

**T.C.**  
**KOCAEL ÜN VERS TES**  
**SA LIK B L MLER ENST TÜSÜ**  
**H STOLOJ VE EMBR YOLOJ ANAB L M DALI**

**KLON VE NORMAL SI IR EMBR YO PLASENTALARINDA NSÜL N BENZER  
BÜYÜME FAKTÖR-I (IGF-I), VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖR  
(VEGF) VE NÖRONAL HÜCRE ADHEZYON MOLEKÜL (N-CAM)  
EKSPRESYONUN İMMÜNOS TOK MYASAL VE MOLEKÜLER TEKN KLERLE  
NCELENMES**

**Fatih KARAKAYA**

Kocaeli Üniversitesi  
Sa lık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeli inin  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördü ü

**YÜKSEK L SANS TEZ**  
Olarak Hazırlanmıştır

**KOCAEL**  
**2013**

**T.C.**  
**KOCAEL ÜN VERS TES**  
**SALIK BILIMLER ENST TUSÜ**  
**HISTOLOJ VE EMBRYOLOJ ANABILIM DALI**

**KLON VE NORMAL SIIR EMBRYO PLASENTALARINDA INSÜLİN BENZER  
BÜYÜME FAKTÖR-I (IGF-I), VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖR  
(VEGF) VE NÖRONAL HÜCRE ADHEZYON MOLEKÜL (N-CAM)  
EKSPRESYONUN İMMÜNOSİTOKİMYASAL VE MOLEKÜLER TEKNİKLERLE  
İNCELENMESİ**

**Fatih KARAKAYA**

Kocaeli Üniversitesi  
Sıhık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Olarak Hazırlanmıştır

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakkı DALÇIK

2. Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sezen ARAT

Bu çalışmada Kocaeli Üniversitesi (Proje No: 2010 / 84) ve TÜBİTAK-KAMAG-106G005  
projesi kapsamında desteklenmiştir.

**KOCAEL**

**2013**

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

**Tez Adı:** Klon ve Normal Sığır Embriyo Plasentalarında İnsülin Benzeri Büyüme Faktör-I (IGF-I), Vasküler Endotelial Büyüme Faktör (VEGF) ve Nöronal Hücre Adhezyon Molekül (N-CAM) Ekspresyonun İmmunositokimyasal ve Moleküler Tekniklerle İncelenmesi

Tez yazarı: Fatih KARAKAYA

Tez savunma tarihi: 27.03.2013

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakkı DALÇIK

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ	
ÜYE(DANIŞMAN):	Prof. Dr. Hakkı DALÇIK	
ÜYE:	Prof. Dr. Doğan GÜLKAÇ	

### ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

27/03/2013

Prof. Dr. Tuncay ÇOLAK

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### **Klon ve Normal Sı ır Embriyo Plasentalarında nsülin Benzeri Büyüme Faktör-I (IGF-I), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör (VEGF) ve Nöronal Hücre Adhezyon Molekül (NCAM) Ekspresyonunun mmunositokimyasal ve Moleküler Tekniklerle ncelenmesi**

Bu çalı ma, “Anadolu Yerli Sı ır Irklarının Klonlanması” projesi kapsamında canlı do umla sonuçlanan klon örneklerinin do umlarından sonra elde edilen klon plasentalar ve kontrol grubu olarak da normal do um yapmı olan sı ırların plasentaları moleküler ve immunositokimyasal teknikler kullanılarak incelenmi tir. nceleme i lemi klon sı ırlarda görülen bazı anomalilerin ve klon plasentada gerçekle en yapısal ve moleküler bozuklukların normal plasenta ile kar ıla tırılarak ili kilendirilmesi amaçlanmı tir. Klonlama çalı malarında Somatik Hücre Nükleer Transfer Yöntemi kullanılmı tir. Klonlamada dönor hücre kayna ı olarak, Uluda Üniversitesi Veteriner Fakültesi Çiftli i’nde bulunan erkek boz bo a ve Yalova’daki bir di i bireyden örnekler alınmı tir. Kontrol grubu olarak ise Tekirda Muratlı’da bulunan Aksa Çiftli i’nde iki normal do um plasenta örne i alınmı tir. Boz ırkına ait kıkırdak hücresinden bir, fibroblast hücresinden bir ve granüloza hücresinden üç adet sa lıklı klon elde edilmi tir. Toplamda canlı do um klon sayısı be olmasına kar ın bir ta ıyıcı annenin ikiz gebelik meydana getirmesi sebebiyle toplamdaki klon plasenta örne i sayısı dördttür. Buna kar ılık olarak iki normal plasenta örneklenmi tir. Her bir örnek plasentanın maternal, fetal ve total olmak üzere üç kısmı örneklenmi tir. Örneklenen her bölge histolojik incelemeler için %4’lük paraformaldehit içinde fikse edilmi , moleküler yöntem için (RNA izolasyonu) ise -20°C ‘de örnekler transfer edilmi , izolasyon a masına kadar ise -80°C ‘de muhafaza edilmi lerdir.

Fikse edilmi materyallerin doku takipleri gerçekle tirilmi ve parafin bloklarda kesit alınana kadar saklanmı tir. Daha sonra mikrotom ile 5µm kalınlı ında alınan kesitler öncelikle hematoksilen – eosin boyama protokolüne göre boyanmı , temel ı ık mikroskopi incelemeleri gerçekle tirilmi tir. Aynı ekilde hazırlanan kesitler daha sonra immunositokimyasal olarak incelenmi tir. Bu inceleme için, PBS’te bekletilen preparatlara proteaz enzimi 30 dk. boyunca uygulanmı tir. Ardından, non-immun serumda 15 dk. bekletilmi ve takibinde buffer ile sulandırılmı primer antikordarda (IGF-I, VEGF, NCAM, Abcam) 2 saat oda ısısında inkübe edilmi lerdir. Primer antikordan sonra yıkama yapılmı ve biyotinle i aretli sekonder antikorda bekletilerek ardından streptavidin-peroxidase ile muamele edilmi tir. Yıkamaların ardından DAB ile i lenerek boyama i lemi tamamlanmı tir.

RNA izolasyonu için trizol kullanılmı ve manuel olarak çalı ılmı tır. rnek alınmı dokular steril olarak yakla ık 50–100 mg. 'lık parçalar halinde kontamine olmayan temiz bir havan içinde sıvı azotla muamele edilmek suretiyle fiziksel olarak paralanmı tır. Fiziksel parçalanmayı takiben trizol reagent ilave edilmı ve pipetleme yapılarak doku ile trizolün karı ması sa lanmı tır. Santifjleri takiben RNA izole edilmı , kalite kontrolleri ve NanoDrop okumaları gerçekle tirilmı , daha sonra cDNA (Fermentas) Kit kullanılarak, cDNA sentezi gerçekle tirilmı tir. InRa ve Ensembl DNA veri bankalarından yararlanılarak tasarlanan Primer'ler IDT firmasına sipari verilmi ; IGF-I, VEGF ve NCAM için alınmı olan primerler ile yapılmı tır. PCR rnleri jele aktarılmı , jel görüntü sonuçları elde edilmı tir.

Daha ileri analiz yapabilmek için RT-PCR i lemi, normal PCR için kullanılan primerler kullanılarak yapılmı tır. Elde edilen sonuçlar amplifiye olma miktarlarına göre saptanmı ve istatistiki olarak analiz edilmı tir.

Her iki analiz sonucunda da elde edilen bulgulara göre, klon plasenta örnekleri ve normal plasenta örnekleri arasında anlamlı bir fark bulunamamı tır.

## ABSTRACT

### **Evaluation of Expression of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Neuronal Cell Adhesion Molecule (NCAM) by Immunocytochemical and Molecular Techniques in Cloned and Normal Bovine Placentas**

In the context of "Cloning of the Anatolian Domestic Bull" project, the clone placentas derived from successful births with live offspring; and the control group placentas from normal birth bovine placentas was evaluated by molecular and immunocytochemical methods. The aim of the evaluation process is to determine abnormalities in cloned bovine, structural and functional defects of cloned placentas by comparing them to normal ones. Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) method was used in our project's cloning procedure. The donor cell sources were from the individuals as male one Uludag University, Faculty of Veterinary Medicine Farm and as a female one from an individual in Yalova. The control group placentas as two normal birth samples were obtained from Aksa Production Farm from Muratlı state, Tekirdag. The cell samples from the Anatolian Gray Bull are separated to one cartilage cell; one fibroblast cell and one granulosa cell; all pregnancies completed by live offspring. In the despite of total birth count is five; one surrogate mother has twins so the sampled placenta count is accepted as four. Each placenta sample was separated maternal, fetal and total. The sampled areas of placenta was fixed in 4% paraformaldehyde for histological examination, and for molecular examination (RNA isolation), the samples were transferred in -20°C; stored in -80°C until isolation.

Tissues fixed tissues had been processed and stored in paraffin blocks until sectioning. After the process of fixation, 5 µm thickness slides were created by ordinal slide-microtome, then all the samples were stained by standard Haematoxylin-Eosin protocol, examined by basic light microscopy. The same processed samples are also examined by immunocytochemistry methods. For this examination process; the slides washed in tap water and protease was applied for 30 mins. to them. After that, they stored in non-immune serum for 15 mins. and kept incubated in diluted primary antibodies (IGF-I, VEGF, NCAM, Abcam) for 2 hours. The samples were washed and treated in biotin flagged secondary antibody; then streptavidin-peroxidase was applied. Washed many then, they were treated by DAB, then the staining process was completed.

RNA isolation was made manually by the extraction method with trisole. Sterilized sampled tissues were comminuted as 50–100 mg. parts in non-contaminated clean mortar by treating liquid nitrogen. After comminution, the trizol reagent added and mixed the reagent and the tissue by several pipetting process. After centrifugation; RNA was isolated and quality check-out is carried thru NanoDrop, spectrophotometer. cDNA (Fermentas) Kit is used for synthesing cDNA. Primers were desinged by the help of InRa and Ensembl DNA Banks, ordered to IDT company; PCR was performed for IGF-I, VEGF and NCAM primers. The products of the PCR were loaded to gel; gel images were also fetched.

For further analysis, RT-PCR process has been used with normal PCR primers. Results were obtained by amplifying ratios based on charts and statistically analyzed.

By the two types of results from both immunocytochemical and molecular processes, examples of normal placenta and the cloned ones were no statistical significant difference between them.

## TE EKKÜR

Her zaman deste ini gördü üm, çalı malarımın önderlik eden, insana farklı bakı açılırları kazandıran, de erli danı manım  
**Prof. Dr. Hakkı DALÇIK'a,**

Çalı malarımın gerekli kolaylıkları sa layan, gerek bilimsel, gerek yönetsel olarak deste ini hissetti im 2. tez danı manım  
**Prof. Dr. Sezen ARAT'a,**

Kocaeli Üniversitesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Ba kanı  
**Sn. Prof. Dr. Melda YARDIMO LU YILMAZ'a** ve de erli ö retim üyelerine,

TÜB TAK GMBE'de histolojik çalı malarımın de erli katkılarda bulunan, çalı malarımın i tirak eden  
**Sn. Arzu TA ÇAPUTÇU'ya,**

Yine GMBE'de moleküler çalı malarımın yol gösteren, deneyleri beraber yaptığımız  
**Sn. Dr. Soner AKSU'ya,**

Kocaeli Üniversitesi, E itim-Ara tırma Hastanesi, Yardımla Üreme Merkezi'nden de erli dostum  
**Sn. Özcan BUDAK'a,**

Kocaeli Üniversitesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda asistan arkadaşım  
**Sn. Elif GELENL DOLANBAY'a,**

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nden de erli arkadaşım  
**Sn. Gül BAKIRER ÖZTÜRK'e,**

Yazım konusunda yardımlarını gördü üm stajyerim, veteriner hekim adayı  
**Sn. Deniz Mukaddes TÜRET'e,**

Kocaeli Üniversitesi, Sa lık Bilimleri Enstitüsü Yönetim ve çalı anlarına,  
Aksa Çiftli i, Muratlı Tekirda de erli çalı anlarına,  
İstanbul ve Uluda Üniversitesi Veteriner Fakültesi çalı anlarına,  
Adını sayamadığım tüm çalı ma arkadaşlarıma..

..ve

**Annem ile Babam'a..**

*Te ekkürü borç bilirim..*



ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TE EKKÜR	v
S MGELER VE KISALTMALAR D Z N	viii
EK LLER D Z N	ix
Ç ZELGELER D Z N	xii
1. AMAÇ VE KAPSAM	1
2. GENEL B LG LER	4
2.1. PLASENTA	4
2.1.1. PLASENTA GENEL TANIMI	4
2.1.2. GENEL PLASENTA ANATOM S	6
2.1.3. SI IRLARDA PLASENTA ANATOM S	8
2.1.4. MPLANTASYON	9
2.1.5. PLASENTAL GEL M	11
2.1.6. PLASENTANIN FONKS YONLARI	12
2.2. KLONLAMA	14
2.2.1. KLONLAMANIN KULLANIM ALANLARI	16
2.3. NORMAL VE KLON PLASENTA ARASINDAK FARKLAR	18
2.3.1. FÖTAL MEMBRANLAR VE YAPILARDAK FARKLILIKLAR	18
2.3.2. DAMAR YAPILANMASINDAK FARKLAR	18
2.3.3. H STOLOJ K DE L KLER	18
2.4. PLASENTA GEL M NE ETK EDEN FAKTÖRLER	19
2.4.1. IGF ( NSÜL N BENZER BÜYÜME FAKTÖRÜ)	19
2.4.2. VEGF (VASKÜLER-ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ)	23
2.4.3. NCAM (NÖRONAL HÜCRE ADHEZYON MOLEKÜLÜ)	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. H STOLOJ K YÖNTEMLER	28
3.1.2. PREPARAT HAZIRLAMA VE KES T ALMA	28
3.1.3. H STOLOJ K BOYAMALAR	29
3.1.4. MMÜNOS TOK MYASAL BOYAMALAR	30
3.2. MOLEKÜLER YÖNTEMLER	32
3.2.1. TRIZOL KULLANILARAK TOTAL RNA ZOLASYONU	32
3.2.2. DENEY N YAPILI I	33
3.2.3. RNA KONSANTRASYONUNUN BEL RLENMES VE KONTROLÜ	34
3.2.4. QPCR - REALTIME PCR UYGULAMASI	36
3.3. B YO STAT ST K VE B YO NFORMAT K YÖNTEMLER	37
3.3.1. ICC BOYAMA FOTO RAFLARININ LENMES	37
3.3.2. RT-PCR (QPCR) SONUÇLARININ ANAL Z	39
4. BULGULAR	40
4.1. H STOLOJ K BULGULAR	40
4.1.1. HEMATOKS LEN - EOS N ÖRNEKLER	41
4.1.2. IGF-I ÖRNEKLER	44
4.1.3. VEGF ÖRNEKLER	46
4.1.4. NCAM ÖRNEKLER	48
4.2. MOLEKÜLER BULGULAR	49
4.2.1. RNA ZOLASYONU SONUÇLARI	49
4.2.2. cDNA SENTEZ	51
4.2.3. IGF-I PCR SONUÇLARI	53
4.2.4. NCAM PCR SONUÇLARI	54
4.2.5. VEGFA PCR SONUÇLARI	55

4.2.6. IGF1 ve NCAM1 tekrar PCR	56
4.3. QPCR - REALTIME PCR SONUÇLARI	58
4.3.1. IGF-1 / CREB3 MELT QPCR	58
4.3.2. VEGF-A / HK1 MELT QPCR	60
4.3.3. NCAM / ZFX MELT QPCR	63
4.3.4. REST 2009 ANALİZ SONUÇLARI	66
4.4. GÖRÜNTÜ ANALİZ SONUÇLARI	67
4.4.1. IMAGEJ VERİLER	67
4.4.2. SPSS ANALİZLER	69
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇLAR	82
7. KAYNAKÇA	84
8. ÖZGEÇMİŞ	89

## S İMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>IGF(-1)</b>	: İnsan benzeri büyüme faktörü(-1)
<b>VEGF(A)</b>	: Vasküler-endothelial büyüme faktörü(A)
<b>NCAM(1)</b>	: Nöronal hücre adhezyon molekülü(1)
<b>SCNT</b>	: Somatik hücre nükleer transfer
<b>RNA</b>	: Ribo nükleik asit
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>cDNA</b>	: Complementer / Circular (Sirküler) DNA
<b>RT-PCR</b>	: Real Time - Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>kD(a)</b>	: Kilo Dalton
<b>µg</b>	: Mikro gram
<b>µl / µL</b>	: Mikro litre
<b>gr</b>	: Gram
<b>hCG</b>	: İnsan Kortiko-Gonadotropin
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>FAM</b>	: Fluorophores (Fluorofor)
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>°C</b>	: Santigrad (Centigrade - Celsius) Derece
<b>xg / xG</b>	: Santrifüj gücü (yerçekimi ivmesi cinsinden)
<b>DAB</b>	: 3,3'-Diaminobenzidine
<b>HE</b>	: Hematoksilin - Eosin
<b>ICC</b>	: İmmünohistokimya / Immunocytochemistry
<b>hPL</b>	: Human placentary lactogen - İnsan placentary laktojen
<b>DEPC</b>	: Diethylpyrocarbonate - Dietilpirokarbonat
<b>MPF</b>	: Maturation/Mitosis promoting factor
<b>IVF</b>	: <i>In vitro</i> fertilizasyon
<b>PFA</b>	: Paraformaldehit
<b>Ig / IG</b>	: Immunoglobulin
<b>PSP / PAG</b>	: Pregnancy Specific Protein / Pregnancy- associated Glycoprotein
<b>HC-ACTH</b>	: Human Chorionic Thyrotropin - Human Chorionic Corticotropin Hormon
<b>ICAM</b>	: Intracellular Adhesion Molecule
<b>NgCAM</b>	: Nöro-glial Hücre Adhezyon Molekülü
<b>PSA</b>	: Polisialik asit
<b>dNTP</b>	: Dinükleotid fosfat (Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin)
<b>FGFR</b>	: Fibroblast growth factor receptor
<b>NK</b>	: Natural Killer / Doğal öldürücü
<b>CD</b>	: Cluster of Differentiation

## EK LLER D Z N

<b>ekil 2.1.</b> Genel insan plasenta yapısı ve yerleşimi	4
<b>ekil 2.2.</b> Genel sırt plasenta yapısı ve zarlar	9
<b>ekil 2.3.</b> Genel sırt plasenta anatomisi	10
<b>ekil 2.4.</b> Klonlamanın ematik gösterimi	15
<b>ekil 2.5.</b> Elektrofüzyon petrisi ve elektrodlar	16
<b>ekil 2.6.</b> Büyüme hormonu, ALS ve IGF ilişkisi	20
<b>ekil 2.7.</b> IGF Temel mekanizması; IGF-I, küçük bazı homolog peptidler ve/veya reseptör afinitesi bazı moleküller gibi inhibitörlerin varlığında, IGF-IR üzerine bağlanamayabilir. (www.medscape.com'dan)	22
<b>ekil 2.8.</b> VEGF ailesi üyeleri, reseptörleri, yolakları ve sonuçları (Hücre göçü, damar geçirgenliği, yaşam fonksiyonları, proliferasyon)	25
<b>ekil 2.9.</b> NCAM bağlanması ve sinyal iletimi	27
<b>ekil 3.1.</b> ICC Boyama yöntemi (nemli ortamda inkübasyon)	31
<b>ekil 3.2.</b> Örnek jel görüntüsü (UV altında açık)	36
<b>ekil 3.3.</b> Histolojik tüm alan boyanması	38
<b>ekil 3.4.</b> 100 level threshold uygulanmış hali, bu halde tüm kırmızı alan boyanmış gibi gözükmemektedir.	38
<b>ekil 3.5.</b> Cloud filtresi siyah-beyaz olarak uygulanmış hali (ICC Boyama örneği)	39
<b>ekil 3.6.</b> 100 level threshold uygulanmış hali, ICC (+) alanlar; arkaplan dahil düzeltilmemek kaydıyla.	39
<b>ekil 4.1.</b> Efe HE Standart boya x40 (Kotiledon/Septum)	42
<b>ekil 4.2.</b> Ece HE Standart boya x4 (Kotiledon/Septum)	42
<b>ekil 4.3.</b> Efe HE Standart boya x40 (Ven)	43
<b>ekil 4.4.</b> Kiraz HE Standart boya x4 (Kranünkül)	43
<b>ekil 4.5.</b> Kontrol-1 HE Standart boya x40 (Kotiledon)	43
<b>ekil 4.6.</b> Kontrol-1 HE Standart boya x40x1,5 (Ven)	44
<b>ekil 4.7.</b> Efe IGF Negatif x20 (Maternal doku)	45

<b>ekil 4.8.</b> Efe IGF Pozitif x20 (Maternal doku)	45
<b>ekil 4.9.</b> Klon 1 IGF Pozitif x20 (Plasentom)	46
<b>ekil 4.10.</b> Kontrol 2 IGF Pozitif x40 (Maternal) -Counterstain-	46
<b>ekil 4.11.</b> Klon 1 VEGF Pozitif x20 (Villus) -Counterstain-	47
<b>ekil 4.12.</b> Efe VEGF Negatif x10 (Fetal)	47
<b>ekil 4.13.</b> Efe VEGF Pozitif x10 (Feto-Maternal)	48
<b>ekil 4.14.</b> Klon 1 VEGF Pozitif x40 (Kranunkül)	48
<b>ekil 4.15.</b> Efe NCAM Negatif x10 (Fetal) -Counterstain-	49
<b>ekil 4.16.</b> Kontrol 2 NCAM Pozitif x10 (Kranunkül)	49
<b>ekil 4.17.</b> Klon 2 NCAM Pozitif x40 (Maternal)	50
<b>ekil 4.18.</b> RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü. Üst sıra; size marker, 1F, 1M1, 1M2, 1T, 2M, 2T, 2F1, 2F2, K1T, K1F, K1M, K3T, K3F, K3M1, K3M2, K2T1, K2T2, K2F, K4T. Alt sıra; size marker, K4M, K4F.	52
<b>ekil 4.19.</b> Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kiti yükleme ve karı tırma oranları (a)	52
<b>ekil 4.20.</b> Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kiti yükleme ve karı tırma oranları (b)	52
<b>ekil 4.21.</b> IGF-I geni PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü.	55
<b>ekil 4.22.</b> NCAM geni PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü.	56
<b>ekil 4.23.</b> VEGFA geni PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü.	57
<b>ekil 4.24.</b> IGF-I ve NCAM tekrar deneyi PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü.	58
<b>ekil 4.25.</b> IGF-I ve CREB3 için erime dereceleri grafi i	59
<b>ekil 4.26.</b> IGF-I ve CREB3 için yükseltgenme tepe noktaları grafi i	59
<b>ekil 4.27.</b> IGF-I ve CREB3 için PCR döngü grafi i	61
<b>ekil 4.28.</b> VEGFA ve HK1 için erime dereceleri grafi i	61
<b>ekil 4.29.</b> VEGFA ve HK1 için yükseltgenme tepe noktaları grafi i	62
<b>ekil 4.30.</b> VEGFA ve HK1 için PCR döngü grafi i	64
<b>ekil 4.31.</b> NCAM ve ZFX için erime dereceleri grafi i	64
<b>ekil 4.32.</b> NCAM ve ZFX için yükseltgenme tepe noktaları grafi i	65

<b>ekil 4.33.</b> NCAM ve ZFX için PCR döngü grafi i	67
<b>ekil 4.34.</b> Relatif (Göreceli) Eksresyon Sonuçları	67
<b>ekil 4.35.</b> Normalize edilmemi sonuçlar (Referans gene kar ı hesaplama)	67

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> RNA izolasyonu yapılan örnekler	32
<b>Çizelge 3.2.</b> Kuyu yükleme tablosu	37
<b>Çizelge 4.1.</b> Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyon değerleri ve stok solüsyon için hesaplamalar	51
<b>Çizelge 4.2.</b> Hazırlanan dilüsyonların konsantrasyon değerleri	51
<b>Çizelge 4.3.</b> Her örnek için protokolde belirtilen RNA/primer karışımını hazırlamak için gerekli olan bileşim oranları	53
<b>Çizelge 4.4.</b> IGF-I genin çoğaltılması için kullanılan PCR protokolü	54
<b>Çizelge 4.5.</b> IGF-I genin çoğaltılması için kullanılan PCR programı	55
<b>Çizelge 4.6.</b> NCAM genin çoğaltılması için kullanılan PCR protokolü	55
<b>Çizelge 4.7.</b> NCAM genin çoğaltılması için kullanılan PCR programı	56
<b>Çizelge 4.8.</b> VEGFA genin çoğaltılması için kullanılan PCR protokolü	56
<b>Çizelge 4.9.</b> VEGFA genin çoğaltılması için kullanılan PCR programı	56
<b>Çizelge 4.10.</b> Tekrar deneyi için kullanılan PCR protokolü	57
<b>Çizelge 4.11.</b> Tekrar deneyi için kullanılan PCR programı	57
<b>Çizelge 4.12.</b> IGF-I için erime erisi analizi (FAM)	60
<b>Çizelge 4.13.</b> VEGFA için erime erisi analizi (FAM)	63
<b>Çizelge 4.14.</b> NCAM için erime erisi analizi (FAM)	66
<b>Çizelge 4.15.</b> Taraması yapılan alanlar tablosu (Örneklerin veri setleri)	68
<b>Çizelge 4.16.</b> Ham <i>ImageJ</i> verisi, Area %'si beyaz alanları işaret etmektedir.	69
<b>Çizelge 4.17.</b> Dağılım tablosu / Normal dağılıma uygunluk, verilerin normal dağılım gösterdiği ve parametrik testlere uygun olduğu Significance değerinden anlaşılabilmektedir	70
<b>Çizelge 4.18.</b> IGF-I için değerlendirme tabloları	70
<b>Çizelge 4.19.</b> VEGF için değerlendirme tabloları	71
<b>Çizelge 4.20.</b> NCAM için değerlendirme tabloları	72

## 1. AMAÇ VE KAPSAM

Plasenta *Placentalia* grubu memelilerde gebelik esnasında geli en ve geçici olan bir yapıdır. Genel olarak fetal ve maternal olmak üzere iki bölüme ayrılır: Fetal membranlar ve plasentanın kendisi fetusu anneden ayıran seçici geçirgen bir yapıdır. Fetal membranlar; amnion, vitellüs, koryon ve allantois keseleridir. Zigotun gelişir. Vitellüs ve allantois haricinde hiçbirisi embriyo yapısına katılmazlar. Allantois kesesi maternal ve fetal plasenta olmak üzere iki kısımdan gelişir. Maternal plasenta *decidia*'dan gelişir. Konseptusunun bulunduğu bölgeye göre farklı tipleri vardır. Konseptus, embriyoyu da içeren embriyodaki yapılarının bütünü ifade etmektedir, genel olarak;

1. Konseptusun hemen altındaki *decidia basalis*
2. Konseptusun üzerini örten *decidia capsularis*
3. Bu ikisinin dışında kalan kısım *decidia parietalis*

Bu üç yapı maternal plasentayı meydana getiren yapılardır.

Fetal plasentanın gelişimine bakıldığında koryon kesesinden köken aldığı görülür. 8. haftaya kadar koryon villusları kesenin tüm yüzeyini kaplar ve koryon kesesi büyüdükçe *decidia capsularis* ile ilişkili villuslar baskıya uğrar ve dejenerer ve düz koryon veya koryon yaprağı (koryon yaprağı) denilen yapı oluşur. *Decidia basalis* ile ilişkili villuslar artarlar ve villus koryonu ya da koryon frondosumu yaparlar. Bazı koryon villusları *decidia basalis*ye tutunurlar ve stem villus veya anchoring villusları oluştururlar. Plasenta membranı 4 tabakadan oluşur. Bunlar dört tanesidir;

- Sinsityotrofoblast
- Sitotrofoblast
- Koryon villuslarının bağ dokusu
- Fetus kapiller endotelidir.

Bu dördü yapı plasenta bariyerini oluşturur. 20. haftadan sonra membran incilir. Bunun nedeni ise sitotrofoblast ve bağ dokusunun kaybolmasıdır. Bu membran incelmesine bağlı olarak gebeliğin ilk haftalarında karınlık olarak geçi yapamayan maddeler geçebilir



hale gelirler. Özellikle anne beslenme rejimine ba lı olarak alınan toksik maddeler de plasenta bariyerini a abilir ve fetuse geçebilir.

Plasentalı memelilerin tümünde plasentanın 3 temel i levli bulunmaktadır. Bu i levler:

1. Metabolizma i levli: Erken gebelik döneminde glikojen, kolesterol ve ya asitlerini üreterek embriyonun beslenmesini sa lar.
2. Ta ıma i levli (her türlü gaz, besin, hormon, elektrolitler, ilaçlar ve bariyeri geçen enfektif ajanlar).
3. Endokrin i levli: En tipik salgılanan hormon insanda hCG dir. Bu hormon ikinci bir menstural döngüyü engeller. Corpus luteumun süreklili ini sa lar. Di er bir hormon hPL (Human plasental lactogen) dir. hPL ye hSC (human chorionic somatomamotropin) de denmektedir. Bu hormonların yanı sıra steroid hormon sentezi de yapılır. Bunlar progesteron ve östrojen hormonlarıdır.

Plasentanın bilinen i levlerinin yanısıra bilinmeyen bazı özelliklerinin de olabilece i yapılan çalı malarda gösterilmektedir. Plasental geli im bozukluklarının do rudan fetus üzerinde etkili oldu u, abortlara ya da anomali ta ıyan do umlara neden oldu u bilinmektedir.

Hayvancılık sektörüne bakıldı ında ise gen kaynaklarının korunması (tükenme tehlikesi altında bulunan hayvanlar gibi) ve insanı da içine kapsayan tedavi amaçlı yapılan klonlama çalı malarının önemi günümüzde giderek artmaktadır. Hayvanlarda klonlama hala bilinmezleri olan ve üzerinde çalı ılarak bu bilinmezleri gidermeye çalı ılan alanlardan biridir.

Sı ır klonlaması açısından duruma yakla ıldı ında, bilindi i üzere yakla ık sı ır gebelik süresi dokuz ay olarak görülmektedir ve bu gebelik süresi üç trimester altında de erlendirilmektedir. SCNT yoluyla elde edilerek transferi gerçekleştirilen blastosistlerin iç genetik mekanizmalarında veya ta ıyıcı anne senkronizasyonu gibi problemlere ba lı abortlar ilk trimester içinde daha çok görünmektedir. Bununla birlikte NT embriyonun implantasyonu gerçekleştirildikten sonra geli imin ikinci trimesteri geçmesi halinde plasental anomalilerin fetus üzerinde etkili oldu u literatür bilgilerle uygunluk göstermektedir. Son döneme yakla ıldı ında plasental anomaliler ile de ili kili oldu u dü ünülen ya da gösterilen hidrops, akci er geli im yetersizli i gibi durumlar ortaya çıkmaktadır.

Klon plasentada ve normal plasental yapılanma arasında damar yapısında farkları, kotiledon sayıları, plasentom birimleri ve bu birimler arasındaki interplasentom farklılıkları, hücresel biçim ve sayım farkları, ayrıca da klon plasentada maternal ve fetal plasenta arasındaki farkın belirginsizleşmesi gibi durumlar söz konusudur.

Bazı çalımlarda makroskobik ve normal mikroskobik bulgular literatürde bu şekilde farklılıkları göstermektedir. Ayrıca immünohistokimyasal olarak da farklılıklar bulunabileceği ve bu farklılıkların moleküler yapılanmadan kaynaklandığı belirlenmiştir. Diğer yandan her üç grup molekülün varlığını moleküler yöntemlerle test ve teyit edilecektir. Moleküler analiz için 5 (bir ikiz plasenta) dondan elde edilmiş olan plasenta örnekleri -80°C'de saklanmaktadır. Total RNA izolasyonu yapılarak, PCR yöntemi ile özel bağlanma bölgesinde, çoğaltılarak yapılarak, primerlere karşı okunması gerçekleştirilmiştir.

Bilindiği üzere fetal gelişim plasenta üzerinden fetal-maternal olarak gerçekleşen kompleks bir süreçtir, bu süreçte plasenta tarafından salınan IGF-I ve IGF-II'nin önemi büyüktür. Bu molekülün genetik olarak varlığının saptanması için literatürde de önerilen primerler cDNA üzerinden okunarak kullanılacaktır. VEGF yine plasenta üzerinde bulunarak damar yapısındaki gelişimi olanaklı kılan bir diğer büyüme faktörüdür. Özellikle klon gebeliklerde plasenta morfolojisinde, dolayısıyla da damarlanmasında sorunlar olmaktadır. Bu morfolojik durumun moleküler düzeyde izlenebilmesi için VEGF'in cDNA üzerinden klonlanan VEGF primeri ile saptanması amaçlanmıştır. NCAM molekülünün de plasental gelişim esnasında endometriyal yüzeylerden sitotrofolblastik yüzeye doğru geçiş yapan trofolblastların yerleşimi ve dağılımı konusunda etkili olduğu bilinmektedir. Özellikle yüksek primatlarda bu durum saptanmış olmakla birlikte sırtırlarda bu tür çalımlar daha ilkin seviyededir. NCAM molekülünün varlığını moleküler olarak NCAM spesifik primerleri vasıtasıyla yine cDNA üzerinden tespit edilmiştir.

Tüm bu analizler sonucunda hem morfolojik, hem de mikroskobik, hem de moleküler düzeyde bu büyüme ve adhezyon moleküllerinin klon ve normal plasentada sentezlenip sentezlenmedikleri saptanarak plasental ve fetal gelişim esnasında anomalilerin varlığı ile ilişkilendirilmeye çalışılması amaçlanmıştır.

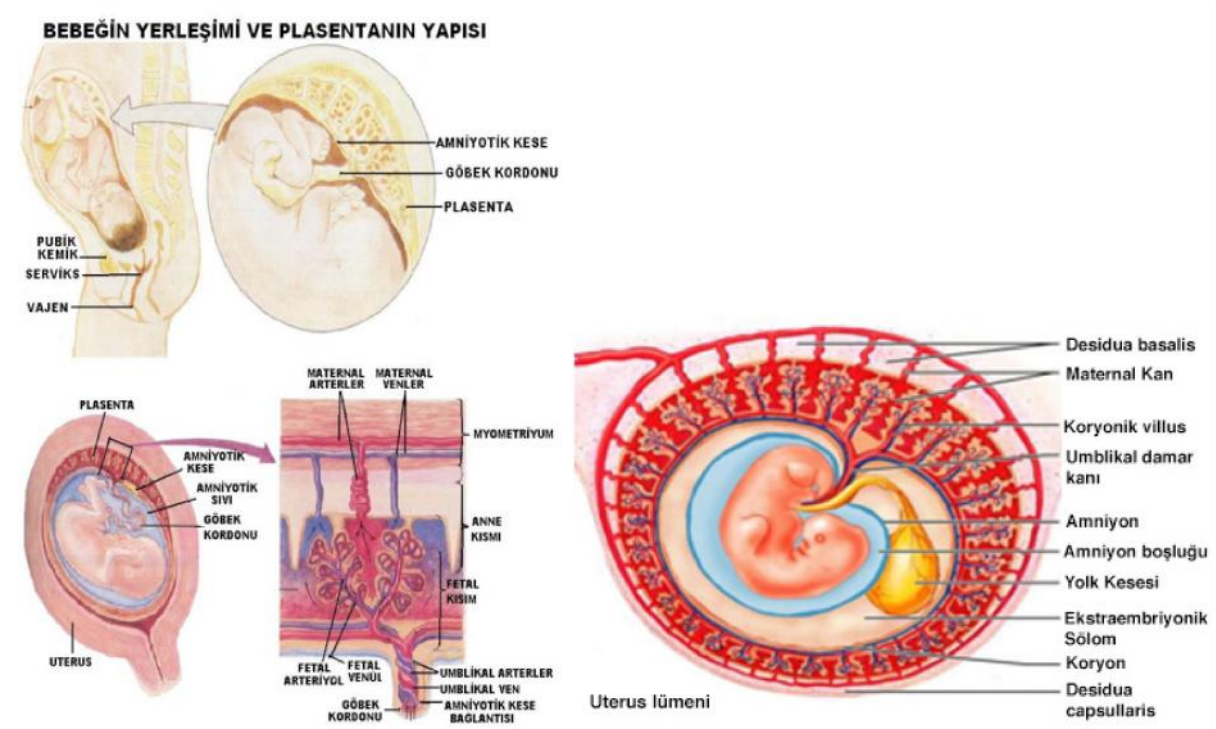
## 2. GENEL B LG LER

### 2.1. PLASENTA

#### 2.1.1. PLASENTA GENEL TANIMI

Yapılan çalı ma ruminantlarda olmasına kar ın öncelikli olarak insan plasenta yapısı sunulacaktır. Bunun sebebi yapılan bazı çalı maların insan plasentası üzerine olu u ve bu çalı ma için de referans kabul edilmesinden dolayıdır. Temel benzerlik ve farklılıklar ortaya konarak zaman zaman kar ıla tırmalara yer verilecektir.

