

Veteriner Mikrobiyolojide Yeni Trendler

Editör
HİKMET YETER ÇOĞUN

BİDGE Yayınları

Veteriner Mikrobiyolojide Yeni Trendler

Editörler: Prof. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN

ISBN: 978-625-372-250-0

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.06.2024

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	3
Rekombinant Antijen Tekniklerinde Güncel Yöntemler	4
Ayda Nur OĞUZ	4
Müzeyyen DEMİR	4
Zorunlu Hücre İçi Bakterilerin Hücre Kültüründe Üretilmesi.....	67
Müzeyyen DEMİR	67
Ayda Nur OĞUZ	67
Genital Tract Microbiota in Female Farm Animals.....	142
Muhammed Kürşad BİRDANE.....	142
Ali SARI.....	142
MikroRNA’lar ve Gıdalardaki Önemi	159
Esra KÜÇÜKGÖZ.....	159
Göknur TERZİ GÜLEL	159
Biyoterapi Uygulaması: Tıbbi Sülük Tedavisi (Hirudoterapi)	193
Aykut ZEREK	193

BÖLÜM I

Rekombinant Antijen Tekniklerinde Güncel Yöntemler

Ayda Nur OĞUZ¹
Müzeyyen DEMİR²

DNA Nedir?

Genetik Materyalin Yapısı

DNA'nın Yapı Taşları

Nükleik asitler, canlıların genetik materyalini oluşturan karmaşık moleküllerdir. DNA ve RNA olmak üzere iki ana türü bulunur. DNA, kalıtsal bilginin depolandığı ve sonraki nesillere aktarıldığı moleküldür (1).

DNA, üç temel yapı taşından oluşur:

¹ Doktorant, Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, yethekaydanur@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0771-8029>

² Doktor, Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, vetmzyyndmr@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7082-4473>

- Azotlu bazlar: Pürin ve pirimidin bazları olarak ikiye ayrılırlar. Pürin bazları adenin (A) ve guanin (G)'yi, pirimidin bazları ise sitozin (C) ve timin (T)'yi içerir.
- Pentoz şekeri: DNA'da bulunan pentoz şekeri, deoksiriboz'dur.
- Fosforik asit: DNA'nın omurgasını oluşturur ve fosfat grupları, nükleotidleri birbirine bağlar (1).

Azotlu Bazlar

Azotlu bazlar, DNA'nın genetik kodunu oluşturan moleküllerdir. Adenin ve guanin (pürinler) ile sitozin ve timin (pirimidinler) olmak üzere dört farklı azotlu baz bulunur. Bu bazlar, birbirleriyle özel bir şekilde eşleşir:

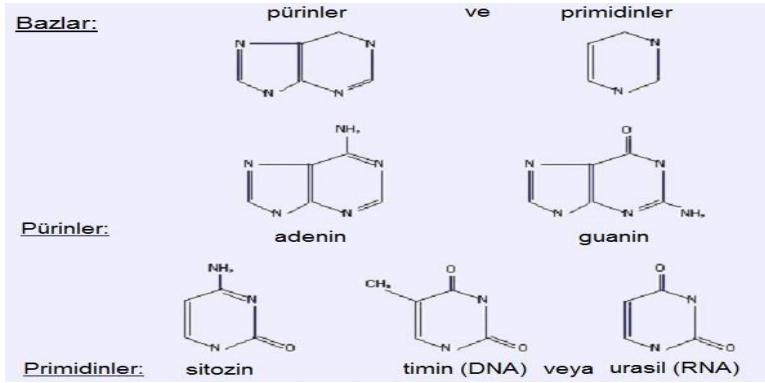
- Adenin (A) her zaman timin (T) ile eşleşir.
- Guanin (G) her zaman sitozin (C) ile eşleşir (1).

Bu eşleşme, DNA'nın çift sarmal yapısını oluşturur.

DNA'nın Yapısı

DNA, iki iplikten oluşan bir çift sarmaldır. Her iplik, nükleotitlerden oluşur. Nükleotitler, deoksiriboz şekeri, fosfat grubu ve bir azotlu bazdan meydana gelir. İki iplik, karşılıklı azotlu bazların hidrojen bağları ile birbirine bağlanır (1). Şekil 1'de verilmiştir.

DNA'nın yapısı, genetik bilginin depolanmasını ve aktarılmasını sağlar. DNA'daki baz dizilimi, bir canlının tüm özelliklerini belirleyen kodlama yapısını oluşturur (1).



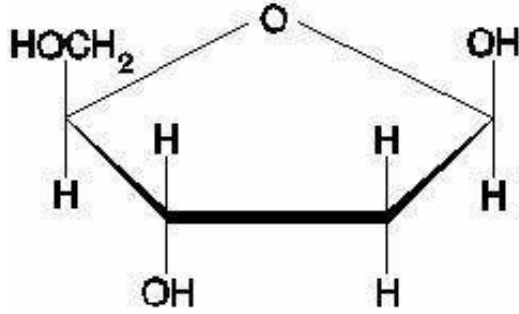
Şekil 1: DNA yapısı

Karbonlu Pentoz Şekeri: Deoksiriboz

DNA'da bulunan 5 karbonlu pentoz şekeri, **deoksiriboz** olarak adlandırılır. Adını, ikinci pozisyonundaki karbon atomuna bağlı oksijenin olmamasından alır. Bu oksijen eksikliği, deoksiribozu, RNA'da bulunan riboz şekerinden ayıran önemli bir özelliktir (1).

Deoksiribozun Özellikleri

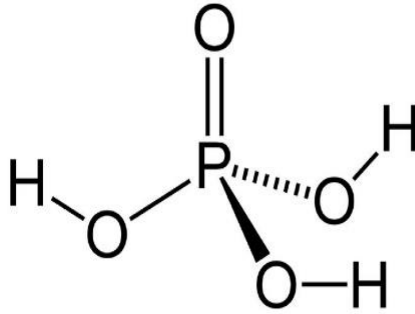
- Beş karbon atomu içerir.
- İkinci pozisyonundaki karbon atomuna bağlı oksijen yoktur.
- DNA molekülünün omurgasını oluşturur.
- Fosfat grupları ile nükleotidleri birbirine bağlar.
- Genetik bilginin depolanmasını ve aktarılmasını sağlar (1). Şekil 2'de verilmiştir.



Deoksiriboz

Şekil 2: 5 Karbonlu pentoz şekeri

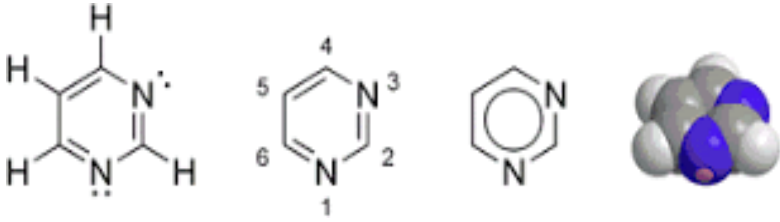
Fosfat Molekülü (Anorganik fosfat) hem DNA'da hem RNA'da yer alır (1). Şekil 3'te verilmiştir.



FOSFORİK ASİT (H₃PO₄)

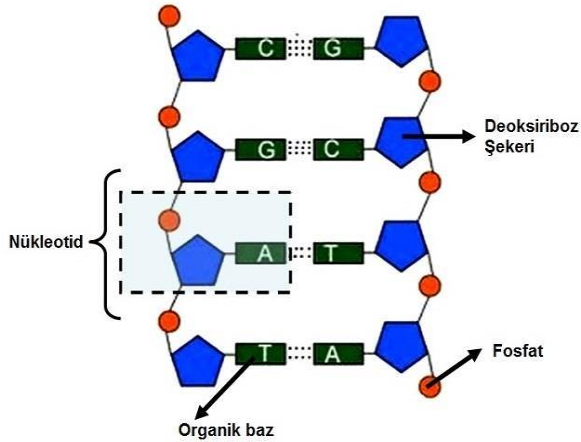
Şekil 3: Fosfat molekülü

Pürin ya da pirimidin bazlarının birinin deoksiribozla birleşmesi ile oluşan bileşiğe deoksiribonucleoside (**nükleozid**) denir (1). Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4: Nükleozid

Bu oluşuma (nükleozid) bir de fosforik asit eklenirse o zaman deoxyribonucleotide (nükleotid) adı verilir (1). Şekil 5’de verilmiştir.



Şekil 5: Nükleotid

Nükleik Asitlerin Kutupsallığı ve Nükleotid Bağı

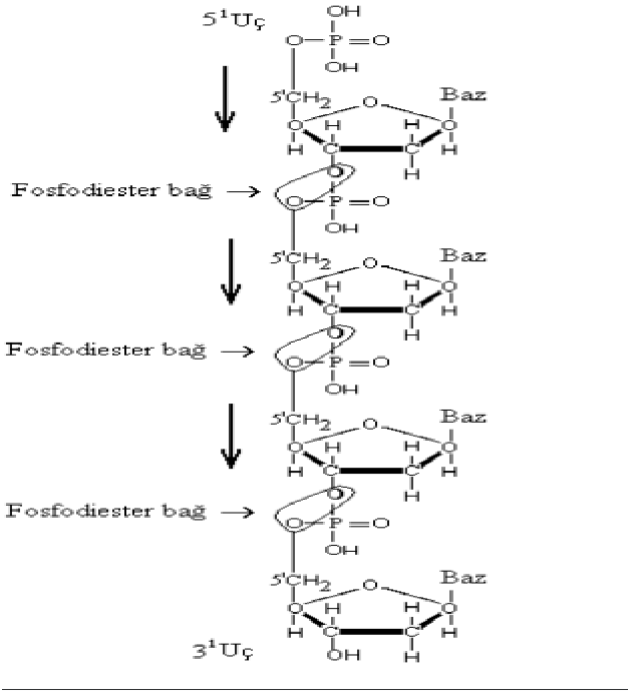
Nükleik asitler, DNA ve RNA gibi, canlının genetik bilgisini taşıyan moleküllerdir. Bu moleküller, zincirler halinde uzanan nükleotidlerden oluşur. Nükleotidler, fosfat grupları, pentoz şekeri ve azotlu bazlardan meydana gelir (1).

Nükleik Asit Zincirlerinin Kutupsallığı

Nükleotidler, fosfodiester bağları ile birbirine bağlanır. Bu bağlar, nükleik asit zincirini oluşturur. Bu zincirin bir ucunda 5' ucu, diğer ucunda ise 3' ucu bulunur. 5' ucunda fosfat grubu, 3' ucunda ise şeker bulunur. Bu nedenle, nükleik asit zincirleri kutupsaldır (1).

Nükleotidlerin Bağlanmasında Organik Bazların Rolü

Nükleotidlerin birbirine bağlanmasında organik bazlar (pürin ve pirimidinler) doğrudan bir rol oynamaz. Fosfat grupları ve şeker molekülleri, fosfodiester bağları oluşturarak nükleotidleri birbirine bağlar (1). Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6: Nükleotitlerin birbirine bağlanması

Rekombinant DNA Teknolojisi

Bir organizmadan herhangi bir yolla izole edilen bir genin (DNA parçasının) uygun bir konağın içerisine sokularak orada çoğalmasını ve transkribe olmasını amaçlayan çalışmalara ait tekniklerin toplamıdır.

Bu teknoloji, en geniş anlamda, belli bir amaca yönelik olarak doğrudan genetik materyal üzerinde yapılan çalışmaları kapsar. Rekombinant DNA terimi, doğal olarak bir arada bulunması mümkün olmayan DNA moleküllerinin kombinasyonunu ifade eder.

Ancak rekombinant DNA terimi daha çok, farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen DNA'ların birleştirilmesiyle elde edilen moleküller için kullanılır.

Rekombinant DNA teknolojisi, bakteri ve virüslerle yapılan çalışmalarda geliştirilen genetik teknikleri ve nükleik asit biyokimyası metotlarını birlikte kullanır.

Günümüzde modern biyoloji alanında ilk akla gelen tanımlardan biri olan Rekombinant DNA veya Rekombinant DNA teknolojisi; genellikle farklı biyolojik türlerden elde edilen DNA moleküllerinin, genetik mühendislik aracılığıyla kesilmesi ve elde edilen bu farklı biyolojik kaynaklı DNA parçalarının yeniden birleştirilmesi işlemine ve bu işlem sonucunda da üretilmiş olan yeni DNA molekülüne verilen bir isimdir (Katartaş, 2011). Bu işlem sonucunda üretilmiş olan DNA molekülüne de “**rekombinant DNA**” ismi verilir ve kısaca “**rDNA**” olarak ifade edilir (Arda, 2000, Arda & Temizkan, 2004). Rekombinant DNA teknolojisi; hedeflenen bir geni ifade etmeyen (eksprese etmeyen) bir hücrenin, o hedeflenen geni eksprese edebilmesini veya hedeflenen bir genin

büyük miktarlarda üretimini amaçlar (Aksoy & Soydemir, 2017). rDNA teknolojisi, genetik rekombinasyon olaylarının yapay bir şekilde gerçekleştirilmesi esasına dayanmaktadır. Teknoloji, çeşitli kaynaklardan elde edilen ve istenilen bir gen sekansına sahip DNA parçalarının uygun bir vektör aracılığıyla başka bir konağa (ekspresyon sistemleri) aktarılmasını içerir. Multidisipliner uygulamalara sahip olan bu teknoloji, aynı zamanda yaşamla ilgili olarak sağlığın iyileştirilmesi, gıda kaynaklarının artırılması ve farklı çevresel olumsuz etkilere karşı direnç gibi önemli konulara çözüm getirme potansiyeline de sahiptir. Rekombinant farmasötiklerin günümüzde güvenle kullanılmasının yanında bu teknoloji, gen terapisi ve genetik modifikasyonlar ile biyosağaltım ve önemli hastalıklara müdahalede kullanılmaktadır (Khan, Siddique & Ullah, 2016).

Rekombinant DNA'nın Tarihi: Bir Buluşun Hikayesi

Rekombinant DNA teknolojisinin temelleri, Stanford Tıp Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda atılmıştır. Prof. Dr. Dale Kaiser'in önderliğinde çalışan lisansüstü öğrencisi Peter Lobban, bu devrim niteliğindeki fikri ilk olarak ortaya atmıştır.

Rekombinant DNA'nın laboratuvar ortamında üretilmesi ve hücre içinde çoğalabilmesi, 1972 ve 1973 yıllarında yapılan çalışmalar sayesinde mümkün hale gelmiştir. Bu önemli buluşlar, bilimsel literatüre de yansımış ve iki önemli yayında yer almıştır (Katartaş, 2011, Berg, Symons & Jackson, 1972). Rekombinant DNA teknolojisi, genlerin bir araya getirilerek yeni DNA molekülleri oluşturulmasına olanak sağlar. Bu teknolojinin kullanılarak geliştirilen ilk genetiği değiştirilmiş (GD) DNA

molekölü, 1972 yılında Paul Berg tarafından oluşturulmuştur (Hughes, 2001).

Günümüzde bilinen ilk genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) ise 1973 yılında üretilen bir bakteridir. Bu çalışmada, bir *E. coli* bakterisine Salmonella genleri eklenerek, bakterinin daha önce sahip olmadığı yeni özelliklere kavuşması sağlanmıştır (Bakırcı, 2012). Rekombinant DNA teknolojisinin önemi anlaşıncı, bu alanda öncü şirketler de kurulmaya başlamıştır. Genentec ve Eli Lilly and Company gibi firmalar, bu teknolojiden faydalanarak önemli ürünler geliştirmeye odaklanmışlardır.

1978 yılında, *E. coli* bakterisi üzerinde yapılan bir genetik manipülasyon sonucunda insülin üretebilen yeni bir bakterinin sentezlendiği açıklanmıştır (Kohlmann & Ladisch, 1992). Bu gelişme, rekombinant DNA teknolojisinin ticari potansiyelini gözler önüne sermiştir.

Başarılar bitkiler üzerinde de devam etmiş ve 1983 yılında ilk GD bitki oluşturulmuştur (Uzun, 2002). Bu gelişme, tarım ve besin üretiminde önemli bir dönüm noktası olmuştur.

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar da bu alandaki gelişmelere katkıda bulunmuştur. İlk kez fareler üzerinde deneyler yapılmış, daha sonra çalışmalar tavşan, koyun, keçi, domuz ve inek gibi memeli hayvanlara doğru genişletilmiştir (Açıkgöz, 2011). Son on yılda rekombinant DNA teknolojisi, transgenik hayvanların üretilmesi ve ticarileştirilmesinde önemli ilerlemeler kaydetmiştir. 2009 yılında, Biotherapeutics firması tarafından kanın pıhtılaşmasını önleyen ATryn GTC ürünü, transgenik bir keçi sütünden üretilmiştir. Bu gelişme, genetiği değiştirilmiş hayvanlardan üretilen ilk ilaç

olma özelliğini taşımaktadır (Açıkgöz, 2011, Adiguzel & et al., 2009).

Aynı yıl Japon bilim insanları, transgenik marmoset (maymun) üretmeyi başarmışlardır. Bu başarı, transgenik hayvanların insan hastalıklarının modellenmesi ve olası tedavilerinin geliştirilmesi için önemli bir adım olarak değerlendirilmektedir (Kishi & et al., 2014).

2010 yılında Hollanda'da, "hereditary angioedema" adı verilen rahatsızlığın tedavisinde kullanılan transgenik tavşan sütünden üretilen ilaç, ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır (Açıkgöz, 2011, Burggraaf & et al., 2005).

2011 yılında Çin'de insan geninin süt ineklerine eklenmesiyle, insan sütü ile aynı özelliğe sahip süt üretilmesi sağlanmıştır. Bu gelişme, süt tedavisi ve bebek maması gibi alanlarda yeni imkanlar sunmaktadır (Tang & et al., 2011).

Aynı yıl, Pasifik somonu ve yılan balığından alınan genetik materyal kullanılarak Atlantik somonu üretilmiştir. Bu somon türü, daha hızlı büyüme ve hastalıklara karşı direnç gibi özelliklere sahiptir. 2015 yılında, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) bu somonun üretimine ve tüketime izin vermiştir (Aerni, 2004, Naylor & et al., 2005, Ledford, 2015).

Canlı hücre veya organizmanın ve hücre içi mekanizma ile moleküler bileşenlerin kullanıldığı biyolojik süreçler, biyoteknolojinin en eski araçlarındandır. Hayvan, bitki veya mikroorganizma kaynaklı üretilen ve saflaştırılan spesifik proteinler çeşitli amaçlar için kullanılır. Bu alanda elde edilen en önemli ürünler; rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla üretilen koruyucu

aşılar (hepatit B gb.) ile rekombinant tedavi proteinleridir (büyüme hormonu, insülin gb.) (Yurdusev, 2002).

Rekombinant DNA Teknolojisinin Başlıca Kullanım Alanları

Son yıllarda hayvancılık ve veteriner hekimlik alanında biyoteknolojinin kullanımı hızla artmıştır. Bu alandaki temel uygulamalar şunlardır:

1. **Hastalıkların Teşhis ve Tedavisi:** Biyoteknoloji, hastalıkların daha erken ve doğru teşhis edilmesine ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine imkân sağlar. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen aşılar ve proteinler, birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde önemli rol oynar.
2. **Hastalıklardan Korunma:** Biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, hayvanlara karşı daha etkili ve güvenli aşılar üretilmiştir. Bu aşılar, hayvanların hastalıklara karşı direncini artırır ve hayvancılık sektörüne önemli katkılar sağlar.
3. **Hayvanlarda Performansın Yükseltilmesi:** Biyoteknoloji, hayvanların süt, et, bal ve yumurta gibi ürünlerin verimini artırmak için kullanılabilir. Ayrıca, hayvanların hastalıklara karşı direncini geliştirmek de bu alandaki önemli hedeflerden biridir (Katartaş, 2011, Ulutin, 2017, Kiper, 2013).

Biyoteknolojinin Diğer Uygulama Alanları

Biyoteknolojinin uygulama alanları oldukça geniştir. Bu alandaki bazı önemli uygulamalar şunlardır:

- **Tıp:** Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen proteinler ve ilaçlar, birçok hastalığın tedavisinde kullanılır. Gen tedavisi ve kanser tedavisi gibi alanlarda da biyoteknoloji önemli bir rol oynamaktadır.
- **Tarım:** Biyoteknolojinin kullanımıyla, daha verimli ve hastalıklara karşı dirençli bitkiler geliştirilmektedir. Bu gelişmeler, gıda üretimini artırır ve gıda güvenliğini sağlar.
- **Çevre:** Biyoteknoloji, hava, toprak ve su kirliliğini azaltmak için kullanılabilir. Ayrıca, atık su arıtma ve biyodegradasyon gibi alanlarda da biyoteknoloji önemli bir rol oynamaktadır.
- **Gıda:** Biyoteknoloji, gıda katkı maddeleri ve yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesi için kullanılır. Ayrıca, gıda kalitesinin kontrol edilmesi ve korunması da bu alandaki önemli uygulamalardandır (Katartaş, 2011, Ulutin, 2017, Kiper, 2013).

Biyoteknoloji, hastalıkların teşhisinde ve hayvancılıkta çığır açan gelişmelere yol açmıştır. Bu alandaki yenilikler, insan ve hayvan yaşamının korunmasına ve yaşam kalitesinin artmasına önemli katkılar sunmaktadır.

Biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesi ile, hayal bile edilemeyen birçok hastalığın doğru ve hızlı bir şekilde teşhis edilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu alandaki gelişmeler, biyoteknoloji tanı yöntemleri ile sağlanmıştır.

Moleküler teşhis: Hastalığa neden olan genlerin veya proteinlerin tespiti için kullanılır.

İmmünotestler: Antijenleri ve antikorları kullanarak hastalıkların teşhisi yapılır.

Biyosensörler: Biyolojik molekülleri algılayan ve bu algıyı elektrik sinyale dönüştüren cihazlar.

Biyoteknolojik ürünlerin kullanımıyla tanı testlerinin hassasiyeti de önemli ölçüde artmıştır. Bu sayede hastalıklar daha erken ve doğru bir şekilde teşhis edilebilmektedir (Bakırcı, 2012, Açıkgöz , 2011).

Gen Klonlama

Rekombinant DNA teknolojisi'nin genetik temeli '**rekombinasyon**'dur. **Rekombinasyon**, farklı genotipteki bireyler arasında eşleşmeler meydana geldiğinde, ana-babaya ait kalıtsal özelliklerin dölde değişik gruplanmalar halinde bir araya gelmesine yol açan olaylar dizisidir.

Moleküler düzeyde rekombinasyon, farklı nükleotid dizilerine sahip iki DNA molekülünün homoloji (benzerlik) gösteren bölgeleri arasındaki parça alışverişi sonucunda meydana gelen yeni gruplanmalardır.

Gerek prokaryotik ve gerekse ökaryotik organizmalara ait değişik proteinleri kodlayan genler, çeşitli vektörler (faj, plazmid, cosmid, fajmid, virus, bakteri, vs.) yardımıyla, mikroorganizmalarda (genellikle rekombinant plazmidi taşıyan bakteriler) ve/veya ökaryotik hücrelerde başarı ile klonlanmış ve genlerin ekspresyonu sağlanmıştır.

Klonlama Tipleri

- DNA / Gen düzeyinde klonlama
- Hücre düzeyinde klonlama
- Organizma /çekirdek düzeyinde klonlama (Alberts & et al., 1994, Brown, 1990, Lewin & et al., 2000, 26, 27).

Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; gen bankalarının oluşturulması, gen izolasyonu, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerinin seçilmesi, DNA dizi analizlerinin basitleştirilmesi, DNA aşılarının oluşturulması ve rekombinant proteinlerin açıklatılması gibi amaçlarla yapılmaktadır (Alberts & et al., 1994, Brown, 1990, Lewin & et al., 2000, 26, 27). Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrelerin bölünmesi sırasında vektörün de içerdiği genin birçok kopyasını oluşturması işlemine “gen klonlaması” adı verilmektedir (Brown, 1990, Lewin & et al., 2000, 26).

Klonlamada; bakteriofajlar, plazmitler, virus ve bakteriler nadiren de kozmid ve mayalar vektör olarak kullanılmaktadır (Brown, 1990, 26, 27). Viral vektörler, genlerin hücrelere aktarılması ve gen ekspresyon çalışmaları için virusların modifikasyonu ile oluşturulmuşlardır. Bu amaçla herpes, adeno, retro, vaccinia, polyoma, baculovirus gibi birçok RNA ve DNA virusu vektör olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte *S. typhimurium*, *E. coli*, *Bacille Calmette Guerin (BCG)* suşu gibi bakteriler de

klonlamada denenmektedir (27, Grimm, 2002, Lachmann, 2004, Li & Ma, 2001).

Gen Klonlama Aşamaları ve Kullanılan Temel Yöntemler

- Saf DNA örneklerinin hazırlanması
- DNA örneklerinin kesilmesi (Restriksiyon endonükleazlar)
- DNA parça boylarının incelenmesi
- DNA moleküllerinin bir araya getirilmesi
- DNA'nın konak hücreye girişi (Transfeksiyon, Transformasyon, Transdüksiyon)
- Rekombinant DNA moleküllerinin belirlenmesi (Genetik, İmmünokimyasal)

Klonlama çalışmalarında daha sık olarak kullanılan plazmitler ise, bakteri ve diğer organizmalarda bulunan, konak hücre kromozomundan bağımsız olarak çoğalan yuvarlak, küçük yapılı kromozom dışı DNA'lardır (Brown, 1990, 26, 27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989).

Gen klonlaması çalışmalarında plazmitler kullanıldığında, klasik olarak genler genomik DNA veya mRNA'dan izole edilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmakta, gen ve genin yerleştirileceği plazmit bir veya daha fazla enzim ile kesilerek in vitro şartlarda genin plazmite yerleştirilmesi sağlanmaktadır (Brown, 1990, 26, 27).

Biyoteknolojinin son yıllardaki hızlı gelişimleri, araştırmacılara gen klonlaması çalışmaları için farklı özelliklere

sahip geniş bir plazmit yelpazesi sunmaktadır. Bu durum, klonlama işleminin daha verimli, hassas ve esnek hale gelmesini sağlayarak, gen fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasına ve yeni tıbbi ve biyoteknolojik uygulamaların geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu yazıda, gen klonlaması çalışmalarının temel ilkelerinin belirtilmesinin yanı sıra bu çalışmalarda kullanılacak plazmitlerin seçiminde dikkat edilmesi gereken noktaların son gelişmelerin ışığında tartışılması amaçlanmıştır.

Gen klonlaması, belirli bir DNA parçasının (hedef gen) bir taşıyıcı molekül (vektör) aracılığıyla bir konak hücreye aktarılması ve çoğaltılması işlemidir. Bu işlem, gen fonksiyonlarının ve düzenlemesinin incelenmesi, yeni proteinlerin üretilmesi ve gen terapisi gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır.

Hedef Gen Seçimi:

Gen klonlaması çalışmaları için ilk adım, klonlanacak geni seçmektir. Hedef genin seçimi, araştırmanın amacına bağlı olarak değişir. Örneğin, bir proteinin fonksiyonunu incelemek için, bu proteini kodlayan gen klonlanabilir.

Restriksiyon Enzimleri ve DNA Kesilmesi:

Restriksiyon enzimleri, DNA'yı belirli bölgelerden kesen özel proteinlerdir. Hedef gen ve vektör DNA'sı, restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilir ve birbirleriyle bağlanacak şekilde hazırlanır.

DNA'nın Plazmite Yerleştirilmesi:

Kesilmiş DNA fragmanları, DNA ligaz enzimi kullanılarak vektör DNA'sına yerleştirilir. DNA ligaz enzimi, DNA zincirlerini birbirine bağlar ve rekombinant DNA molekülünü oluşturur.

Rekombinant DNA'nın Çoğaltılması:

Rekombinant DNA molekülü, konak hücreye aktarılır ve burada çoğaltılır. Konak hücreler çoğaldıkça, rekombinant DNA molekülü de çoğalır ve her hücrede bir kopyası bulunur.

Klonlanmış Vektörün Hücrelerden Seçimi:

Rekombinant DNA molekülünü taşıyan konak hücreler, seçici işaretleyici kullanılarak seçilir. Seçici işaretleyici, konak hücrenin belirli bir antibiyotiğe karşı dirençli olmasını sağlar. Bu sayede, rekombinant DNA molekülünü taşımayan hücreler elenir.

Klonlamanın Doğrulanması:

Klonlamanın başarılı olup olmadığını doğrulamak için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler arasında DNA dizilemesi, Southern blot ve PCR gibi moleküler biyoloji teknikleri yer alır.

Plazmitler:

Plazmitler, bakterilerde bulunan küçük, dairesel DNA molekülüdür. Gen klonlaması çalışmalarında vektör olarak kullanılırlar. Plazmitler, replikasyon kökeni, seçici işaretleyici ve klonlama bölgeleri gibi çeşitli özelliklere sahiptir.

Gen Klonlamada Yeni Yöntemler:

Biyoteknolojideki gelişmeler, gen klonlaması için yeni ve daha verimli yöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu yöntemler

arasında, PCR tabanlı klonlama, Gateway sistemi ve Cre-loxP sistemi gibi yöntemler yer alır.

Gen Klonlamada Önemli Noktalar:

Gen klonlaması çalışmaları, dikkatli bir şekilde planlama ve uygulama gerektirir. Başarılı bir klonlama için aşağıdaki noktalara dikkat edilmesi önemlidir:

Uygun hedef gen seçimi

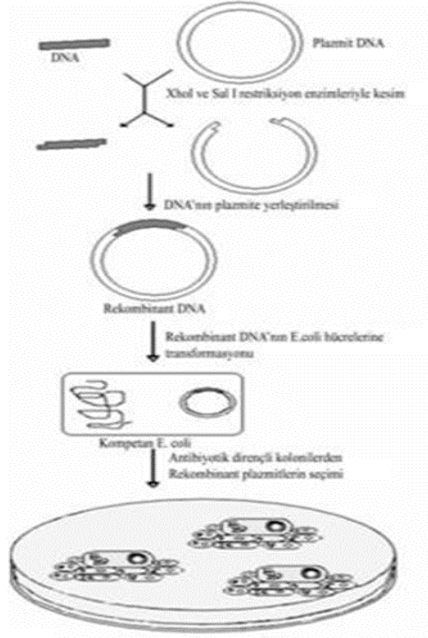
Doğru vektör kullanımı

Verimli DNA kesme ve ligasyonu

Konak hücrenin seçimi ve kültürü

Klonlamanın doğrulanması

Gen klonlamanın temel ilkeleri şekil 7’de özetlenmiştir. DNA için taşıyıcı rolü oynayan küçük ve sirküler yapılı moleküllere vektör adı verilmektedir. Klonlamada temel işlem; organizma genomundan elde edilen DNA parçasının vektöre yerleştirilmesidir. Vektör DNA’sına, organizmaya ait bir DNA’nın yerleştirilmesiyle oluşturulan moleküle rekombinant DNA adı verilmektedir (27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989). Bu rekombinant DNA molekülü bakteriyel hücrelere transforme edilmesi sonucunda bakterilerin bölünmesiyle rekombinant DNA’da replike olarak klon olarak isimlendirilen kopyalar meydana getirilmektedir (27). Klonlanan DNA’nın varlığı, transforme edildiği hücrelerden saflaştırılarak doğrulanmaktadır (Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989).



Şekil 7: Gen klonlanmasının temel ilkeleri. Konakçıdan elde edilen DNA ve plazmid aynı restriksiyon enzimleri ile kesilerek, DNA'nın plazmide yerleştirilmesi sağlandıktan sonra oluşan rekombinant DNA, E.coli bakteri hücresine transfer edilmesi.

Hedef Genin Seçilmesi

Klonlama çalışmaları, genlerin işlevlerini ve yapısal özelliklerini araştırmak, DNA ve protein aşılı geliştirmek gibi birçok alanda kritik öneme sahiptir. Bu karmaşık sürecin en önemli basamaklarından biri ise hedef genin seçilmesi aşamasıdır. Doğru gen seçiminin yapılmaması, tüm çalışmanın başarısızlıkla sonuçlanmasına yol açabilir (33). Klonlama çalışmaları, sadece genlerin işlevlerini ve yapılarını araştırmak için değil, aynı zamanda hastalıkların tanısı ve tedavisinde de önemli bir rol oynayabilir. Bu bağlamda, hedef gen seçiminde göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktör de elde edilen rekombinant proteinlerin hastalık tanısında kullanılabilme potansiyelidir

(Hartley, 2006.). Rekombinant proteinler, klonlanmış genler tarafından kodlanan ve üretilen proteinlerdir. Bu proteinler, orijinal proteinlerle özdeş özelliklere sahip olup, birçok farklı amaçla kullanılabilirler. Hastalık tanısında ise rekombinant proteinler, teşhis kitleri ve görüntüleme ajanları gibi çeşitli araçlarda kullanılarak hastalıkların varlığını veya ilerleyişini belirlemeye yardımcı olabilir.

Restriksiyon Enzimleri ve DNA'nın Kesilmesi

Rekombinant DNA teknolojisi ve klonlama gibi moleküler biyolojinin temel alanlarının gelişmesinde **restriksiyon enzimlerinin keşfi ve karakterizasyonu** kritik bir adım olmuştur. Bu özel enzimler, bakteriler tarafından virüslere karşı bir savunma mekanizması olarak üretilmektedir ve DNA'yı belirli bölgelerden kesme yeteneğine sahiptirler (27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989).

Restriksiyon enzimleri, izole edildikleri bakterilerin isimlerine göre adlandırılır ve her enzim kendine özgü bir DNA dizisini tanır ve keser. Bu sayede, farklı kaynaklardan gelen DNA parçaları, restriksiyon enzimleri kullanılarak hassas bir şekilde birleştirilebilir (27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989).

Restriksiyon enzimlerinin DNA manipülasyonlarında oynadığı önemli roller şunlardır:

- **DNA parçalarının kesilmesi:** Rekombinant DNA teknolojisinde, farklı organizmalardan gelen DNA parçaları, restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilir ve istenilen şekilde birleştirilir. Şekil 8'de verilmiştir.
- **Gen klonlama:** Belirli bir gen, restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'dan izole edilir ve bir taşıyıcı DNA molekülüne klonlanır.

- **DNA haritalama:** Restriksiyon enzimleri, DNA moleküllerinin haritalanmasında ve kromozomlardaki genlerin konumlarının belirlenmesinde kullanılır.
- **DNA teşhisi:** Restriksiyon enzimleri, genetik hastalıkları ve enfeksiyonları teşhis etmek için DNA analizlerinde kullanılır (27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989).

Restriksiyon enzimleri, iki farklı şekilde DNA'yı kesebilir:

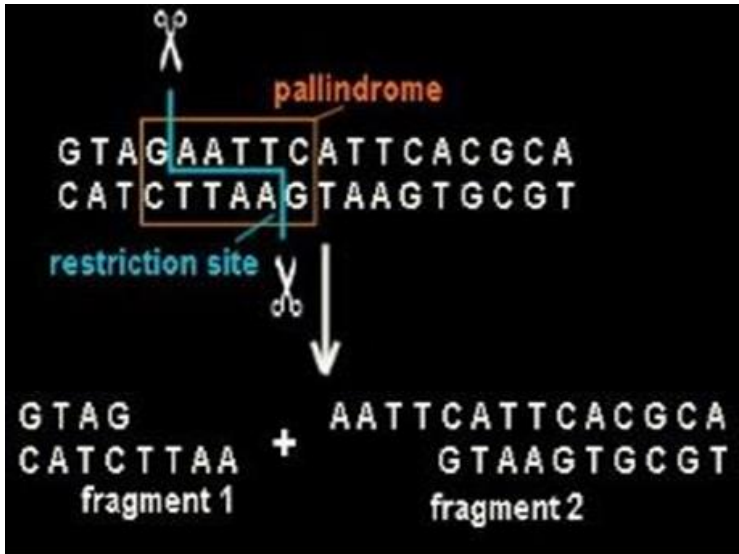
- **Yapışkan uçlar oluşturma:** Bazı restriksiyon enzimleri, DNA'yı zıt uçlarda kısa, tek zincirli uzantılar (yapışkan uçlar) bırakarak keser. Bu yapışkan uçlar, farklı DNA parçalarının birbirine kolayca bağlanmasını sağlar.
- **Küt uçlar oluşturma:** Diğer restriksiyon enzimleri ise DNA'yı düz uçlar (küt uçlar) bırakarak keser. Bu uçlar, DNA ligaz enzimi kullanılarak birleştirilebilir (27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989). Şekil 9 ve 10'da verilmiştir.

Restriksiyon enzimleri, moleküler biyolojide en çok kullanılan enzimlerden biridir ve DNA manipölasyonu, gen klonlama ve genomik araştırmalar gibi birçok alanda kritik öneme sahiptir. Bu enzimlerin keşfi ve karakterizasyonu, biyoteknolojinin gelişmesinde bir dönüm noktası olmuştur ve tıp, tarım ve çevre bilimleri gibi birçok alanda önemli ilerlemelerin yapılmasına katkıda bulunmuştur. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri

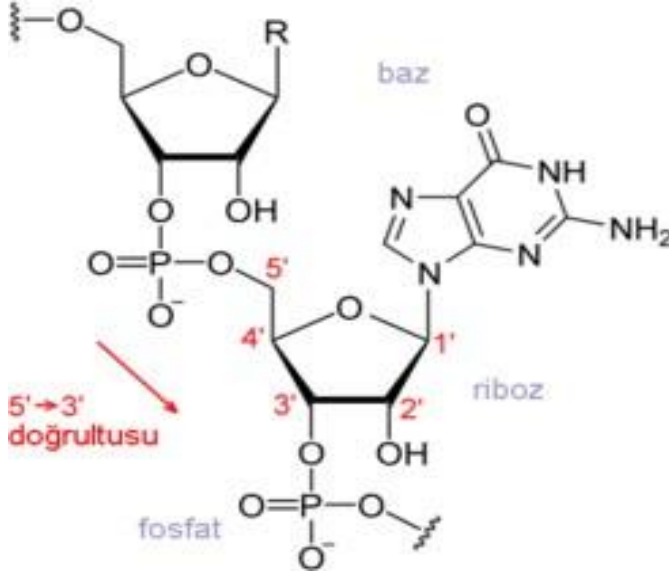
mikroorganizmalar ve enzim tanıma noktaları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve DNA tanıma noktaları

Enzimin adı	İzole edildiği mikroorganizma	Oluşturduğu uç	Tanıma dizisi
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] GATCC-3' 3'-C CTAG [^] G-5'
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] AATTC-3' 3'-C TTAA [^] G-5'
<i>KpnI</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yapışkan uç	5'-GGTAC [^] C-3' 3'-C [^] CATGG-5'
<i>Sal I</i>	<i>Streptomyces albus</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] TCGAC-3' 3'-C AGCT [^] G-5'
<i>XhoI</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i>	Yapışkan uç	5'-C [^] TCGAG-3' 3'-G AGCT [^] C-5'
<i>AluI</i>	<i>Artrobacter luteus</i>	Künt uç	5'-AG [^] CT-3' 3'-TC [^] GA-5'
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcessens</i>	Künt uç	5'-CCC [^] GGG-3' 3'-GGG [^] CCC-5'



Şekil 8: Restriksiyon endonükleazlar ile DNA'nın spesifik bölgelerinden kesilmesi



Şekil 9: Kovalent bağların kırılmasıyla DNA'nın kesileceği yerler

Restriksiyon endonükleaz şeker-fosfat omurgayı ayırarak küt ya da yapışkan uçlu, çift iplikli DNA fragmenti oluşturabilir.

Küt uça (Blunt end); molekülün her iki ipliği aynı yerden kesilmiştir yani uçlar düz ve nükleotidlerin her biri eşlenmiş şekildedir.

Yapışkan uça (Sticky end); molekülün her ipliği farklı pozisyonlardan kesilmiştir.

İplikteki birkaç nükleotit çıkıntı oluşturur, bu tek iplikli uçlar kendiliğinden birbirleri ile baz çifti oluşturabilirler.

