

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GEN BANKASI MATERYALİNDE DONDURMA VE**  
**SAKLAMA KOŞULLARININ DNA TEMELLİ**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ VE YENİ MATERYAL**  
**EKLENMESİ**

**Aylin DEMİRAY**

**GENETİK ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Bengi ÇINAR**

**Bu araştırma Tarımsal Araştırmalar Politikalar Genel Müdürlüğü'nün**  
**TAGEM/HAYSÜD/E/23/A4/P3/5928 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA**  
**2025**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Gen Bankası Materyalinde Dondurma ve Saklama Koşullarının DNA Temelli Değerlendirilmesi ve Yeni Materyal Eklenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Aylin DEMİRAY

Tarih: 30/05/2025

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Genetik Anabilim Dalında  
Aylin DEMİRAY tarafından hazırlanan  
“Gen Bankası Materyalinde Dondurma ve Saklama Koşullarının DNA Temelli  
Değerlendirilmesi ve Yeni Materyal Eklenmesi” adlı  
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak OY  
BİRLİĞİ/ OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
.....Üniversitesi  
Jüri Başkanı

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
.....Üniversitesi  
Raportör

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
.....Üniversitesi  
Üye

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
.....Üniversitesi  
Üye

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
.....Üniversitesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza  
Unvan Adı ve Soyadı  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### Gen Bankası Materyalinde Dondurma ve Saklama Koşullarının DNA Temelli Değerlendirilmesi ve Yeni Materyal Eklenmesi

Bu çalışmada, yerli gen kaynaklarımızı korumak amacıyla başlatılan TÜRK-HAYGEN projesinin sürekliliğini sağlamak hedeflenmiştir. TÜRK-HAYGEN projesi tamamlandıktan sonra, 2012 yılında Gen Bankası, Uluslararası Hayvancılık Araştırma Enstitüsü bünyesinde kurulmuş ve doğal afetlere karşı önlem olarak TÜBİTAK MAM yerleşkesinde bir duplikasyonu oluşturulmuştur.

Projenin başlangıç hedeflerinden biri olan "yerli gen kaynaklarımızın korunması ve gerektiğinde gen bankasındaki materyal ile hayvan üretilmesi" hedefine yönelik çalışmalar ise henüz gerçekleştirilmemiştir. Bu proje kapsamında, gen bankasına yeni materyaller eklemenin yanı sıra, materyalin canlılık kontrollerine ek olarak laboratuvar koşullarında üretimini sağlamak hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, Gen Bankasında bulunan sığırlara ait toplam 60 adet total DNA izolatu ve 60 adet mezenşimal (fibroblast) hücre örneği kullanılmıştır. Genetik faktörlerin ve laboratuvar kaynaklı değişkenlerin etkisini en aza indirmek amacıyla, DNA örnekleri Yerli Kara (YK), Boz Irk, Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK), Güney Anadolu Kırmızısı (GAK), Yerli Güney Sarısı (YGS) ve Zavot sığır ırklarından, her birinden eşit sayıda (10'ar adet) hayvan seçilerek alınmıştır. Kontrol grubu oluşturmak amacıyla, aynı sığır ırklarından sahadan taze örnekler toplanmış ve bu örnekler, yukarıda belirtilen gruplarla paralel olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda, en fazla allel sayısı (20 allel) YK popülasyonunda TGLA122 marköründe tespit edilmiştir. En az allel sayısı ise (5 allel), DAK popülasyonunda ETH10 lokusunda gözlenmiştir. Markör düzeyinde değerlendirildiğinde ise, en yüksek allel sayısının TGLA122 (20 allel) ve en düşük allel sayısının ETH10 (5 allel) lokusunda olduğu belirlenmiştir.

Dondurulup saklanmış ve taze hazırlanmış örnek grupları arasında DNA hasarı açısından farklılık olup olmadığı incelenmiştir. Sperma gibi materyaller üzerinde yapılan çalışmalarda, kısa süreli dondurmanın veya dondurma işleminde kullanılan ajanların DNA hasarına yol açabileceği bilinmektedir. Ancak, bu tür çalışmaların gen bankasında saklanan örneklerde ne ölçüde geçerli olduğu henüz yeterince araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, materyal olarak hücre örnekleri kullanılmış ve 10 yıldan uzun süreli dondurmanın etkisi, Comet analizi ile değerlendirilmiştir. Comet analizi sonucunda, kuyruk yoğunluğu ırklara göre dondurulmuş gen bankası örneklerinden oluşan deney grupları arasında belirgin farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek kuyruk yoğunluğu ortalamaları sırasıyla BOZ (12,83), YGS (12,41), DAK (12,36), Zavot (11,29), GAK (11,76) ve YK (11,19) gruplarında tespit edilmiştir. Kontrol grubunda (dondurulmamış örnekler), kuyruk yoğunluğu ortalaması 5,63 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda kuyruk uzunluğu ortalaması ise 72,62 olarak ölçülmüştür. Deney grupları arasında en düşük ortalama değer GAK grubunda (42,87) gözlenirken, YK (62,46) ve YGS (57,64) gruplarında bu değer daha yüksek olduğu saptanmıştır. BOZ, DAK ve ZVT gruplarında ise ortalama kuyruk uzunluğu sırasıyla 50,71; 47,25 ve 44,92  $\mu$ m olarak belirlenmiştir. Kuyruk momenti değerleri açısından en yüksek ortalama DAK (3,41) ve YGS (3,44) gruplarında saptanmış olup, BOZ (3,18), YK (3,28), ZVT (3,02) ve GAK (2,90) gruplarında ise bu değerlerin benzer seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, sahadan toplanan örnekler, gen bankasına yeni materyal olarak eklenmiştir. Bunun yanı sıra, RT-qPCR yöntemi kullanılarak APEX1 geninin ifadesi incelenmiş ve elde edilen değerler analiz edilmiştir. APEX1 Gen ifadesi artması beklenirken APEX1 geninde 0,52 kat azalma ( $p < 0,05$ ) azaldığı tespit edilmiş olup sebepleri tartışılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Comet Analizi, DNA Hasarı, Gen Bankası, Mikrosatellit, Yerli Sığır Irkları

## SUMMARY

### DNA-Based Evaluation of Freezing and Storage Conditions in Gene Bank Material and Addition of New Material

In this study, the aim is to ensure the continuity of the TÜRK-HAYGEN project, which was initiated to protect our local genetic resources. After the completion of the TÜRK-HAYGEN project, the Gene Bank was established in 2012 within the International Livestock Research Institute, and a duplication was created at the TÜBİTAK MAM campus as a precaution against natural disasters.