Di ide implantasyon ve plasantasyon süreci etkile imler içermektedir. Temel olarak mononükleer ve multinükleer trofoblast ekillenmesi, bu hücrelerin prolifer olmaları, adhesif özelliklerindeki de i iklikler ve trofoblast populasyonunun ileri derecede farklılı malarının önemi büyüktür. Gebelik boyunca yavruya ait koryon ile uterus mukozası arasında, yavrunun geli mesi ve korunması için geli en ekstra embriyonal doku plasentayı olu turur. Embriyonun beslenmesini, geli mesini, solunumunu ve bo altımını sa lar; embriyonun geli mesi süresince de de i ik hormonlar salgılar (Cunningham F. 2011,Uysal O. 2002).



ekil 2.1. Genel insan plasenta yapısı ve yerle imi (Anonim-web)

Memelilerde plasentasyonun amacı; fetal ve maternal dolaşımı mümkün olduğu kadar birbirine yakınlaştırmak ve bu yakınlaştırmayı seçici geçirgen yapıda gerçekleştirmektir. Plasental gelişim, döllenmeyi takiben implantasyon ile başlamaktadır. Implantasyon hızlı bir trofoblast proliferasyonu ve plasental morfogenez periyodu ile devam etmekte olup, implantasyon ilerlerken, blastosisti çevreleyen trofoblast hücreleri periferde sinsisyotrofoblast ve içte sitotrofoblast tabakalarına farklılaşma gösterir. 7. ve 8. günde implantasyonu gerçekleştiren blastosistin sinsisyotrofoblastında ilk lakünalar görülmektedir ve aynı süreçte koryon plaşı gelişmeye başlamaktadır. Ekstra-embriyonik mezenterimin gelişip blastosist bölümunun sitotrofoblast yüzeyini kaplamasıyla beraber primer koryon plaşı; mezenterim, sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast olmak üzere üç tabakalı şekli alır. Aynı esnada lakünaları ayıran trofoblastik trabeküller, prolifer olmaya başlar, sürekli büyüyen ve genişleyen laküner sistemin içine doğru ilerleyen ilk villusları oluşturur. Lakünaların genişlemesi, intervillöz aralık oluşumuna neden olmakta, intervillöz aralıkların ilk oluşum evrelerinde ise serbest villuslar bulunmamaktadır. Genel olarak bu şekilde tanımlanabilen plasenta türleri arasında farklı yapılar göstermektedir (Gökçimen A., Temel S., 2004).

Fetal ve maternal kan; sinsisyotrofoblast, sitotrofoblast, trofoblast bazal membranı, villus stroması, fetal kapiller endotel ve fetal kapiller endotelin bazal membranından oluşan plasenta bariyeri ile ayrılmıştır. Sinsisyotrofoblast tabakası maternal kan ile direkt olarak ilişki kide olan fetal villus aracını çevreler. Bunun etrafında yer alan mikrovilluslar; absorpsiyon ve fetal gelişimde önemli olan pek çok hormonun sentezi, gaz değişimi ve sekresyondan sorumludur. Özetle plasentanın temel fonksiyonu transport ve sentezdir. Transport fonksiyonu, her iki yönde plasental bariyerden geçişle olur. Yüzey alanı gerek villus, gerekse mikrovillus yapılan nedeniyle oldukça geniştir.

Plasenta, insan ve hayvan türlerinde kendine has özellikler gösterir. Bu nedenle plasentalar anatomik, histolojik ve jinekolojik olarak sınıflandırılabilir. Plasentaların sınıflandırılması, temel olarak plasentanın anatomik özellikleri göz önüne alınarak yapılır. Anatomik olarak plasentalar, diffuz ve lokal plasenta olarak ayrılır. Diffuz plasentada koryon villusları yaygındır. Bu tip plasenta kısırak, eek ve domuzda görülür. Lokal plasentalarda koryon üzerinde bulunan villuslar (villi choralis), belli noktalar üzerinde yerleşim gösterirler. Buna göre lokal plasentalar *plasenta cotyledonata* ruminantlarda, *plasenta zonaria* karnivorlardan kedi ve köpeklerde, *plasenta discoidea* ise insan ve maymunlarda görülür. Jinekolojik olarak plasenta, plasenta desiduata, plasenta adhesiduata ve plasenta intermedia olarak üç gruba ayrılır (Karaca T., Yörük M. 2010).

### 2.1.2. GENEL PLASENTA ANATOMS

nsanda, fetal ve plasental membranların ba nda desidua (desidua basalis, desidua capsularis, desidua parietalis), koryon pla ı ve amniyon zarı gibi temel olu umlar gelmektedir. Membranlar normalde plasentanın kenarlarında sonlanır ve amniyon sıvısı ile fetusu içerir. Plaseenta ve fetal membranlar koruma, besleme, solunum, salgılama ve hormon üretimi fonksiyonlarını yerine getirirler (Demir, 1995; Eftalio lu, 1988). Canlının do umundan kısa bir süre sonra plaseenta ve fetal membranlar, gerilme ve mekanik müdahale ile yırtılır ve uterusdan atılır. Zigottan geli en koryon, amniyon, vitellus kesesi ve allantois; fetal membranları olu turur, fakat vitellus kesesi ve allantois hariç, bunlardan hiçbiri embriyo/fetusun ekillenmesine katılmaz. Vitellus kesesi, barsak primordiyumu olarak embriyoya katılır. Allantois ise, fetusta urakus olarak bilinen fibröz kordu ekillendirir ve yeti kinde median umbilikal ligament olarak kalır. Mesanenin apeksinden umbilikusa dek uzanır (Uysal, 2002).

Memeli blastosistinin dı tabakası geli iminin farklı evrelerinde çe itli isimler alır. ç hücre kütesine embriyoblast ya da pluriblast denmektedir. Hipoblast ve mezodermin ekillenmesinden sonra, daha özel bir tanımlama olarak "trofoektoderm" denmektedir. Mezoderm yarılıp, sonraki tabakaların ektoderm ile birlesinden sonra bu ekstra-embriyonik somato-pleuraya koryon adı verilmektedir. Amniyon tamamlandıktan sonra koryon, embriyoyu ve di er ekstra-embriyonik membranları ku atır ve embriyo dokusu ve uterus arasında bir arayüz olarak hizmet etmektedir (Carlson, B. M., 1996).

Ekstraembriyonik keselerin geli imi ile embriyonun genel vücut formu geli meye ba ladı nda, ekstraembriyonik keseler endometriyuma ba lanır ve bu olaya implantasyon denir. Bu süre türe göre de i im göstermektedir. Blastosist intrauterin ya amın ba langıcında diffuzyonla histotrofik olarak beslenir. Histotrof embriyonun beslenmesinde yetersiz kaldı nda, inekte 12. günde, köpek ve kedilerde 13-17. günde ve kısırakta 25-30. günde uterusda embriyonik ba lantılarla implantasyon ba lar. Koyunlarda 15-16. gebelik gününde ba layan implantasyon ve plasentasyon 50-60. günler civarında geli mesini tamamlar (Guillomot M., 1995; Karaca T., Yörük M. 2010).

#### *Desidua*

Dölyata ı mukozasının yüzeyinde bulunan ve gebelik hormonlarının salgılanmasıyla de i ikli e u rayarak yumurtanın koryon zarına yapı an ince zar olarak tanımlanabilen

desidua; endometriyumun fonksiyonel tabakası olarak da nitelendirilir. Endometriyum gebelik öncesi hazırlık niteliinde bazı de i iklikleri yapmı tır. Gebelikte de i iklikler sürer, ancak en ileri de i iklik elbette implantasyon alanındadır. Gebelikte psödodesidual hücreler tipik desidual hücreleri yapar. Desidua bulundu u bölgeye, dolayısı ile implantasyon bölgesi ile ili kilerine göre, farklı yapı ve fonksiyonda olmasına ba lı olarak; desidubasalis, desidua capsullaris ve desidua parietalis olmak üzere üç alt grupta incelenir (Uysal O. 2002).

### ***Desidua Basalis***

Desidua plasentalis olarak da adlandırılan desiduanın trofoblast hücreleri ile etkile im halinde bulunan kısmıdır. Bu bölge dı ta *stratum compactum*, ortada *stratum spongiosum*, myometriuma yakın *stratum basalis* olarak üç kesimde incelenebilir (Gray H. 1918 - 2000). Embriyonun bulundu u taraftaki trofoblastlarla yanal kesiminde yer alan desidual hücrelerdir, dolayısıyla embriyo ile miyometriyumun arasında kalır. Burada ekillenen bazal plak; maternal ve fetal dokular arasında bir yapı olup, koryon ve desidua basalisin kayna masıyla ekillenir. Maternal ve fetal hücrelerin çok yakın olarak buldu u yer; desidubasalistir. Endometriyumdan orjinlenen maternal bile en, embriyoya derinlemesine uzanır ve ba langıçta kompakt ve spongiyoz maternal desidua tabakalarından olu ur, sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast tabakaları ise fetal dokuları olu turur (Bowen R. 2008).

### ***Desidua Capsullaris***

Embriyo tasla ının uterus lümenine bakan tarafındaki koryon yapra ına kar ı sınırlayıcı, endometriyumun zona kompakta bölgesinin farklılaşmasından ibaret olan, maternal dokuyu olu turan yapıdır. Desidua parietalisin bir devamı gibidir. nsanda, gebeli in 3. ayında kalınlı ı yakla ık 1 mm'ye kadar iner (Carlson, B. M. 1996). Yapısındaki hücresel ve fibriller elemanlar gebeli e ba lı olarak yapısal bir gerileme gösterir; dejenere olur ve kalıntıları desidua parietalisle kayna ır ve tamamen ortadan kalkar (Uysal, O. 2002).

### ***Desidua Parietalis***

implantasyon alanı dı nda kalan desidual hücrelerden olu ur. Desidua basalisten prolifer olmayan salgı bezleri ve trofoblast hücrelerinin genel olarak bulunmaması ile ayırt edilir. Ayrıca damar geli imindeki farklar nedeniyle de erken do um ve gebelik kayıpları ile de ili kilendirilir. (Vailhé B., Dietl J., Kapp M. Toth B., Arck P. 1999). Plasental fonksiyon bozukluklarında histolojik ve fizyolojik olarak de erlendirilmesi gerekli olan bir kısımdır Miglino M. A. ve ark. (2007). Gebelikte birlikte uterus lümenini kaplayan epitel ve onun

altındaki lamina propriyanın de i mesiyle olu an desidua tipidir ve uterus lümeninin plasentasyon dı ındaki kısımlarını kapsar. Fetusun büyümesine ba lı olarak uterus kavitesinin kapanmasıyla desidua capsullaris ve desidua parietalis yapı ırlar. Gebeli in son üç ayında desidua parietalis de kayna ır. Gebeli in ikinci yarısını takiben Desidua parietalis tamamen geriler ve bu dönemden sonra desidua özelli ini sadece desidubasalis sürdürür (Vailhé B., Dietl J., Kapp M. Toth B., Arck P. 1999).

Desidua capsullaris ve desidua parietalis, gebeli in 3. ayından ba layarak, fetusun büyüüp itmesiyle birbirine yakla an ve yassıla ıp bir arada koryon yapra ı ile kayna arak amniyona dayanır ve "amniyo-koryonik membranı"olu tururlar. Bu membran desiducapsullaris ile birle ir. Desidua capsullarisin yok olmasından sonra, desidua parietalise tutunur (Uysal, O. 2002).

### ***Koryon ve Amniyon Zarı***

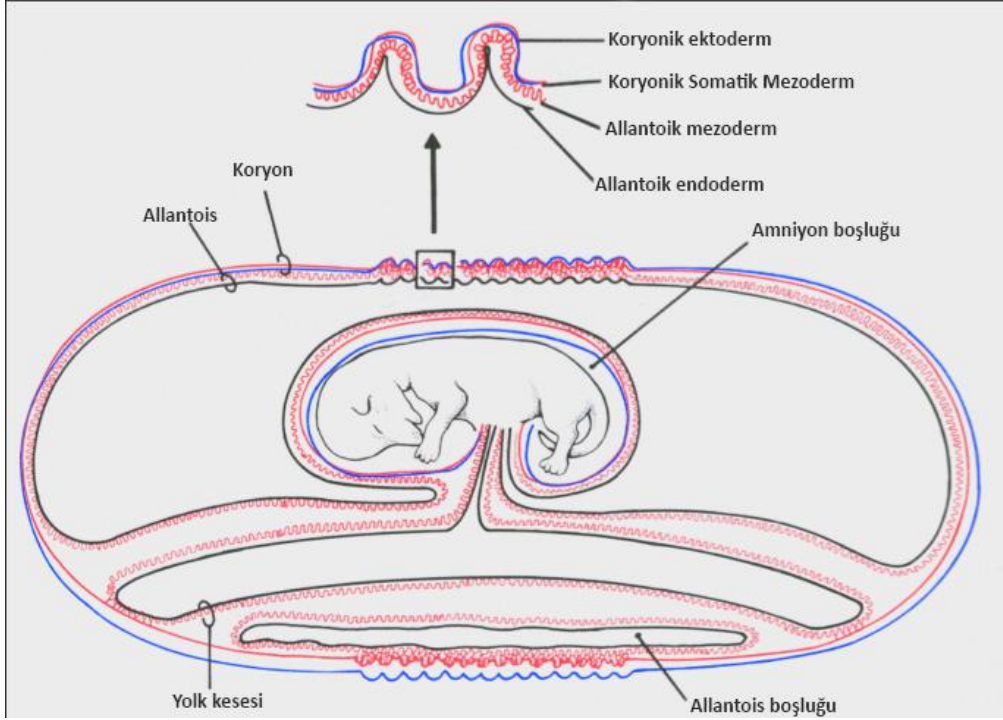
Gebeli in erken haftalarında embriyonik disk amniyotik kese içerisinde amniyos sıvısı ile çevrenmi olarak bulunur. İlk haftalarda önemli iki kese daha bulunmaktadır, bu keselerden biri koryonik kese ya da koryon kesesi ve yolk kesesidir. Koryonik kese içerisinde; sölom (vücut) bo lu u ile içerisinde embriyoyu barındıran amniyotik kese ve bu iki bo luk arasındaki ba lantıyı sa layan yolk kesesi bulunur. Gebeli in ilk 12 haftasında amniyotik kese sölomik sıvı ile çevrenmi tir. Bu üçlü yapı fertilizasyondan sonra 17. günde olu maktadır (Tütüncü L. ve ark.2000). Koryon yapra ı ya da pla ının geli mesi, primer koryon pla ının olu ması esnasında ba lar. Bu olay 8. günde implante olan blastosistin sinsisyotrofoblastında ilk lakünalar belirmeye ba lar. Dokuzuncu haftadan itibaren amniyon sıvısı üretimi hızla artar ve 12. hafta sonlarında amniyotik zar ile koryon birle ir ve sölomik bo luk ortadan kaybolur.

Ba langıçta bu tabaka sadece sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblasttan olu mu tur. İlk laküner sistemi, blastosist bo lu undan ayırır. Ekstraembriyonik mezen imin geli ip blastosist bo lu ımın sitotrofoblast yüzeyini kaplamasıyla beraber primer koryon pla ı mezen im, sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblasttan olu an üç tabakalı eklini alır (Uysal, O. 2002).

### **2.1.3. Sİ IRLARDA PLASENTA ANATOM S**

Sı ırlar bilindi i üzere ruminant memeliler içinde yer almaktadırlar. Sı ır plasentaları süre ve geli im yönünden insan plasentasına benzerlikler göstermesine ra men, anatomik olarak insan ve di er ruminant dı ı gruplardan farklılıklar göstermektedir. Sı ır plasentası

Placenta syndesmo-chorialis, adesiata, villosa cotyledonata olarak da adlandırılan, kotiledon denilen yapılardan oluşmaktadır. Evrimsel gelişim içerisinde plasenta gelişimi köken olarak reptil ve kuş yumurtalarındaki zarlar ve keseler ile ilişkilendirilir. Bununla birlikte canlı doğuran balıklardaki yumurta yapışması ile gerçek plasenta farklı yapılanmalardır (Weekes H.C.; D.Sc. 2009).



**ekil 2.2.** Genel sı ır plasenta yapısı ve zarlar (www.studyblue.com'dan)

Ruminant memeliler, otçul hayvan grupları içinde olup, sı ırlar, keçiler, koyunlar ve geyikler kotiledon tipinde plasenta içermektedir. İnsan plasentasından temel yapısal farkı bu ekinde açıklanmaktadır. Bununla beraber at, deve gibi otçul memeli gruplarında diffüz tip plasenta gözlenmektedir. Geçmişte yapılan moleküler filogenetik çalışmaları plasentalı grupların yaklaşık yüz milyon ile seksenbeş milyon yıl önce gelişim gösterdiklerini göstermektedir. Fakat modern plasentalı familyaları ise geç Eosen ve erken dönem Miyosen'de görülmüştür (Bininda-Emonds, O.R.P. et al, 2007)

#### 2.1.4. MİPLANTASYON

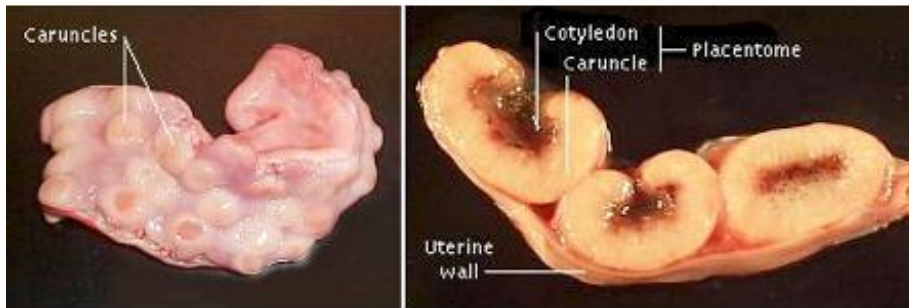
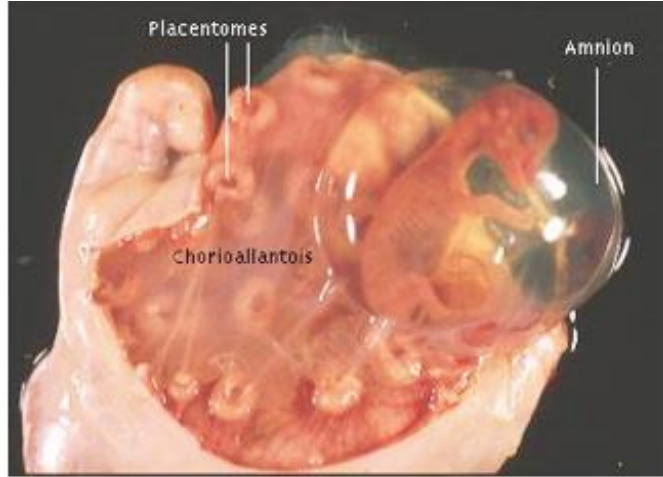
Ruminantlarda yani gevi getiren memelilerde implantasyon tam invazif ekinde gerçekleşir, bazı ara tırmacılara göre eklenme biçiminde implantasyon gerçekleşir. Embriyonik zarlar ve endometriyum üzerindeki kranunküller arasında sıkı bir bağlantı ve



eklenme gerçektir, bu durum sı ırlarda 5 haftalık geli imde gözlenir. 5. haftayı takiben ise plasenta ekillenmeye ba lar.

Gevi getiren hayvan gruplarında görülen kotiledon tipinde plasenta maternal ve fetal yüzeyler arasında geni ba lanma bölgeleri olması yerine kotiledon denilen daha küçük plasenta yapılanmaları içermektedirler. Sı ır plasentasını tanımlamak için kullanılan terminoloji genellikle u ekildedir:

- Kotiledon (Cotyledon): Plasentanın fetal kısmı
- Kranunkül (Cranuncula): Plasentanın maternal kısmı
- Plasentom (Placentoma): Kotiledon ve kranunkülden olu an plasental (i levsel) birim



**ekil 2.3.** Genel sı ır plasenta anatomisi (vivo.colostate.edu'dan)

Kranunküller oval veya yuvarlak halde incelerek uterus mukozasına yönelirler, mukozanın proliferasyonu ve subepitel dokunun geli imi sayesinde meydana gelirler.

Gebeli in geli medi i zamanlarda bile varlıklarını görmek mümkündür. Ancak gebeli in sürmemesi halinde bu yapı da dejenere olur. Bu yapının geli mesinin sebebi gebelik halinde fetal membranlarla ba lantıyı sa lamak amaçlıdır. Koriyoallontoik zar, kranunküller epitel içinde uzayan kriptlerden geli ir (Elliot, M.; Crespi, B. 2006).

Gebe sı ırlar 75-125 arası plasentom içerebilir, genellikle bu durum hayvanın ya ı ve boyutları ile ilgili olmaktadır. Koyunlarda da plasentom sayısı yakla ık sı ırlarınki gibiyken, geyiklerde bu sayı oldukça azdır (4-6 kadar).

Plasental geli im esnasında, kranunküllerin kotiledon kaynaklı villuslarında ciddi bir azalma meydana gelir, bunu takiben ise plasentomlar yatay olarak geni leme ve geli im sa larlar. Fetusün dı a atımını takiben ise fetal dola ım sonlanır. Villüs kapillerleri kopmaya ba lar, plasentomların boylarında küçülmeler söz konusu olur. Uterus kasılmalarına ba lı olarak da kotiledonlar kranunküllerden ayrılır ve do umu takiben 12 saat içinde yenilenme tamamlanır. Gerçekte, maternal dokudan ciddi bir eksilme söz konusu de ildir. Bu sebeple de ruminant plasentaları genel olarak non-desidual olarak tanımlanır (Karaca T., Yörük M. 2010).

#### **2.1.5. PLASENTAL GEL M**

Ruminantlarda plasenta, koryon ile uterus mukozası arasındaki ili kini derecesine göre yarım (semi) plasenta grubuna girer. Ruminant koryonunda, koryon villusları belli odaklarda topluluk halinde bulunurlar ve bu yapılar kotiledon olarak isimlendirilir. Ruminantlarda uterus mukozası ile koryon arasındaki ili ki yüzeysel oldu u için desidua ekillenmez. Bunun yanında küçük ruminantlarda, uterus epitelinde yer yer erimeler olu tu unda koryon villusları uterus ba dokusu ile kar ılıklı konumludur. Küçük ruminantlarda plasenta, uterus epitelindeki yüzeysel erimeler nedeniyle desiduatlı plasentalar ile adesiduata tipi plasentalar arasında yer alır ve bu nedenle *intermedia* tip plasentadan söz edilebilir. Buna göre büyük ruminantlarda plasenta *epiteliyo-koryal (epithelio-chorial)*, koyun ve keçilerde *sindesmo-koryal (syndesmo-chorial)* plasenta tipi görülür (Karaca T., Yörük M. 2010).

Histolojik olarak sinepiteliokoryal kotiledonata tipi plasenta görülen ruminantlarda, tür içinde de i en sayıda plasentom ta imalarına ra men morfolojik olarak üniform bir yapı gösterirler. Ruminant plasentalarında, binuklear trofoblast hücreleri ile uterus epitel hücrelerinin füzyonu ile fötomaternal sinsityumun ekillenmesi nedeniyle sinepiteliokoryal

olarak adlandırılır (Wooding 1992). Plasentomlar anne ile yavru arasında besin unsurları ile metabolik atıkların de i im alanlarıdır. Fetal villus kümeleri kotiledon, maternal kriptler ise kranunkül olarak adlandırılır. Plasentomların maksimum sayısı türe spesifiktir ve bunu neonatal uterusda bulunan kranunkül sayısı belirlemektedir. Kranunkül ise bezsiz endometriyum alanlarının ekillendirdi i ve bez bulunan bölgelerden tamamen farklı bir damarla ma gösteren uterus olu umları eklindedir. De i ik türlerde plasentom sayısı ve hacmi oldukça de i kenlik göstermekle beraber geyiklerde 4-6 (oldukça büyük yapıda), sı ır 70-142, koyunda 80-100, keçilerde 160-180 adet bulunmaktadır (Wooding, 1997; Wooding ve Flint 1994; Green ve ark., 1998; Wooding 2005).

Koryon villuslarının dı yüzünü trofoblast hücreleri örter. Ruminantda üç farklı trofoblast hücre türü vardır: ki çekirdekli trofoblast hücreleri (%20- binucleate), tek çekirdekli trofoblast hücreleri (%80- uninucleate) ve türe göre de i en oranlarda hibrid fötomaternal sinsitial plak hücreleri (Wooding 1984; 1992; 1997). Koyun ve keçilerde embriyo uterusu tutunmaya ba layınca, özellikle karunkula alanlarında uterus prizmatik epitel hücreleri, a amalı olarak çok çekirdekli dev hücrelere (multinucleated gigant cells) veya sinsitial plaklara dönü ürler (Wooding 1984).

Koyun, keçi ve ineklerde implantasyondan hem sonra maternofetal sinsityum ekillenir. Bu yapı koyun ve keçi plasentomlarında do uma kadar sürmektedir, ama plasentomlar arası bölgelerde ve inek plasentomlarının tamamında maternal yarım epitel hücreleri, bir kısım uterus epitel hücrelerinde köken olarak yenilenirler (Lee ve ark. 1995; Green ve ark. 1998).

### **2.1.6. PLASENTANIN FONKS YONLARI**

Plasentanın fetal kısmı ve fetal membranlar, fetusu uterusun endometriyumundan ayırır. Maternal ve fetal kanın plasentaya do ru akı ı ile besin ve oksijenin de i imi gerçekleştirir. Göbek kordonundaki damarlar, plasental ve fetal dola ımı birbirine ba lar. Plasentanın üç temel fonksiyonu vardır. Bunlar metabolizma, transport, endokrin sentezi ve sekresyonudur.

#### ***Plasental metabolizma***

Plasenta özellikle erken gebelikte glikojen, kolesterol ve ya asitlerini embriyoya besin ve enerji kayna ı sa lamak üzere sentezler. Ruminant plasentalarında trofoektoderm hücreleri gebelikte ili kili glikoproteinler salgılamaktadır. Bu proteinler, aspartik proteinaz ailesine aittirler ve bunların bazıları maternal kanda sirküle oldukları için de i ik gebelik

testlerinin yapılmasını da kolaylaştırır. Moleküler biyolojik araştırmalar göstermiştir ki ruminant genomu, birkaç tane gebelikle ilişkili glikoprotein geni bulundurmaktadır. Gebelikle ilişkili glikoproteinler ilk kez sırtlarda plasental antijen olarak implantasyondan sonra maternal serumunda belirlenmiştir (Karaca T., Yörük M. 2010).

### ***Plasental transport***

Plasenta ve maternal kan arasında her iki yönde madde geçişini plasenta bariyerinin geniş yüzeyi ile kolaylaştırır. Damar yapısı normal biçimindedir. Sürece transport da membranlar arasında normal şekilde gerçekleşir. Plasenta bariyeri gebelik ilerleyen zamanlarında dehidratasyonla birlikte normal şartlarda patojen geçişine izin vermeyen yapısını korur (Vailhé B. ve ark. 1999). Materyaller, plasenta bariyerini dört ana transport mekanizması ile geçer. Bunlar; basit difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, aktif transport ve pinositozdur. Genel olarak plasental taşıma ruminantlarda, insan ve diğer hayvan gruplarında olduğu gibidir. Anatomik olarak, sırt plasentasını, insan plasentasını ile farklılık göstermesine rağmen işlevsel olarak aynı şekilde çalışır. Aynı şekilde immunoglobulin yapıdaki proteinler anneden fetuse geçmez ve enfeksiyonları geçmesini engelleyen plasenta bariyeri etkilidir. Bununla beraber plasental yıkımın başladığı 3. trimesterde bazı patojenlerin bariyeri aştığı görülmektedir. Yine de anneden kaynaklı enfeksiyona bağlı olarak Ig'ler doğan canlı üzerinde bir bariyerlik oluşturmaz. Fetuse geçen patojenler ayet enfeksiyona sebep olursa, bu fetüsün immun sistemi ile etkileşimde olan bir olaydır (Karaca T., Yörük M. 2010).

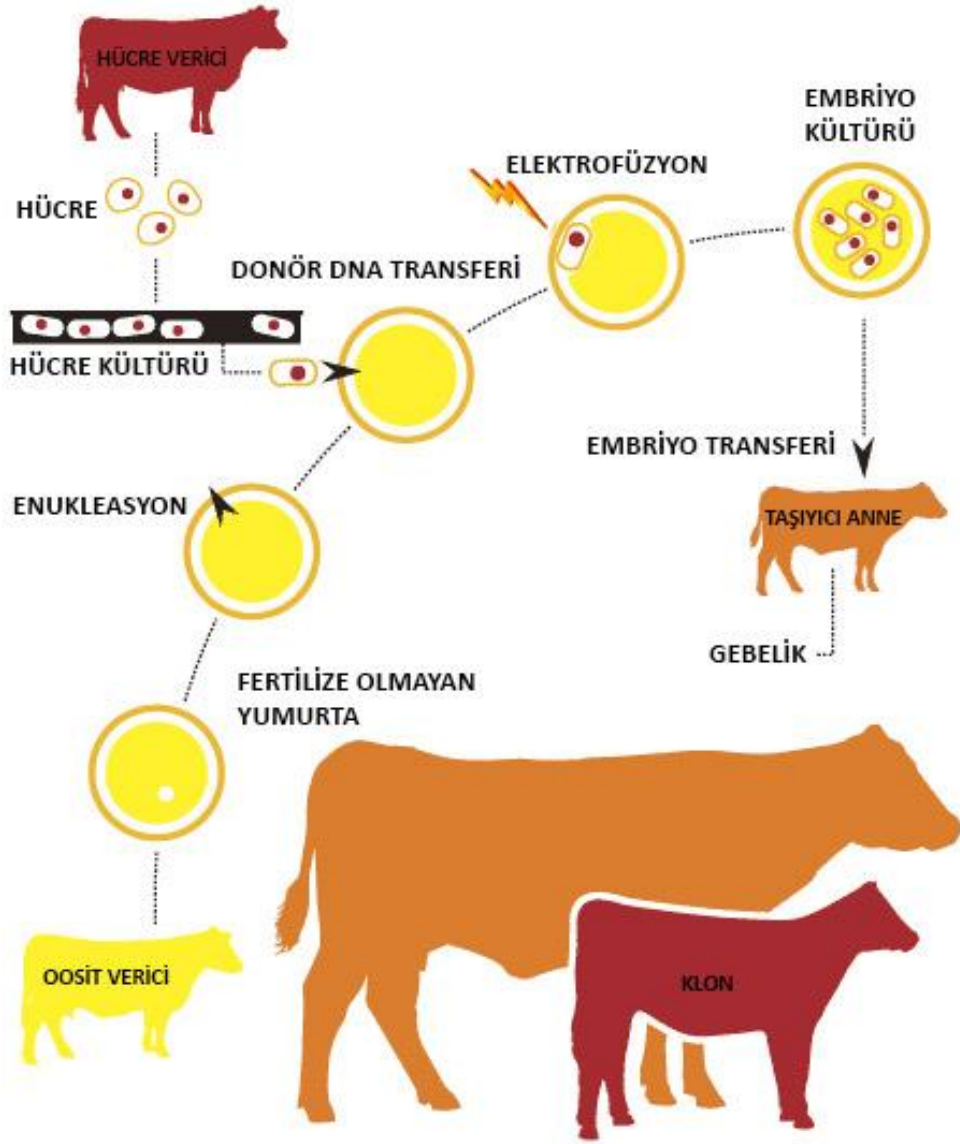
### ***Plasental Endokrin Sentezi ve Sekresyon***

Sinsisyotrofoblast hücreleri protein ve steroid hormonların sentezi gerçekleştirirler. Plasenta tarafından yapılan protein hormonlar; insanda, HCG, HCS/HPL ve HC-ACTH'dir (Uysal, O. 2002). Plasenta aynı zamanda otokrin, parakrin ve endokrin bir organ olarak geniş bir skalaya sahip çok sayıda steroid ve peptid hormon salgılar. Salgılanan bu hormonlar fetoplasental birimin (conceptus) gelişimini ve annenin bu fizyolojik değişime uyumunda destek görevi sağlarlar (Gootwine 2004). Sırt plasentalarının önemli hormonları arasında progesteron ve östrojenler ve plasental laktojenlerdir (Sammin ve ark. 2009). Ruminantlarda gebelik erken dönemlerinde conceptus gelişimi için kaçınılmaz olan progesteron desteğini sağlamak için, luteal regresyonu engelleyen sinyaller gönderir. (Migliano M. A. ve ark. 2007; Karaca T., Yörük M. 2010).

## 2.2. KLONLAMA

Klonlama moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak eysiz üreme yöntemiyle genetik yapısı birbirinin aynı canlıların olu turulması anlamına gelmektedir. Di er bir klonlama rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan DNA klonlama yöntemidir. Ancak bu metinde klonlama canlı kopyalama anlamında kullanılmaktadır.

Somatik hücre nüklear transfer yöntemi (Somatic-cell nuclear transfer - SCNT); ara tırma ya da tedavi gibi amaçlarla embriyo olu turma yöntemidir. Bu yöntem ile elde edilen embriyoların üretim amacı kök hücre ara tırmalarında kullanmak olabilece i gibi tedaviye yönelik olarak olarak insan ya da ba ka bir çok hücreli canlının kök hücrelerini elde etmek amaçlı da olabilir. nsan için yapılan çalı malarda blastosist elde edilmi olmakla birlikte buradan bir kök hücre hattı elde etmeye yönelik çalı malar devam etmektedir. Bununla beraber bu kök hücre çalı maları ve insan klonlama konusu etik tartı malara da açıktır (Gideon G., 2008). 2000'li yılların ba ında *Richard Seed* adlı doktor, ABD'de klonlama klini i açaca ını duyurmu ancak sonra gelen tepkiler üzerine bu çalı mayı tamamlayamamı tır. Bununla beraber insan klonlandı ına dair çokça haber yer almakta ancak organizma klonlama olarak neticelenen bilimsel bir sonuca ula ılamamı tır (Bil-Tek, Science, 2001).

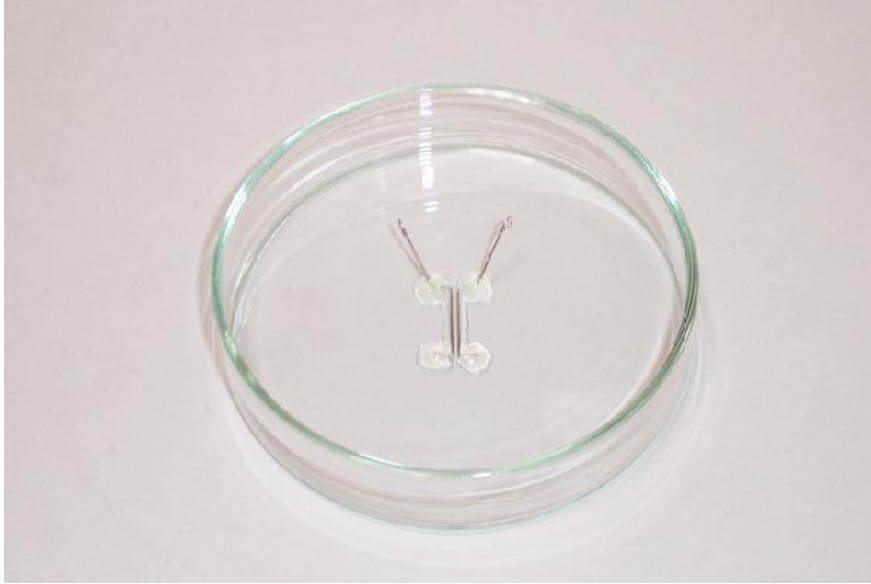


**ekil 2.4.** Klonlamanın tematik gösterimi (mostateag.blogspot.com'dan de i tirilerek)

SCNT, ayrıca tarımsal önem arz eden çiftlik hayvanlarının besin amacına yönelik üretimi için de kullanılabilir. Günümüze kadar olan süreçte koyun, sığırcı, keçi ve domuz, tavuk, kedi, siçan, at, katır, köpek, dağ keçisi ve deve kopyalanabilmektedir. SCNT'nin bir diğer avantajı ise soyu tükenmekte olan hayvanların klonlama ile geri getirilmesine olanak sağlamasıdır (Latham, K. E. 2005). Bu kapsamda dünyadaki ilk örnek gen bankasında iki yıl süre ile saklanmış nesli tehlike altında olan Boz sığırcı ırkının klonlanması olmuştur (Arat, S. ve ark, 2011)

Kato'ya göre nükleer transfere tabi tutulacak olan in vitro mature oositler, maturasyonun 22 - 24. saatinde enukleasyona tabi tutulmalıdır. Bir donör hücre  $150 \text{ Vmm}^{-1}$  ve  $25 \mu\text{s}$  olacak

ekilde Zimmerman solüsyonunda füzyona tabi tutulmu tur. Gönderilen palsler füzyon olana kadar arası 15 dk. olacak ekilde gönderilmi tir. Füzyona u rayan oositler, tekrar 20  $\mu$ s ve 20  $Vmm^{-1}$  olacak ekilde aktivasyona tabi tutulmu tur. 10  $\mu$ g cycloheximide içeren medyumda 5-6 saat boyunca tutulmu ve cycloheximide içermeyen medyumda kültüre edilmi lerdir (Kato Y., Tani T. ve TsunodaY. (2000).