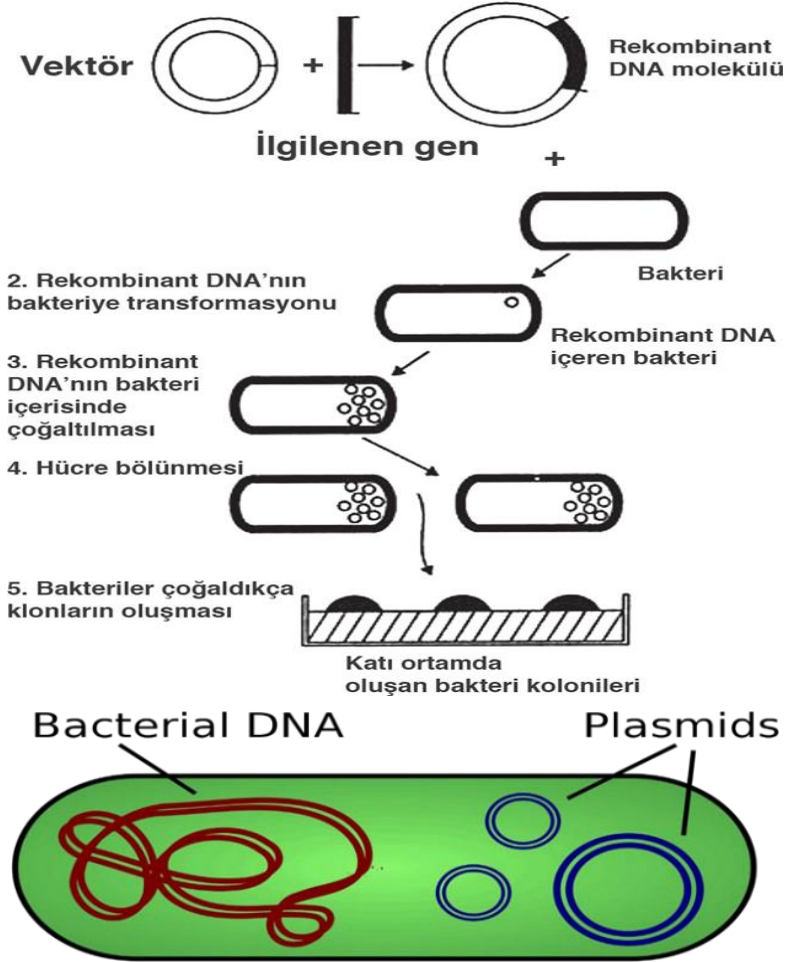
DNA'nın Plazmide Yerleştirilmesi

- Taşıyıcı DNA plazmit ise ‘Transformasyon’ (Virus ise Transfeksiyon)
- Mikroenjeksiyon
- Biyolistik
- Elektroporasyon

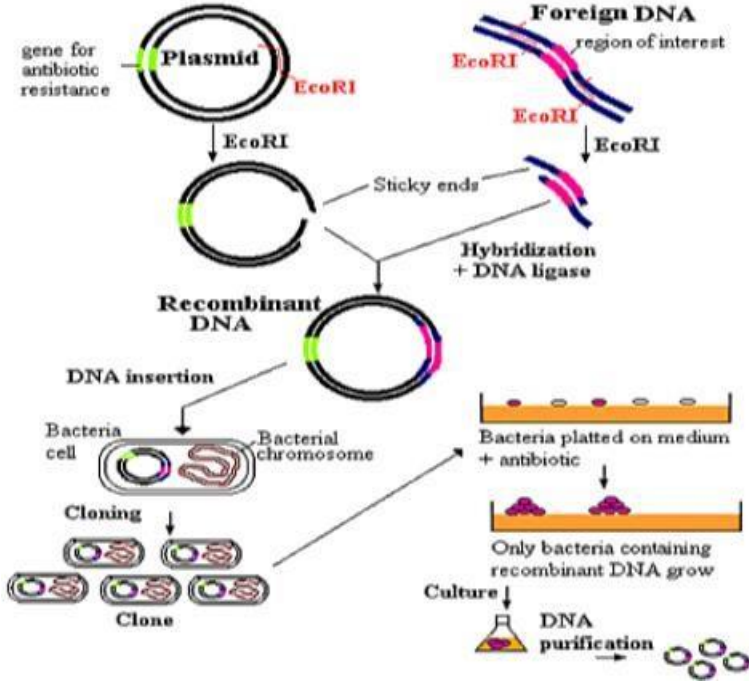
***E. coli* DNA Replikasyonunda Rol Alan Proteinler**

- **DNA helikaz:** DNA çift sarmalını açarak replikasyonu sağlar.
- **DNA primaz:** Primosonla kompleks halde bulunur, kısa primer RNA dizilerini sentezler.
- **DNA polimeraz III:** Primer RNA dizilerini kullanarak DNA sentezini gerçekleştirir (saniyede 1000 nükleotid ekleyebilir). Bugüne kadar tespit edilen hiçbir DNA polimeraz enzimi yeni zincirin birden bire oluşumunu başlatamaz bu nedenle 3’-OH grubu yeni nükleotidin P grubunun eklenmesine müsait yani açık olan bir primer başlatıcı zincire ihtiyaç vardır.
- **Tek iplikli DNA’ya bağlanan protein kompleksi:** Replikasyon sırasında geçici olarak oluşan DNA tek iplikçiklerine bağlanarak bu kısımların stabilizasyonunu sağlar.
- **DNA polimeraz I:** RNA primerini kopardıktan sonra gereken (eksik) nükleotidleri ilave eder (5’→3’ ekzonükleaz aktivitesi) (~10 nükleotid/saniye)

- **DNA Ligaz:** Ogazaki segmentleri arasındaki gedikleri doldurarak segmentleri birbirine ekler.



Şekil 10: Klonlama vektörü olarak bakteri plasmidi kullanılan rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları



Şekil 11: Plazmid içerisinde klonlama

Klasik gen klonlama yönteminde, hedef genin DNA'dan izole edilmesi ve bir taşıyıcı DNA molekülüne (plazmit) aktarılması işlemi, **saflaştırma** ve **ligasyon** adı verilen iki önemli aşamadan oluşur (27). Şekil 11'de verilmiştir.

Saflaştırma:

- **Restriksiyon enzimi kullanımı:** Hedef gen ve plazmit, her ikisi de kendine özgü DNA dizilerini tanıyan ve kesen farklı restriksiyon enzimleri ile kesilir. Bu işlem sonucunda, her iki DNA molekülünde de yapışkan uçlar adı verilen kısa, tek zincirli uzantılar oluşur.

- **Agaroz jel elektroforezi:** Kesilmiş DNA molekülleri, boyutlarına göre ayırtmak için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılır. Bu sayede, istenilen boyuttaki hedef gen ve plazmit bantları belirlenerek jelden kesilir.

Ligasyon:

- **T4 DNA ligaz enzimi:** Saflaştırılmış gen ve plazmit, yapışkan uçlarının tamamlayıcılığı sayesinde T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak birleştirilir. Bu enzim, kimyasal bağlar oluşturarak DNA moleküllerini birleştirir.
- **Uygun koşullar:** Ligasyon reaksiyonu, enzimin optimum aktivitesini sağlayacak şekilde belirli bir sıcaklık ve pH aralığında gerçekleştirilir.

Saflaştırma ve ligasyon aşamaları, klasik gen klonlama yönteminin başarısı için kritik öneme sahiptir. Doğru şekilde gerçekleştirilmeyen bu işlemler, istenmeyen DNA parçalarının klonlanmasına veya klonlama işleminin başarısız olmasına yol açabilir (27).

DNA ligasyon reaksiyonu, gen klonlama ve moleküler biyoloji alanlarında yaygın olarak kullanılan önemli bir işlemdir. Bu işlemde, **T4 DNA ligaz enzimi**, DNA moleküllerini birleştirmek için kullanılır. Ligasyon reaksiyonunun verimliliği ve başarısı, kullanılan enzimin türüne, reaksiyon sıcaklığına ve süresine bağlıdır. Farklı firmalar tarafından üretilen T4 DNA ligaz enzimleri, farklı reaksiyon sıcaklığı ve süreleri önermektedir. Bu durum, enzimlerin farklı

bileşimlere ve aktivite profillerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır (33, Hartley, 2006, 35, 36).

- **Sıcaklık:** Reaksiyon sıcaklığı genellikle **+4°C ile +25°C** arasında değişmektedir. Enzimin optimum aktivitesinin sağlanabilmesi için önerilen sıcaklığa uyulması önemlidir. Düşük sıcaklıklarda reaksiyon hızı yavaşlarken, yüksek sıcaklıklarda enzim denatüre olabilir ve aktivitesini kaybedebilir.
- **Süre:** İnkübasyon süresi ise **5 dakikadan bir geceye** kadar değişebilmektedir. Reaksiyon süresi, DNA parçalarının uzunluğuna, konsantrasyonuna ve enzimin aktivitesine bağlı olarak belirlenir. Kısa DNA parçaları ve yüksek enzim konsantrasyonları için daha kısa inkübasyon süreleri yeterli olurken, uzun DNA parçaları ve düşük enzim konsantrasyonları için daha uzun inkübasyon süreleri gerekebilir (Hartley, 2006, 35, 36, Kuk, 2003).

T4 DNA ligaz enzimi, T4 bakteriyofajlarından izole edilen ve DNA ligasyon reaksiyonlarında kullanılan önemli bir enzimdir. Bu enzim, *E. coli* DNA ligaz enziminden **400 kat daha yüksek** bir etkinliğe sahip olmasıyla öne çıkmaktadır (Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989, 35).

T4 DNA ligaz enzimi, DNA ligasyon reaksiyonlarında kullanılan önemli bir enzimdir. Bu enzimin aktivasyonu ve optimum aktivitesinin sağlanması için ATP molekülüne ihtiyacı vardır. ATP, enzimin aktif bölgesindeki lizin amino asidinin hidroksil grubuna bağlanarak fosfodiester bağ oluşumunu katalize eden reaksiyon için

gerekli enerjiyi sağlar. Ligasyon reaksiyonlarında kullanılan buffer karışımları, enzimin optimum aktivitesini sağlayacak şekilde pH, iyon konsantrasyonu ve diğer faktörleri dengelemek için tasarlanmıştır. Bu buffer karışımları genellikle ATP içerir, çünkü ATP enzimin aktivasyonu için gereklidir (35).

Rekombinant DNA'nın Çoğaltılması

Genin plazmite yerleştirilmesi ile elde edilen rekombinant DNA'nın çoğaltılması sonraki çalışmalar için büyük avantajlar sağlamaktadır. Bunun için rekombinant DNA'nın bakteri hücrelerine sokulması (transformasyon) gerekmektedir. Şekil 12'de verilmiştir.

Transformasyon işlemi, basit ve ucuz olan kimyasal metotların yanında daha etkin bir metot olan elektroporasyon metodu da araştırmacılara alternatif olabilmektedir (Arda, 2000, Kishi & et al., 2014). Laboratuvar çalışmalarımızda kimyasal yolla transformasyon metodunu yoğun olarak kullanmaktayız (Kuk, 2003, Demirdağ & ark., 2003).

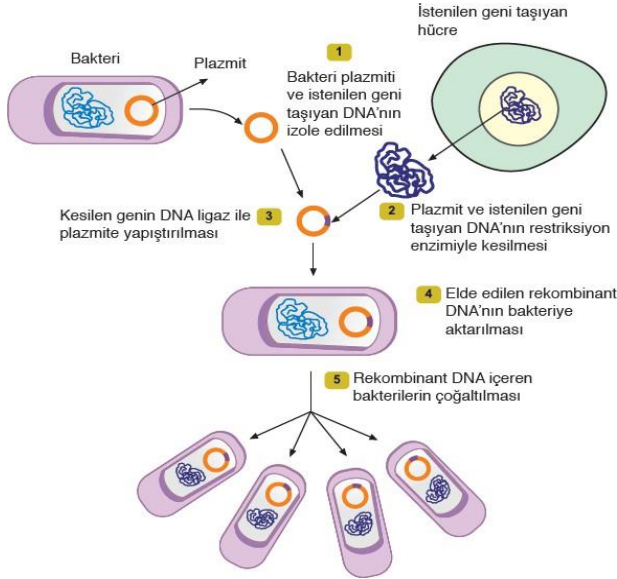
Transformasyon işlemi, DNA'nın bir canlı hücreye aktarılması ve hücre tarafından kabul edilmesi işlemidir. Bu işlem, gen klonlama, rekombinant DNA teknolojisi ve moleküler biyoloji gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Transformasyon işleminde kullanılan en önemli unsurlardan biri **kompetan hücrelerdir**. Kompetan hücreler, DNA'yı almaya ve entegre etmeye karşı daha yatkın olan özel olarak hazırlanmış hücrelerdir (35, Kuk, 2003, Demirdağ & ark., 2003).

Kompetan Hücre Hazırlama Yöntemleri

Kompetan hücreler, ticari olarak satın alınabileceği gibi araştırmacıların kendi laboratuvarlarında da elde edilebilmeleri mümkündür. Bunu yapmak için çeşitli yöntemler kullanılabilir. En yaygın kullanılan yöntemlerden bazıları şunlardır:

- **Kalsiyum klorür yöntemi:** Bu yöntemde, kalsiyum klorür çözeltisi kullanılarak hücre duvarı zayıflatılır ve DNA'nın hücreye girmesi kolaylaştırılır.
- **Rubidyum klorür yöntemi:** Bu yöntemde, rubidyum klorür çözeltisi kullanılarak hücre zarının geçirgenliği artırılır ve DNA'nın hücreye girmesi kolaylaştırılır.
- **Etilen diaminetetraasetik asit (EDTA) yöntemi:** Bu yöntemde, EDTA kullanılarak hücre duvarındaki magnezyum iyonları şelatlanır ve hücre duvarı zayıflatılır.
- **Elektroporasyon yöntemi:** Bu yöntemde, elektriksel darbeler kullanılarak hücre zarı geçici olarak delinir ve DNA'nın hücreye girmesi sağlanır (35, Kuk, 2003, Demirdağ & ark., 2003).



Şekil 12: Plazmidin bakteriye yerleştirilmesi ve çoğaltılması

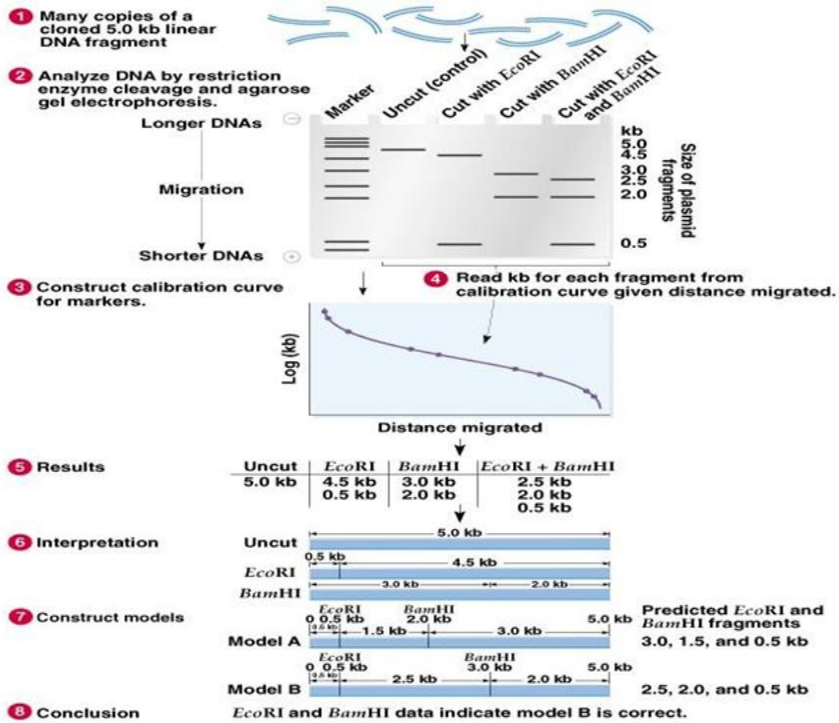
Southern Blot Tekniği ile Saflaştırma

Southern blot tekniği, bir genomdaki belirli bir DNA sekansının varlığını ve konumunu tespit etmek için kullanılan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu teknik, adını geliştiren Edwin Southern'dan almıştır. Şekil 13ve 14'de verilmiştir.

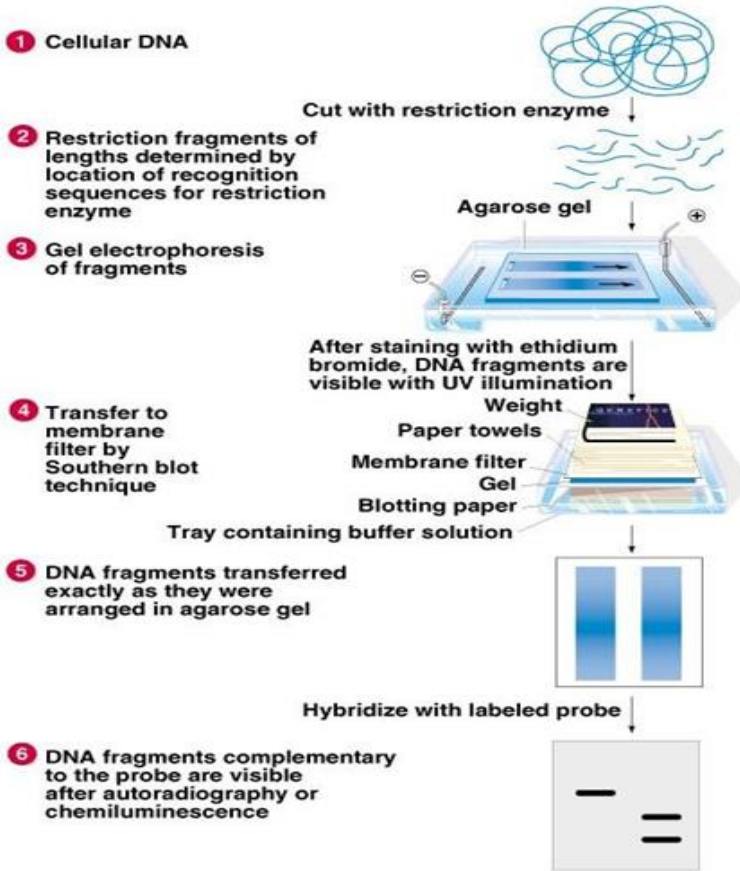
Southern blot tekniğinin adımları şunlardır:

- 1. DNA izolasyonu:** Örnek organizmadan DNA izole edilir.
- 2. Restriksiyon enzimi ile sindirim:** DNA, belirli bir DNA sekansını tanıyan ve kesen bir restriksiyon enzimi ile sindirilir.
- 3. Elektroforez:** Sindirilmiş DNA, boyutlarına göre ayrıştırılmak için elektroforez ile ayrıştırılır.

4. **Membrana transfer:** Ayrılmış DNA, nitroselüloz veya naylon gibi bir membrana aktarılır.
5. **Hibridizasyon:** Membrana, radyoaktif veya floresan etiketli bir prob ile hibridize edilir. Prob, DNA'daki tamamlayıcı sekansa bağlanır.
6. **Yıkama ve tespit:** Fazla prob yıkanır ve etiketli probun bağlandığı bantlar, radyografi veya floresan tarayıcı ile tespit edilir.



Şekil 13: Sekans ile Tanımlama Yapma



Şekil 14: Agarose Jelde Etiketleme Yapma

Klonlanan Vektörün Hücrelerden Seçimi

Klonlamada karşılaşılan sorunlardan biri de kolonilerden rekombinant plazmitlerin seçimidir. Çoğu zaman transformasyon sonrasında onlarca hatta yüzlerce koloni karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan hangilerinin rekombinant plazmitleri içerdiğinin tespiti gerekmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisinde, klonlanmış DNA'nın taşıyıcı plazmit içerisinde başarıyla yerleştirilmesi ve seçilmesi

kritik önem taşır. Bu seçim işlemi, çeşitli yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir (Bulut & ark., 2002). İki yaygın yöntem şunlardır:

Antibiyotik Direnç Genleri Kullanımı:

Birçok plazmit, ampisilin veya tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç kazandıran genler taşır. Bu direnç genleri, rekombinant plazmit seçiminde önemli rol oynar.

- **Transformasyon:** Hedef DNA, antibiyotik direnç geni içeren bir plazmit ile birlikte konak hücrelere aktarılır.
- **Seçim:** Transformasyon işleminden sonra, konak hücreler antibiyotik içeren bir besi ortamına ekilir.
- **Sadece Rekombinant Plazmit Sahip Hücrelerin Büyümesi:** Antibiyotik direnç geni içeren rekombinant plazmit taşıyan hücreler, antibiyotiğe karşı dirençli oldukları için hayatta kalırken, plazmit içermeyen veya farklı bir plazmit içeren hücreler ölür.
- **Mavi/Beyaz Renkli Koloniler:** Bazı plazmitler, β -galaktozidaz enziminin α -peptidini kodlayan bir diziye de sahiptir. Bu enzim, X-gal isimli bir substratı mavi renge dönüştürür. Rekombinant plazmit içeren hücreler mavi koloniler oluştururken, plazmit içermeyen hücreler beyaz koloniler oluşturur (Bulut & ark., 2002).

β -galaktozidaz Kullanımı:

pTARGET gibi bazı vektörler, β -galaktozidaz enziminin α -peptidini kodlayan bir diziye sahiptir. Bu enzim, X-gal isimli bir substratı mavi renge dönüştürür.

- **Transformasyon:** Hedef DNA, β -galaktozidaz geni içeren bir plazmit ile birlikte konak hücrelere aktarılır.
- **Seçim:** Transformasyon işleminden sonra, konak hücreler X-gal içeren bir besi ortamına ekilir.
- **Mavi/Beyaz Renkli Koloniler:** Rekombinant plazmit içeren hücreler, β -galaktozidaz geni sayesinde X-gal'i maviye dönüştürerek mavi koloniler oluştururken, plazmit içermeyen veya farklı bir plazmit içeren hücreler beyaz koloniler oluşturur (Bulut & ark., 2002).

Klonlamanın Doğrulanması

Klonlamanın doğrulanması için transforme katı besiyerindeki kolonilerden, PZRTarama ile kolonilerin rekombinant DNA'yı içerip içermediği hızlı bir şekilde tespit edilebilmektedir (35, Bulut & ark., 2003). Kolonilerin, agaroz jelde yürütülerek görüntülenmesi de rekombinant plazmitin doğrulanmasına yardımcı olmaktadır (Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989, 35). Doğrulamada kullanılan yöntem, araştırmanın amacına ve ihtiyaç duyulan hassasiyet seviyesine göre seçilir. Hızlı bir tarama için direkt agaroz jel yöntemi, daha detaylı analizler için miniprep ve enzim kesim deneyleri ve kesin doğrulama için DNA dizi analizi kullanılabilir.

Otomatize DNA dizi analizleri, günümüzde bu alandaki altın standart haline gelmiştir.

Plazmitler

Genetik mühendisliği ve gen klonlaması çalışmaları, modern biyolojinin temel taşlarından biridir. Bu alandaki gelişmeler, tıp, tarım, endüstri ve birçok başka alanda önemli atılımlar yapılmasını sağlamıştır. Genetik mühendisliğin temel unsurlarından biri de **plazmitlerdir**. Plazmitler, genetik mühendisliği ve gen klonlaması çalışmaları için önemli bir araçtır. Küçük boyutları, kendi kopyalama mekanizmaları ve genetik manipülasyona uygunlukları sayesinde birçok farklı amaçla kullanılabilirler. Plazmitler sayesinde bilim insanları, genlerin işlevlerini daha iyi anlayabilir, yeni ilaçlar ve tedaviler geliştirebilir ve tarımsal verimi artırabilirler (Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989).

PBR 322, rekombinant DNA teknolojisinde ilk kullanılan ve en çok kullanılan plazmitlerden biridir. 1977 yılında geliştirilen bu plazmit, aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- **Küçük boyutlu:** PBR 322 plazmidi, yaklaşık 4.4 kilobaz DNA barındırır. Bu küçük boyut, plazmidin kolayca izole edilmesini ve çalışılmasını sağlar.
- **Antibiyotik direnç genleri:** PBR 322 plazmidi, ampicilin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç kazandıran genler taşır. Bu özellik, rekombinant plazmit içeren hücrelerin seçilmesinde ve izole edilmesinde kullanılır.
- **Çoklu restriksiyon enzim bölgeleri:** PBR 322 plazmidi, birçok farklı restriksiyon enziminin

kesebileceği bölgeler içerir. Bu bölgeler, DNA parçalarının plazmite eklenmesi ve çıkarılması için kullanılır.

- **Kopyalama replikonu:** PBR 322 plazmidi, kendi kopyalama mekanizmasına sahip bir replikasyon replikonu taşır. Bu özellik, plazmidin bakteri hücrelerinde çoğalmasını sağlar (27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989).

pUC plazmitleri, pBR 322 plazmidinin geliştirilmiş versiyonlarıdır. pBR 322'den daha küçük boyutlu olan pUC plazmitleri, aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- **Daha küçük boyut:** pUC plazmitleri, pBR 322'nin yaklaşık yarısı boyutundadır. Bu küçük boyut, plazmidin kolayca izole edilmesini ve çalışılmasını sağlar.
- **Daha büyük DNA klonlama kapasitesi:** pUC plazmitleri, pBR 322'ye kıyasla daha büyük DNA parçalarının klonlanmasına izin verir.
- **Basit kullanım:** pUC plazmitleri, pBR 322'ye kıyasla daha basit bir kullanıma sahiptir.

Polilinker Bölgesi:

Polilinker bölgesi, pUC plazmitlerinde bulunan ve birçok farklı restriksiyon enzimiyle kesilebilen bir bölgedir. Bu bölge, DNA parçalarının plazmite eklenmesi için kullanılır. Polilinker bölgesinin özellikleri şunlardır:

- **Çoklu restriksiyon enzim bölgeleri:** Polilinker bölgesi, birçok farklı restriksiyon enziminin kesebileceği bölgeler içerir. Bu bölgeler, DNA parçalarının plazmite eklenmesi için kullanılır.
- **LacZ geni ile ilişkili:** Polilinker bölgesi, E.coli'nin lacZ geni içerisinde yer alır. LacZ geni, β -galaktozidaz enzimi üretimini kodlar.
- **Rekombinant DNA seçiminde kullanılır:** Polilinker bölgesine eklenen DNA, lacZ geninin bozulmasına sebep olur. Bu durum, β -galaktozidaz enzimi üretiminin durmasına ve beyaz bakteri kolonilerinin oluşmasına yol açar. Rekombinant DNA içeren hücreler ise mavi koloniler oluşturur. Bu sayede, rekombinant DNA taşıyan hücreler kolaylıkla ayırt edilebilir (27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989, Bensasson, Boore & Nielsen, 2004).

Klonlama çalışmaları ve gen mühendisliğinde önemli rol oynayan plazmitler, bakterilerde bulunan ve kromozomdan bağımsız olarak çoğalabilen, **küçük boyutlu, kovalent olarak kapalı, çift zincirli ve yuvarlak DNA molekülleridir**. Plazmitlerin boyutları 1 kb ile 200 kb arasında değişebilmektedir (27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989, Ertl & Thomsen, 2003).

Replikasyon orjinleri: Plazmitlerin çoğalmasını sağlayan ve birkaç yüz baz çifti uzunluğunda olan özel bölgelerdir. Bu sayede, düşük veya yüksek sayıda replike olabilen farklı plazmitler üretilmektedir.

Klonlama bölgesi: Rekombinant DNA'nın yerleştirildiği bölgedir. Bu bölge, birçok farklı restriksiyon enzimi kesme yeri içerir.

Promotorlar: Genlerin transkripsiyonunu başlatan ve protein sentezine yol açan DNA dizileridir. Klonlama plazmitlerinde bakteriofajlardan elde edilen T3, T7, SP6 ve tac promotorları kullanılırken, gen ekspresyon çalışmalarında Sitomegalo virus (SMV) promotoru ve Simian virus promotoru (SV40) gibi promotorlar tercih edilir.

Antibiyotik direnç genleri: Bazı plazmitler, ampicilin veya tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç kazandıran genler taşır. Bu genler, rekombinant DNA içeren hücrelerin seçilmesinde ve izole edilmesinde kullanılır (27, Fritsch, Maniatis & Sambrook, 1989, Ertl & Thomsen, 2003).

Gen Klonlamada Yeni Metotlar ve Önemli Noktalar

Klonlama çalışmaları, genlerin izole edilmesi, çoğaltılması ve başka bir organizmaya aktarılması işlemlerini içeren moleküler biyoloji teknikleridir. Bu teknikler, tıp, tarım, endüstri ve birçok başka alanda önemli uygulamalara sahiptir. Klonlama çalışmalarının ilk aşamasında, araştırma amacına uygun bir plazmit seçimi kritik önem taşımaktadır.

Bugün gelişen teknoloji ile birlikte birçok özelliği bir arada bulunduran plazmit, araştırmacıların hizmetine sunulmuş durumdadır. Bir plazmit, yapısındaki topoizomeraaz aktivitesi ile ligaz ilişkili vektör sistemlerine göre önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu sistemde sadece vektör ve PZR ile çoğaltılan gene gereksinim

duyulmakta ve vektöre genin yerleştirilmesi işlemi 5 dakikada tamamlanmaktadır.

Ayrıca ligazların nükleazlarla kontamine olarak gen ve vektör de çentikler oluşturmaları ve sonrasında rekombinasyon sayısının azaltılması, topoizomera kullanımı ile önlenmektedir.

Genlerin kodladığı proteinlerin ifade edilmesi beklenildiği durumlarda protein açıklama vektörlerinin seçilmesi gerekmektedir. Konvansiyonel olarak enzim kesimleri ile genin yerleştirileceği pCI-neo gibi plazmitler kullanılabileceği gibi direkt PZR ürününün yerleştirileceği pTARGET gibi vektörler de kullanılabilir (Hartley, 2006).

Bazı klonlama çalışmalarında, klonlanan genin ekspresyon seviyesinin kantitatif olarak ölçülmesi gerekir. Bu durumlarda, reporter genler içeren özel vektörler kullanılır. Reporter genler, kolayca ölçülebilen bir sinyal üreten genlerdir. Bu sinyal, protein ekspresyon seviyesinin bir göstergesi olarak kullanılır (Ashutosh & et al., 2005, Chen, 2002, Bartholomeu & et al., 2004, Brindley & et al., 2006., Dumas & et al., 2000, Fidock & et al., 2003).

Yaygın Kullanılan Reporter Vektörler:

- **β -Galaktosidaz reporter vektör:** Bu vektör, β -galaktosidaz enzimini kodlayan bir gen içerir. Bu enzim, X-gal isimli bir substratı mavi renge dönüştürür. Protein ekspresyonu arttıkça, mavi renk yoğunluğu da artar.
- **Kloramfenikol asetil transferaz reporter vektör:** Bu vektör, kloramfenikol asetil transferaz (CAT) enzimini kodlayan bir gen içerir. Bu enzim,

kloramfenikol isimli bir antibiyotik molekülünü asetil hale getirir. Protein ekspresyonu arttıkça, üretilen CAT enziminin miktarı da artar ve bu da daha fazla kloramfenikolün asetil hale getirilmesine yol açar.

- **Lusiferaz reporter vektör:** Bu vektör, lusiferaz enzimini kodlayan bir gen içerir. Bu enzim, ATP ve lusiferin isimli bir substrat varlığında ışık üretir. Protein ekspresyonu arttıkça, üretilen lusiferaz enziminin miktarı da artar ve bu da daha fazla ışık üretilmesine yol açar.

Reporter Vektör Seçimi:

Kullanılacak reporter vektör seçimi, ölçüm yöntemine ve araştırma amacına bağlıdır. Örneğin, β -galaktosidaz reporter vektör, görsel bir ölçüm yöntemi için kullanılabilirken, CAT reporter vektör daha hassas bir ölçüm imkânı sunar. Lusiferaz reporter vektör ise en hassas ölçüm yöntemlerinden biridir (Ashutosh & et al., 2005, Chen, 2002, Bartholomeu & et al., 2004, Brindley & et al., 2006., Dumas & et al., 2000, Fidock & et al., 2003).

Gen klonlaması çalışmalarında göz önünde bulundurulması gereken en önemli konulardan birisi de maliyet hesaplarıdır. PUC tabanlı veya pCI-neo gibi miniprep yapılarak plazmit DNA'sı elde edilmesine olanak sağlayan vektörler düşük maliyetleri ile özellikle yeni kurulan laboratuvarlar için önemli olmaktadır (Kuk, 2003).

Aşı ve Aşı Üretimi

Aşı ve teşhis araçlarının geliştirilmesinde rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi, geleneksel yöntemlere kıyasla birçok önemli

avantaja sahiptir. Geleneksel yöntemlerde, aşılar zayıflatılmış veya inaktif hale getirilmiş mikroorganizmalardan üretilir. Bu yöntemler, istenilen protein antijenlerinin büyük miktarlarda ve saf halde elde edilmesini zorlaştırabilir. rDNA teknolojisi ise, istenilen genin bir konak hücreye aktarılması ve bu hücrenin geni protein olarak üretmesi ile çalışır. Bu sayede, büyük miktarlarda ve saf halde protein antijeni elde etmek mümkündür (Balamurugan & et al., 2006).

Geleneksel yöntemlerle üretilen aşılar, partiden partiye değişkenlik gösterebilir. Bu durum, aşının etkinliğinde ve güvenliğinde dalgalanmalara yol açabilir. rDNA teknolojisi ile üretilen aşılar ise daha tutarlı bir kaliteye sahiptir. Çünkü bu yöntem, katı ve kontrollü bir üretim süreci içerir (Balamurugan & et al., 2006).

rDNA teknolojisi ile üretilen aşılar, zayıflatılmış veya inaktif mikroorganizmalar içermez. Bu nedenle, bu aşılarda bulaşıcı olma riski yoktur. Ayrıca, rDNA teknolojisi ile üretilen aşılar, geleneksel aşı üretim yöntemlerinde kullanılan kimyasallar ve katkı maddelerini içermezler (Balamurugan & et al., 2006).

rDNA teknolojisi, daha önce aşı geliştirilmesi zor veya imkansız olan hastalıklara karşı aşı geliştirmeyi mümkün kılmıştır. Örneğin, Hepatit B aşısı ve HPV aşısı rDNA teknolojisi kullanılarak geliştirilmiştir. rDNA teknolojisi, sadece aşı geliştirmede değil, aynı zamanda teşhis araçlarının geliştirilmesinde de kullanılmaktadır. Örneğin, bazı teşhis testleri, rDNA teknolojisi ile üretilen antikorlar veya enzimler kullanır (Balamurugan & et al., 2006).

Aşı Çeşitleri

- Konvansiyonel Aşılar
 - ✓ Canlı Aşılar
 - ✓ İnaktive Aşılar
- Biyoteknolojik Aşılar: Bazı moleküler teknikler kullanılarak hazırlanan aşılardır.
- İleri Teknoloji ile Hazırlanan Aşılar
 - ✓ Sentetik peptid aşılar
 - ✓ Antiidiotip antikör aşıları
 - ✓ Subünit aşılar
- Genetik Mühendisliği İle Hazırlanan Aşılar
 - ✓ Mutant aşılar
 - ✓ Subünit aşılar
 - ✓ Marker aşılar
 - ✓ Rekombinant mutant aşılar
 - ✓ Rekombinant ürünü aşılar
 - ✓ Nükleik asit aşıları (DNA aşıları)

Rekombinant Aşı

Rekombinant DNA teknolojisinin veteriner aşılar da kullanımı Rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilen aşılar “rekombinant aşı” olarak adlandırılmaktadır (Ellis, 1999). Rekombinant aşıların hastalığa neden olmamaları ve güçlü immun yanıt oluşturmaları önemli avantajlarındandır. İlk rekombinant aşılar, yaban hayatında kuduz hastalığını kontrol altına almak için 1980’lerin sonlarında geliştirilmiştir (Bauduin & et al., 1988).

Şu an piyasada ticari olarak bulunan bazı rekombinant veteriner aşılar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Bazı rekombinant veteriner aşılar

Hedef Patojen	Hedef Hayvan	Marka İsmi	Özellği
<i>Brucella abortus</i>	Sığır	RB-51	Rifamisin dirençli R
<i>Streptococcus equi</i>	At	Equilis StrepE	aroA silinmiş canlı aşı
<i>Chlamydomphila abortus</i>	Koyun	Ovilis Enzovax	Isıya duyarlı canlı aşı
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Tavuk	Vaxsafe MS	Isıya duyarlı canlı aşı
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Tavuk	Vaxsafe MG	Isıya duyarlı canlı aşı
<i>Salmonella spp.</i>	Hindi ve tavuk	Megan VacI	Çift geni silinmiş <i>S. Typhimurium</i>
<i>Bordetella avium</i>	Hindi	Art Vax	Isıya duyarlı canlı mutant suş
BHV-1	Sığır	Bovilis IBR Marker	gE geni silinmiş marker aşı
Equine Influenza Virus	At	Proteq-Flu	Canarypox virus vektör aşısı
West Nile Virus	At	West Nile- Innovator DNA	DNA aşısı
HTV ve IBDV	Tavuk	Vaxxitek HVT + IBD	Canlı rekombinant aşı
NDV	Tavuk	NA	HN rekombinant aşı
H ₂ N ₁ ve NDV	Tavuk	Vectormune FP-ND	Fowlpox virus vektör aşı
Kuduz	Köpek	Raboral	Vaccinia virus rekombinant aşı
Parvovirus	Köpek	Recombitek Canine Parvo	Canarypox virus vektör aşısı
Kedi Lösemi Aşısı	Kedi	Eurifel FeLV	Canarypoxvirus vektör aşısı
IHN	Alabalık	Novartis	DNA aşısı

Rekombinant DNA Teknolojisi ile İlaç Geliştirilmesi

Rekombinant DNA teknolojisi, genleri ve DNA'yı kesip yeniden birleştirerek istenilen özelliklere sahip yeni DNA molekülleri üretme imkânı sunan güçlü bir araçtır. Bu teknolojinin temel prensibi, özel enzimler kullanarak DNA'yı belirli bölgelerden kesmek ve bu parçaları taşıyıcı bir vektörün içine yerleştirmektir. Vektör daha sonra konak hücrelere (genellikle bakteriler) aktarılır ve burada DNA çoğaltılır (Ulutin, 2017, Şahin, 2013).

Rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi, ilaç geliştirmede yeni ve umut verici bir yöntemdir. Bu yöntem, hastalıkları tedavi etmek veya önlemek için genlerin ve DNA'nın manipüle edilmesini içerir. rDNA teknolojisi ile ilaç geliştirme süreci karmaşık olsa da, temel adımları şu şekilde sıralanabilir:

1. DNA İzolasyonu: İlk adım, hedef organizmadan (örneğin, insan hücreleri, mikroorganizmalar) DNA'yı izole etmektir. Bu işlem kimyasal veya enzimatik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir.

2. İstenilen Gen Bölgesinin Belirlenmesi: İkinci adım, istenilen proteinin sentezini kodlayan geni belirlemektir. Bu işlem genellikle DNA dizi analizi ve biyobilişim teknikleri kullanılarak gerçekleştirilir.

3. Genin Çıkarılması: Belirlenen gen, restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'dan çıkarılır. Restriksiyon enzimleri, DNA'yı belirli bölgelerden kesen özel enzimlerdir.

4. Vektör DNA Elde Edilmesi: Vektör DNA, rekombinant DNA'nın konak hücrelere aktarılması için kullanılan bir araçtır. Plazmitler ve virüsler yaygın olarak kullanılan vektör türleridir. Vektör DNA, restriksiyon enzimleri kullanılarak istenilen şekilde kesilir.

5. Gen DNA ile Vektör DNA'nın Birleştirilmesi: Kesilen gen DNA ve vektör DNA, ligasyon adı verilen bir işlem ile birbirine bağlanır. Bu işlem, DNA ligasi isimli bir enzim tarafından gerçekleştirilir.

6. Rekombinant DNA'nın Konak Hücrelere Yerleştirilmesi: Rekombinant DNA içeren vektör, konak hücrelere (genellikle bakteriler) aktarılır. Bu işlem, transformasyon veya transdüksiyon gibi farklı yöntemlerle yapılabilir.

7. Rekombinant DNA Replikasyonu ve Ekspresyonu: Konak hücreler çoğaldıkça, rekombinant DNA molekülü de

çoğaltılır. Bu sayede, istenilen proteinin sentezi için gerekli olan genin birçok kopyası elde edilir.

8. Mutant Hücrelerden Oluşan Genlerin İzolasyonu: Bazı durumlarda, istenilen proteinin fonksiyonel olması için gende mutasyonlar yapılması gerekebilir. Bu mutasyonlar, rekombinant DNA üzerinde çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilir. Mutant hücrelerden oluşan genler izole edilir ve dizi analizi ile mutasyonların doğruluğu kontrol edilir.

9. Protein Saflaştırma: Üretilen protein, konak hücrelerden santrifüjasyon ve kromatografi gibi teknikler kullanılarak saflaştırılır.

10. Klinik Testler: Saflaştırılan protein, hayvan modellerinde ve insanlarda güvenlik ve etkinlik açısından kapsamlı klinik testlere tabi tutulur (Ulutin, 2017, Şahin, 2013).

rDNA teknolojisinin ilaç geliştirmede birçok avantajı vardır:

- **Hedefe Yönelik Tedavi:** Hastalığa neden olan spesifik geni hedef alarak daha etkili ve daha az yan etkiye sahip ilaçlar geliştirilebilir.
- **Yeni İlaç Keşfi:** Daha önce imkansız olan yeni ilaçlar ve tedaviler geliştirilebilir.
- **Kişiselleştirilmiş Tıp:** Hastaların bireysel genlerine göre özelleştirilmiş ilaçlar geliştirilebilir.

Ancak rDNA teknolojisinin bazı dezavantajları da vardır:

- **Karmaşık ve Pahalı:** rDNA teknolojisi, geleneksel ilaç geliştirme yöntemlerine kıyasla daha karmaşık ve pahalıdır.

- **Etik Kaygılar:** rDNA teknolojisinin kullanımı, gen modifikasyonu ve klonlama gibi etik kaygıları gündeme getirmektedir.
- **Güvenlik Riskleri:** rDNA teknolojisi ile üretilen ilaçların uzun vadeli güvenlik riskleri tam olarak bilinmemektedir (Ulutin, 2017, Şahin, 2013).

Biyoteknoloji ürünü ilaçların geliştirilme süreci, ilk bakışta geleneksel ilaçların geliştirilme sürecine benzeyebilir. Her iki süreç de bir hastalığı teşhis etmek, tedavi etmek veya önlemek için yeni bir molekülün keşfedilmesi ve geliştirilmesi aşamalarını içerir (Şahin, 2013).

Ancak, biyoteknoloji ürünü ilaç geliştirme, her aşamada çok ayrıntılı ve gelişmiş tekniklerle yapılan analitik işlemlere gereksinim duyması bakımından geleneksel yöntemlerden önemli ölçüde farklılık gösterir. Bu farklılıkların en önemlileri şunlardır:

Hedef Belirleme:

- **Geleneksel İlaçlar:** Genellikle hücresel veya moleküler mekanizmaların tam olarak anlaşılmadığı durumlarda hastalığın semptomlarını hafifletmeye veya ortadan kaldırmaya odaklanır.
- **Biyoteknoloji Ürünlü İlaçlar:** Hastalığın kökenine inerek spesifik hücresel veya moleküler hedefleri belirlemeye odaklanır. Bu da daha etkili ve özel tedavilere olanak tanır (Şahin, 2013).

Rekombinant DNA teknolojisi, tıp alanında çığır açan gelişmelere yol açmış ve birçok yeni ve etkili farmasötik ürünün

geliştirilmesine imkân tanımıştır. Bu ürünler, geleneksel yöntemlerle üretilen ilaçlara kıyasla birçok avantaja sahiptir:

Avantajlar:

- **Daha Yüksek Safılık:** Rekombinant ürünler, hücre kültürleri kullanılarak üretilir ve bu da onları safsızlık riskinden arındırır.
- **Daha Tutarlı Kalite:** Rekombinant üretim süreci, geleneksel yöntemlere kıyasla daha fazla kontrol imkânı sunar ve bu da ürünlerin daha tutarlı bir kaliteye sahip olmasını sağlar.
- **Artırılmış Etki:** Rekombinant ürünler, istenilen proteinin daha yüksek konsantrasyonlarda üretilmesine imkân tanır ve bu da daha güçlü bir etkiye sahip olmalarını sağlar.
- **Daha Az Yan Etki:** Rekombinant ürünler, geleneksel yöntemlerle üretilen ilaçlarda bulunan safsızlıklardan arındırılmış olduğu için daha az yan etkiye neden olabilir.
- **Hedefe Yönelik Tedavi:** Rekombinant DNA teknolojisi, belirli hastalıklara neden olan spesifik proteinleri hedef alan ilaçların geliştirilmesine imkân tanır.