One of the initial goals of the project, namely "the protection of our local genetic resources and the production of animals using materials from the gene bank when necessary," has not yet been achieved. Within the scope of this project, in addition to adding new materials to the gene bank, it is also aimed to ensure the viability of the materials and to produce them under laboratory conditions. For this purpose, a total of 60 total DNA isolates and 60 mesenchymal (fibroblast) cell samples obtained from cattle in the Genebank were used. To minimize the effects of genetic factors and laboratory-induced variations, DNA samples were collected from equal numbers (10 each) of animals belonging to the following cattle breeds: Yerli Kara (YK), Boz Irk, Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK), Güney Anadolu Kırmızısı (GAK), Yerli Güney Sarısı (YGS), and Zavot. To establish a control group, fresh samples were collected from the same cattle breeds in the field and included in the study in parallel with the aforementioned groups.

As a result of the analyses, the highest number of alleles (20 alleles) was detected at the TGLA122 marker in the YK population. The lowest number of alleles (5 alleles) was observed at the ETH10 locus in the DAK population. At the marker level, it was determined that the highest number of alleles was observed at the TGLA122 marker (20 alleles), while the lowest number of alleles was recorded at the ETH10 locus (5 alleles).

The differences in DNA damage between frozen-stored and freshly prepared sample groups were investigated. It is known that in materials such as sperm, short-term freezing or the agents used in the freezing process can lead to DNA damage. However, the extent to which such findings are applicable to samples stored in gene banks has not been sufficiently studied.

In this study, cell samples were used as the material, and the effect of long-term freezing (over 10 years) was evaluated using the Comet Assay analysis. As a result of the Comet Assay analysis, significant differences in tail intensity were observed among the experimental groups formed from frozen gene bank samples according to breed. The highest tail intensity averages were recorded as follows: BOZ (12.83), YGS (12.41), DAK (12.36), Zavot (11.29), GAK (11.76), and YK (11.19). In the control group (non-frozen samples), the average tail intensity was determined to be 5.63. The average tail length in the control group was measured as 72.62. Among the experimental groups, the lowest average value was observed in the GAK group (42.87), while higher values were recorded in the YK (62.46) and YGS (57.64) groups. In the BOZ, DAK, and ZVT groups, the average tail length was determined to be 50.71, 47.25, and 44.92  $\mu\text{m}$ , respectively. In terms of tail moment values, the highest averages were observed in the DAK (3.41) and YGS (3.44) groups, while similar levels were also detected in the BOZ (3.18), YK (3.28), ZVT (3.02), and GAK (2.90) groups. In addition, samples collected from the field were added as new materials to the gene bank. Furthermore, the expression of the APEX1 gene was examined using the RT-qPCR method, and the obtained values were analyzed. While an increase in APEX1 gene expression was expected, a 0.52-fold decrease ( $p<0.05$ ) was observed, and the possible reasons for this reduction have been discussed.

**Keywords:** Comet Assay, DNA Damage, Gene Bank, Indigenous Cattle Breeds, Microsatellite

## İÇİNDEKİLER

|                                                   |           |
|---------------------------------------------------|-----------|
| Etik Beyan                                        | ii        |
| Kabul ve Onay                                     | iii       |
| Özet                                              | iii       |
| Summary                                           | v         |
| Önsöz                                             | vii       |
| Simgeler ve Kısaltmalar                           | ix        |
| Şekiller                                          | xi        |
| İçindekiler                                       | vi        |
| Çizelgeler                                        | xiii      |
| <br>                                              |           |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                   | <b>1</b>  |
| 1.1. Gen Bankaları                                | 1         |
| 1.2. DNA Hasarı ve Hasar Tespit Yöntemleri        | 3         |
| 1.3. Çalışmada Kullanılan Yerli Sığır Irkları     | 8         |
| 1.4. Mikrosatellitlerin Önemi ve Çalışma Alanları | 11        |
| 1.5. Hücre Kültürü Yöntemleri                     | 12        |
| 1.6. Hücre Dondurma (Kryoprezervasyon) İşlemi     | 14        |
| <br>                                              |           |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                         | <b>19</b> |
| 2.1. Materyal                                     | 19        |
| 2.2. Kan Örneklerinin Alınması                    | 21        |
| 2.3. DNA Elde Edilmesi ve Fragment Analizleri     | 21        |
| 2.4. Kulak Dokusunun Elde Edilmesi                | 23        |
| 2.5. Kulak Dokusundan Hücre İzole Edilmesi        | 24        |
| 2.6. Hücre Örneklerinin Dondurulması              | 28        |
| 2.7. RNA Elde Edilmesi ve RT-qPCR Analizleri      | 31        |
| 2.7.1. Total RNA İzolasyonu                       | 31        |
| 2.7.2. cDNA Eldesi                                | 32        |
| 2.7.3. RT-qPCR Analizi                            | 33        |
| 2.8. Comet Analizleri ve Değerlendirmesi          | 36        |
| 2.9. İstatistiksel Analizler                      | 40        |
| <br>                                              |           |
| <b>3. BULGULAR</b>                                | <b>42</b> |
| 3.1. DNA İzolasyonu ve Fragment Analizleri        | 42        |
| 3.2. Primer Hücre Kültürü Bulguları               | 47        |
| 3.3. RNA Kalite ve Miktarları                     | 49        |
| 3.4. COMET Analizi Bulguları                      | 57        |
| 3.4.1. Kuyruk Yoğunluğu                           | 59        |
| 3.4.2. Kuyruk Uzunluğu                            | 61        |
| 3.4.3. Kuyruk Momenti                             | 62        |
| <br>                                              |           |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                | <b>64</b> |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                       | <b>77</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                  | <b>80</b> |
| <b>EKLER</b>                                      | <b>90</b> |
| Ek- 1. Etik Kurul                                 | 90        |
| Ek- 2. Çalışma İzni                               | 91        |
| Ek- 3. DNA Ölçüm ve Sulandırma Oranları           | 92        |