**ekil 2.5.** Elektrofüzyon petrisi ve elektrodlar

Gerek insanda gerekse de hayvanlarda klonlamanın tarihine de inildi inde; ilk klonlanan canlı bir kurba a iriba ıdır. Çalı ma Robert Briggs ve Thomas J. King tarafından ba arılı bir ekilde 1959 yılında gerçekte tirilmi tir (Briggs R.W.; 1959 - 2012).1996 yılında klonlanan Dolly, SCNT ile ortaya çıkartılan ilk memeli canlıdır (Chambell K.H., 1996). Daha sonraki yıllarda çe itli memeliler de dahil olmak üzere birçok canlı klonlanmı tur.

### **2.2.1.KLONLAMANNIN KULLANIM ALANLARI**

Klonlama tekni i hayvancılıkta belli verime ula maya yönelik hayvan ıslahı, hastalık dirençli bireylerin populasyonda ço altımı, verimli olan çiftlik hayvanlarından üreyemeyecek durumda olanların elde edilmesi gibi amaçlarla kullanıldı ı gibi, sa lık alanında çe itli tedavilere yönelik kök hücre eldesi, organ nakline yönelik ba ka organizmalar üzerinde yapay organ geli tirilmesi ve transgenik organizma olu turmak suretiyle hastalık modelleme çalı malarının yapılması biçiminde uygulama alanları bulmaktadır (Arat S., 2004; Paterson, L., 2003).

### ***Hayvancılık Alanında Klonlama***

Tarımsal açıdan önem arz eden çiftlik hayvanlarının kalitesi insan ya am kalitesini ve ekonomik parametreleri doğrudan etkileyen bir faktördür. Çiftlik hayvanları besin verimleri, et kalitesi, süt miktarı ve kalitesi, yavrulama özellikleri gibi faktörlerce değerlendirilir. Günümüz nüfus artışı nedeniyle az tüketerek yüksek verim sağlayan kaynaklara ihtiyaç vardır ve çiftlik hayvanları da bu şekilde değerlendirilebilir. Bu nedenle yüksek verim özelliklerine sahip, hastalık direnci bulunan hayvanların korunması ya da üretilmesine yönelik olarak; ayrıca yakın türler arasında soyu tükenmekte olan canlıların kurtarılmasına yönelik olarak da klonlama teknolojisi kullanılmaktadır (Wolf E. ve ark, 1998; Lanza R.P.ve ark, 2000). Bu gibi çalışmalarda klonlanacak canlının hücresi ya ayan bireyden alınabileceği gibi aynı zamanda dondurulmuş materyal kullanılarak da bu çalışma gerçekleştirilebilir (Dobrinsky J.R., 2002).

### ***Sağlık Alanında Klonlama***

Diğer yandan biyomedikal araştırma amacı ile SCNT tekniğinin kullanılması rejeneratif tıp (doku ve organların yenilenmesine yönelik) kavramını geliştirme ve Alzheimer, Parkinson gibi hücrelerin dejenerasyonuna bağlı olarak gelişen hastalıklar için yeni bir tedavi yaklaşımı ortaya çıkmıştır. SCNT ile elde edilen 5-7 günlük embriyoların blastosist evresinde fetal dokuyu oluşturacak olan iç hücre kütleleri (inner cell mass) izole edilerek laboratuvar şartlarında uygun büyüme faktörleri ile desteklenerek pluripotent embriyonik kök hücre hatları elde edilmektedir. Bu hücreler şu anda hala araştırma evresinde olan belli faktörler aracılığıyla çeşitli dokulara farklılaşma kapasitesine sahiptirler ve hastalara transplante edilebilme potansiyeline sahip hücre kaynaklarını oluştururlar. Tedavi amaçlı klonlama olarak tanımlanan bu işlemlerin hedefi embriyonik kök hücre eldesidir (Arat S ve ark. 2011; Özsunay E. ve ark. 2005).

Ayrıca hastalıkların tedavi edilebilmesi amacıyla protein üretimi, karmaşık dizilimleri ve yapılanmaları nedeniyle oldukça zordur. Tıbbi açıdan önemli bir proteini kodlayan geni, bir hayvanın genomuna yerleştirmek ve ürüne dönüp dönmediğini görmek günümüzde mümkündür (Bağcı H., 2007).



## **2.3. NORMAL VE KLON PLASENTA ARASINDAKİ FARKLAR**

### **2.3.1. FÖTAL MEMBRANLAR VE YAPILARDAKİ FARKLILIKLAR**

Makroskobik olarak fetal membranlar genel olarak ödemli ve jelatinimsi bir görünümüne sahip olabilmektedirler. Plasentanın fetal kısmından itibaren anlaşılmaması güç biçimde ödem geli tirebilmektedir. Septum ve koryon arasında laküna oluştuğundan anne kanının birikmesi neticesinde hematomik yapılar da görülebilmektedir. Bu bölgelere mikroskobik olarak bakıldığında ise bazı eritrositlerin hemolize oldukları saptanmıştır. Ayrıca histolojik kesitlerde kan çıkışı görülen kısımların genellikle inter-kotiledon alanlarında olduğu belirlenmiştir.

Normal, IVF ve SCNT plasentalarda plasentom büyüklükleri de farklılık arz edebilir. SCNT ve normal plasentalarda iki büyük farklılık göze çarpar, genellikle SCNT plasentaların kotiledonları ve plasentomları daha kalındır. Buna ek olarak boyu çok küçük, yaklaşık 1 cm'den az kotiledon yapılarına da rastlanır (Miglino, 2007).

### **2.3.2. DAMAR YAPILANMASINDAKİ FARKLAR**

SCNT plasentalarındaki kranünküllerin daha geni olması ek olarak, bunların oluştuğu kriptler de normal plasentalardan daha geniştir. Bu genel yapılanma sebebiyle de plasenta gelişimi ve yerleşimi normalden farklı görünmektedir. Bir kript yapısı içinde bir dallanma gösteren villus ve iki ya da daha fazla fetal villus içermektedir. Bunun ilk trimester düzeyleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada düşükle sonuçlanan gebeliklerde plasenta yapısının bu şekilde olduğu, ancak gebeliğin sürdüğü (en azından 3. trimester'e kadar) gebeliklerde ise SCNT ve normal plasentalar arasındaki farkın daha az olduğu saptanmıştır (Miglino, 2007).

### **2.3.3. HISTOLOJİK DEĞİŞİMLER**

Plasentalarda yapılan incelemelere göre maternal - fetal geçişi sağlayan yapılarda bir fark gözlenmemiştir. Her iki plasenta yapısında da besin maddelerini ve gazların geçişini sağlayacak geni bir alan mevcuttur. Bununla beraber (Constant, 2006) bir çalışmada maternal epitelin daha ince olduğu gösterilmiştir. Ancak karlı olarak koyun plasentasında villüs damarlanmasında ve trofoblastların hipoplazisi düşükle sonuçlanan gebeliklerde görülmektedir (Loi, 2006; Palmieri 2006).

## 2.4. PLASENTA GELİMİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER

### 2.4.1. IGF (İNSÜLİN BENZER BÜYÜME FAKTÖRÜ)

IGF'ler tek zincirli polipeptidlerdir. IGF-I, 70 aminoasit içeren bazık bir peptiddir, molekül a ırlı ı 7649 kD'dur. IGF-II ise 67 aminoasit içeren hafifçe asidik bir peptiddir, molekül a ırlı ı 7471 kD'dur. Her iki IGF molekülü proinsülin'e benzer olarak A ve B zincirlerine sahiptirler ve bu zincirler birbirlerine C peptidi adı verilen disülfid ba ılarıyla ba ılıdır. IGF-I ve IGF-II'nin aminoasit dizilimleri sırasıyla %43 ve %41 oranında proinsülin ile homoloji gösterirler. Proinsülininden farklı olarak IGF'ler karboksi terminalinde D bölgesi içermektedir. Proinsüline olan bu yapısal benzerlik her iki IGF molekülünün insülin reseptörlerine dü ık affinite ile ba ılanmasını açıklar. Di er yandan yapısal farklılıklar insülinin IGF ba ılayan proteinlere ba ılanmasını önler.

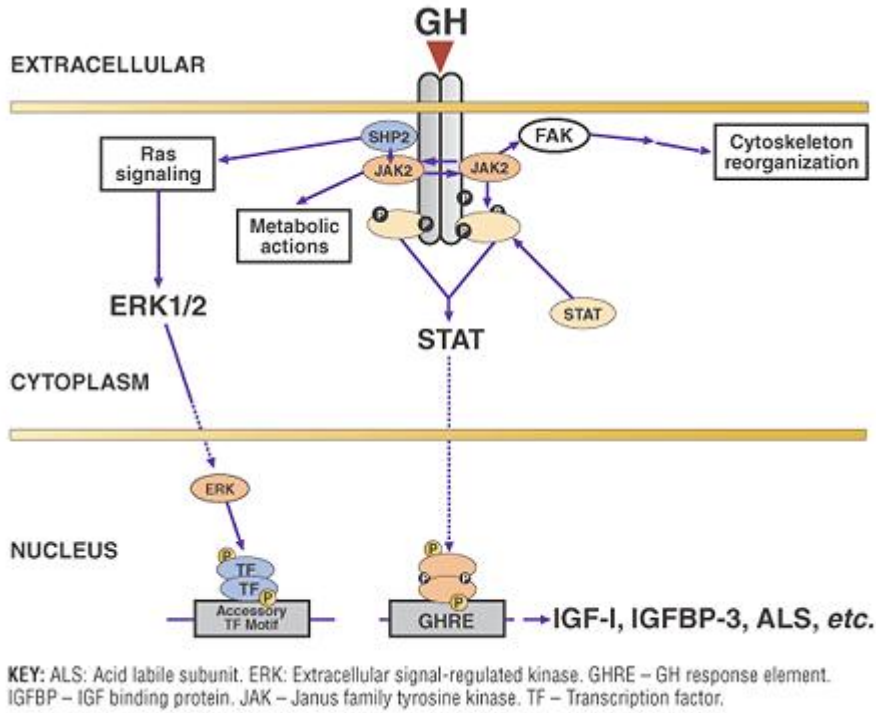
Gebelik döneminde, 9. haftadan itibaren birçok fetal dokuda IGF-1 saptanmı ır . Fetal IGF düzeyleri gebelik boyunca artar ve termde erken gebelik düzeylerinin 2 katına çıkar. Erken gebelikte IGF konsantrasyonları ekstraembriyonik bo lukta ve amniotik sıvıda maternal serumdan belirgin ölçüde yüksektir. Bu fetal membranlarında IGF-1'i sentez ederek fetal büyümeyi etkiledikleri iddiasını ortaya çıkartmı ır. İkinci trimesterde fütusta karaci er, böbrek, akci er, kalp, dü z ve çizgili kaslarda yüksek oranda IGF-1 ve IGF-2 bulunmu tur . Lokal sentez hipotezi dokularda yaygın olarak IGF-1 ve IGF-2'nin mRNA'sının bulunmasıyla desteklenmi tir. Maternal sirkulasyondaki IGF fetal dola ıma geçmez. Maternal ve fetal IGF üretimlerinin ayrı ayrı yapıldı ı gösterilmi tir (Kele , 2005).

#### *IGF Reseptörleri*

IGF'ler protein yapıda olduklarından hücre membranını geçememekte ve etkilerini membrandaki reseptörlerine ba ılanarak yapmaktadırlar. Bu konuda yapılan çalı malarda üç farklı IGF reseptörü tanımlanmı olup, bunlar insülin reseptörü, tip I IGF reseptörü (IGF-I reseptörü), tip II IGF reseptörüdür (IGF-II reseptörü); IGF-I Reseptörü: IGF-I reseptörü, hücre dı ı iki alfa ünitesi ve iki transmembran beta ünitesi içeren bir glikopeptiddir. Alfa ve beta subüniteleri disülfid ba ılarıyla birbirine ba ılanmı ır. Yapısal ve fonksiyonel olarak insülin reseptörüne benzer. Bu reseptörler benzer ligandları spesifik olarak ba ılar. IGF-I reseptörü IGF-I'i insüline göre yüz kat daha fazla affinite ile ba ılar. IGF-I reseptörü, tirozin kinaz ailesine ait olup insülin reseptörüne benzer. Alfa subünit bütünüyle hücre dı ındadır. Beta subünit ise membran üzerine yerle mi bir protein olup sitoplazmik bölgesinde bir tirozin

kinaz ilmi i ihtiva eder. IGF-I'in IGF-I reseptörünün alfa sübünitine ba lanmasını takiben beta sübünitinin otofosforilas-yonu meydana gelir. Otofosforilasyon, reseptörün tirozin kinaz aktivitesini artırır. Bu aktivasyon endojen substratlarda oldu u gibi reseptör üzerindeki di er önemli tirozinlerin fosforilasyonuna neden olur. IGF-I reseptörü, IGF-II'den daha yüksek bir affinite ile IGF-I'i ba lar. Gerçekte IGF-I ve IGF-II'ye kar ı büyüme yanıtının ço una IGF-II reseptöründen daha çok IGF-I reseptörü aracılık eder. IGF-II Reseptörü: IGF-II reseptörü, tek zincirli bir polipeptiddir. Ekstrasellüler olarak yerle en uzunlamasına devam eden zinciri takiben kısa bir transmembran zincire sahiptir. IGF-II reseptörü intrinsek tirozin kinaz aktivitesinden yoksundur. Lizozomal enzim trafi ini düzenleyen katyon ba ımsız mannoz 6-fosfat reseptörüyle çok benzer oldu undan IGF-II mannoz 6-fosfat (M6P) reseptörü olarak da bilinir. IGF-II reseptörü, IGF alım ve yıkımına aracılık eder. IGF-II reseptörü aynı zamanda IGF-II'ye ba lanarak hücre yüzeyinden IGF-II'yi hücre içerisine sokar ve sonuçta IGF-II'nin lizozomlarda yıkımına neden olur. IGF-II reseptörü, IGF-II'yi IGF-I'den yüz kat daha fazla affiniteyle ba lar. nsülin, insülin reseptörlerini aktive ederken her iki IGF molekülü, IGF-I reseptörünü aktive edebilir. IGF-II üçüncü bir reseptör olan IGF-II reseptörüne ba lanırsa da hücre içi aktivasyonu bilinmemektedir.

### ***IGF Ba layıcı Proteinler (IGF-BP)***



**ekil 2.6.** Büyüme hormonu, ALS ve IGF ili kisi (www.healio.com'dan)

IGF'ler plazmada ba layıcı proteinlerle ta ınır. Bugüne kadar 6 IGF ba layıcı protein tanımlanmıştır. IGFBP'ler birçok yönüyle IGF klirensini düzenlerler. Dola ımdaki serbest IGF'nin yarı ömrü 30 dakika iken IGFBP'ler bunu 12-15 saate kadar uzatırlar. IGF'lerin akut etkilerinin ortaya çıkmasını önlerler. Kapiller bariyerlerde transport proteini olarak görev yaparlar. IGF'lerin reseptörlerine prezentasyonlarını önlerler. Bunun yanısıra spesifik reseptörler aracılığı ile IGF'lerden ba ımsız olarak spesifik etkilerini olu tururlar.

IGFBP-3: IGFBP-3, IGFBP'lerin en önemli olanıdır. IGFBP'lerin %75'ini IGFBP-3 olu turur. Dola ımda bulunan IGF'lerin %70 ila %90'ın transportunu IGFBP-3 sa lar. IGF ve "acid labile subünit (ALS)" ile 150 kiloDaltonluk bir kompleks olu turur. IGFBP-3 aynı zamanda potansiyel bir hücre büyüme inhibitörüdür. Çe itli hücre kültürlerinde IGFBP-3'ün IGF olmadan DNA sentezini inhibe etti i gösterilmiştir. IGFBP-3'ün antiproliferatif etkisinin p53 tümör süpresör geni aracılığıyla kontrol edildi i öne sürülmektedir. p53 etkisi ile IGFBP-3 ekspresyonunun indüklenmesi IGF-I'nin mitojenik etkisinin inhibisyonuna yol açmaktadır.

### ***IGF'nin Fizyolojisi ve Etkileri:***

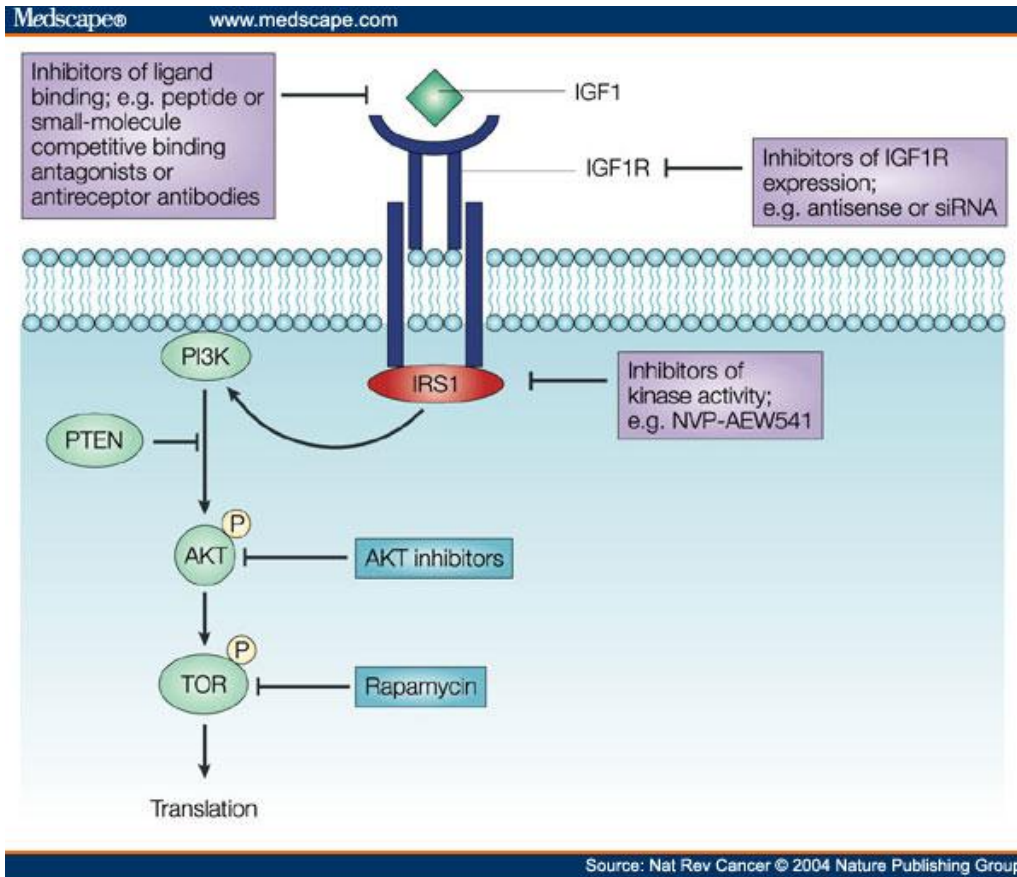
İnsülin, primer olarak karaci er, kas ve ya dokusunda etki gösterirken, IGF'ler hemen hemen tüm organların fonksiyonlarında etkilidirler. IGF'lerin her ikisi de embriyolojik gelişimede önemli bir rol oynarlar ve nanomolar konsantrasyonları erişkin yaşamı boyunca da devam ettirilir. Bununla birlikte doğum sonrası IGF-II'nin fizyolojik rolü tam olarak bilinmezken, IGF-I büyümenin düzenlenmesinde önemli rol oynar.

Gerek insülin gerekse IGF-I reseptörünün uyarılması hücre içinde aynı ilk uyarıyı ba latır. Bununla birlikte, insülin metabolik fonksiyonları düzenlerken, IGF'ler büyüme ve farklılaşma fonksiyonlarında rol alırlar. Muhtemelen hücre içinde bu hormonların uyarıcı yolları farklıdır. IGF-II, IGF-II reseptörüne ba lanırsa da hücre içi aktivasyonu bilinmemektedir. IGF'ler in vitro etkisini ya akut olarak protein ve karbonhidrat metabolizması üzerine anabolik etkisiyle veya uzun dönemde hücre ço alması ile farklılaşması üzerine yapar. Hücre siklusunda DNA sentez ve hücre replikasyonunu uarması çok önemli bir etkidir. Sessiz fibroblastların G<sub>0</sub> fazından G<sub>2</sub> fazına girmeleri için IGF-I molekülüne gerek vardır. IGF-I'nin hücre siklusunun G<sub>1</sub> ile S fazı arasında etkili oldu u ve bunu IGF-I reseptörü ile yaptı ı, hücre "turnover"ını artırmak suretiyle hücresel biçim de i tirmeye riskini artırdığı gösterilmiştir. IGF'ler ve ba layıcı proteinler aynı zamanda birçok dokuda lokal olarak üretilerek otokrin ve parakrin etki gösterirler. IGFBP'lerin temel yapım

yeri karaci erdir. IGFBP'lerin karaci er haricinde di er birçok organda yapılıp sentez edildi i bilinmektedir. IGFBP-1 karaci er ve endometriyumda, IGFBP-2 merkezi sinir sistemi ve prostatta, IGFBP-3 karaci er ve birçok dokuda, IGFBP-4 merkezi sinir sistemi ve kemikte, IGFBP-5 böbrekte, IGFBP-6 prostat ve yumurtalıkta sentez edilir.

nsülin ba ta olmak üzere IGF-I'ler esas olarak karaci erde sentezlenir. Büyüme hormonunun kendi hepatik reseptörü ile ili kiye girmesi IGF-I geninin ekspresyonunu uyarmakta ve IGF-I peptidinin salınımına neden olmaktadır. Karaci erin IGF-II sentezini nasıl regüle etti i halen bilinmemektedir. nsülin ba ta olmak üzere tiroksin, gonodotropinler, seks steroidleri ve paratiroid hormon, çe itli dokularda IGF-I üretimini uyarmaktadır (Saltan, 2008).

### Sinyal Yolakları



**ekil 2.7.** IGF Temel mekanizması; IGF-I, küçük bazı homolog peptidler ve/veya reseptör afinitesi bazı moleküller gibi inhibitörlerin varlı ında, IGF-IR üzerine ba lanamayabilir.

(www.medscape.com'dan)

insülin tarafından aktive edilen endojen formulu protein kinaz (RAC/Akt kinaz) IGF-I ve IGF-IR/BP reseptörü otofosforilasyonla hücre içine hareket ederler. IRS'ler (insülin reseptör substratları) tirozin fosforilasyonu sonucu aktive olup ba lama bölgeleri olan çok fonksiyonlu proteinlerdir. IRS proteinlerinin Pleckstrin homoloji (PH) ve fosfotirozin ba layıcı (PTB) gibi birçok fonksiyonel bölgesi vardır. PI (fosfatidilinozitol) 3-kinaz, IRS proteinleriyle etkile ime girerek düzenlenir. Bu enzim insülin duyarlı dokularda glukoz transportunu sa layan GLUT-4'ün uyarılması için gereklidir fakat yeterli de ildir. PI 3-kinaz, 3,4,5-fosfoinozitol olu umunu sa lar ve bu da bir grup PIP3 (fosfatidilinozitol-3,4,5 trifosfat) ba ımlı serin-threonin kinazları aktive eder. Serin-threoninkinazlar içinde PI-ba lı protein kinaz 1 ve 2 gibi bir grup enzim vardır. Bu enzimler Akt,glukokortikoid tarafından indüklenen kinazları, protein kinaz C'yi, insülin tarafından uyarılan serin kinazları ve di erlerini aktive eder (Harbili S., 2008; Alessi D., 1996).

#### **2.4.2. VEGF (VASKÜLER-ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ)**

VEGF, Vasküler-endotelyal büyüme faktörü damarlanmayı uyanan bir sinyal proteindir. Bununla birlikte oksijenin dokulara yayılımında da endikedir. VEGF, büyüme faktörü olarak tanımlanan ailenin bir üyesidir ve gerek plasentada gerekse de embriyonik geli im esnasındaki damarlanmada görevi bulunmaktadır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süperaillesinin üyesi olan Vasküler Endotel Büyüme Faktörü ailesi, endotel hücreleri için özgüldür ve önemli etkileri vardır. VEGF ayrıca, tümör büyümesi ve yayılmasını da içeren patolojik bir çok hastalı ın etiolojisinde yer alır. Bu yüzden 1980'lerde ke fedildi inden günümüze kadar gittikçe artan bir ilgiyle ara tırılmaktadır (Claesson-Welsh, 2008).

En önemli üyesi VEGF-A olmakla birlikte altı üyesi (PIGF ile yedi) vardır: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü. VEGF-A Human-VEGF olarak da isimlendirilir. Hatta bazı yayınlarda sadece VEGF olarak da adlandırılmaktadır. VEGF-A'nın geni kromozom 6p21.3'teki lokalizasyonda kodlanmı tır. VEGF vücutta; ovaryum follikülleri, korpus luteum, akci er alveolar hücreleri, renal glomerül visseral epitel hücreleri, böbrek proksimal tübül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, Leydig hücreleri, aktive makrofajlar, arteriollerini çevreleyen fibroblastlar, bron iyal ve koroid pleksus epitel hücreleri, hepatositler gibi yerlerde sentezlenir (Yazır, 2004).

### ***VEGF Üyeleri ve Yapısı***

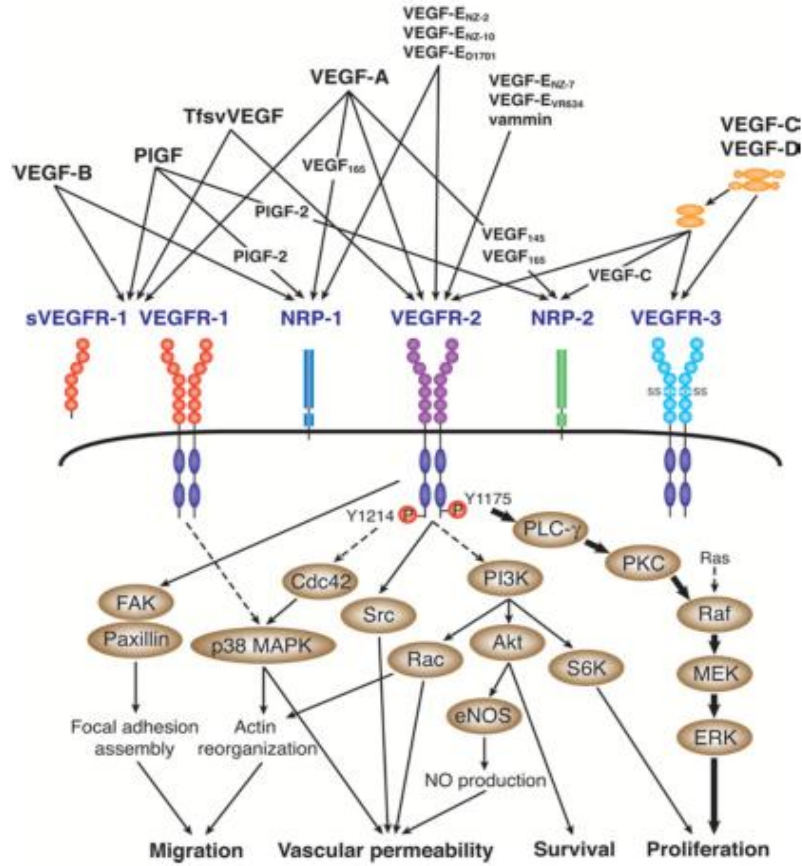
Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. Vasküler permeabilite faktörü olarak da bilinir ve permeabiliteyi artırıcı etkisi açısından histaminden 10.000 kat daha potenttir. 34-42 kDa a ırlı ıda,heparine ba lanan dimerik bir glikoproteindir. Endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve diferansiasyonuna sebep olur. VEGF, hem geli im sırasında, hem de yeti kinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir.

VEGF ailesi ilk ke fedildi inde, kobay derisinde vasküler sızıntı ba lattı için, vasküler permeabilite faktörü olarak isimlendirilmi tir. VEGF ailesi,VEGF-A (Human VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve Plasenta büyüme faktörü (PIGF) olmak üzere 7 üyeden olu ur.

### ***VEGF Reseptörleri***

VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk1/KDR)ve VEGFR-3 (flt-4) olarak sıralanabilir. VEGFR-1 ve VEGFR-2 endotel hücreleri üzerinde bulunurken, VEGFR-3 lenf damarları üzerinde bulunur. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu birçok hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiasyonunu sa lar. VEGFR-1, anjiogenez sırasında ve hipoksi varlı nda upregule olur. VEGFR-2, VEGF'nin anjiogenez ve mikrovasküler permeabilite ile ilgili etkilerine, ayrıca endotel hücrelerinin proliferasyon, invazyon, migrasyon ve hayatta kalmalarına aracılık eder. VEGFR-3'ün ekspresyonu ise, ba langıçta embriyonik damarlanma sırasında olurken, maturasyondan sonra lenfatik endotel hücrelerinde sınırlı kalır, VEGFR-3'ün mutasyonları her lenfödemli olan vakalarda tespit edilmi tir. VEGFR-3, VEGF-C ve VEGF-D'yi ba lar ve bu reseptörün aktivasyonu ve up-regulasyonu melanom ve meme kanseri gibi bazı neoplazilerde tespit edilmi tir, ayrıca VEGF-C ve VEGF-D'nin artımı seviyeleri lenf nodu metastazı ile ili kili bulunmu tur. Neuropilin-1 (NRP-1) ve Neuropilin-2 (NRP-2) isimli hücre yüzey glikoproteinleri de VEGF için ko-reseptör görevi yaparlar (Karkan, 2006).

## Sinyal Yolakları



**ekil 2.8.** VEGF ailesi üyeleri, reseptörleri, yolları ve sonuçları (Hücre göçü, damar geçirgenliği, ya da am fonksiyonları, proliferasyon (Takahashi'den)

VEGFA'nın da afinite gösterdiği VEGFR-2, üzerinde Tyr21175 ve Tyr1214 kodlu iki önemli otofosforilasyon bölgesi içermektedir. PLC- $\gamma$ , Y1175'e ba lanarak proteininin, fosforile olarak aktivasyonunu sa lar. Y1214 burada CDC42 ve p38 MAPK'nın tetikleme mekanizmasında görev alır. VEGFR-2 tarafından aktive edilen proteinlerin bazılarının (FAK, PI3K ve SRC'nin mekanizmaları tam olarak çözülemedi tir. Bununla birlikte aktive olan proteinler ba ta damar yapılanması olmak üzere, proliferasyon, hücre göçü gibi mekanizmaları uyarılmaktadırlar (Takahashi H., 2005).

### 2.4.3. NCAM (NÖRONAL HÜCRE ADHEZYON MOLEKÜLÜ)

NCAM, hücre adhezyon moleküllerinin immünoglobülin süperailisi yapısal olarak immünoglobülin proteinleri ile yakın ili ki içinde olan homofilik bir hücre-hücre adhezyon molekülüdür. Günümüzde yapılan ara tırmalarda ise NCAM için yeni bazı mekanizmalar

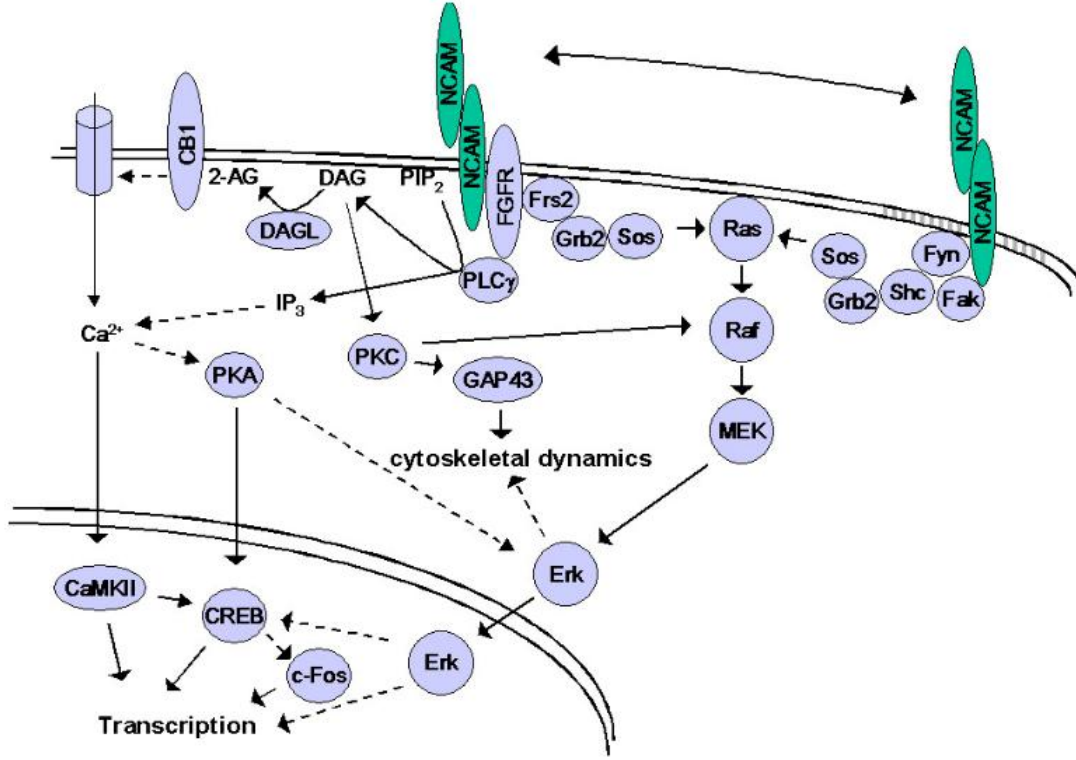


gündeme gelmiştir. CAM ailesi, NCAM ve NgCAM'i içeren yüzün üzerinde üyeye sahiptir. NCAM (CD56) ve NgCAM kalsiyumdan bağımsız adhezyon molekülleridir. İlk hücre adhezyon molekülü olması ile karakterize olan NCAM, gelişimin çok erken evrelerinde tüm nöronlar tarafından ve aynı zamanda glia, iskelet kası ve doku katıl hücrelerinden (NK) de ifade edilir. Komşu hücreler üzerine homofilik olarak bağlanırlar ve nöral gelişim boyunca çok çeşitli fonksiyonları mevcuttur. Bu önemli fonksiyonlarından biri, nöral doku büyüme esnasında gelişmekte olan nöritleri bir arada tutmak ve nöral bağlantıları sağlamaktır. Gelişim ve plastisite sürecinde NCAM'ın adheziv özellikleri, regüle karbonhidrat ve polisialik asit (PSA) varlığında düzenlenir. Moleküle PSA'nın posttranslasyonel olarak eklenmesinin (NCAM-PSA), öğrenme ve hafıza fonksiyonu sürecinde sinaptik plastisiteye ve sinir rejenerasyonu mekanizmasına yol açtığı düşünülmektedir.

NCAM'ın akson doku büyümesini, fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) ve p59Fyn iletim yolu üzerinden etkilediği düşünülmektedir. Anatomik patolojide, patologlar CD56 (NCAM)'yı belli tümörleri tanımak için immünohistokimya kullanırlar. CD56 ile pozitif boyanan normal hücreler arasında NK (natural killer) hücreleri, aktive T hücreleri, beyin, serebellum ve nöroendokrin dokular bulunur. CD56 pozitif tümörler: Myelom, myeloid lösemi, nöroendokrin tümörler, Wilms tümörü, erişkin nöroblastom, NK/T hücre lenfomaları, pankreatik asiner hücre karsinomu, feokromatisma ve küçük hücreli akciğer karsinomudur. NCAM ayrıca deneysel antibiyotik temelli immünoterapide hedef molekül olarak da kullanılmaktadır.

### ***Sinyal mekanizması ve yolları***

NCAM, her ne kadar homofilik yapıda tanımlanmış olsa da, hem heterofilik, hem de homofilik karakterdeki bağlanmalarda iştir araçlarına (etkiletilmelerine) duyarlı olan sinyal taşıma özelliğinin de olduğu saptanan bir molekül olduğu belirlenmiştir. Yani heterofilik ya da homofilik bağlanma gerçekleşmesi durumunda (hücre-hücre duvar teması) NCAM, sinyal olarak hücre iletiminde görev almaktadır. Nöral yapıların gelişimi esnasında olduğu gibi gelişmekte olan diğer dokularda da bu molekülün hücreden hücreye sinyal iletilmede görev aldığı gösterilmiştir.



ekil 2.9. NCAM ba lanması ve sinyal iletimi (Hinsby'den)

NCAM aracılı sinyal iletiminde örnek olarak akson geli imi gösterilmi tir ( ekil 2.9.). NCAM'in kar ılıklı olarak ba lanması neticesinde IGF ve VEGF ailelerindeki gibi tirozin-kinaz aracılı sinyal iletimi söz konusu olmaktadır. Tirozin kinaz lipid temelli yapılar ve FGFR ile etkile mekte ve bu sayede NCAM tersinir olarak hücre iskeleti, dolayısıyla akson üretimini sa layacak transkripsiyon faaliyetini ba lattı ı gösterilmi tir. Bu iletim mekanizmasında da yine açıklanmamı moleküler mekanizmalar ve proteinler bulunmaktadır (Hinsby A.M. ve ark., 2004).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

Histolojik çalışmalar için materyal temini farklı ekollerde yapılmıştır. Klon plasentalar için doğumu takiben plaseenta atılımıyla birlikte materyal temiz bir biçimde alınmış ve plasentom birimlerine dikkat edilerek, ayrıca fetal ve maternal zarlardan da kesitler alınarak formaldehid ve PFA'da fikse edilmişlerdir. Buna ek olarak iki ayrı Holshtein ırkına ait normal doğum plasentaları Tekirdağ Muratlı'da bulunan Aksa Çiftliği'nden bütün halinde soğutulmuş olarak temin edilmiş ve İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Avcılar'da fikse edilerek laboratuara ulaştırılmıştır. Alınan iki örnekten 59457199 kulak küpe numarasına sahip olan birey 1. laktasyonda ve yaklaşık 2 yaşındadır (735 gün/yaş); diğeri 569600 kulak küpe numarasına sahip olan birey ise yine 1. laktasyonda ve yaklaşık 2,5 yaşındadır.

