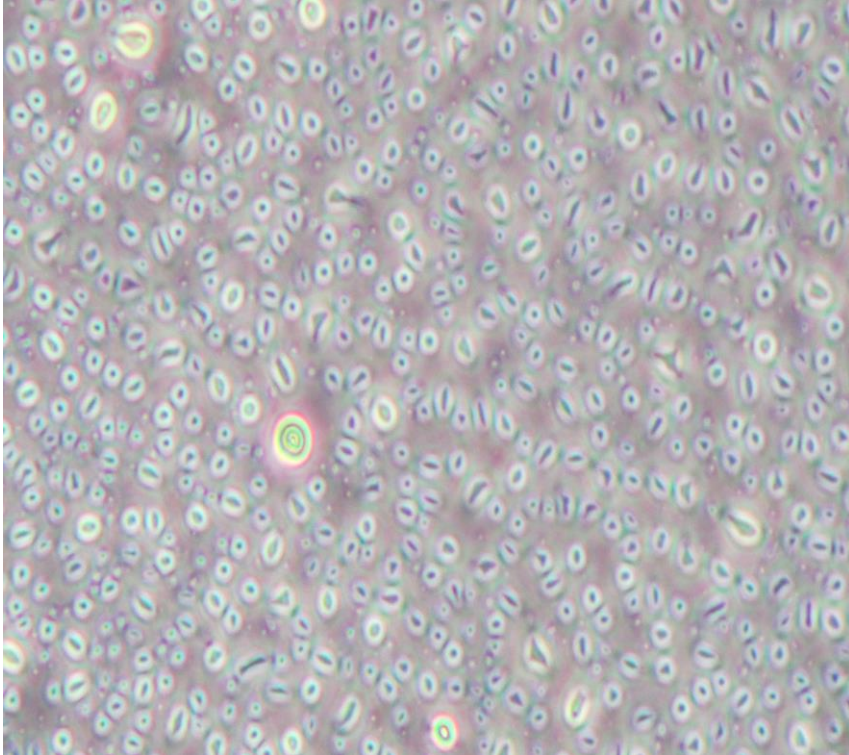


Şekil 4.6. Oogoniyal Kök Hücre Kültürü 1.'inci gün

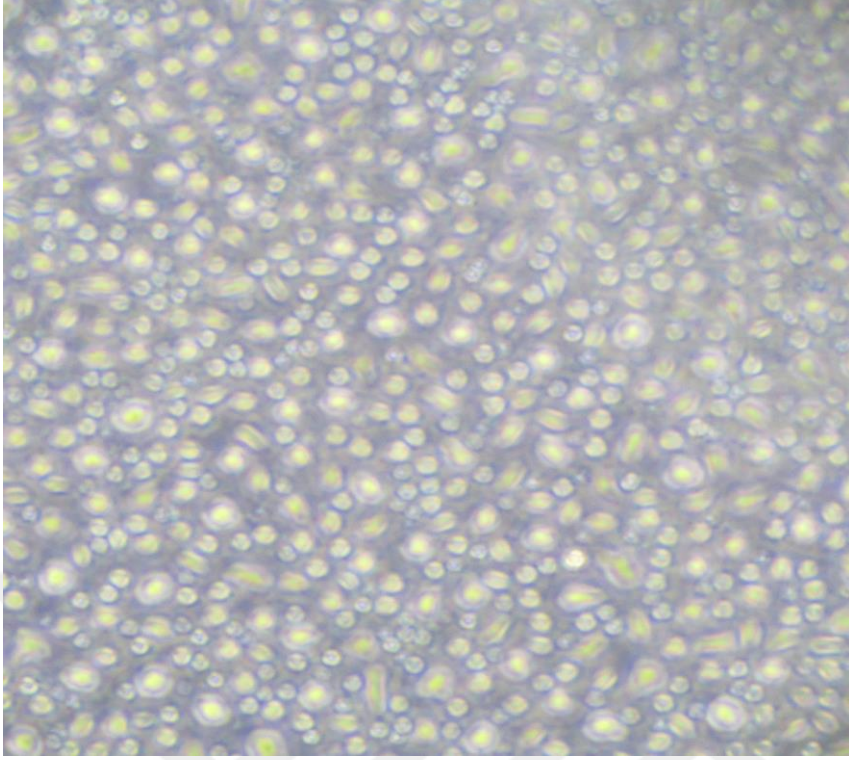




Şekil 4.7. Oogonyal Kök Hücre Kültürü 3. Gün



Şekil 4.8. Kök Hücrelerin Bölünmeleri



Şekil 4.9. Oogoniyal Kök Hücre Kolonisi

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

*S. trutta macrostigma* türünde en yüksek miktarda germ hücrelerinin bulunduğu diğer bir ifade ile optimum oogoniyal kök hücre izolasyonunun yapılacağı, ortalama yaşlar 2,5±3 aylık, ortalama boy ve ağırlıkları sırasıyla, 14,65±1,66cm, boy 28,22±7,79g olan bireylerdir ve bu tez oogonyal kök hücre izolasyon ve kültürü için 2,5+ aylık olan ortalama 14,65±1,66cm boyunda ve 28,22±7,79g, ağırlığında olan bireylerin kullanılmasını önerilmektedir.

Hücrelerin izolasyonu sonucunda, oogoniyal kök hücre yoğunluğu  $5,4 \cdot 10^5 \pm 2,6 \cdot 10^5$  hücre/ml olarak, oogoniyal kök hücre hacmi ise 13,5 ml olarak hesaplanmıştır. Tezde, *S. trutta macrostigma* için taşıyıcı anaç teknolojisinde ve hücre gen transfer sistemlerinde kullanılacak hücre hattı geliştirilmiştir. Oogoniyal kök hücre kültürü sonucunda transplanyonda kullanılacak hücre miktarı  $2,7 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^6$  olarak önerilmiştir.

*S. trutta macrostigma* da oogoniyal kök hücrelerin %0.25'lik enzimatik tripsin içeren 12ml'lik HBSS ile izole edilmesi, bu tür üzerinde ileride yapılacak olan biyoteknolojik çalışmalar için, oldukça kolay bir yöntem olarak önerilmiştir. Tripsinin ayrıştırıcı enzim olarak etkinliği türsel bazda araştırılmalı ve her bir balık türü için optimum