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada Evcil Hayvan Gen Kaynaklarımızdan sığır ırkları ile yapılan ve Gen Bankası materyalinin kullanıldığı ilk çalışma olması sebebiyle tasarlanmaya başladığı ilk günden itibaren beni heyecanlandırmıştır. Yerli Sığır Irklarımız ve Gen Bankası ülkemiz için iki önemli konuyu Genetik başlığı altında çalışmak olmaktan çok mutluyum.

Bu tez, uzun bir yolculuğun, bazen sabahlara kadar süren çalışmaların, bazen de sadece bir sayfa yazmak için geçirilen saatlerin sonunda ortaya çıktı. **‘Gen Bankası Materyalinde Dondurma ve Saklama Koşullarının DNA Temelli Değerlendirilmesi ve Yeni Materyal Eklenmesi’** başlıklı bu çalışmanın her satırında emeğim, sabrım ve zaman zaman da inatçılığım var.

Başta desteklerini esirgemeyen Enstitü eski Müdürümüz Dr. Engin ÜNAY ve Enstitü Müdürümüz Dr. Sezer ÖZ ve müdür yardımcımız Dr. İlker ÜNAL olmak üzere yardım ve emeklerini esirgemeyip bana destek olan mesai arkadaşlarım Ecem HATİPOĞLU GÜRSOY, Dr. Esin KELEŞ ARSLAN ve Dr. Halil Ozancan ARSLAN’a,

Bu çalışma proje olup hayata geçirilmesinde materyal izin ve gerekli maddi desteğin sağlanmasında TAGEM Genel Müdürümüz, Genel Müdür Yardımcıları ve Daire Başkanlarımıza,

Tez sürecimde değerli zamanını ayırarak beni laboratuvarına kabul ettiği ve yapıcı katkılarıyla çalışmama yön verdiği için Prof. Dr. Fatma ÜNAL hocama minnettarlığımı belirtmek isterim. Bilgi ve tecrübelerinizle tezimin gelişimine sağladığınız katkılar için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, değerli katkıları ve yapıcı eleştirileri ile çalışmamın gelişmesine katkı sağlayan saygıdeğer jüri üyeleri Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU, Prof. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN, Doç. Dr. Özge ÖZMEN ve Doç. Dr. Ece AVULOĞLU YILMAZ hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın projelendirilmesinden tezimin ortaya çıkışına kadar geçen tüm doktora sürecimde, sabrını, bilgisini ve fedakarlığını esirgmeden beni akademik anlamda yönlendiren, her sorumu sabırla dinleyen ve tez sürecimde bana rehberlik eden çok değerli danışmanım Doç. Dr. Bengi ÇINAR’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin çalışma sürecime kattığı değerli görüşleri ve her aşamada sağladığı destek sayesinde bu çalışmayı tamamlayabilme imkânı buldum. Akademik yolculuğumda yanımda olduğu için minnettarım.

Bu dönemde beni her halimle kabul edip her türlü destek olan canım dostlarımı Özlem&Ozan AHLAT, Feryal AYDIN, Mustafa Yenil AKKURT, Zeynep BARS YILDIRIM, Dr. Şebnem Özge ÇILDIR ve Dr. Sevim ISPARTA'ya sonsuz teşekkürler,

Laboratuvar ve saha çalışmalarım süresince bana verdikleri destek, sabır ve özverili katkılarıyla sürecin her aşamasında yanımda olan değerli araştırmacı arkadaşlarım Ahmet AKÇAY, Yasin ERGİDEN, Buse Naz, Yağmur, Derya, Sevcin, Sertaç, Uğur ve Burak'a en içten teşekkürlerimi sunmak isterim. Yoğun çalışma temposu içinde gösterdikleri iş birliği, bilimsel merakları ve çözüm odaklı yaklaşımları, bu çalışmaların başarıyla yürütülmesinde büyük rol oynamıştır. İyi ki varsınız, iyi ki bu yolu birlikte yürüdük.

Beni hayatımın her noktasında olduğu gibi doktora sürecimde de destekleyen annem babam ve kardeşim Yasemin-Aydoğan-Mert AYDOĞDU'ya,

Bu çalışmanın her aşamasında gösterdikleri anlayış, destek ve sabır ile bana güç veren aileme ve sevgili eşim Demokan DEMİRAY'a ayrıca teşekkür etmek istiyorum. En zor anlarımda yanımda oldun, beni sabırla dinledin, motive ettin ve bu yolculukta tek bir an bile yalnız hissetmeme izin vermedin. Varlığın, desteğın ve sevgiliyle kurduğumuz bu hayat bana güç verdi. Bu tez, bir anlamda senin de emeğini taşıyor. İyi ki hayatı seninle paylaşıyorum. Sonsuz Teşekkürler.