Klonlama çalışmasında 5 saatlik doğum gerçekleşmiştir, ancak SCNT sonrası senkronize ineklere birden fazla blastosist transfer edilmesi neticesinde biri ikiz gebelik olacak şekilde toplam 5 doğum (sezeryan) gerçekleşmiş ve 5 adet klon plaseenta örneği bulunmaktadır. Her klon plaseenta tek taşıyıcı anne üzerinde gelişmiştir. Klon plaseenta örnekleri bahsedildiği üzere doğumu takiben atım gerçekleştiği anda alınıp, kesilerek fikse edilecek hale gelmiştir. Ek olarak normal doğumlardan elde edilen plasentalarda mevcut hallerde umbilikal kord da alınmış ancak bu çalışma mayaya dahil edilmemiştir.

Canlı birey ile sonuçlanan doğumlardan ayrı olarak gebeliğin sonlandırılması gereken durumda olan 2 bireye ait plasentalar da sadece histolojik analizlerde kullanılmak üzere alınmıştır. Bu örnekler çalışmada dahilinde Klon 1 ve Klon 2 olarak adlandırılmıştır. Canlı doğum ile sonlanmayan mummifiye örnekten ise herhangi bir örnekleme yapılmamıştır.

#### 3.1.2. PREPARAT HAZIRLAMA VE KESİT ALMA

Tüm fikse edilmiş materyaller Kocaeli Üniversitesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji Laboratuvarı'nda mikrotomda 5 µm kalınlığında kesilmiştir. Ancak bazı zar yapılarındaki bozulmayı engellemek ve dokunun ıslak geçirgenliğini de göz önüne alınarak kesit kalınlığı 10 µm'ye kadar çıkartılmıştır.

Kesitler klasik parafine gömme biçiminde kesit almaya hazır hale getirilmişlerdir. Dokuların mikrotom yardımıyla birkaç mikron kalınlığında kesilebilmesi, dokunun sertolması halinde mümkün olmaktadır. Bu amaçla öncelikle doku içindeki suyun alınıp su yerine

alkolün geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra alkol alınıp yerine ksilol ve en son olarak ksilol alınıp yerine parafin geçirilmiştir, her bir basamakta tutma süresi doku türüne göre belirlenmiştir. Zar yapılarında 30 dk, diğer yapılarında ise 1 saat her bir amaç için uygulanmıştır.

Doku öncelikle PFA veya formaldehid'den arındırılmak üzere açme suyu altında yıkanmıştır. Yıkanmayı takiben dokudan suyun uzaklaştırılması için alkol serilerinden geçirilmiştir. Başlangıç serisi %70 etil alkol olmak üzere, sırasıyla %80, %90 ve absöü alkol ile birer saat muamele edilmiştir. Dehidrasyon (dehidratasyon) işleminden sonra dokunun saydamlaştırılması için, dokulara alkol - ksilol çiftleri ile alkolden ksilole seri halde işlem yapılmıştır. İlk etapta alkol ve ksilol yüzdeleri eşit olacak şekilde yaklaşık 1 saat muamele edilen dokular, ikinci amaçta %100 ksilol içine alınmıştır. Yüksek alkolde başlı bulanma söz konusu ise ksilol deşitirilerek işlem tekrarlanmıştır. Dokuya ksilol giriş sağlandıktan sonra 60°C'lik etüv içinde birinci amaçta %50 - %50 (hacmen) ksilol - parafin solüsyonunda, bir saat beklemeden sonra ise tamamen parafinizasyon için %100 parafinle dokular muamele edilmiştir. Sıcaklık etkisi ile ksilol ortamdan uzaklaştırarak dokuya parafinin nüfuz etmesi sağlanmıştır.

Dokunun parafine gömülmesi için doku ve blok yaklaşık 60°C olacak şekilde önce bir miktar parafin blok kalıbı içine dökülmüştür, daha sonra doku uygun şekilde yerleştirilmiştir. İşlem bittikten sonra doku oda sıcaklığına inene kadar dışarıda bekletilmiştir, soğumanın tamamlanmasından sonra buzdolabına yerleştirilmiştir. Kesit alınma işlemine kadar ise oda sıcaklığının altında (yaklaşık 16°C'de) muhafaza edilmiştir. Bu işlemlerin tümü hem histolojik, hem de immunositokimyasal boyamalar için aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **3.1.3.H STOLOJİK BOYAMALAR**

Parafin bloklar içindeki dokudan kesit alınmasını kolaylaştırmak için bloklar kesilmeye başlanmadan önce yaklaşık 15 dk kadar buzdolabında (0°C) tutulmuştur. Leica marka kızaklı mikrotom ayarlanarak kesitler seri halinde alınmıştır ve önceden ısıtılmış su banyosu (benmari) içine fırça yardımı ile bırakılmıştır. Daha sonra polilizin kaplı lam yardımı ile seri haldeki kesitler sabitlenerek alınmıştır ve yatay dik pozisyonda suyunun süzülmesi için bekletilmiştir.

Suyun süzülmesinin ardından dokular kurumadan, parafinin uzaklaştırılması için yaklaşık 55°C'lik etüvde yarım saat bekletilmiştir. Ardından saydamlaştırmak üzere ksilol içine alınmıştır, ksilolde 1,5 saat kadar bekletilen dokular daha sonra boyama sepetine yatık

vaziyette yerle tirilmi lerdir. Daha önceden hazırlanmış olan stok hematoksilen (Harris) içine doku sepeti yerle tirilmi ve 1 ile 4 dk kadar beklenmi tir. Ardından doku akan musluk suyu altında yıkanmış tir. Sabitleme için asit alkol içine alınan dokular ardından Eosin için öncelikle yıkanmış ve boya içinde çok kısa süre daldırılıp çıkarılmış tir. Çe me suyunda birkaç dakika daha yeniden yıkanan dokular göz ile kontrol edildikten sonra kurumaya bırakılmış tir.

Kuruma işlemi takiben lamalar üzerine dokuyu örtecek miktarda entellan damlatılarak 25 x 25 mm'lik lameller ile doku kapatılmış tir. Kapatılan dokular ışık mikroskopisinde inceleninceye kadar ışık görmeyecek biçimde muhafaza edilmiş tir.

### **3.1.4. İMMÜNOSİTOKİMYASAL BOYAMALAR**

İmmünohistokimyasal boyamalar için doku fiksasyonu, takibi ve kesit alma işlemleri normal histolojik yöntemlerde bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Kesitlerin alınmasından sonra boyama gerçekleştirilene kadar dokular parafinli halde saklanmış, ICC protokolü dahilinde işlem göreceği zaman parafinden kurtarma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Uygulanan protokol aşağıdaki gibidir:

- Deparafinizasyon (%100 ksilolde, iki kez, 10'ar dk)
  - Rehidrasyon (%100, %80, %70 alkol ve PBS'de 10'ar dk)
  - Antijen retrieval (Proteaz ile 37°C'de 30 dk bekletilir)
  - PBS'de 10 dk bekletilir.
  - PBS-Tx'de 5-10 dk bekletilir. (150 µl Tx + 300 ml PBS)
  - Reagent A, non-immun serum ile muamele (15 Dk) - "Santa Cruz"
  - Buffer One içinde Primer Antikor ile muamele (nemli ortamda 12 saat) - "Abcam"
- (IGF-I, VEGFA ve NCAM için ayrı ayrı)
- PBS-Tx ile tekrar yıkanır.
  - Reagent B ile (Biotinleştirilmiş secondary antikor) - "Abcam Biotin Sek. Antikor"
  - Reagent C ile (Streptavidin-peroksidaz) ile 15 dk muamele edilir.

- DAB, dH<sub>2</sub>O ve DAB Enhancer ile muamele edilir. - "Zymed Stain Kit"
- Bazı örnekler için counterstain uygulanmı tır (Hemotoksilen ile birkaç sn.)
- dH<sub>2</sub>O ile çalkalayıcıda, ale içinde yakla ık 30 dk yıkanır.
- %80, %90 ve absolü etanol serilerinden geçirilir. (5 dk)
- Ksilol'de 10 dk bekletilir, süzülür ve entellan ile kapatılır.



**ekil 3.1.** ICC Boyama yöntemi (nemli ortamda inkübasyon)

Fazla miktarda kimyasal kullanmamak için dokuların etrafı oje ile çizilmi ve kuyucuklar olu turulmu tur. Gerek antikorlar, gerekse de di er reaktifler bu kuyucuklar üzerinde uygulanmı tır. Santa Cruz ve Zymed'in kitleri alma ık olarak kullanılmı , deneme boyamalarından sonra optimize metod yukarıda anlatıldı ı gibi saptanarak uygulanmı tır. Pozitif ve negatif kontrol preparatları da hazırlanmı ve ık mikroskobunda kontrol edilmi tir.

### 3.2. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Çizelge 3.1. RNA izolasyonu yapılan örnekler.

Örnek ID	Örnek Tanımı
1F	1. Örnek normal plasenta
1M <sub>1</sub>	1. Örnek normal plasenta
1M <sub>2</sub>	1. Örnek normal plasenta
1T	1. Örnek normal plasenta
2M	2. Örnek normal plasenta
2T	2. Örnek normal plasenta
2F <sub>1</sub>	2. Örnek normal plasenta
2F <sub>2</sub>	2. Örnek normal plasenta
K1T	Klon Efe (Total)
K1F	Klon Efe (Fetal)
K1M	Klon Efe (Maternal)
K3T	Klon Nilüfer (Total)
K3F	Klon Nilüfer (Fetal)
K3M <sub>1</sub>	Klon Nilüfer (Maternal)
K3M <sub>2</sub>	Klon Nilüfer (Maternal)
K2T <sub>1</sub>	Klon Ece & Ecem (Total)
K2T <sub>2</sub>	Klon Ece & Ecem (Total)
K2F	Klon Ece & Ecem (Fetal)
K4T	Klon Kiraz (Total)
K4M	Klon Kiraz (Maternal)
K4F	Klon Kiraz (Fetal)

#### 3.2.1. TRIZOL KULLANILARAK TOTAL RNA ZOLASYONU

Bu yöntem, sı ır ve fare gibi hayvan materyallerinden (doku, hücre ve embriyo gibi) materyallerinin parçalanmasını takiben Trizol (Invitrogen) ile total RNA izole edilme yöntemini açıklamaktadır.

##### ***Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanması***

**Trizol:** Ticari olarak satın alınır.

**2-isopropanol:** Ticari olarak satın alınır.

**%75 etanol:** Absolute (Saf) etanol ile DEPC ile muamele edilmiş dH<sub>2</sub>O kullanılarak hazırlanmıştır.

##### **0,1 DEPC ile muamele edilmiş dH<sub>2</sub>O:**

DEPC 1 ml D<sub>2</sub>O ile hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Gece boyu 37°C'de karıştırılarak DEPC ile muamele edilen su, otoklavlanarak DEPC uzaklaştırıldıktan ve sterilize edildikten sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir.

### ***Numune Hazırlama***

Trizol reagent kullanılarak dokulardan veya hücrelerden izolasyon yapmak mümkündür. Eğer doku alınacaksa her bir doku için steril scalpel kullanmak suretiyle yaklaşık 50-100 mg'lık doku alınıp, steril temiz bir *ependorf* tüpe konur ve ardından hemen sıvı azota konuldu. Alınan dokular aşağıda belirtildiği şekilde homojenize edilerek kullanılmalı ve eğer hücre veya embriyodan izolasyon yapılacaksa Trizol eklendikten sonra birkaç kez pipetaj yaparak hücreler parçalanmalıdır.

### **3.2.2. DENEYİN YAPILIŞI**

***Homojenizasyon:*** Sıvı azotta dondurulup -80°C'de saklanan dokuların yaklaşık 50-100 mg'ı tartılarak ayrıldı. İzolasyon için ayrılan dokular sıvı azot içinde porselen havanlarda toz haline gelinceye kadar öğütüldü. Toz halindeki dokuya 1 ml Trizol eklendi (50-100 mg örnek için) ve havanda bir süre daha homojenize edildi. Homojenat temiz bir 1.5 ml'lik *ependorf* tüpe aktarıldı.

***Faz Ayrımı:*** Homojenat 5 dakika boyunca oda sıcaklığında (15-30°C) inkübe edilerek nükleoprotein komplekslerinin çözünmesi sağlandı. Dokudan izolasyon yapılması için; çözünmeyen materyallerin uzaklaştırılması için homojenat 4°C'de 12,000 xg'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Oluşan pelet ekstrasellüler membranları, polisakkaritleri ve yüksek moleküllü DNA'yı içerirken, üst sıvı RNA içermektedir. Bu nedenle, üst sıvı temiz bir 1.5 ml'lik *ependorf* tüpe aktarıldı. Hücreden veya embriyodan izolasyon yapıyorsa bu santrifüj aşamasına gerek bulunmamaktadır. Üst sıvının üzerine 200 µl (Kullanılan her 1 ml Trizol için) saf kloroform eklendi ve tüpler 15 saniye boyunca elde alt üst edilerek karıştırıldı. Homojenat-kloroform karışımı 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4°C'de 12,000 xg'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.

***RNA Çöktürme:*** Santrifüj sonrası oluşan RNA içeren üst faz temiz bir tüpe alındı. İstenildiği takdirde altta bulunan organik faz DNA veya protein izolasyonu için saklanabilir ancak bu deneysel çalışma kapsamında saklanmamıştır. Alınan üst faza 500 µl (Kullanılan her 1 ml Trizol için) 2- isopropanol (isopropil alkol) eklendi. Örnekler tekrar oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edilerek, daha sonra örnekler 4°C'de 12,000 xg'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.



*RNA Yıkama:* Bu amaçta RNA tüpün dibinde pelet halinde görülmelidir. Üstte bulunan tüm sıvı pipetle uzakla tırıldı. 1 ml %75'lik etanol eklendi (Kullanılan her 1 ml Trizol için) ve vortekslenerek karı tırıldı. Örnek 4°C'de 7,500 xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.

*RNA'nın Çözülmesi:* Tüm üst sıvı pipetle uzakla tırıldı , pelet vakumlu kurutucuda veya oda sıcaklığında 5-10 dakika tüpün kapa ı açık bırakılarak kurutulmu tur. Kurutma i lemi, materyal kaybı olmaması için kesinlikle vakumlu santrifüj kullanılarak gerçekleştirilmemi tir. Örnekler tam olarak kurutulduktan sonra pelet üzerine uygun miktarda DEPC-H<sub>2</sub>O eklendi. Daha sonra örnekler 10 dakika boyunca 55-60°C'de inkübe edilerek RNA peletinin tam olarak çözülmesi sa lanmı tir.

*RNA'nın Saklanması:* Elde edilen RNA'lar -80°C'de saklanmı tir.

### **3.2.3. RNA KONSANTRASYONUNUN BEL RLENMES VE KONTROLÜ**

zole edilen total RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlendi. Belirlemede OD<sub>260</sub> x 40 x dilüsyon faktörü: 1000=µg/µl RNA e itli inden yararlanıldı.

zole edilen total RNA cDNA'ya çevrilerek RT-PCR reaksiyonu için deney olu turuldu. stenilen transkriptin ço altımı sa lanabiliyorsa RNA'nın yeterince kaliteli oldu u sonucuna varılmı tir. Ayrıca, elde edilen total RNA denatüre edici agaroz jelde elektroforezlendikten sonra ultraviyole ı ı ı altında incelenebilir; 18S ve 28S ribozomal RNA'larına kar ılıklı gelen bantlar gözlenerek izole edilen RNA bütünlü ü açısından kontrol edilebilece i bilinmektedir.

### ***cDNA Sentezi ve RT-PCR (Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)***

Bu yöntem, total RNA'dan cDNA sentezini ve sentezlenen cDNA'nın kalıp olarak kullanılarak istenilen cDNA bölgesinin RT-PCR reaksiyonu ile ço altılmasını kapsar.

### ***Kullanılan Reaktifler ve Hazırlan ı***

cDNA sentezinde kullanılan reaktifler kitle beraber gelir.

2x PCR Master Mix (MBI, Fermentas): Fermentas Firması'ndan satın alınır. Taq DNA polimeraz (rekombinant) enzimi (Reaksiyon tamponu içinde): 0.05u/µl, MgCl<sub>2</sub>: 4mM ve dNTP'ler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): Her biri 0.4mM içerir.

6X DNA Yükleme Solüsyonu: 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, % 0.03 bromfenol mavisi, % 0.03 ksilen siyanol FF, 60 mM EDTA ve % 60 gliserol içerir.

Primer çifti: Ço altılmak istenen DNA/gen bölgesine spesifik oligonükleotitler olup nükleotit dizileri tasarlandıktan sonra sentezlettiler.

zole edilip OD<sub>260</sub>x40x dilüsyon faktörü:1000=µg/µl RNA e itli i ile miktarı belirlenmi RNA'nın 1-10 µg'ı steril temiz PCR tüpüne alınmı tır.

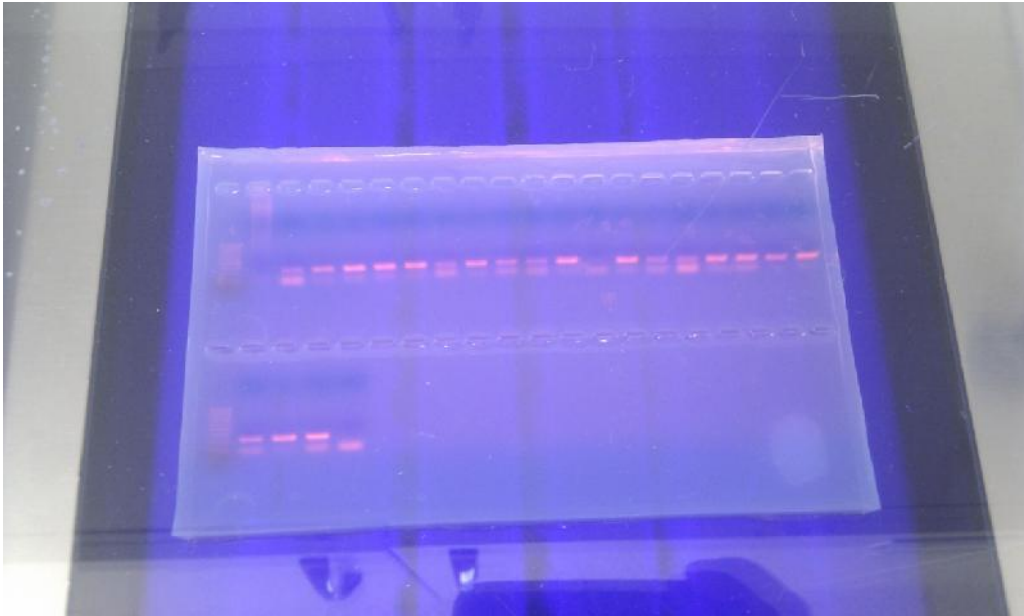
Total RNA materyalinden RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, #K1621) kullanılarak kitin kullanım kitapç ında belirtildi i ekilde önce tek iplikli cDNA sentezlendi. Daha sonra, sentezlenen cDNA kalıp olarak kullanılarak ilgilenilen cDNA bölgesi bu bölgeye spesifik primerler yardımıyla RT-PCR ile ço altıldı.

### ***cDNA Sentezi ve RT-PCR***

- PCR tüpüne 11 µl total RNA (10 µg'a kadar) ve 1 µl Random hexamer (Raslantısal primer, 0,2 µg/µl) eklendi.
- Karı ım elle karı tırılıp 3-5 saniye spin yapıldıktan sonra 5 dakika süreyle 70°C'deki ısıtıcı blokta tutuldu.
- nkübasyon sonrası karı ım hemen buza alındı.
- Ardından birkaç saniyelik santrifüj ile kapak çevresindeki damlaların çökmesi sa landı.
- Tüpteki karı ıma buz üzerinde sırasıyla;

5x Reaksiyon Tamponu	4 µl
Ribonükleaz nhibitörü	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl eklendi.
- Hazırlanan bu karı ım nazıkçe elle karı tırılarak, 3-5 saniye santrifüjlendi.
- 25°C'de 5 dakika inkübe edilir ve 1 µl RevertAid™ M-MuLV ters transkriptaz enzimi (200 U/µl) eklenir ve 25°C'de 10 dakika daha inkübe edildi.

- Daha sonra, 42°C’de 1 saat süreyle inkübe edilen reaksiyon 10 dakika 70°C’de tutularak durdurulur. Tek iplikli cDNA sentezlenmiş olur.
- 2 µl tek iplikli cDNA, 1 er µl çoğaltılmak istenen cDNA’ya özgü primerler (20 pmol/µl), 10 µl 2x PCR master mix ve 6 µl dH<sub>2</sub>O içerecek şekilde RT-PCR reaksiyonu kuruldu.
- PCR cihazında yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen reaksiyonlar sırasında tüp içeriklerinin buharla kaybolmasını önlemek için örneklerin üzerine birer damla mineral yağ damlatıldı.
- Uygun PCR programında RT-PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.
- PCR programı bittikten sonra, PCR tüpleri cihazdan çıkarıldı. Tüpler anlık santrifüj edildi ve örnekler analiz edilinceye kadar -20°C’de saklandı.
- Örnekler hemen analiz edilecekse her bir tüpte bulunan 20 µl’lik alt fazdaki örnek kısmı otomatik pipet ile üst fazdaki mineral yağdan ayrılır ve üzerine 4 µl 6x DNA yükleme solüsyonu eklenerek agaroz jele yüklendi.
- Agaroz jelde koğutulduktan sonra jel görüntüleme cihazında önce göz ile sonra da kapalı ortamda UV altında görüntülendi ve görüntülenen bantlar fotoğraflandı.



**ekil 3.2.** Örnek jel görüntüsü (UV altında açık)

#### **3.2.4. QPCR - REALTIME PCR UYGULAMASI**

Klon ve normal plasenta örnekleri, fetal, maternal ve total örnekler olmak üzere, her üç grup primer için (IGF, VEGF, NCAM); 1:10, 1:100, 1:1000 standartları ve NTC (no

template control) ile birlikte kuyucuklara 25 µl olarak yüklenmiş 21 kuyuda reaksiyona sokulmuştur. Toplamda 63 kuyu BioRad IQ5 cihazında realtime PCR ile test edilmiştir ve neticede grafik ve sayısal veriler elde edilmiştir. Referans (housekeeping) olarak CREB3, HK1 ve ZFX genleri de ayrı bir siklus da yine aynı standartlar ve NTC ile PCR'a tabi tutulmuştur.

**Çizelge 3.2.** Kuyu yükleme tablosu

B1 / STD 1:10	B2 / STD 1:100	B3 / STD 1:1000	B4 / NTC	B5 / LF	B6 / LM	B7 / 2F	B8 / 2F	B9 / 2M	B10 / 2T	B11 / K1F	B12 / K1M
C1 / K1T	C2 / K2F	C3 / K2T	C4 / K3F	C5 / K3M	C6 / K3T	C7 / K4F	C8 / K4M	C9 / K4T			
D1 / STD 1:10	D2 / STD 1:100	D3 / STD 1:1000	D4 / NTC	D5 / 1F	D6 / 1M	D7 / LT	D8 / 2F	D9 / 2M	D10 / 2T	D11 / K1F	D12 / K1M
E1 / K1T	E2 / K2F	E3 / K2T	E4 / K3F	E5 / K3M	E6 / K3T	E7 / K4F	E8 / K4M	E9 / K4T			
F1 / STD 1:10	F2 / STD 1:100	F3 / STD 1:1000	F4 / NTC	F5 / LF	F6 / LM	F7 / LT	F8 / 2F	F9 / 2M	F10 / 2T	F11 / K1F	F12 / K1M
G1 / K1T	G2 / K2F	G3 / K2T	G4 / K3F	G5 / K3M	G6 / K3T	G7 / K4F	G8 / K4M	G9 / K4T			

### 3.3. B YO STAT ST K VE B YO NFORMAT K YÖNTEMLER

Moleküler bulgular zaten sayısal değerler olarak elde edilmiştir. Bununla birlikte histolojik bulgulardan elde edilen mikroskopu foto rafları dijital imajleme ekinde sayısallaştırılmış ve ICC boyamasının klon ve kontrol grupları arasında farklı olup olmadığını saptanmaya çalışılmıştır.

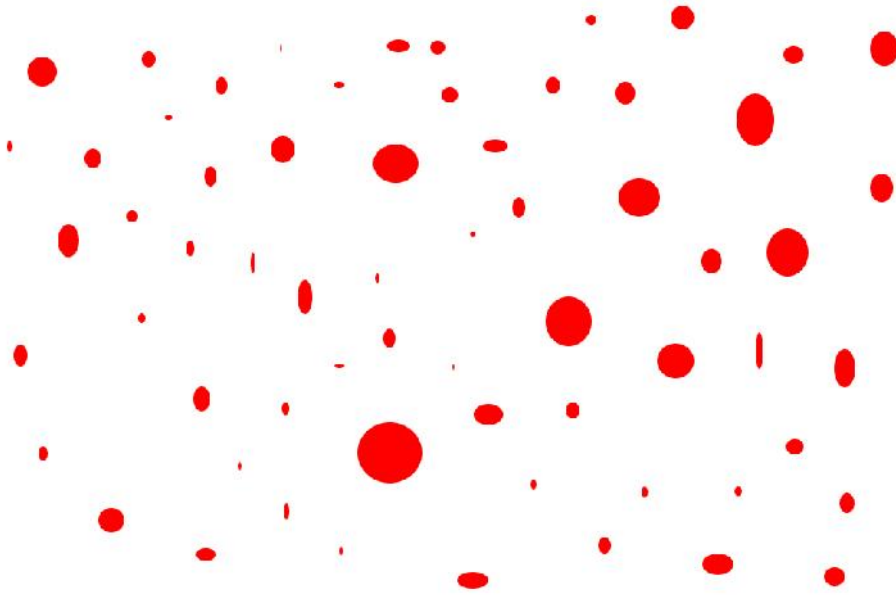
#### 3.3.1. ICC BOYAMA FOTO RAFLARININ İZLENMESİ

Invert mikroskopta foto raflar sabit mik ayarlarında dijital foto raf makinesi ile çekilmiştir. Çekilen sabit foto raflar, Adobe Photoshop™ programında 100 Threshold (eşik) değeriyle test edilmiştir ve ICC (+) ve ICC (-) alanlar ayırt edilmiştir. Ayırt edilen imajlar hala 8 bit kanallar halinde kodlu resim dosyası biçimindedir. Bu dosyalar NIH, ImageJ programına aktarılarak Binary, yani ikili kodlu sisteme çevrilmiştir. Bu işlem neticesinde boyanan ve boyanmayan alanlar rastgele olarak 3 adet 250 x 250 piksel alan dahilinde ölçümlenmiş, alan yüzölçümü ve boyanan / boyanmayan alan yüzdeleri elde edilmiştir. Boyanmayan alanlar yani

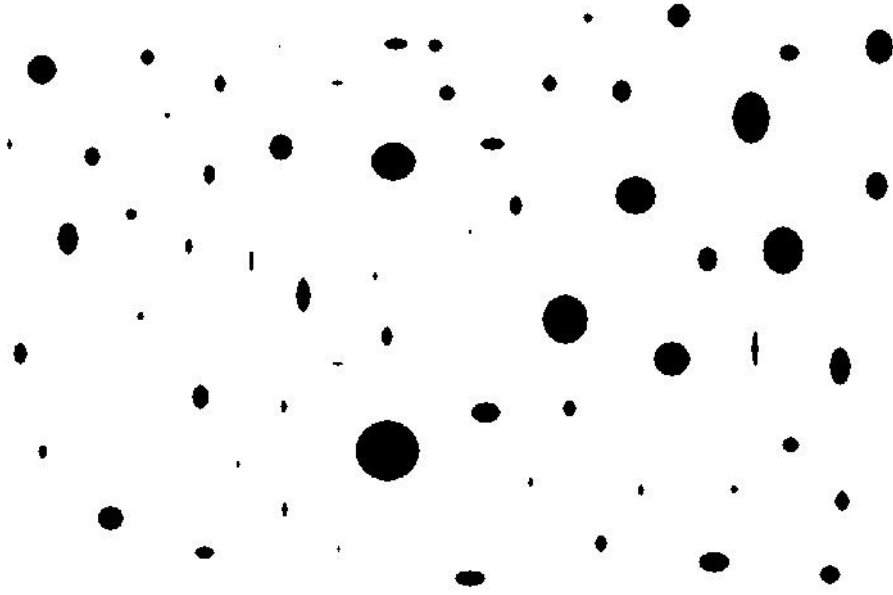
ICC (-) alanlar ile preparattaki bo alanların karı mamasına dikkat edilmi , bo alanlar haricinde rastgelelelik (randomize) sa lanmı tır (Efford, N. 2000).

Elde edilen sayısal veri daha sonra IBM SPSS programında hem veri da ılımı ve varyans homojenli i yönünden test edilmi , ardından do ru de erlendirmenin veri setine göre parametrik test olaca ı anla ılarak "ba ımsız örneklem T-testi" ortalama kar ıla tırma metodu uygulanmı tır. Güven aralı ı %95 olmak üzere,  $H_0$  hipotezi klon ve kontrol grupları arasında istatistiki anlamlı bir fark olmadı ı yönünde kurulmu tur.

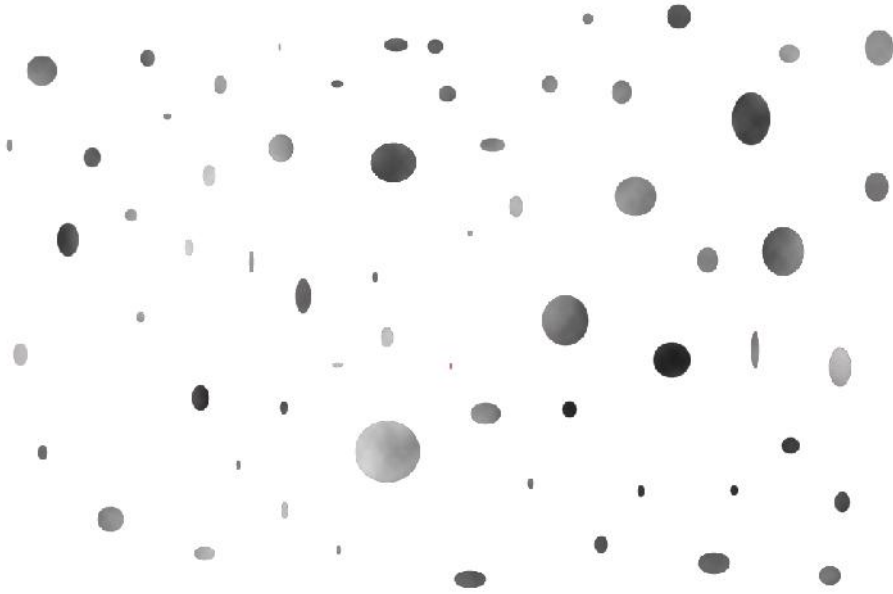
Örnek çalı ma a a ıdaki gibi ifade edilebilir.



**ekil 3.3.** Histolojik tüm alan boyanması



**ekil 3.4.** 100 level threshold uygulanmı hali, bu halde tüm kırmızı alan boyanmı gibi gözükmetedir.



**ekil 3.5.** Cloud filtresi siyah-beyaz olarak uygulanmı hali (ICC Boyama örne i)



**ekil 3.6.** 100 level treshold uygulanmı hali, ICC (+) alanlar; arkaplan dahil dü ünülmemek kaydıyla.

### **3.3.2. RT-PCR (QPCR) SONUÇLARININ ANALİZ**

Biorad firmasının üretimi olan RT-PCR cihazında yapılan PCR yükseltgenme çalışmalarından elde edilen veriler, Qiagen tarafından da ıtılmakta olan olan REST 2009 yazılımında normalize ve normalize edilmeden karşılaştırılmı tır. Yükseltgenme değerlerinin REST 2009 programına 2000 iterasyon (tekrar) ile verilmesi ve CREB3 ile ZFX genlerinin referans verilmesi ile IGFI, VEGF-A ve NCAM için hesaplanmı tır. Güven aralı %95'tir.

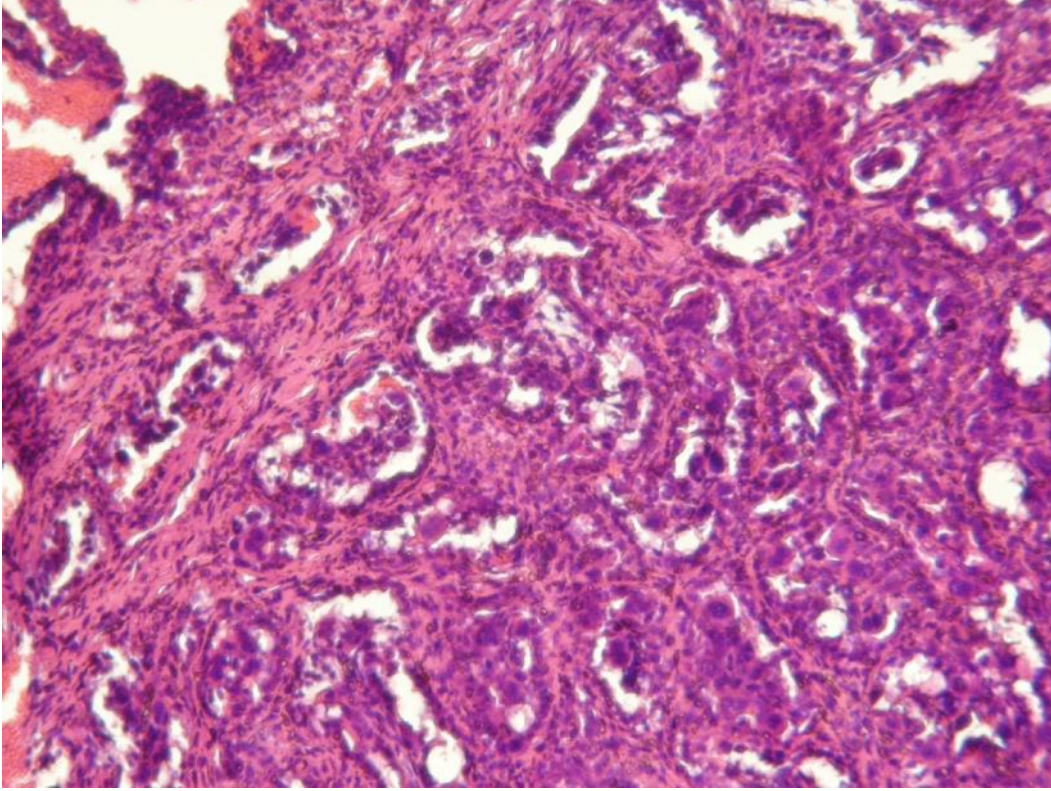
## 4. BULGULAR

### 4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR

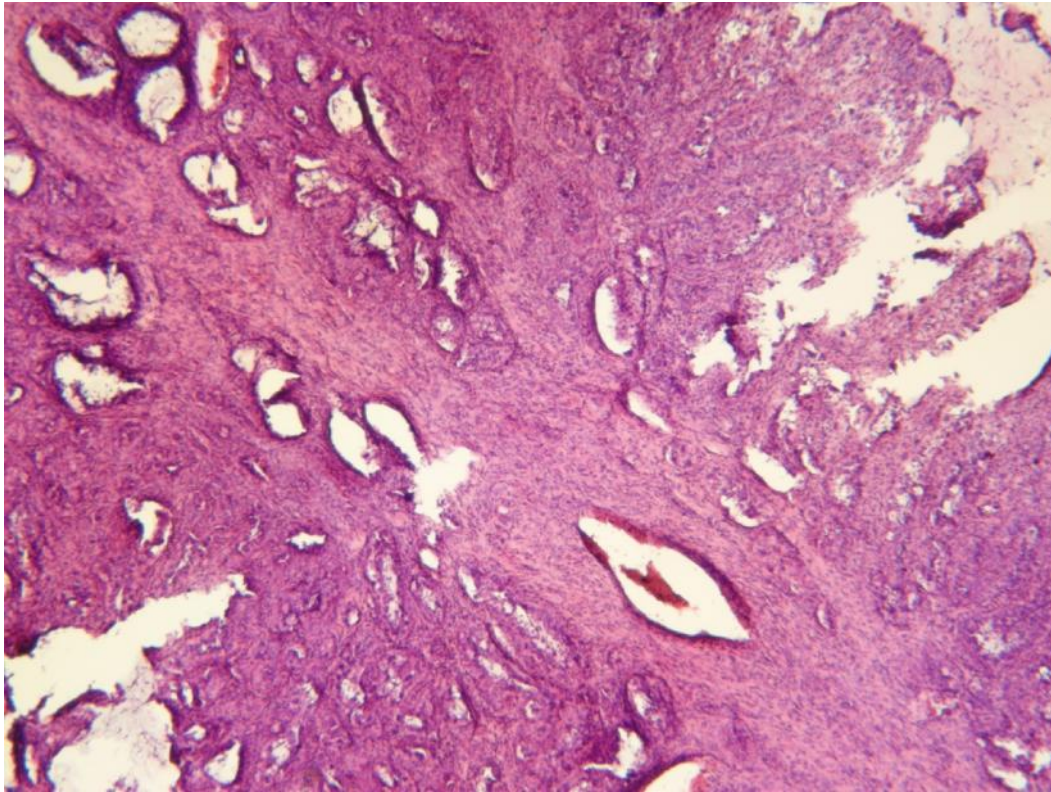
IGF-I, VEGF-A ve NCAM için ICC boyamalar gerçekleştirildi ve boyamalar neticesinde yer yer artifaktlar oluştu da ICC (+) ve ICC (-) bölgeler ayırt edilebilirdi. Bazı örneklerde counterstain yapılması gölgelemelere sebep oldu. Histolojik yapılanma ICC boyamalar içinde görülebilmektedir. Foto raflamalar 5x büyütmeden başlandı, 1,5x oküler çarpanı ile maksimum 40x'e kadar çıkıldı. Foto raflanan örnekler arasında fiziksel olarak daha iyi durumda temin edilmiş olan moleküler analizlere dahil edilmemiş, klon 1 ve klon 2 bireyleri de foto raflandı. Klon gebeliklerin miktarının az olması ve plasenta atımının fizyolojik olarak bazen gecikmesi fiziksel olarak da materyalin zarar görmesine neden olabilmektedir. Bununla birlikte klon 1 ve klon 2 gebelikleri abort ve cerrahi sonlandırma ile bitirildikleri için, plasenta materyali daha az fiziksel yıpranmaya uğramış ve gerek fiksasyonu gerekse de fiksasyonu işleminden sonra işlenmesi daha kolay oldu.