Rekombinant Farmakolojik Ürünlere Örnekler:

- **Aşılar:** Hepatit B, HPV, kızamık, kabakulak ve kızamıkçık aşıları gibi birçok aşı artık rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilmektedir.

- **Büyüme Faktörleri:** Erithropoietin (EPO), trombopoietin (TPO) ve insan büyüme hormonu (HGH) gibi birçok büyüme faktörü rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmektedir. Bu faktörler, anemi, kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılır.
- **Antikorlar:** Rekombinant antikorlar, kanser, bağışıklık sistemi hastalıkları ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılır.
- **Sitokinler:** İnterferonlar, interlökinler ve granülosit makrofaj-koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi sitokinler, kanser ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılır.
- **Hormonlar:** Rekombinant insülin, diyabet tedavisinde kullanılır. Rekombinant tiroid hormonu, tiroid bezi yetmezliği tedavisinde kullanılır.
- **Koagülasyon Proteinleri:** Rekombinant faktör VIII ve faktör IX, hemofili hastalarının tedavisinde kullanılır.
- **Enzimler:** Rekombinant DNaz, kistik fibroz hastalarının solunum yollarında biriken mukusu inceltmek için kullanılır. Rekombinant alteplaz, kalp krizi ve felç gibi akut vasküler olayların tedavisinde kullanılır (Şahin, 2013, Atanasova & Terziivanov, 2010, Raso & Steinberg, 1998, Akbuğa, 2002.).

Biyoteknoloji, ilaç sanayisini dönüştürerek birçok yeni ve etkili tedavinin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi, insülin gibi hayati önem taşıyan proteinlerin büyük miktarlarda ve saf halde üretilmesine imkân tanımıştır. Bu, diyabet hastaları için büyük bir umut kaynağı olmuştur (Bakırcı, 2012, Açıkgöz, 2011).

Rekombinant teknolojinin ilaç sanayisinde kullanımı, transgenik hayvanlardan hormonların üretilmesi ile daha da ivme kazanmıştır. Bu yöntem, daha önce imkânsız olan birçok yeni tedavinin geliştirilmesine olanak tanımıştır. Örneğin, büyüme hormonu eksikliği olan çocuklar için rekombinant insan büyüme hormonu üretilmiştir (Bakırcı, 2012, Açıkgöz, 2011).

Günümüzde ise gen tedavisi, tıp alanındaki en heyecan verici gelişmelerden biridir. Bu yöntem, hastalığa neden olan genleri değiştirerek veya onararak hastalıkları tedavi etmeyi amaçlamaktadır. Gen tedavisi hala başlangıç aşamasındadır, ancak birçok hastalık için umut vadeden bir tedavi seçeneği sunmaktadır.

Biyoteknolojinin ilaç sanayisine sağladığı diğer önemli katkılar şunlardır:

- **Kanser tedavisinde yeni ilaçların geliştirilmesi:** Rekombinant DNA teknolojisi ve monoklonal antikorlar kullanılarak kanser hücrelerini hedef alan yeni ilaçlar geliştirilmiştir.
- **Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi:** Antibiyotik direncinin artmasıyla mücadele etmek için

biyoteknoloji kullanılarak yeni antibiyotikler geliştirilmektedir.

- **Nadir hastalıkların tedavisinde yeni ilaçların geliştirilmesi:** Rekombinant DNA teknolojisi, nadir hastalıklara neden olan genleri hedef alan yeni ilaçların geliştirilmesine imkân tanımıştır (Bakırcı, 2012, Açıkgöz, 2011).

Transgen Protein

Rekombinant protein üretimi, modern tıbbın ve farmasötik endüstrisinin temel taşlarından biridir. Bu proteinler, insülin, büyüme hormonu ve antikorlar gibi birçok hayati önem taşıyan ilaç ve tedavinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Rekombinant protein üretiminde bakteriler, mayalar ve transgenik bitkiler gibi çeşitli sistemler kullanılmaktadır (Kiepure & et al., 2013).

Ancak, transgenik hayvanlar, protein üretimi açısından bazı önemli avantajlar sunmaktadır:

Yüksek Üretim Kapasitesi: Transgenik hayvanlarda, memeli hücre sistemlerine kıyasla rekombinant protein üretimi birkaç kat daha fazla olabilir. Bu da, büyük miktarda proteine ihtiyaç duyulan tedaviler için idealdir.

Karmaşık Proteinlerin Üretimi: Transgenik hayvanlar, bakteriler ve mayalar gibi tek hücreli sistemlerde üretilemeyen karmaşık proteinlerin üretiminde kullanılabilir.

Post-Translasyonel Modifikasyonlar: Transgenik hayvanlar, proteinlerin doğal hücresel ortamda uğradığı post-translasyonel modifikasyonları taklit edebilir. Bu da, proteinlerin işlevselliğini ve stabilitelerini artırır.

Genel Güvenlik: Transgenik hayvanlar, bakteriyel kontaminasyon riski gibi diğer sistemlerde bulunan bazı risklerden arındırılmıştır.

Bu avantajlar sayesinde, transgenik hayvanlar günümüzde birçok terapötik proteinin üretimi için kullanılmaktadır. Örneğin, ATIII (antitrombin III) proteini, hemofili B hastalığının tedavisinde kullanılır ve tPA (trombolizin plazminojen aktivatörü) proteini ise kalp krizi ve felç tedavisinde kullanılır (Kiepora & et al., 2013).

Transgenik hayvanlarda protein üretimi, sadece insan tedavisinde değil, hayvan sağlığında da önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, transgenik ineklerde üretilen bovine somatotropin (BST) proteini, süt üretimini artırmak için kullanılır (Kiepora & et al., 2013).

Rekombinant DNA Teknolojisi ve Aşı Geliştirme: Hastalıklara Karşı Güçlü Bir Silah

Rekombinant DNA teknolojisi, tıp alanında çığır açan gelişmelere yol açmış ve birçok yeni ve etkili aşı geliştirilmesine imkân tanımıştır. Bu aşılar, geleneksel yöntemlerle üretilen aşılarla kıyasla birçok avantaja sahiptir:

Avantajlar:

- **Daha Güvenli:** Rekombinant aşılar, zayıflatılmış veya inaktif hale getirilmiş patojenler yerine, hastalığa neden olan spesifik proteinleri içerir. Bu da, aşı reaksiyonlarının riskini azaltır.
- **Daha Etkili:** Rekombinant aşılar, bağışıklık sisteminin daha güçlü bir şekilde yanıt vermesini sağlayarak daha etkili bir koruma sağlayabilir.

- **Daha Üretilbilir:** Rekombinant aşılar, geleneksel yöntemlerle üretilen aşılarla kıyasla daha büyük miktarlarda ve daha hızlı bir şekilde üretilir.
- **Daha Esnek:** Rekombinant DNA teknolojisi, yeni ve gelişmekte olan hastalıklara karşı hızla aşı geliştirilmesine imkân tanır.

Rekombinant Aşı Örnekleri:

- **Hepatit B aşısı:** Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak geliştirilen ilk aşıdır. Hepatit B virüsünün majör yüzey antijeni geninin maya hücrelerinde klonlanmasıyla üretilmiştir.
- **Human papillomavirus (HPV) aşısı:** Rahim ağzı kanseri ve diğer kanserlere karşı koruma sağlar.
- **Suçiçeği aşısı:** Suçiçeğine karşı koruma sağlar.
- **Menenjit aşısı:** Meningokok menenjitine karşı koruma sağlar.
- **Gelişmekte Olan Rekombinant Aşılar:**
 - **AIDS aşısı:** AIDS'e karşı bir aşı geliştirmek için birçok araştırma devam etmektedir.
 - **Malaria aşısı:** Malaryaya karşı bir aşı geliştirmek için birçok araştırma devam etmektedir.
 - **Tüberküloz aşısı:** Tüberküloza karşı daha etkili bir aşı geliştirmek için çalışmalar yapılmaktadır (Şahin, 2013).

SONUÇ

Biyoteknoloji, veteriner hekimliğinde de tıpkı insan tıbbında olduğu gibi çığır açan gelişmelere yol açmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ve diğ er biyoteknolojik araçlar kullanılarak, hayvan hastalıklarının teşhis, tedavi ve önlenmesinde yeni ve etkili yöntemler geliştirilmektedir.

Rekombinant ilaçlar ve gen terapisi gibi biyoteknolojik yöntemler, geleneksel ilaçlara kıyasla daha etkili ve daha az yan etkiye sahip tedaviler sunmaktadır. Moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak, hayvan hastalıkları daha hızlı ve daha doğru bir şekilde teşhis edilebilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen aşılar, daha güvenli ve daha etkilidir. Genetik m hendisliğı teknikleri kullanılarak, hayvanların hastalıklara karşı direnci artırılabilir.

Rekombinant aşılar ve antibiyotikler, hayvanlarda enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmaktadır.

Rekombinant ilaçlar ve gen terapisi, hayvanlarda kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, hayvanlarda üreme sağlığı ile ilgili problemler teşhis ve tedavi edilebilmektedir. Biyoteknoloji kullanılarak, hayvan yemleri daha besleyici hale getirilebilir.

Biyoteknolojinin veteriner hekimliğinde kullanımı her geçen gün artmaktadır. Veteriner hekimler, her hayvanın bireysel ihtiyaçlarına göre özel tedaviler geliştirmek için biyoteknolojiyi kullanabileceklerdir. Biyoteknoloji, insanlara ve hayvanlara

bulaşabilen zoonotik hastalıkların kontrolünde önemli rol oynayabilir.

Biyoteknolojinin veteriner hekimliğinde daha fazla kullanılabilmesi için veteriner hekimlikte biyoteknolojiye yönelik araştırma ve geliştirme faaliyetlerinin artırılması gerekmektedir. Veteriner hekimlik fakültelerinde biyoteknolojiye yönelik eğitim programları geliştirilmeli ve bu dersler müfredata eklenmelidir. Biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesi ve pazarlanması için sanayi, üniversite ve araştırma kurumları arasındaki iş birliği artırılmalıdır.

Biyoteknoloji, veteriner hekimliğinde yeni bir çağ açma potansiyeline sahiptir. Bu teknolojinin sorumlu ve etik bir şekilde kullanılması, hayvan refahını ve gıda güvenliğini önemli ölçüde geliştirmeye katkıda bulunacaktır.

Rekombinant DNA teknolojisi, tıp alanındaki gelişmelerin ön saflarında yer almaya devam etmektedir. Bu teknolojinin kullanımıyla gelecekte daha birçok yeni ve etkili farmasötik ürün geliştirilmesi beklenmektedir. Bu ürünler, birçok hastalığın daha etkili bir şekilde tedavi edilmesine ve hastaların yaşam kalitesinin artmasına katkıda bulunacaktır. Moleküler biyoloji ve gen teknolojisindeki gelişmeler, transgenik hayvanlarda protein üretimini daha da optimize etmeye ve yeni uygulamalar geliştirmeye olanak sağlamaktadır. Bu alandaki araştırmaların artmasıyla birlikte, transgenik hayvanlar, yakın gelecekte ilaç sanayisinde ve endüstrisinde daha da önemli bir rol oynayacağı benziyor. Rekombinant DNA teknolojisi, aşı geliştirmede önemli bir rol oynamaya devam etmektedir. Bu teknolojinin kullanımıyla gelecekte daha birçok yeni ve etkili aşı geliştirilmesi beklenmektedir. Bu aşılar, birçok hastalığın daha etkili bir şekilde

önlenmesine ve insanların daha sağlıklı bir yaşam sürmesine katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

http://eczacilik.anadolu.edu.tr/bolumSayfaları/belgeler/Genetik%20Materyal_20140404062843.pdf

Katartaş Z. 2011. Rekombinant DNA teknolojisi ile ilaç üretimi. Bitirme Ödevi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji, Kayseri.

Arda M. 2000. Gen klonlanması (moleküler klonlama). Arda M, ed. Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. 2000. Medisan Yayınevi, Ankara. s. 50-150.

Temizkan G, Arda N. 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. “Genetik Mühendisliği, Nobel Kitabevi, Ankara.

Soydemir E, Aksoy ZB. 2017. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı. Güncel Gastroenteroloji 21(1): 14-17.

Khan S, Ullah MW, Siddique R, (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. Int J Genomic. 2405954.

Jackson D, Symons R, Berg P. 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into dna of simian virus 40: circular sv40 dna molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of escherichia coli. Proc Natl Acad Sci, 69(10): 2904-2909.

Hughes SS. 2001. Making dollars out of DNA. The First Major Patent in biotechnology and the commercialization of molecular biology, 1974-1980. Isis., 92(3): 541-75.

Bakırcı ÇM. 2012. Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) nedir? Faydaları ve zararları nelerdir? GDO hakkında bilimsel gerçekler.<http://evrimagaci.org/article/tr/genetigi-degistirilmis-organizmalargdo-nedir-faydalari-ve-zararlari-nelerdirgdohakkinda-bilimsel-gercekler> (Erişim Tarihi: 20.11.2017).

Ladisch MR, Kohlmann KL. 1992. Recombinant human insülin. Biotechnol. Prog., 8:469-478.

Uzun A. 2002. Gen teknolojisi ve biyogüvenlik. Alatarım, 1(2): 27-34.

Açıkgöz N. 2011. İlk Ticari transgenik hayvan: keçi, Erişim:<http://agrobiyoteknoloji.blogcu.com/ilk-ticaritransgenik-hayvan-keci/10569623>. (Erişim tarihi: 20.11.2017)

Adiguzel C, Iqbal O, Demir M, et al. 2009. European community and US-FDA approval of recombinant human antithrombin produced in genetically altered goats. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 15(6): 645-651.

Kishi N, Sato K, Sasaki E, et al. 2014. Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology. Development, growth & differentiation, 56(1): 53-62.

Van Doorn MBA, Burggraaf J, Van Dam T, et al. 2005. A phase 1 study of recombinant human c1 inhibitor in asymptomatic patients with hereditary angioedema. J. Allergy Clin İmmunol, 116(4): 876-883.

Yang B, Wang J, Tang B, et al. 2011. Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. PloS one, 6(3): e17593.

Aerni P. 2004. Risk, regulation and innovation: The case of aquaculture and transgenic fish. *Aquatic Sciences-Research across Boundaries*, 66(3): 327-341.

Naylor R, Hindar K, Fleming IA, et al. 2005. Fugitive salmon: assessing the risks of escaped fish from net-pen aquaculture. *AIBS Bulletin*, 55(5), 427-437.

Ledford H. 2015. Salmon approval heralds rethink of transgenic animals. *Nature*, 527: 417-418.

Yurdusev N. 2002. Hayvancılık ve Veteriner Hekimlikte Gen Teknolojileri ve Biyoteknoloji, *Avrasya Dosyası, Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri Özel, Sonbahar 2002*, 8(3): 77-89.

Ulutin. 2017. Rekombinant DNA teknolojisi. Erişim Adresi: http://194.27.141.99/dosya_-_depo/ders-notlari/turgut-ulutin/rec-DNAt.pdf. Erişim Tarihi: 24.05.2017.

Kiper M. 2013. Biyoteknoloji sektörle inovasyon sistemi kavramlar dünyadan örnekler türkiye’de durum ve çıkarımlar, Baskı Afşar Matbaacılık. Yayınno: TTGVT/2013/001. Ankara.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, eds., 1994. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, p. 308-318.

Brown TA, 1990. *Gene Cloning*. Second Edition. London: Chapman & Hall, p.3- 11.

Lewin B, eds., 2000. *Gene VII*. New York: Oxford University Pres, p.52-60.

www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.section.479 Medical Microbiology. Erişim tarihi: 12.01.2007.

www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mga.chapter.153

6. Modern Genetic Analysis. Erişim tarihi: 12.01.2007.

Grimm D, 2002. Production methods for gene transfer vectors based on adeno- associated virus serotypes. *Methods*, 28(2): 146-157.

Lachmann R, 2004. Herpes simplex virus-based vectors. *Int J Exp Pathol*, 85(4): 177-190.

Li S, Ma Z, 2001. Nonviral gene therapy. *Curr Gene Ther*, 1(2): 201-226.

https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/7196/mod_resource/content/0/6.%20Hafta.pdf

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres, p. 1- 1.86.

pcDNA3.1/V5-His-TOPO. 2007. Invitrogen K4800.

Hartley JL, 2006. Cloning technologies for protein expression and purification. *Curr Opin Biotechnol*, 17(4): 359-366.

Subcloning notebook. 2007. Promega

TOPO XL PCR Cloning Kit. 2007. Invitrogen K4700.

Kuk S. 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L1 geninin ökaryotik hücrelerde açıklatılması. Uzmanlık Tezi. F.Ü. Tıp Fakültesi Parazitoloji AD. Elazığ.

Özdarendeli A, Kaplan M, Kuk S, Demirdağ K, Kalkan A, 2003. In vitro transkripsiyonla *Fasciola hepatica* Cathepsin L1

RNA'sının Elde Edilmesi (Ön çalışma). Türkiye Parazitol Derg, 27: 27-30.

Kaplan M, Kuk S, Özdarendeli A, Bulut Y, Kalkan A, 2002. *Fasciola hepatica* cathepsin L1 geninin klonlanması ve rekombinant plazmitlerin polimeraz zincir reaksiyon taraması ile belirlenmesi. Türkiye Parazitol Derg, 26: 388-392.

Özdarendeli A, Toraman ZA, Kuk S, Tonbak S, Bulut Y, Kalkan A, 2003. Polimeraz zincir reaksiyonu ile transforme bakteriyel kolonilerin belirlenmesi (PZR-Tarama). Fırat Tıp Dergisi, 8: 79-82.

Bensasson D, Boore JL, Nielsen KM, 2004. Genes without frontiers? Heredity, 92(6): 483-489.

Ertl PF, Thomsen LL, 2003. Technical issues in construction of nucleic acid vaccines. Methods. 31(3): 199-206.

Ashutosh, Gupta S, Ramesh, Sundar S, Goyal N, 2005. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. Antimicrob Agents Chemother, 49(9): 3776-3783.

Chen Y, 2002. A novel single-stranded DNA expression vector. Expert Opin Biol Ther, 2(7): 735-740.

DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ, Teixeira SM, 2004. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. Parasitol Res, 92(2): 113-120.

Kines KJ, Mann VH, Morales ME, Shelby BD, Kalinna BH, Gobert GN, Chirgwin SR, Brindley PJ, 2006. Transduction of

Schistosoma mansoni by vesicular stomatitis virus glycoprotein pseudotyped Moloney murine leukemia retrovirus. Exp Parasitol, 112(4): 209-220.

Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, Ouellette M, Olivier M, Papadopolou B, 2000. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying Leishmania spp. infections in macrophages and in animal models. Mol Biochem Parasitol, 110(2):95-206.

Waller KL, Muhle RA, Ursos LM, Horrocks P, VerdierPinard D, Sidhu AB, Fujioka H, Roepe PD, Fidock DA, 2003. Chloroquine resistance modulated in vitro by expression levels of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter. J Biol Chem, 278(35): 33593-33601.

Balamurugan V, Sen A, Saravanan P, Singh RK, (2006). Biotechnology in the production of Recombinant Vaccine or Antigen for Animal Health. J Anim Vet Adv. 5(6), 487-495.

Ellis RW, (1999). New technologies for making vaccines. Vaccine. 17, 1596-1604.

Pastoret PP, Brochier B, Languet B, Thomas I, Paquot A, Bauduin B, Kieny MP, Lecocq JP, De Bruyn J, Costy F, (1988). First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. Vet Rec. 123, 481-483.

Şahin O. 2013. Rekombinant DNA teknolojisinin eczalıktaki uygulamaları. Bitirme Ödevi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri.

Atanasova IV, Terziivanov D. 2010. Advanced molecular Therapies of the 21st century I. Recombinant drug productsproteins and vaccines. J Clin Med. 3(2): 9- 18.

Steinberg FM, Raso J. 1998. Biotech pharmaceuticals and biotherapy: an overview. J Pharm Pharm Sci, 1(2): 48-59.

Akbuğa J. 2002. Farmasötik biyoteknoloji ürünleri. Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi. S: 54-62. Erişim: <http://ekutuphane.teb.org.tr/pdf/mised/mayis02/10.pdf> (Erişim tarihi: 20.11.2017).

Stryjewska A, Kiepora K, Librowski T, et al. 2013. Biotechnology and genetic engineerin in the new drug development Part I. DNA technology and recombinant proteins. Pharmacological Reports. 65; 1075-108.

BÖLÜM II

Zorunlu Hücre İçi Bakterilerin Hücre Kültüründe Üretilmesi

Müzeyyen DEMİR³
Ayda Nur OĞUZ⁴

Hücre Kültürünün Tanımı ve Genel Bilgiler

Hücre kültürü, hücrelerin belirli bir besi ortamında çoğaltılması ve kontrol altında tutulması işlemidir. Bu sayede, canlı bir organizmanın içindeki doğal ortamlarından farklı olarak, hücrelerin davranışlarını ve işlevlerini **in vitro** (laboratuvar ortamında) incelemek mümkün hale gelir.

Hücre kültürü ve genetik analiz:

- **Rekombinant ve mutant DNA'ların belirlenmesi:**
Kültürdeki hücreler, farklı genleri içeren

³ Doktor, Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, vetmzyyndmr@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7082-4473>

⁴ Doktorant, Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, vethekydanur@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0771-8029>

rekombinant DNA molekülleri ile transfekte edilebilir. Bu sayede, genlerin işlevleri ve birbirleriyle olan etkileşimleri incelenebilir.

- **Gen haritalama:** Hücre kültürü, kromozom haritalama ve gen dizileme gibi moleküler genetik teknikleri için ideal bir platform sağlar. Bu sayede, genlerin kromozomlardaki konumları ve dizileri belirlenebilir.

Hücre kültürü için doku kaynakları:

- **Doğum öncesi tanı:** Amniyotik hücreler, Down sendromu ve diğer genetik hastalıkları teşhis etmek için kromozom analizi gibi genetik testler için kullanılabilir.
- **Araştırma:** Epitel ve fibroblast hücreleri, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve metabolik bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların mekanizmalarını araştırmak için kullanılabilir.
- **Kök hücreler:** Kemik iliği ve periferel kandan izole edilen kök hücreler, yenilikçi hücre terapileri ve ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılabilir.
- **Tümör hücreleri:** Çeşitli tümör hücreleri, kanser biyolojisini ve yeni kanser tedavilerini araştırmak için kullanılabilir.

Hücre kültürü, birçok bilimsel araştırmada ve deneysel çalışmada kullanılan önemli bir yöntemdir. Özellikle deney hayvanı kullanımının etik ve pratik açıdan zorlayıcı olduğu durumlarda alternatif bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Dikkat edilmesi

gereken en önemli konu titizlik ve sterilizasyon koşullarına uyumdur (Adıgüzel & ark, 2008).

Hücre kültürleri hücre süspansiyonları veya primer doku eksplantlarından meydana gelir. Hücre kültürleri genel olarak monolayer kültür ve süspansiyon kültür olmak üzere ikiye ayrılır.

Süspansiyon Kültür:

- Genellikle kan, kemik iliği ve bazı tümör hücrelerinden elde edilen hücreler için kullanılır.
- Bu hücreler kültür kabına yapışmadan, besi ortamında serbestçe yüzer şekilde çoğalırlar.
- Süspansiyon kültürler, hücre-hücre etkileşimlerini ve hücrelerin hareket kabiliyetini incelemek için idealdir.
- Lösemi ve diğer kan hastalıklarının mekanizmalarını araştırmak için sıklıkla kullanılır (Uçar & Ovalı, 2003).

Monolayer Kültür:

- Amniyon hücreleri ve fibroblast hücreleri gibi yapışmaya ihtiyaç duyan hücreler için kullanılır.
- Bu hücreler, kültür kabının düz yüzeyine yapışarak bir tabaka oluştururlar.
- Monolayer kültürler, hücrelerin morfolojisini ve hücre-matriks etkileşimlerini incelemek için idealdir.
- Genetik hastalıkları teşhis etmek, ilaçların hücreler üzerindeki etkilerini araştırmak ve doku mühendisliği

alışmaları için sıklıkla kullanılır (Uçar & Ovalı, 2003).

Teorik olarak, çekirdeği olan her hücre çoğalma yeteneğine sahiptir. Fakat pratikte, vudumuzdaki hücrelerin çoğalma kapasiteleri oldukça farklılık gösterir. Bu farklılıkları temel alarak, hücreleri üç ana gruba ayırabiliriz:

Kök Hücreler:

- Sürekli çoğalan hücrelerdir. Kemik iliği, cilt, beyin ve gastrointestinal sistemin epitel hücreleri gibi dokularda bulunur.
- Farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Yani, zel işlevleri yerine getiren farklı hücre tiplerine dönüşebilirler.
- Vücudun onarım ve yenilenme süreçlerinde önemli rol oynarlar.
- Embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Embriyonik kök hücreler, daha fazla farklılaşma potansiyeline sahipken, yetişkin kök hücreler daha sınırlı bir farklılaşma yeteneğine sahiptir.

Uyarılabilir Hücreler:

- Normalde oğalmazlar, ancak belirli bir uyarıya maruz kaldıklarında çoğalmaya başlarlar. Karaciğer hücreleri, periferel lenfositler ve makrofajlar gibi hücreler bu gruba girer.

- Uyarılar arasında enfeksiyonlar, yara iyileşmesi ve toksinler yer alır.
- Vücudun savunma ve onarım mekanizmalarında önemli rol oynarlar.

Sonlu Hücreler:

- Yaşam boyu sadece bir kez çoğalırlar. Sinir sistemi hücreleri ve gözün bazı hücreleri bu gruba girer.
- Çoğalma kapasitelerini kaybettikten sonra da uzun yıllar boyunca işlevlerini yerine getirmeye devam ederler.
- Vücudumuzdaki en uzun ömürlü hücrelerdir (3).

Hücrelerin yapısı, işlevleri ve birbirleriyle olan etkileşimleri, biyolojinin ve tıbbın temelini oluşturan karmaşık konulardır. Bu karmaşıklığı anlamak için, tek bir hücre tipini detaylı bir şekilde incelemek önemlidir.

Hücre izolasyonunun amacı:

- **Belirli bir hücre tipine odaklanmak:** Dokular, birçok farklı hücre türünden oluşan karmaşık yapılardır. Hücre izolasyonu ile, araştırmacılar ilgilendikleri hücre tipini diğerlerinden ayırarak daha detaylı bir şekilde inceleyebilirler.
- **Hücrelerin işlevlerini ve özelliklerini araştırmak:** İzole edilmiş hücreler, doğal ortamlarından farklı olarak kontrollü bir laboratuvar ortamında incelenebilir. Bu sayede, hücrelerin işlevleri, gen

ekspresyonları ve sinyal iletim mekanizmaları gibi özellikleri daha net bir şekilde ortaya konulabilir.

- **Hastalık mekanizmalarını aydınlatmak:** Farklı hastalıklarda, hücrelerin işlevlerinde ve özelliklerinde anormallikler meydana gelebilir. Hücre izolasyonu ile, bu anormalliklerin kaynağını belirlemek ve yeni tedavi yöntemleri geliştirmek için çalışmalar yapılabilir (Alberts & et al, 2002).

Doğru, farklı hücre türlerinden oluşan bir dokudan tek tip hücre elde etmek için ilk adım ekstrasellüler matriksi (ECM) ayırmaktır. Bu, dokudaki hücreleri birbirine ve çevreye bağlayan proteinler, polisakkaritler ve diğer moleküllerden oluşan karmaşık bir ağıdır. ECM'yi ayırmak için doku örneği genellikle aşağıdakiler gibi çeşitli ajanlarla muamele edilir:

Proteolitik enzimler: Tripsin ve kollajenaz gibi enzimler, ECM'yi oluşturan proteinleri parçalayarak hücrelerin ayrılmasını sağlar. Tripsin, peptid bağlarını parçalayan bir serine proteazdır ve kollajenaz ise kollajen gibi fibriller proteinleri parçalayan bir enzimdir.

EDTA: EDTA, kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının bağlanmasıyla hücre adezyonunda önemli rol oynayan kalsiyum iyonlarını şelatlar. Bu, hücrelerin birbirine ve ECM'ye bağlanmasını zayıflatarak ayrılmasını kolaylaştırır.

Diğer ajanlar: Bazı durumlarda, ECM'yi ayırmak için başka ajanlar da kullanılabilir. Örneğin, disodium sitrat, hücreler arası yapışıklıkları zayıflatmak için kullanılabilir ve deoksiribonükleaz

(DNaz), hücre çekirdeklerini çevreleyen DNA'yı parçalayarak hücrelerin ayrılmasını kolaylaştırabilir (Alberts & et al, 2002).

Hücre süspansiyonundan farklı hücre türlerini ayırmak için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler, hücrelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve araştırmacının hedeflerine göre seçilir.

Fiziksel Ayırma Yöntemleri:

- **Süzme:** Farklı boyutlarda olan hücreleri ayırmak için kullanılır. Örneğin, eritrositler ve lökositler gibi büyük kan hücreleri, mikroplar ve bakteriler gibi daha küçük hücrelerden süzülerek ayrılabilir.
- **Santrifüjleme:** Farklı yoğunluklarda olan hücreleri ayırmak için kullanılır. Örneğin, yoğun kan hücreleri santrifüjleme ile plazmadan ayrılabilir.
- **Çökeltme:** Yerçekimi kuvvetini kullanarak hücreleri ayırmak için kullanılır. Örneğin, kırmızı kan hücreleri kanın dibine çökerken, plazma yüzeyde kalır.

Kimyasal Ayırma Yöntemleri:

- **Affinitesi kromatografisi:** Belirli hücre türlerine bağlanabilen özel moleküller (liganlar) içeren kolonlar kullanılarak hücreleri ayırmak için kullanılır. Örneğin, antikorlar kullanılarak belirli bir bağışıklık sistemi hücre tipi izole edilebilir.
- **Manyetik ayırma:** Hücre yüzeylerinde bulunan manyetik nanopartiküllere bağlanabilen mıknatıslar kullanılarak hücreleri ayırmak için kullanılır. Örneğin, kök hücreler veya kanser hücreleri gibi

belirli hücre popölasyonları manyetik ayırma ile izole edilebilir (Alberts & et al, 2002).

Diğer Yöntemler:

- **Farklı hücrelerin cam veya plastikten yapılmış yüzeye yapışma eğilimlerinden yararlanma:** Bazı hücre türleri, diğerlerinden daha fazla yapışma eğilimi gösterir. Bu özellikten yararlanarak, farklı hücre türleri seçici olarak izole edilebilir.
- **Hücre yüzeyindeki belirli proteinleri veya antikorları tanıyan floresan boyalar kullanarak hücreleri ayırma:** Floresan akış sitometrisi adı verilen bir teknikte, farklı hücre türleri floresan boylarla işaretlenerek ve bir lazer ışığı altında analiz edilerek seçici olarak izole edilebilir (Alberts & et al, 2002).

Hücre Kültürünün Tarihçesi

Doku kültürü, 20. yüzyılın başlarında bilim dünyasına yepyeni bir pencere açan çığır açıcı bir tekniktir. Bu yöntem, hayvan hücrelerinin özelliklerini, karmaşık bir organizmanın sistemik değişimlerinden etkilenmeden inceleme imkânı sunarak biyoloji ve tıbbın birçok alanında yöntem olarak kullanılmaktadır (Fresney, 2005).

1950’lerde ilk hücre dizisi ‘HeLa’, insan servikal kanserinden başarıyla kültüre edilmiştir. (Griffithd, 2007).

1950’lerde önemli gelişmeler olurken, 1980’lerde tekrarlanabilir memeli hücre kültürleri gerçekleştirilmiştir (Griffithd, 2007).

Yüzyılın ikinci yarısında, hücre kültürü çalışmaları sağlık alanlarında oldukça yaygınlaştı. Bu gelişmeye rağmen, 50 yılı aşkın süredir doku eksplantları da kullanılmaya devam ettiğinden, "doku kültürü" terimi günümüzde hala iki farklı anlamı kapsamaktadır:

1. Organ Kültürü: Bu yöntem, ayrıştırılmamış dokuların üç boyutlu bir ortamda yetiştirilmesini ifade eder. Bu sayede, organların ve dokuların doğal yapısı ve işlevleri korunarak incelenmesi mümkün olur. Organ kültürü, özellikle embriyonik gelişim, toksikoloji ve ilaç araştırmaları gibi alanlarda önemli bir araçtır.

2. Hücre Kültürü: Bu yöntem, primer hücreler veya hücre hatlarından elde edilen hücrelerin kontrollü koşullar altında çoğaltılmasını ve incelenmesini ifade eder. Hücre kültürü, hücrelerin davranışlarını ve işlevlerini detaylı bir şekilde incelemek için ideal bir ortam sunar. Bu sayede, kanser, genetik hastalıklar ve virüsler gibi birçok hastalık hakkında önemli bilgiler edinilmiştir.

Dolayısıyla, "doku kültürü" terimi hem organların üç boyutlu kültürünü hem de hücrelerin iki boyutlu kültürünü kapsar. Bu iki yöntem, birbirini tamamlayarak sağlık alanlarında önemli bir rol oynamaktadır (Griffithd, 2007). Hücre ve doku kültürünün gelişimine katkı sağlayan önemli olaylar Tablo 1’ de özetlenmiştir (Griffithd, 2007).

Tablo 1. Hücre ve Doku Kültürünün Gelişimine Katkı Sağlayan Önemli Olaylar

Tarih	Olay
1907	İn vitro kurbağa embriyonu sinir lifi üretimi
1912	Tavuk bağ dokusunun explantları
1920/30	Fibroblastik hücre soylarının subkültürü
1940	Doku kültüründe antibiyotik kullanımı
1943	İlk devamlı hücre soyları
1949	Hücre kültüründe virüsün üretilmesi
1952	Subkültürde tripsin kullanımı
1952-1955	Servikal karsinomadan ilk insan hücre soyu, HeLa
1955	HeLa'nın klonlanması Medyanın geliştirilmesi
1965	Çin hamster hücrelerinin serumsuz klonlanması
1970	Laminer akım kabinlerinin geliştirilmesi
1980-1987	Özel hücre soylarının geliştirilmesi
1991	Yetişkin insan mezenkimal kök hücresinin kültürü
1998	İnsan embriyonik kök hücre kültürü
2000 +	İnsan genom projesi: genomiks, proteomiks

Hücre Kültürünün Amaçları

Hücre ve doku kültürü, biyoloji ve tıp alanlarında çok yönlü bir araştırma aracı olarak öne çıkmaktadır. Farklı hücre ve doku

türlerinin laboratuvar ortamında yetiştirilmesi ve incelenmesi, birçok bilimsel alanda önemli gelişmelere yol açmıştır.

Hücre ve doku kültürü kullanımıyla:

- Aşılar, monoklonal antikorlar, enzimler ve hormonlar gibi tıbbi ürünler üretilebilmektedir.
- Hücre içi aktiviteler, DNA ve RNA replikasyonu, protein sentezi ve enerji metabolizması gibi temel biyolojik süreçler araştırılabilir.
- Farklı ilaçların hücre döngüsüne etkileri, hormonal reseptörlerin davranışları, sinyal iletim mekanizmaları ve hücre haberleşmesi gibi karmaşık fonksiyonlar incelenebilir.
- Hücrenin beslenme özellikleri, enfeksiyon mekanizmaları, viral ve kimyasal transformasyonlar gibi çeşitli konularda bilgi edinilebilir.
- Özel ürünlerin sentezlenmesi ve salgılanması, embriyonik gelişim, hücre popülasyon dinamikleri, adezyon, sitogenetik analiz, genetik manipülasyon ve immortalizasyon gibi alanlarda çalışmalar yapılabilir (Uçar & Ovalı, 2003).

Hücre kültürünün temel amaçları şunlardır:

Hücreleri Yaşatmak: Hücreler, doğal ortamlarından koparıldıklarında hayatta kalmakta zorlanabilirler. Hücre kültürü, bu hücrelere kontrollü bir ortamda gerekli besinleri ve oksijeni sağlayarak uzun süre yaşayabilmelerini sağlar (Adıgüzel & ark, 2008).

Hücreleri Çoğaltmak: Deneyler için yeterli sayıda hücreye ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar ortamında çoğaltılarak deneyler için gerekli sayıda hücrenin elde edilmesini sağlar.

Hücreleri Saklamak: Hücreler, dondurularak uzun süre saklanabilirler. Bu sayede, aynı hücrelerin ileride tekrar kullanılması veya farklı araştırmacılara gönderilmesi mümkün olur.

Hücrelerin çoğaltılması:

Hücrelerin çoğaltılması, hücre kültürü uygulamasının önemli bir aşamasıdır. Hücreler, belirli bir süre boyunca besin ve oksijen içeren bir ortamda inkübe edilerek çoğaltılır. Bu süre, hücre tipine ve kullanılan besi ortamına göre değişir. Hücrelerin çoğaltılması sayesinde, yapılabilecek deneylerin sayısı önemli ölçüde artırılabilir (Adıgüzel & ark, 2008).

Dondurulmuş hücrelerin kullanımı:

Deney yapılan pasajdaki hücrelerin dondurulması, ileride deneyin aynı pasajdaki hücrelerle tekrarlanabilmesini sağlar. Bu sayede, elde edilen sonuçların tutarlılığı kontrol edilebilir ve farklı laboratuvarlar arasında veri karşılaştırması yapılabilir. Her aşamada hücrelerin canlılığı en önemli aşamadır. Hücre kültüründe başarı, steril çalışma şartlarına bağlıdır (Adıgüzel & ark, 2008).

Hücre Kültürünün Avantajları

Çevrenin kontrolü:

Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar ortamında kontrollü bir şekilde yetiştirilmesi ve incelenmesi için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri, fizyolojik ve kimyasal çevrenin hassas bir şekilde kontrol edilebilmesidir. Doğal ortamda,

hücreler karmaşık ve sürekli değişen bir ortamda yaşarlar. Sıcaklık, pH, ozmotik basınç, oksijen ve karbondioksit gibi faktörler, hücrelerin işlevlerini ve davranışlarını doğrudan etkileyebilir. Bu faktörlerin kontrol altına alınması, hücrelerin nasıl tepki verdiğini ve hangi koşullarda en iyi şekilde büyüdüğünü anlamak için oldukça zordur. Hücre kültürü ortamında ise bu faktörler hassas bir şekilde kontrol edilebilir. Sıcaklık kontrollü inkübatörler, pH metreleri ve özel gaz karışımları kullanarak, hücrelerin ihtiyaç duyduğu ideal ortamı oluşturmak mümkündür. Bu sayede, hücrelerin davranışları daha net bir şekilde gözlemlenebilir ve farklı koşulların hücreler üzerindeki etkileri daha kolay analiz edilebilir. (Fresney, 2005).

Homojenitesi ve karakterizasyonu:

Doku örnekleri, doğaları gereği **heterojendir**, yani farklı hücre tiplerinden ve dokulardan oluşur. Bu durum, doku kültürünün ilk aşamalarında zorluklar yaratabilir. Ancak, bir veya iki pasajdan sonra, hücreler **homojen bir hale gelirler**. Bu, tüm hücrelerin benzer özelliklere sahip olduğu ve aynı şekilde davrandığı anlamına gelir.

Homojen hücre dizileri, araştırmacılara birçok avantaj sunar:

- **Tutarlı Sonuçlar:** Homojen hücreler, her seferinde tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar verir. Bu durum, farklı deneylerde elde edilen verilerin karşılaştırılmasını kolaylaştırır.
- **Standardize Araştırmalar:** Homojen hücre dizileri, standardize araştırma protokolleri geliştirilmesine olanak tanır. Bu sayede, farklı laboratuvarlar aynı hücreleri kullanarak benzer sonuçlar elde edebilirler.

- Uzun Vadeli Araştırmalar: Homojen hücre dizileri uzun süreli araştırmalar için idealdir. Bu hücreler, sıvı nitrojende dondurularak sonsuz süre boyunca saklanabilirler (Fresney, 2005).

Hücrelerin homojenliği ve çalışma koşullarının standardize edilmesi, hücre költürü çalışmalarının başarısı için kritik öneme sahiptir. Bu da çalışan kişilerin homojenitesi ve çalışmaları aynı koşullarda yapılmasından geçer (Aydıntuğ & Mutlu, 2003).

Ekonomi:

- Hücre költürleri, in vivo (canlı organizmada) testlere kıyasla daha ekonomiktir. Hücre költürlerinde, verilen maddenin %90'lara kadar bir kısmına cevap alınabilirken, canlı organizmalarda bu oran sadece %10 civarındadır. Bu durum, hücre költürlerinin çok daha yüksek bir verimliliğe sahip olduğunu gösterir (Fresney, 2005).

İn vivo durumların in vitro modellenmesi:

Hücre költürü, birçok bilimsel alanda önemli bir araştırma aracı olmasının yanı sıra, endüstriyel amaçlı ürün geliştirmede de büyük bir potansiyele sahiptir. Son yıllarda geliştirilen yeni teknikler (histotipik ve organotipik modellerdeki gelişme) sayesinde bu potansiyel daha da artmış ve hücre költürleri ile üretim yapmak çok daha kolay hale gelmiştir. (Fresney, 2005). Hücre költürünün temel avantajları Tablo 2' de gösterilmiştir (Fresney, 2005).

Tablo 2. Hücre Kültürünün Avantajları

Kategori	Avantajlar
Fizyo-kimyasal çevre	pH, ısı, osmalalite ve çözünmemiş gazların kontrolü
Fizyolojik şartlar	Hormonlar ve solüsyonların kontrolü
Mikroçevre	Matriksin düzenlenmesi, hücre-hücre etkileşimi ve gazların difüzyonu
Koruma	Sıvı nitrojen içerisinde depolanabilir.
Validasyon	Doğruluğu kanıtları ve kaydedilir.
Kopyalanma ve değişkenlik	Niceliksel ve kolaydır.
C x T'nin kontrolü (Konsantrasyon-Zaman)	Dozu belirleme yeteneği
Hayvan kullanımının azaltılması	Sitotoksik farmasötiklerin hayvanlar üzerinde denenmemesi

Hücre Kültürünün Dezavantajları

Uzmanlık:

Hücre kültürü çalışmaları mutlaka aseptik koşullarda yapılmalıdır. Bunun başlıca sebepleri şunlardır:

Kontaminasyon Riski: Hayvan hücreleri, maya, bakteri veya küf gibi mikroorganizmalara karşı son derece hassastır. Bu tür kontaminasyonlar, hücrelerin yavaş büyümesine, ölümüne veya fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilir. Bu durum da deney sonuçlarının yanlış veya anlamsız hale gelmesine yol açar.