Bazen bir kahveyle, bazen bir teselli mesajıyla yanımda olduklarını hissettiren dostlarımın yeri çok ayrı. Onlara tek tek teşekkür etsem sayfalar yetmez. Ama onlar kendilerini biliyor. Ailem... Onların sonsuz desteği, sevgisi ve duaları olmasaydı bu yol bu kadar dayanılır olmazdı. İyi ki varsınız.

Bu tez sadece bir akademik çalışma değil, aynı zamanda benim kişisel bir mücadelem, büyüme hikayem. Zorlandım, pes etmeyi düşündüm, sonra yeniden başladım. O yüzden bu tezin bende ki yeri çok başka.

Çalışmamın bilim dünyasına katkı sağlamasını umuyor, emeği geçen herkese minnettarlığımı ifade ediyorum.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|       |                                          |
|-------|------------------------------------------|
| AKA   | Alkali Kararsız Alanlar                  |
| APEX1 | Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1     |
| BER   | Baz Eksizyon Onarımı                     |
| cDNA  | Komplementer DNA                         |
| °C    | Santigrad derece                         |
| Conc  | Konsantrasyon                            |
| Ct    | Cycle Threshold                          |
| ÇZK   | Çift Zincir Kırılmaları                  |
| DAK   | Doğu Anadolu Kırmızısı                   |
| dk    | Dakika                                   |
| DMEM  | Dulbecco's Modified Eagle Medium         |
| DMSO  | Dimetil Sülfoksit                        |
| DNA   | Deoksiribonükleik Asit                   |
| EtBr  | Ethidium Bromür                          |
| FCM   | Flow Cytometry                           |
| FIS   | Akrabalı Yetiştirme Katsayısı            |
| FITC  | Floresan Filtre                          |
| GAK   | Güney Anadolu Kırmızısı                  |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase |
| GLUT1 | Glukoz Taşıyıcı                          |
| GUSB  | Beta-Glucuronidase                       |
| He    | Beklenen Heterozigotluk                  |
| HMA   | High Melting Agar                        |
| Ho    | Gözlenen Heterozigotluk                  |
| IRC   | Inter Run Calibrator                     |
| LMA   | Low Melting Agar                         |
| µl    | Mikrolitre                               |
| µm    | Mikrometre                               |
| MAM   | Marmara Araştırma Merkezi                |
| MMR   | Uyumsuzluk Onarımı                       |
| miRNA | MikroRNA                                 |
| ml    | Mililitre                                |
| Na    | Allel Sayısı                             |
| Ne    | Etkili Allel Sayısı                      |
| NER   | Nükleotid Eksizyon Onarımı               |