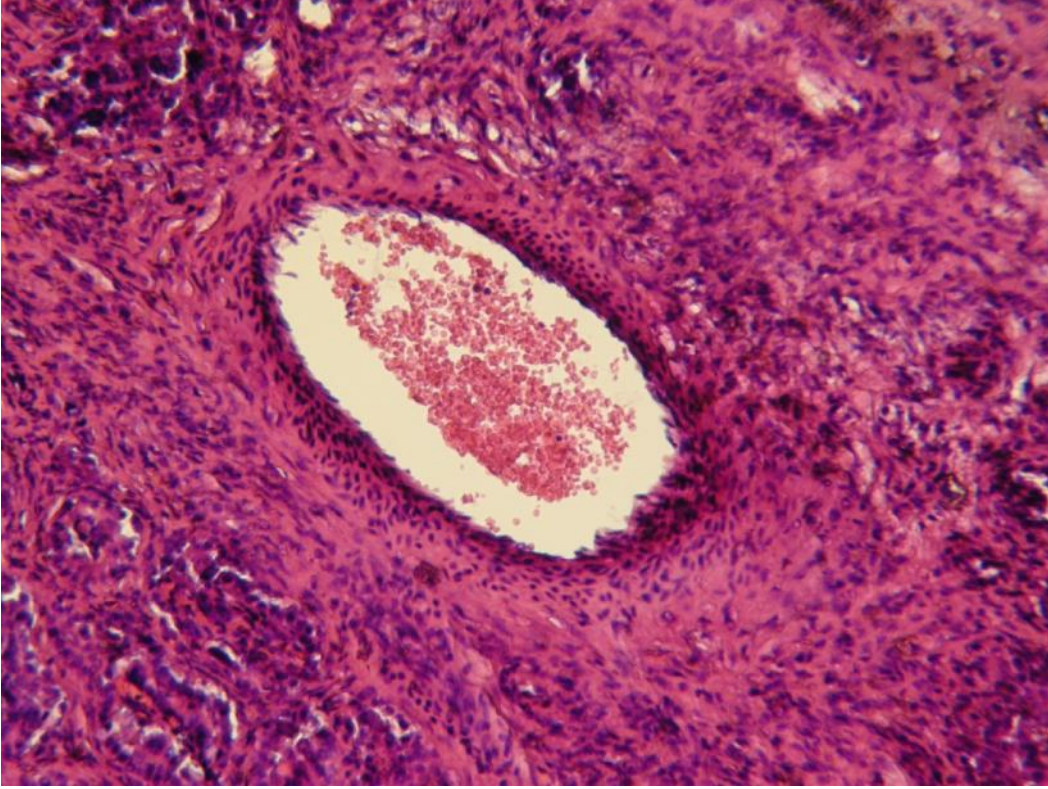
#### 4.1.1.HEMATOKS LEN - EOS N ÖRNEKLER



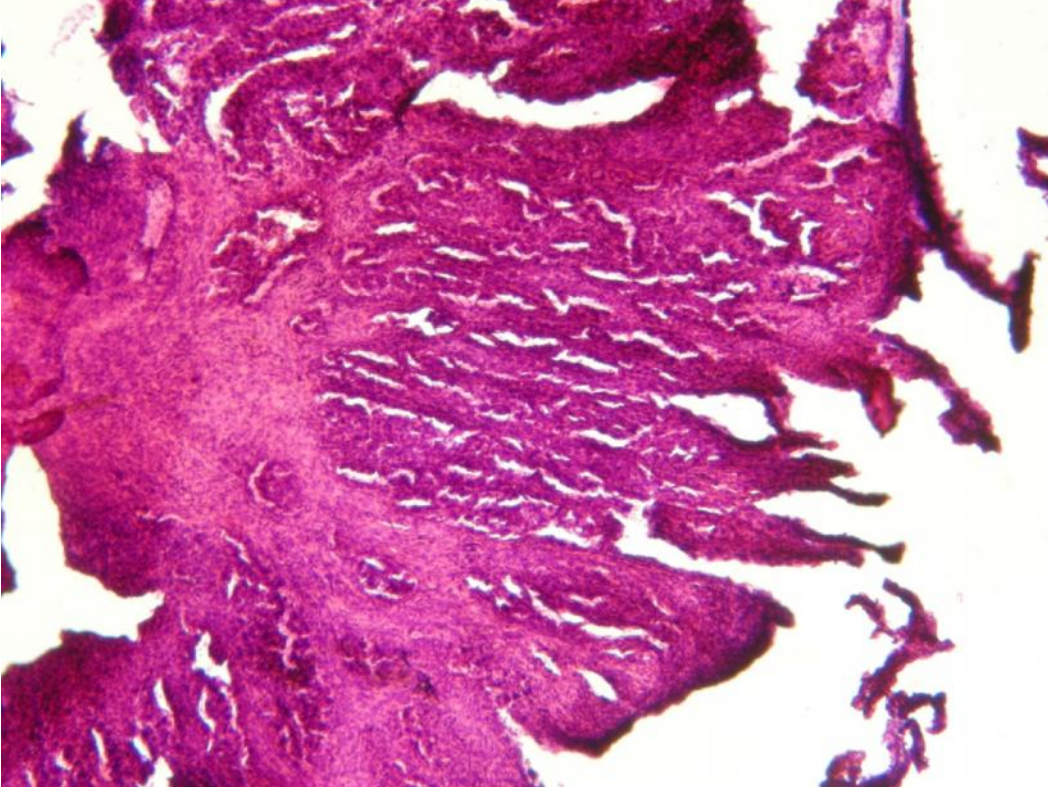
**ekil 4.1.** Efe HE Standart boya x40 (Kotiledon/Septum)



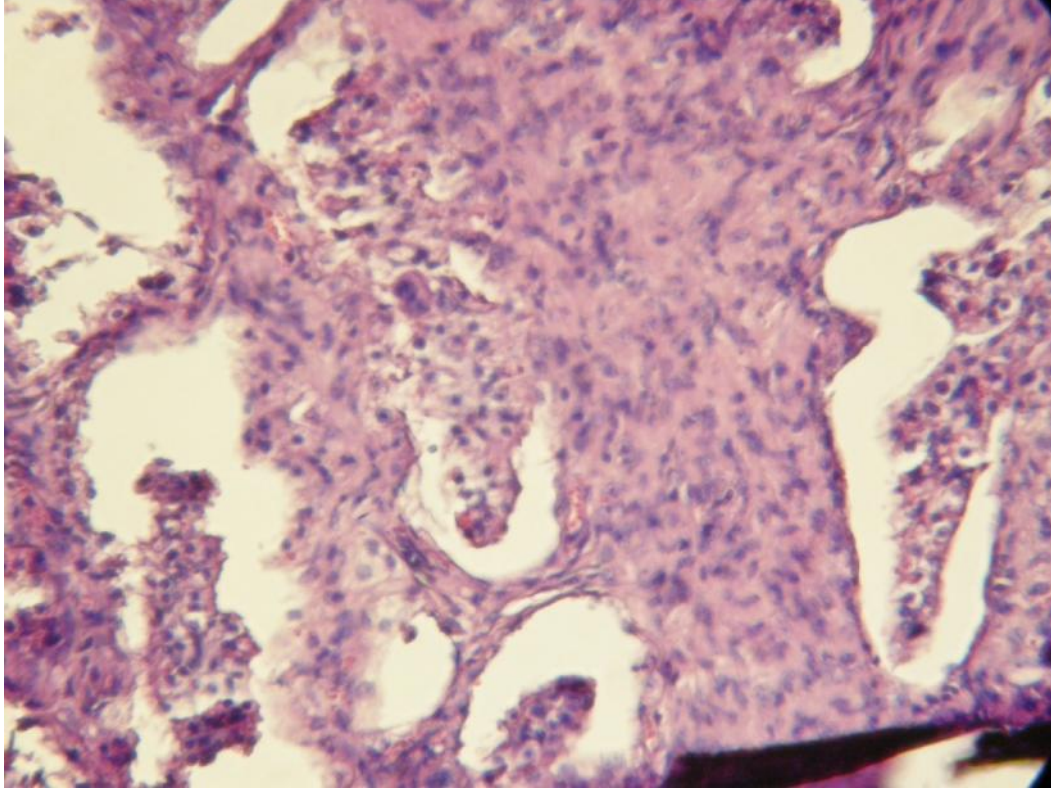
**ekil 4.2.** Ece HE Standart boya x4 ( nterkotiledonal alan)



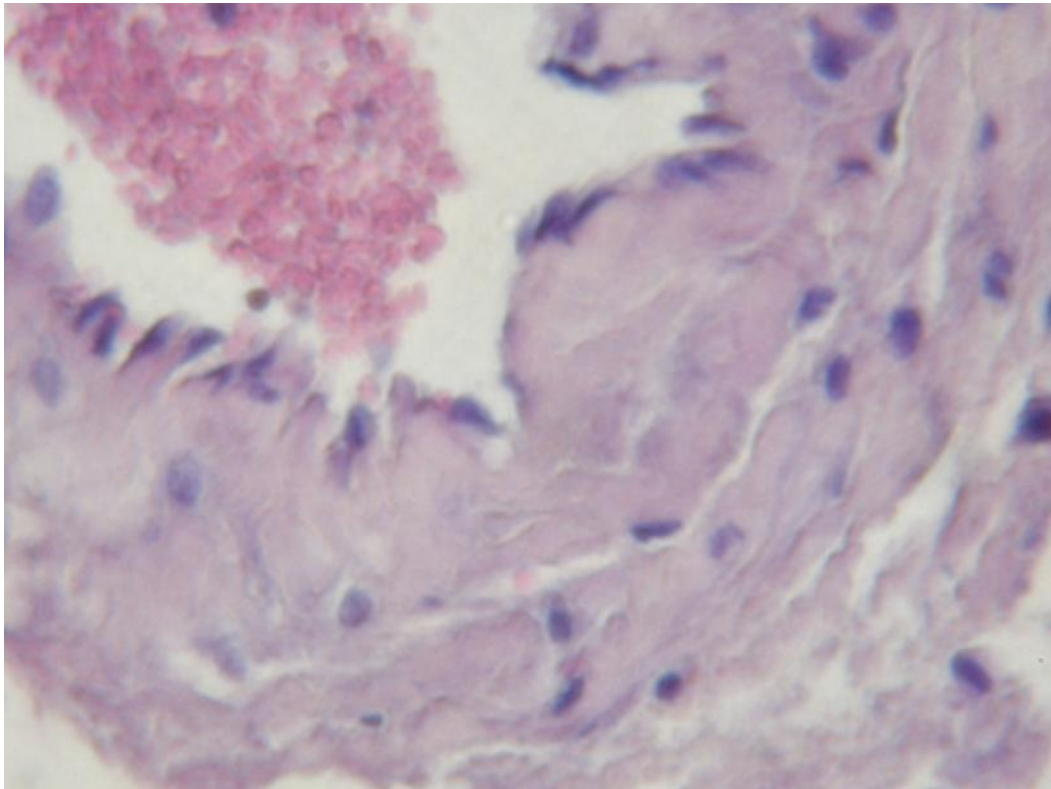
**ekil 4.3.** Efe HE Standart boya x40 (Ven)



**ekil 4.4.** Kiraz HE Standart boya x4 (Kranunkül)

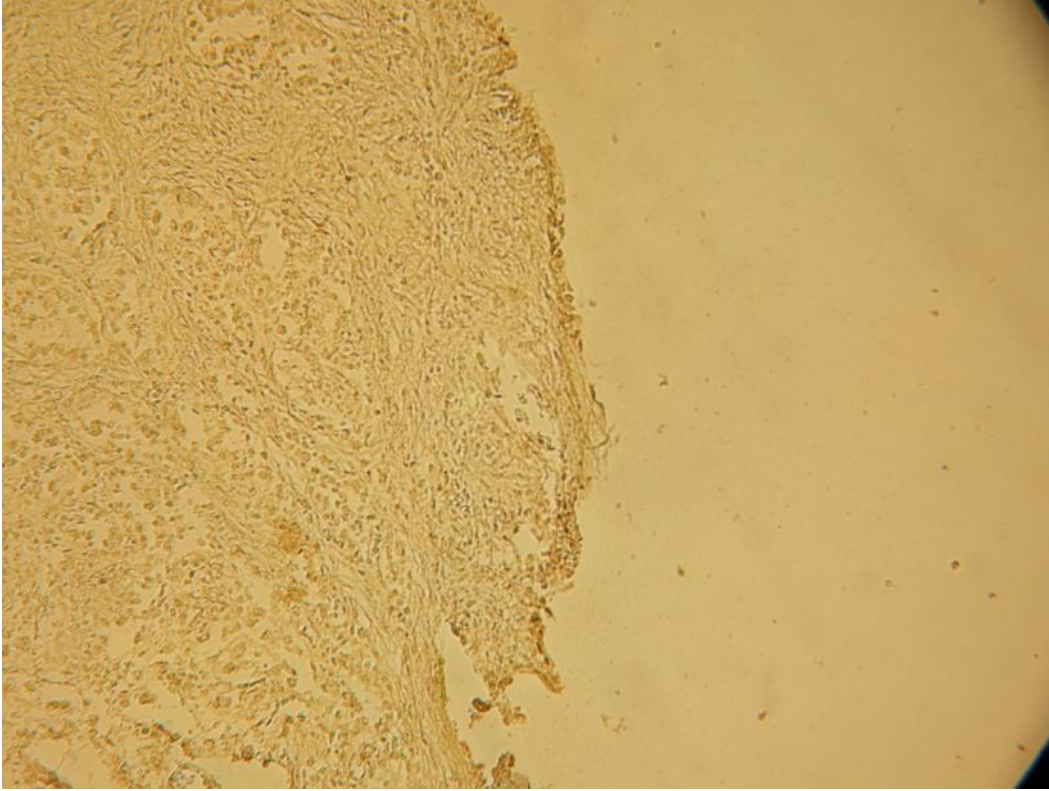


**ekil 4.5.** Kontrol-1 HE Standart boya x20 (Kotiledon)

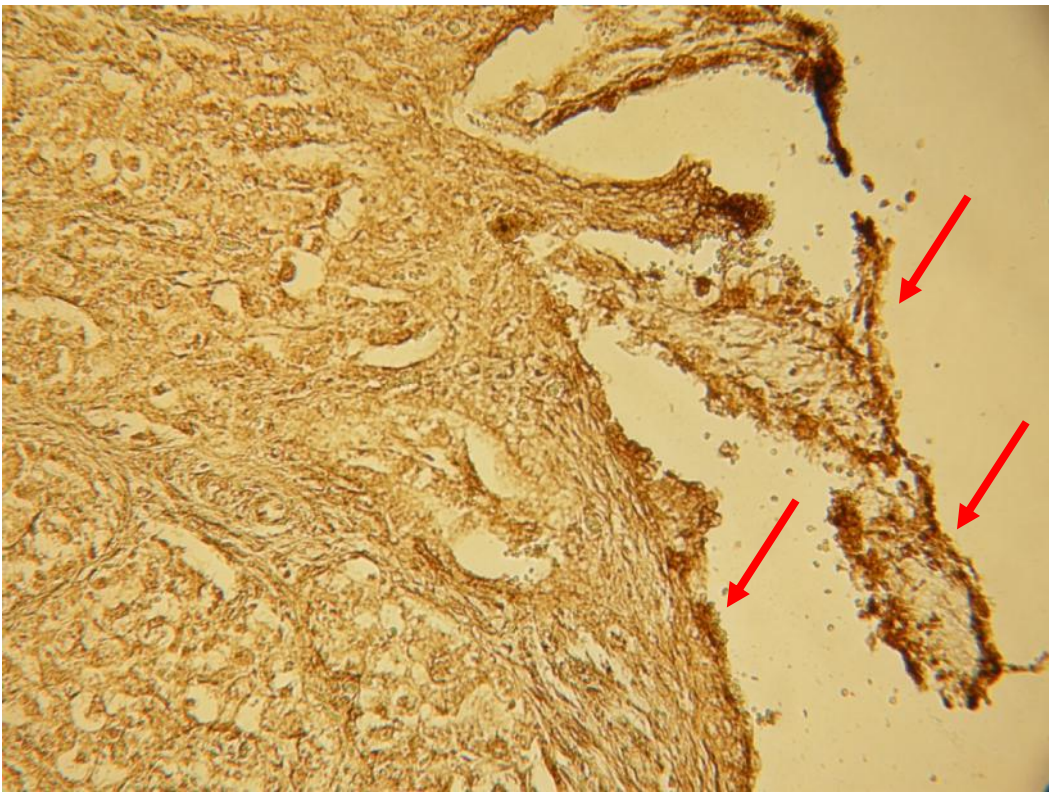


**ekil 4.6.** Kontrol-1 HE Standart boya x40 x1,5 (Ven)

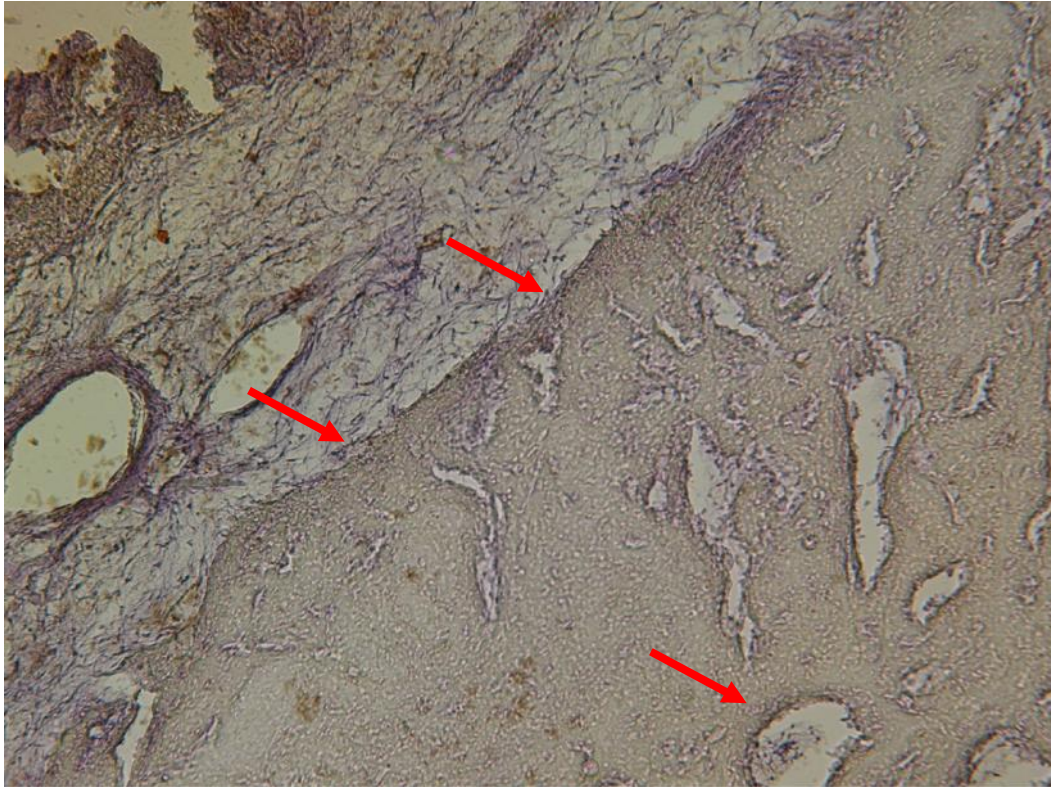
#### 4.1.2. IGF-I ÖRNEKLER



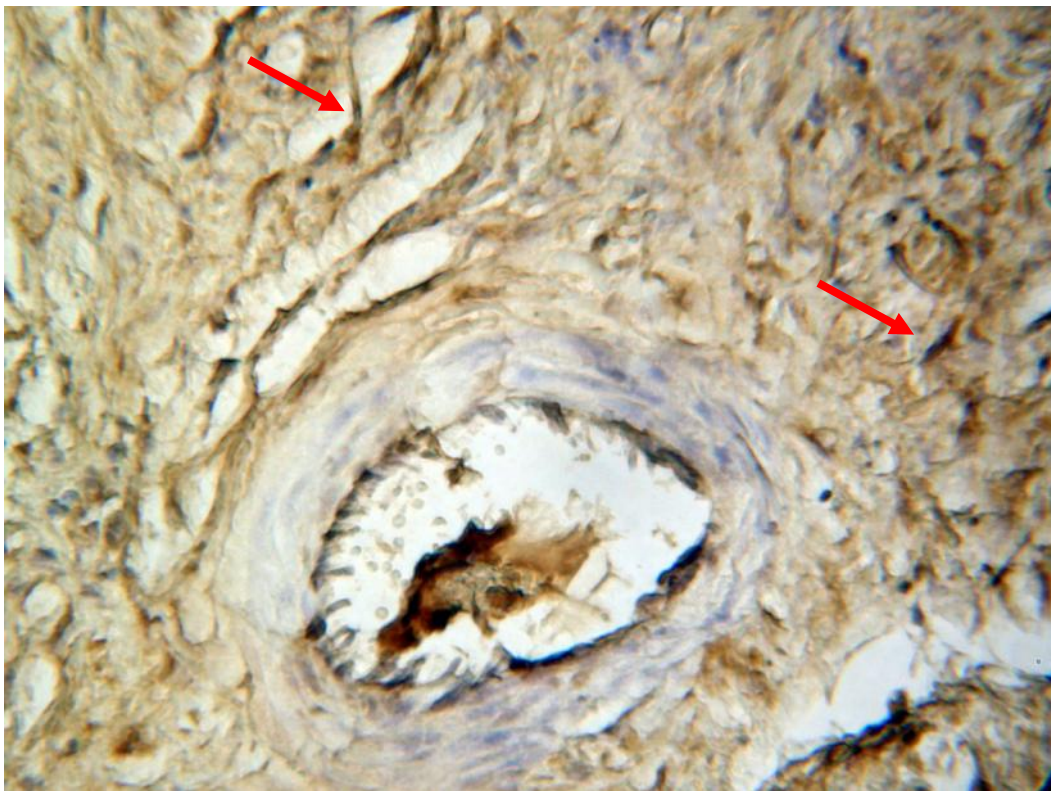
ekil 4.7. Efe IGF Negatif x20 (Maternal doku)



ekil 4.8. Efe IGF Pozitif x20 (Maternal doku)



**ekil 4.9.** Klon 1 IGF Pozitif x20 (Plasentom) -Counterstain-

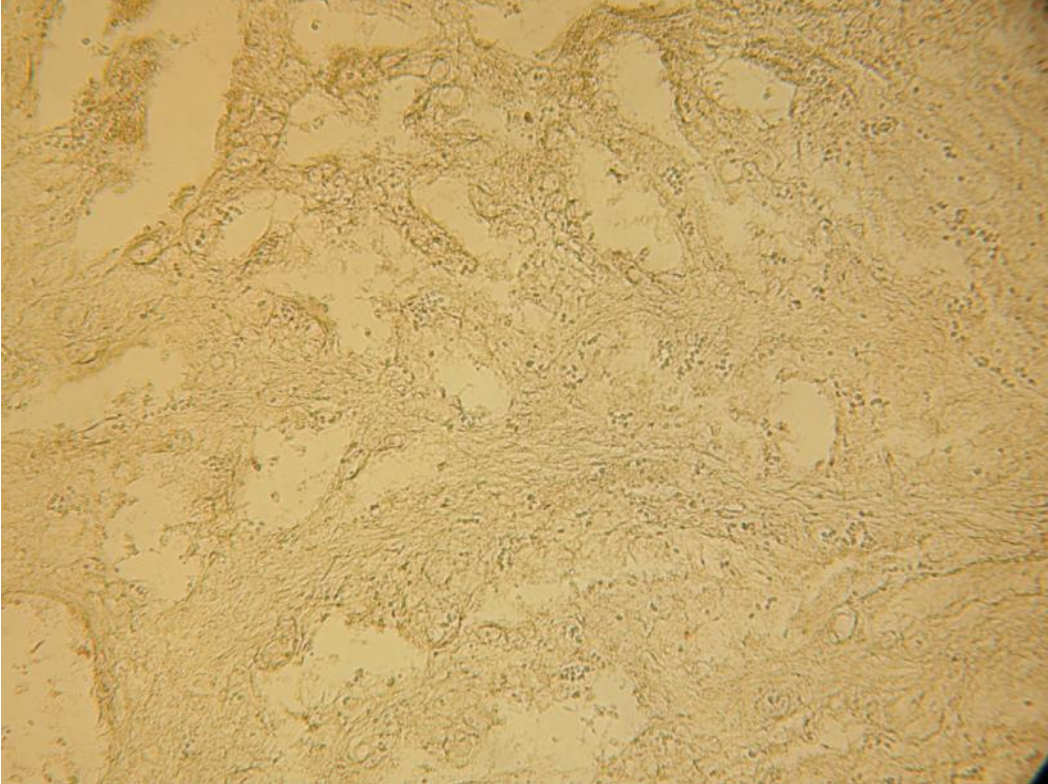


**ekil 4.10.** Kontrol 2 IGF Pozitif x40 (Maternal) -Counterstain-

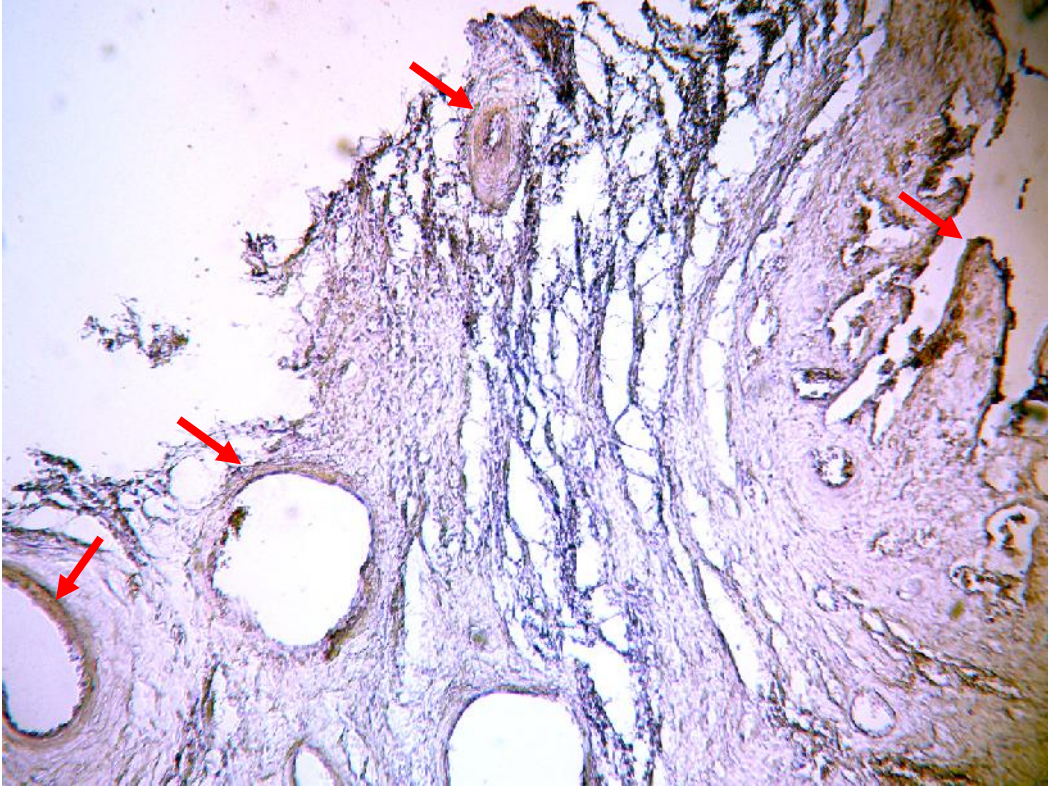
### 4.1.3.VEGF ÖRNEKLER



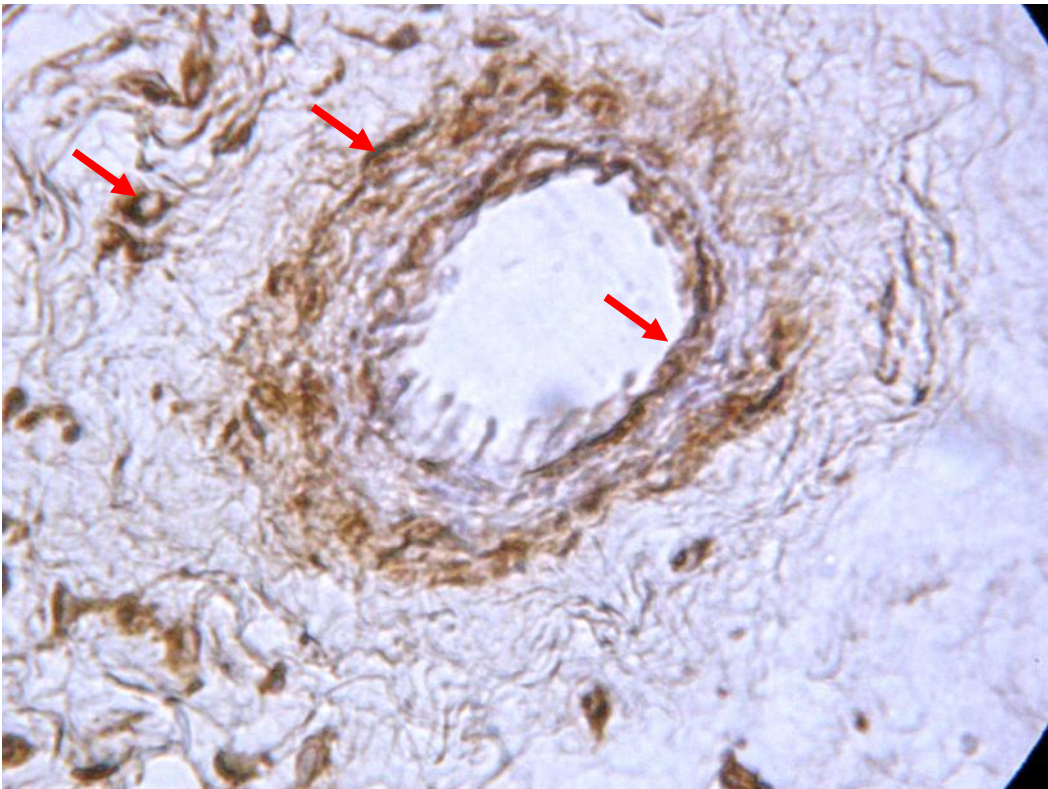
ekil 4.11. Klon 1 VEGF Pozitif x20 (Villus) -Counterstain-



ekil 4.12.Efe VEGF Negatif x10 (Fetal)

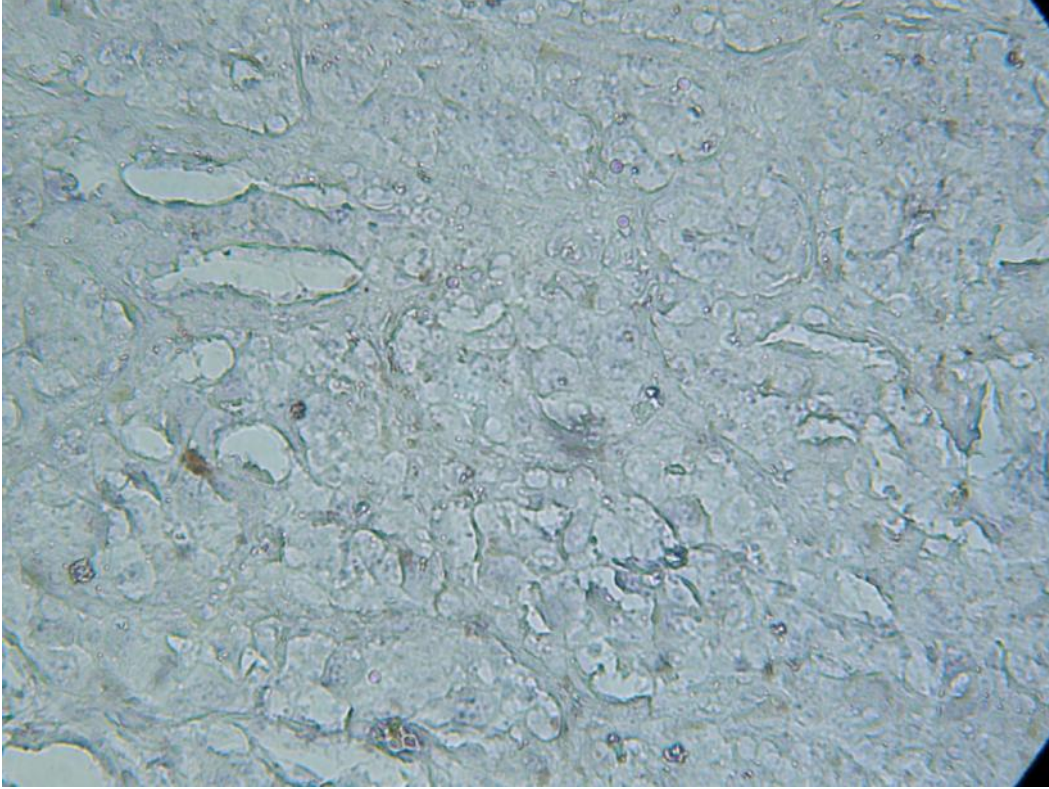


**ekil 4.13.**Efe VEGF Pozitif x10 (Feto-Maternal)

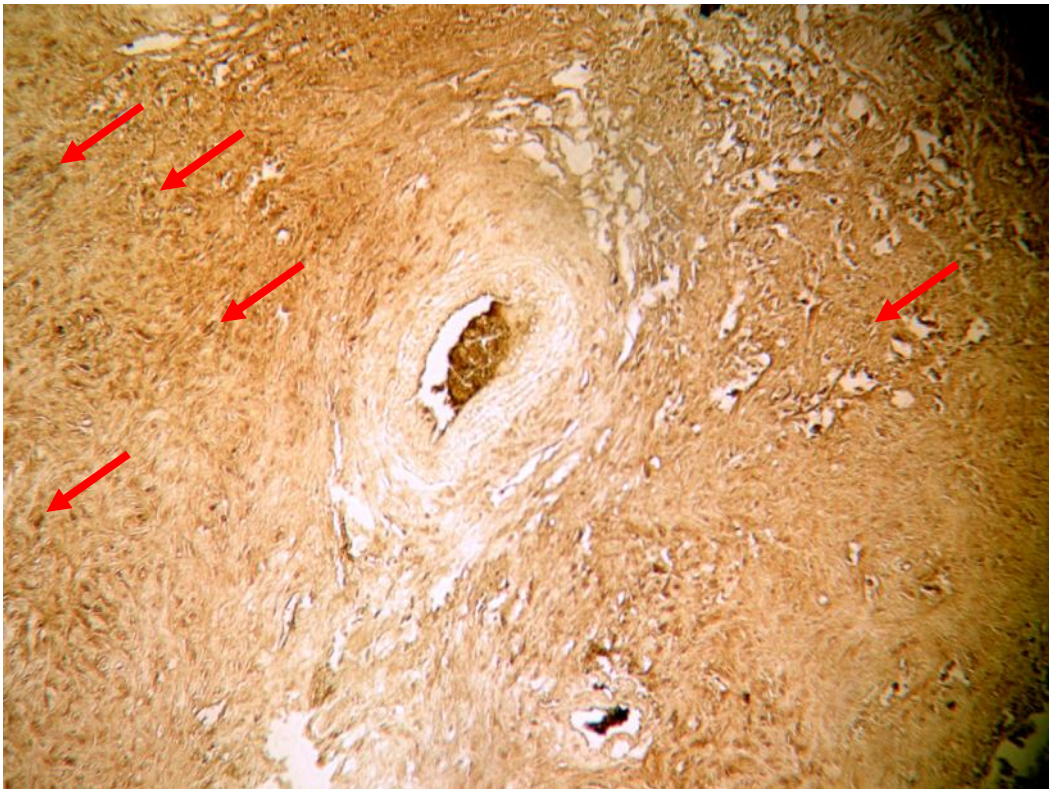


**ekil 4.14.** Klon 1 VEGF Pozitif x 40 (Kranunkül)

#### 4.1.4. NCAM ÖRNEKLER

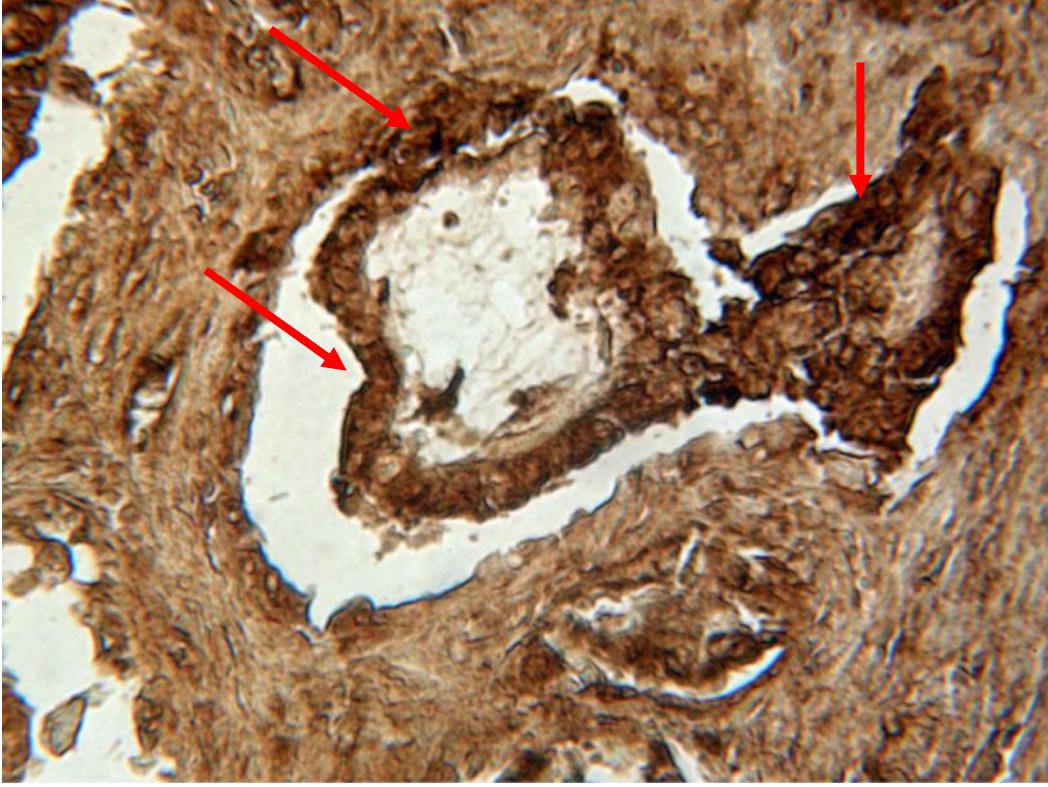


**ekil 4.15.** Efe NCAM Negatif x10 (Fetal) -Counterstain-



**ekil 4.16.** Kontrol 2 NCAM Pozitif x10 (Kranunkül)  
-Daha koyu boyanan bölgelerden bir kısmı oklanmı tır.-





ekil 4.17. Klon 2 NCAM Pozitif x40 (Maternal)

## 4.2. MOLEKÜLER BULGULAR

### 4.2.1. RNA ZOLASYONU SONUÇLARI

- Bazı örneklerden iki er adet olmak üzere toplam 21 adet RNA örne i izole edildi.
- Daha önce elde edilen ve  $-80^{\circ}\text{C}$ derecede saklanan plesanta örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 4.1).
- RNA izolasyonu Trizol ile gerçekleştirildi (Çizelge 4.2) ve bunun için önerilen protokol takip edildi.