Karmaşık Çevre İhtiyacı: Çok hücreli hayvanların hücreleri, doğal ortamında karmaşık bir ekstrasellüler matris (ECM) ve besin ortamı ile çevrilidir. Bu ortam, hücrelerin yapısal bütünlüğünü korumak, besin alımını ve atık madde atılımını sağlamak gibi hayati fonksiyonlar için gereklidir. Laboratuvar ortamında bu karmaşık ortamı taklit etmek için interstisyel sıvı veya kan plazması benzeri bir besin ortamı kullanmak gerekir. Aksi takdirde hücreler hayatta kalamaz veya istenilen şekilde çalışamazlar (Fresney, 2005, Aydınтуğ & Mutlu, 2003).

Miktar:

Küçük laboratuvarlarda hücrelerin 1-10 gramı ile çalışılabilir, büyük laboratuvarlarda ise 10-100 gram hücre ile çalışmak mümkündür. 100 gramın üstü hücre ile çalışılacaksa endüstriyel ortam gereklidir (Fresney, 2005).

Farklılaşma ve seleksiyon:

1950'lerde ilk hücre soyu çoğaltıldığında, hücrelerin karakteristik özelliklerinin değiştiği gözlemlenmiştir. İzole edilen hücreler, zamanla orijinal karakteristik özelliklerini kaybederek farklı bir hücre tipine dönüşmeye başlamıştır. Ancak daha sonra, farklılaşmanın tek sebebinin hücrelerin değişimi olmadığı, aynı zamanda farklı soy hücrelerinin aşırı büyümesi de olduğu anlaşılmıştır. Bu önemli keşif, hücre kültürüne yeni bir bakış açısı getirmiştir. Farklılaşmanın önlenmesi için besiyerleri yeniden düzenlenerek hücrelerin istenilen özelliklerini koruması için yeni teknikler geliştirilmiştir.

Sürekli hücre soylarının birkaç önemli sorunu da vardır. Bunlardan biri de stabilite sorunudur. Bu sorun, kromozom sayısındaki anormallikler (anöploidi) nedeniyle ortaya çıkar. Anöploid hücreler, normal hücrelere kıyasla daha az stabildir ve zamanla farklılaşabilir veya ölüme uğrayabilir.

Anöploid kromozomal bileşimin stabiliteye etkileri:

- Farklı büyüme ve gelişme oranları: Anöploid hücreler, farklı oranlarda büyür ve gelişir. Bu durum, hücre popülasyonunda heterojeniteye yol açar.
- Pasajdan pasaja çeşitlilik: Popülasyondaki bu farklılıklar, bir pasajdan diğerine çeşitlilik gösteren

hücrelerin oluşmasına neden olur. Bu durum, deney sonuçlarının tutarsız olmasına ve araştırmanın başarısız olmasına yol açabilir (Fresney, 2005). Hücre kültürünün dezavantajları Tablo 3’ te gösterilmiştir (Fresney, 2005).

Tablo 3. Hücre Kültürünün Dezavantajları

Kategori	Örnek
Uzman gerekliliği	Kimyasal kontaminasyon Mikrobiyal kontaminasyon Çapraz kontaminasyon
Çevresel kontrol	Çalışma alanı Biyolojik açıdan tehlikeli maddeler
Miktar ve masraf	Çalışılan malzemeler çok pahalı Medyum ve serum pahalı
Kullanılıp atılan plastik malzemeler	Flasklar
Genetik instabilite Fenotipik instabilite	Heterojenite, Selektif fazla büyüme
Hücre tiplerinin teşhisi	İşaretleyiciler daima göstermez Geometri ve sitolojisi değişik

Hücre Kültürünün Sınıflandırılması

Hücre kültürünün hazırlanmasında alınan küçük doku veya organ parçasına eksplant denir. Eksplant, canlı dokudaki hücrelerin doğal ortamını ve işlevlerini mümkün olduğunca korur. Çalışmalarda daha çok diploid hücreler kullanılır. Diploid hücreler, insan hücrelerinin normal kromozom sayısına (46) sahip olan hücrelerdir. Bu hücreler, genetik olarak daha stabildir ve araştırma için daha uygun kabul edilir. Eksplantın doku veya organdan alınıp ilk ekiminin yapıldığı kültüre primer kültür denir. Primer kültürde, hücreler doğal ortamlarından koparıldıkları için strese girerler ve bu

durum hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını etkileyebilir. Primer kültürde oluşan yeni hücrelerin bir başka besiyerine ekimiyle oluşan kültüre ise pasaj veya subkültür denir. Pasajlama işlemi, hücrelerin sayısını artırmak ve araştırma için daha fazla hücre elde etmek için kullanılır. Sürekli hücre kültürleri; anormal, transforme olmuş ve ölümsüz hücrelerdir (Alberts & et al, 2004).

Hücre Kültürü için Doku Kaynakları:

Hücre kültürü çalışmaları için çeşitli doku kaynakları kullanılabilir. Günümüzde en yaygın kullanılanlardan bazıları şunlardır:

- Amniyotik Hücreler
- Epitel ve Fibroblast Hücreler
- Kemik İliği Hücreleri
- Periferik Kan Hücreleri
- Tümör Hücreleri (Uçar & Ovalı, 2003).

Hücre kültürleri kaynaklarına ve büyüme biçimlerine göre sınıflandırılabilir.

Kaynaklarına Göre Kültürler

Çok çeşitli kaynaklardan ve dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç bölümde incelenir.

- 1) Primer (birincil) hücre kültürleri
- 2) Sekonder veya diploid hücre kültürleri
- 3) Sürekli hücre kültürleri veya hücre soyları (cell line)

Primer (Birincil) Hücre Kùltürleri

Dokulardan tripsin gibi enzimler ile ayrıştırılarak elde edilen hücrelerin in vitro üretilmeleri ile elde edilen kùltürlere primer kùltür denir. Bu kùltürler, orijinal dokudan izole edildikleri için in vivo genotipik ve fenotipik özelliklerini büyük ölçüde korurlar. Primer kùltürler, in vitro koşullarda sınırlı sayıda pasajlanabilir. Birkaç pasajdan sonra, üreme yeteneklerini kaybederler ve bu durum araştırma sonuçlarını etkileyebilir. Örneğin: İnsan embriyonu böbreği (HEK), insan amniyonu (HAM), Rhesus maymunböbreği (RhMK), yeşil maymun böbreği (GMK), tavşan böbreği (RK) (Bilgiç & Çiçek, 2006).

Hücre kùltürü çalışmaları, deneylerin doğru zamanda planlanması ve hücrelerin korunması ile başarıya ulaşabilir. Hücreler, logaritmik büyüme fazında deneylere alınmalı ve ilerideki çalışmalar için bazı hücreler dondurularak saklanmalıdır. Dondurma işlemi sırasında uygun yöntem, hız ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir (Adıgüzel & ark, 2008).

Primer hücre kùltürleri, küçük doku parçalarının flasklara ekilmesiyle eksplant kùltürler halinde ya da enzim uygulanmasıyla hücre süspansiyonu olarak yapılabilir (Arat, Çetinkaya & Taş, 2006).

Primer kùltürler kontaminasyon riski bulunan kùltürlerdir. Manipölasyonlarda sterilitateye özen gösterilmelidir. Kullanılan bütün malzemeler otoklavlanmalıdır. Tüm işlemler laminar kabin içerisinde yapılmalıdır (Arat, Çetinkaya & Taş, 2006).

Primer hücre kùltürünün uygulanması aşağıda verilmiştir.

Primer mezanşimal (kıkırdak, fibroblast) hücre kültürü:

Dokuların Alınması:

- **Kulak temizliği:** Dokular alınmadan önce kulak, %70 alkol ile iyice temizlenmelidir.
- **Doku alma:** Alkol ile iyice temizlenmiş kulak pensi ile doku alınmalıdır.
- **Sterilite:** Dokuların alınması sırasında steriliteye özen gösterilmelidir.

Dokuların Saklanması:

- **Taşıma:** Hayvandan alınan dokular, + 4 derecede %5 antibiyotik içeren PBS solüsyonunda muhafaza edilir.
- **Muhafaza süresi:** Bu şekilde muhafaza edilen doku örnekleri 3-4 gün canlılığını muhafaza edebilir.

Dokuların Laboratuvara Ulaşması:

- **Antibiyotikli PBS:** Laboratuvara ulaşan doku örnekleri, laminar kabin içinde %5 antibiyotikli PBS'den %2 antibiyotikli PBS içerisine aktarılırlar. Bu işlem, dokuların kontaminasyona karşı korunmasını sağlar.

Dokuların Temizlenmesi:

- **Kılların temizlenmesi:** Kulak doku parçalarının üzerindeki kıllı deri bisturi ucu yardımı ile dikkatlice temizlenir.

- **Kıkırdak ve bağ dokusu ayırma:** Temizlenen doku parçalarından kıkırdak ve bağ dokusu, steril bir petriye aktarılır.
- **Kuruma önleme:** Dokuların kurumaması için üzerine az miktarda PBS damlatılır.

Dokuların Parçalanması:

- **Steril aletler:** Steril bistüri ve pensler ile dokular iğne başı kadar küçük parçalara ayrılır. Bu işlem için keskin ve steril aletler kullanılmalıdır.
- **Dikkatli çalışma:** Dokulara zarar vermemek için dikkatli ve özenli bir şekilde çalışılmalıdır.

Dokuların Kültür Petrisine Aktarımları:

- **Petri seçim:** Dokular, 35 mm'lik hücre kültür petrilere aktarılır. Bu petriler, hücrelerin büyümesi için uygun bir ortam sağlar.

Yapışma için bekleme: Dokuların kültür petrisine tutunması için 2-3 dakika kadar beklenir. Bu süre zarfında petriler sabit tutulmalıdır. Hücre kültürü besiyeri petrinin kenarından yavaş bir şekilde dokuların üzerine aktarılır.

Ekim yapılan kültür petrileri inkübatöre yavaşca kaldırılır.

Petriler her gün kontrol edilir. Besiyerinin rengi sarıya dönmüşse, bulanıklaşmışsa veya bir tortu oluşmuşsa kültür kontamine. Eğer petrilerde kontaminasyon varsa, kontamine petri % 70 alkolle kaplanır ve tıbbi atığa atılır.

Ekimi takiben 7 gün boyunca petriler yerlerinden oynatılmadan kültüre edilir. 7. günde petriler invert mikroskop

altında incelenir, üreyen petrilere tespit edilir. İlk olarak primer kültür petrililerinin besiyeri 7. günde değiştirilir ve 2 gün ara ile tekrarlanır. Hücrelerin petriyi kaplamasının ardından; doku parçaları pastör pipeti ile toplanır ve petrilere tripsin uygulanır ve hücreler pasajlanır. Eğer hücreler hemen kullanılmayacaksa dondurma işlemi gerçekleştirilir (Arat, Çetinkaya & Taş, 2006).

2.1.2 Sekonder Hücre Kültürleri

Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilen ve en fazla 50 kez pasajları yapılabilen kültürler denir.

Örneğin: WI-38, MRC-5 vb (Bilgiç & Çiçek, 2006).

2.1.3. Sürekli Hücre Kültürleri

Sürekli hücre hatları, teorik olarak sonsuz pasaj yapılabilir hücre kültürleridir. Bu hücreler genellikle habis tümörlerden elde edilir ve laboratuvar ortamında uzun süre yaşayabilir ve çoğalabilirler (Bilgiç & Çiçek, 2006).

Sürekli hücre hatlarının bazı özellikleri şunlardır:

Teorik olarak sonsuz pasaj yapılabilirler. Sürekli hücre hatları, Hayflick sınırı gibi kromozomal sınırlamalara tabi değildir ve belirli bir sayıda bölündükten sonra ölmezler. Bu nedenle, laboratuvar ortamında uzun süre korunabilir ve çalışmalarda kullanılabilirler.

Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar. Sürekli hücre hatları, orijinal tümör hücrelerinden farklı olarak bazı kromozomal değişikliklere ve gen ekspresyonu değişikliklerine uğrayabilirler. Bu değişiklikler, hücrelerin büyüme hızı, morfolojisi ve fonksiyonları üzerinde önemli etkiler yaratabilir.

Kromozom sayıları sabit değildir. Sürekli hücre hatları, genellikle kromozom sayılarında farklılıklar gösterir. Bu durum, hücre popülasyonunun heterojen olmasına ve farklı hücre alt popülasyonlarının oluşmasına neden olabilir.

Sürekli hücre hatlarının bazı kullanım alanları:

Virüs ve bakteri gibi patojenlerin çalışılması

Yeni ilaçların geliştirilmesi

Toksisite testleri

Gen terapisi çalışmaları

Kanser biyolojisi araştırmaları

Farklı hücre türleri arasından, tıbbi açıdan en umut verici olanlar insan embriyonik kök hücreleri gibi görünmektedir. Bu hücreler, erken embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilir ve iki olağanüstü özelliğe sahiptir:

- **Sınırsız çoğalma yeteneği:** İnsan embriyonik kök hücreleri, uygun koşullar sağlandığında sonsuz sayıda bölünebilir ve çoğalabilir. Bu durum, bu hücrelerin büyük miktarlarda üretilmesine ve farklı araştırmalarda kullanılmasına olanak tanır.
- **Herhangi bir hücreye dönüşme yeteneği:** İnsan embriyonik kök hücreleri, pluripotent hücreler olarak da bilinir ve embriyonik gelişimin tüm aşamalarında yer alan hücrelere dönüşme yeteneğine sahiptir. Bu yetenek sayesinde, bu hücreler hasar görmüş veya işlevini yitirmiş dokuları onarmak için kullanılabilir.

Büyüme Biçimlerine Göre Kùltürler

Süspansiyon Kùltürler

Süspansiyon kùltürleri, **bir zemine tutunma gereksinimi duymadan** gaz alışverişinin ve besin transferinin yeterince sağlanabildiği bir ortamda üreyebilen hücre kùltürleridir. Bu kùltürlerde hücreler, sıvı besi ortamında serbestçe yüzerler.

Süspansiyon kùltürlerinin özellikleri:

- **Kolay üretim:** Süspansiyon kùltürleri, yapışkan hücre kùltürlerine kıyasla daha kolay üretilir ve yönetilir.
- **Hızlı büyüme:** Süspansiyon kùltürleri, yapışkan hücre kùltürlerine kıyasla daha hızlı büyür ve çoğalır.
- **Büyük miktarda üretim:** Süspansiyon kùltürleri, hücrelerin bir defada ve büyük miktarlarda üretilmesine imkân tanır.

Süspansiyon kùltürlerinin kullanımı:

- **Kan hücreleri:** Kan hücreleri (kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri, trombositler) süspansiyon kùltürlerinde sıklıkla kullanılır.
- **Dalak hücreleri:** Dalak hücreleri, bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir ve süspansiyon kùltürlerinde incelenebilir.
- **Kemik iliği hücreleri:** Kemik iliği hücreleri, kan hücrelerinin üretiminden sorumludur ve süspansiyon kùltürlerinde araştırılabilir.

- **Olgunlaşmamış hücreler:** Olgunlaşmamış hücreler, süspansiyon kültürlerinde farklılaşma ve gelişme potansiyeli açısından değerlendirilebilir (Adıgüzel & ark, 2008, Aydınтуğ & Mutlu, 2003).

Tutunarak Büyüyen (Monolayer) Hücreler

Canlı organizmalar, hücrelerin karmaşık bir şekilde organize olmasıyla oluşur. Bu hücreler, sadece birbirleriyle değil, aynı zamanda çevreleriyle de sürekli iletişim halindedir. Bu iletişim, hücrelerin büyümesini, bölünmesini, göç etmesini ve işlevlerini yerine getirmesini sağlar. Ekstrasellüler matris (EKM) ve integrinler, bu iletişimde kritik rol oynayan iki önemli bileşendir. EKM, hücrelerin etrafını saran ve onları destekleyen karmaşık bir protein ve şeker molekülü ağıdır. Kollajen, fibronektin, laminin ve proteoglikanlar gibi çeşitli makromoleküllerden oluşur. EKM, hücrelere mekanik destek sağlar, hücre göçü için yollar oluşturur ve hücreler arasındaki sinyalleri iletir. Bu sayede EKM, hücrelerin yaşaması ve işlev görmesi için gerekli olan bir platform görevi görür. Integrinler, hücre zarında bulunan ve EKM'deki proteinlere bağlanan transmembran proteinlerdir. Heterodimerik proteinlerdir, yani iki farklı protein alt biriminden oluşurlar. Integrinler, hücrelerin EKM ile bağlanmasını ve bu bağlanmanın hücre sinyallerine dönüştürülmesini sağlar. Bu sayede integrinler, hücrelerin EKM ile iletişim kurmasına ve çevrelerindeki değişikliklere uyum sağlamasına olanak tanır. (Ör: İntegrin $\alpha1\beta3$, $\alpha2\beta3$ vs.).

Polistiren Kültür Kapları:

Hücrelerin kültürde büyütülmeleri en çok **polistiren** tek kullanımlık plastik malzemeler kullanılır. Polistiren yüzeyler hidrofobiktir bu nedenle hücrelerin tutunmasına uygun değildir.

Hücre kültür kapları özel yöntemler ile aktive edilir ve yüzeylerine yüklü moleküllerin yerleşmesi sağlanır. Bu sayede hidrofilitik hale getirilirler.

Cam Kültür Kaplarının Dezavantajları:

Cam, hücre kültürü çalışmaları için uzun yıllardır kullanılan bir malzemedir. Ancak cam kültür kaplarının bazı dezavantajları da vardır:

- **Yıkanma ve sterilizasyon zorluğu:** Cam kültür kaplarının yıkanması ve sterilize edilmesi zordur ve zaman alıcıdır.
- **Kontaminasyon riski:** Cam kültür kapları, plastik kültür kaplarına kıyasla daha yüksek kontaminasyon riskine sahiptir. (Adıgüzel & ark, 2008).
- Çoğu hücre türü, doğal ortamında ekstrasellüler matris (EKM) adı verilen karmaşık bir protein ve şeker molekülü ağı ile çevrilidir. EKM, hücrelere mekanik destek sağlar, hücre göçü için yollar oluşturur ve hücreler arasındaki sinyalleri iletir. Hücre kültürü ortamında EKM'nin bulunmaması, hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını ve işlevlerini olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, hücre kültür malzemesinin yüzeyi, EKM'ye benzer bir etki yaratmak için çeşitli makromoleküllerle kaplanabilir.

Farklı Matriks Malzemeleri ve Etkileri:

- **Kollajen:** Kollajen, EKM'nin en bol bulunan bileşenidir. Epitelyum hücreleri, kas hücreleri ve hepatositlerin (karaciğer hücreleri) tutunması ve

çoğalması için önemlidir. Kollajen jel tabakası, bu hücrelerin doğal ortamına benzer bir ortam sağlayarak diferansiyasyonlarının (uzmanlaşmalarının) korunmasına yardımcı olur.

- **Fibronektin:** Fibronektin, EKM'de bulunan bir başka önemli proteindir. Endotel hücrelerinin (kan damarlarının içini kaplayan hücreler) tutunması ve çoğalması için gereklidir. Fibronektin ayrıca hücrelerin göç etmesini ve yeni dokular oluşturmasını da teşvik edebilir.
- **Jelatin:** Jelatin, kollajenden türetilen bir proteindir. Endotel hücreleri ve bazı fibroblastlar (bağ dokusu hücreleri) için bir substrat olarak kullanılabilir. Jelatin, hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını destekler ve ayrıca hücrelerin göç etmesini de teşvik edebilir (Adıgüzel & ark, 2008).

Hücre Kültür Yöntemleri

Standart Tüp Kültürü

Genel olarak virüsleri üretmek için kullanılan altın standart bir yöntemdir. Bu yöntemde, standart laboratuvar tüpleri içine pasajlanan hücre dizileri belli aralıklarla döndürülür (genellikle, 10-15 devir/dakika). Bu döndürme işlemi, tüp yüzeyinin tek tabaka hücre dizisi ile kaplanmasını sağlar. Daha sonra, virüs içeren örnek tüplere eklenir ve her virüsün sitopatik etki oluşturma süresi gözlemlenir. Sitopatik etki, virüsün hücreleri tahrip ederek ölüme yol açmasıdır. Bu inkübasyon süresi virüse göre değişebilir, ancak genellikle 14 gün kadardır (Bilgiç & Çiçek, 2006). Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1: Rollerdrum sistem

3.2 “Shell Vial” Hücre Kültürü Yöntemi

Viroloji ve mikrobiyolojide yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, virüsler, bakteriler ve parazitler gibi mikroorganizmaların hücre kültürü üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılır (Bilgiç & Çiçek, 2006). Yöntem, standart tüp hücre kültürü yöntemine göre bazı önemli avantajlar sunar:

- **Daha az yer ve malzeme kullanımı:** Standart kültür tüplerine kıyasla daha az yer kaplar ve daha az malzeme gerektirir. Bu durum, araştırma maliyetlerini ve atık miktarını azaltır.
- **Yüksek verim:** Çok sayıda numunenin aynı anda analiz edilmesine olanak tanır. Bu durum, verimliliği artırır ve araştırma süresini kısaltır.
- **Daha iyi duyarlılık:** Daha küçük hacimlerde hücre kültürü kullanılmasını sağlar. Bu durum, virüsler gibi düşük konsantrasyonlarda bulunan mikroorganizmaların tespitinde duyarlılığı artırır.

Yöntem:

- 1) **Lamellerin Hazırlanması:** 16-18 mm çapında, 4-5 cm boyutunda tüpler içine 12-15 mm'lik yuvarlak lameller yerleştirilerek uygulanır. Hücre dizileri bu lameller üzerine pasaj geçilir. Yuvarlak lameller 96'lık U tabanlı serolojik plaklara da yerleştirilerek aynı yöntem olarak kullanılabilir.
- 2) **Hücre Kültürü:** Hücreler, lameller üzerine ekilir ve uygun koşullarda (sıcaklık, CO₂ konsantrasyonu, nem) inkübe edilir. Tek tabaka hücre dizisi oluşumuna kadar hücreler büyütülür.
- 3) **Örnek Ekimi:** Tek tabaka hücre dizisi oluştuktan sonra örnekler ekilir. Örneklerin ekimi, santrifüjleme ile hücreler üzerine taşınmasını sağlayacak şekilde yapılır. Santrifüjleme süresi ve hızı, izole edilecek örneğe göre değişir.
- 4) **İnkübasyon:** Örneklerin ekilmesi ardından lameller tekrar inkübe edilir. Bu süreçte, örnekte bulunan mikroorganizmaların hücre kültürü ile etkileşime girmesi ve hücrelerde sitopatik etkiler (hücre ölümüne neden olan değişiklikler) yaratması beklenir. Mikroplak hücre kültürü yönteminde, standart tüp kültüründe olduğu gibi sitopatik etki görülmeyebilir.
- 5) **Boyama:** Yaklaşık 24-48 saat sonra lameller, etkene özgül FITC (fluorescein isothiocyanate) ile işaretlenmiş monoklonal antikör ile boyanır. FITC, antikörün bağlandığı hücreleri floresan hale getirir.

Bu sayede floresan mikroskobu kullanılarak virüsler, bakteriler veya parazitler gibi mikroorganizmaların varlığı ve yeri belirlenebilir (Bilgiç & Çiçek, 2006). Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2: Shell vial yöntemi ve tüpleri

Kokültivasyon Yöntemi

Teşhis için incelenen doku numunesi, daha önceden üretilerek elde edilen hücreler ile kültürünün yapılma işlemidir. Önceden üretilmiş hücre kültürü, incelenen numunedeki hücrelerin canlılık ve sürekliliğini sağlamayı amaçlamaktadır. Bu metot HIV tanısında kullanılır.

Hücre Kültürü Laboratuvarları ve Temel Cihazları

Viroloji ve hücre kültürü laboratuvarları, hava akımına sahip kabinlerin olduğu (Class 2 kabin-pozitif basınçlı HEPA filtreli) ayrı odalardan oluşmalıdır. Bu kabinler, çalışılan materyallerden çıkan aerosoller ve diğer kontaminantları izole ederek laboratuvar ortamının ve çalışanların korunmasını sağlar.

Kontaminasyon Kontrolü:

- Bakteri ve mantar kontaminasyonunu engellemek için çalışma alanı, çalışmadan önce ve sonra dezenfektan ile temizlenip UV ile açılmalı, diğer durumlarda temiz ve tozsuz tutulmalıdır. Düzenli temizlik ve dezenfeksiyon, laboratuvar ortamında kontaminasyon riskini en aza indirmeye yardımcı olur.
- Farklı hücre dizileri aynı anda işlenmemelidir. Bu işlem, çapraz kontaminasyon riskini artırır.
- Hiçbir sıvı ağız ile pipetlenmemelidir. Pipetler veya otomatik pipetleme sistemleri kullanılmalıdır.
- Flasklar kullanımdan önce %70 'lik alkol ile silinmelidir. Bu işlem, flaskların yüzeyindeki kontaminantları öldürmeye yardımcı olur.
- Kontaminasyonu belirlemek için durumunda hücre üretme besiyerleri hücre ekilmediği sürece antibiyotiksiz kullanılmalıdır. Antibiyotikler, bakteri kontaminasyonunu maskeleyebilir ve kontaminasyonun tespitini zorlaştırabilir (Aydıntuğ & Mutlu,2003, (Bilgiç & Çiçek, 2006).

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli donanımdaki araç-gereçler aşağıda detaylı şekilde anlatılmıştır.

Laminar akımlı kabin (laminar flow hood):

Laminar akım kabinlerinde iki ana hava akışı tipi bulunur:

- **Horizontal (Yatay) Akış Kabinleri:** Bu kabinlerde, filtrelenmiş hava çalışma alanının arkasından ön

tarafa doğru paralel bir şekilde akar. Bu sayede çalışma alanı boyunca eşit ve sabit bir hava akışı sağlanır. Horizontal kabinler, doku kültürü ve mikrobiyoloji gibi çalışmalarda yaygın olarak kullanılır.

- **Vertikal Akış Kabinleri:** Bu kabinlerde, filtrelenmiş hava tavandan aşağıya doğru bir şelale gibi akar ve çalışma alanını kaplar. Bu sayede çalışma alanındaki tüm partiküller ve mikroorganizmalar aşağı doğru itilir ve kabinin ön kısmından dışarı atılır. Vertikal kabinler, toz ve aerosollerin yoğun olduğu çalışmalarda, örneğin virüs çalışmaları ve ilaç hazırlamada kullanılır (Aydınтуğ & Mutlu,2003).

Laminar Akım Kabinlerinin Avantajları:

- Steril bir çalışma ortamı sağlar.
- Hava kirliliğinden kaynaklanan kontaminasyonu önler.
- Çalışanların ve çalışılan materyallerin korunmasına yardımcı olur.
- Daha hassas ve güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlar.

Laminar Akım Kabinlerinin Dezavantajları:

- Diğer laboratuvar ekipmanlarına kıyasla daha pahalı olabilir.
- Bakım ve temizliği daha özenli gerektirir.

- Hava akışı nedeniyle çalışma alanında hafif bir hava akımı hissedilebilir (Aydıntuğ & Mutlu,2003).

Çalışmadan önce ve sonra UV ışığı 30 dakika açık bırakılır. UV ışığı, mikroorganizmaların DNA'sını hasarlayarak onları öldürür. Her kullanımdan sonra ortam %70'lik etanol ile temizlenir. Etanol, mikroorganizmaların hücre zarlarını parçalayarak onları öldürür. Horizontal kabinler, ameliyathanegibi ortamların havasını steril etmek için kullanılırlar ve Class C olarak da bilinen bu kabinler doku kültürü laboratuvarlarında daha çok ürün korumaya yönelik olarak kullanılan, kullanıcıyı korumayan kabinlerdir.

Biyolojik güvenlik kabini olarak bilinen vertikal laminar akım kabinleri ise; zararlı organizmalarla çalışırken ve hücre kültürü yaparken steril bir ortam sağlarlar. Class B vertikal laminar akım kabinleri hem ürünü hem de kullanıcıyı koruyan kabinlerdir. Bu kabinler, hava akışını hem çalışma alanının üzerinden hem de önünden aşağıya doğru yönlendirerek çalışılan materyalleri ve kullanıcıyı mikroorganizmalardan korur. Class B kabinler, hücre kültürü laboratuvarlarında en çok kullanılan kabinlerdir. Şekil 3'te verilmiştir.

Class A olarak bilinen özel odalarda yer alan diğer tip kabinler, yüksek biyolojik kontaminasyon riski bulunan ürünler için olup, Class B kabinlerinin özelliklerinin yanı sıra tamamen kapalı ve uzaktan kumanda ile işlemlerin yapıldığı kabinlerdir (Oktar, 2009). Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3: Biyogüvenlik Kabini

CO2 inkübatörü:

Hücreler, çoğalmak ve hayatta kalmak için oksijene ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte, hücreler aynı zamanda metabolizmaları sonucunda karbondioksit (CO₂) üretirler. Yeterli CO₂ eliminasyonu, hücre kültürünün pH dengesini korumak ve asidik atık ürünlerinin birikmesini önlemek için önemlidir. Bu nedenle çoğu hücre kültürü %5-10 CO₂ içeren bir ortamda gerçekleştirilir.

Kültür Flasklarının Kapakları:

Kültür flasklarının kapakları, gaz giriş çıkışına izin verecek şekilde tasarlanmalıdır. Bu, hücrelerin oksijene erişmesini ve CO₂'yi dışarı atmasını sağlar. Bazı kültür flasklarının kapaklarında havalandırma delikleri bulunurken, bazılarında gaz geçirgen bir membran bulunur.

İnkübatör Koşulları:

Hücre kültürleri, sabit bir sıcaklık ve nemde tutulan bir inkübatörde tutulmalıdır. İnkübatörün kapağı uzun süre açık bırakılmamalıdır, aksi takdirde ısı kaybı ve kontaminasyon riski artacaktır.

İnkübatör Nem Kontrolü:

Kültür ortamının nemi, inkübatördeki su kabının daima temiz ve dolu olmasıyla olur. Su kabı, inkübatör tabanına yerleştirilir ve su seviyesi düzenli olarak kontrol edilir.

Kültür Ortamı Sıcaklığı:

Kültür ortamının optimal sıcaklığı kullanılan hücre tipine göre ayarlanmalıdır. Genellikle 37°C hücre kültürleri için uygundur. Bazı hücre tipleri daha yüksek veya daha düşük sıcaklıklarda daha iyi büyür. Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4: CO2 Etiv

Mikroskoplar:

- **Ters Mikroskop (Inverted Microscope):** Bu mikroskop tipi, hücreleri kültür kabının altından yukarı doğru aydınlatarak gözlemler. Bu sayede hücreler, kültür kabının dibinde yapışmış olsalar bile net bir şekilde görülebilir. Ters mikroskoplar, hücrelerin tek tabaka halinde olup olmadığını, shell-vial yüzeyinde yeterli hücre olup olmadığını ve ekimlerden sonra sitopatik etkinin izlenmesini sağlar. Ayrıca, hücrelerin büyümesini, morfolojik

özelliklerini ve kontaminasyon olup olmadığını takip etmek için de kullanılır.

- **Floresan Mikroskop:** Bu mikroskop tipi, özel olarak etiketlenmiş molekülleri floresan ışık kullanarak görselleştirir. Floresan antikolar, hücrelerin belirli proteinlerini veya organellerini hedef almak için kullanılabilir. Floresan mikroskoplar, hücrelerin protein ekspresyonunu, hücre-hücre etkileşimlerini ve hücre döngüsünü incelemek için kullanılır. Şekil 6'da gösterilmiştir.
- **Faz Kontrast Mikroskop:** Bu mikroskop tipi, ışık dalgalarının faz farkını kullanarak hücrelerin şeffaf kısımlarını görünür hale getirir. Faz kontrast mikroskoplar, canlı hücreleri gözlemlemek ve hücre sayımı yapmak için kullanılır (13). Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: Faz Kontrast Mikroskop



Şekil 6: Floresan Mikroskop

Su banyosu:

Düzenli olarak temizlenmelidir. Azot tankından çıkarılan hücre stoklarının hızlı eritilmesinde ve FCS (Fetal Calf Serum)'nin inaktive edilmesinde kullanılır. Şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7: Su Banyosu

Santrifüj cihazı:

Santrifüjler, hücre kültürü işlemlerinde kritik öneme sahip araçlardır. Farklı yoğunluklara sahip maddelerin birbirinden ayrılması veya saflaştırılması için kullanılırlar. Santrifüjlerin doğru

seçimi ve kullanımı, hücre kültürü işlemlerinin başarısı için önemlidir. Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8: Santrifüj

Buzdolabı ve dondurucular:

Hücre üretme sıvıları 2-8°C’ lik soğutucularda, glutamin, tripsin gibi enzimler, antibiyotik solüsyonları, FCS vb. -20°C’ de, hasta örnekleri, sulandırılmış monoklonal antikolar, hemen kullanılacak hücre stokları vb. -80°C’ de, hücre ve virüs stoklar ise -196°C’ de (azot tankı) saklanır.

Hücre saklama kapları:

Hücre saklama kapları, sıvı nitrojen içerisinde saklanan plastik ya da metal alaşımlı kaplardır. Sıvı nitrojen, çok düşük sıcaklıklarda (-196°C sıvı fazında, -156°C gaz fazında) hücreleri dondurarak uzun süreli saklanmalarını sağlar. Bu kaplar, doku kültürü hücrelerinin korunmasında yaygın olarak kullanılır.

Hücre Kültürü Laboratuvarında Gerekli Ekipmanlar:

Hücre saklama kaplarının yanı sıra, hücre kültürü laboratuvarlarında aşağıdaki ekipmanlar da bulunur:

- **Vakum Hattı veya Pompası:** Vakum hattı veya pompası, hücre kültür kabı ve diğer laboratuvar ekipmanlarından havayı ve gazları çıkarmak için kullanılır. Bu sayede hücrelerin kontaminasyondan korunması ve kültür ortamının steril kalması sağlanır.
- **Otoklav:** Otoklav, yüksek basınç ve buhar kullanarak bakteri, virüs ve diğer mikroorganizmaları öldüren bir sterilizasyon cihazıdır. Hücre kültür kabı, kültür ortamı ve diğer laboratuvar malzemeleri otoklavda sterilize edilir.
- **Sıvı Azot Tankı:** Sıvı azot tankı, hücre saklama kaplarının ve diğer dondurulmuş malzemelerin saklanması için kullanılır. Sıvı azot, -196°C 'lik çok düşük bir sıcaklık sağlayarak hücrelerin uzun süreli saklanması sağlar. Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9: Sıvı Azot Tankı

Hücre Kültüründe Kullanılan Temel Besiyeri ve Solüsyonlar

Hücre kültürü besiyerleri, hücrelerin ihtiyaç duyduğu tüm besinleri ve büyüme faktörlerini içeren karmaşık bir bileşime sahiptir. Bu bileşenler başlıca şunlardır:

Amino Asitler: Proteinlerin yapı taşları olan amino asitler, hücrelerin protein sentezi için gereklidir.

Karbonhidratlar: Hücrelerin enerji kaynağı olan karbonhidratlar, glikoz ve fruktoz gibi basit şekerler şeklinde bulunur.

Vitaminler: Hücre metabolizmasında önemli rol oynayan vitaminler, yağda ve suda çözünen vitaminler olmak üzere ikiye ayrılır.

İyonlar: Hücre içi ve hücre dışı ortamlar arasındaki ozmotik dengeyi sağlayan iyonlar, sodyum, potasyum, klorür ve kalsiyum gibi mineralleri içerir.

Hücre kültürü besiyeri, hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması için gerekli olan besinleri ve büyüme faktörlerini sağlar. Besiyerinin pH'ı, sıcaklığı ve ozmolaritesi de hücrelerin sağlıklı bir şekilde gelişmesi için kritik önem taşır. Doğru besiyeri seçimi ve kullanımı, hücre kültürü çalışmalarının başarısı için temel bir faktördür. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir (Adıgüzel & ark, 2008, Aydınтуğ & Mutlu, 2003, Arat, Çetinkaya & Taş, 2008).

Hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyümesi ve işlev görmesi için kültür ortamının belirli kimyasal ve fiziksel gereksinimleri karşılaması gerekir. Bu gereksinimlerden biri de **iyon bileşimi** ve **pH** dır.

İyon Bileşimi:

Hücrelerin canlılıklarının sürdürülebilmesi ve üremeye devam edebilmeleri için karbonhidratlar, aminoasitler, vitaminler, lipidler, proteinler ve iyonların ortamda bulunması gereklidir. Hücre kültüründe iyon bileşimi bakımından ekstrasellüler ortama en yakın olan, bunun yanı sıra hücre çoğalması için serum içeren çözeltiler kullanılır. Bu çözeltilerde bulunan önemli iyonlar şunlardır:

- **Sodyum (Na⁺) ve Klorür (Cl⁻):** Hücre membranı potansiyelinin korunması ve hücre içi-dışı sıvı dengesinin sağlanması için gereklidir.
- **Kalsiyum (Ca²⁺)**
- **Magnezyum (Mg²⁺)**
- **Potasyum (K⁺)**

- **Fosfat (PO_4^{3-})**

pH:

Çözeltilerin pH'sı, hidrojen iyonlarının (H^+) konsantrasyonunu ölçen bir skaladır. Hücre kültüründe çözeltilerin pH'sı **7,4 civarında olmalıdır**. Bu pH değeri, hücrelerin enzimlerinin en aktif olduğu ve hücre metabolizmasının en iyi şekilde gerçekleştiği pH değeridir. Çoğu hücre kültürü ortamında **pH indikatörü olarak fenol kırmızısı** bulunur. Fenol kırmızısı, pH 7,4'te kırmızı, 7'de turuncu, 6,5'te sarı, 7,6'da koyu pembe ve 7,8'de mor renk vermektedir. Bu sayede, çözeltilerin pH'sının gözle kontrol edilmesi ve gerekirse ayarlanması mümkündür (Adıgüzel & ark, 2008).

Hücre kültürü ortamında bikarbonat ve CO_2 kontrolü, hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve işlevlerini yerine getirmesi için gereklidir. CO_2 kontrolü için özel olarak tasarlanmış inkübatörlerin kullanımı, hücre kültürü çalışmalarının başarısı için kritik önem taşır.

Hücre kültürü besiyerlerinde kullanılan temel çözeltiler, dengeli tuz çözeltileridir. Bu çözeltiler, hücrelerin hayatta kalması ve işlevlerini yerine getirmesi için gerekli olan inorganik iyonları içerir. En sık kullanılan temel çözeltiler şunlardır:

- **Earle's Balanced Salt Solution (EBSS):** 1950'li yıllarda yayınlanan bu çözelti, hücrelerin temel inorganik iyon ihtiyacını karşılar.
- **Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM):** EBSS'ye amino asitler ve vitaminler eklenerek

oluşturulan bu çözelti, hücrelerin daha fazla besin ihtiyacını karşılar.

- **Hank's Balanced Salt Solution (HBSS):** Hücrelerden iyon taşınmasını incelemek için kullanılan bu çözelti, kalsiyum ve magnezyum iyonları bakımından düşük konsantrasyona sahiptir.

Besiyerinde Kullanılan Diğer Moleküller:

Temel çözeltilere ek olarak, hücre kültürü besiyerlerinde aşağıdaki moleküller de bulunur:

- **Esansiyel Amino Asitler:** Hücrelerin protein sentezi için gerekli olan amino asitler, besiyerine eklenir.
- **Vitaminler:** Özellikle B vitaminleri, hücre metabolizması için gereklidir ve besiyerine eklenir.
- **Hormonlar:** İnsülin ve hidrokortizon gibi hormonlar, hücre büyümesi ve işlevleri üzerinde önemli etkilere sahiptir ve besiyerine eklenebilir.
- **Glikoz:** Hücrelerin enerji kaynağı olan glikoz, besiyerine eklenir.

Farklı Hücre Türleri için Farklı Besiyerleri:

Farklı hücre türleri farklı besin ihtiyaçlarına sahiptir. Bu nedenle, her hücre türü için özel olarak tasarlanmış farklı besiyerleri kullanılır. En yaygın kullanılan besiyerlerinden bazıları şunlardır:

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium):** Farklı hücre tipleri için yaygın olarak kullanılan bir besiyeridir.

- **RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium):** Lösemi ve lenfoma hücreleri gibi kan hücreleri için kullanılır.
- **Ham's F-12:** Böbrek ve fibroblastik hücreler gibi bazı özel hücre tipleri için kullanılır (Adıgüzel & ark, 2008). Ortama % 5-20 civarında eklenecek serum, hücrelerin çoğalmasını sağlar.

Hücre kültüründe kullanılan temel besiyeri ve solüsyonlar şunlardır:

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM):

Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa 1955 yılında **Stanley S. Eagle** tarafından tanımlanmıştır. **Minimum Eagle's Medium (MEM)** isimli besiyeri, Eagle tarafından geliştirilmiş ve bazı modifikasyonlarla günümüze kadar gelmiştir. MEM solüsyonu, **Salvador Luria** ve **Renato Dulbecco** tarafından modifiye edilerek, **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)** isimli besiyeri oluşturulmuştur. DMEM, günümüzde somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besiyeri bileşenidir. DMEM, hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli **glikoz**, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun **ozmolarite ve pH**, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli **aminoasitler** ve **vitaminler** içerir (Arat, Çetinkaya & Taş, 2008, Başaran, 1994).

Fetal Bovine Serum (FBS):

Hücre kültürü ortamının temel bileşenlerinden biri olan serum, hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan besinleri ve büyüme faktörlerini içeren karmaşık bir bileşiktir.

Serumun Avantajları:

- **Zengin Besin Kaynağı:** Serum, hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan proteinler, amino asitler, vitaminler ve mineraller gibi birçok besin maddesi içerir.
- **Büyüme Faktörleri:** Serum, hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını teşvik eden büyüme faktörleri içerir.
- **Hücre Tutunması:** Serum, hücrelerin kültür kabına tutunmasını sağlayan hücrelerarası matriks proteinleri içerir.