değerleri bulunmalıdır. Balıklar aynı familya ya ait olsalar bile her bir türün ve hatta her bir balığın bağışıklık sistemi birbirinden farklılık arz ettiğinden dolayı, oogoniyal kök hücre izolasyonu için optimum tripsin değeri mutlaka bulunmalıdır. Çalışmadaki veriler biyomühendislik örneğin oogoniyal kök hücre transplantasyonunda kullanılarak zamandan ve ekonomik anlamda bir kuluçkahane kullanılarak önemli ölçüde tasarruf sağlanabilir. Biyomühendisiliğin bir diğer alanı olan biyoyazıcılar aracılığı ile üç boyutlu hayvan gonadı ve daha sonra da üç boyutlu insan dokusu modelleri geliştirilebilir. Üç boyutlu biyoyazıcı için öncelikle oogoniyal kök hücrelerin izolasyonunun ve kültürünün yapılmış olması elzemdir.

Bu çalışmada geliştirilen izolasyon ve kültür yöntemi biyoteknoloji alanında, örneğin, *S. trutta macrostigma* gametlerin saklanması ve korunmasında ve monosex popülasyonlar elde etmede etkin olarak kullanılacağı önerilmiştir. *S. trutta macrostigma* nın ülkemizde yaşama alanı her geçen gün daraldığı için, neslinin



korunması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Yumurtaların kriyoprezervasyon ile saklanması gúçlüğünden dolayı oogonyal kök hücrelerin kriyoprezervasyon ile saklanması başka birçok balık türü için bir çok bilim insanı tarafından önerilmiştir. *S. trutta macrostigma* da bunu başarmak için bu tezde önerilen oogonyal kök hücre izolasyon ve kültür yöntemi kullanılmalıdır.

*S. trutta macrostigma* dişileri erkekler den önemli ölçüde daha iyi büyüme performansı gösterdiğinden dolayı %100 dişi popülasyonlar elde etmek, yetiştiricilikte tercih edilmektedir.