|           |                                                         |
|-----------|---------------------------------------------------------|
| nm        | Nanometre                                               |
| NMA       | Normal Melting Point Agarose                            |
| ODTÜ      | Orta Doğu Teknik Üniversitesi                           |
| OPS       | Open Pulled Straw                                       |
| PBS       | Phosphate-Buffered Saline                               |
| Pen-Strep | Penisilin Streptomisin                                  |
| PIC       | Polimorfizm Bilgi İçeriği                               |
| PCR       | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                             |
| PI        | Propidiyum İyodür                                       |
| RQ        | Relative Quantification                                 |
| RT-PCR    | Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu              |
| RT-qPCR   | Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu   |
| RNA       | Ribonükleik asit                                        |
| TSC2      | Tuberous sclerosis complex 2                            |
| TUBİTAK   | Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu         |
| TZK       | Tek Zincir Kopmaları-Kırılmaları                        |
| UHAEM     | Uluslararası Hayvancılık ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü |
| YGS       | Yerli Güney Sarısı                                      |
| YK        | Yerli Kara                                              |
| ZVT       | Zavot                                                   |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1.</b> Yerli Kara sığır ırkından erkek ve dişi                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 8  |
| <b>Şekil 1.2.</b> Yerli Güney Sarısı sığır ırkından erkek ve dişi                                                                                                                                                                                                                                                                         | 9  |
| <b>Şekil 1.3.</b> Doğu Anadolu Kırmızısı sığır ırkından erkek ve dişi                                                                                                                                                                                                                                                                     | 9  |
| <b>Şekil 1.4.</b> Zavot sığır ırkından erkek ve dişi                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 10 |
| <b>Şekil 1.5.</b> Boz ırkından erkek ve dişi                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 10 |
| <b>Şekil 1.6.</b> Güney Anadolu Kırmızısı sığır ırkından erkek ve dişi                                                                                                                                                                                                                                                                    | 11 |
| <b>Şekil 2.1.</b> Gen Bankası DNA örneklerinin -80 °C’de saklandığı kutular                                                                                                                                                                                                                                                               | 20 |
| <b>Şekil 2.2.</b> Kulak dokusu elde etmek için kullanılan 5mm steril medikal punch (solda) ve Yerli Kara sığırında kulak dokusundan punch yardımı ile örnek alım aşaması (sağda)                                                                                                                                                          | 24 |
| <b>Şekil 2.3.</b> Hücre Kültürü çalışmaları (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Laboratuvarı)                                                                                                                                                                                                             | 25 |
| <b>Şekil 2.4.</b> Falkon tüpte laboratuvara getirilen dokular petriye alındıktan sonra (solda). Dokular bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılıp enzim ile yüzeyi kaplandıktan sonra (ortada). Hücre kazıyıcı yardımı ile hücrelerin flasktan kaldırılması (sağda)                                                                      | 28 |
| <b>Şekil 2.5.</b> Mr. Frosty dondurma kabı                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 29 |
| <b>Şekil 2.6.</b> Hücre Kültürü iş akış şeması                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 30 |
| <b>Şekil 2.7.</b> Göreceli gen ifadesi farklılıklarının belirlenmesinde kullanılan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü                                                                                                                                                                                                                         | 35 |
| <b>Şekil 2.8.</b> RT-qPCR 96 well plaka tasarımı                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 36 |
| <b>Şekil 2.9.</b> Comet analizi Sonucu tek hücrede DNA hasar tespiti                                                                                                                                                                                                                                                                      | 37 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Gen Bankası örneklerinde bir Yerli Kara DNA’sına ait mikrosatellit allel görüntüleri                                                                                                                                                                                                                                    | 42 |
| <b>Şekil 3.2.</b> Ne’nin Da Dendogramında ırkların genetik mesafesi (filogenetik ağaç)                                                                                                                                                                                                                                                    | 46 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Petride kollajenaz enzimi ile 20 saat sonra kulak dokusundan hücrelerin ayrılması (Scale 0-50µm). Solda dokuya yakın yerlerdeki hücreler, sağda ise petrinin herhangi bir yerinden alınan hücre görüntüleri                                                                                                             | 47 |
| <b>Şekil 3.4.</b> 2. Gün Hücreler 25cm <sup>2</sup> ’lik flaska alındığında mikroskop görüntüsü (A), Aynı gün besiyeri eklendikten sonra mikroskop görüntüsü (B), 3. gün mikroskop görüntüsü (C), 4. gün besiyeri eklendikten sonra mikroskop görüntüsü (D), 5. gün mikroskop görüntüsü (E) 7. gün mikroskop görüntüsü (F) %60 konfluensi | 47 |
| <b>Şekil 3.5.</b> Sığır kulak dokusundan izole edilen fibroblast hücrelerin 500µm (Solda) 50µm’yi (Sağda) temsil eden ölçü çizgisinde görüntüsü                                                                                                                                                                                           | 48 |
| <b>Şekil 3.6.</b> Sığır kulak dokusundan izole edilen fibroblast hücrelerin canlılık oranları ve otomatik sayım görüntüsü                                                                                                                                                                                                                 | 48 |
| <b>Şekil 3.6.</b> Gen Bankasında bulunan Boz sığır ırkı hücre örneklerinde RT-qPCR yükseltgenme pik görüntüleri; APEX1 mor, GAPDH turuncu ve GUSB yeşil renkle gösterilmiştir                                                                                                                                                             | 52 |
| <b>Şekil 3.7.</b> Gen Bankasında bulunan Boz sığır ırkı hücre örneklerinde RT-qPCR erime eğrileri; APEX1 mor, GAPDH turuncu ve GUSB yeşil renkle gösterilmiştir                                                                                                                                                                           | 52 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.8.</b> Gen Bankasında bulunan Boz sığır ırkı hücre örneklerinde RT-qPCR erime pikleri; APEX1 mor, GAPDH turuncu ve GUSB yeşil renkle gösterilmiştir                                                                                                         | 53 |
| <b>Şekil 3.9.</b> RT-qPCR analizinde seçilen GAPDH ve GUSB housekeeping genlerinin geometrik ortalama isabet tablosu (RefFinder)                                                                                                                                       | 53 |
| <b>Şekil 3.10.</b> Gen bankasında farklı ırklara ait dondurulmuş hücre materyalinde RT-qPCR analizinden elde edilen DeltaCT ortalamaları plot görseli                                                                                                                  | 54 |
| <b>Şekil 3.11.</b> Hücre materyalinde RT-qPCR analizinde kontrol ve deney grubu APEX1 Geni için DeltaCT değerleri                                                                                                                                                      | 55 |
| <b>Şekil 3.12.</b> RT-qPCR analizinde ırklar arası kat değişimi dağılımı (Kruskal-Wallis Test p-value = 0,0328)                                                                                                                                                        | 56 |
| <b>Şekil 3.13.</b> Hücre materyalinde RT-qPCR analizinde dondurulmamış ve gen bankası hücre örneklerinde APEX1 Geni için kat değişimi değerleri                                                                                                                        | 57 |
| <b>Şekil 3.14.</b> Alkali Comet Analizi ile görüntülenen DNase I ile muamele edilmiş sığır kulak fibroblast hücresi. Kuyruk yapısının yoğunluğu ve uzunluğu, enzim kaynaklı yüksek düzeyde DNA hasarını göstermektedir. Bu hücre pozitif kontrol olarak kullanılmıştır | 57 |
| <b>Şekil 3.15.</b> Solda Gen Bankası -80°C’de saklanan Boz Irka ait hücre örneğinde Comet görüntüsü. Sağda Yerli Kara Sığır kulak dokusundan elde edilen hücrede DNase ile muamele sonucu pozitif kontolde Comet kuyruk görüntüsü(40X)- Ghost Comet Görüntüsü          | 58 |
| <b>Şekil 3.16.</b> Yerli Kara Sığır kulak dokusundan elde edilen hücrelerde hasarsız Comet görüntüsü (40X)                                                                                                                                                             | 58 |
| <b>Şekil 3.17.</b> Irklar arasında comet kuyruk yoğunluğu                                                                                                                                                                                                              | 60 |