**Çizelge 4.1.** Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyon değerleri ve stok solüsyon için hesaplamalar

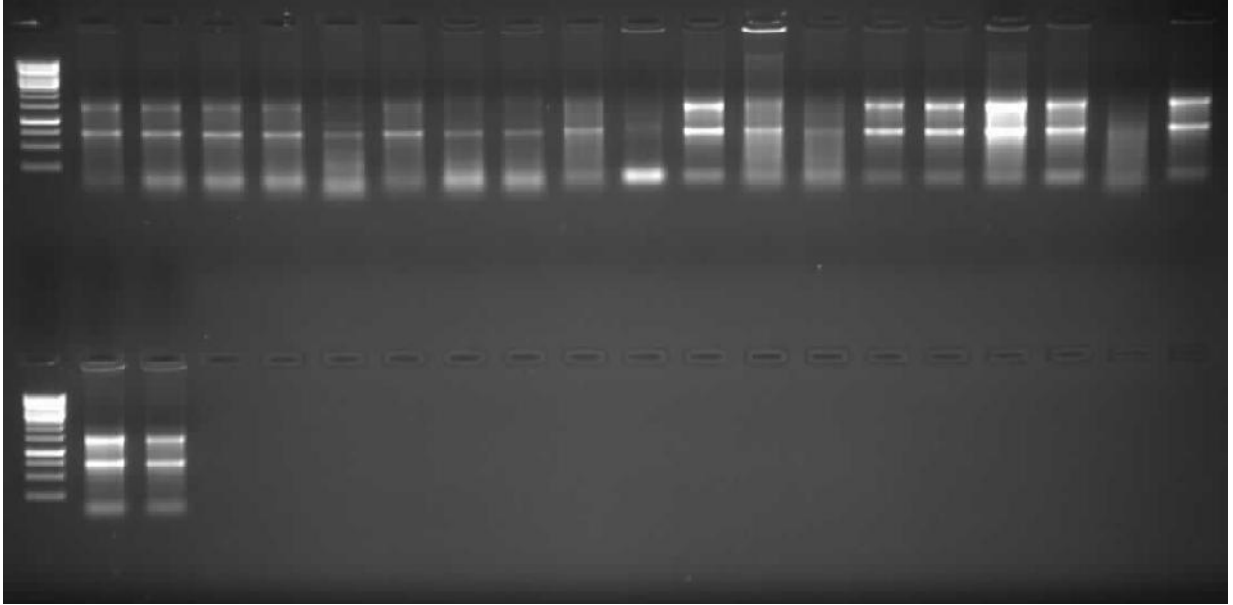
Örnek ID	Konst. (ng/µl)	200 ng/µl konsantrasyona sahip toplam 50 µl'lik stok solüsyonlara hazırlamak için;		
		Örnek Miktarı	DEPC-H <sub>2</sub> O	Toplam Hacim
1F	792,6	12,62	37,38	50,00
1M <sub>1</sub>	2.637,0	3,79	46,21	50,00
1M <sub>2</sub>	2.518,8	3,97	46,03	50,00
1T	2.304,9	4,34	45,66	50,00
2M	804,1	12,44	37,56	50,00
2T	1.662,7	6,01	43,99	50,00
2F <sub>1</sub>	364,7	27,42	22,58	50,00
2F <sub>2</sub>	680,9	14,69	35,31	50,00
K1T	1.794,1	5,57	44,43	50,00
K1F	337,3	29,65	20,35	50,00
K1M	3.619,5	2,76	47,24	50,00
K3T	3.129,7	3,20	46,80	50,00
K3F	1.334,5	7,49	42,51	50,00
K3M <sub>1</sub>	2.282,5	4,38	45,62	50,00
K3M <sub>2</sub>	2.518,4	3,97	46,03	50,00
K2T <sub>1</sub>	2.669,2	3,75	46,25	50,00
K2T <sub>2</sub>	3.713,3	2,69	47,31	50,00
K2F**	546,1	18,31	31,69	50,00
K4T	3.604,4	2,77	47,23	50,00
K4M	3.657,2	2,73	47,27	50,00
K4F	3.468,6	2,88	47,12	50,00

- Orjinal RNA örnekleri 200 ng/µl konsantrasyona sahip olacak şekilde dilüsyonlar hazırlandı ve konsantrasyonları tekrar kontrol edildi (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.2.** Hazırlanan dilüsyonların konsantrasyon değerleri.

Örnek ID	Konsantrasyon (ng/µl)	A260/280	A260/230
1F	232,2	1,83	1,48
1M <sub>1</sub>	242,5	1,87	1,94
1M <sub>2</sub>	258,1	1,87	1,89
1T	256,2	1,84	1,85
2M	192,9	1,85	1,77
2T	201,6	1,85	1,62
2F <sub>1</sub>	209,6	1,78	1,53
2F <sub>2</sub>	190,7	1,85	1,14
K1T	225,4	1,86	1,56
K1F	223,3	1,81	1,16
K1M	326,9	1,92	2,00
K3T	257,0	1,90	1,77
K3F	211,9	1,81	1,78
K3M <sub>1</sub>	286,0	1,89	2,01
K3M <sub>2</sub>	233,5	1,89	1,97
K2T <sub>1</sub>	569,0	2,04	1,77
K2T <sub>2</sub>	364,6	1,93	1,94
K2F**	206,6	1,95	1,16
K4T	558,3	2,00	1,86
K4M	386,7	1,92	1,94
K4F	261,7	1,91	1,93

- Hazırlanan dilüsyonlar %1 agaroz jelde yürütülerek görüntülendi ( ekil 4.18). Bunun için 2 µl RNA örneği + 3 µl DEPC-H<sub>2</sub>O + 1 µl yükleme boyası eklendi.



**ekil 4.18.** RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü. Üst sıra; size marker, 1F, 1M1, 1M2, 1T, 2M, 2T, 2F1, 2F2, K1T, K1F, K1M, K3T, K3F, K3M1, K3M2, K2T1, K2T2, K2F, K4T. Alt sıra; size marker, K4M, K4F.

#### 4.2.2. cDNA SENTEZ

- cDNA sentezi için Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1622) kullanıldı.

##### RT-PCR

##### I. First Strand cDNA Synthesis

After thawing, mix and briefly centrifuge the components of the kit. Store on ice.

1. Add the following reagents into a sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Template RNA	total RNA	0.1 ng - 5 µg
	or poly(A) mRNA	10 pg - 0.5 µg
	or specific RNA	0.01 pg - 0.5 µg
Primer	oligo (dT) <sub>18</sub> primer	1 µl
	or random hexamer primer	1 µl
	or gene-specific primer	15-20 pmol
Water, nuclease-free		to 12 µl
Total volume		12 µl

2. *Optional.* If the RNA template is GC-rich or contains secondary structures, mix gently, centrifuge briefly and incubate at 65°C for 5 min. Chill on ice, spin down and place the vial back on ice.

### “1. Tek zincirli cDNA sentezi

Çözme i leminden sonra, kitin bile enlerini karı tırıp, santrifüj edin. Buz üzerinde saklayın.

1. Buz üstünde nukleaz içermeyen steril bir tüp içine a a ıdaki reaktifleri sırasıyla ekleyin:

Taslak RNA | toplam RNA veya poly(A) mRNA veya spesifik RNA | 0.1 ng-5 µg / 10 pg-0.5 µg / 0.01 pg-0.5 µg

Primer | oligo (dT)<sub>18</sub> primer veya rastgele hegzamer primer veya gen-spesifik primer | 1 µl / 1 µl /15-20 pmol

Su, nukleaz içermeyen 12 µl'ye kadar

Toplam hacim 12 µl

2. Opsiyonel. E er RNA GC-yönünden zengin ise veya ikincil yapılanmalar içeriyorsa, iyice karı tırın ve santrifüj edin, 5 dk boyunca 65°C’de inkübe edin. Buzda so utun, çevirin ve vialı buza tekrar koyun.”

### ekil 4.19. FermentasRevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kiti yükleme ve karı tırma oranları (a)

- cDNA sentezi için 2 ug RNA kullanılmasına karar verildi. Yukarıdaki tabloya göre her örnek için kaç µl RNA dilüsyonunun kullanılması gerekti i hesaplandı (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.3. Her örnek için protokolde belirtilen RNA/primer karı mını hazırlamak için gerekli olan bile im oranları.

Örnek ID	RNA Stok Konsantrasyon (ng/µl)	RNA Stok Dilüsyon (µl)	dH <sub>2</sub> O (µl)	Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer (µl)	Toplam Reaksiyon Hacmi (µl)
1F	232,2	8,61	2,39	1,00	12,00
1M <sub>1</sub>	242,5	8,25	2,75	1,00	12,00
1M <sub>2</sub>	258,1	7,75	3,25	1,00	12,00
1T	256,2	7,81	3,19	1,00	12,00
2M	192,9	10,37	0,63	1,00	12,00
2T	201,6	9,92	1,08	1,00	12,00
2F <sub>1</sub>	209,6	9,54	1,46	1,00	12,00
2F <sub>2</sub>	190,7	10,49	0,51	1,00	12,00
K1T	225,4	8,87	2,13	1,00	12,00
K1F	223,3	8,96	2,04	1,00	12,00
K1M	326,9	6,12	4,88	1,00	12,00
K3T	257,0	7,78	3,22	1,00	12,00
K3F	211,9	9,44	1,56	1,00	12,00
K3M <sub>1</sub>	286,0	6,99	4,01	1,00	12,00
K3M <sub>2</sub>	233,5	8,57	2,43	1,00	12,00
K2T <sub>1</sub>	569,0	3,51	7,49	1,00	12,00
K2T <sub>2</sub>	364,6	5,49	5,51	1,00	12,00
K2F**	206,6	9,68	1,32	1,00	12,00
K4T	558,3	3,58	7,42	1,00	12,00
K4M	386,7	5,17	5,83	1,00	12,00
K4F	261,7	7,64	3,36	1,00	12,00

3. Add the following components in the indicated order:

5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1 µl
Total volume	20 µl

4. Mix gently and centrifuge.

5. For oligo(dT)<sub>18</sub> or gene-specific primed cDNA synthesis, incubate for 60 min at 42°C. For random hexamer primed synthesis, incubate for 5 min at 25°C followed by 60 min at 42°C.

**Note.** For GC-rich RNA templates the reaction temperature can be increased up to 45°C.

6. Terminate the reaction by heating at 70°C for 5 min.

The reverse transcription reaction product can be directly used in PCR applications or stored at -20°C for less than one week. For longer storage, -70°C is recommended.

“3. A a ıdaki reaktifleri sırasıyla ekleyin:

- 5X Reaksiyon tamponu
- Ribolock RNaz inhibitörü (20 u/µl)
- 10 mM dNTP karı ımı
- RevertAid M-MuLV ters transkriptaz (200 u/µl)
- Toplam hacim: 20 µl

4. yice karı tırn, santrifüjleyin.

5. Oligo (dT)<sub>18</sub> veya gen-spesifik primerli cDNA sentezi için, 42C’de 60 dk. nkübe edin. Rastgele hegzamer primer sentezi için, 25°C’de 5 dk ve ardından 42°C’de 60 dk. inkübe edin.

Not: GC-bölgeleri zengin RNA için sıcaklık 45°C’ye kadar çıkartılabilir.

6. 70°C’ye 5 dk.’lı ına çıkartarak reaksiyonu sonlandırın. RT-reaksiyon ürünü do rudan PCR için kullanılabilir ya da 1 haftadan az saklama için -20°C’de muhafaza edilebilir. Daha uzun süreli saklamalar için -70°C tercih edilmelidir.”

**ekil 4.20.** FermentasRevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kiti yükleme ve karı tırma oranları (b)

#### 4.2.3. IGF-I PCR SONUÇLARI

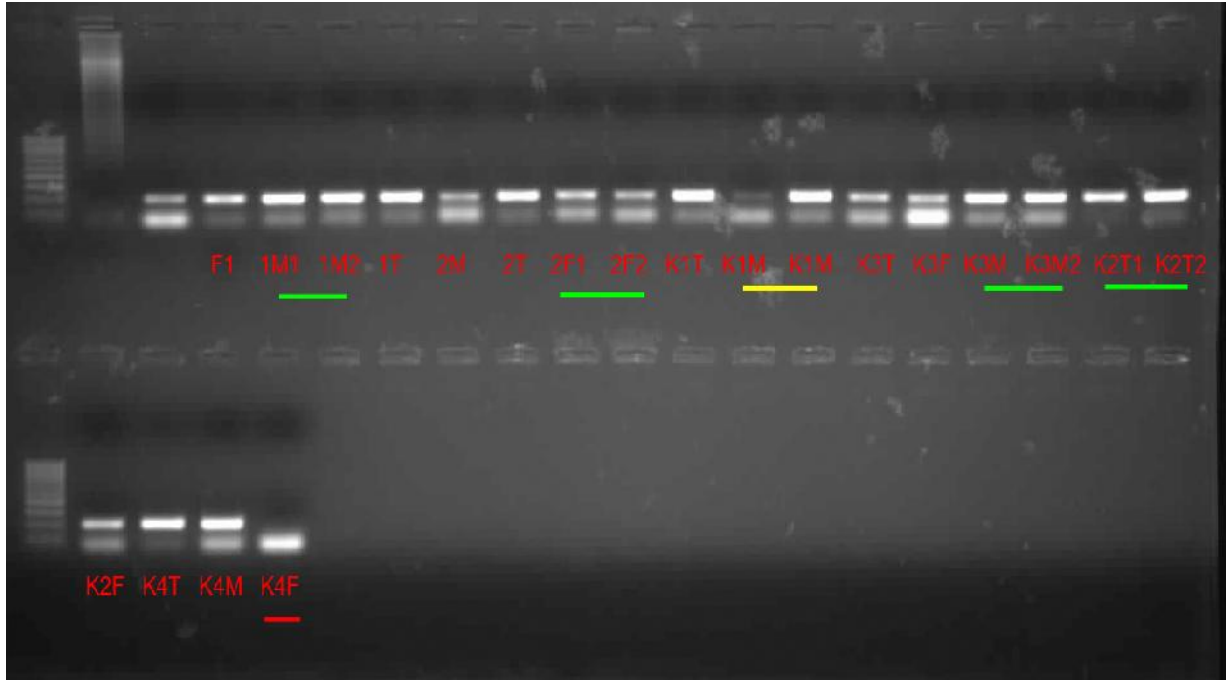
- IGF-I primerlerin T<sub>m</sub> de eri 57°C.
- Ürün Büyüklü ü: 204 bp.

**Çizelge 4.4.** IGF-I genin ço altılması için kullanılan PCR protokolü.

Kimyasal	Konsantrasyon	Miktar (µl)
Forward Primer	10 pmol/ µl	2 µl
Reverse Primer	10 pmol/ µl	2 µl
2 X PCR Master Mix	---	10 µl
dH <sub>2</sub> O	---	4 µl
DNA	50 ng/ µl	2 µl
TOPLAM		20 µl

**Çizelge 4.5.**IGF-I geninin ço altılması için kullanılan PCR programı.

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dk.	1
Deantürasyon	95°C	30 sn.	36
Ba lanma	53°C	45 sn.	
Uzama	72°C	1 dk.	
Son Uzama	72°C	10 dk.	
Sonlandırma	4°C		--



**ekil 4.21.** IGF-I geni PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü.

#### 4.2.4. NCAM PCR SONUÇLARI

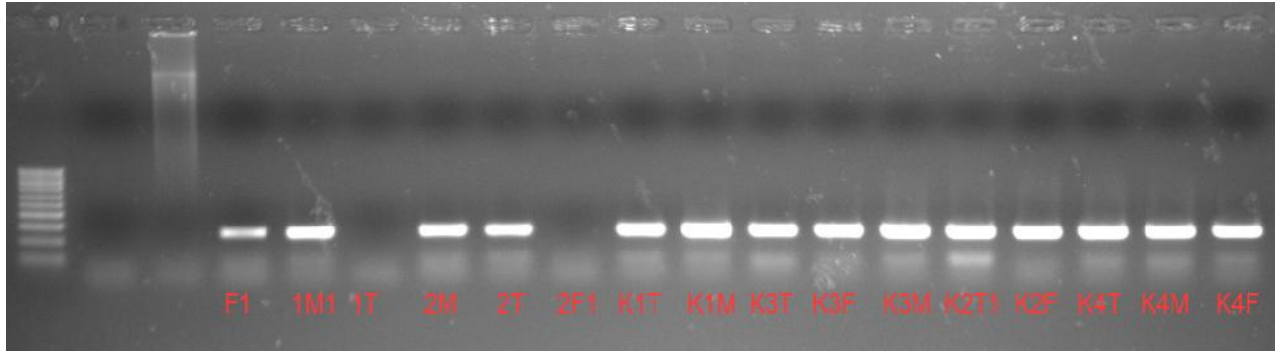
- NCAM primerlerin  $T_m$  de eri 57°C.
- Ürün Büyüklü ü: 249 bp.

**Çizelge 4.6.** NCAM genin ço altılması için kullanılan PCR protokolü.

Kimyasal	Konsantrasyon	Miktar ( $\mu$ l)
Forward Primer	10 pmol/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
Reverse Primer	10 pmol/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
2 X PCR master mix	---	10 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	---	4 $\mu$ l
DNA	50 ng/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
TOPLAM		20 $\mu$ l

**Çizelge 4.7.** NCAM genin ço altılması için kullanılan PCR programı.

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dk.	1
Deantürasyon	95°C	30 sn.	36
Ba lanma	53°C	45 sn.	
Uzama	72°C	1 dk.	
Son Uzama	72°C	10 dk.	1
Sonlandırma	4°C		--



**ekil 4.22.**NCAM geni PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü.

#### 4.2.5. VEGF-A PCR SONUÇLARI

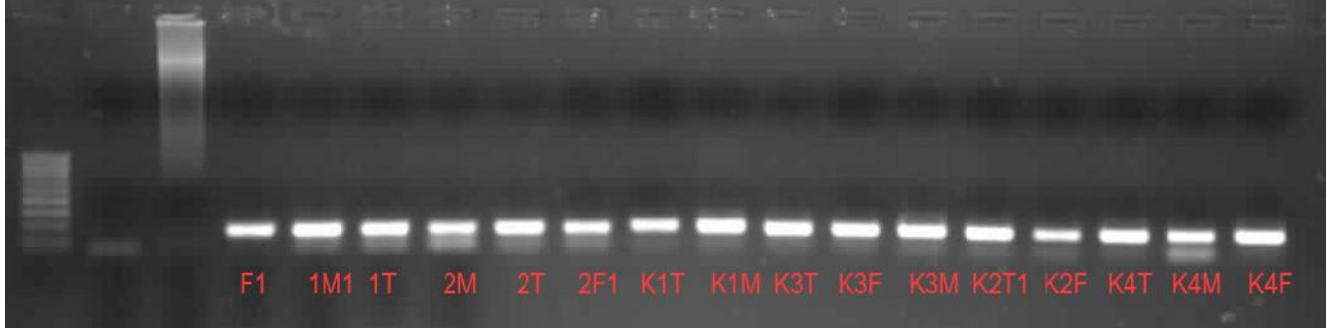
- NCAM primerlerin  $T_m$  de eri 57°C.
- Ürün Büyüklü ü: 163 bp.

**Çizelge 4.8.** VEGF-A genin ço altılması için kullanılan PCR protokolü

Kimyasal	Konsantrasyon	Miktar ( $\mu$ l)
Forward Primer	10 pmol/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
Reverse Primer	10 pmol/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
2 X PCR master mix	---	10 $\mu$ l
dH2O	---	4 $\mu$ l
DNA	50 ng/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
TOPLAM		20 $\mu$ l

**Çizelge 4.9.** VEGFA genin ço altılması için kullanılan PCR programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dk.	1
Deantürasyon	95°C	30 sn.	36
Ba lanma	53°C	45 sn.	
Uzama	72°C	1 dk.	
Son Uzama	72°C	10 dk.	1
Sonlandırma	4°C		--



**ekil 4.23.** VEGFA geni PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü.

#### 4.2.6. IGFI ve NCAM; tekrar PCR

- IGF-I ve NCAM primerlerin  $T_m$  değeri 57 °C.
- Ürün Büyüklüğü: 204 ve 249 bp.

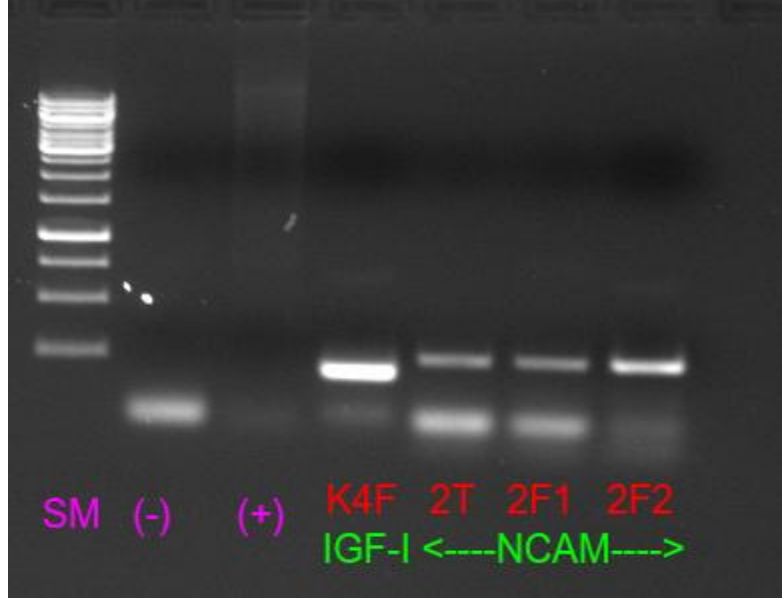
**Çizelge 4.10.** Tekrar deneyi için kullanılan PCR protokolü

Kimyasal	Konsantrasyon	Miktar ( $\mu$ l)
Forward Primer	10 pmol/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
Reverse Primer	10 pmol/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
2 X PCR master mix	---	10 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	---	4 $\mu$ l
DNA	50 ng/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
TOPLAM		20 $\mu$ l

**Çizelge 4.11.** Tekrar deneyi için kullanılan PCR programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dk.	1
Deantürasyon	95°C	30 sn.	36
Ba lanma	53°C	45 sn.	
Uzama	72°C	1 dk.	
Son Uzama	72°C	10 dk.	1
Sonlandırma	4°C		--



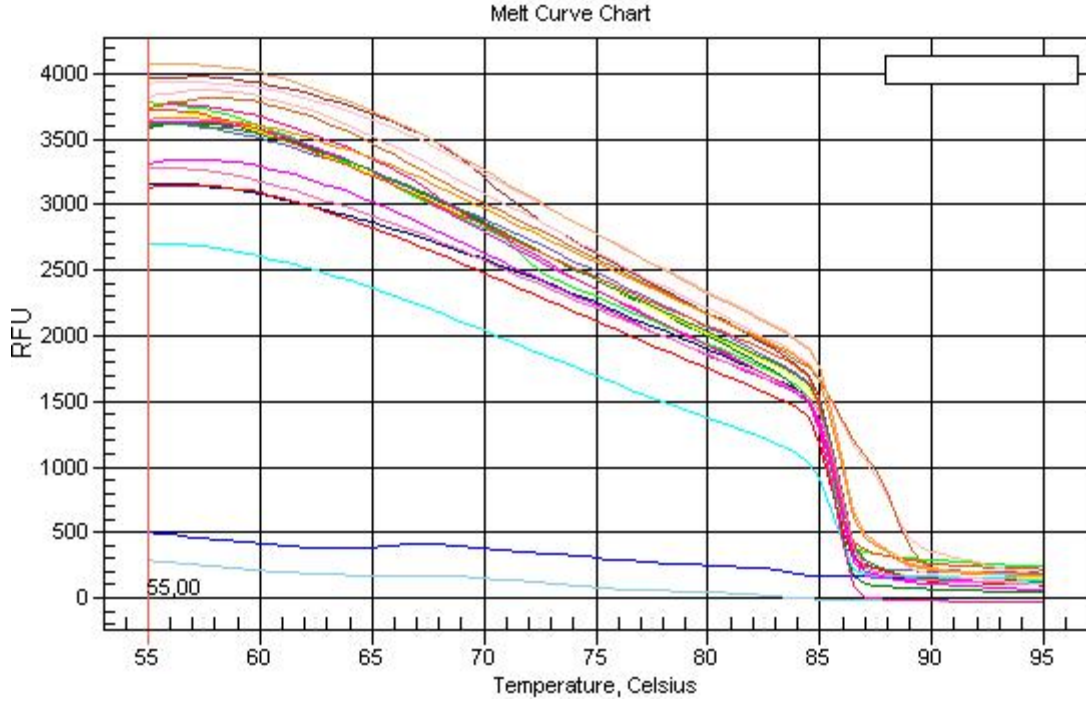


**ekil 4.24.**IGF-I ve NCAM tekrar deneyi PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü.

### 4.3. QPCR - REALTIME PCR SONUÇLARI

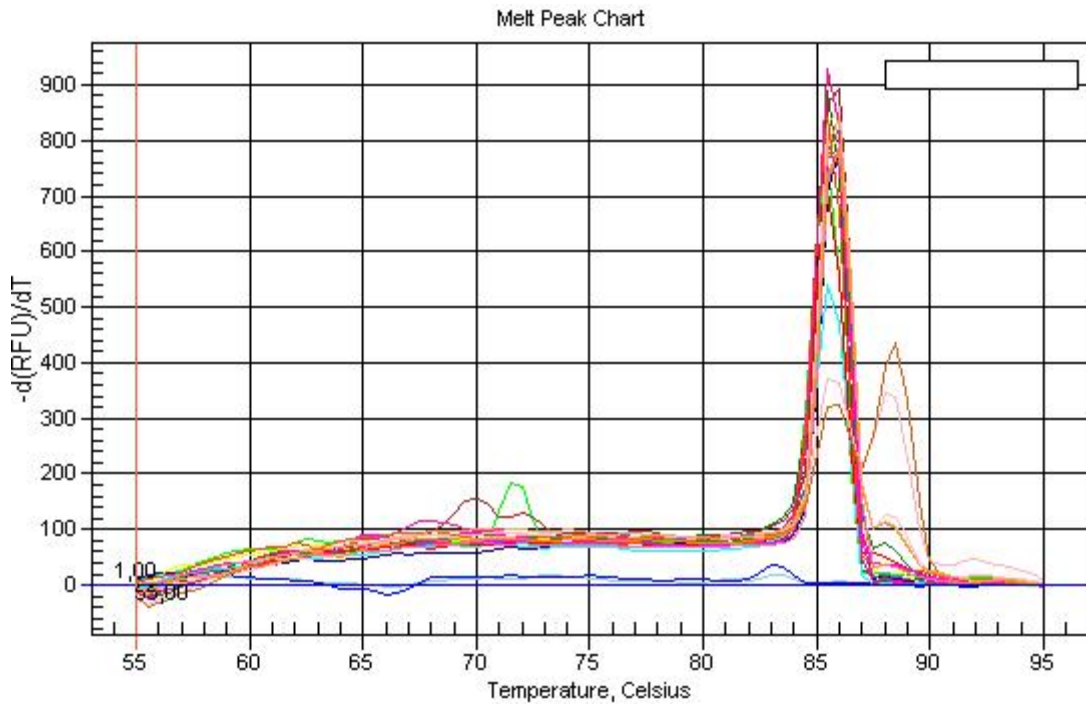
#### 4.3.1. IGF-I / CREB3 MELT QPCR

#### Melt Curve Chart (F vs T)



ekil 4.25. IGF-I ve CREB3 için erime dereceleri grafi i

#### Melt Curve Peak Chart (-dF/dt vs T)



ekil 4.26. IGF-I ve CREB3 için yükseltgenme tepe noktaları grafi i

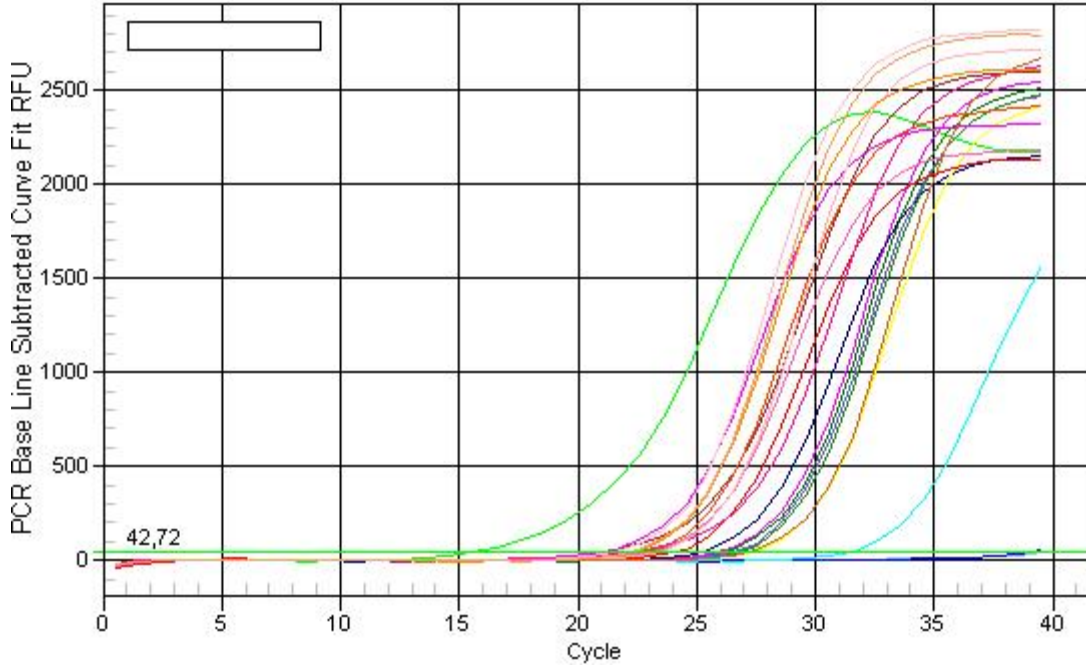
Çizelge 4.12.IGF-I için erime e risi analizi (FAM)

**Melt Curve Analysis Spreadsheet Data for FAM**

Well	Well Identifier	Peak ID	Melt temp	Begin Temp	End Temp	Begin Edit	End Edit	Peak Desc
Std 1/10 .		IGF-I - 01.0		85,50	82,00	91,00	82,00	91,00
Std 1/100 .		IGF-I - 02.0		85,50	81,50	89,00	81,50	89,00
Std 1/1000.		IGF-I - 03.0		55,50	55,00	56,50	55,00	56,50
NTC .		IGF-I - 03.1		57,50	56,50	58,50	56,50	58,50
IGF-I - 03 .		IGF-I - 03.2		59,50	58,50	60,50	58,50	60,50
IGF-I - 03 .		IGF-I - 03.3		61,50	60,50	63,50	60,50	63,50
IGF-I - 03 .		IGF-I - 03.4		70,50	67,00	71,50	67,00	71,50
IGF-I - 03 .		IGF-I - 03.5		73,00	71,50	77,00	71,50	77,00
IGF-I - 03 .		IGF-I - 03.6		78,00	77,00	79,50	77,00	79,50
IGF-I - 03 .		IGF-I - 03.7		81,50	79,50	82,00	79,50	82,00
IGF-I - 03 .		IGF-I - 03.8		83,50	82,00	84,50	82,00	84,50
IGF-I - 04 .		IGF-I - 04.0		56,00	55,00	58,00	55,00	58,00
IGF-I - 04 .		IGF-I - 04.1		58,50	58,00	60,50	58,00	60,50
IGF-I - 04 .		IGF-I - 04.2		69,00	67,50	70,00	67,50	70,00
IGF-I - 04 .		IGF-I - 04.3		71,50	71,00	73,00	71,00	73,00
IGF-I - 04 .		IGF-I - 04.4		74,00	73,00	74,50	73,00	74,50
IGF-I - 04 .		IGF-I - 04.5		75,00	74,50	78,00	74,50	78,00
IGF-I - 04 .		IGF-I - 04.6		83,00	81,50	85,00	81,50	85,00
IGF-I - 05 .		IGF-I - 05.0		85,50	81,00	87,50	81,00	87,50
IGF-I - 06 .		IGF-I - 06.0		86,00	79,00	87,50	79,00	87,50
IGF-I - 07 .		IGF-I - 07.0		86,00	83,50	87,50	83,50	87,50
IGF-I - 08 .		IGF-I - 08.0		86,00	81,00	87,50	81,00	87,50
IGF-I - 09 .		IGF-I - 09.0		86,00	82,00	87,50	82,00	87,50
IGF-I - 10 .		IGF-I - 10.0		85,50	81,50	87,50	81,50	87,50
IGF-I - 11 .		IGF-I - 11.0		85,50	80,00	87,50	80,00	87,50
IGF-I - 12 .		IGF-I - 12.0		85,50	81,00	92,00	81,00	92,00
IGF-I - 01 .		IGF-I - 01.0		85,50	81,00	91,50	81,00	91,50
IGF-I - 02 .		IGF-I - 02.0		85,50	81,00	87,50	81,00	87,50
IGF-I - 03 .		IGF-I - 03.0		85,50	81,50	87,50	81,50	87,50
IGF-I - 04 .		IGF-I - 04.0		86,00	82,00	91,50	82,00	91,50
IGF-I - 05 .		IGF-I - 05.0		86,00	81,00	87,50	81,00	87,50
IGF-I - 06 .		IGF-I - 06.0		85,50	82,00	87,00	82,00	87,00
IGF-I - 06 .		IGF-I - 06.1		88,00	87,00	90,50	87,00	90,50
IGF-I - 07 .		IGF-I - 07.0		86,00	81,50	87,00	81,50	87,00
IGF-I - 07 .		IGF-I - 07.1		88,50	87,00	91,50	87,00	91,50
IGF-I - 08 .		IGF-I - 08.0		86,00	81,00	87,50	81,00	87,50
IGF-I - 09 .		IGF-I - 09.0		86,00	81,50	87,50	81,50	87,50