Serumun Dezavantajları:

- Tanımlanmamış Bileşim
- Partiden Partiye Değişkenlik
- Kontaminasyon Riski
- Etik Kaygılar Serumsuz Besiyerleri:

Serumun dezavantajlarından dolayı bazı laboratuvarlar serumsuz besiyerlerini kullanmaktadırlar. Serum kullanılmayan bir besiyerinin, hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan besinler ve büyüme faktörleri ile takviye edilmesi gerekir. Bu da serumdan daha pahalı olabilir.

Serumsuz Besiyerlerinin Avantajları:

- Tanımlanmış Bileşim
- Partiden Partiye Tutarlılık
- Kontaminasyon Riski

- Etik Avantajlar (Arat, Çetinkaya & Taş, 2008, Oktar, 2009).

Phosphate Buffer Saline (PBS):

Hücre içindeki ve hücre dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan tuz ihtiva eden bir solüsyondur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler, pH'yı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar (Arat, Çetinkaya & Taş, 2008).

Tripsin:

Tripsin, pankreastan salgılanan bir serin proteaz enzimidir. Proteinleri parçalama özelliğine sahiptir. Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin kültür kabındaki yapışkan maddelerden ayrılması ve yeni bir kültüre aktarılması için kullanılır.

Tripsin Kullanımında Dikkat Edilmesi Gerekenler:

- 1) **Saklama Koşulları:** Tripsin, -20°C'de saklanmalıdır. Daha yüksek sıcaklıklarda bekleyen tripsinin aktivitesi düşer. Bu nedenle, tripsin tek kullanımlık alikotlar halinde saklanmalıdır.
- 2) **Serum İnhibitörleri:** Serum, tripsin inhibitörleri içerir. Bu inhibitörler, tripsinin proteinleri parçalama yeteneğini engeller. Hücrelere tripsin uygulanmadan önce, hücreler Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanmalı ve yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmalıdır.
- 3) **Uygulama Miktarı:** Tripsin, hücrelerin yüzeyini örtecek kadar uygulanmalıdır. Fazla tripsin kullanımı, hücrelere zarar verebilir.

- 4) **İnkübasyon Sıcaklığı:** Tripsin, sıcaklık arttıkça daha etkili çalışır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre konduklarında daha çabuk yüzeylerden ayrılırlar. Oda sıcaklığında daha yavaş yüzeyden ayrılırlar. Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi önemlidir. Tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar verir.
- 5) Hücrelerin yüzeylerden ayrılma hızı besiyerindeki serum oranı, hücre tipi, petrideki hücre yoğunluğu, tripsinin aktivitesi ve son pasaj üzerinden geçen zamana göre değişiklik gösterir.
- 6) Farklı şişelerdeki tripsinler birbirleriyle her zaman aynı etkiyi göstermeyebilir.
- 7) Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar %10 FBS'li besiyeri uygulanmalıdır. Daha sonra hücreler pipetlenerek birbirlerinden ayrılırlar (Adıgüzel & Baysal, 2008, Arat, Çetinkaya & Taş, 2008).

Hücre Kültürü Çalışmalarında Yapılan İşlemler

Hücrelerin Beslenmesi

Büyüme çözeltileri, hücre kültüründe kullanılan temel ortamlardan biridir ve hücrelerin hayatta kalması ve işlevlerini yerine getirmesi için gerekli besinleri ve diğer bileşenleri içerir.

Büyüme Çözeltilerinin Özellikleri:

Hücre Dışı Ortamla Izoosmotik: Büyüme çözeltileri, hücre dışı ortamla izoosmotik bir tuz karışımı içerir. Bu sayede, hücrelerin şekli ve hacmi korunur.

Tamponlama Sistemi: Büyüme çözeltileri, sodyum bikarbonat gibi tamponlar içerir. Bu tamponlar, hücrelerin sitoplazmik pH'sını 7.4 civarında sabit tutmaya yardımcı olur.

Besin Maddeleri: Büyüme çözeltileri, hücrelerin büyümesi ve işlevleri için gerekli olan çeşitli aminoasitler, vitaminler ve diğer besin maddelerini içerir.

pH Göstergesi: Büyüme çözeltileri, pH seviyesini gösteren bir renk göstergesi olan fenol kırmızısı içerir (Adıgüzel & Baysal, 2008).

Büyüme çözeltileri iki şekilde hazırlanabilir:

- **Hazır Çözeltiler:** Büyüme çözeltileri, önceden hazırlanmış ve sterilize edilmiş şekilde satın alınabilir. Bu yöntem, zaman tasarrufu ve kolaylık sağlar.
- **Toz Materyal:** Büyüme çözeltileri, toz materyal olarak da satın alınabilir. Bu durumda, toz materyal belirli bir hacimde su ile karıştırılarak çözelti haline getirilir.

Toz Materyalden Büyüme Çözeltisi Hazırlama:

- Toz materyal, belirli bir hacimde distile su ile karıştırılarak çözelti haline getirilir.
- Çözelti, bir manyetik karıştırıcı ile karıştırılır ve tamamen çözünene kadar beklenir.
- Çözelti, pH metre ile ölçülerek pH'sı 7.4 civarına ayarlanır.

- Ayarlanmış pH'a sahip çözelti, 0.22 µm filtreden süzülerek sterilize edilir.
- Sterilize edilmiş çözelti, ışık almayan ve serin bir ortamda saklanır (Aydıntuğ & Mutlu, 2003). Çoğu hücre, pH; 7.4 civarında büyüyüp çoğalmaktadır. Besiyerlerine % 5-20 oranında(v/v) serum eklenir. En sık kullanılan serum fetal buzağı serumudur. Bazı hücreler at serumuna hatta bazı primer hücreler elde edildikleri canlıların serumuna gereksinim duyarlar.

Antibiyotikler sıklıkla ortama eklenirler ancak 37°C'de stabiliteleri kısa süreli olduğundan kontaminasyona karşı koruyuculukları sınırlı olmaktadır. En sık kullanılan standart antibiyotikler:

-Gentamisin 5-10 mg/ml

-Penisilin 10,000 U/ml ve streptomisin 10 mg/ml

Besiyerleri +4°C'de saklanmalı, ancak hücrelere eklenmeden önce 37°C'lik su banyosunda ısıtılmalıdır.

Hücrelerin 2 günde bir besiyerleri değiştirilmelidir (Adıgüzel & Baysal, 2008).

Kültür ortamını dört faktör etkiler. Bunlar;

pH' ın düşmesi:

pH 7' den 6.5'e düşerse bir çok hücrenin büyümesi durur ve pH 6-6.5 arasında ölümler başlar. Ortamın pH' sı düştüğünde besiyerinin renginde önce turuncu renk görülür, bu renk sonrasında sarıya döner. Bu durumda besiyeri değiştirilmelidir.

Hücre konsantrasyonu:

Kültürde yüksek hücre konsantrasyonu varsa besiyeri daha çabuk tükenir.

Hücre türü:

Normal hücreler yüksek hücre yoğunluğuna ulaştıkları zaman bölünmeyi durdururlar. Gelişme fazında kalan hücreler uzun süre canlı kalabilirler. Sonsuz hücre kültürleri ve bazı embriyonik hücreler kültürde yüksek konsantrasyona ulaştıklarında, besiyeri değiştirilmeli veya pasaj işlemi yapılmalıdır.

Hücre morfolojisi:

Hücre kültürü çalışmaları her zaman sorunsuz ilerlemez. Bazen, morfolojik bozulmalar olarak adlandırılan istenmeyen değişiklikler hücrelerde gözlemlenebilir. Bu bozulmalar, kültürün başarısını etkileyebilir ve hatta hücrelerin ölümüne yol açabilir.

Morfolojik Bozulmaların Nedenleri:

- **Ortam Değişikliği:** Hücreler, belirli bir ortamda büyümeye ve gelişmeye adapte olurlar. Ortamda ani değişiklikler (örneğin pH, osmolarite, besin maddeleri), hücrelerde strese neden olarak morfolojik bozulmalara yol açabilir.
- **Yaşlanma:** Hücreler, kültürde uzun süre tutulduğunda yaşlanır ve işlevlerini kaybeder. Yaşlanan hücrelerde, çekirdek granülasyonu, sitoplazmik vakuolizasyon ve hücre membranında hasar gibi morfolojik bozulmalar görülebilir.
- **Mikrobiyolojik Kontaminasyon:** Bakteriler, mantarlar veya virüsler gibi mikroorganizmalar hücre

kültürüne bulaşabilir ve hücrelere zarar vererek morfolojik bozulmalara neden olabilir.

- **Toksik Maddeler:** Hücre kültürüne toksik maddeler (örneğin antibiyotikler, ağır metaller, metabolik atık ürünler) bulaşabilir ve hücrelere zarar vererek morfolojik bozulmalara neden olabilir.

Morfolojik Bozulmaların Belirtileri:

- Çekirdek çevresinde granüllerin belirmesi
- Hücrelerin yuvarlaklaşıp tabandan ayrılması
- Sitoplazmik vakuolizasyon
- Hücre membranında hasar
- Hücrelerin sayısında azalma

Kültürde daha ciddi sorunlarla karşılaşmamak için, kültür rutin olarak kontrol edilmelidir (Adıgüzel & Baysal, 2008).

Hücrelerin Pasajlanması

Hücre pasajlama işlemi; flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücre kültürlerinin yüzeyden ısı ve tripsin yardımıyla kaldırılıp sıvı içinde süspanse edilerek başka ortamlara aktarılmasıdır. Aktarılan ortam % 5 CO₂'li etüvde 37°C' de hücreler tam tabaka olana kadar inkübe edilir (Bilgiç & Çiçek, 2010).

Her hücre tipi, kendine özgü bir hızla bölünerek çoğalır. Genelde hücrelerin bölünme süresi 24 saat civarındadır. Bu nedenle, hücrelerin fazla büyümesini ve kültür kabında yer kalmamasını önlemek için 24 saatte bir pasajlama işlemi yapılmalıdır.

Bölünme Öncesi Tutunan Hücrelerin Kaldırılması:

Pasajlama işlemi sırasında, bölünme öncesinde tutunan hücrelerin de kaldırılması gerekir. Bu hücreler, kültürün büyümesini ve gelişmesini engelleyebilir.

Hücrelerin Yıkanması:

Büyüme çözeltisinin ortamdan çekilmesinden sonra hücreler bir kez daha PBS ile yıkanır. Bu işlem, hücrelerin yüzeyindeki büyüme faktörleri ve diğer proteinlerden arınmasını sağlar.

Ekstrasellüler Matriks (EM) Proteinlerinin Parçalanması:

Hücreler, birbirlerine ve kültür kabının yüzeyine yapışmak için ekstrasellüler matriks (EM) proteinlerini kullanır. Pasajlama işlemi sırasında bu proteinler parçalanmalıdır ki hücreler kültür kabından ayrılabilsin.

Tripsin Kullanımı:

Tripsin enzimi, EM proteinlerini parçalamak için kullanılır. Tripsin, hücrelerin membranlarını da parçalayabileceğinden dikkatli kullanılmalıdır. Tripsin yerine EDTA veya Tripsin-EDTA birlikte kullanılabilir. EDTA, kalsiyum iyonlarını bağlayarak integrin-EM etkileşimini bozar ve hücrelerin kültür kabından ayrılmasını kolaylaştırır.

Hücre Sayımı:

Kaldırılan hücreler sağlıklı bir sonuç için sayılmalıdır. Bu sayede, yeni kültür kabına ekilecek hücre sayısı belirlenir.

Hücrelerin Bölünmesi:

Her bir flask için 10^5 hücre/ml olacak şekilde hücreler birkaç flaska bölünür. Bu sayede, hücreler için yeterli alan sağlanır ve hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyümesi ve çoğalması sağlanır



Şekil 10: Flasklar ve Pleytler

(Adıgüzel & Baysal, 2008). Şekil 10'da gösterilmiştir. Şekil 10'da gösterilmiştir).

Hücrelerin Dondurularak Saklanması

İstenen özellikleri taşıyan ve kontaminasyon içermeyen bir hücre hattı üretildiğinde ya da klonlanmış bir hücre türü seçildiğinde bir “asıl” stok donmuş olarak saklanmalıdır (15).

Sıvı azotta saklama günümüzde tercih edilen hücre koruma yoludur (Menezo, 1990).

Hücreler sıvı azot içinde -196°C 'de, bu düşük sıcaklığa dayanacak özel plastik tüpler veya cam vialler içinde saklanır. Hücreler geç logaritmik faza kadar büyütülür ve yüksek bir hücre yoğunluğunda süspansiyon hazırlanır (Adıgüzel & Baysal, 2008).

Hücreler, büyüme çözeltileri besiyerine %10-20 serum ve % 5-10 gliserol veya DMSO eklenerek dondurulabileceği gibi, % 90 serum ve % 10 DMSO içeren çözeltide de dondurulabilir (Adıgüzel & Baysal, 2008).

Hücre süspansiyonu tercihen yüksek bir konsantrasyonda olmalı ve yavaşça, dakikada 1°C hızıyla dondurulmalıdır. Kontrollü yavaş dondurma işlemi için vialler izopropanol bulunan kaba yerleştirilir ve ortalama -80°C'lik derin dondurucuya kaldırılması ile her dakikada 1-3°C düşme sağlanır. Kaliteli bir dondurma sağlayabileceği gibi -80°C'de hücreler ortalama 6 ay 1 yıl saklanabilir (Bilgiç & Çiçek, 2006).

Kriyo tüp dondurma kutusu, hücrelerin kontrollü bir şekilde soğutulmasını sağlar. Kriyo tüp dondurma kutusu, -80°C'ye önceden soğutulmuş bir alkollü solüsyonla doldurulur. Dondurulacak kriyo tüpleri, kriyo tüp dondurma kutusuna yerleştirilir. Alternatif olarak, iki strafor köpük parçası (2.5 cm kalınlığında) arasında sandviç yapılarak da dondurulabilir. Bu yöntem, kriyo tüp dondurma kutusu yerine kullanılabilir. Gerektiğinde hücreler hızlıca çözdürülmeli ve asgari geri kazanım açısından yüksek bir konsantrasyonda ekilmelidir (Menezo, 1990).

Dondurma işlemi, hücreler için stresli ve potansiyel olarak letal bir işlemdir. Bu işlem sırasında hücreler, **buz kristallerinin oluşması** ve **sıcaklık değişimleri** gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Bu faktörler, hücre zarında hasara, **elektrolit konsantrasyonunda değişikliklere**, hücre dehidrasyonuna ve **pH'da değişimlere** neden olabilir. Bu hasarlar, hücre ölümüne yol açabilir (Bilgiç & Çiçek, 2006).

Dondurma işleminin etkilerini en aza indirmek için bazı önlemler geliştirilmiştir:

1. Log Fazda Dondurma: Hücrelerin dondurma işleminden önce **taze besiyerinde 24 saat log fazda bekletilmesi** önerilir. Log

fazda bulunan hücreler, daha aktif ve strese karşı daha dirençlidir. Bu sayede dondurma işlemi sırasında daha az hasar görürler.

2. Kriyoprotektif Ajanlar: Dondurma işleminde **kriyoprotektif ajanlar** olarak da bilinen **gliserol** veya **Dimetil Sülfoksit (DMSO)** gibi maddeler kullanılabilir. Bu maddeler, hücrelerin içine girerek buz kristallerinin oluşmasını engeller ve hücrenin dehidrasyonunu önler.

3. Hızlı Soğutma ve Çözme: Hücrelerin dondurma ve çözme işlemleri sırasında **hızlı bir şekilde soğutulması ve çözülmesi** önemlidir. Yavaş soğutma ve çözme işlemleri, buz kristallerinin oluşmasına ve hücre zarında hasara neden olabilir.

4. Uygun Dondurma Sıcaklığı: Hücreler, **-196°C** gibi son derece düşük sıcaklıklarda dondurulmalıdır. Bu sıcaklık, hücrelerin hızlı bir şekilde donmasını ve buz kristallerinin oluşmasını engeller.

Dondurulmuş hücrelerin saklanması:

Dondurulmuş hücreler, sıvı azot tanklarında uzun süre saklanabilir. Sıvı azot, hücrelerin **-196°C**'de korunmasını sağlar. Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11: Cryovialler

Hücrelerin Çözdürülmesi

Dondurulmuş hücrelerin araştırmada kullanılmadan önce çözülmesi ve kültürleştirilmesi önemli bir adımdır. Bu işlem sırasında hücrelerin canlılıklarını ve işlevlerini korumaları için dikkatli bir şekilde ilerlemek gerekir.

Çözme İşlemi:

Hızlı Çözme: Dondurulmuş hücreler, azot tankından veya -80°C'lik soğutucudan çıkarıldıktan sonra 37°C'ye ayarlanmış bir su banyosunda hızla çözülmelidir. Hızlı çözme işlemi, hücrelerin devitrifikasyon ve rekristalizasyon hasarlarını en aza indirmeye yardımcı olur.

Taze Besin Maddesi Ekleme: Çözdürülen hücre çözeltisi, taze besiyeri ile seyreltilmelidir. Bu işlem, hücrelerin ozmotik strese maruz kalmasını önler.

Santrifüjleme: Çözdürülen hücre çözeltisi, santrifüj ile 500-1000 rpm'de 5-10 dakika süreyle santrifüj edilir. Bu işlem, dondurma sırasında kullanılan kriyoprotektif maddeleri ve buz kristallerini hücrelerden uzaklaştırır.

Pellet'in Süspanse Edilmesi ve Kültüre Alınması: Santrifüjleme sonrası oluşan pellet, taze besiyerinde süspanse edilir ve taze besiyeri içeren petrilere aktarılır (Aydınтуğ & Mutlu, 2003).

Hücre Canlılığı ve Sitotoksite

Hücre popölasyonlarında hücre canlılığı ve proliferasyonlarını belirlemek için bazı metotlar geliştirilmiştir (Doyle & Griffiths, 1998).

Direkt hücre sayımında canlı ve cansız hücreleri ayırt etmek için genellikle hemositometre ile vital bir boya (trypan blue) kullanılır (Freshney,1994).

Hemositometre ile hücre sayımı

Hücre sayımı için en genel metot hemositometre kullanmaktır. Kalın düz sayım odacıklı lamın üzerine lamel konması temeline dayanmaktadır. Temel olarak lam üzerinde çizgi ile kesin olarak kazanmış 1 mm kareler ve daha küçük kareler içerir. Hücre süspansiyonları lam lamel arasına doldurulduğu zaman hücreler mikroskop altında gözlenebilir ve seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayılır. Bu sayımdan süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanabilir (Adıgüzel & Baysal, 2008, Eğilmez & ark, 2006).

Trypan blue canlılık testi

Trypan blue canlılık testi genellikle hücre dondurma, ayırma veya çözme gibi potansiyel olarak travmatik bir işlem uygulandıktan sonra canlı kalan hücrelerin oranını belirlemek için kullanılan bir testtir. Genel olarak canlılık testleri membran bütünlüğünü bozarak normalde geçirgen olmadığı bir boyayı alması prensibine dayanır (Adıgüzel & Baysal, 2008).

Bu metodun temel prensibi, canlı hücreler boyayı almaz iken ölü hücrelerin almasıdır. Hücre süspansiyonu trypan blue ile dilüe edilir. Canlı hücreler yuvarlak, küçük ve refraktil olarak gözlenir. Ölü hücreler büyük, şiş ve koyu mavi olarak gözlenirler. Her iki hücrenin total sayısı mililitre başına ve canlı hücrelerin yüzdesi olarak belirlenebilir (Freshney,1994).

Neutral red boyası ile canlılık testi

Nötr Kırmızı (3-amino-7-dimetil-2-metilfenazin hidroklorür), canlı hücrelerin lizozomunda biriken suda çözünen bir boyadır. Lizozomlar, hücrenin "geri dönüşüm tesisleri" olarak bilinir ve proteinlerin, nükleik asitlerin ve diğer hücresel bileşenlerin parçalanmasından sorumludur

Hücrelere Nötr Kırmızı Boyası Eklenir: Boya, hücre kültürüne eklenir ve hücreler boya ile inkübe edilir.

Canlı Hücreler Boyayı İçerir: Canlı hücreler, boyayı plazma membranından pasif taşıma yoluyla lizozomlarına alır. Lizozomlarda boya, polisakkaritler gibi lizozomal matriks içinde birikir veya lizozomun nötr kırmızıdan proton alışverişi ile birikir.

Hasarlı veya Ölü Hücreler Boyayı İçeremez: Hasarlı veya ölü hücrelerin lizozomları bozulmuştur ve nötr kırmızıyı alamazlar. Ayrıca, hasarlı hücrelerin plazma membranı hücre içinde nötr kırmızıyı tutamaz.

Sonuç Değerlendirmesi: İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, boyalı hücreler ve boyasız hücreler mikroskop altında sayılır. Canlı hücreler kırmızı renkte görünürken, ölü veya hasarlı hücreler renksizdir (Freshney,1994).

Floresan boya tutucularla canlılık sayımı

Floresan boyama yöntemi, özel olarak tasarlanmış boyaların hücrelere uygulanması ve bu boyaların hücrenin farklı bileşenleri ile etkileşime girmesi prensibiyle çalışır. Bu boyalar, uyarıldıklarında ışık yayarlar ve bu ışık mikroskobu altında gözlemlenebilir. Farklı boyalar, hücrenin farklı bileşenlerini seçici olarak boyar ve bu sayede hücrenin yapısı ve işlevleri hakkında bilgi edinilebilir.

Akridin Oranj ve Propidium İyodür Boyama Tekniği:

Akridin oranj ve propidium iyodür (AO/PI) boyama tekniği, hücre canlılığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir floresan boyama yöntemidir. Bu teknikte iki farklı boya kullanılır:

Akridin Oranj (AO): Canlı hücrelerin plazma membranından geçerek nükleik asitle (DNA ve RNA) bağlanır. Düşük boya konsantrasyonunda yeşil floresan yayar.

Propidium İyodür (PI): Canlı hücrelerin plazma membranından geçemez. Fakat hasar görmüş veya ölü hücrelerin membranı hasar gördüğü için PI hücreye girer ve nükleik asitle bağlanır. Kırmızı floresan yayar.

Boyama Sonuçlarının Yorumlanması:

AO/PI boyama sonrası hücreler mikroskop altında gözlemlendiğinde:

Canlı hücreler: Yeşil floresan ile parlarlar.

Hasar görmüş veya ölü hücreler: Kırmızı floresan ile parlarlar.

Apoptotik hücreler: Hem yeşil hem de kırmızı floresan ile parlarlar (Fisher, Francis & Rickwood, 1998).

MTT testi

Hücre canlılığını değerlendirmek, biyolojide ve tıpta önemli bir konudur. Farklı yöntemler kullanılarak hücrelerin canlı olup olmadığı ve ne kadar sağlıklı oldukları belirlenebilir. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) yöntemi, hücre canlılığını kantitatif olarak ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir kolorimetrik yöntemdir (Bissonnette & et al, 1995).

Mitokondriyal fonksiyonun bir göstergesi olan formazan oluşumuna dayanır. Canlı hücrelerde mitokondriler, MTT'yi suda çözünür bir tetrazolyum tuzu olan formazana dönüştürür. Formazan, mor renkte bir üründür. Ölü veya hasar görmüş hücrelerde mitokondriyal fonksiyon bozulmuştur ve bu nedenle MTT'yi formazana dönüştüremezler.

Yöntemin Prensibi:

MTT yöntemi, aşağıdaki temel prensiplere dayanır:

- 1) MTT'nin Suda Çözünürlüğü: MTT, fenol kırmızısı içermeyen medyum veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur.
- 2) Tetrazolium Halkasının Parçalanması: Canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimleri, MTT'nin tetrazolium halkasını formazan'a dönüştürür.
- 3) Formazan Oluşumu: Bu dönüşüm sonucunda mor renkli, suda çözünür olmayan formazan oluşur.
- 4) Formazan'ın Çözünürleştirilmesi: Oluşan formazan, izopropanol veya başka bir çözücü kullanılarak suda çözünür hale getirilir.
- 5) Kolorimetrik Ölçüm: Çözünür formazan, spektrofotometre kullanılarak 570 nm dalga boyunda ölçülür (Başaran, 1999, Doyle & Griffiths, 1998).

Sonuçların Yorumlanması:

Absorbans değeri, formazan konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Dolayısıyla, yüksek absorbans değeri, daha fazla

formazan oluşumu ve daha fazla canlı hücre anlamına gelir (Eğilmez & ark, 2006).

MTT yöntemi, hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan bir yöntem olmasına rağmen, asıl gücü, mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlamasıdır (Mosmann, 1983).

Hücre Kültüründe Kontaminasyon

Hücre kültürlerinin kontaminasyonu hücrelerin fizyolojisini ve metabolizmasını bozarak, araştırmaların ve endüstriyel çalışmaların verimliliğini olumsuz yönde etkilemekte, hastalıkların tanılarının doğru bir şekilde konulmasını engellemektedir.

Ayrıca virüs aşılarının hazırlandığı hücre kültürlerindeki kontaminasyon, insan sağlığı açısından ciddi bir tehlike oluşturmaktadır (Karaaslan & Özsan, 1998).

Hücre kültüründeki kontaminasyon çoğunlukla numunedeki antibiyotiklerin varlığından dolayı fark edilemeyebilir. Antibiyotikler kontaminasyonu maskeleyebilir veya aldatıcı negatif sonuçlara neden olabilir (McGarrity, 1979).

Antibiyotiksiz hücre kültürlerinde kontaminasyon, araştırma sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilen ve tüm deneyi bozabilecek ciddi bir sorundur. Bu tür kültürlerde kontaminasyon belirtileri ve etkenleri, antibiyotikli kültürlerden farklılık gösterebilir.

Kontaminasyon Belirtileri:

Hızlı Bulanıklık: Antibiyotik kullanılmayan kültürlerde kontaminasyon oluştuğunda, mikroorganizmalar tipik olarak hızlı bir şekilde büyür ve 18-24 saat içerisinde koyu bir bulanıklık

oluşturur. Bu bulanıklık, bakteri kolonileri veya mantar hiflerinin gözle görülür hale gelmesiyle oluşur.

pH Değişikliği: Kontamine olmuş kùltùrlerde, metabolik aktivitedeki artış nedeniyle medyumun pH'ı değişebilir. Bu değişim, asidikleşme veya alkalikleşme şeklinde olabilir ve pH göstergesi kullanarak gözlemlenebilir.

Hücre Morfolojisinde Değişiklik: Kontaminasyon, hücrelerin morfolojisini de etkileyebilir. Kontamine olmuş hücreler, büzölmüş, şişmiş veya düzensiz bir görünüm alabilir.

Hücre Ölümlü: Kontaminasyon, hücrelerin ölümlüne de yol açabilir. Bu durum, kùltürde hücre sayısında azalma ve sitoplazmik granölasyon gibi belirtilerle görölebilir.

Kontaminasyon Etkenleri:

Antibiyotiksiz hücre kùltürlerinde kontaminasyona neden olabilecek birçok farklı mikroorganizma türü vardır. Bunlardan en yaygın olanları şunlardır:

Bakteriler: Özellikle *Pseudomonas* türleri, antibiyotiksiz kùltürlerde hızlı bulanıklık oluşturabilen dirençli bakterilerdir. Diğer yaygın kontaminantlar arasında *Staphylococcus*, *Enterococcus* ve *Escherichia coli* bulunur.

Mantarlar: Mantarlar, özellikle küf türleri, antibiyotiksiz kùltürlerde sıklıkla kontaminasyona neden olur. Küf, kùltürde pamukçuk benzeri koloniler oluşturur.

Mayalar: Mayalar, antibiyotiksiz kùltürlerde daha az yaygındır, ancak kontaminasyona neden olabilirler. Mayalar, kùltürde bulanıklık ve tortu oluşturabilir.

Virüsler: Virüsler de antibiyotiksiz kültürleri kontamine edebilir, ancak bu durum daha nadirdir. Virüs kontaminasyonu, sitopatik etki gibi belirtilerle görülebilir.

Yavaş Büyüyen Mikroorganizmalar:

Bazı mikroorganizmalar, yavaş büyüdüğü için rutin testlerde gözden kaçabilirler. Bu mikroorganizmalar arasında mikoplazma, mikobakteri, anaerobik mikroorganizmalar, Haemophylus türleri, fastidiyoz difteroidler ve mayalar bulunur. Bu mikroorganizmalar, uzun süreli inkübasyon veya özel kültür teknikleri kullanılarak tespit edilebilir (Fresney, 2005).

Hücrelerin Sayımı

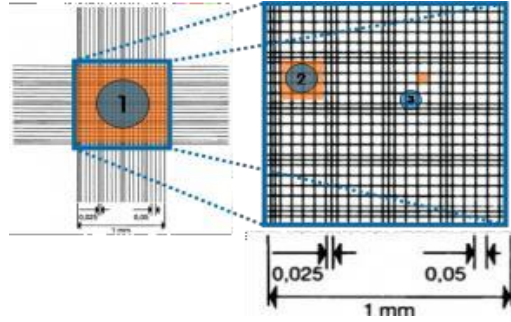
Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

Thoma lamının esası, $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma lamının görünüşü şekil 13’te verilmiştir.



Şekil 13: Thoma Lamı

Lamın çukur bir kısmı vardır. Kültür, bu kısım üzerine aktarılır, lamel kapatıldığında bu çukurda $0,1 \text{ mm}$ yüksekliğinde bir sıvı kalır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir. Şekil 14’te gösterilmiştir.



Şekil 14: Sayım Yapılacak Alan

Lamel konduktan sonra üzerine bastırılarak lamın çukuru dışında kalan düz kısmıyla lamel arasında bir sıvı katmanının kalması önlenir. Böylece çukur alan içinde tam olarak 0,1 mm yüksekliğinde sıvı bulunması sağlanmış olur. Thoma lamında 1 büyük kare 16 orta boy kare, her orta boy karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçükkare vardır. Sayım bu karelerde yapılır.

Hücre İçi Bakterilerin Hücre Kültüründe Üretilmesi

Prokaryotlar

Çekirdek zarı olmayan ve kalıtım maddesi sitoplazmada dağınık halde bulunan çok basit hücrelerdir. Bunların zarları ve organelleri yoktur.

Sadece ribozom organeli içerirler. Bazılarında sitoplazmada klorofil pigmentleri veya hücre zarından oluşan mezozomlar bulunabilir.

Daha basit bir hücre yapısına sahip, gerçek bir hücre çekirdeği olmayan Mavi- Yeşil Algler (*Cyanobacteriae*) ve bakteriler (klamidya, riketsiya ve mikoplazmalar dahil) bu grup içinde yer alır.

Zorunlu Hücre içi Bakteri

Bu gruba dahil bazı mikroorganizmalar

- Riketsiyalar,
- Mikoplazmalar(hem hücre içi hem de özel besiyerlerinde üretilebilir.)
- Koksiellalar
- Anaplasmlar
- Klamidyalar
- Ve daha birçok bakteri genusu hücre içi ve zorunlu hücre içi paraziti olarak adlandırılırlar. Zira hücrenin enerjisini kendi yaşamsallıklarını sürdürmek için kullanırlar.

Riketsiyalar

Bakteriler grubuna dahil olan riketsiyalar, diğer bakterilere göre daha küçüktür. Hücre yapıları bakterilere benzer. Bakteriler gibi hem RNA hem de DNA moleküllerini birlikte içerirler. İkiye bölünme yoluyla çoğalırlar. Zorunlu hücre içi parazitlerdir. Çoğunlukla artropodlarda (eklembacaklılarda) rastlanırlar.

Hücre görünüşleri, daha çok kok, bazen küçük çomakçık bazen de değişik şekillerde olabilir. Bakterilerden küçük, virüslerden büyüktürler. Işık mikroskopunda incelenebilir; ancak elektron mikroskopunda daha iyi görünürler. Üremeleri için virüsler gibi canlı ortam gereklidir. Antibiyotiklerden bakteriler gibi etkilenirler.

Mikoplazmalar

Bakteriler grubunda yer alan, hücre duvarı olmayan en küçük mikroorganizmalardır. 3 katlı sitoplazmik zarları vardır.(unit

membran) İkiye bölünerek çoğalırlar ve her iki nükleik asitleri taşırlar. Bazı antibiyotiklerden etkilenirler. Hücre duvarları olmadığı için son derece pleomorfiktirler. Kok, çomak, amibimsi, disk, yıldız, halka gibi çok çeşitli şekillerde olabilirler. Hücre kültürlerinin en önemli kontaminantıdır.

Koksieller

Q ateşi etkeni *Coxiella burnetii*'dir. Gammaproteobacteria sınıfında, Legionellales takımında, Coxiellaceae familyasında yer alır. Küçük (0.2-0.4 µm genişliğine 0.4-1 µm uzunluğunda), Gram negatif, pleomorfik kokobasil yapıdadırlar. Gram negatif bakterilerdekine benzer bir membrana sahip olmasına rağmen, genellikle Gram yöntemi ile boyanmazlar. Klinik örneklerde ve laboratuvar kültürlerinde *C. burnetii*'yi boyamak için genellikle Gimenez boyama yöntemi kullanılır. Özellikle mononükleer fagositleri ve makrofajları infekte etme eğilimleri vardır.

Dış membran lipopolisakkarit yapısındaki değişikliklerle ilişkili olarak 2 çeşit antijenik fazı bulunmaktadır:

Faz 1: Virulan olan infeksiyöz formudur. LPS molekülünün tümünü taşır.

Faz 2: Patojenitesi düşük laboratuvar pasajlarında veya hücre kültürlerinde oluşur.

LPS molekülü kısadır (truncated)

L-virenose, dihydrohydroxystreptose gibi diğer Gram negatif bakterilerde bulunmayan özel şekerler taşırlar.

Anaplasmalar

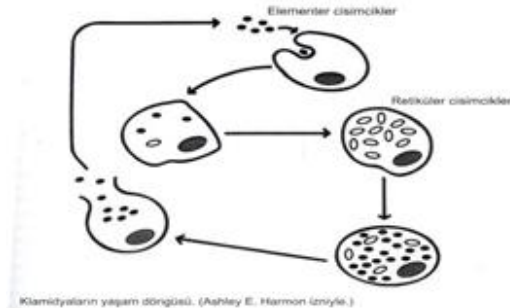
Anaplasma türleri eritrosit içerisinde, 0.3-1.0 µm çapında, yuvarlak, morfolojik ayrıntıları belirgin olmayan noktacıklar şeklinde organizmalardır.

Bu türlerden *A. marginale*, özellikle eritrosit duvarında veya duvara yakın bir bölgede yerleşim gösterirken, *A. centrale*, eritrositlerin merkezinde veya merkeze yakın olarak bulunur.

Hastalığın hafif seyrettiği vakalarda eritrositlerin içerisinde 1-2 etken bulunurken, şiddetli vakalarda bu sayı 6-7'ye çıkabilmektedir.

Klamidyalar

Küçük (200-1500 nm), zorunlu hücre içi, Gram negatif bakterilerdir. Hücre içinde özel bir büyüme döngüsü oluştururlar. Hücre içine giren infektif form (elementer cisim) fagozom içinde metabolik olarak aktif olan retiküler cisim haline dönüşür. Retiküler cisimler ikiye bölünerek, içinde çok sayıda elementer cisimler oluşur ve hücre içinde inklüzyon cisimcikleri oluştururlar. Sonuçta bu yapı parçalanarak, elementer cisimler ortama dağılırlar. Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 13: Klamidyaların Yaşam Döngüsü

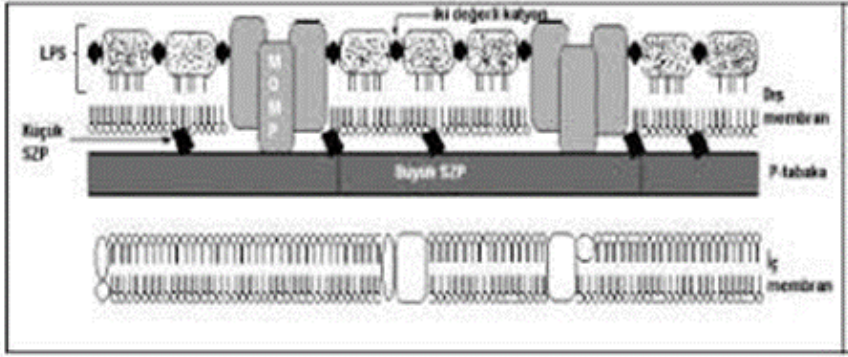
Nükleik asit, protein gibi yapıları sentezleme yetenekleri varken enerji üretimi i inkonak hücre enzimlerini kullanırlar (enerji parazitliği). Hücre duvarında bulunan peptidoglikan yapı oldukça değişiktir. Diğer bakterilerde hücre bölünmesini ve h crenin eklini belirleyen hücre bölünme proteini olan FtsZ proteinine sahip değillerdir.

Klamidyaların cinse ve t re özgül antijenleri vardır. Bunlar komplement fiksasyon ve immunofloresan testler ile belirlenir. T re  zg l antijenler olan dış membran proteinleri immunofloresan yöntemiyle belirlenirler. Cinse  zg l antijenler lipopolisakkarit, tür ve serotipe özgül antijenler polipeptit yapısındadır. Klamidyaların toksik etkisi bu antijenlere bağlıdır.

Enerji paraziti:

Klamidyalar yeterli enzimleri olmadığından ve metabolizmaları için gerekli enerjibile iklerini sentezleyemedikleri için konak hücrenin ADP ve ATP'sine gerek duyarlar. Şekil 14'te gösterilmiştir.

Özel hücre kültürlerinde, embriyolu yumurta sarı kesesinde veya deney hayvanlarında  retilbilirler. Isıyla hızlı şekilde inaktive olurlar. Eterle 30 dakikada, fenolle 24 saatte inaktive olmalarına rağmen, klorlanmış yüzme havuzunda 24 saat canlıkalırlar. Bu da venera hastalıklar için çok önemlidir.



Şekil 14: Klamidya Yapısı

SZP: Sisteinden zengin protein, LPS: lipopolisakkarid, MOMP: Dış membranproteini

Hücre İçi Bakterilerde Tanı

Sitopatolojik, serolojik, Kültür ve moleküler metodlar,

İmmunohistokimyasal yöntemler ile direk saptama ile teşhis edilebilir.

Hücre Kültüründe İzolasyon

Hücre içi bakteriler çeşitli hücre kültürlerinde iyi ürer. Örnek olarak, Klamidyalar en sık olarak McCoy veya HeLa-229 hücrelerinde ürerler. Hücre kültürlerinde hücre tipine ve biyovara bağlı olarak 42 ile 72 saatlik inkübasyondan sonra üreme olmaktadır. İmmunofloresan, Gimenez, Macchiavello ve Giemsa ile boyandıktan sonraintrasitoplazmik inklüzyonlar tespit edilebilir.

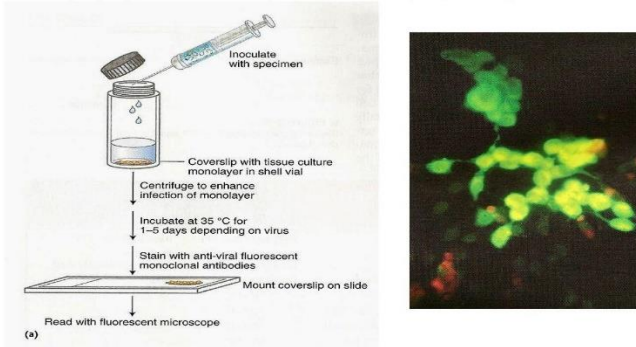
İnklüzyonlar aynı zamanda glikojen içeriyorsa McCoy hücrelerinde iyod boyama ile tespit edilebilir. Örnekler elde edildikten 24 saat içinde kültüre edilecekse +4°C’de muhafaza edilmelidir. Eğer daha uzun süre bekletilecekse alternatif olarak -70°C’de dondurularak saklanmalıdır. Kültürün özgüllüğü % 100

olmasına rağmen, duyarlılığı en uygun koşullar altında % 100 den düşüktür.

Yüksek özgüllüğünden dolayı yasal olaylarda infeksiyonun varlığı veya yokluğu hücre kültürü ile belirlenir. Örneğin; Chlamydia referans laboratuvarlarından biri olan Helsinki Üniversitesi Viroloji Bölümü Chlamydia laboratuvarında rutin olarak *C. pneumoniae* izolasyonunda Vero hücreleri kullanılmakta ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmektedir. İzolasyonda kullanılacak hücreler sıvı azottan (-196°C) çıkarılır ve oda sıcaklığında çözündürülür. İçerisinde %5-10 fetal sıgır/dana serumu, 0.05 M glukoz ve 2 mM L-glutamin ihtiva eden pH:7.2-7.4 arasında değişen modifiye besiyeri (Eagle MEM) bulunan çeşitli pleytlere veya shell viallere aktarılır.

Temel olarak kullanılan bu besiyeri her laboratuvarın kendi prensipleri dahilinde modifiye edilmektedir. Şüpheli numuneler hücreler ile kaplı lamelli tüplere (Shell vials) ya da pleytlere ekilir. Ekilen muayene maddesinin 2500-3000 devirde santrifüj edilmesi hücrelerin inokülasyonunu kolaylaştırmaktadır. Şekil 15'te gösterilmiştir.

Virus Cell Culture - Shell Vial



Şekil 15: Shell Vial Detaylı Gösterim

Muayene maddesinin çift ekilmesi ve inkübasyon sonrası birinin boyanarak inklüzyonların araştırılması, diğerinin ise alınan sonucu doğrulama amacıyla sekonder pasaj yapılması tanı için oldukça önem taşımaktadır. Sekonder pasaj yapımı daha çok seçilen boyama yönteminin türüne göre tercih sebebi olmaktadır.

Örneğin; iyot ya da Giemsa ile yapılan boyamada mutlak sekonder pasaj yapımı gerekirken, fluoresan işaretli konjuge ile boyanmış bir kültürün değerlendirilmesinde sekonder pasaj yapımı çoğu zaman tercihe bağlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

SONUÇ

Hücre kültürü, deney hayvanı kullanımına olan ihtiyacı önemli ölçüde azaltarak etik kaygıları ve hayvan refahı ile ilgili endişeleri hafifletir. Artık karmaşık biyolojik soruları cevaplamak için yüzlerce fareye veya tavşana ihtiyaç duymak yerine, kontrollü ortamlarda yetiştirilen hücreler kullanılabilir.