## ÇİZELGELER

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1.</b> Gen Bankasında dondurularak saklanan YK, Boz Irk ve GAK, DAK, YGS ve ZVT örneklerinin bulunduğu yer ve sayıları                                                                                                                                                                                                                           | 3  |
| <b>Çizelge 2.1.</b> Çalışmada kullanılan materyal ve sayıları                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 19 |
| <b>Çizelge 2.2.</b> Sığır örneklerinin genotiplenmesi için kullanılan mikrosatellit bölgelere ait bilgiler                                                                                                                                                                                                                                                    | 22 |
| <b>Çizelge 2.3.</b> Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 22 |
| <b>Çizelge 2.4.</b> Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 22 |
| <b>Çizelge 2.5.</b> Genomik DNA uzaklaştırmak için kurulan reaksiyon protokolü                                                                                                                                                                                                                                                                                | 33 |
| <b>Çizelge 2.6.</b> Reverse transkripsiyon reaksiyon bileşenleri                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 33 |
| <b>Çizelge 2.7.</b> RT-qPCR’da çalışılan gen bölgelerine ait bilgiler                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 34 |
| <b>Çizelge 2.8.</b> Syber Green ile RT-qPCR protokolü                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 34 |
| <b>Çizelge 2.9.</b> RT-qPCR reaksiyon koşulları                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 34 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Popülasyonlarda ırklara göre gözlenen allel sayıları                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 43 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Bütün popülasyonda çalışılan mikrosatellit lokuslar bakımından gözlenen allel sayısı (Na), etkili allel sayısı (Ne), gözlenen heterozigotluk (Ho), beklenen heterozigotluk (He), polimorfizm bilgi içeriği (PIC) ve akrabalı yetiştirme katsayısı (FIS). Koyu renkle belirtilen değerler en yüksek ve en düşük değerleri ifade etmektedir | 44 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> Irklara göre 11 lokusun p değerleri (Kesin P-değerlerinin Markov zinciri yöntemiyle hesaplanması)                                                                                                                                                                                                                                         | 45 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> Zavot Sığırlarında Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları                                                                                                                                                                                                                     | 49 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> Yerli Kara Sığırırkı Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları                                                                                                                                                                                                                   | 49 |
| <b>Çizelge 3.6.</b> Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) Sığırları Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları                                                                                                                                                                                                 | 50 |
| <b>Çizelge 3.7.</b> Yerli Güney Sarısı (YGS) Sığırları Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları                                                                                                                                                                                                     | 50 |
| <b>Çizelge 3.8.</b> Boz Irk Sığırları Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları                                                                                                                                                                                                                      | 50 |
| <b>Çizelge 3.9.</b> Güney Anadolu Kırmızısı (GAK) Sığırları Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları                                                                                                                                                                                                | 51 |
| <b>Çizelge 3.10.</b> Yerli Kara Sığırlarında sahadan toplanan kulak dokusundan elde edilen hücre örneklerinden RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları                                                                                                                                                                                         | 51 |
| <b>Çizelge 3.11.</b> Hücre materyalinde RT-qPCR analizinde DeltaCT kontrol ve deney grubu ortalamaları, SPSS analizleri                                                                                                                                                                                                                                       | 55 |
| <b>Çizelge 3.12.</b> Hücre örneklerinde Comet Analizinde Irklara Göre Kuyruk Yoğunluğu (SPSS-Anova Testi)                                                                                                                                                                                                                                                     | 59 |
| <b>Çizelge 3.13.</b> Farklı ırklara ait hücre örneklerinde Comet analizinde Dunnet t-testi ortalama kuyruk yoğunluğu                                                                                                                                                                                                                                          | 61 |

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 3.14.</b> Hücre örneklerinde Comet Analizinde Irklara Göre Kuyruk Uzunluğu (Tanımlayıcı İstatistik-SPSS) | 61 |
| <b>Çizelge 3.15.</b> Hücre örneklerinde Comet Analizinde Kuyruk Uzunluğuna ilişkin Dunnet t-testi                   | 62 |
| <b>Çizelge 3.16.</b> Hücre örneklerinde Comet Analizinde Irklara Göre Kuyruk Momenti (Tanımlayıcı İstatistik-SPSS)  | 63 |
| <b>Çizelge 3.17.</b> Hücre örneklerinde Comet Analizinde Dunnet t-testi Kuyruk Momenti                              | 63 |



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Gen Bankaları

Son yıllarda, değişen pazar dinamikleri ve tarımsal üretimde yaşanan yoğunlaşmanın etkisiyle çiftlik hayvanlarında genetik çeşitlilik önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, tek bir türün kaybı dahi ekosistem işleyişinde olumsuz sonuçlar doğurabileceğinden, çiftlik hayvanlarının genetik kaynaklarının ve biyolojik çeşitliliğinin korunması uluslararası düzeyde kritik bir öncelik haline gelmiştir (Diaz vd., 2019; FAO, 2015). Genetik erozyona yönelik farkındalığın artışı, küresel ölçekte çiftlik hayvanı ırklarının korunmasına yönelik girişimlerin ivme kazanmasına zemin hazırlamıştır. Bu doğrultuda, koruma çalışmalarının temel hedefi, genetik çeşitliliği oluşturan gen kombinasyonlarının gelecekte kullanılabilir biçimde muhafaza edilmesidir. Bu amacı gerçekleştirmek üzere iki ana koruma stratejisi öne çıkmaktadır: in situ ve ex situ yöntemler. In situ koruma, hayvanların doğal yaşam alanlarında, yerel çevre koşullarında yaşatılarak genetik çeşitliliğin korunmasını amaçlamaktadır. Ex situ in vivo koruma, hayvanların doğal yaşam alanları dışında; parklar, hayvanat bahçeleri, araştırma çiftlikleri veya özel muhafaza merkezlerinde canlı olarak yaşatılması esasına dayanırken; ex situ in vitro koruma ise genetik materyalin diploid (embriyo) hücre, haploid (sperm ve oosit) veya DNA dizisi biçiminde saklanması ifade etmektedir. Günümüzde, çiftlik hayvanlarının korunmasına yönelik en yaygın uygulamalardan biri olarak ex situ in vitro stratejisinin ön plana çıktığı bildirilmektedir (Mara vd., 2013; White vd., 2025).

Öte yandan iklim değişikliğine, hayvan hastalıklarına, yem maddelerinin değişen durumuna, sosyal değişikliklere, seçim hatalarına ve öngörülemeyen felaket olaylarına karşı sigorta sağlaması açısından genetik çeşitliliğin korunması önemlidir (Skuterud vd., 2005).