Xx kromozomu taşıyan oogonyal kök hücreler *S. trutta macrostigma*'dan izole edilerek alıcı erkeğın gonadlarına transfer edilerek, alıcı erkeğın gonadlarında sperm üretilerek alıcı erkeğın spermi ile üretilen F1 jenerasyonu ve *S. trutta macrostigma* (xx) dan elde edilen xx kromozomu taşıyan yumurtaların tamamının xx kromozomlarına sahip dişi olarak üretilebilir. Tamamı dişi olan *S. trutta macrostigma* bireyleri üretmek için bu tezde standardize edilen oogonyal kök hücre izolasyon ve kültür yöntemi kullanılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Alp, A., Kara, C. ve Büyük H.M, 2005. Age, Growth and Diet Composition of the Resident Brown Trout, *Salmo trutta macrostigma* Dumeril 1858, in Fırnız Stream of the River Ceyhan, Turkey. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 29: 285-295
- Anonim,2017, <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9630458>
- Béjar J, Hong Y. and Alvarez MC.,1999, Towards obtaining ES cells in the marine fish species *Sparus aurata*; multipassage maintenance, characterisation and transfection. **Genet Anal** 15: 125–129.
- Çek Ş., E. Yılmaz, 2009. The Effect of Varying Dietary Energy on Gonad Development at First Sexual Maturity of the Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) **Aquaculture International**, DOI:10.1007/s10499-008-9224-4 17: 553-563.
- Çek Ş., SHANG M. , PERERA D.A., SU B., Rex A. DUNHAM R.A.,2016, Balık Kök Hücreleri: Sınıflandırma, Kaynakları, Karakteristik Özellikleri ve Uygulama Alanları, **LIMNOFISH-Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research** 2(2): 107-119.
- Çek, 2006, Early gonadal development and sex differentiation in rosy barb,**Animal biology** , ISSN: 1570-7555 E-ISSN: 1570-7563
- Çek, Ş., N. Bromage, C. Randal, K. Rana, 2001. ‘‘Oogenesis, Hepatosomatic and Gonadosomatic Indexes, and Sex Ratio in Rosy barb (*Puntius conchonius*),’’ **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 1(1): 33-41,
- Dash C., Routray P., Tripathy S., Verma D. K., Guru B. C., Meher P. K., Nandi S., Eknath A. E.,2010, Derivation and characterization of embryonic stem-like cells of Indian major carp *Catla catla*, **Fish Biology** ,volume 77, Issue 5 Pages 1096–1113
- De Jong JLO, Burns CE, Chen AT, Pugach E, Mayhall EA, Smith ACH, Feldman HA, Zhou Y, Zon LI. 2011, Characterization of immune-matched hematopoietic transplantation in zebrafish, **Blood**. 117:4234–4242.
- Diep C.Q., Ma D., Deo R.C., Holm T.M., Naylor R.W., Arora N., Wingert R.A., Bollig F., Djordjevic G., Lichman B., Zhu H., Ikenaga T, Ono F, Englert C., Cowan C. A., Hukriede N.A., Handin R.I, Davidson A.J.,2011, Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish , **Nature**,470,95–100,doi:10.1038/nature09669
- Dion M., Parker W.,2013, Pharmaceutical Engineering, **The Official Technical Magazine Of ISPE**, November/December,vol33,no 6.
- Dodd, J. M. and J. P. Sumpter. 1984. Fishes. In G. E. Lamming (ed.), **Marshall's physiology of reproduction**, Vol. 1, pp. 1-126. Churchill Livingstone, Inc., New York
- Duman M., Dartay M.,2011, Yüksel Munzur Çayı (Tunceli) Dağ Alabalıkları *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858)'nin Et Verimi ve Kimyasal Kompozisyonu, **Fırat Üniv. Fen Bilimleri Dergisi**, 23 (1), 41-45.
- Fan L, Moon J, Wong TT, Crodian J, Collodi P. 2008. Zebra fish Primordial Germ Cell Cultures Derived from vasa: RFP Transgenic Embryos. **Stem Cells Dev.** 17:585–597. doi: 10.1089/scd.2007.0178.