Hücre kültürü, araştırmacılara hücrelerin davranışları ve işlevleri üzerinde hassas kontrol imkanı sunar. Sıcaklık, pH, besin maddeleri ve gaz konsantrasyonu gibi faktörleri ayarlayarak hücrelerin nasıl tepki verdiğini inceleyebilir, karmaşık biyolojik mekanizmaları aydınlayabiliriz.

Hücre kültürü, insan ve hayvan dokularından elde edilen çeşitli hücre türlerini in vitro ortamda yetiştirmemize ve incelememize olanak tanır. Sinir hücrelerinden bağışıklık hücrelerine, kas hücrelerinden deri hücrelerine kadar geniş bir yelpazede hücre türü ile çalışabiliriz.

Hücre kültürü, ilaçlar, aşılar, enzimler ve hormonlar gibi yeni ürünlerin geliştirilmesinde kritik bir rol oynar. Örneğin, insülin ve

büyüme hormonu gibi hayati önem taşıyan ürünler, hücre kültürleri kullanılarak üretilir.

Hücre kültürü, belirli bir hedefe karşı özel olarak bağlanan monoklonal antikorların üretimi için kullanılır. Bu moleküler savaşçılar, kanser hücrelerini hedef almak, otoimmün hastalıkları tedavi etmek ve teşhis testleri geliştirmek gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Sitogenetik çalışmalar, hücre kültürleri kullanılarak kromozom anomalilerini ve genetik hastalıkları incelemek için kullanılır. Bu sayede, genetik hastalıkların tanısı ve tedavisi için yeni yollar geliştirilebilir.

Sitotoksik çalışmalar, hücre kültürleri kullanılarak kanser hücrelerinin davranışlarını ve ilaçlara karşı direnç mekanizmalarını araştırmak için kullanılır. Bu çalışmalar, daha etkili kanser tedavileri geliştirmeye yardımcı olur.

Enfeksiyon ve ilaç araştırmaları, hücre kültürleri kullanılarak yeni antibiyotikler ve antiviral ilaçlar geliştirmek için kullanılır. Ayrıca, bu yöntem enfeksiyon mekanizmalarını ve virüslerin nasıl yayıldığını araştırmak için de kullanılabilir.

Hücre kültürü, somatik gen tedavisi, tümör aşılı, canlı aşılıların greft amaçlı kullanılması ve üç boyutlu dokuların oluşturulması gibi gelecek vadeden alanlarda da büyük potansiyele sahiptir. Bu gelişmeler, tıbbın sınırlarını zorlayarak birçok hastalığın tedavisinde ve yaşam kalitesinin artmasında önemli rol oynayabilir.

KAYNAKLAR

Baysal K, Serhatlı M, Adıgüzel Z, ve ark. İleri moleküler hücre biyolojisi teknikleri eğitimi, TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli, 12-16 Mayıs 2008; 5-14.

Ovalı E, Uçar F. Hematolojide uygulamalı hücre teknikleri kurs kitabı. Trabzon, 2003; 217:7-16.

www.medicine.ankara.edu.tr/temel_tip/biyokimya/files/Hucure%20kulturu.doc Erişim tarihi: 2006.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Isolating cells and growing them in culture, Walter P. (Eds.). Molecular Biology of the Cell, New York Garland Science, 2002; 32-50.

Fresney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. John Wiley and Sons, New Jersey, 2005; 15-19.

Griffiths B. The Development of Animal Cell Product: History and Overview, ed. Glyn Stacey and John Davis, Medicines from Animal Cell Culture. John Wiley and Sons Ltd. England, 2007; 11-18.

Aydınтуğ YS, Mutlu İ. Hücre kültürü ve dış hekimliğindeki uygulamaları, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dış Hekimliği Bilimleri Merkezi, Ankara, 2003; 2-22.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al. Manipulating genes and cells, Essential cell biology. GS Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2004; 323-327.

Çiçek C, Bilgiç A. Klinik viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı. *İnfeksiyon Dergisi* 2006; 20 (3): 231-241.

Çetinkaya G, Taş A, Arat S. Primer hücre kültürü uygulamalı kursu. TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, 23-24 Ocak 2008; 3-8.

Hardingham TE, Kielty CM, Canfield AE, et al. *Cell Culture in Tissue Engineering*. Stacey G, Davis J, Medicines from Animal Cell Culture. John Wiley and Sons Ltd, England, 2007; 113-125.

Oktar N. K562 Hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin MTT ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2009; 20-25.

Başaran N. Tıbbi genetik ders kitabı. (7.Baskı), Güneş & Nobel Tıp Kitabevi, Bursa, 1999;186-187. 40

Tucker JM, Kort HI, Toledo AA, et al. Effect of coculture on subsequent survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J Assist Reprod Gen* 1995;12: 689- 692.

Menezo YJ, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod.* 1990 Feb;42(2):301-6. doi: 10.1095/biolreprod42.2.301. PMID: 2337628.

Doyle A. Griffiths JB. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. John Wiley&Sons. 1998; 57-64.

Freshney RI. *Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Techniques*. Wiley-Liss. New York,1994; 486.

Fisher D, Franscis GE, Rickwood D. Cell Separation A practical apprioach, Oxford University Pres.1998; 259: 21-27.

McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP. et al. Green DR: The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. In: Schwartz LM, Osborne BA (eds), Methods in Cell Biology, Cell Death. Academic Press. San Diego, 1995; 46: 150-181.

Yaka E, Eğilmez MY, Keskinoglu P. ve ark. Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında (BOS) biyolojik belirteçler ve BOS' un PC12 hücre hattı canlılığı üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi, Turkish Journal of Geriatrics 2006; 9 (1): 1-7.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.

Karaaslan A, Özsan M. Hücre kültürlerinde mycoplasma kontaminasyonu, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 1998; 3; (51); 169-172.45

McGarritty GJ. Detection of contamination. In: Jakoby WB, Pastan IH (eds), Cell Culture. Acedemic Press, Inc.-New York-1979; 18-29.

Bal F, Oğur G, Yıldız A. ve ark. Kromozomal anomali riski taşıyan gebeliklerde amniyotik hücre kültürü ile fetal kromozomların incelenmesi. T. Klin Jinakol Obst 1995;249-258.

BÖLÜM III

Genital Tract Microbiota in Female Farm Animals

Muhammed Kürşad BİRDANE¹
Ali SARI²

Introduction

The microbiome, composed of billions of bacteria residing within or on the host, significantly influences the host's health and susceptibility to disease. It plays a crucial role in energy metabolism, maintaining epithelial integrity, supporting gut barrier function, modulating immune responses, and influencing neuronal development. Recently, there has been growing interest in investigating how the microbiota impacts animal reproduction. Studies have shown that the microbiome plays diverse and essential roles in maintaining overall animal health and fertility. The term "microbiota" encompasses not only bacteria that inhabit specific locations but also all populations of microorganisms, including fungi, archaea, viruses, and protozoans. It was traditionally believed

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Bilimler Bölümü, Doğum ve Jinekoloji A.D, Afyonkarahisar/Türkiye, Orcid: (0000-0002-9683-4979), mkbirdane@gmail.com

² Yüksek lisans öğrencisi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü

that the female reproductive system of mammals is a sterile organ. However, with the advancement of molecular diagnostic methods, it has been discovered that organs such as the uterus, historically thought to be sterile, harbor unique microbiome colonies. (Baker & et al., 2018; Appiah & et al., 2022; Adnane & Chapwanya, 2022; Ma & et al., 2023).

Microbiota in Genital Organs

1. Microbiota of the Vagina

The composition of the vaginal microbiome plays a crucial role in mucosal health and susceptibility to infections. The reproductive system harbors a dynamic microbiome, defined as a community of microorganisms that competes and interacts within the female reproductive tract. The vaginal canal is the most extensively studied site within the reproductive system for microbiome flora. In beef cattle, the composition of the vaginal microbiota has been linked to pregnancy rates, while in dairy cattle, it correlates with periparturient reproductive diseases. Similarly, microbial populations found in the vagina of sheep have been associated with reproductive outcomes. Bacteria have the potential to indirectly modify the reproductive tract environment by influencing factors such as vaginal pH, which directly impacts critical aspects of reproduction like sperm motility, fertilization rates, and early embryo development or survival (Appiah & et al., 2020; Koester & et al., 2021; Pyleres & et al., 2021; Adnane & Chapwanya, 2022).

In cattle, the vaginal microbiome can be influenced by breeding methods such as artificial insemination or natural mating. Healthy cows without uterine infections typically have predominant

species like *Bacteroides* and *Enterobacteriaceae* in their vaginal canal. Unlike humans, the vaginal microbiome in cows remains relatively stable during pregnancy due to high progesterone levels that suppress microbial populations. The predominant phyla in the vaginal microbiome of cows across different breeds include Firmicutes, Bacteroidetes, and Proteobacteria. Additionally, Fusobacteria, Tenericutes, and Actinobacteria are reported in lower abundance. Research indicates that the microbiome profile of cows closely resembles that of ewes, suggesting a shared microbiome among ruminant animals (Swartz & et al., 2014; Clemmons & et al., 2017; Deng & et al., 2019; Appiah & et al., 2020; Adnane & Chapwanya, 2022).

Vaginal ascension can occur during parturition when the cervix's barrier function is breached, allowing native vaginal bacteria or environmental microbes that have entered the vaginal canal to reach the uterus.. Female animals with a horizontally oriented vulva are prone to retaining urine and accumulating feces in the vulva, providing an environment for newly introduced microbiota to colonize. A reproductive tract microbiota dominated by Fusobacteria and Bacteroidetes has been associated with cows that later develop reproductive diseases. These phyla contribute synergistically to reproductive disease through the expression of virulence and growth factors. (Sheldon & et al., 2008; Minseok & et al., 2015; Santos & et al., 2021; Ong & et al., 2021).

The microbiological profile of the human female reproductive tract is primarily dominated by Lactobacilli, which play a crucial role in maintaining vaginal health and defending against pathogens. Lactobacilli produce lactic acid as a by-product of glucose metabolism, lowering the pH (3.5-4.5) and creating an acidic

environment within the vaginal canal. This acidic environment acts as the first line of defense against pathogens and supports certain species, while inhibiting potentially harmful microbes. Thus, Lactobacilli significantly contribute to maintaining the balance of the vaginal microbiota and supporting reproductive health in women. The near-neutral vaginal pH observed in farm animals contrasts with the acidic pH typically maintained by abundant Lactobacillus species in humans. This difference in pH could partly explain the variation in vaginal Lactobacilli abundance between humans and farm animals (Fraga & et al., 2008; Swartz & et al., 2014; Miller & et al., 2016; McCracken & et al., 2021; Navarro & et al., 2023; Wang & et al., 2024).

A study on the vaginal microbiota of sheep found that Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Tenericutes, and Actinobacteria collectively constitute over 95% of the total bacterial population. Significant differences were observed in vaginal bacterial communities among sheep breeds, and it was noted that certain bacteria such as *Mageebacillus*, *Histophilus*, *Actinobacillus*, and *Sneathia* were more prevalent in flocks with lower pregnancy rates. (Serrano et al., 2020; Greenwood et al., 2022).

The primary bacteria in the mare's vaginal flora include *E. coli* and *S. zooepidemicus*. *E. coli* is notably more prevalent in maiden mares than in those that have foaled. Vaginal bacterial diversity increases progressively throughout the estrous cycle, reaching its peak around day 14. These findings underscore fluctuations in the vaginal microbiota of mares throughout their normal estrous cycle. Five bacterial species *E. coli*, *S. capitis*, *S. equisimilis*, *S. thoraltensis*, and *S. Zooepidemicus* are consistently

found in mares regardless of their reproductive status. However, the composition of vaginal bacterial flora varies depending on where the horses are located. Despite these variations, *E. coli* consistently emerges as the most frequently isolated bacterium across all stud farm locations. Bacterial growth fluctuates throughout different phases of the estrous cycle, with the highest growth observed during the onset and mid stages of diestrus. This growth pattern remains consistent in both maiden and previously foaled mares (Malaluang et al., 2022; Malaluang et al., 2024).

2. Microbiota of the Cervix

The cervix serves as a critical anatomical barrier that separates the uterus from the vaginal canal, thereby protecting the uterus against external contaminants. Cervical mucus provides an additional defense mechanism by preventing the ascent of unwanted bacteria from the vagina to the uterus. During parturition, the cervix undergoes dilation, reducing its barrier function and potentially increasing the risk of pathogens entering the uterus from the external environment. Firmicutes and Proteobacteria have been identified as the predominant phyla in the cervical microbiota of healthy cattle. Key bacterial species include *Porphyromonas* and *Fusobacterium*. Variations in the community composition and diversity of cervical microbiota have been observed across different physiological stages and reproductive health statuses (Appiah & et al., 2022; Adnane & Chapwanya, 2022; Poole & et al. 2023).

Changes in the cervical microbiome have been noted in cows with metritis, characterized by elevated levels of Bacteroidetes and Fusobacteria. These findings highlight the complex interactions involving cervical mucus, microbiota, and the protective

mechanisms of the cervix in maintaining reproductive health in animals. Modifications in the genital microbiota due to external factors can influence the volatile profile of cervicovaginal mucus. The cervical microbiota is primarily composed of the phyla Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes, Tenericutes, and Actinobacteria. The most common genera found are *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Fontimonas*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroides*, and *Pseudomonas*. (Swartz & et al., 2014; Amat & et al., 2022a; Luecke & et al., 2022).

3. Microbiota of the Uterus

Traditionally, it was believed that the uterus remains sterile during pregnancy and only acquires a microbiome postpartum due to contamination. Earlier studies, relying on outdated methods, emphasized uterine sterility as essential for a healthy pregnancy. However, recent advancements such as fluorescent in situ hybridization and 16S rRNA analysis have revealed bacterial species in the uteri of pregnant cattle, suggesting the existence of a natural microbiome during pregnancy. The main bacterial phyla identified in the uterus include Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes, Tenericutes, and Actinobacteria (Amat & et al., 2022a; Luecke & et al., 2022; Poole & et al. 2023)

A study identified four dominant phyla Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria in both the uterine body and uterine horns. However, the uterine body was found to harbor a greater variety of unique taxa compared to the uterine horns. These findings suggest that while the overall bacterial composition in the uterus is similar between the uterine body and horns, there are notable differences at the genus level. In the uterine body, after

Chryseobacterium, the most abundant genera detected were Pedobacter, Sphingobacterium, Flavobacterium, Paenibacillus, Bacillus, and Rhodococcus. Conversely, in the uterine horns, the most prevalent genera included Pedobacter, Stenotrophomonas, Paeniglutamicibacter, Sphingobacterium, Paenarthrobacter, and Flavobacterium. At the phylum level, Bacteroidetes were the most abundant in both regions, yet the order of prevalence among the phyla differed: in the uterine body, it was Firmicutes, Proteobacteria, and Actinobacteria; in the uterine horns, it was Actinobacteriota, Proteobacteria, and Firmicutes. This variation may stem from the uterine body's increased exposure to external factors, potentially leading to higher bacterial diversity and load (Murga Valderrama & et al., 2023).

The prevalence or increased frequency of major bacterial phyla is closely associated with the health status of cattle. Healthy cows typically exhibit a reproductive tract dominated by Proteobacteria and Firmicutes. In contrast, cows that develop reproductive diseases during the postpartum period often show higher proportions of Fusobacterium, Porphyromonas and Bacteroides. These shifts in microbial composition can indicate underlying health issues affecting the reproductive health of cattle. Uterine infections typically involve mixed bacterial infections, with Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes, Tenericutes, and Actinobacteria identified as the main bacterial phyla in the uterus (Ong & et al., 2021; Casaro & et al.2024).

There is a suggestion that pioneer microbiota may colonize bovine fetuses during the early stages of gestation. Maternal nutritional patterns during gestation are thought to impact the initial fetal microbiota. Recent studies on fetal samples from both humans

and cattle suggest that microbial colonization of the fetal gastrointestinal tract may occur before birth. Different bacterial communities, characterized by significant variations in microbial community structure and diversity, have been observed in the fetal sacs, placenta, and fetal intestine around 2.5 months into pregnancy in cows. Intestinal-related bacterial taxa such as *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lachnospiraceae*, *Christensenellaceae*, and *Ruminococcaceae* were identified in meconium and/or amniotic fluid samples. While variability was noted among individual samples, common phyla including Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria were consistently found. Meconium samples predominantly harbored *Delftia*, *Staphylococcus*, and *Clostridium sensu stricto* 1, whereas amniotic fluid samples exhibited higher abundance of *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Delftia*, *Sphingomonas*, and *Enterococcus*. Researchers concluded that while most calves are exposed to bacterial DNA transfer from the uterine environment, the amount of bacterial DNA present is low, and live bacteria are infrequent. This rarity is attributed to bacteriostatic substances found in both intestinal mucosal surfaces and amniotic fluid, which inhibit bacterial growth and viability (Amat & et al.2022b, Husso & et al. 2021).

Bacterial endometritis is recognized as the primary cause of infertility in mares, leading to reduced reproductive efficiency and significant economic losses. Studies employing culture-dependent techniques have consistently found a high prevalence of Enterobacteriaceae on the uterine epithelium of mares affected by endometritis. Enterobacteriaceae, a family within the gamma-proteobacteria phylum, includes pathogens such as *Escherichia coli*,

Salmonella, Shigella, and Klebsiella. There exists a clear correlation between the microbial composition of the endometrium and the reproductive status of mares. Specifically, the presence of bacteria from the phyla Proteobacteria and Bacteroidetes has been positively associated with healthy pregnancies. Researchers studying samples from healthy mares have identified a diverse array of bacteria belonging to the phyla Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria in the uterine environment. This microbial diversity and composition are crucial for maintaining reproductive health and are pivotal in understanding and managing conditions like bacterial endometritis in mares (Canisso & et al. 2020; Díaz-Bertrana & et al.,2021; Thomson & et al 2022).

Lower pregnancy rates are commonly observed in mares suffering from severe endometritis, primarily caused by infectious agents such as *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus* spp. These bacteria are frequently implicated in the condition. The reproductive tract microbiome in mares is characterized by five major phyla Proteobacteria, Firmicutes, Aneorococcus, Bacteroidetes, and Actinobacteria which are present in relatively equal proportions. This composition contrasts with the greater diversity typically seen in fecal microbiota. Within the equine uterus, a core microbiome includes species such as *Lactobacillus*, *Escherichia/Shigella*, *Streptococcus*, *Blautia*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, and *Peptoanaerobacter*. In contrast, the vaginal microbiota of mares is less diverse, with lactobacilli being sparse. The most abundant genera include *Corynebacterium*, *Porphyromonas*, *Campylobacter*, and *Helcococcus*. Studies specifically focusing on the vaginal microbiome have identified *Lactobacillus* species among others.

Understanding these microbiological profiles is crucial for managing reproductive health in mares, especially in relation to conditions like endometritis which can significantly impact fertility (Canisso & et al. 2020; Thomson & et al 2022; Silva & et al 2024).

In a study, it was found that bacterial DNA was present in the placenta of healthy horse pregnancies. The identified bacteria mainly belonged to genera such as *Bradyrhizobium*, unclassified *Pseudonocardiaceae*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, and *Microbacteriaceae*. There was a notable difference in microbial composition between the placenta before and after birth. The reproductive tract of non-pregnant mares may impact the microbiome development of the placenta. *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* have been linked to positive cultures during ovulation. These phyla are notably found in mares with embryos at day 7 post-ovulation, whereas *Rhodocyclaceae* and *Proteobacteria* are more common in mares without embryos. Furthermore, bacterial growth has been observed in amniotic fluid collected during delivery from healthy mare pregnancies. Additionally, on postnatal day 1, foal meconium is primarily composed of the *Firmicutes* phylum, with predominant genera including *Enterococcus*, *Bacillus*, and *Lactococcus*. These findings underscore the mare's reproductive tract microbiome's role in influencing microbial colonization in the developing placenta and the early gut microbiome of foals. Understanding these dynamics is crucial for managing equine reproductive health and ensuring the well-being of newborn foals (Beckers & et al. 2023; van Heule & et al. 2023).

Conclusion

It has been firmly established that farm animals possess unique microbiomes in their uterus, cervix, and vagina, which play a pivotal role in their reproductive health. These microbiomes exert significant influences on fertility outcomes and the susceptibility to reproductive diseases. Understanding the composition and dynamics of these microbial communities provides crucial insights into developing preventive measures and effective management strategies. This knowledge is essential for maintaining optimal animal health and enhancing productivity. Given the ongoing importance and relevance of this research, further studies are warranted to deepen our understanding and refine these strategies for the benefit of animal reproductive health.

References

Adnane, M., & Chapwanya, A. (2022). A review of the diversity of the genital tract microbiome and implications for fertility of cattle. *Animals*, 12, 460.

Appiah, M. O., Wang, J., & Lu, W. (2020). Microflora in the reproductive tract of cattle: A review. *Agriculture*, 10(6), 232.

Baker, J. M., Chase, D. M., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2018). Uterine microbiota: Residents, tourists, or invaders? *Frontiers in Immunology*, 9, 208.

Ma, H., Zhao, W., Song, T., Baijiu, Z., & Zhang, Z. (2023). Comparative Analysis of the Pre-Parturition and Post-Parturition Genital Tract Microbiota in Plateau Bangor Sewa Sheep. *Veterinary sciences*, 10(8), 523

Koester, L. R., Petry, A. L., Youngs, C. R., & Schmitz-Esser, S. (2021). Ewe vaginal microbiota: Associations with pregnancy outcome and changes during gestation. *Frontiers in Microbiology*, 12, 745884.

Pyles, R. B., Miller, A. L., Maxwell, C., Dawson, L., Richardson-Harman, N., Swartz, G., O'Neill, C., Walker, C., Milligan, G. N., Madsen, T., Motamedi, M., Vargas, G., & Vincent, K. L. (2021). Characterization of the ovine vaginal microbiome and inflammation patterns as an improved testing model of human vaginal irritation. *Frontiers in Reproductive Health*, 3, 714829.

Deng, F., McClure, M., Rorie, R., Wang, X., Chai, J., Wei, X., Lai, S., & Zhao, J. (2019). The vaginal and fecal microbiomes are related to disease in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102, 11786–11797

Clemmons, B. A., Reese, S. T., Dantas, F. G., Franco, G. A., Smith, T. P. L., Adeyosoye, O. I., Pohler, K. G., & Myer, P. R. (2017). Vaginal and uterine bacterial communities in postpartum lactating cows. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1047.

Swartz, J. D., Lachman, M., Westveer, K., O'Neill, T., Geary, T., Kott, R. W., Berardinelli, J. G., Hatfield, P. G., Thomson, J. M., Roberts, A., & Yeoman, C. J. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of Lactobacilli and near-neutral pH. *Frontiers in Veterinary Science*, 1, 19.

Santos, T. M. A., Gilbert, R. O., & Bicalho, R. C. (2011). Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94, 291–302

Minseok, K. & Wells, J. E. (2015). A meta-analysis of bacterial diversity in the feces of cattle. *Current Microbiology*, 72, 142-151

Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N., Nash, D. M., & Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, 176, 115–121.

Ong, C. T., Turni, C., Blackall, P. J., Boe-Hansan, G., Hayes, B. J., & Tabor, A. E. (2021). Interrogating the bovine reproductive metagenomes using culture-independent approaches: a systemic review. *Animal Microbiome*, 3, 41

Fraga, M., Perelmuter, K., Delucchi, L., Cidade, E., & Zunino, P. (2008). Vaginal lactic acid bacteria in the mare: Evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and

Enterococcus spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93(1-2), 71-78

Miller, E. A., Beasley, D. E., Dunn, R. R., & Archie, E. A. (2016). Lactobacilli dominance and vaginal pH: Why is the human vaginal microbiome unique?. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1936.

McCracken, J. M., Calderon, G. A., Robinson, A. J., Sullivan, C. N., Cosgriff-Hernandez, E., & Hakim, J. C. E. (2021). Animal models and alternatives in vaginal research: A comparative review. *Reproductive Sciences*, 28(6), 1759-1773.

Navarro, S., Abla, H., Delgado, B., Colmer-Hamood, J. A., Ventolini, G., & Hamood, A. N. (2023). Glycogen availability and pH variation in a medium simulating vaginal fluid influence the growth of vaginal *Lactobacillus* species and *Gardnerella vaginalis*. *BMC Microbiology*, 23(1), 186.

Wang, N., Chen, L., Yi, K., Zhang, B., Li, C., & Zhou, X. (2024). The effects of microbiota on reproductive health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(6), 1486-1507.

Serrano, M., Climent, E., Freire, F., Martínez-Blanch, J. F., González, C., Reyes, L., Solaz-Fuster, M. C., Calvo, J. H., Jiménez, M. Á., & Codoñer, F. M. (2020). Influence of the ovine genital tract microbiota on the species artificial insemination outcome: A pilot study in commercial sheep farms. *High-Throughput*, 9(3), 16.

Oliveira, J. K., Martins, G., Esteves, L. V., Penna, B., Hamond, C., Fonseca, J. F., Rodrigues, A. L., Brandão, F. Z., & Lilenbaum, W. (2013). Changes in the vaginal flora of goats following a short-term protocol of oestrus induction and

synchronisation with intravaginal sponges as well as their antimicrobial sensitivity. *Small Ruminant Research*, 113, 162-166.

Greenwood, E. C., Torok, V. A., & van Wettere, W. H. E. J. (2022). Characterizing the vaginal microbiota of high and low producing Poll Merino and White Suffolk ewes. *Translational Animal Science*, 6(4).

Malaluang, P., Wilén, E., Frosth, S., Lindahl, J., Hansson, I., & Morrell, J. M. (2022). Vaginal bacteria in mares and the occurrence of antimicrobial resistance. *Microorganisms*, 10(11), 2204.

Malaluang, P., Åkerholm, T., Nyman, G., Lindahl, J., Hansson, I., & Morrell, J. M. (2024). Bacteria in the healthy equine vagina during the estrous cycle. *Theriogenology*, 213, 11-18.

Luecke, S. M., Webb, E. M., Dahlen, C. R., Reynolds, L. P., & Amat, S. (2022). Seminal and vagino-uterine microbiome and their individual and interactive effects on cattle fertility. *Frontiers in microbiology*, 13, 1029128.

Amat, S., Dahlen, C. R., Swanson, K. C., Ward, A. K., Reynolds, L. P., & Caton, J. S. (2022a). Bovine Animal Model for Studying the Maternal Microbiome, in utero Microbial Colonization and Their Role in Offspring Development and Fetal Programming. *Frontiers in microbiology*, 13, 854453

Poole, R. K., Soffa, D. R., McAnally, B. E., Smith, M. S., Hickman-Brown, K. J., & Stockland, E. L. (2023). Reproductive Microbiomes in Domestic Livestock: Insights Utilizing 16S rRNA Gene Amplicon Community Sequencing. *Animals*, 13(3), 485.

Murga Valderrama, N. L., Segura Portocarrero, G. T., Romani Vasquez, A. C., Frias Torres, H., Flores Durand, G. J., Cornejo Villanueva, V. G., Del Solar, J. C., Costa Polveiro, R., da Silva Vieira, D., Bardales Escalante, W., Zamora-Huamán, S. J., Ordinola-Ramirez, C. M., Maicelo Quintana, J. L., & Lopez Lapa, R. M. (2023). Exploring the microbiome of two uterine sites in cows. *Scientific reports*, 13(1), 18768.

Santos, T. M., Gilbert, R. O., & Bicalho, R. C. (2011). Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *Journal of dairy science*, 94(1), 291–302.

Casaro, S., Prim, J. G., Gonzalez, T. D., Cunha, F., Bisinotto, R. S., Chebel, R. C., Santos, J. E. P., Nelson, C. D., Jeon, S. J., Bicalho, R. C., Driver, J. P., & Galvão, K. N. (2024). Integrating uterine microbiome and metabolome to advance the understanding of the uterine environment in dairy cows with metritis. *Animal microbiome*, 6(1), 30.

Husso, A., Lietaer, L., Pessa-Morikawa, T., Grönthal, T., Govaere, J., Van Soom, A., et al. (2021). The composition of the microbiota in the full-term fetal gut and amniotic fluid: a bovine cesarean section study. *Front. Microbiol.* 12:626421

Amat, S., Holman, D. B., Schmidt, K., McCarthy, K. L., Dorsam, S. T., Ward, A. K., Borowicz, P. P., Reynolds, L. P., Caton, J. S., Sedivec, K. K., & Dahlen, C. R. (2022b). Characterization of the Microbiota Associated With 12-Week-Old Bovine Fetuses Exposed to Divergent in utero Nutrition. *Frontiers in microbiology*, 12, 771832

Thomson, P., Pareja, J., Núñez, A., Santibáñez, R., & Castro, R. (2022). Characterization of microbial communities and predicted metabolic pathways in the uterus of healthy mares. *Open Veterinary Journal*, 12(6), 797-805

Díaz-Bertrana, M. L., Deleuze, S., Pitti Rios, L., Yeste, M., Morales Fariña, I., & Rivera Del Alamo, M. M. (2021). Microbial Prevalence and Antimicrobial Sensitivity in Equine Endometritis in Field Conditions. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(5), 1476

Canisso, I. F., Segabinazzi, L. G. T. M., & Fedorka, C. E. (2020). Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares - a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1432.

Silva, J. A., Castañares, M., Mouguelar, H., Valenciano, J. A., & Pellegrino, M. S. (2024). Isolation of lactic acid bacteria from the reproductive tract of mares as potentially beneficial strains to prevent equine endometritis. *Veterinary research communications*, 48(3), 1353–1366

Beckers, K. F., Gomes, V. C. L., Crissman, K. R., Liu, C. C., Schulz, C. J., Childers, G. W., & Sones, J. L. (2023). Metagenetic Analysis of the Pregnant Microbiome in Horses. *Animals*, 13(12), 1999.

van Heule, M., Monteiro, H. F., Bazzazan, A., Scoggin, K., Rolston, M., El-Sheikh Ali, H., Weimer, B. C., Ball, B., Daels, P., & Dini, P. (2023). Characterization of the equine placental microbial population in healthy pregnancies. *Theriogenology*, 206, 60–70.

BÖLÜM IV

MikroRNA'lar ve Gıdalardaki Önemi

Esra KÜÇÜKGÖZ¹
Göknur TERZİ GÜLEL²

Giriş

MikroRNA'lar (miRNAs) gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, küçük, kodlanmayan yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, mRNA'nın 3' UTR ucuna bağlanan bir RNA sınıfıdır (Bartel, 2004). Genetik, moleküler klonlama ve biyoinformatik tahmin stratejileri kullanılarak yuvarlak solucan, sinek, balık, kurbağa, memeliler, çiçekli bitkiler ve virüslerden yüzlerce miRNA tespit edilmiştir (Miska & ark., 2007). Tanımlanan ilk miRNA Lin-4 olup 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* olarak adlandırılan yuvarlak solucandan elde edilmiştir. İnsanlarda keşfedilen ilk miRNA ise let-7'dir (Roush & Slack, 2008). Bugüne kadar insan genomunu düzenleyen 2000'den fazla miRNA tanımlanmış ancak bunlardan çok azının fonksiyonel özellikleri incelenmiştir (Bartel, 2018). Yeni tanımlanan

¹Doktora Öğrencisi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye, Orcid: 0000-0001-9368-5595, esrakucukgoz@hotmail.com

² Prof. Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye, Orcid: 0000-0002-0011-0440, goknurt@omu.edu.tr

bir RNA'ya miRNA denilebilmesi için bazı kriterleri karşılaması gerekmektedir. Bu kriterler arasında i) moleküler yapının yaklaşık ~22 nükleotidden oluşması, ii) genomda düşük serbest enerjili filogenetik olarak korunan firkete yapısının olması ve iii) biyogenezin kusurlu olduğu canlılarda miRNA ekspresyon seviyesinin azalması yer almaktadır (Ambros & ark., 2003).

MiRNA'ların sayısındaki artış isimlendirme sisteminin benimsenmesini zorunlu hale getirmiştir (Ambros & ark., 2003). İnsanlarda miRNA'ları belirtirken “has”, farelerde (*Mus musculus*) “mmu”, *Drosophila melanogaster*'da “dme” gibi üç harfli kısaltmalar kullanılmaktadır. Ayrıca “miR” miRNA'nın olgunlaşmış formunu, “mir” ise olgunlaşmamış formunu ifade etmektedir (Singh & ark., 2019). MiRNA'ların isimlendirmesinde diğer bir yöntem ise dizi benzerliğine dayalı sayısal tanımlayıcıların kullanılmasıdır. Buna göre keşfedilen bir miRNA'ya miR-318 ismi verilmişse bundan sonra keşfedilen miRNA dizileri miR-319 şeklinde tanımlanmaktadır. Birbiriyle aynı olan olgun dizilere sahip olanlara aynı isim verilmektedir. MiRNA'lar farklı genomik lokuslardan geliyorsa mir-6-1 ve mir-6-2 gibi son ekler almaktadır. Bununla birlikte homolog dizilerinde bir veya iki baz değişikliği görülüyorsa miR-181a ve miR-181b şeklinde son ekler almaktadır (Rodriguez & ark., 2004).

MiRNA'lar hayvanlarda embriyo gelişimi, değişimi, metabolizması, apoptozu ve homeostazisi gibi birçok biyolojik olayın düzenlenmesinde, kök hücrelerinin farklılaşmasında ve yaşlanma karşıtı olaylarda görev almaktadır (Bartel, 2004; Vrijens, Bollati & Nawrot, 2015).

Memeli genomunda en yaygın görülen mutasyon olan “tek nükleotit polimorfizmleri” (SNP'ler) sığırlarda fenotipik özelliklerin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Sousa & ark., 2021). Bu nedenle miRNA'lar ve bunların hedef bölgelerinde doğal olarak oluşan SNP'ler, çiftlik hayvanlarında ekonomik verim özelliklerinin belirlenmesinde önemli yer tutmaktadır (Lei & ark., 2011).

Yapılan çalışmalar miRNA'ların sadece vücutta endojen olarak sentezlenmediğini bununla birlikte gıdalar yolu ile eksojen

olarak dışarıdan alınabileceğini göstermiştir (Zhang & ark., 2012). Sebze, meyve ve tahıllar ile et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri ve bal gibi gıdalarda çok sayıda miRNA tespit edilmiştir (Cieślak, Bryniarski & Nazimek, 2023). Günümüzde miRNA'lar üzerine yapılan çalışmalar bitkisel kaynaklı gıdalardan hayvansal kaynaklı gıdalara özellikle de inek sütündeki miRNA'ların varlığına doğru yönelmiştir (Cui & ark., 2017).

MiRNA Biyogenezi

MiRNA'ların biyogenezinde çok sayıda alternatif yol bulunmaktadır. MiRNA'ları kodlayan genler, memeli genomu boyunca intragenik ve intergenik pozisyonda dağılmışlardır. Gen modellerine göre miRNA'lar intergenik ve intragenik miRNA'lar olmak üzere iki gruba ayrılır. Protein kodlayan genler arasında lokalize şekilde bulunan miRNA'lara intergenik miRNA, protein kodlayan genler içinde lokalize şekilde bulunan miRNA'lara ise intragenik miRNA adı verilir (García-López, Brieno-Enríquez & Del Mazo, 2013).

MiRNA'ların biyogenezi, kanonik ve kanonik olmayan yol üzerinden gerçekleşir. Kanonik yol, miRNA'ların en yaygın olarak işlendiği yoldur. Bu yolda pri-miRNA'lar RNA polimeraz II tarafından genlerin nükleusunda kopyalanır. Daha sonra RNA bağlayıcı protein olan DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8 (DGCR8) ve Drosha'dan (ribonükleaz III enzimi) oluşan mikroişlemci kompleksi tarafından tanınır (Denli & ark., 2004). MiRNA'ların çoğunluğu kanonik yoldan kaynaklanırken, bu kuralın istisnaları da kanonik olmayan yollarla işlenir. Bu miRNA'lar Drosha'dan bağımsız veya Dicer'den bağımsız bir şekilde oluşturulur (Chung & ark., 2011; Hansen & ark., 2016). Bugüne kadar birden fazla kanonik olmayan miRNA biyogenez yolu açıklanmıştır. Bu yollarda kanonik yolda yer alan proteinlerin, özellikle Drosha, Dicer, Exportin 5 ve AGO2'nin farklı kombinasyonları kullanılır. Genel olarak kanonik olmayan miRNA biyogenezi, Drosha/DGCR8'den bağımsız ve Dicer'den bağımsız yollar halinde gruplandırılabilir.

Drosha/DGCR8'den bağımsız yol tarafından üretilen ön miRNA'lar, Dicer substratlarına benzer. Bu tür pre-miRNA'ların bir örneği, birleştirme sırasında mRNA'nın intronlarından üretilen mirtronlardır (O'Brien & ark., 2018).

MiRNA İzolasyonu

MiRNA'lar hücre ve dokular ile serum, plazma, ter ve idrar gibi vücut sıvılarından izole edilirler (Weber & ark., 2010). miRNA izolasyonu için geleneksel olarak fenol-kloroform ekstraksiyonu, RNA çökmesi ve bunların dışında sıklıkla TRIzol ajanı kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin kullanımında yüksek düzeyde kontaminasyon problemi ortaya çıkmıştır. Bu problemleri büyük ölçüde engellemek için miRNA izolasyonunda sütun bazlı RNA adsorbsiyon yöntemi tercih edilmektedir (Kim & ark., 2012).

Sütun bazlı yöntem, fenol-kloroform ekstraksiyonundan sulu fazın bir RNA'ya yüklenmesi ve ardından miRNA'nın yıkanmasını içermektedir. Bu yöntem için sıklıkla MirVana ve miRNEasy kitleri kullanılmaktadır. Direct-zol gibi yeni üretim ticari kitler faz ayırma adımını atlayarak miRNA içeren fenol reaktifini doğrudan bir RNA adsorbsiyon sütununa yükler ve ardından miRNA yıkaması ve ayrıştırmasını gerçekleştirir. Bu işlemler sırasında sütunların aşırı yüklenmemesine özen gösterilmelidir. Çünkü aşırı yüklenme RNA verimi ve kalitesini önemli ölçüde azaltmaktadır (Lu & Rothenberg, 2018).

MiRNA'ların vücut sıvılarından izolasyonu hücre ve dokulara oranla daha düşük yoğunlukta bulunduğu için zordur. Vücut sıvılarından izolasyon için yüksek hacimlerde örnek gerekir. Piyasadaki kitlerin örnek giriş hacimlerini aşan miktarlarda sıvıya ihtiyaç vardır (Moldovan & ark., 2014). MiRNA'lar doku, plazma, kan, ter gibi biyolojik materyaller dışında insan tümörlerinden de izole edilmektedir (Calin & ark., 2002). İnsan miRNA'larının birçoğunun kanserle bağlantılı genomik bölgelerde bulunduğu bildirilmiştir (McManus, 2003).

Bitkilerde MiRNA

MikroRNA'lar bitkisel ve hayvansal kaynaklı çok çeşitli kaynaklardan tespit edilebilmektedir. Çalışmalar hem bitki hem de hayvan miRNA'larının alıcı organizma tarafından absorbe edildiğini ve burada işlevlerini gösterdiğini ortaya koymuştur (Zhang & ark., 2012). Bitki miRNA'ları, hayvan miRNA'larında olduğu gibi yaklaşık 22 nükleotidden oluşan endojen RNA'lardır. Çoğu bitki miRNA'sı bağımsız genlerden kopyalanır ve genellikle evrimsel olarak korunur (Reinhart & ark., 2002). Bitkilerde Arabidopsis (Turpgiller familyasına ait) miRNA'ları ilk olarak 2002 yılında tespit edilmiştir (Park & ark., 2002). Bitki miRNA'larından mir 168a pirinçte bol miktarda bulunur ve pirinç tüketimiyle absorbe edilir (Zhang & ark., 2012).

Bitki miRNA'ları doku gelişimi, farklılaşması, biyotik ve abiyotik (kuraklık, tuz) çevresel stres koşullarına yanıtta önemli rol oynar (Khraiwesh, Zhu & Zhu, 2012). Bitkilerde çiçek gelişiminin zamanlaması ve oluşumu miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir. Bitkilerde erken çiçeklenme ve bozulmuş fenotipik görüntü miR172'nin aşırı ekspresyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır (Zhao, 2010). Bitkilerin gelişimini kısıtlayan pek çok stres faktörü (sıcak, soğuk ve tuz gibi) bulunmaktadır. Bitkilerde kuraklık stresine yanıt veren miRNA'lar (miR167, miR168, miR171 ve miR396) bildirilmiştir (Liu & ark., 2008). Pirinç ve Arabidopsis (turpgiller)'de miR396'nın aşırı ekspresyonunun tuz ve alkali stres toleransını azalttığı bildirilmiştir (Chi & ark., 2011). Soğuk stresi bitkilerin büyüüp gelişmelerini etkileyen önemli bir stres faktördür. Arabidopsis'te soğuk stresi sonucu çeşitli miRNA'ların (miR165/166, miR169, miR172, miR393, miR396, miR397, miR402 ve miR408)'in ekspresyon seviyelerinin arttığı, miR398 seviyesinin ise azaldığı bildirilmiştir (Sunkar & Zhu, 2004).

Hayvanlarda MiRNA

Hayvanlarda miRNA çalışmaları genellikle yağ doku, iskelet kası, kemik ve kıkırdak gelişimi, üreme sistemi, erken embriyonik dönem, oosit gelişimi, yapığı verimi, et kalitesi ve süt verimi üzerinde gerçekleştirilmiştir (Abd El Naby & ark., 2013; Reza & ark., 2019; Wenguang & ark., 2007; Xu & ark., 2003).