Dondurarak saklama yöntemi ile genetik materyalin saklanması yeni bir yöntem değildir ancak son yıllarda hem dondurulan hayvan çeşidi hem de materyal çeşitliliği artırılmıştır. 1950'li yıllarda boğa sperması uygun yöntemlerle dondurularak saklanmaya başlanmış olup, günümüzde ise boğa dışında koyun, keçi, at, domuz gibi ırkların hücre, sperma, DNA, embriyo gibi materyalleri dondurularak saklanabilmektedir (Amstislavskii ve Trukshin, 2010).

Bir gen bankasının yaygın amacı, bir doğal afet sonucunda ırkların kaybolması durumunda ırkları veya üreme hatlarını yeniden canlandırma imkanı sağlamasıdır. Fakat en

büyük dezavantajı maliyetli olması ve uzman kişiler tarafından organize edilerek hazırlanması gerektiğidir. Bunun yanı sıra küçük popülasyonlarda akrabalı yetiştirme ve genetik sürüklünme gibi olumsuz durumları ortadan kaldırmak için dondurularak saklanan sperma ve embriyo gibi materyalleri önemli bir araç olarak kullanmak mümkündür (Mara vd., 2013).

Türkiye'de evcil hayvan genetik kaynaklarının korunmasına yönelik ilk büyük ölçekli girişimlerden biri, TÜRKHAYGEN-1 kısa adıyla bilinen “Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının In Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-1” adlı projedir. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yürütülen ve TÜBİTAK’ın KAMAG programı kapsamında (2007-2012, Proje No: 106G005) desteklenen bu çalışma, çok paydaşlı yapısıyla dikkat çekmektedir. Proje, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) koordinatörlüğünde yürütülmüş; Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü ile Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü’nün yanı sıra on farklı üniversitenin katkısıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamlı iş birliği çerçevesinde, risk altındaki bazı yerli ırkların genetik materyali (DNA, hücre, doku, embriyo ve sperma) saklanarak hem DNA hem de hücre bankaları oluşturulmuştur. Aynı zamanda, bu ırkların ön genetik tanımlamalarına yönelik analizler yapılmış ve hayvan genetiği ile biyoteknolojisi alanında yeni teknolojilerin ülkemize kazandırılması hedeflenmiştir. Oluşturulan biyobankalar, hem genetik araştırmalara temel oluşturacak birer referans kaynağı hem de gelecekte yeni bireylerin üretimi açısından önemli bir biyolojik güvence niteliğindedir. Proje çıktıları, sadece klasik dondurma teknikleriyle sınırlı kalmamış; aynı zamanda gelişen yardımcı üreme teknolojileriyle (örneğin, in vitro fertilizasyon) ve klonlama teknikleriyle de entegre edilmiştir. Örneğin, Boz sığır ırkından elde edilen somatik hücreler kullanılarak, İstanbul ve Uludağ Üniversiteleri iş birliğinde klon bireyler başarıyla üretilmiştir. Farklı hücre kaynaklarından türetilen erkek ve dişi buzağların sağlıklı bir şekilde doğması, bu tür genetik koruma stratejilerinin pratikte de uygulanabilirliğini göstermektedir (Arat vd., 2011).

Gen bankaları hem hayvanlarda hem bitkilerde genetik çeşitliliğin kaybolmasını önlemek amacıyla kurulan saklama depolarıdır. Bu çeşitlilik hayvanların hayatta kalması ve hayvancılık geleceği için önemli bir rol oynamaktadır (FAO, 2021; Hiemstra vd., 2006). Yerli gen kaynaklarımızı korumak amacıyla bazı ırklara ait DNA, sperma, hücre, embriyo materyalleri TÜRK-HAYGEN projesi kapsamında dondurulmuş olarak UHAEM (Uluslararası Hayvancılık Eğitim ve Araştırma Merkezi, UHEAM) bünyesinde saklanmaktadır. Donmuş doku örnekleri, ekoloji, viroloji, taksonomi ve evrim gibi tarihi alanlarda önemli bir kaynak olarak kullanılabilir. Son yıllarda, genomik düzeyde

dizileme verilerine olan ilginin artmasıyla birlikte, uygun şekilde saklanan doku örneklerine de olan talep giderek yükselmiştir. Doku örneklerinin uzun süreli hatta sonsuz süreyle saklanması dondurma, güvenilir ve etkin bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Smith ve Jones, 2018; Wong vd., 2020). Özellikle genetik analizler için kullanılan biyolojik materyallerin canlılık ve bütünlüğünü koruması, başarılı dondurma ve saklama tekniklerine bağlıdır (Brown vd., 2021).

Doku örnekleri, hücre ve DNA'nın hasar görmemesi için yeterince soğuk ortamlarda saklanmalıdır. Son zamanlarda birçok kurum sıvı nitrojen tanklarında -196 °C 'de dondurarak saklamayı tercih etmektedir (Soniati, 2019). Çizelge 1.1'de UHEAM ve MAM bünyesinde TÜRKHAYGEN-1 kapsamında dondurulmuş sığır ırkları ve örnek sayıları verilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Gen Bankasında dondurularak saklanan YK, Boz Irk ve GAK, DAK, YGS ve ZVT örneklerinin bulunduğu yer ve sayıları

|                             | UHEAM |       |         |          | MAM |       |
|-----------------------------|-------|-------|---------|----------|-----|-------|
|                             | DNA   | Hücre | Embriyo | Sperma*  | DNA | Hücre |
| Sığır Irkları               |       |       |         |          |     |       |
| Yerli Kara                  | 54    | 51    | 103     | 25/6886  | 54  | 51    |
| GAK (Güney Anadolu Kırmızı) | 51    | 48    | 2       | 26/976   | 50  | 51    |
| Boz Irk                     | 54    | 54    | 33      | 25/894   | 54  | 54    |
| DAK (Doğu Anadolu Kırmızı)  | 55    | 55    | 70      | 26/1003  | 55  | 55    |
| YGS (Yerli Güney Sarısı)    | 51    | 51    | 3+3     | 16/515   | 51  | 51    |
| ZVT                         | 19    | 19    | 5+5     | 17/20280 | 19  | 19    |