- Fan L. , Collodi P.,2016, Zebrafish embryonic stem cells, **NCBI, Methods Enzymol.** ;418:64-77
- Fan L., Moon J., Crodian J., Collod P., 2016, Homologous Recombination in Zebrafish ES Cells, **Transgenic Res**, 15: 21. doi:10.1007/s11248-005-3225-0
- Farlora R., Hattori-Ihara S., Takeuchi Y., Hayashi M., Octavera A., Alimuddin, Yoshizaki G.,2013, Inrapertoneal Germ Cell Transplantation in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* , **Mar Biotechnol**, DOI10.1007/s10126-013-9551-y
- Grandel H., Kaslin J., Ganz J., Wenzel I., Brand M. 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. **Dev. Biol.** 295, 263–277. 10.1016/j.ydbio.2006.03.040
- Güngör E.,2015, Isolation of early stages of germ cells in pikeperch (*Sander lucioperca*), University of South Bohemia in České Budějovice Faculty of Fisheries and Protection of Waters Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology
- Hayashi M. ,Sato M. , Nagasaka Y. , Sadaie S. , Kobayashi S. , Yoshizaki G. ,2014, Enrichment of Spermatogonial Stem Cells Using Side Population in Teleost, **Biology of Reproduction**,91(1):23,1-8.
- Higaki S., Eto Y.,Kawakami Y.,Yamaha E., Kagawa N., Kuwayama M, Nagano M.,Katagiri S. and Takahashi Y.,2010,Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos, **Reproduction**, 139 733-740
- Hoar W.S. and Randall D.J. (eds.), 1969. Fish physiology. London: **Academic Press**:325pp.
- Kocabaş M., 2009,Türkiye Doğal Alabalık (*salmo trutta*) Ekotiplerinin Fenotipik Özelliklerinin Karşılaştırılması, **Akuademi**, Doğal Alabalık Çalıştayı:Sürdürülebilir Yetiştiricilik, Koruma ve Balıklandırma 22-23 Ekim, Trabzon
- Kocabaş M., Başçınar N., Kutluyer F., Aksu Ö., 2012, Ülkemizde Yayılım Gösteren *Salmo trutta macrostigma* Ekotipi Gerçekten Yok Oluyor mu? , **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi** 6 (1): 132-138,ISSN: 1308-0040, E-ISSN: 2146-0132.
- Lacerda S.M.S.N., Aponte P.M., Costa G.M.J., Campos-Junior P.H.A., Segatelli T.M, Silva M.A., França L.R.,2012, An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish, **Anim.Reprod.**,v.9,n.4,p.798-808,
- Lacerda S.M.S.N., Batlouni S.R., Silva S.B.G., Homem C.S.P. , França L.R.,2006, Germ Cell Transplantation in Fish: the Nile Tilapia model. , **Anim Reprod**,2: 146–159.
- Lacerda SMSN, Batlouni SR, Assis LH, Resende FM, Silva SMC, Silva RC, Segatelli TM, França LR. 2008. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Cybium**, 32(2): 115-118.
- Lee S, Seki S, Katayama N, Yoshizaki G. 2015. Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. **Scientific Reports**. 5: 1-12. doi: 10.1038/srep16045.
- MeiSheng Y, Ni H, ZhenDong L, Yan Y, DanKe W, HaoBin Z, YunHan H. 2010. Medaka fish stem cells and their applications. **Sci China Life Sci**. 53(4): 426-434. doi: 10.1007/s11427-010-0079-3.
- Nakajima S., Hayashi M., Kouguchi T., Yamaguchi K., Miwa M., Yoshizaki G., 2014,Expression patterns of *gdnf* and *gfra1* in rainbowtrout testis,**Gene Expression Patterns**,111-120.