1-MiRNA’ların İskelet Kası Gelişimi (Miyogenez) Üzerine Etkileri

Miyogenez, erken embriyonik gelişim sırasında iskelet kas dokusunun oluşumudur. Miyogenez esnasında miRNA’lar miyoblast hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında görev alırlar. Kalp ve iskelet kası gelişiminde etkili spesifik pek çok miRNA (miR-1, miR-133, miR-206, miR 208, mir 499, mir 486, miR-181 ve miR-214) bildirilmiştir (Ge & Chen, 2011). Bunlar arasında üzerinde en fazla çalışılan miyogenik miRNA’lar, miR-1, miR-206 ve miR-133 aileleridir (Williams & ark., 2009). Yapılan alışmalar canlılarda embriyonik ve perinatal dönemde kaslarda düşük ekspresyon seviyelerde bulunan miR-23’ün kas gelişimi ile kademeli olarak arttığını göstermiştir (Wang & ark., 2012). Tavuklarda iskelet kası gelişiminden miR-1, miR-206, miR-133, mir16-5p’nin sorumlu olduğu, bunlar arasında miR-16-5p’nin erken embriyonik dönemde kademeli olarak arttığı bildirilmiştir (Cai & ark., 2018).

2-MiRNA’ların Kemik ve Kıkırdak Gelişimi Üzerine Etkileri

miRNA’lar endokondral ossifikasyon (kemik yapımı), kondrosit farklılaşması, osteoblast (kemik yapımını sağlayan hücreler) ve osteoklast (kemik yıkımını sağlayan hücreler) aktivitelerinde görev alırlar (Desjardin & ark., 2014). miRNA’lar osteoblastların proliferasyonu ve farklılaşmasını düzenleyerek kemik oluşumu ile ilgili birçok genin aktivasyonu veya baskılanmasında rol oynarlar (Fang & ark., 2015). Osteogenezde birçok miRNA (miR 103a, miR 132-3p, miR 204, miR 93, miR 145,

miR 214, miR 205 vd) bildirilmiştir. Tanımlanan ilk mekanosensitif (mekanik duyarlı) miRNA olan miR-103a doğrudan Runx2'yi hedefleyerek osteoblast aktivitesi ve matris mineralizasyonunu engeller. Bununla birlikte osteoporozda; miR-203a, miR-31-5p, miR-19b-1-5p, miR-23b-3p, miR-140-3p, miR-21-5p, miR-122-5p osteosarkomda; miR-191, miR326, miR-338-p, romatizmal eklem iltihabında; miR-451a, miR-25-3p, miR-140 osteoartritde; miR-33b-3p, miR671-3p, miR-140-3p, miR-378a-5p'nin rol oynadığı bildirilmiştir (Yu & ark., 2022). MiRNA'ların kırıkta hücre döngüsü, farklılaşması, enerji üretimi ve metabolizmasında da fonksiyonları bulunmaktadır. Kırıkta özgü bir miRNA olan Eca-miR-140'ın atların kırıkta yüksek oranlarda eksprese edildiği bildirilmiştir (Buechli, LaMarre & Koch, 2013).

3-MiRNA'ların Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Memelilerde miRNA'lar cinsiyet farklılaşması, gametogenez, dölleme, implantasyon, germ tabakası spesifikasyonu ve gebelikte rol oynamaktadır. Bununla birlikte miRNA'lar yalancı gebelik ile normal gebeliğin ayırımında kullanılmaktadır. Erkek üreme sisteminde miRNA ekspresyonunun bozulması, olgun spermatozoa sayısında azalma, sperm morfolojisinde değişiklikler, motilitede azalma, germ hücre apoptozu, seminifer tubullerinde dejenerasyon ve testis boyutunda küçülmeye neden olmaktadır (Reza & ark., 2019). Sığır oositlerinde üremede görevli farklı miRNA'lar (miR-205, miR-150, miR-122, miR-96, miR-146a, miR-146b-5p) tespit edilmiştir (Abd El Naby & ark, 2013). miR-133b'nin yumurtalıkların gelişimi ve oositlerin olgunlaşmasında görev aldığı bildirilmiştir (Xiao & ark., 2014).

4-MiRNA'ların Laktasyon Periyodundaki Değişimi

Meme bezi buzağılamadan sonra gelişen, süt üretimi sağlayan kompleks bir organdır. Meme bezi epitellerinin süt üretimi için gerekli genlerin belirlenmesi ve gen ekspresyon profillerinin ortaya konmasında önemli fonksiyonları bulunmaktadır (Cui & ark.,

2020). İneklerde farklı yaş, gebelik ve laktasyon dönemlerinde meme dokusunda farklı miRNA'lar tespit edilmiştir (Gu, Eleswarapu & Jiang, 2007). Sığırlarda yapılan bir çalışmada laktasyonun farklı dönemlerinde 13 miRNA'nın (miR-10a, miR-15b, miR-16, miR-21, miR-31, miR-33b, miR-145, miR-155, miR-181a, miR-205, miR221 ve miR-223) ekspresyon seviyeleri incelenmiş, miR-31 dışındaki tüm miRNA'ların kuru dönem ve erken laktasyon döneminde arttığı bildirilmiştir (Wang & ark., 2012). Koyunlarda ise miR-148, miR-143, miR-26a, let-7f, let-7g, miR-30a-5p, let-7a ve miR-21'in laktasyon döneminde en fazla eksprese edilen miRNA'lar oldukları, laktasyon dönemi dışında ise miR-199a-3p, miR-221, miR125b, miR-329b-3p ve miR-493-5p'nin yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Wang & ark., 2021).

5-MiRNA'ların Yapağı Verimi Üzerine Etkileri

Yün kalitesi koyunlarda önemli ekonomik kalite özelliklerinden biridir. Yün lifi, yün folikülleri olarak adlandırılan özel cilt hücrelerinden elde edilir. (Alonso & Fuchs, 2006). Tibet koyunlarında Solexa dizilim yoluyla anajen, katajen ve telojen aşamalarında yün folliküllerinde miRNA'ların ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda yün foliküllerinde en fazla eksprese edilen 10 miRNA'nın oar-miR-146a-5p, oar-let-7a-5p, oar-miR-24-3p, oar-let-7f-5p, oar-miR-378-3p, oar-miR-21- 5p, oar-miR-27b-3p, oar-let-7c-5p, oar-miR-184-3p ve oar-miR-103-3p olduğu bildirilmiştir (Liu & ark., 2013). Başka bir çalışmada ise miR-125b'nin kıl folikülü kök hücrelerinin farklılaşmasında baskılayıcı bir görevi olduğu ve bu nedenle anajen aşamasının başlamasında oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (Zhang & ark., 2011).

6-MiRNA'ların Yağ Doku Üzerine Etkileri

miRNA'lar hayvanlarda lipit metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Deri altı dokusunda lipid birikimi et verimi ve kalitesi açısından oldukça önemli bir parametredir (Jin & ark., 2010). Hayvanlarda yağ metabolizmasının düzenlenmesinde görev alan

miR-14'ün delesyonu (kaybı) trigliserit ve digliserit seviyelerinde yükselmeye neden olmaktadır (Xu & ark., 2003). miR-143 adiposit farklılaşmasında protein kinaz 5'in gen ekspresyonunu sağlayarak rol oynamaktadır (Esau & ark., 2004). miRNA'lar içinde miR-122, miR-370, miR-378, miR-27 ve miR-335'in lipid metabolizması ve adiposit farklılaşmasında görev aldığı gösterilmiştir (Sun & ark., 2014). Bunlara ilave olarak yağ doku oluşumunu destekleyen sekiz miRNA daha (miR-19a, miR-92a, miR-92b, miR-101, miR-103, miR-106, miR-142a-5p ve miR-296) belirlenmiş olup bu miRNA'ların yüksek yağlı rasyonla beslenmede yağ doku oluşumuna iyi cevap verdiği bildirilmiştir (Romao & ark., 2012).

Deri altı yağ doku kalınlığı ile miRNA ekspresyonu arasında ilişki bulunmaktadır. Farklı sırt yağı kalınlığına sahip melez danalarda miR378'in sırt yağı kalınlığında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Jin & ark., 2010). Yapılan son çalışmalar memede süt yağı sentezlenmesinde mRNA'ların önemli rol oynadığını göstermiştir. Memelilerde miR-130a'nın süt yağı metabolizması ile ilişkili mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde etkilediği, epitel hücrelerinde trigliserit konsantrasyonunu düşürdüğü ve lipid damlacıkları oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Yang & ark., 2017).

7-MiRNA'ların Et Kalitesi Üzerine Etkileri

Et insan beslenmesinde önemli bir protein kaynağıdır. Etin görünümü, tekstürü, sululuğu, yumuşaklığı, sertliği ve su tutma kapasitesi etin kalite niteliklerini oluşturmaktadır. Ette bulunan yağ ve yağ asitlerinin bileşimi etin kalitesi ile ilişkili olup genetik faktörlerden etkilenmektedir. Et kalitesinin iyileştirilmesinde miRNA'lar haberci RNA'lara bağlanarak sığırlarda embriyonik gelişim, iskelet kası gelişimi, yağ doku oluşumu ve yağ hücre metabolizmasında önemli görev almaktadır (Li & ark., 2022).

Artan dünya nüfusu nedeniyle gıdaya olan talep her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle tüketiciler bol miktarda ve iyi kaliteli

et tüketmeyi arzu etmektedir. Kasların gelişim aşaması olarak bilinen miyogenez et üretiminde önemli bir aşamadır. Bu aşamada şekillenen miRNA'ların ekspresyonu etin kalitesini doğrudan etkilemektedir. Kasların miyogenezinde miR-1, miR-21, miR22, miR-27, miR-34, miR-127, miR-133, miR-143, miR-155, miR-199, miR-206, miR-208, miR-378 ve miR-432 olmak üzere çeşitli miRNA'lar rol oynamaktadır (Iqbal & ark., 2020).

İskelet kası gelişiminde miRNA'lar hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli görevler almaktadır. Yapılan çalışmalarda miR-148a-3p, miR-133 ve miR-206'nın iskelet kası büyümesi ve gelişmesinde görev aldığı (Song & ark., 2019; Zhang & ark., 2018), miR-543 ve miR-758'in ise miyosit güçlendirici faktör 2A ile iskelet miyoblast farklılaşmasını desteklediği bildirilmiştir (Wang & ark., 2019). miR-744 ineklerde hücre proliferasyonunu teşvik etmekte ve miyoblast apoptozunu baskılamaktadır (Peng & ark., 2019). Holstein-Friesian ve Hereford-Limousin cinsi sığırlarda yapılan çalışmada 9 farklı miRNA'nın (miR-1, miR-128, miR-133a, miR-133b, miR-139, miR-206, miR-222, miR-486 ve miR-503) kas hücresi gelişimini desteklediği bildirilmiştir (Sadkowski & ark., 2018). Çin'de yapılan bir çalışmada Quinchuan sığırlarında beş farklı miRNA'nın (bta-miRNA-206, miRNA-1, miRNA-133, miRNA-12 ve miRNA-17) kas spesifik miRNA'lar oldukları bildirilmiştir (Sun & ark., 2013).

8-MiRNA'ların Süt Kalitesi Üzerine Etkileri

Süt yavrunun erken dönemde gelişimini düzenleyen, anne ile yenidoğan arasında beslenme ve iletişim rolü üstelenen önemli bir gıda maddesidir. Sütte ilk miRNA 1993 yılında keşfedilmiştir. Süt miRNA'ları eksozomlar tarafından taşınır. Eksozomlar anne ile yavru arasındaki hücresel iletişime aracılık eden en önemli yapılardır (Melnik & Schmitz, 2017). Süt miRNA'ları hücre büyümesi ve sinyal iletimi gibi fizyolojik faaliyetlerde görev alırlar ve yeni doğan yavrunun hücresel işlevlerini düzenlerler (Van Herwijnen & ark.,

2018). Sütte miRNA'ların ekspresyonu, enfeksiyon, gebelik ve emzirme gibi meme bezini etkileyen koşullar ile doğrudan ilişkilidir. Sütte miRNA'lar bazı hastalıkların belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. miRNA'lar özellikle stafilkokkal mastitis ve tüberküloz gibi meme bezini etkileyen enfeksiyonlarının tespitinde önem taşımaktadır. Sütte sıklıkla izole edilen 10 miRNA arasında miR-148a-3p, miR-21-5p, miR-30a-5p, miR-200c, let-7b-5p, miR-99a-5p, miR-26a-5p, let-7a-5p, miR-200b, miR-30d yer almaktadır (Benmoussa & Provost, 2019). Sütte miRNA-152 meme bezi gelişimi ve laktasyonu düzenlemede görev almaktadır (Wang & ark., 2014). miRNA-148a laktasyonun her aşamasında en çok eksprese edilen miRNA olarak tespit edilmiştir (Do & ark., 2017).

Eksozomal süt miRNA'ları sahip oldukları lipid tabakası nedeniyle oldukça dayanıklıdır. Yapılan çalışmalarda 100 °C'de 10 dk kaynatma, beş kez arda arda dondurma-çözdürme ve 4°C'de bir gece muhafaza sonrasında miRNA'ların sütte kararlı halde bulundukları bildirilmiştir (Baddela & ark., 2016). Süt miRNA'ları asit ortama direnç göstermektedir. Gastrointestinal sistemi taklit etmek için sütün asitleştirilmesi sonrası miRNA verimi ve kalitesinin etkilenmediği bildirilmiştir (Hata & ark., 2010). Yapılan çalışmalar sütün işlenmesi sırasında uygulanan pastörizasyon ve fermentasyon gibi işlemlerin miRNA kaybına neden olduğu ve süt ürünlerinde miRNA konsantrasyonlarının önemli oranlarda düştüğünü göstermiştir (Howard & ark., 2015; Yu & ark., 2017). Sütte miRNA-148a-3p'nin miktarının yağsız inek sütünde %23 iken, süt pastörize edildiğinde bu oranın %16'ya düştüğü bildirilmiştir (Golan-Gerstl & ark., 2017). Başka bir çalışmada yağsız sütte pastörizasyon ve homojenizasyon işlemleri sonrası miR-200c ve miR-29b'de %63'lük ve %67'lik bir kayıp şekillendiği, mikrodalga ısıtma sonrası ise miR-29b'de %40'lık bir kayıp olurken miR-200c'de ise bir kayıp şekillenmediği bildirilmiştir (Howard & ark., 2015).

Sütte miRNA'ların diğer önemli görevi sütün kalitesinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak görev almalarıdır. Sütte

kalitenin belirlenmesinde protein, lipid, karbonhidrat ve iyon miktarı tayini gibi klasik yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemlerin manipüle edilmeleri nispeten kolay olmaktadır. Buna karşın süt miRNA'larının manipüle edilmeleri diğer belirteçlere göre daha zor olduğu için sütün kalitesinin belirlenmesinde güvenilir sonuçlar vermektedir. Çiğ süt ve süt ürünlerinde kalite kontrolü ile ilişkili olarak yedi miRNA (miR-26a, miR-26b, miR-200c, miR-21, miR-30d, miR-99a ve miR-148a) potansiyel biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (Chen & ark., 2010).

9- İnsanlarda miRNA'lar ve Hastalıklar Üzerine Etkileri

İnsan genomunda yaklaşık olarak 2600 olgun miRNA bulunmaktadır. Bu miRNA'lar insanlardaki belirli mRNA'ları hedef alırlar (Plotnikova, Baranova & Skoblov, 2019). İnsan genomundaki genlerin %1-4'ünün miRNA olduğu ve tek bir miRNA'nın 200 kadar mRNA'yı düzenleyebileceği tahmin edilmektedir. miRNA'larda oluşabilecek mutasyonlar, biyogenezdeki bozukluklar ve hedef düzensizlikler çeşitli hastalıklara sebep olabilmektedir. Şimdiye kadar miRNA'lar ile ilişkili yaklaşık 70 hastalık bildirilmiştir (Lu & ark., 2008).

Dokuya özgü miRNA'lar genellikle belirli dokularla ilgili hastalıklarla ilişkilidir. İnsanlarda organ ve doku biyopsi profilinin çıkarılmasıyla belirli miRNA'ların ve ailelerinin yaklaşık %17'sinin ağırlıklı olarak farklı dokularda eksprese edildiği bildirilmiştir (Saliminejad & ark., 2019). MiRNA'ların gen ifadelerini düzenlemeleri ve hücrelere kolayca girebilmeleri göz önüne alındığında kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde önemli bir potansiyel sahibi oldukları düşünülmektedir (Croce & Calin, 2005).

miRNA'ların obezite, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser genetiğinde rol oynadıkları, miR-33 ve diğer bazı miRNA'ların lipid metabolizmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Fernández-Hernando & ark., 2011; Melkman-Zehavi & ark., 2011).

miRNA düzensizliği kanser, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli hastalıklarda, hastalığın ilerlemesinin nedeni olarak gösterilmektedir (Paul & ark., 2018). Geliştirilen non-invaziv miRNA tanı testleri ile insanlarda malign akciğer kanserleri, kronik pankreatitis ve pankreas kanserlerinde miRNA ekspresyon düzeylerinde farklılıklar saptanabilmektedir (Singh & ark., 2019). MiR-21'in kanser dahil olmak üzere pek çok patolojik durumda yukarı regüle olduğu bildirilmiştir (Jazbutyte & Thum, 2010). İnsanlarda kanser üzerine yapılan bir çalışmada miR-21'in akciğer, meme, mide, prostat, kolon ve pankreas dahil olmak üzere altı farklı kanser türünde aşırı eksprese edildiği tespit edildiği bildirilmiş ve onkojenik miRNA olarak kabul edilmiştir (Schramedei & ark., 2011). Ayrıca miR-21'in kan dolaşımında, balgamda, beyin omurilik sıvısında ve dışkıda bulunması malignitenin biyolojik belirteci olarak gösterilmiştir (Kumarswamy, Volkmann & Thum, 2011).

Kanserli bölgelerdeki düzensiz miRNA'lara tümör baskılayıcı miRNA'lar veya "OncomiR" denilmektedir. OncomiR'ler kanserde yukarı regüle olarak tümör baskılayıcı genleri baskılar ve buna karşılık tümör baskılayıcı miRNA'lar malignite durumunda aşağı regüle olur ve hedef oncomiR'ler aşırı eksprese edilirler (Svonoros, Angelman & Slack, 2016). Tedaviye dirençli kanserlerde miR-155 yukarı regüle olmaktadır. In vitro çalışmalar miR-155'in aşırı ekspresyonunun transforme edici büyüme faktörü- β reseptörü 2'nin (TGF β R2) ekspresyonunu baskıladığını ve mide kanseri hücre proliferasyonu ve göçünü desteklediği bildirilmiştir (Qu & ark., 2018). Lösemide miR-34a'nın aşağı regüle olarak apoptozu teşvik ettiği, akut miyeloid lösemi hücrelerinde otofajiyi inhibe ettiği, miR-374b'nin rahim ağzı kanserinde aşağı regüle olarak p38/ERK sinyal kolunun blokajı yoluyla hücre çoğalması ve göçünü inhibe ettiği bilinmektedir (Liu, Ren & Chen, 2017; Li & ark., 2018). miR-125b'nin inhibisyonu farklılaşmış kanser hücrelerinin proliferasyonunda azalmaya sebep

olmaktadır (Lee & ark., 2005). Özefagus skuamöz hücreli karsinoma tanılı hastaların serumlarında miR-21 seviyesi yükselirken miR-375 seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Komatsu & ark., 2011). İnsanlarda let-7'nin bazı akciğer kanserlerinde aşağı regüle olarak kanser hücrelerinin büyümesini in vitro olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (Johnson & ark., 2005).

MiRNA'ların insan hastalıklarındaki rolü sadece kanserle sınırlı değildir. miRNA'lar patolojik virüslerle de etkileşim halindedir. Viral kodlanmamış miRNA'lar normal hücrel fizyolojiye müdahale ederek virüslerin konaktaki yaşam döngülerini sürdürebilmelerini sağlarlar. miR-S1'in Simian Vakuolasyon virüs 40 ile enfekte olmuş hücrelerin bağışıklık sisteminden korunmasında önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (Singh & ark., 2019).

Astım, solunum yollarının iltihaplanması ve solunum fonksiyonlarında azalma ile seyreden kronik inflamatuvar bir hastalıktır (Kuperman & ark., 2005). Astım hastalarında miR-21 mononükleer ve çok çekirdekli miyeloid hücre sitoplazmasında tespit edilmiş ve ekspresyon düzeyinin astım hastalarında önemli düzeylerde arttığı bildirilmiştir (Lu, Munitz & Rothenberg, 2009). Alerjik rhinitli çocuklardan alınan monosit örneklerinde miR-21'in belirgin bir ölçüde aşağı regüle olduğu belirlenmiştir (Chen & ark., 2010).

Diyabetli hastalarda karaciğer, böbrek, pankreas β hücreleri ve yağ dokuda miR-29a/29b1/29b2'nin yukarı regüle olduğu tespit edilmiştir (Rupaimoole & Slack, 2017). miR-143/145'in vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması sırasında protein kodlayan mRNA'ları hedeflediği ve fare modellerinde aşağı regülasyonunun hipertansiyon ve kalp rahatsızlıkları ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Zhao, Zhao & Zhao, 2015).

10- Gıdalar ile miRNA Alımı ve Metabolizma Üzerine Etkileri

Gıda kalitesi ve beslenme alışkanlıkları insan sağlığı üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar

miRNA'ların bitkiler ve hayvanlar da dahil olmak üzere çeşitli beslenme kaynaklarında yaygın olarak tespit edildiğini göstermektedir (Mishra & ark., 2023).

Son 10 yılda besinlerin yalnızca yağ, karbonhidrat, protein, vitamin, mineral ve iz elementlerden oluşmadığı, bunun yanı sıra makro ve mikro besinlerin yapısında bitki ve hayvanlardan kaynak alan miRNA'ların yer aldığı anlaşılmıştır. Vitaminler (D vitamini, E vitamini, folat) ve ikinci bitki metabolitlerinde (curcumin, resveratrol, quercetin, vb) belirgin miRNA seviyeleri rapor edilmiştir (Wagner & ark., 2015). Çalışmalar sonucunda diyetle modüle edilen birçok miRNA tanımlanmış olup beslenme alışkanlıkları ile endojen miRNA'ların modülasyonlarının yakından ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Özellikle enerji içeriği ve yağ alımının miRNA seviyelerini etkileyen anahtar faktörlerden olduğu ortaya çıkmıştır (DeLucas & ark., 2024).

Diyetle alınan miRNA'lar dolaşım yoluyla taşınır ve genler arası çaprazlama adı verilen bir süreç aracılığıyla genin hücrelerdeki ekspresyonunu etkiler (Mishra & ark., 2023). Son yıllarda miRNA'ların insülin duyarlılığı, kolesterol ve lipid metabolizması da dahil olmak üzere besin metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Yu & ark., 2022)

Diyet miRNA'ları inflamasyon, otoimmün tepkiler ve kanser gibi çeşitli bozukluk ve hastalıkların tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak gösterilmektedir (Zhang & ark., 2019; Kalarikkal & Sundaram, 2021). Yapılan çalışmalarda miR29b ve miR-200c'nin inek sütü tüketen insanlarda geçici olarak arttığı inek sütünden alınan miR-29b'nin ise insanlar tarafından tüketilip vücuda alındığında insan gen ekspresyonu ile değiştiği ortaya konmuştur (Baier & ark., 2014).

Diyet kaynağı pirinç olan Çinli yetişkin bireylerin serumlarında 30 eksojen miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar arasında ath-miR-156a, ath-miR166a ve osa-miR-168a'nın

seviyelerinin önemli düzeylerde olduğu bildirilmiştir. Yapılan alışma sonunda bu üç miRNA'nın özellikle pirinç ve turungillerden geçtiği sonucuna varılmıştır (Zhang & ark., 2012).

Dört hafta boyunca her gün 500 ml kan portakalı suyu tüketen 18 ila 40 yaş arası 20 kadın tüketicinin plazma ve periferik kan mononükleer hücrelerinin incelenmesi sonucu plazmada hsa-miR-144-3p'nin, periferik kan mononükleer hücrelerinde hsa-miR-144-3p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-130b-3p'nin yükseldiği, hsa-let-7f-5p ve hsa-miR-126-3p'nin ise dştği grlmştir (Capetini & ark., 2023).

Anne sütü, bebeğin bağışıklık sisteminin gelişimini etkileyen immünolojik bileşenler açısından zengin kompleks bir sıvıdır. Anne sütünde eksozomlar içerisinde miRNA'lar bulunmaktadır. Bu eksozomal miRNA'ların anne sütünden bebeğe sindirim sistemi yoluyla geçmekte ve bağışıklık sisteminin gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (Zhou & ark., 2012). Anne sütündeki miRNA'ların microarray (mikrodizileme) analiziyle incelendiği bir çalışmada 281 miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar arasında T hücreleri ve B hücrelerinin olgunlaşmasını düzenleyen miR-155, B hücrelerinin farklılaşmasını sağlayan miR-181a ve miR-181b, monosit gelişimini düzenleyen miR-17 ve miR-92 gibi miRNA'ların olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada anne sütü tüketen bebeklerde ek gıda alımının olmadığı ilk 6 ayda bağışıklık sistemi üzerine etkili miRNA'ların yüksek ekspresyonda olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda anne sütündeki miRNA'ların çok asidik koşullara (pH 1) dayanıklı olması nedeniyle bebeklerin mide-bağırsak sisteminden etkilenmeden bağışıklığa katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (Kosaka & ark., 2010).

Sonuç ve neriler

Günümüzde hayvansal ve bitkisel kaynaklı gıdalarda miRNA'ların varlığı ve fonksiyonları üzerine çalışmalar devam etmektedir. MiRNA'lar tanı, teşhis ve hastalıkların

değerlendirmesinde önemli bir yer tutmaktadır. MiRNA'lar çiftlik ve kümes hayvanlarının sağlıklı yetiştirilmesi ve kaliteli gıda elde edilmesinde önemli rol oynamaktadır. MiRNA'lar et kalitesi, süt kalitesi, yapağı verimi, iskelet ve kas gelişimine etki ederek gıda güvenliği ve gıda verimliliğine katkı sağlamaktadır. Özellikle çiftlik hayvanlarında kas doku gelişimi ve yağlanma metabolizması üzerine etkilerinin belirlenmesi ile et verimliliği artmaktadır. Bununla birlikte MiRNA'lar süt endüstrisinde sütün kalitesinin ortaya konması, yapılan taklit ve tağşişlerin belirlenmesinde potansiyel işaretleyici olarak kabul edilmektedir.

KAYNAKÇA

Abd El Naby, W., Hagos, T., Hossain, M., Salilew-Wondim, D., Gad, A., Rings, F., Tesfaye, D. (2013). Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. *Zygote*, 21(1), 31-51. <http://doi:10.1017/S0967199411000566>

Alonso, L., Fuchs, E. (2006). The hair cycle. *Journal of Cell Science*, 119(3), 391-393. <http://doi:10.1242/jcs.02793>.

Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *Rna*, 9(3), 277-279. <http://doi:10.1261>

Baddela, V. S., Nayan, V., Rani, P., Onteru, S. K., Singh, D. (2016). Physicochemical biomolecular insights into buffalo milk-derived nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178, 544-557. <http://doi.org/10.1007/s12010-015-1893-7>

Baier, S. R., Nguyen, C., Xie, F., Wood, J. R., Zemleni, J. (2014). MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *The Journal of Nutrition*, 144(10), 1495-1500. <https://doi.org/10.3945/jn.114.196436>

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)

Bartel,D. P. (2018). Metazoan micromnas. *Cell*, 173(1), 20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>

Benmoussa, A., Provost, P. (2019). Milk microRNAs in health and disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 703-722. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12424>

Buechli, M. E., LaMarre, J., Koch, T. G. (2013). MicroRNA-140 expression during chondrogenic differentiation of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Development*, 22(8), 1288-1296. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0411>

Cai, B., Ma, M., Chen, B., Li, Z., Abdalla, B. A., Nie, Q., Zhang, X. (2018). MiR-16-5p targets SESN1 to regulate the p53 signaling pathway, affecting myoblast proliferation and apoptosis, and is involved in myoblast differentiation. *Cell Death & Disease*, 9(3), 367. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0403-6>

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(24). 15524-15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>

Capetini, V. C., Quintanilha, B. J., de Oliveira, D. C., Nishioka, A. H., de Matos, L. A., Ferreira, L. R. P., Ferreira, F.M., Sampaio, G.R., Hassimotto, N.M.A., Lajolo, F.M., Fock, R.A., Rogero, M. M. (2023). Blood orange juice intake modulates plasma and PBMC microRNA expression in overweight and insulin-

resistant women: impact on MAPK and NFκB signaling pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 112, 109240. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109240>

Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., Tian, C., Gao, S., Dong, H., Guan, D., Hu, X., Zhao, S., Li, L., Zhu, L., Yan, Q., Zhang, J., Zhang, C. Y., Zen, K., (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Research*, 20(10), 1128-1137. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.80>

Chi, X., Yang, Q., Chen, X., Wang, J., Pan, L., Chen, M., Yang, Z., He, Y., Liang, X., Yu, S. (2011). Identification and characterization of microRNAs from peanut (*Arachis hypogaea* L.) by high-throughput sequencing. *PloS One*, 6(11), e27530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027530>

Cieślik, M., Bryniarski, K., Nazimek, K. (2023). Dietary and orally-delivered miRNAs: are they functional and ready to modulate immunity?. *AIMS Allergy and Immunology*, 7(1), 104-131. <https://doi.org/10.3934/Allergy.2023008>

Croce, C. M., Calin, G. A. (2005). miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*, 122(1), 6-7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.036>

Cui, J., Zhou, B., Ross, S. A., Zemleni, J. (2017). Nutrition, microRNAs, and human health. *Advances in Nutrition*, 8(1), 105-112. <https://doi.org/10.3945/an.116.013839>

Cui, X., Zhang, S., Zhang, Q., Guo, X., Wu, C., Yao, M., Sun, D. (2020). Comprehensive MicroRNA expression profile of the mammary gland in lactating dairy cows with extremely different

milk protein and fat percentages. *Frontiers in Genetics*, 11, 548268.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.548268>

DeLucas, M., Sánchez, J., Palou, A., Serra, F. (2024). The Impact of Diet on miRNA Regulation and Its Implications for Health: A Systematic Review. *Nutrients*, 16(6), 770.
<https://doi.org/10.3390/nu16060770>

Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231-5.
<https://doi.org/10.1038/nature03049>

Desjardin, C., Vaiman, A., Mata, X., Legendre, R., Laubier, J., Kennedy, S. P., Laloe, D., Barrey, E., Jacques, C., Cribiu, E.P., Schibler, L. (2014). Next-generation sequencing identifies equine cartilage and subchondral bone miRNAs and suggests their involvement in osteochondrosis physiopathology. *BMC Genomics*, 15, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-798>

Do, D. N., Li, R., Dudemaine, P. L., Ibeagha-Awemu, E. M. (2017). MicroRNA roles in signalling during lactation: an insight from differential expression, time course and pathway analyses of deep sequence data. *Scientific Reports*, 7(1), 44605.
<https://doi.org/10.1038/srep44605>

Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R.J., Jain, R., Dean, N.M., Freier, S.M., Bennett, C.F., Lollo, B., Griffey, R. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52361-52365.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C400438200>

Fang, S., Deng, Y., Gu, P., Fan, X. (2015). MicroRNAs regulate bone development and regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8227-8253. <https://doi.org/10.3390/ijms16048227>

Fernández-Hernando, C., Suárez, Y., Rayner, K. J., Moore, K. J. (2011). MicroRNAs in lipid metabolism. *Current opinion in lipidology*, 22(2), 86. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283428d9d>

García-López, J., Brieño-Enríquez, M. A., Del Mazo, J. (2013). MicroRNA biogenesis and variability. *Biomolecular concepts*, 4(4), 367-380. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0015>

Ge, Y., Chen, J. (2011). MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle*, 10(3), 441-448. <https://doi.org/10.4161/cc.10.3.14710>

Golan-Gerstl, R., Elbaum Shiff, Y., Moshayoff, V., Schecter, D., Leshkowitz, D., Reif, S. (2017). Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(10), 1700009. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700009>

Gu, Z., Eleswarapu, S., Jiang, H. (2007). Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Letters*, 581(5), 981-988. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.081>

Hata, T., Murakami, K., Nakatani, H., Yamamoto, Y., Matsuda, T., Aoki, N. (2010). Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochemical and*

Biophysical Research Communications, 396(2), 528-533.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.135>

Howard, K. M., Jati Kusuma, R., Baier, S. R., Friemel, T., Markham, L., Vanamala, J., Zemleni, J. (2015). Loss of miRNAs during processing and storage of cow's (*Bos taurus*) milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 588-592.
<https://doi.org/10.1021/jf505526w>

Iqbal, A., Ping, J., Ali, S., Zhen, G., Juan, L., Kang, J. Z., Ziyi, P., Huixian, L., Zhihui, Z. (2020). Role of microRNAs in myogenesis and their effects on meat quality in pig—A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(12), 1873. <http://doi.org/> <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0324>

Jazbutyte, V., Thum, T. (2010). MicroRNA-21: from cancer to cardiovascular disease. *Current Drug Targets*. 11(8). 926-935.

Jin, W., Dodson, M. V., Moore, S. S., Basarab, J. A., Guan, L. L. (2010). Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Molecular Biology*, 11(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-29>

Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D., Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5). 635-647. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.014>

Kalarikkal, S. P., Sundaram, G. M. (2021). Inter-kingdom regulation of human transcriptome by dietary microRNAs: Emerging bioactives from edible plants to treat human

diseases?. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 723-734.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.032>

Khraiwesh, B., Zhu, J. K., Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137-148.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.05.001>

Kim, Y.-K., Yeo, J., Kim, B., Ha, M., Kim, V. N. (2012). Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells. *Molecular Cell*, 46(6). 893-895. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.036>

Komatsu, S., Ichikawa, D., Takeshita, H., Tsujiura, M., Morimura, R., Nagata, H., Kosuga, T., Litaka, D., Konishi, H., Shiozaki, A., Fujiwara, H., Okamoto, K., Otsuji, E. (2011). Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 105(1). 104-111. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.198>

Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., Ochiya, T. (2010). microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1(1). 1-8. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-7>

Kumarswamy, R., Volkmann, I., & Thum, T. (2011). Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biology*, 8(5). 706-713. <https://doi.org/10.4161/rna.8.5.16154>

Kuperman, D. A., Lewis, C. C., Woodruff, P. G., Rodriguez, M. W., Yang, Y. H., Dolganov, G. M., Fahy, J. V., Erle, D. J. (2005). Dissecting asthma using focused transgenic modeling and functional

genomics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(2). 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.03.024>

Lee, Y. S., Kim, H. K., Chung, S., Kim, K. S., Dutta, A. (2005). Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17). 16635-16641. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412247200>

Lei, B., Gao, S., Luo, L. F., Xia, X. Y., Jiang, S. W., Deng, C. Y., Xiong, Y.Z., Li, F. E. (2011). A SNP in the miR-27a gene is associated with litter size in pigs. *Molecular Biology Reports*, 38, 3725-3729. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0487-2>

Li, G. C., Cao, X. Y., Li, Y. N., Qiu, Y. Y., Li, Y. N., Liu, X. J., Sun, X. X. (2018). MicroRNA-374b inhibits cervical cancer cell proliferation and induces apoptosis through the p38/ERK signaling pathway by binding to JAM-2. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9). 7379-7390. <https://doi.org/10.1002/jcp.26574>

Li, Y., Yang, M., Lou, A., Yun, J., Ren, C., Li, X., Xia, G., Nam, K., Yoon, D., Jin, H., Seo, K., Jin, X. (2022). Integrated analysis of expression profiles with meat quality traits in cattle. *Scientific Reports*, 12(1), 5926. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09998-w>

Liu, G., Liu, R., Li, Q., Tang, X., Yu, M., Li, X., Cao, J., Zhao, S. (2013). Identification of microRNAs in wool follicles during anagen, catagen, and telogen phases in Tibetan sheep. *PloS One*, 8(10), e77801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077801>

Liu, L., Ren, W., Chen, K. (2017). MiR-34a promotes apoptosis and inhibits autophagy by targeting HMGB1 in acute myeloid leukemia cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(5). 1981-1992. <https://doi.org/10.1159/000475277>

Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A., & Zheng, C. C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Rna*, 14(5), 836-843. <http://doi:10.1261/rna.895308>

Lu, M., Zhang, Q., Deng, M., Miao, J., Guo, Y., Gao, W., Cui, Q. (2008). An analysis of human microRNA and disease associations. *PloS One*, 3(10). 1-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003420>

Lu, T. X., Munitz, A., Rothenberg, M. E. (2009). MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *The Journal of Immunology*, 182(8). 4994-5002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803560>

Lu, T. X., Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *Journal of allergy and clinical immunology*, 141(4), 1202-1207.

McManus, M. T. (2003). MicroRNAs and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 13(4). 253-258. [https://doi.org/10.1016/S1044-579X\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S1044-579X(03)00038-5)

Melkman-Zehavi, T., Oren, R., Kredo-Russo, S., Shapira, T., Mandelbaum, A. D., Rivkin, N., Dor, Y. (2011). miRNAs control insulin content in pancreatic β -cells via downregulation of transcriptional repressors. *The EMBO journal*, 30(5). 835-845. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.361>

Melnik, B. C., Schmitz, G. (2017). MicroRNAs: milk's epigenetic regulators. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31(4), 427-442. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.003>

Mishra, V., Kumar, P., Singh, J., Varshney, V., Shukla, P., Maurya, B. (2023). Dietary microRNAs (miRNAs) and their cutting-edge use in food science. *Food Science and Engineering*, 130-142. <https://doi.org/10.37256/fse.4120232245>

Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Abbott, A. L., Lau, N. C., Hellman, A. B., McGonagle, S. M., Bartel, D.P., Ambros, V.R., Horvitz, H. R. (2007). Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genetics*, 3(12), e215. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030215>

Moldovan, L., Batte, K. E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C. B., Piper, M. (2014). Methodological challenges in utilizing microRNAs as circulating biomarkers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(3). 371-390. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12236>

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3(9). 1-12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12(17), 1484-1495. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01017-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01017-5)

Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., Singha, R.K. S., Malakar, A. K., Chakraborty, S. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3). 2007-2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.25854>

Peng, S., Song, C., Li, H., Cao, X., Ma, Y., Wang, X., Huang, Y., Lan, X., Lei, C., Chaogetu, B., Chen, H. (2019). Circular RNA SNX29 sponges miR-744 to regulate proliferation and differentiation of myoblasts by activating the Wnt5a/Ca²⁺ signaling pathway. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 16, 481-493. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.03.009>

Plotnikova, O., Baranova, A., Skoblov, M. (2019). Comprehensive analysis of human microRNA-mRNA interactome. *Frontiers in Genetics*, 10(933).1-11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00933>

Qu, Y., Zhang, H., Sun, W., Han, Y., Li, S., Qu, Y., Ying, G., Ba, Y. (2018). Micro RNA-155 promotes gastric cancer growth and invasion by negatively regulating transforming growth factor- β receptor 2. *Cancer Science*, 109(3). 618-628. <https://doi.org/10.1111/cas.13472>

Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, 16(13), 1616-1626. <http://doi:10.1101/gad.1004402>

Reza, A. M. M. T., Choi, Y. J., Han, S. G., Song, H., Park, C., Hong, K., Kim, J. H. (2019). Roles of microRNAs in mammalian reproduction: from the commitment of germ cells to peri-implantation embryos. *Biological Reviews*, 94(2), 415-438. <https://doi.org/10.1111/brv.12459>

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14(10a), 1902-1910. <http://doi:10.1101/gr.2722704>

Romao, J. M., Jin, W., He, M., McAllister, T., Guan, L. L. (2012). Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet. *PLoS One*, 7(7), e40605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040605>

Roush, S., Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, 18(10), 505-516. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>

Rupaimoole, R., Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 203-222. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>

Sadkowski, T., Ciecierska, A., Oprządek, J., Balcerek, E. (2018). Breed-dependent microRNA expression in the primary culture of skeletal muscle cells subjected to myogenic differentiation. *BMC Genomics*, 19(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4492-5>

Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451-5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>

Schramedei, K., Mörbt, N., Pfeifer, G., Läuter, J., Rosolowski, M., Tömm, J., Bergen, M. V., Horn, F., Brocke-

Heidrich, K. (2011). MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene*, 30(26). 2975-2985. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.15>

Singh, B., Mal, G., Gautam, S. K., Mukesh, M., Singh, B., Mal, G., Mukesh, M. (2019). Big from Small: MicroRNA in Relation to Veterinary Sciences. *Advances in Animal Biotechnology*, 447-453. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1_41

Song, C., Yang, J., Jiang, R., Yang, Z., Li, H., Huang, Y., Lan, X., Lei, C., Ma, Y., Qi, X., Chen, H. (2019). miR-148a-3p regulates proliferation and apoptosis of bovine muscle cells by targeting KLF6. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 15742-15750. <https://doi.org/10.1002/jcp.28232>

Sousa, M. A. P. D., de Athayde, F. R. F., Maldonado, M. B. C., Lima, A. O. D., Fortes, M. R. S., Lopes, F. L. (2021). Single nucleotide polymorphisms affect miRNA target prediction in bovine. *Plos One*, 16(4), e0249406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249406>

Sun, J., Li, M., Li, Z., Xue, J., Lan, X., Zhang, C., Lei, C., Chen, H. (2013). Identification and profiling of conserved and novel microRNAs from Chinese Qinchuan bovine longissimus thoracis. *BMC Genomics*, 14(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-42>

Sun, J., Zhou, Y., Cai, H., Lan, X., Lei, C., Zhao, X., Zhang, C., Chen, H. (2014). Discovery of novel and differentially expressed microRNAs between fetal and adult backfat in cattle. *PloS One*, 9(2), e90244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090244>

Sunkar, R., Zhu, J. K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(8), 2001-2019. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022830>

Van Herwijnen, M. J., Driedonks, T. A., Snoek, B. L., Kroon, A. T., Kleinjan, M., Jorritsma, R., Pieterse, C.M.J., Nolte-'t Hoen, E.N.M., Wauben, M. H. (2018). Abundantly present miRNAs in milk-derived extracellular vesicles are conserved between mammals. *Frontiers in Nutrition*, 5(81), 1-6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00081>

Vrijens, K., Bollati, V., Nawrot, T. S. (2015). MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 123(5), 399-411. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408459>

Wagner, A. E., Piegholdt, S., Ferraro, M., Pallauf, K., Rimbach, G. (2015). Food derived microRNAs. *Food & function*. 6(3). 714-718. <https://doi.org/10.1039/C4FO01119H>

Wang, J., Bian, Y., Wang, Z., Li, D., Wang, C., Li, Q., Gao, X. (2014). MicroRNA-152 regulates DNA methyltransferase 1 and is involved in the development and lactation of mammary glands in dairy cows. *PLoS One*, 9(7), e101358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101358>

Wang, J., Hao, Z., Hu, J., Liu, X., Li, S., Wang, J., Shen, J., Song, Y., Ke, N., Luo, Y. (2021). Small RNA deep sequencing reveals the expressions of microRNAs in ovine mammary gland development at peak-lactation and during the non-lactating period. *Genomics*, 113(1). 637-646. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.060>

Wang, M., Moisés, S., Khan, M. J., Wang, J., Bu, D., Loo, J. J. (2012). MicroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6529-6535. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5748>

Wang, Y., Mei, C., Su, X., Wang, H., Yang, W., Zan, L. (2019). MEF2A regulates the MEG3-DIO3 miRNA mega cluster-targeted PP2A signaling in bovine skeletal myoblast differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2748. <https://doi.org/10.3390/ijms20112748>

Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D. J., Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733-1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>

Wenguan, Z., Jianghong, W., Jinqian, L., Yashizawa, M. (2007). A subset of skin-expressed microRNAs with possible roles in goat and sheep hair growth based on expression profiling of mammalian microRNAs. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 11(4), 385-396. <https://doi.org/10.1089/omi.2006.0031>

Williams, A. H., Liu, N., Van Rooij, E., Olson, E. N. (2009). MicroRNA control of muscle development and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(3), 461-469. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.029>

Xiao, G., Xia, C., Yang, J., Liu, J., Du, H., Kang, X., Lin, Y., Guan, R., Yan, P., Tang, S. (2014). MiR-133b regulates the expression of the Actin protein TAGLN2 during oocyte growth and maturation: a potential target for infertility therapy. *PloS One*, 9(6), e100751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100751>

Xu, P., Vernooy, S. Y., Guo, M., Hay, B. A. (2003). The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology*, 13(9), 790-795. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00250-1](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00250-1)

Yang, W. C., Guo, W. L., Zan, L. S., Wang, Y. N., Tang, K. Q. (2017). Bta-miR-130a regulates the biosynthesis of bovine milk fat by targeting peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal of Animal Science*, 95(7), 2898-2906. <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1504>

Yu, L., Li, W., Yang, P., Zhang, W., Tao, H., Ge, G., Yang, H., Bai, J., Wang, H., Geng, D. (2022). Osteoblastic microRNAs in skeletal diseases: biological functions and therapeutic implications. *Engineered Regeneration*, 3(3), 241-257. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.06.002>

Yu, S., Zhao, Z., Sun, L., Li, P. (2017). Fermentation results in quantitative changes in milk-derived exosomes and different effects on cell growth and survival. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(6), 1220-1228. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05002>

Zhang, L., Chen, T., Yin, Y., Zhang, C. Y., Zhang, Y. L. (2019). Dietary microRNA—a novel functional component of food. *Advances in Nutrition*, 10(4), 711-721. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy127>

Zhang, L., Stokes, N., Polak, L., Fuchs, E. (2011). Specific microRNAs are preferentially expressed by skin stem cells to balance self-renewal and early lineage commitment. *Cell Stem Cell*, 8(3), 294-308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.014>

Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., Chen, J., Wang, J., Wang, M., Zhang, Q., Zhang, C. Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*, 22(1), 107-126. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.158>

Zhang, M., Li, D. H., Li, F., Sun, J. W., Jiang, R. R., Li, Z. J., Han, R. L., Li, G. X., Liu, X. J., Kang, X.T., Sun, G.R. (2018). Integrated analysis of MiRNA and genes associated with meat quality reveals that Gga-MiR-140-5p affects intramuscular fat deposition in chickens. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(6), 2421-2433. <https://doi.org/10.1159/000489649>

Zhao, C. Z., Xia, H., Frazier, T. P., Yao, Y. Y., Bi, Y. P., Li, A. Q., Li, M. J., Li, C. S., Zhang, B. H., Wang, X. J. (2010). Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-3>

Zhao, W., Zhao, S.-P., Zhao, Y.-H. (2015). MicroRNA-143/-145 in cardiovascular diseases. *BioMed Research International*. 2015. 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/531740>

L, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X., Li, X. (2012). Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International Journal of Biological Sciences*. 8(1). 1-6. <https://doi.org/10.7150%2Fijbs.8.118>

BÖLÜM V

Biyoterapi Uygulaması: Tıbbi Sülük Tedavisi (Hirudoterapi)

Aykut ZEREK¹

1. Giriş

Biyoterapi, Uluslararası Biyoterapi Derneği tarafından canlı organizmaların tıbbi kullanımı şeklinde tanımlanan biyolojik temelli uygulamadır. Biyoterapi uygulamaları insanoğlunun hayatında geçmişten günümüze kadar geleneksel ve tamamlayıcı tıpta (GETAT) kullanılmaktadır. Bu uygulamalar zor ve zahmetli olsalar da, nispeten güvenli, çevre dostu, düşük teknolojiye sahip ve düşük maliyetli olmaları bakımından son derece etkili ve faydalıdır (Grassberger & ark., 2013). Türkiye’de GETAT yönetmeliği kapsamında uygulama merkezleri ve ünitelerde yalnızca sertifikalı

¹ Dr. Öğr. Üyesi Aykut ZEREK, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay/Türkiye, Orcid: 0000-0002-8533-387X, aykutzerek@mku.edu.tr

hekimlerce uygulanabilecek 15 adet biyoterapi uygulaması tanımlanmıştır. Bunlar; maggot terapi, apiterapi, hirudoterapi, fitoterapi, proloterapi, mezoterapi, müzik terapi, ozon terapisi, hipnoz, akupunktur, homeopati, osteopati, kupa tedavisi, kayropraktik tedavi ve refleksolojidir. Tıbbi sülük tedavisi olarak da bilinen hirudoterapi GETAT da iyi bilinen ve yaygın kullanılan bir biyoterapi uygulamasıdır (Batur Çağlayan, Ataoğlu & Kıbaroğlu, 2018). Bu derlemede, hirudoterapi, sülükler ve tıbbi sülük uygulaması hakkında bilgiler sunulmuştur.