## PCR Quantification Data

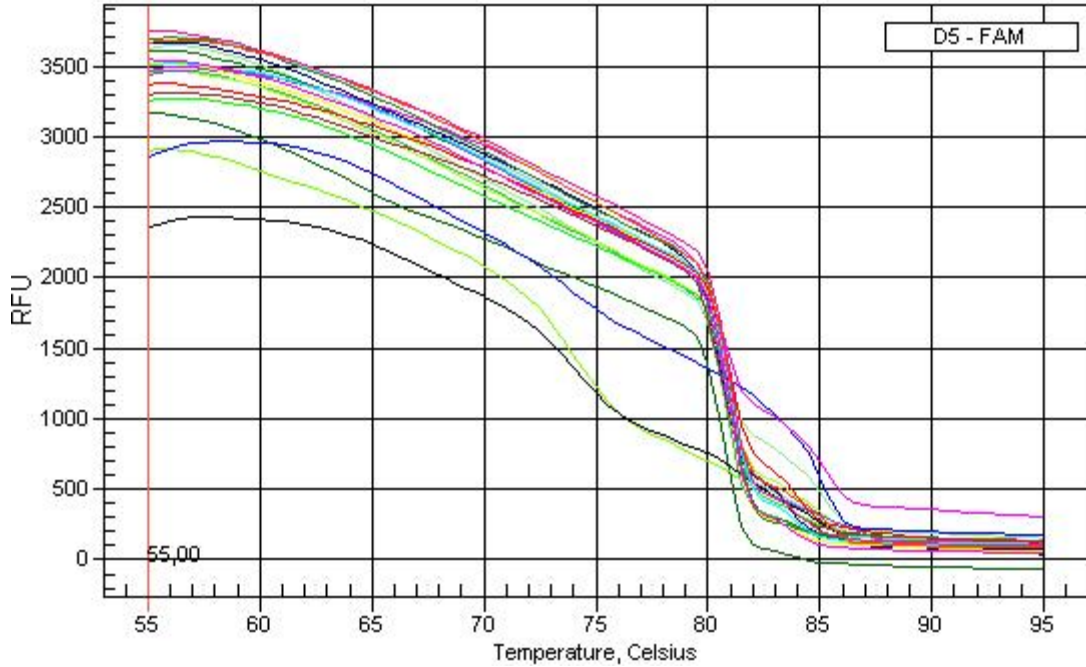
### PCR Amp/Cycle Chart Amplification Chart



ekil 4.27. IGF-I ve CREB3 için PCR döngü grafi i

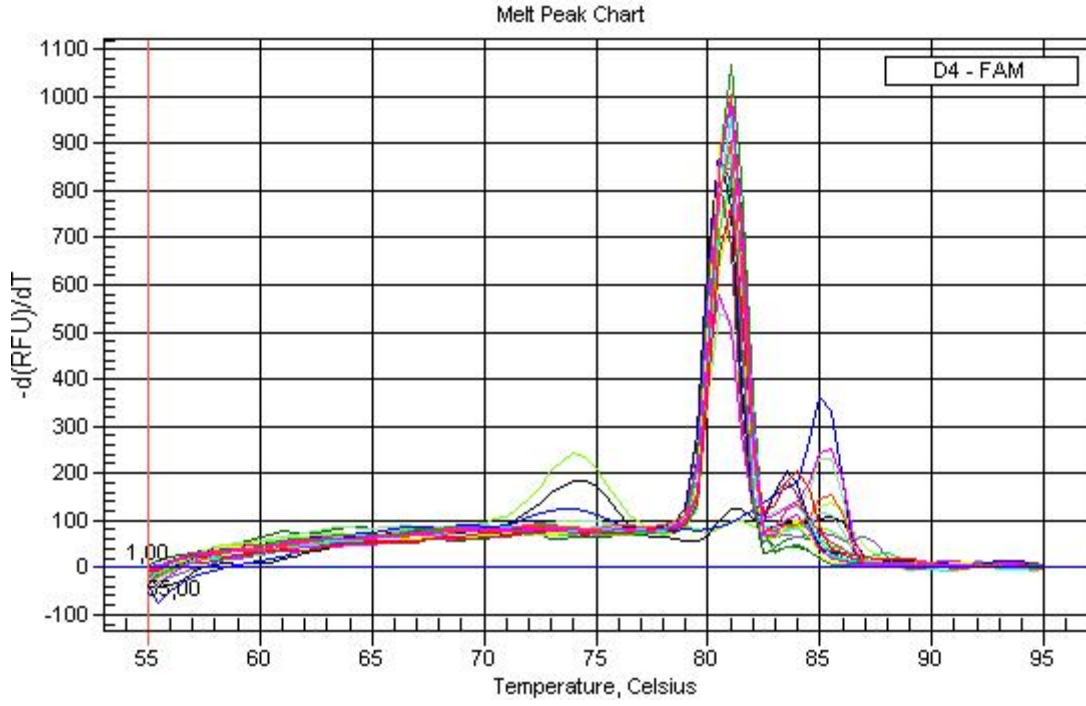
## 4.3.2. VEGF-A / HK1 MELT QPCR

### Melt Curve Chart (F vs T) Melt Curve Chart



ekil 4.28. VEGFA ve HK1 için erime dereceleri grafi i

### Melt Curve Peak Chart (-dF/dt vs T)



ekil 4.29. VEGFA ve HK1 için yükseltgenme tepe noktaları grafi i

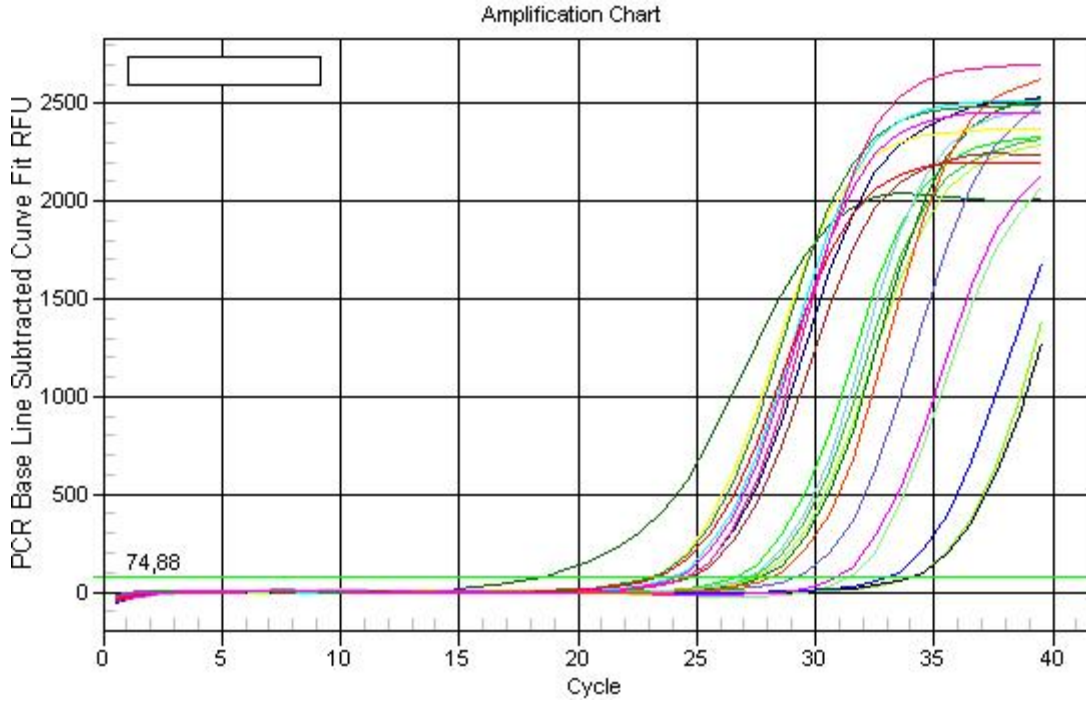
**Çizelge 4.13.** VEGF için erime eğrisi analizi (FAM)

**Melt Curve Analysis Spreadsheet Data for FAM**

Well	Well Identifier	Peak ID	Melt temp	Begin Temp	End Temp	Begin Edit	End Edit	Peak Desc
Std 1/10 82,50	.		VEGF - 01.0		80,50	75,00	82,50	75,00
Std 1/100 82,50	.		VEGF - 02.0		81,00	77,00	82,50	77,00
Std 1/1000 82,50	.		VEGF - 03.0		80,50	78,00	82,50	78,00
NTC 87,00	.		VEGF - 03.1		85,50	82,50	87,00	82,50
VEGF - 04 78,00	.		VEGF - 04.0		74,00	62,50	78,00	62,50
VEGF - 04 83,00	.		VEGF - 04.1		81,00	80,00	83,00	80,00
VEGF - 05 82,50	.		VEGF - 05.0		81,00	78,00	82,50	78,00
VEGF - 06 68,00	.		VEGF - 06.0		67,00	59,00	68,00	59,00
VEGF - 06 79,50	.		VEGF - 06.1		74,50	68,50	79,50	68,50
VEGF - 06 83,00	.		VEGF - 06.2		81,00	79,50	83,00	79,50
VEGF - 06 88,50	.		VEGF - 06.3		85,50	83,00	88,50	83,00
VEGF - 07 83,00	.		VEGF - 07.0		81,00	75,50	83,00	75,50
VEGF - 08 83,00	.		VEGF - 08.0		81,00	78,00	83,00	78,00
VEGF - 09 82,50	.		VEGF - 09.0		81,00	77,00	82,50	77,00
VEGF - 10 88,00	.		VEGF - 10.0		85,00	78,00	88,00	78,00
VEGF - 11 82,50	.		VEGF - 11.0		80,50	76,00	82,50	76,00
VEGF - 11 87,50	.		VEGF - 11.1		85,50	82,50	87,50	82,50
VEGF - 12 82,50	.		VEGF - 12.0		80,50	75,50	82,50	75,50
VEGF - 01 82,50	.		VEGF - 01.0		80,50	77,50	82,50	77,50
VEGF - 02 82,50	.		VEGF - 02.0		80,50	76,50	82,50	76,50
VEGF - 03 82,50	.		VEGF - 03.0		81,00	76,50	82,50	76,50
VEGF - 04 83,00	.		VEGF - 04.0		81,00	77,50	83,00	77,50
VEGF - 05 82,50	.		VEGF - 05.0		81,00	78,00	82,50	78,00
VEGF - 06 82,50	.		VEGF - 06.0		81,00	74,50	82,50	74,50
VEGF - 07 82,50	.		VEGF - 07.0		81,00	77,00	82,50	77,00
VEGF - 08 82,50	.		VEGF - 08.0		81,00	77,00	82,50	77,00
VEGF - 09 82,50	.		VEGF - 09.0		81,00	77,50	82,50	77,50

## PCR Quantification Data

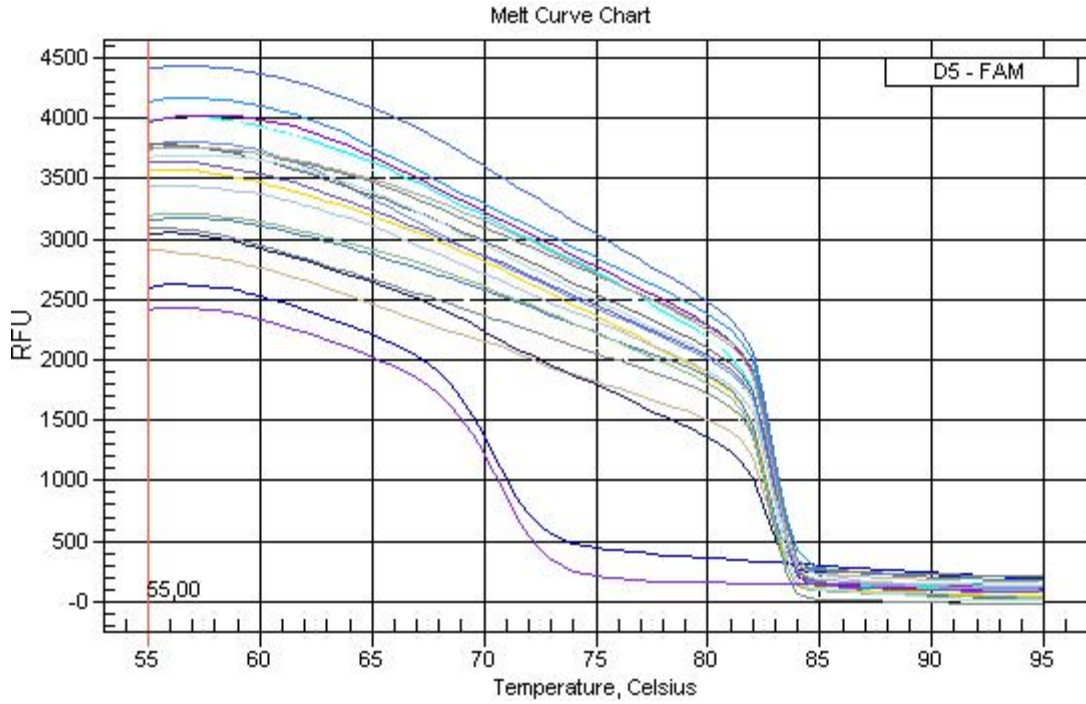
### PCR Amp/Cycle Chart



ekil 4.30. VEGFA ve HK1 için PCR döngü grafi i

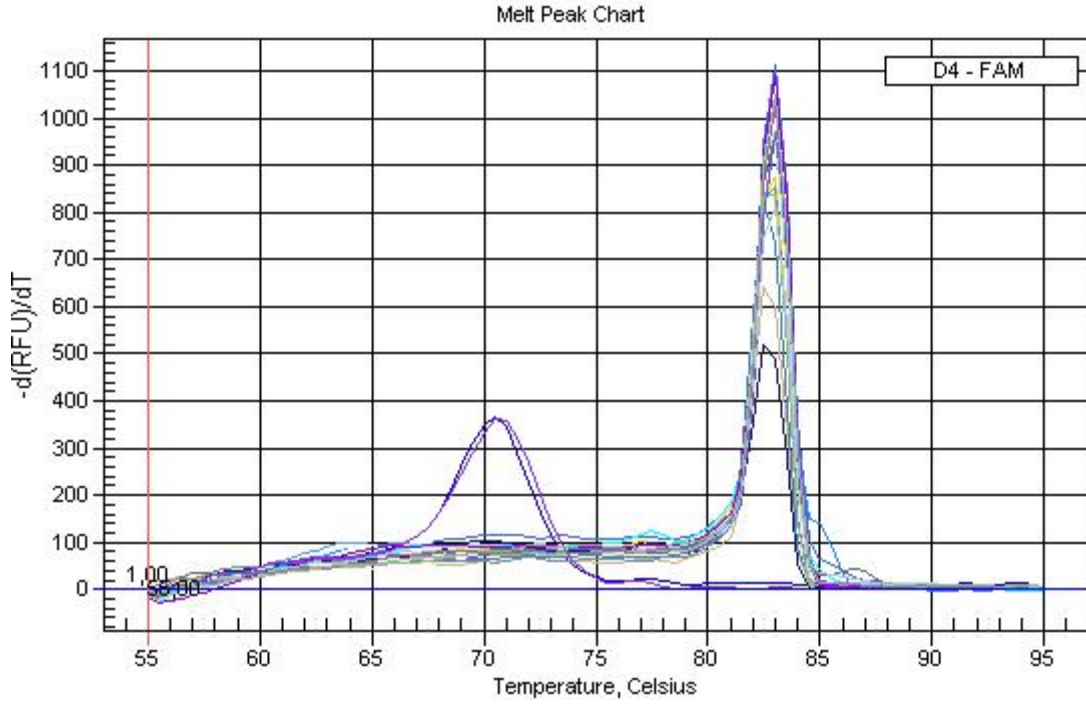
### 4.3.3. NCAM / ZFX MELT QPCR

#### Melt Curve Chart (F vs T)



ekil 4.31. NCAM ve ZFX için erime dereceleri grafi i

### Melt Curve Peak Chart (-dF/dt vs T)



ekil 4.32. NCAM ve ZFX için yükseltgenme tepe noktaları grafi i

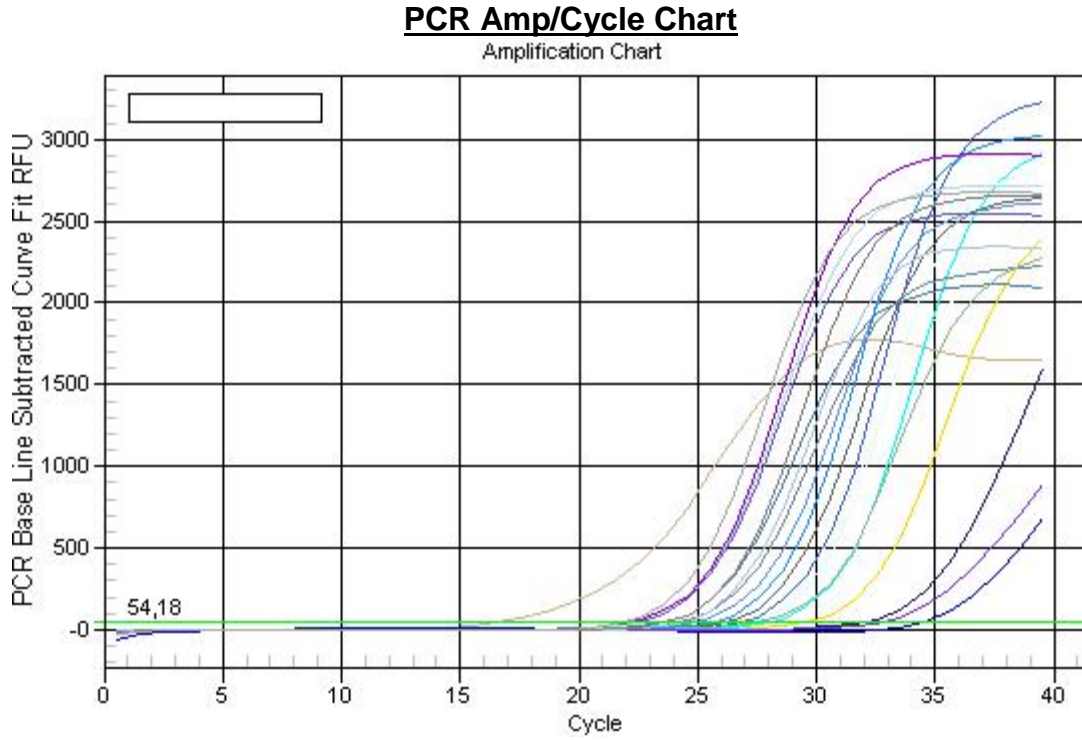


**Çizelge 4.14.** NCAM için erime e risi analizi (FAM)

**Melt Curve Analysis Spreadsheet Data for FAM**

Well	Well Identifier	Peak ID	Melt temp	Begin Temp	End Temp	Begin Edit	End Edit	Peak Desc
Std1/10 - 01		.	NCAM - 01.0		82,50	78,50	85,50	78,50
85,50								
Std1/100 - 02		.	NCAM - 02.0		83,00	78,50	88,50	78,50
88,50								
Std1/1000 - 03		.	NCAM - 03.0		83,00	79,00	84,50	79,00
84,50								
NTC		.	NCAM - 04.0		70,50	56,50	76,00	56,50
76,00								
NCAM - 05		.	NCAM - 05.0		83,00	78,50	89,50	78,50
89,50								
NCAM - 06		.	NCAM - 06.0		83,00	78,50	86,00	78,50
86,00								
NCAM - 07		.	NCAM - 07.0		83,00	78,50	86,50	78,50
86,50								
NCAM - 08		.	NCAM - 08.0		83,00	79,00	86,00	79,00
86,00								
NCAM - 09		.	NCAM - 09.0		83,00	79,00	87,50	79,00
87,50								
NCAM - 10		.	NCAM - 10.0		83,00	76,50	85,50	76,50
85,50								
NCAM - 11		.	NCAM - 11.0		82,50	79,00	84,50	79,00
84,50								
NCAM - 12		.	NCAM - 12.0		82,50	76,50	87,00	76,50
87,00								
NCAM - 01		.	NCAM - 01.0		83,00	77,00	88,00	77,00
88,00								
NCAM - 02		.	NCAM - 02.0		83,00	77,00	88,50	77,00
88,50								
NCAM - 03		.	NCAM - 03.0		83,00	78,00	85,00	78,00
85,00								
NCAM - 04		.	NCAM - 04.0		70,50	63,50	76,00	63,50
76,00								
NCAM - 05		.	NCAM - 05.0		83,00	76,00	86,00	76,00
86,00								
NCAM - 06		.	NCAM - 06.0		83,00	78,00	87,50	78,00
87,50								
NCAM - 07		.	NCAM - 07.0		83,00	78,50	91,50	78,50
91,50								
NCAM - 08		.	NCAM - 08.0		83,00	76,50	85,50	76,50
85,50								
NCAM - 09		.	NCAM - 09.0		83,00	77,00	86,00	77,00
86,00								

## PCR Quantification Data



ekil 4.33. NCAM ve ZFX için PCR döngü grafi i

### 4.3.4. REST 2009 ANAL Z SONUÇLARI

#### Relative Expression Results

Parameter	Value
Iterations	2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
CREB3	REF	0,249	0,966			
ZFX	REF	0,426	1,035			
IGF1	TRG	0,301	1,039	0,511 - 1,696	0,390 - 13,730	0,948
NCAM1	TRG	0,27	1,670	0,857 - 2,913	0,544 - 12,446	0,137
VEGFA	TRG	0,407	0,754	0,379 - 1,234	0,283 - 6,037	0,443

#### Interpretation

IGF1 sample group is not different to control group. P(H1)=0,948

NCAM1 sample group is not different to control group. P(H1)=0,137

VEGFA sample group is not different to control group. P(H1)=0,443

ekil 4.34. Relatif (Göreceli) Ekspresyon Sonuçları

#### Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
CREB3	REF	0,249	1,476	0,656 - 2,783	0,254 - 3,642	0,222
ZFX	REF	0,426	1,583	0,212 - 4,944	0,081 - 7,831	0,463
IGF1	TRG	0,301	1,587	0,528 - 4,419	0,240 - 7,121	0,218
NCAM1	TRG	0,27	2,552	1,134 - 5,812	0,536 - 7,902	0,006
VEGFA	TRG	0,407	1,152	0,474 - 3,237	0,110 - 5,532	0,755

ekil 4.35. Normalize edilmemi sonuçlar (Referans gene kar 1 hesaplama)

## 4.4. GÖRÜNTÜ ANALİZ SONUÇLARI

### 4.4.1. IMAGEJ VERİLERİ

"Gereç ve Yöntem" kısımlarında açıklandığı üzere yapılan işlemler sonucunda aşağıdaki veri setleri oluşturulmuştur.

**Çizelge 4.15.** Taraması yapılan alanlar tablosu (Örneklerin veri setleri)

IGF	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	IntDen	%Area	Sets
Neg Kont. - 1					43.851.143	93,000	1
Neg Kont. - 2					44.294.632	93,771	1
Kontrol - 1					29.360.711.000	66,503	2
Kontrol - 2					22.075.771	52,798	2
Klon - 1					11.032.441	73,181	3
Klon - 2					11.674.470	76,749	3
Klon - 3					11.392.967	75,318	3
Klon - 4					11.276.522	75,078	3
Klon - 5					7.741.132	55,942	3
Klon - 6					9.512.816	65,566	3
<b>VEGF</b>							
Neg Kont - 1					46.040.634	96,714	4
Neg Kont - 2					47.755.650	99,901	4
Neg Kont - 3					46.197.210	97,118	4
Neg Kont - 4					47.390.079	99,252	4
Kontrol - 1					22.362.294	54,134	5
Klon - 1					35.051.220	77,000	6
Klon - 2					29.749.242	67,875	6
Klon - 3					24.796.719.000	58,781	6
<b>NCAM</b>							
Neg Kont. - 1					62.276.644	98,008	7
Neg Klon - 1					63.386.935	99,521	7
Neg Klon - 2					61.880.211	97,834	7
Neg Klon - 3					63.247.194	99,352	7
Kontrol - 1					21.784.805	72,990	8
Kontrol - 2					16.498.643.000	57,518	8
Klon - 1					12.117.231	79,214	9
Klon - 2					12.180.662	79,843	9
Klon - 3					13.654.378	87,779	9
Klon - 4					6.824.697	50,237	9

**Çizelge 4.16.** Ham *ImageJ* verisi, Area %'si beyaz alanları i aret etmektedir.

	Area	Mean	Mode	Min	Max	XM	YM	BX	BY	Width	Height	Skew	IntDen	%Area
1	187500	233873	255	0	255	348527	467530	44	86	694	774	-3034	43.851.143	93,000
2	187500	236238	255	0	255	596306	476946	232	136	850	740	-3274	44.294.632	93,771
3	187500	156590	255	0	255	614975	502743	172	204	856	654	-469	29.360.711.000	66,503
4	187500	117737	0	0	255	765552	495199	210	174	924	706	154	22.075.771	52,798
5	62500	176519	255	0	255	380320	542450	248	416	250	250	-833	11.032.441	73,181
6	62500	186792	255	0	255	368062	306082	236	172	250	250	-1051	11.674.470	76,749
7	62500	182287	255	0	255	744996	141682	608	8	250	250	-952	11.392.967	75,318
8	62500	180424	255	0	255	392351	474489	268	348	250	250	-913	11.276.522	75,078
9	62500	123858	0	0	255	552213	348413	426	222	250	250	57	7.741.132	55,942
10	62500	152205	255	0	255	642814	410903	512	278	250	250	-395	9.512.816	65,566
11	187500	245550	255	0	255	656016	488602	122	118	998	794	-4903	46.040.634	96,714
12	187500	254697	255	0	255	693008	349631	148	118	1022	564	-29140	47.755.650	99,901
13	187500	246385	255	0	255	624275	463181	98	84	1052	774	-5169	46.197.210	97,118
14	187500	252747	255	0	255	429323	451809	90	120	846	670	-10522	47.390.079	99,252
15	187500	119266	0	0	255	597631	432793	70	78	1092	646	130	22.362.294	54,134
16	187502	186938	255	0	255	467051	506323	2	108	989	810	-1055	35.051.220	77,000
17	186504	159510	255	0	255	566088	354359	190	72	796	602	-519	29.749.242	67,875
18	187502	132248	255	0	255	711253	479959	116	102	983	653	-75	24.796.719.000	58,781
19	250000	249107	255	0	255	518040	466725	104	46	874	818	-6355	62.276.644	98,008
20	250000	253548	255	0	255	581888	440079	108	90	950	696	-13188	63.386.935	99,521
21	249004	248511	255	0	255	585943	482818	104	122	1008	734	-6037	61.880.211	97,834
22	250000	252989	255	0	255	572332	472042	124	106	920	742	-11201	63.247.194	99,352
23	125000	174278	255	0	255	625775	362881	162	98	852	494	-789	21.784.805	72,990
24	125000	131989	255	0	255	693172	554549	178	196	786	562	-70	16.498.643.000	57,518
25	62500	193876	255	0	255	292815	639757	174	514	250	250	-1220	12.117.231	79,214
26	62500	194891	255	0	255	380414	347701	250	224	250	250	-1247	12.180.662	79,843
27	62500	218470	255	0	255	375307	406057	250	284	250	250	-2038	13.654.378	87,779
28	62500	109195	0	0	255	992479	256415	856	132	250	250	290	6.824.697	50,237

#### 4.4.2. SPSS ANALİZLER

##### *Varyans Homojenliği ve Normal Dağılım Testleri (Explore)*

**Çizelge 4.17.** Dağılım tablosu / Normal dağılıma uygunluk, verilerin normal dağılım gösterdiği ve parametrik testlere uygun olduğu Significance değerinden anlaşılabilmektedir.

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Gruplar	28	100,0%	0	,0%	28	100,0%
Alanlar	28	100,0%	0	,0%	28	100,0%

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Gruplar	,167	28	,045	,924	28	,044
Alanlar	,161	28	,060	,907	28	,016

a. Lilliefors Significance Correction

##### *Bağımsız Örneklem T-Testi (Independent T-Test)*

#### IGF-I

**Çizelge 4.18.** IGF-I için değerlendirme tabloları

Gruplar	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Alanlar Kontrol	2	59,6505	9,69090	6,85250
Klon	6	70,3057	8,08037	3,29880

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Alanlar	Equal variances assumed	,025	,879
	Equal variances not assumed		

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
Alanlar	Equal variances assumed	-1,559	6	,170	-10,65517
	Equal variances not assumed	-1,401	1,501	,332	-10,65517

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means		
		Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
			Lower	Upper
Alanlar	Equal variances assumed	6,83435	-27,37823	6,06790
	Equal variances not assumed	7,60518	-56,36708	35,05675

**VEGF-A**

**Çizelge 4.19.** VEGF için değerlendirme tabloları

**Group Statistics**

Gruplar	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Alanlar Kontrol	1	54,1340	.	.
Klon	3	67,8853	9,10950	5,25937

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Alanlar	Equal variances assumed	.	.
	Equal variances not assumed	.	.

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
Alanlar	Equal variances assumed	-1,307	2	,321	-13,75133
	Equal variances not assumed	.	.	.	-13,75133

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means		
		Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
			Lower	Upper
Alanlar	Equal variances assumed	10,51875	-59,00986	31,50719
	Equal variances not assumed	.	.	.

**NCAM**

**Çizelge 4.20.** NCAM için değerlendirme tabloları

**Group Statistics**

Gruplar		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Alanlar	Kontrol	2	65,2540	10,94036	7,73600
	Klon	4	74,2683	16,48817	8,24409

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Alanlar	Equal variances assumed	,410	,557
	Equal variances not assumed		

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
Alanlar	Equal variances assumed	-,681	4	,533	-9,01425
	Equal variances not assumed	-,797	3,190	,480	-9,01425

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means		
		Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
			Lower	Upper
Alanlar	Equal variances assumed	13,24248	-45,78127	27,75277
	Equal variances not assumed	11,30534	-43,81182	25,78332

## SPSS Sonuçlarının De erlendirilmesi

Her üç molekülün ICC boyamasının alan yüzdeleri ortalamalarının de erlendirilmesi sonucu  $H_0$  hipotezi,  $p > 0,05$  için (%95); kontrol ve klon plasenta grupları arasında istatistiki anlamlı bir fark olmadığı yönünde kurulmuştur. Significance, yani geçerlilik de erlendirmesi tüm moleküllerde %95 ihtimalle boyanma yüzdelerinin aynı olduğunu ifade etmektedir. Bu sebeple  $H_0$  hipotezi kabul edilmekte ve grupların ICC (+) alanlarının ortalamaları üzerinde anlamlı bir fark olmadığı, di er bir de i le hem klon, hem de normal bireylerin boyanma miktarlarının aynı olduğunu söylenebilir. Burada analiz yapılırken imajlar siyah-beyaz hale ve ikili (binary) verileri halinde incelenmektedir. ImageJ programı beyaz alan yüzdelerinin ortalamasını alarak bilgi oluşturmaktadır. statistik yapılırken de boyanmayan alanlar üzerinden gidilmiştir, ancak tersi durum da matematiksel olarak doğrudur. Veri seti tablolarında sunulan örnekler ise %90 üzeri biçimde beyaz alan içermekte, yani neredeyse artefaktlar haricinde hiç boyanmamış alan içermemektedir. Bu analiz için kullanılan kesitler sadece ICC ile muamele edilmiş, negatif olanlar ise antikorlarındaki amaçlara tabi tutulmuştur. Bu sebeple DAB kalıntısı vb. boyanmamış alanların miktarında negatif örnekler için yüzdesel de i şime sebep olmuştur. Bu örnekler istatistik olarak de erlendirilmemiştir.



## 5. TARTI MA

1997 yılında Wilmut ve arkadaşları ilk kez ergin bir canlıdan alınan hücreden, klonlanan bir canlıyı dünyaya duyurdular. Bu açıklama gerçekten önemli bir gelişme idi, SCNT metodu ile artık bir canlının klonlanmasının biyolojik olarak mümkün olduğu anlaşıldı. Bununla beraber memeli hücrelerinin totipotent olduğu ve klonlamada kullanılması halinde bu özelliği gösterebileceği anlaşıldı. Klonlanan canlı Dolly, nükleer bir genom ve sitoplazma içeren hücrenin varlığında meydana getirilmiştir (Edwards J.L. ve ark. 2003).

Nükleer transfer ile elde edilen embriyolar donör nükleus ve alıcı sitoplazma etkileşimi ile yeniden yapılanmıştır. Sitoplazmik kinaz aktivitesi, MPF, maturasyon promotör faktörünün kromozomal hasar oluşturabileceği ve yeniden yapılandırılmış embriyolar üzerinde aneuploidi oluşması muhtemeldir (Campbell K.H.S. ve ark. 1996). Bununla beraber transfer edilen hücre içindeki sitoplazma organelleri içermektedir, bu organellerden mitokondriler de genetik materyal taşımaktadır (Ricchetti, M., Fairhead, C. and Dujon B. 1999) ve bu materyal maternal olarak klonlara aktarılmaktadır.

Somatik hücrenin ooplazmanın kontrolünü ele almasının ne şekilde olduğu oldukça kompleksdir. Ooplazmanın yeniden programlanma mekanizmaları hakkında pek az şey bilinmektedir. Bu durum da klonlama başarısının düşük olmasına ve bu durumun nedenselliği hakkında ilerleme kaydedememize neden olmaktadır. Örnek olarak Dolly, 277 deneme sonucunda (%0,3 başarı) elde edilmiş bir klonudur. Klonlama sonucunda yavru ve gelişimine devam eden bir soy yaratmak bütün prosedürleri de erlendirmek neticesinde mümkün olmaktadır (Edwards J.L. ve ark. 2003).

Migliano'ya göre klon ve normal plasentalar arasında mikroskobik ve/veya makroskobik farklar olabileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte her plasentadan alınan kesitlerden elde edilen HE boyama sonuçlarında normal ya da klon plasentalar arasında mikroskobik bir fark gözlenmemiştir. Şekil 4.1.'de verilmiş olan Efe adlı ilk canlı doğum sonucu meydana gelen klon canlıya ait plasentanın yapısı tıkkız ve morfolojisi normal biçimdedir. HE boyaması neticesinde nükleus yapıları belirgin, hücre ve doku sınırları nettir. Aynı şekilde kontrol amaçlı alınmış olan Şekil 4.5. ve 4.6.'da bireylerin plasentalarında da aynı düzgün yapılanma gözlenmektedir. Şekil 4.2. ile 4.4. klon örneklerinde de ıkk mikroskobik olarak kontrol örneklerinden farklı bir yapı gözlenmemiştir. İkk mikroskopi bulgularına göre plasentomlar,

interplasentom alanlar, kotiledon yapısı ve interkotiledonal alanlar Miglino'nun bulgularına zıt olarak normaldir (Miglino M. A. ve ark. 2007); bununla birlikte Miglino'nun çalı masındaki umblikal kord anomalilerinin görülme ihtimali yüksektir, ancak bu konuda çalı ma yapılmadı ı için bu konu bulgulanılmamı tır.

Makroskobik olarak plasentalar arasında gözle görünen bir farklılı a da rastlanmamı tır. Ancak, bu çalı ma kapsamında foto raflanarak veya morfometrik analizler yapılarak herhangi bir de erlendirmede bulunulmamı tır. Kullanılan tüm klon plasentalar sezeryan operasyonunda ve sonrasındaki normal retansiyon i lemi esnasında alınmı , normal plasentalar ise bütün olarak örnekenmi tir. Makroskobik olarak umblikal kord'lar tüm bireylerde normalden daha geni görülmekle beraber özellikle, son do umu gerçekle en di i Nilüfer ve Kiraz adlı klon bireylerde ve erkek klon Efe'de normalden daha kalın olarak görülmü ancak detaylı de erlendirilmemi tir.

Genel olarak, klonlamanın ilk a aması kaynak hücrenin verici hayvandan temini eklindedir. SCNT'de kullanılabilcek hücre tipleri farklı farklıdır. Sı ırlarda kümünlüs hücreleri, fibroblastlar, granülosa hücreleri, meme bezi hücreleri, kas, ovidukt ve uterus hücre tipleri kullanılmı tır. Bununla birlikte sinir dokuya ait hücreler kullanıldı ında geli im yakla ık 8. günde durmaktadır. Bu durum NCAM içeren ve sentezleyebilen Schwan hücrelerinin SCNT kullanımı ile saptanmı tır (Wakayama T., 1998). Placenta geli iminde sinyal ta ıma görevi de yapabilece i dü ününlü NCAM molekülü bu yönden de erlendirilmemi tir (Paratcha, G., Ledda F., Ibanez F. 2003).