- Nakamura S., Kobayashi K., Nishimura T., Tanaka M., 2011, Ovarian Germline Stem Cells in the Teleost Fish, Medaka, *Int J Biol Sci* 7(4):403-409. doi:10.7150/ijbs.7.403
- Nwokwa M.C., 2012 , The Review of Recent Advances in Fish Genetics and Biotechnology, **Continental Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 6(1),9-18.
- Okutsu T, Shikina S, Kano M, Takeuchi Y, Yoshizaki G. 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, 317: 1517. doi: 10.1126/science.1145626.
- Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, Yoshizaki G. 2006. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proc Natl Acad Sci U S A**. doi: 10.1073/pnas.0509218103.
- Okutsu T., Suzuki K., Takeuchi Y., Takeuchi T., ve Yoshizaki G., 2015. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan; and Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan**
- Otteson DC, Hitchcock PF. 2003, Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration, **Vision Res.**, ;43:927.
- Parenti L.R., Grier H.J., 2004, Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes, **Oxford Journals**, Volume 44, Issue, Pp 333-348.
- Psenicka M, Saito T, Linhartova Z, Gazo I. 2015. Isolation and transplantation of sturgeon early stage germ cells. **Theriogenology**. 83: 1085-1092. doi:10.1016/j.theriogenology. 2014.12.010.
- Rocha, A. , RUIZ S. , Estepa A. , Coll J.M. 2003 , Review, Fish as Biofactories: Inducible Genetic Systems and Gene Targeting, **Spanish Journal of Agricultural Research**, 1(3), 3-11 .
- Saito T, Kazeto RG, Arai K, Yamaha E. 2008. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. **Biol Reprod** 78: 159-166. doi: 10.1095/biolreprod.107.060038.
- Shang M, Su B, Lipke E, Perera DA, Li C, Qin Z, Li Y, Dunn DA, Cek S, Peatman E, Dunham RA. 2015. Spermatogonial stem cells specific marker identification in channel catfish *Ictalurus punctatus* and Blue Catfish *I. furcatus*. **Fish Physiol Biochem**. 41: 1545-1556. doi: 10.1007/s10695-015-0106-1.
- Shikina S., Nagasawa K., Hayashi M., Furuya M., Iwasaki Y., ve Yoshizaki G., 2013. Short-Term In Vitro Culturing Improves Transplantability of Type A Spermatogonia in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Molecular Reproduction & Development**, 80:763–773
- Shikina S., Yoshizaki G., 2010. Improved In Vitro Culture Conditions to Enhance the Survival, Mitotic Activity, and Transplantability of Rainbow Trout Type A Spermatogonia, **Biology Of Reproduction**, 83, 268–276 Published online before print 28 April 2010. DOI 10.1095/biolreprod.109.082123
- Sosa, M.A.G., Gasperi R. D.E., Elder G.A., 2010. Animal Transgenesis an Overview, **Brain Structure and Function**, 214, 91-109 .

- Takeuchi Y., Higuchi K., Yatabe T., Miwa M, Yoshizaki G.,2009, Development of Spermatogonial Cell Transplantation in Nibe Croaker, *Nibea mitsukurii* (*Perciformes, Sciaenidae*), **Biology of Reproduction** ,81, 1055–1063.
- Tanaka M, Nakamura S, Saito D, Kobayashi K, Nishimura T. 2011. Ovarian structures that support reproductive cycle germ line stem cells and their niche structure in ovary. **Indian J Sci Technol.** 4(8): 93-94.
- Tran S-L, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao N (2011) Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*, **PLoS ONE**, 6(9): e22876 doi:10.1371/journal.pone.0022876
- Wong TT, Crodian J, Collodi P. 2011. Zebra fish Germ line Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae. **Biol Reprod.** 84: 1190-1197. doi: 10.1095/biolreprod.110.088427.
- Yazawa R., Takeuchi Y., Morita T., Ishida M., Yoshizaki G.,2013, The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) dead end gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia, **Mol Reprod Dev.**, 2013 Oct;80(10):871-80. doi: 10.1002/mrd.22224.
- Yi M., Hong N., Hong Y.,2009.Generation of Medaka Fish Haploid Embryonic Stem Cells , **Science** , 16 Oct 2009:Vol. 326, Issue 5951, pp. 430-433,DOI: 10.1126/science.1175151
- Yi M., Hong N., Li Z.,Yan Y., Wang D., Zhao H., Hong Y.,2010, Medaka fish stem cells and their applications, **Science China Life Sciences**, Volume 53, Issue 4, pp 426–434
- Yoshizaki G, Okutsu T, Ichikawa M, Hayashi M, Takeuchi Y. 2010b. Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. **Anim Reprod.** 3(7): 187-196.
- Yoshizaki G, Okutsu T, Morita T, Terasawa M, Yazawa R, Takeuchi Y. 2012. Biological characteristics of fish germ cells and their application to developmental biotechnology, **Reprod Domest Anim**, 47(suppl 4):187-192.
- Yoshizaki G. , Takeuchi Y. , Kobayashi T. , Takeuchi T. 2003 , Fish Physiol. , Biochem.28,453–457.
- Yoshizaki G., Fujinuma K., Iwasaki Y., Okutsu T, Shikina S., Yazawa R., Takeuchi Y.,2010a. Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**, doi:10.1016/j.cbd.2010.05.003.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Erzurum’da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimimi Mersin’de tamamladım. 2008 yılında girdiğim Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri mühendisliğibölümünden 2012 yılında Su Ürünleri Mühendisi unvanı ile mezun oldum. 2012 güz döneminde İskenderun Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans eğitimine hak kazanıp, eğitimime devam etmekteyim.