2. Hirudoterapi

2. 1. Hirudoterapinin Tarihçesi

Hirudoterapi, tıbbi sülükler kullanılarak yapılan bir tedavi şeklidir. Tıp alanında eski çağlardan beri uygulanan sülük tedavisinin geçmişi taş devrine kadar uzanır. Yıllar geçtikçe sülüklerin kullanımı basit bir kan alma prosedüründen, rasyonel olarak tanımlanmış klinik uygulamalara sahip bilimsel temelli bir fizyolojik sürece dönüşmüştür. Yunan hekim Kolofonlu Nicander hirudoterapinin öncüsü kabul edilir (Grassberger & ark., 2013). İbni Sina'nın (Avicenna) 'El Kanun Fi't-Tıbb' adlı eserinde hirudoterapiden bahsedilmiştir (Singh, 2010). Sülükler için "Hirudo" ismini kullanan ilk Romalılar olsa da, 1758 yılında tedavi amaçlı kullanılan sülükleri "*Hirudo medicinalis*" olarak ilk defa adlandıran İsveçli doktor ve zoolog Linnaeus'tur. Kan almanın altın çağı olan Orta Çağ'da, sülükler doktorların birçoğu tarafından baş ağrısından hemoroide kadar her türlü hastalığın tedavisinde kullanılıyordu. Hirudoterapi 1800'lü yıllarda Avrupa'da özellikle de Fransa ve Rusya'da popüler hale gelerek çeşitli hastalıkların tedavisinde yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmış olup, her yıl

130 milyondan fazla sülüğün kullanıldığı varsayılmıştır. On dokuzuncu yüzyılın sonuna gelindiğinde, antibakteriyel tedavinin ortaya çıkmasıyla sülüklerin tıbbi kullanımı popülaritesini önemli ölçüde kaybetti. Yirminci yüzyılın ortalarına kadar bir zamanlar imparatorların doktorları ve önde gelen cerrahlar tarafından kullanılan hirudoterapi, çoğu ülkede tıbbi şarlatanlıkla ilişkilendirilmeye başlandı (Grassberger & ark., 2013). Benzer şekilde yirminci yüzyılın başlarında uzman olmayan kişiler tarafından sülüklerin tedavide kullanımı birçok komplikasyona neden olduğundan, sülük tedavisine olan ilgi gün geçtikçe azaldı (Whitaker & ark., 2004). Ancak bu süre zarfında sülüklerle ilgili bilimsel çalışmalar tamamen ortadan kalkmadı. Nitekim Haycraft tarafından 1884 yılında, sülük tükürük salgısında antikoagülan özellikte “Hirudin” adı verilen bir madde keşfedildi. Yirminci yüzyılın ikinci yarısına doğru, plastik cerrahlar tarafından özellikle rekonstrüktif cerrahide modern tedaviyi destekleyici bir metot olarak kullanılan hirudoterapi yeniden önem kazandı (Parlakpınar & Polat, 2021).

2. 2. Sülüklerin Genel Özellikleri

Annelida filumunda yer alan sülüklerin 15.000’den fazla türü bulunur. Sülükler çoğunlukla ılık göl ve akarsularda paraziter veya serbest yaşam süren, uzunlukları 8 mm ile 76 cm arasında değişkenlik gösteren solucanlardır. Ortalama ağırlıkları yaklaşık 2.5 gr. kadardır. Sülüklerin çoğu ektoparazit olup genellikle kan emerek beslenirler. Ancak bütün sülüklerin kan emme özelliği yoktur. Bazı sülük türleri omurgasızları, Annelida’ya ait diğer sınıfların bireylerini, salyangozları ve böcek larvalarını yerler. Kan emen türler ise, kabuklu su canlıları, salyangoz, kaplumbağa, kurbağa,

balık, omurgalı hayvanlar ve insanlarda ektoparazit olarak yaşarlar. İnsanları deri yağları, kan, ısı ve hatta solunum havasındaki karbondioksitten tespit ederler (Kaestner, 1967, Davies, 1991, Whitaker & ark., 2004, Singh, 2010).

Dorso-ventral yassılaşmış olan vücutları 34 segmentten oluşmuştur. Ön uçta yer alan ve sivri olan baş kısımları arka uca göre daha dardır. Üst dudak üzerinde bulunan gözlerinin fark edilmesi oldukça zordur. Uçların her ikisinde de birer adet vantuz bulunur. Birçok tabakadan oluşan üçgen şeklindeki ön vantuz vakum etkisi oluşturabilme özelliğine sahipken, arka vantuz konağa tutunmaya ve harekete yardımcı olur. Sivri, keskin ve küçük dişlerle donatılmış biri horizontal, ikisi lateral olmak üzere toplam üç çeneye sahiptirler. Çenelerin her birinde 100'e yakın toplamda da 300'e yakın diş bulunur. Sahip oldukları bu özellikleri sayesinde sülükler deri dâhil yumuşak dokuları ve mukoz membranları ısırabilirler (Fort, 2001, Dwivedi, 2012). Kan emme işlemi salgıladıkları histamin benzeri maddeler nedeniyle ağrılı değildir. Ayrıca tükürük salgıları anestezi içerdüğinden hastalar ısırığı da hissetmezler. Deriyi keskin olan dişleriyle ensize ettikten sonra salgılarındaki lokal anestezi, histamin benzeri vazodilatatörler, pıhtılaşmayı engelleyici maddeler, yayılma faktörleri, antibiyotikler gibi çeşitli mediatörleri bu bölgeye salarlar (Singh, 2010). Isırdıkları bölgede Mercedes Benz sembolünü andıran “Y” şeklinde yara izi oluştururlar ve 3-24 saat kanama meydana getirebilirler (Gödekmerdan & ark., 2011, Yakışan Maden, 2015). Her beslenmelerinde vücut ağırlıklarının yaklaşık 10 katı kadar miktarlarda kan emebilirler. Bu özellikleri sülüklerin bir defa kan emip beslendikten sonra yaklaşık iki yıldan fazla beslenmezse bile hayatta kalmalarına olanak sağlar (Küçük &

Yaman, 2019). Sülüklerde ağız, farinks, özefagus ve on çift kör keseden oluşan çift duvarlı sindirim tüpü mevcuttur. Sindirimleri için midelerinde yaşayan ve aralarında simbiyotik ilişki olan *Aeromonas biovar sobria veronii* isimli bakteri türüne ihtiyaç duyarlar (Michalsen, Roth & Dobos, 2011).

Sülükler hem erkek hem de dişi organlarına sahip hermafrodit canlılar olmakla birlikte kendi kendilerini dölleyemezler. Dölleme olayında genellikle 1 veya 2 sülük eş olarak kullanır. Yaklaşık olarak 15 ile 20 dakika süren bu olayda süre sonunda bu eyleme katılan bütün sülükler döllenebilir. Çiftleşme periyotlarının her biri 30 ile 40 gün sürer. Bu süre sonunda sülükler protein benzeri madde dolu koza ve yumurta yaparlar. Yaptıkları kozaları yaşam alanlarındaki kıyı kenarlarına gömerler ve 40 gün içinde kozanın ucundaki küçük bir delikten yavrular sürünerek çıkarlar (Dwivedi, 2012).

Özellikle ilk 2 yıl içerisinde oldukça yavaş gelişen sülükler, erişkin hale 5 ile 8 yıl arasında gelirler. Yaklaşık olarak 20 yıl kadar yaşayabilen sülükler yaşamlarının 3. veya 4. yıllarında medikal uygulamalarda kullanılabilirler de, doğal şartlar altında 5 yıldan önce medikal alanda kullanılabilecek büyüklüğe ulaşamazlar. Yapay ortamda ise medikal kullanım için gerekli olan ağırlığa (1.5-2 gram) 12 ile 36 ay arasında daha kısa süre zarfında ulaşabilirler. Ancak yapay ortamda yetişenlerin ömürleri genellikle ortalama 3-4 yıl kadar olup doğal şartlarda yetişenlere göre çok daha kısadır (Kutschera & Roth, 2006).

Poikiloterm canlılar olan sülükler yaşamlarını 0 ile 30 °C sıcaklık aralığında sürdürebilirler. Bulundukları ortamlardaki ani sıcaklık değişimleri ve sularda bulunan klor düşük seviyede olsa

dahi sülükleri öldürebilmektedir (Abdullah & ark., 2012). Sülükler kutup okyanuslarından çöllerdeki su kaynaklarına kadar dünyanın her tarafına yayılmışlardır. Bazı sülükler denizlerde yaşasalar da çoğunluğu yüzeyinde bitki bulunan ılıman havuz, göl ve hafif akan çayların kenarı gibi akuatik tatlı su ortamlarında yaşarlar (Barnes, 1974).

2. 3. Sülüklerin Sınıflandırılması ve Tıbbi Sülükler

Tıbbi sülükler, Annelida filumu, Clitellata sınıfı ve Hirudinea alt sınıfı içerisinde yer alırlar. Hirudinea alt sınıfında kara sülükleri, tatlı su ve deniz sülüklerini içeren yaklaşık 650'den fazla sülük türü bulunsa da, tedavi edici özelliğinden faydalanan yaklaşık 15 tür bulunmaktadır (Sağlam & ark., 2016). Tedavide kullanılan sülükler genellikle koyu kahverengi, koyu yeşil veya kırmızı-kahverenkli dirler. Sırt taraflarında kırmızı, açık kahverengi, yeşil ya da siyah renkli altı tane çizgi bulunur. Ancak çoğu zaman kırmızı ve sarı nokta halinde göründükleri için bu çizgileri tespit etmek zordur. Tıbbi sülüğün normalde yeşil olan yan tarafı sarı ya da yeşil gölge içerir. Siyah, gri veya kahverengi noktalar içeren karın kısmı ise koyu yeşil karışık renklidir. Tıbbi amaçla kullanılmayan sülüklerin ise tüylü, yuvarlak, kör uçlara sahip ve tek renkli olan vücutlarında çizgiler bulunmaz (Sivachandran & ark., 2015).

Tıbbi amaçla tedavide en fazla kullanılan sülük türleri *Hirudo* cinsinde yer alırlar. Bu soyda bulunan bütün türlerden tıbbi amaçla yararlanılabilse de, *Hirudo medicinalis* ve *Hirudo verbana* en yaygın kullanılan türlerdir. Ayrıca *Hirudo orientalis*, *Hirudo troctina*, *Hirudinaria manillensis* (Asya tıbbi sülüğü) ve *Macrobdella decora* (Kuzey Amerika tıbbi sülüğü) gibi diğer tıbbi sülük türleri de nadir olarak hirudoterapide kullanılmışlardır.

Günümüze kadar Türkiye’de tespit edilen ve tıbbi amaçlı kullanılan sülük türleri; *H. medicinalis*, *H. verbana* ve *Hirudo sulukii*’dir. *Limnatis nilotica* türü de Türkiye’de bulunmakla birlikte bu türün tıbbi kullanımı ile ilgili bilgi bulunmamaktadır (Sağlam & ark., 2016).

2. 3. 1. Türkiye’de Tıbbi Amaçla Kullanılan Sülük Türleri

2. 3. 1. 1. *Hirudo medicinalis*

Hirudo medicinalis tıbbi amaçla kullanılan sülükler arasında en iyi bilinen türdür. Bu tür halkalardan oluşan dorso-ventral basık bir vücuda sahiptir. Erişkin bireyleri maksimum uzamada 120 mm uzunluk ve 8-10 mm genişlik, maksimum kısaltmada ise 30-35 mm uzunluk ve 15-18 mm genişliğe ulaşabilirler. Dorsal yüzeyi genellikle zeytin yeşili-kahverengi renkte olup, kahverengimsi siyah noktalar ve her iki yan taraf boyunca uzanan iki noktalı kahverengi şeritlere sahiptir. Genellikle sarımsı-yeşil renkte olan ventral yüzey ise, siyah noktalar ve bir çift siyah düz kenar çizgiler bulundurur. Bu tür doğada hazirandan ağustos ayına kadar uzanan sürede yılda bir kez ürer (Lukin, 1976). Konaklarına anterior ve posterior kısımlarında bulunan çekmenler ile tutunurlar. Ağız boşluğu ve çenelerden oluşan anterior çekmenler tutunma ve beslenme için kullanılırken, daha büyük olan disk şeklindeki posterior çekmenler ise hareket etmede ve tutunmada görev alırlar (Lukin, 1976, Sawyer, 1986). Üç adet sert çeneye sahiptirler. Her çenede altmış ile yüz arasında değişen sayıda piramit şeklinde keskin dişlerini kullanarak deride karakteristik Y şeklinde bir ısırık bırakırlar. Her bir dişin yan tarafında salyanın deriye enjekte edilmesini sağlayan bir açıklık vardır (Orevi & ark., 2000). Deriyi delip salyalarını enjekte ettikten sonra kanla beslenmeye başlarlar ve yavaş yavaş hirudoterapinin

terapötik yararlarından sorumlu olan bir takım kimyasal maddeleri de serbest bırakırlar. Besleme işlemi yaklaşık olarak 30-40 dakika sürer, bu süre zarfında 10-15 ml kan emebilirler (Sawyer, 1986). Sindirim kanalındaki kan endoenzimler tarafından korunabilir. Böylelikle yaklaşık bir buçuk yıl boyunca beslenmeden hayatlarını devam ettirebilirler. Sindirim sisteminde bulunan *Aeromonas hydrophila* ve *Pseudomonas hirudinia* gibi endosimbiyotik bakteriler çok önemli sindirim enzimlerini tedarik ederek, kanın sindiriminde ve bozulmasının engellenmesinde görev alırlar. *Hirudo medicinalis*'in boşaltım sistemi idrarı salgılayan bir böbreğe benzer işleve sahip 17 çift olan nefridiadan oluşur. Ayırt edici bir solunum sistemi olmayıp doğrudan epidermis yoluyla solunum yapar. Sinir sistemi bir çift serebroid ganglion, segmental sinirler, duysal papilla, beş çift göz, birçok termo ve kemoreseptörden oluşur (Lagutenko, 1981). Termo ve kemoreseptörler bulunduğu ortamda uyarılara yönelmesine ve tepki vermesine yardımcı olurlar. Bu özellikleri sayesinde su titreşimine, dokunmaya, ışığa, ısıya, kurumaya, seslere ve bazı kimyasal maddelere karşı hassasiyet gösterirler (Grassberger & ark., 2013).

2. 3. 1. 2. *Hirudo verbana* ve *Hirudo sulukii*

Her iki sülük türünün de *H. medicinalis* türü gibi halkalardan oluşan dorso-ventral olarak yassılaştırmış bir vücudu vardır. *Hirudo verbana*'nın vücut uzunluğu 55,4-123 mm arasında değişkenlik gösterirken, genişliği 8,5-13,1 mm arasındadır. *Hirudo sulukii*'nin ise uzunluğu 27-117 mm, genişliği 3,7-12,0 mm'dir. *Hirudo verbana*'nın dorsal yüzeyi geniş ve dağınık paramedian turuncu çizgili, ventral yüzeyi bir çift siyah ventro-lateral çizgiyle sınırlanmış yeşilimsi sarı renktedir. *Hirudo sulukii*'nin zeytin

yeşilinden kahverengiye kadar değişen renkte olan dorsal yüzeyinde, birleşik elipsoid uzun lekeler ve bir çift zikzaklı siyah uzunlamasına çizgiler vardır. Yeşilimsi kahverengi renkte olan ventral yüzeyinde ise az sayıda düzensiz siyah benekler bulunur (Sağlam, 2019).

2. 4. Tıbbi Sülük Salgısında Bulunan Biyoaktif Maddeler

Sülüklerin tükürük salgılarında farklı moleküler kütlelere sahip 100'den fazla biyoaktif madde tespit edilmiş olsa da, bu maddelerden ancak bir kaç tanesinin aktif rolleri ortaya konulabilmiştir. Hirudoterapinin başlıca terapötik faydaları da tıbbi sülüklerin salgılarında bulunan bu biyoaktif maddeler tarafından gerçekleştirilir (Abdullah & ark., 2012, Küçük & Yaman, 2019).

Sülük ısırma işlemini gerçekleştirdikten sonra;

-hücre dışı matris yıkımı etki mekanizmasıyla bir emme yolu oluşturur,

-trombosit fonksiyonunun inhibisyonu ve antikoagülan etkileriyle adhezyon, agregasyon ve koagülasyonu inhibe eder,

-antimikrobiyal etki göstererek kendini korur ve kan akışını artırır,

-analjezik ve antienflamatuar etkiler göstererek de tespit edilmekten kaçınır.

Tıbbi sülük salgılarında bulunan bazı potansiyel biyoaktif maddeler ve etki mekanizmaları Tablo 1'de verilmiştir (Sig & ark., 2017).

Tablo 1. Tıbbi sülük salgılarında bulunan bazı potansiyel biyoaktif maddeler ve etki mekanizmaları

Maddeler	Etki mekanizması
Destabilase, chloromycetyn, theromacin, theromyzin ve peptide B	Antimikrobiyal etki
Hirudin, gelin, factor Xa inhibitor, destabilase, new leech protein-1, whitide ve whitmanin	Antikoagülan etki
Saratin, calin, apiraz, decorsin	Trombosit fonksiyon inhibisyonu
Asetilkolin, Histamin benzeri moleküller	Kan akımında artış
Hyaluronidaz ve kollajenaz	Hücre dışı matriks yıkımı
Antistasin, hirustasin, ghilantens, eglin C, LDTI*, complement C1 inhibitor guamerin ve piguamerin, karboksipeptidaz inhibitor, bdellins ve bdellastasin	Analjezik ve antienflamatuar etki
*LDTI: Leech-Derived Tryptase Inhibitor	

2. 5. Tıbbi Sülük Uygulaması (Hirudoterapi)

Tıbbi sülük kullanılmadan önce hastanın korkularını yatıştırmak için görüşme yapmak gereklidir. Sülük tedavisinin yararlı olduğu, bu amaçla kullanılacak sülüklerin zararlı olmadığı hastaya açıklanarak psikolojik olarak tedaviye hazır olması sağlanmalıdır (Michalsen, Roth & Dobos, 2011, Tanyuksel & Mumcuoğlu, 2017). Uygulama yapılacak hastanın hepatit, AIDS, anemi, diyabet ve pıhtılaşma bozukluğu (hemofili gibi) hastalıkları olup olmadığı mutlaka bilinerek gerekli tedbirler alınmalıdır. Tıbbi sülük uygulaması hakkında bilgi veren bir onam formu hastaya okutularak imzalatılmalıdır (Rahul & ark., 2014). İnvaziv bir işlem olduğu için tıbbi sülük uygulaması konu hakkında eğitim almış uzman sağlık personelleri tarafından yapılmalıdır. Uygulamada kullanılacak sülüklerin üretimi mutlaka kültür ortamında ve steril

şartlar altında olmalıdır. Uygulamanın yapılacağı ortamda hijyen kurallarına riayet edilmelidir. Sülük tedavisini yapacak uzman kişinin elleri temiz ve kuru olmalıdır. Ortamda sigara, parfüm, kolonya veya alkol gibi herhangi bir etkili koku olmamalı, hem uzman kişinin hem de hastanın kıyafetleri mümkün olduğunca kokusuz olmalıdır. Sülük uygulaması yapılacak bölge steril distile su ile iyice temizlenmeli, hastanın cildinin kuru ve ılık olmasına dikkat edilmelidir (Michalsen, Roth & Dobos, 2011, Işık & Aksoy, 2012, Rahul & ark., 2014, Tanyuksel & Mumcuoğlu, 2017).

Tedavide medikal amaçla kullanılabileceğine dair sertifikası olan sülükler kullanılmalıdır (Tanyuksel & Mumcuoğlu, 2017). Sülükler steril su bulunan cam kavanozlara bırakılmalıdır. Sülüklerin aktif bir şekilde hareket etmeleri için suya çok az miktarda zerdeçal serpilebilir (Rahul & ark., 2014). Sülük tedavisi günün herhangi bir saatinde yapılabilirse de, sülüklerin hastaya yapışmasında beslenme davranışlarını etkileyen hava koşulları tedaviyi etkileyebilir. Çok nemli havalar veya fırtına öncesi zamanlar sülüklerin beslenme eğilimlerini azaltarak hastaya yapışma ihtimalini azaltabilir. Böyle zamanlarda hastaya yapışmayı sağlamak büyük uğraş ve sabır gerektirebilir (Michalsen, Roth & Dobos, 2011).

Tedavi esnasında kullanılacak sülük sayısının belirlenmesi oldukça önemlidir. Standart olarak tedavi başına 2, 5, 7, 10, 12 hatta 15-20 adet sülük kullanılabilmektedir. Ancak sülük uygulamasında en iyi sonucun elde edilebilmesi için kaç adet sülük kullanılması gerektiğı bilgisi net değildir ve bu sayı için uluslararası bir standart belirlemek oldukça zordur. Çünkü hastaların yaş, cinsiyet, fiziksel durumları, genel güçleri, sülüklere karşı irritabilitesi gibi pek çok

faktör değişkenlik gösterebilmektedir. Bu nedenle her hastaya uygulanacak doğru sülük sayısını belirlemek, terapiyi yapan uzmanın bilgi ve deneyimine bağlıdır (Rahul & ark., 2014, Tanyuksel & Mumcuoğlu, 2017).

Boyun, çene ve koltuk altı, kasık gibi büyük arter ve venlerin bulunduğu yerlere, göz kapağı çevresi gibi yumuşak deri bölgeleri ve avuç içi, ayak tabanı gibi keratenize alanlara sülük uygulaması yapılmamalıdır. Ayrıca diş eti ve kadın doğum ile ilgili bazı hastalıklarda tedavi süresi boyunca hasta gözlenmelidir. Pratikte uygulaması kolay olmasa da sülükler belirginleşmiş veya palpe edilebilen damarların üzerine doğrudan bırakılmamalı, 1 cm uzağına travmatize edilmeden konulmaya çalışılmalıdır. Tedavide sülükler etkinliklerini direk etkilenen bölgenin üzerine konulduklarında gösterebilecekleri gibi etkilenen bölgeden uzak bir yerde de gösterebilirler. Sülüklerin asıl tedavi edici etkilerini tükürüklerindeki biyoaktif maddeler oluşturduğundan, etkilenen bölgeden uzak bir yere konulsalar bile etkilerini gösterebilmelerine olanak sağlar (Das, 2014, Tanyuksel & Mumcuoğlu, 2017). Sülük istenilen bölgeye ısırma dolayısıyla tutunma işlemini gerçekleştiremezse, bölge steril bir iğne veya lanset yardımıyla delinerek birkaç damla kan çıkartılarak ısırma işlemine yardımcı olunabilir. Tedavi esnasında sülük ısırma işlemini gerçekleştirmeyip sadece hastanın kanıyla temas etse dahi, başka bir hastada kullanılmamalı, kavanoza konarak imha edilmelidir (Michalsen, Roth & Dobos, 2011). Işıktan etkilenmemesi, tedavi bölgesinden başka bölgelere gitmemesi ve hastanın cildinin soğumaması için sülük steril gazlı bir bez veya pamuk ile kapatılabilir (Michalsen, Roth & Dobos, 2011, Tanyuksel & Mumcuoğlu, 2017).

Hastaya yapıştırıldığında bir sülük yaklaşık 5 ile 15 ml arasında kan emebilir. Normal şartlar altında 20 ile 60 dakika süren beslenme işlemi sonunda hastayı bırakır. Ancak ender durumlarda kanlanmanın bol olduğu bir bölgede 10 dakika gibi kısa bir sürede, olumsuz şartlar altında ise 2 saat süreyle beslenme işlemini gerçekleştirebilir. Beslenme işlemini tamamlayarak doyan sülük normalde kendiliğinden hastayı bırakır. Fakat bazen sülük doyduğu halde kendini hastadan bırakmadan hareketsiz bir şekilde kalabilir. Böyle durumlarda sülüğe hafifçe vurma veya sıkıştırma yoluyla uyarı verilip hastadan ayrılması sağlanabileceği gibi, sirke veya serum fizyolojik solüsyonu uygulaması ile de ayrılması sağlanabilir. Sülüğü güç kullanarak veya tuz gibi çeşitli maddelerle canını yakarak hastadan çıkarmaya çalışmak oldukça tehlikelidir. Çünkü böyle durumlarda sülük mide içeriğini yaranın içine kusabilir, bu durumda ciddi enfeksiyon gibi komplikasyonlara neden olabilir (Yantis, O'Toole & Ring, 2009, Michalsen, Roth & Dobos, 2011, Isaac, 2011, Tanyuksel & Mumcuoğlu, 2017).

Sülük hastadan ayrıldıktan sonra %70'lik alkol solüsyonuna veya tıbbi atık poşetlerine bırakılarak imha edilmelidir. Tedavide kullanılan sülük kan kaynaklı enfeksiyon riski nedeniyle başka bir kişide tedavi amacıyla kesinlikle kullanılmamalıdır. Sülük tedavisi tamamlandığında yara yerinde kanama 3-36 saate kadar devam edebilir. Kanamanın yanı sıra kaşıntı, morarma, ödem gibi semptomlarda görülebilir. Bu nedenle özellikle ayak ve bacak bölgesine sülük tedavisi yapılmış hastalara uzun süre ayakta kalmamaları belirtilmelidir. Ödem meydana geldiğinde bacaklarını yükselterek dinlenmeleri, kaşıntı olduğunda kaşınan bölgeyi kaşımadan soğuk kompres, sirkeli su veya limon uygulamalarını

yapmaları gerektiği anlatılmalıdır. Bunlar yapılmadığı zaman yara yerinde iz kalabileceği ve enfeksiyon gelişme ihtimalinin artacağı söylenmelidir. Gerekli olması durumunda antihistaminik tedavisine de başlanmalıdır. Tedavi sonrasında hastaya alkollü içecekler almaması, yoğun masaj aktivitelerinden uzak durması, yeterli miktarda sıvı tüketmesi ve 1 gün sonra duş alması gerektiği bildirilmelidir. Yara bölgesinde enfeksiyon neticesinde ağrı, akıntı, vücut ısısı ve nabız sayısında artma gibi semptomlar ortaya çıkarsa mutlaka doktora başvurması gerektiği hastaya belirtilmelidir (Düzgün, 2015, Ayhan & Mollahaliloğlu, 2018).

2. 5. 1. Endikasyonları

Geleneksel ve tamamlayıcı tıpta çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde destek amacıyla kullanılan tıbbi sülük uygulaması anestezi, antiinflamatuvar, vazodilatör, trombolitik ve antikoagülan etkilere sahiptir. Bu sebepten dolayı günümüzde birçok hastalıkta bu uygulamadan yararlanılmaktadır (Duruhan & ark., 2014). Türkiye’de tıbbi sülük uygulaması; uygulama merkezlerinde flep cerrahisi, replantasyon ve revaskülarizasyon sonrası görülen venöz yetmezliklerde, ünitelerde ise ağrıyı azaltmak amacıyla dejeneratif eklem hastalıkları, alt ekstremitte variköz ven hastalıklarında ve lateral epikondilit gibi hastalıklarda yapılabilmektedir (Ayhan & Mollahaliloğlu, 2018). Dünya’da farklı ülkelerde tıbbi sülük tedavisinin; kardiyovasküler komplikasyonlar, hemoroid, mide-bağırsak bozuklukları, dermatolojik hastalıklar, jinekolojik anormallikler, vücuttan kopmuş ekstremitelerin (el, ayak, parmak, kulak gibi) replantasyonu gibi travmatik durumlara kadar çok geniş bir kullanım alanı vardır. Ayrıca son zamanlarda diyabet, astım ve

kanser tedavisi gibi alanlarda tıbbi sülükler yeni yeni uygulanmaya başlanmıştır (Chhayani, Daxini & Patel, 2023).

2. 5. 2. Kontrendikasyonları

Tıbbi sülük uygulaması ile ilgili kontrendikasyonlar arasında; hemofili, hemorajik diyatez, hematolojik maligniteler, şiddetli anemi, şiddetli hipotansiyon, sepsis, HIV enfeksiyonu, hepatobiliyer hastalıkların dekompanse formları, kaşeksinin her türü ve sülüklere karşı bireysel hoşgörüsüzlük yer alır. Bunların dışında sülük tedavisinin önerilmediği koşullar ve hastalar şunlardır:

- hamilelik ve emzirme döneminde olanlar
- 10 yaşın altındaki çocuklar
- tıbbi durumu stabil olmayanlar
- sülük alerjisi öyküsü veya ciddi alerjik diyatezi olanlar
- keloid skar oluşumuna yatkınlığı olanlar
- ciddi arteriyel yetmezliği olanlar
- antikoagülan ve bağışıklık baskılayıcı ilaç tedavisi alanlar
- cerrahi girişimler (rekonstrüktif ve plastik cerrahi gibi) uygulandıktan sonra kan nakli almayı reddedenler (Grassberger & ark., 2013).

3. Sonuç

Tıp tarihine bakıldığında sülük tedavisine olan ilgi periyodik olarak artmış ve azalmıştır. Bununla birlikte, son 30-40 yıllık süreçte pek çok ülkede doktorlar ve hastalar arasında etkili bir tedavi

yöntemi olarak sülüklere olan ilginin yeniden canlandığı görülmektedir. Konvansiyonel tedaviye destek olarak birçok hastalıkta kullanılan sülük tedavisi modern tıbbın bazı alanlarında yeni bakış açıları kazandırabilir. Ancak sülük tedavisinin etkinliğini ve avantajlarını belirlemek için daha fazla deneysel ve karşılaştırmalı klinik araştırmalar yapılmalıdır. Her hastalık ve semptom için en etkili ve uygun sülük uygulama teknikleri araştırılmalıdır. Uzmanlara göre sülük salgısının bileşimi ve özellikleri hala tam olarak bilinmediğinden, sülük salgılarında yeni bileşikler bulmaya ve sentezlemeye çalışılmalıdır. Sülük salgısının aktif yeni bileşenlerinin tanımlanması sülük bazlı yeni ilaçlara ivme kazandırabilir. Ayrıca tıbbi amaçla kullanılan sülük türlerinin haricinde diğer hematofaj sülük türlerinin salgılarındaki aktif bileşikler üzerinde de araştırmalar yapılması gereklidir. Türkiye tıbbi sülük türleri açısından zengin bir kaynağa sahiptir. Bu kaynağın iyi değerlendirilmesi ve sülük tedavisinin modern tıp uygulamalarında tedaviye destek olarak daha etkin bir şekilde kullanılması oldukça önemlidir.

Kaynaklar

Grassberger, M. Sherman, R. A. Gileva, O. S. Kim, C. M. H. (2013). *Biotherapy—History, Principles and Practice*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. Doi: 10.1007/978-94-007-6585-6

Batur Çağlayan, H.Z., Ataoğlu, E.E., & Kibaroglu, S. (2018). Nörolojide geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarının etkinliğinin değerlendirilmesi. *Turk Noroloji Dergisi*, 24 (2), 111-116, Doi: [10.4274/tnd.83357](https://doi.org/10.4274/tnd.83357)

Singh A. P. (2010). Medicinal leech therapy (Hirudotherapy): A brief overview. *Complement Ther Clin Pract*, 16 (4), 213–215.

Whitaker, I. S. Rao, J. Izadi, D. Butler, P. E. (2004). Historical article: *Hirudo medicinalis*: Ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 42 (2), 133–137.

Parlakpınar, H. Polat, S. (2021). Hirudoterapi (tıbbi sülük uygulaması) tarihçesi. Parlakpınar H, (Ed.). *Hirudoterapi (Tıbbi Sülük Uygulaması)*, 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri. p.1-6.

Kaestner A. (1967). *Invertebrate Zoology, Interscience Publishers*. A Division of John Wiley and Sons, New York, London, Sydney.

Davies R. W. (1991). *Annelida: Leeches, Polychaetes, and Acanthobdellids*. Thorp JH and Covich AP, (Ed.). Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. San Diego: Academic Press Inc. p. 437-79.

Fort C. W. (2001). Leech Therapy: Current Uses for an Old Treatment. *Delaware Nurses Assocation (DNA) Reporter*, 26, 16-17.

Dwivedi A. P. (2012). Case study of leech application in diabetic foot ulcer. *IJRAP*, 3 (5), 748-751. Doi: 10.7897/2277-4343.03536

Gödekmerdan A. Arusan S. Bayar B. Sağlam N. (2011). Tıbbi Sülükler ve Hirudoterapi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 35, 234-239.

Yakışan Maden, R. Ş. (2015). Varis tedavisinde rutin tedaviler ile tıbbi sülük tedavisinin karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum.

Küçük M. Ö, Yaman O. (2019). Tıbbi Sülük Terapisi (Hirudoterapi). *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3, 29-46.

Michalsen A, Roth M, Dobos GJ. (2011). *Medicinal leech therapy*. Thieme, Stuttgart New York.

Kutschera U, Roth M. (2006). Cocoon deposition and cluster formation in populations of the leech *Hirudo verbana* (Hirudinae: Hirudinidae). *Lauterbornia*, 56, 5-8.

Abdullah S. Dar M. L, Rashid A. Tewari A. (2012). Hirudotherapy /Leech therapy: Applications and Indications in Surgery, *Archives of Clinical and Experimental Surgery*, 1, 172-180.

Barnes R. D. (1974). Invertebrate Zoology, W.B. Saunders Company, pp. 233316. Philadelphia, Washington.

Sağlam N. Saunders R. Lang S. A. Shain D. H. (2016). A new species of *Hirudo* (Annelida: Hirudinidae): historical biogeography of Eurasian medicinal leeches, *BMC Zoology*, 1:5, 1-12. Doi: 10.1186/s40850-016-0002-x

Sivachandran, P. Heera, R. Lalitha, P. Ravichandran, M. Sivadasan, S. Marimuthu, K. (2015). An overview of leech and its therapeutic applications. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3 (5), 405-413.

Lukin E. I. (1976). Leeches. In: Fauna USSR. Academy of Science of the USSR, Moscow.

Sawyer R. T. (1986). Leech Biology and Behaviour. Clarendon: Oxford

Orevi M, Eldor A, Giguzin Y, Rigbi M. (2000). Jaw anatomy of the blood-sucking leeches, *Hirudinea Limnatis nilotica* and *Hirudo medicinalis*, and its relationship to their feeding habits. *J Zool Lond*, 250, 121–127.

Lagutenko J. P. (1981). Structural organization of the trunk brain of annelids: evolutionary neuromorphological analysis. Nauka, Leningrad

Sağlam, N. (2019). Tıbbi Sülük Türleri *Hirudo sulukii* ve *Hirudo verbana*'nın İç ve Dış Morfolojik Özellikleri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 43 (4), 204-209.

Sig A. K, Guney M, Guclu A. U, Ozmen E. (2017). Medical leech therapy—an overall perspective. *Integr Med Res*, 6, 337–343.

Tanyuksel M, Mumcuoğlu K. Y. (2017). Multidisiplinler yaklaşımı Biyolojik Temelli Doğal Tedaviler-Biyoterapi. Meta Basım: İzmir, 283-309.

Rahul, S. Swarnasmita, P. Janhavi, D. Bhuvan, J. Shobhit, P. (2014). Hirudotherapy-a holistic natural healer, *IJOCR*, 2 (1), 60.

Işık M, Aksoy F. N. (2012). Tıbbi Sülük Tedavisi (Hirudoterapi) ve Hacamata. *Sağlık Düşüncesi ve Tıp Kültürü Dergisi*, 22, 80-83.

Das, B. K. (2014). An overview on hirudotherapy/leech therapy. *Ind Res J Pharm Sci*, 1 (1), 34.

Isaac M. (2011). Leech Therapy: an introduction to a natural healing alternative. *Bread Line Publishing*.

Yantis M. A, O'Toole N. K, Ring P. (2009). Leech Therapy, *Hirudo medicinalis* has made a comeback. *AJN*, 109 (4), 36-42.

Düzgün, Ö. (2015). Sülük Tedavisi: Ruhsal ve Fiziksel Hastalıklarda Geleneksel Tedavi, Mercan Kitap Yayınları.

Ayhan H, Mollahaliloğlu S. (2018). Tıbbi Sülük Tedavisi: Hirudoterapi. *Ankara Med J*, 18 (1), 141-148.

Duruhan S. Biçer B. Tuncay M. S. Uyar M. Güzel S. (2014). Travma ve Plastik Cerrahi Operasyonları Sonrası Sülük Uygulamaları. *Integr Tıp Derg.* 2 (2), 32-7.

Chhayani, K. Daxini, P. Patel, P. (2023). An Overview on Medicinal Leech Therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11, 107-113. Doi: 10.17265/2328-2150/2023.06.001