Ruminantlar bilindi i üzere kotiledonlu bir plasentaya sahiptirler ve geni tek bir alan yerine maternal ve fetal damar sistemlerinin ili kisini sa layan fetal kısımda bir kotiledon ve maternal kısımda kranunkül bulunmaktadır. Plasentasyonun ba langıcında yani implantasyon a amasında trofoblast hücrelerinin gerekli yapı ma ortamını hazırlamakta daha yetersiz olabildikleri gösterilmemi tir (Farin P.W., Piedrahita J.A., Farin C.E. 2006). Bu hücreler ayrıca gebelik ile ili kili proteinlerin sentezi ile de ili kilidir (Arnold D.R. ve ark. 2008). IGF-I ve IGF-II insüline yapı olarak benzer protein tabiatında maddeler, VEGF familyası yine glikoprotein tabiatında maddeler ve son olarak NCAM de protein yapısında olan maddelerdir. Bu hücrelerdeki anormalliklerin protein sentez mekanizmalarında sorunlara yol açarak, bu çalı mada incelenen maddelerin miktarlarına etki edebilece i dü ünülmü ancak bulgulanılmamamı tır (Ravelich, S., 2004). Kotiledonların ve interkotiledonal alanların

sa lıklı incelenmesi için örnekler plasentom birimleri halinde alınmı , ek olarak çe itli zarlar da incelemeye tabi tutulmu tur.

Bu faktörler göz önüne alındı ında klonlama çalı malarında karanlık ve çözülmesi gereken noktalar oldu u anla ılmaktadır. Klonlama a amasındaki sorunların giderilmesi için çe itli alanlarda çalı malar halihazırda devam etmektedir. Yapılan bu çalı ma kapsamında plasental ve fetal geli ime etkisi oldu u bilinen IGF (Fowden, L.A. 2003; Gardner R.L., 1999), VEGF (Miles, J.R., 2004), NCAM (Takeichi, M.1988; Krueger, N.X., Streuli M. and Saito H. (1990) etkileri klon ve normal plasentalarda kar ılıklı olarak bulgulanmı tır.

Anadolu Sı ırının Klonlanması Proje çalı ması kapsamında ise, enükleasyon uygulanacak olan oositler mezbaha materyali olarak getirilen ovaryumlardan aspirasyon yöntemi ile toplanmı , TL-HEPES medyumunda yıkanan oositler, daha sonra maturasyon medyumunda ve mineral ya ile kapatılarak 16-18 saat % CO<sub>2</sub> sa layan inkübatörde 38,5-39°C'de inkübe edilmis tir. Hoechst 33342 boyası ile UV ı ık ve filtre altında invert mikroskopta ilk polar body ve metafaz II plate'i aspire edilmis tir. ( 15 µm iç çapında pipet vasıtasıyla). Bu sırada hücre G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında durdurulmu bulunmaktadır. Aspirasyondan sonra aynı mikropipet vasıtasıyla DNA kayna ını olu turacak hücre, oositin perivitellin bo lu una verilerek TCM-199 ve FCS ile muamele edilerek füzyona kadar inkübe edilmis tir.

Yakla ık bir günlük inkübasyondan sonra hücre-oosit kompleksleri 100 mm petri içinde Zimmermann füzyon medyumuna aktarılır ve iki elektrod arasında 133V 25-30 µs süresince füzyona tabi tutulmu tur. Füzyon i leminden 2 saat sonra embriyolar aktivasyon medyumuna alınmı ve 10 dk. inkübe edildikten sonra TCM-199, %10 FCS, 5 µg/ml cytochalin B ve 10 µg/ml cycloheximide içeren medyumda bir saat inkübe edilirler. Daha sonra TCM-199, %10 FCS ve 10 µg/ml cycloheximide içeren % CO<sub>2</sub>'e ek olarak O<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona devam edilir ve blastosist a amasına kadar geli en embriyolar transferine yönelik hazırlanmaktadırlar (Arat S. ve ark. 2010, 2011).

Bu projede hem Uluda Üniversitesi, hem de stanbul Üniversitesi Veteriner Fakülteleri'nde senkronize edilmis alıcı ineklere çok sayıda blastosist ve nadir de olsa morula safhasında embriyo transfer edilmis tir. Klon embriyolar TÜB TAK MAM Gen Mühendisli i ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Hayvan Geneti i ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarı'nda üretilmi tir. Efe için Uluda Üniversitesi Veteriner Fakültesinde bulunan Boz Irk bo adan;

Ece, Ecem, Nilüfer ve Kiraz için ise Yalova'daki bir bireyden doku örneği alınarak HGÜ laboratuvarında hücre izolasyonu yapılmış bu hücreler çoğaltılarak hücre bankasına konmak üzere dondurulmuştur. Hücrelerin bir kısmı test edilmek amacıyla "Anadolu Yerli Sırlarının Klonlanması" projesinde DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu maksatla, HGÜ laboratuvarında in vitro olarak olgunlaştırılan yumurta hücrelerinin çekirdekleri çıkarılmış ve her yumurta hücresine bir hücrenin çekirdeği verilerek çekirdek transferi gerçekleştirilmiştir. Yedi gün boyunca kültüre edilen klon embriyolar blastosist dönemine geldiklerinde tabii olarak inkübatör içinde İstanbul ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliğine gönderilmiş ve orada üniversite personeli tarafından alıcılara transfer edilmiştir. Bu bağlamda .Ü'ne gönderilmiş olan klon embriyolardan 3'ü sağlıklı olarak doğuma kadar gelişmiş ve önce Efe, sonra Ece ve Ecem dünyaya gelmiştir. Yine U.Ü.'e gönderilmiş olan klon embriyolardan 2'si sağlıklı olarak doğuma kadar gelişmiş ve önce Nilüfer, sonra ise Kiraz dünyaya gelmiştir. Bu proje çerçevesinde TÜB TAK MAM Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarı'nda 250'nin üzerinde klon embriyo üretilmiş bunların bir kısmı dondurulmuş ve saklanmış bir kısmı ise doğuma gelişmeleri için iki üniversitedeki alıcı hayvanlara transfer edilmiştir. (Arat S. ve ark. 2009; 2011).

Literatürde de aktarıldığı üzere yapılan bu transferler neticesinde zaman zaman gebelikler oluşmuş olmakla birlikte çoğu gebelik ilk trimesterde sonlanmıştı (Hill J.R., ve ark. 2000). İkiz gebelik de son trimestere gelişmesi olmasına rağmen ölü doğum riski sebebiyle sonlandırılmış, anne de kurban edilmiştir. Son olarak ise bir gebelik de mummifiye doğum olarak gerçekleşmiş, plasenta ya da buzaının materyal olarak kullanımı söz konusu olmamıştır. Bununla beraber proje süresince 5 adet canlı buzağı dünyaya gelmiştir. Tüm doğumlar sezeryan ile gerçekleştirilmiş, bir doğumda buzaının nefes almaması dışında tıbbi açıdan sıkıntılı bir durum olmamıştır. Doğum sonrası bakımları yapılan buzağılar, 2013 yılında da yaşamlarını sürdürmektedirler.

5 canlı doğum neticesinde, bir gebeliğin ikiz olması nedeniyle tek taşıyıcı anne üzerinde toplam 5 adet plasenta elde edilmiştir. Bu ikiz plasenta, plasenta amiasında ayırt edilememesi ve tek bir plasenta gibi değerlendirilmiştir. Buna ek olarak daha önce gebeliği sonlandırılan bireylerin ikisinin de (Klon 1 ve Klon 2) plasentaları fikse edilebilmesi ve çalışmaya dahilinde histolojik analizlerde kullanılmıştır. Kontrol grubu oluşturulması açısından 2 normal (veya IVF) döllenme ve doğum yapmış olan inekten de plasenta alınmış ve çalışmaya dahil edilmiştir. Normal örnekler Holstein ırkına sahip, süt amaçlı kullanılan hayvanlardır. Klon olarak

kullanılan bireyler ise Anadolu Boz Sı ır ırkına aittir (Arat S. ve ark. 2011).

nsülin benzeri büyüme faktörleri IGF-I ve IGF-II do uma kadarki tüm a amalarda fetus plasenta geli iminin düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar. Bu faktörler plasentayı da içeren fetal dokularda metabolik, mitojenik ve farklı tırıcı etkilere sahiptir. Normal gebeliklerde IGF-II'nin ekspresyonu gebeli in ortasından sonuna kadar IGF-I'den daha fazladır (Fowden L.A., 2003). IGF-II'nin normalden dü ük ekspresyonu küçük plasenta ile sonuçlanırken a ır ır ekspresyonu ise büyük plasenta ile sonuçlanır (Gardner R.L. ve ark, 1999). Sı ırlarda klon plasentolarda IGF-I ve IGF-II'nin miktarı kontroller ile aynı bulunmu tur (Ravelich, S. ve ark, 2004).

ekil 4.7. ve ekil 4.8. aynı bölgeden pe pe e alınmı kesitlerin boyanması neticesinde elde edilmit ir. ekil 4.7. maternal dokunun negatif kontrolü iken, 4.8 aynı dokunun IGF primerleri ile pozitif boyanması sonucu ortaya çıkmı tır. Net olarak doku içi boya da ılımları görülebilmekte, dokunun siliar tabiattaki distal kesimlerinde IGF-I boyanması daha yüksek seviyede saptanmaktadır. ekil 4.11.'deki kontrol grubu canlının plasentasında da geni olarak IGF-I boyanması saptanmaktadır. ekil 4.9.'da tam bir plasentom kesiti Klon 1 bireyinden alınarak boyanmı ve özellikle maternal kısımda daha yo un IGF-I boyanması saptanmı tır. Ravelich'in bulgularıyla bu çalı ma kapsamında elde edilen veriler örtü mektedir.

Çizelge 4.4 ve 4.5'te verilen IGF-I için PCR programı ve protokolü neticesinde elde edilen PCR ürünleri jel elektroforezine tabi tutulmu , ekil 4.19'daki jel görüntüsü elde edilmi tir. Bu jel görüntüsüne göre size marker'ın normal ko mu olması elektroforezin ba arılı oldu unu göstermektedir. Ayrıca tam genom pozitif kontrol sı ır DNA'sı da jelde normal açılım göstermi tir. Kodlanan ve farklı bölgelerden alınan PCR ürünlerinde aynı kD miktarında bantla ma görülmü ve IGF-I primerinin do ru bölgeyi ço altarak elektroforezde bantla ma gösterdi i anla ılmı tır. K1M örnekleri fazla miktarda oldu u için iki tüpte ve iki kuyuda ko turulmu ancak birinci örnekte bantın silik olması manipulasyon hatası olarak de erlendirilmi tir. Yine K4F örne i bant göstermemi , bunun nedeni de master mix'teki hata olarak saptanmı tır. Daha sonra K4F örne i tekrar PCR'la ço altılmı ve sonuç elde edilmi tir ( ekil 4.22.) Elde edilen moleküler sonuçlar literatür kaynakları ile de uygunluk göstermektedir (Fowden A., 2003).

PCR ile ço altılan ve elektroforezde bant gösteren örnekler arasında yükseltgenme

döngüsü açısından bir fark olup olmadığını saptamak için örnekler realtime-PCR ile test edilmiştir. Gereç ve Yöntem kısmında detaylı anlatılmış üzere kuyucuklara yüklemeler yapılmış ve yükseltgenmesi bilinen gen bölgelerine karşı test edilmiştir. Çizelge 4.12'de IGF için standartlar ve NTC de dahil olmak üzere; erime sıcaklıkları, döngü sayıları bilgileri verilmiştir. Ekil 4.25'de ise PCR amplifiye sonuçları görsel olarak yorumlanmıştır. Bu sonuçlara göre beklendiği üzere tüm klon ve normal plasenta örnekleri, dokunun tipine göre farklı döngülerde amplifiye olsalar da amplifiye olmayan örnek olmamıştır. Daha sonra bu veriler ikincil bir analize REST 2009 ile test edilmiştir.

Plasentada vaskularizasyon önemli bir etkidir ve bu da angiogenesis ile bağlantılıdır. Angiogenesis; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile düzenlenir. Erken plasental dönemlerde immünohistokimyasal olarak VEGF protein varlığı yüksek miktarlarda gösterilmiştir. Gebeliğin geç dönemlerinde de VEGF proteini esas olarak mikrodamarlarda ve maternal karunkular villüslerde gösterilmiştir. Yapılan çalışmada in vitro ve in vivo üretilmiş embriyolardan gelişen yavrulara ait plasentalarda VEGF protein ekspresyonu açısından fark bulunmamıştır. (Miles, J.R. ve ark., 2004). Sırasıyla klonlama ile ilgili aktarılan bilgiler özet olarak değerlendirildiğinde, bazı çalışmalarda plasentalardaki anomalilerin özellikle doğum öncesinde bazı kayıplarına neden olabildiği gösterilmiştir. Ayrıca normal doğumla sonuçlanan bireylerde de bazı anomalilerin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma kapsamında değerlendirilmemiş olmakla birlikte bazı umbikal kord anomalileri bahsi geçen 5 bireyde de gözlemlenmiştir. Umbikal kord anomalilerinin VEGF ile ilişkili olabileceği düşünülmekle birlikte bu çalışma kapsamında umbikal kord üzerinde VEGF bakımından inceleme yapılmamıştır.

Yapılan diğer bir çalışmaya göre SCNT sonucu elde edilen klon canlılar ve onların plasentalarında klinik olarak değerlendirilebilecek bazı anomaliler saptanmıştır. Bu anomalilerin bir kısmı gebeliğin erken evrelerinde ultrason ile tespit edilebilmektedir. İlk mikroskopik olarak bakıldığında plasenta gelişimindeki damar bozuklukları VEGF sisteminin ekspresyon bozuklukları ile ilişkilendirilmektedir. VEGF'nin eksik sentez edilmesi sonucu oluşan plasentomlar ve bazı gebeliklerde de ödem oluşumu bildirilmiştir. Genel olarak SCNT esnasındaki el manipülasyonlarının embriyo gelişimine etki ettiği ve bu sonuçları doğurduğu belirtilmektedir (Arnold D.R. ve ark. 2008).

Klon Embryo'da feto-maternal alanda (Ekil 4.13.) yapılan boyamada, gerek damar

çeperlerinde gerekse de yeni geli en siliar bölgelerde VEGF boyamasının yo un oldu u saptanmı tır. ekil 4.12. gibi negatif kontrol örneklerinde ise counterstain yapılmadı ı zaman damar yapılarını ayırt etmek bile zordur. Di er örneklerde de benzer ekilde damar çeperi daha yo un olarak boyanmakta, yer yer di er doku kısımlarında benzer boyanmalar gerçeikle mekle birlikte, damar çeperi kadar yo un ICC boyaması söz konusu olmamaktadır. Bu durum da, VEGF ICC boyamasının do ru bölgeleri hedefledi i ve yalancı boyamaya sebep olmadı ı sonucunu bildirmektedir. Bununla birlikte ven ve arter yapıları içindeki eritrositler do rudan DAB ile etkile ime girerek koyu renk almakta ancak bu durum de erlendirmeler esnasında saptanarak göz ardı edilmektedir.

IGF-I gibi VEGF için de çizelge 4.8 ve 4.9'da belirtilen protokol ve program uygulanmı tır. Bunun neticesinde ekil 4.21'deki jel görüntüsü elde edilmi olup, tüm örneklerde küçük görsel de i iklikler olmasına kar ın VEGF PCR ürününe ba lı tek bant olu mu , bu durum hem primerin spesifik oldu unu göstermi , hem de tüm örneklerde VEGF bulundu unu ispatlamı tır. Bu set içinde tekrar örne ine gerek görülmemi tir. Benzer çalı malardaki literatür bulgularla da sonuçlar örtü mektedir (Miles, J.R., 2004).

VEGF için de beklendi i ekilde RT-PCR sonuçları çizelge 4.13'de verilmi ve ekil 4.30'taki RT-PCR amplifiye grafi ine göre yükseltgenmeyen (amplifiye olmayan) herhangi bir örnek bulunmamakta, NTC ise yükseltgenme göstermeyerek negatif kontrol görevini yerine getirmi tir. Buradan alınan bilgiler de yine REST 2009 programında analize tabi tutulmu tur.

implantasyon ve plasantasyon, ardından da fetus geli imi esnasında maternal ve fetal tarafta yo un bir hücre profilerasyonu ve differansiasyonu olmaktadır. Bu durumun kontrolünde protein fosforilasyon mekanizmaları ile sinyal iletimi söz konusu olmaktadır. Bu sinyal iletimini sa layan domain'lerde NCAM benzeri adhezyon moleküllerinin varlı na i aret edilmektedir (Krueger, N.X., Streuli M. ve Saito H. 1990). Bununla birlikte sı ırlarda NCAM ve plasenta arasında yapılmı fazla çalı ma bulunmamaktadır.

NCAM boyanması da plasentom genelinde ekil 4.16'da VEGF gibi damar çeperlerinde yo un olmakla birlikte doku içi hücresel alan yayılımı VEGF'den daha yüksek boyanmayla gösterilmi tir. NCAM hücresel yo unlu un bulundu u kotiledonal bölgelerde hücre yüzeylerinde gözlenmekte, ancak kollajen materyalin daha yo un oldu u bölgelerde lifler üzerinde saptanmamaktadır. Bu durumun liflerin NCAM primer boyasında afinitesinin dü ük

olması ile açıklanabilir.

Çizelge 4.6 ve 4.7'de belirtilen protokol ve program dahilinde uygulanan PCR çalışması neticesinde NCAM PCR ürünleri ekil 7.5'te görüldüğü gibi gösterilmiştir. Ancak 1T (Normal-total plasenta), 2F1 (2. örnek normal fetal plasenta) örneklerinde bantla ma saptanmamıştır. Manipülasyon hatası olabileceğinden ünlülerek her iki örnek 2F örneğinin birinci deneye eklenmeyen ikinci tüpü ile (2F2) birlikte tekrar PCR'a tabi tutulmuş ve diğer IGF-I örneği ile jele yüklenmiştir. Sonuç olarak 2T ve 2F1 örneği zayıf da olsa bant göstermiştir. 2F2 örneği ise daha kuvvetli (parlak) bir bant göstermiştir. Aynı materyalin 2 farklı parlaklıkta bant göstermesi aykırı bulunmakla birlikte manipülasyon hatası olabileceği göz önüne alınarak bant gösteren örnek üzerinden çalışmaya derlendirilmiştir. İnsan plasentasında NCAM ile ilgili çalışmalar olmasına karşın klon sırtı plasentasına tam referans olacak literatür bulunamamıştır. Benzer başka çalışmalar incelenerek sonuçlar derlendirilmiştir.

Çizelge 4.14 ve ekil 4.33'de gösterildiği üzere NCAM için plasenta örneklerinin tamamı amplifiye olmuştur. Ancak ekil 4.33'te göze çarpan fark; NCAM'ın IGF-I ve VEGF için olduğu undan daha farklı döngülerde gerçekleştirerek amplifiye olmasıdır, NTC ise olmamıştır. Yine buradan elde edilen çıktılar REST 2009 programında analiz edilmiştir.

Bu çalışmada kapsamında daha önce yüksek lisans tezleri kapsamında çok kullanılmayan görüntü sayısallaştırma teknikleri ve çıktılarının istatistiki derlendirmesi yapılmıştır. Sonuç olarak elde edilen görsel ya da sayısal bilgi, belli normalizasyonlara tabi tutulup, en optimize biçimde derlendirilmiştir ve istatistik olarak anlamlı sonuçlar ortaya konmaya çalışılmıştır.

Çizelge 4.15.'de tanımlandığı üzere IGF-I, VEGF ve NCAM için negatif kontroller (primer antikoru ile üretilemeyenler), klon plasenta örnekleri ve normal plasenta örnekleri ülenmiştir. IGF-I için 2 negatif kontrole karşılık, 2 normal kontrol, 6 tane de klon plasenta örneği; VEGF için, 4 negatif kontrol, 1 normal kontrol ve 3 klon plasenta örneği, NCAM için 4 negatif kontrol, 2 normal kontrol ve 2 klon plasenta örneği olmak üzere her örnekten 3 rastgele 250 x 250 piksel ( $62.500 \text{ px}^2 \times 1$  ve  $62.500 \text{ px}^2 \times 3 - 187.500 \text{ px}^2$ ) alan seçilip, boyanmamış alan göz ardı edilerek Efford'a göre Java™ temelli NIH ImageJ yazılımı ile analiz yapılmıştır (Collins, T.J. 2007; Efford, N. 2000). Bu analiz sonucuna göre yüzde boyanmayan alan farkından gidilerek boyanan alan üzerinden hesaplama yapılmıştır. Bu



verilerden veri setleri oluşturulmak suretiyle normal dağılım ve varyans homojenliği aranarak, saptandı daha sonra her bir molekül için Çizelge 4.18, 4.19 ve 4.20'de başlımsız örnekler için T testi analiz sonucuna göre normal ve klon plasenta ICC boyanmaları arasında %95 güven aralığı dahilinde istatistiksel bir fark bulunmamaktadır. Literatür bilgileriyle de bu sonuç örtüşmektedir.

Her üç molekülün RT-PCR sonuçlarının çıktısı olan OPD dosyası Qiagen firmasının yazılımı olan REST 2009 programına girildi olarak verilmiş ve gereç-yöntem kısmında açıklandı üzere 2000 iterasyon üzerinden kontrol ve klon plasenta grupları ekspresyon miktarları arasında fark olup olmamasına yönelik değerlendirilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlara göre her üç molekül de; IGF-I, NCAM ve VEGF klon grubu sabit olmak üzere kontrol grubu olan normal doğum plasentalarından farksız bulunmuştur. İstatistiksel olarak güven aralığı %95, belirtildiği üzere 2000 tekrar ile CREB3 ve ZFX gen bölgelerine karşı değerlendirilmiştir.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmada için yola çıkıldı ında klon plasentaları ve normal plasentalar arasında histolojik ve moleküler yönden farklılıklar olup olmadığı IGF-I, VEGFA ve NCAM yönünden saptandı , yine literatürde bu tarz çalışmalar bulunan çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar farklılık göstermektedir. Burada tartışılarak ortaya konmak istenen husus, yapılan klonlama çalışması neticesinde canlı kalan ya da gebeliği sonlandırılan bireylerin plasentaları ile normal bir plaseenta arasında IGF, VEGF ve NCAM moleküllerinin mRNA kopyalarının yeter seviyede var olduğunu belirlemek bunların sonucunda gebelik ve plaseenta gelişim durumuna etkisinin olmadığı ya da elde edilen veriler ışığında istatistiksel bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmada plaseenta gelişiminde etkisi olduğu literatür bilgileriyle sabit olan üç önemli molekülün, hem histolojik, hem de moleküler yöntemler ile analizini içermektedir. Bu çalışmaların hepsi birbirinin sağlamasını yapar mahiyettedir.

IGF, VEGF ve NCAM familyalarının plasentada da bulunmalarını görmek için mRNA üzerinden gitmek gerekmektedir, buradan PCR sonucu elde edebilmek için cDNA kiti kullanılmış ve neticede PCR'da ürünlerin varlıkları hem jel elektroforezinde, hem de realtime PCR ile sayısal olarak elde edilmiştir. Bu moleküler sayısal verilerin her ikisi de birbirini konfirme eder durumdadır. Her iki sonuçta da kontrol ve klon grupları arasında bir fark olmadığı adı geçen moleküllerin mRNA'sının bulunduğu, dolayısıyla plasentada sentezlendikleri ve seviyeleri oldukları sonucuna ulaşılabılır. Bununla beraberolumsuz biçimde sonuçlanan gebeliklerde dahi saptanan IGF, VEGF ve NCAM varlıkları sorunun bu moleküllerden kaynaklanmadığını ispat etmektedir. Daha sonra yapılabilecek klonlama çalışmalarında sağlam ve sağlıklı fiziksel kopyalara sahip plaseenta elde edilmesi halinde bu plasentalar üzerinde de IGF, VEGF ve NCAM moleküllerinin reseptörleri ile ilgili bir çalışmanın yürütülebilir. Bazı fizyolojik olaylarda maddenin sentezlenmesi, onun her seviyede seviyeli olarak üretilmesi, ona seviyeli kazandıracak reseptörün bulunmaması halinde madde ortamda seviyeli kalacaktır. Bu durum, bu çalışmanın belirsizliğini oluşturmaktadır.

Histolojik olarak yaklaşıldığında ise moleküler sonuçlardaki verileri teyit eder nitelikte sonuçlara ulaşılmıştır. Beklendiği üzere NCAM ve VEGF-A damar ve endotel yakınlarında yaygın olarak bulunmasına karşın, IGF-I genel olarak dokuda yoğun miktarda tespit edilmiştir. Özellikle total plaseenta örneklerinin fetal yüzlerindeki siliyar yapılar üzerinde her üç molekül de izlemek mümkündür. Bu ICC boyamalarından da yola çıkılarak gösterimin

sayısalla tırılarak da teyit edilmesi arzusu do mu ve neticede NIH ImageJ programı ile görüntülerin i lenmesi ve bilimsel bir çalı mada istatistiki yakla ımın gereklili i sonucu, görsel veriler, sayısal olarak çevrilmi , i lenmi ve sonuç olarak ortaya net bir farksızlık konmu tur.

Tüm bu verilerin ve sonuçların ı ı ı altında denilebilir ki, elde edilmi 5 klon canlının ve cansız operasyonla sonuçlanan bireylerin plasentalarında IGF-I, VEGF ve NCAM yönünden yapı ve i leve dönük bir fark bulunmamakta ve plasentaların standartları normal plasentalarla bu yönden örtü mektedir. Tüm di er faktörler ba ka çalı malarla de erlendirilmeli ve sonuçlar ihtiyaç halinde tekrar edilebilmelidir.

## 7. KAYNAKÇA

- Alessi D.R. ve ark. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insülin and IGF-1. The EMBO Journal vol.15.
- Arat S. ve ark. (2009). Klonlama Nedir?, www.turkhygen.gov.tr.
- Arat S. ve ark. (2010). Yerli Sı ır Irklarının Klonlanması, IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi - Antalya.
- Arat S. ve ark. (2011). Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey Cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23, 1012–1023
- Arat S., Bagis H., Ergin F. ve ark. (2004). Cold storage of tissue as source for donor cells does not reduce the in vitro development of bovine embryos following nuclear transfer. *Reprod Fertility Dev*; 16(1, 2):135.
- Arnold D.R. ve ark. (2008). Placental Insufficiencies in Cloned Animals - A Workshop Report. *Placenta* 29, Vol. 22. S108-110.
- Bagis H. ve ark. (2007). Cryogenic effect of antifreeze protein on transgenic mouse ovaries and the production of live offspring by orthotopic transplantation of cryopreserved mouse ovaries. *Molecular Reproduction and Development*. DOI: 10.1002/mrd.20799.
- Bilim ve Teknik. (2001). Bilim ve Teknoloji Haberleri: nsan klonlama kararına tepkiler (Science, 2001).
- Bininda-Emonds, O.R.P.; Cardillo, M.; Jones, K.E.; 've ark.', Ross D. E.; Beck, Robin M. D.; Grenyer, Richard; Price, Samantha A.; Vos, Rutger A. ve ark. (2007). The delayed rise of present-day mammals. *Nature* 446 (7135): 507–511. Bibcode:2007Natur.446..507B. doi:10.1038/nature05634. PMID 17392779.
- Bowen R. (2008). www.vivo.colostate.edu; Placentation in Ruminants. Colorado State University
- Briggs R.W. (1959 - 2012). National Academies Press.
- Campbell K.H.S. ve ark. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line, *Nature*, vol. 380, 64.
- Carlson, B. M. (1996). Extraembryonic Membranes and Placenta in "Patten's Foundations of Embryology", 255-90,6th Ed., McGraw-Hill Comp., USA.
- Champbell K.H., McWhir J., Ritchi, W.A., Wilmut I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64-66.

- Collins, T.J. (2007). "ImageJ for microscopy". *BioTechniques* 43 (1 Suppl): 25–30. doi:10.2144/000112517. PMID 17936939
- Cunningham F.G., M.D., MacDonald P.C., M.D., Grant N.F., M.D. (2011). *The Placenta*, gynob.com, with quotes from Williams Obstetrics, 18th Edition, , Appleton & Lange, Publishers.
- Demir, R. (1995). Fetal ve Plasental Membranlar, nsanın Geli mesi ve mplantasyon Biyolojisi, 148-78. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Dobrinsky J.R. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology.*; 57 (1): 285-302.
- Edwards J.L. ve ark. (2003). Cloning Adult Farm Animals: A Review of the Possibilities and Problems Associated with Somatic Cell Nuclear Transfer. *American Journal of Reproductive Immunology*.
- Efferd, N. (2000). *Digital Image Processing, a practical introduction using Java™*, Pearson Education Limited.
- Elliot, M.; Crespi, B. (2006). Placental invasiveness mediates the evolution of hybrid inviability in mammals. *The American naturalist* 168 (1): 114–120. doi:10.1086/505162. PMID 16874618.
- Farin P.W., Piedrahita J.A., Farin C.E. (2006). Errors in development of fetuses and placentas in-vitro produced bovine embriyos. *Theriogenology* 65, 178-191.
- Fowden, L.A. (2003). The Insulin-like Growth Factors and feto-placental Growth. *Placenta*, 24, 803–812 doi:10.1016/S0143-4004(03)00080-8
- Gardner R.L., Squire S, Zainan S, Hills S, Graham C.F. (1999). Insulin-like growth factor - 2 regulation of conceptus cposition: effects of the trophoectoderm and inner cell mass genotypes in the Mouse. *Biol Reprod.* 60, 190-195.
- Gideon G., (2008). "California biotech says it cloned a human embryo, but no stem cells produced". *Boston Globe*.
- Gootwine E. (2004). Placental hormones and fetaleplacental development. *Anim Reprod Sci*, (82-83): 551-566.
- Gökçimen A., Temel S. (2004). mplantasyon ve moleküler etkile imler. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2004;11(4): 25-33.
- Gray H. (1918 - 2000). *Development of the Fetal Membranes and Placenta*. Gray's Anatomy of the Human Body. Philadelphia: Lea & Febiger, New York: Bartleby.com, ABD.

- Green JA, Xie S, Quan X ve ark. (2000). Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol Reprod*, 62, 1624-1631.
- Guillomot M. (1995). Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fertil*, 49, 39-51.
- Hill J.R., ve ark. (2000). Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*;63:1787-94.
- Hinsby A.M., Berezin V., Bock E. (2004). Molecular Mechanisms of NCAM Function. *Frontiers in Bioscience* 9, 2227-2244.
- Karaca T., Yörük M. (2010). Ruminant Plasentalarının Yapı ve Fonksiyonu, *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21 (3), 191 - 194.
- Kato Y., Tani T. and Tsunoda Y. (2000). Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of Reproduction and Fertility* (2000) 120, 231–237
- Krueger, N.X., Streuli M. and Saito H. (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *The EMBO Journal*. vol.9 no.10. 3241-3252
- Lanza, R.P., Jose, B.C., Francisca, D. ve ark. (2000). Cloning of an Endangered Species (*Bos gaurus*) using Interspecies Nuclear Transfer, *Cloning*, 2(2): 79-90. doi: 10.1089/152045500436104.
- Latham K. E. (2005). Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning. *Biology of the Cell*. pp. 97, 119–132.
- Lee C.S., Wooding F.B.P., Morgan G. (1995). Quantitative analysis of intraepithelial large granular lymphocyte distribution and maternofetal cellular interactions in the synepitheliochorial placenta of the deer. *J Anat*, 187, 445-460.
- Miglino M. A. ve ark. (2007). Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture, *Theriogenology* 68, 604–617
- Miles, J.R., Farin C.E., Rodrigue K.F., Alexander J.E., Farin P.W. (2004). Angiogenesis and Morphometry of Bovine Placentas in Late Gestation from Embryos Produced In Vivo or In Vitro. *Biol. Reprod*, 71, 1919–1926.
- Özsunay E. ve ark. (2005). UNESCO Türkiye Milli Komisyonu Biyoetik Hıttisat Komitesi, Klonlama Çalı ma Alt Grubu Raporu, Ankara.
- Paratcha, G., Ledda F., Ibanez F. (2003). The Neural Cell Adhesion Molecule NCAM Is an Alternative Signaling Receptor for GDNF Family Ligands. *Cell*, Vol. 113, 867–879.

- Paterson L., DeSousa, P., Ritchie, W., King, T., Wilmut, I.A. (2003). Application of reproductive biotechnology in animals: Implications and potentials application of reproductive cloning. *Anim. Reprod. Sci* 79,137-143.
- Ravelich, S., Andrew N. Shelling, Anna Ramachandran, Shiva Reddy, Jeffrey A. Keelan, David N. Wells, A. James Peterson, Rita S.F. Lee, and Bernhard H. Breier. (2004). Altered Placental Lactogen and Leptin Expression in Placentomes from Bovine Nuclear Transfer Pregnancies, *Biology of Reproduction* 71, 1862–1869.
- Ricchetti, M. , Fairhead, C. and Dujon B. (1999) Mitochondrial DNA repairs double-strand breaks in yeast chromosomes. *Nature* 402, 96-100 | doi:10.1038/47076
- Sammin D., Markey B., Bassett H., Buxton D. (2009). The ovine placenta and placentitis - A review. *Vet Microbiol*, 135, 90-97.
- eftalio lu, A. (1988). Fetal Membranlar ve Plasenta, "Genel Özel nsan Embriyolojisi", 143-66. 3. Baskı, Feryal Matbaası, Ankara.
- Takahashi H. ve Shibuya M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 109, 224-241.
- Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102. 639-655
- Tütüncü L. ve ark. (2000). İkinci Trimesterde Amniyon ve Koryon Zarlarının Birle mesi ile Down Sendromu Birlikteli i. *Perinatoloji Dergisi*; 8(3):120 - 122
- Uysal, O. (2002). nsan Plasenta Villuslarında Enzim Aktivitelerinin Histokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi, Doktora Tezi, Osmangazi Üniv., Eski ehir.
- Vailhé B., Dietl J., Kapp M. Toth B., Arck P. (1999). Increased vessel density in decidua parietalis is associated with spontaneous human first trimester abortion. *Human Reproduction*, vol. 14 no.6 pp.1628-1634.
- Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*; 394:369–374.
- Weekes H.C.; D.Sc. (2009). A Review of Placentation among Reptiles with, particular regard to the Function and Evolution of the Placenta. DOI: 10.1111/j.1096-3642.1935.tb01686.x.
- Wolf E., Zakhartchenko V., Brem G. (1998). Nuclear transfer in mammals: Recent developments and future perspectives. *Journal of Biotech* 65: 99-110.

- Wooding F.B.P. (1984). Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am J Anat*, 170, 233-250.
- Wooding F.B.P., (1992). Current Topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, 13, 101-113.
- Wooding F.B.P., Flint A.P.F. (1994). Placentation, in *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4th edition, Vol. 3, Pregnancy and Lactation [Lamming, G. E., ed.]. Chapman and Hall, London: pp.



## **8. ÖZGEÇM**

### **1. Bireysel Bilgiler**

#### **Fatih Karakaya**

İstanbul -1981

Türkiye Cumhuriyeti

Bekar

313 K.D. - Sıhhiye Sınıfı

TÜB TAK MAM Gıda Enstitüsü - Gıda Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı

(Eski Lab. GMBE Hayvan Geneti i ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarı)

TÜB TAK Gebze Yerleşkesi Barınım Mh. MAM Merkez Bina GE - 41470 Gebze / Kocaeli

(544) 5595686 - (262) 6773286

### **2. E itimi (tarih sırasına göre)**

Lisans: Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Mezun)

Lisansüstü: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Lisans: Eskişehir Üniversitesi İktisat Fakültesi Kamu Yönetimi Bölümü (Devam)

Yabancı Dil: İngilizce, kısmen Fransızca

### **3. Unvanları**

Biyolog, Araştırmacı

### **4. Mesleki Deneyimi**

Özel Trakya Hastanesi, Laborant-Biyolog

İnsan Kaynaklar, de i ik pozisyonlar

TÜB TAK MAM GMBE, Araştırmacı

TÜB TAK Bilgi Sistemleri Dairesi, Araştırmacı, idari personel

TÜB TAK MAM GE, Araştırmacı

### **5. Üye Oldu u Bilimsel Kuruluşlar**

-

### **6. Bilimsel Etkinlikler**

“Türkiye Yerli Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının In Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-I (KAMAG – 106G005)

Anadolu Yerli Sı ır Irklarının Klonlanması (TOVAG – 104O360)

“Klon ve Normal Sı ır Embriyo Plasentalarında insülin Büyüme Faktör-I (IGF-I), Vasküler Endotelial Büyüme Faktör (VEGF) ve Nöronal Hücre Adhezyon Molekül (N-CAM) Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal ve Moleküler Tekniklerle İncelenmesi” konulu

(BAP Hızlı Destek Projesi – 2010/84 – Kocaeli Ünv.)

Karakaya F. ve ark. (2011). "Establishing cell-banks of Anatolian domestic breeds with visualization of cryostorage", Current Opinion in Biotechnology.

Biyoinformatik veritabanları

Hücre kültür çalışmaları

İmmünohistokimyasal teknikler

Kriyobiyoloji

IVF ve Nükleer Transfer (Klonlama)