\* hayvan sayısı/toplam payet sayısı

## 1.2. DNA Hasarı ve Hasar Tespit Yöntemleri

Hücresel yaşam döngüsü boyunca DNA hasarlarının oluşması oldukça yaygın bir biyolojik durumdur ve bu tür bozulmalar hücrede mutasyonlara, malign dönüşümlere ya da hücre ölümüyle sonuçlanabilecek süreçlere zemin hazırlamaktadır. DNA'da meydana gelen bu hasarlar, hücrenin çeşitli savunma mekanizmalarını devreye sokmasına neden olur. Bu mekanizmalar ya hasarın doğrudan giderilmesini ya da hasarı taşıyan hücrenin programlı hücre ölümü (apoptoz) yoluyla ortadan kaldırılmasını hedefler (Roos ve Kaina, 2006).

Hücreler, belirli DNA lezyonlarını çözmek ve genom bütünlüğünü korumak için tipik olarak çok adımlı bir işlemi gerçekleştiren bir dizi DNA onarım yolu geliştirmiştir. Farklı DNA onarım sistemlerinin biyolojik katkılarını tam olarak anlayabilmek için, içinde çalıştıkları hücresel bağlam akılda tutulmalıdır (Iyama ve Wilson, 2013). Hücreler, DNA bütünlüğünü korumak amacıyla çeşitli yanıt yollarını aktive eder. Bu yanıtlar arasında: (i) DNA'daki bozulmaların onarımı ve çift sarmal yapının yeniden tesisi, (ii) hücre döngüsünün geçici olarak durdurularak kusurlu kromozom aktarımının önüne geçilmesi, (iii) gen ifadesinin yeniden düzenlenmesi yoluyla transkripsiyonel adaptasyon ve (iv) hasarın geri döndürülemediği durumlarda apoptoz mekanizmasının devreye girmesi yer almaktadır. Söz konusu hücresel tepkileri düzenleyen onarım sistemleri; doğrudan hasar düzeltimi, baz eksizyon onarımı, nükleotid eksizyon onarımı, çift zincir kırıklarının giderilmesi ve DNA'daki çapraz bağların çözülmesini sağlayan yolları içermektedir (Sancar vd., 2004). Organizmaların DNA hasarına karşı koyabilmelerini sağlayan fotoreaktivasyon, nükleotid eksizyon onarımı (NER), baz eksizyon onarımı (BER), uyumsuzluk onarımı (MMR), rekombinasyonel onarım ve apoptozis gibi çok sayıda onarım mekanizması bulunmaktadır (Huang ve Zhou, 2021). DNA hasar tespit ve ölçümlerinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; PCR, Halo Assay, Tunnel, Comet, FISH, Flow Cytometry (FCM), Immunological Assay, İmmunohistokimyasal Assay, ELİSA'dır. PCR, DNA hasarını tespit etmek için en güvenilir şekilde kullanılan tekniklerden biridir çünkü çoğaltma hasar bölgesinde durur. Halo Assay tekniğinde floresan bir boya olan propidyum iyodür (PI); DNA heliksine girer ve DNA'nın süper sarmal durumunda değişikliğe neden olur. Böylece DNA, PI konsantrasyonuyla çapı değişen floresan bir hale olarak görülebilir. TUNEL testi, DNA'nın serbest uçlarını floresanlayarak DNA parçalanmasını tespit eder, bu nedenle floresan mikroskopi yardımıyla apoptozu tespit etmek mümkündür (Moldovan vd., 2023). HPLC-elektrosprey ardışık kütle spektrometrisi hassas ve spesifik bir analizdir ancak sıvı kromatografisinin erken elüsyon özelliği nedeniyle, oksidasyona en yatkın olan Guanin (purin bazı) olmak üzere oksidatif baz hasarlarının tespitinde çok yardımcı olmaz. Flow Cytometry (FCM) analizi kromozomal sapmaları, DNA'ya kimyasal eklentileri, kardeş kromatit değişimini ve DNA zincir kırılmalarını tespit etmek için faydalı bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında kullanılan yöntemlerden biri olan Comet Assay (tek hücre jel elektroforezi), DNA hasarının tespiti için oldukça hassas bir yöntemdir. Bu teknik, tek ve çift zincir kırıkları, oksidatif DNA hasarı, UV radyasyonu ve elektromanyetik frekans radyasyonu gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerin neden olduğu DNA hasarlarını belirlemede etkilidir. Ayrıca, eksik çıkarma onarım bölgeleri ile ilişkili tek zincir kırıklarının tespitinde de kullanılmaktadır (Awad ve Kato, 2025; Kumari vd., 2008).

Comet analizi adını ‘kuyruklu yıldız’ görünümünden almıştır. Elde edilen görüntü, sağlam DNA'dan oluşan farklı bir baş bölgesine ve hasarlı veya kırık DNA parçalarından oluşan bir kuyruğa sahip bir "kuyruklu yıldız" gibi görünüyordu. Comet çalışmalarına yönelik ilk olarak Cook vd. (1976) iyonik olmayan deterjan ve yüksek molariteli sodyum klorür ile hücrelerin parçalanmasına dayanan nükleer yapıyı araştıran bir makale yayınlamasıyla başlamıştır. Bu işlem, membranların, sitoplazmanın ve nükleoplazmanın ortadan kaldırılmasına ve nükleozom yapısının bozulmasına yol açmakta olup, neredeyse tüm histon proteinleri yüksek tuz konsantrasyonu tarafından çözündürülmektedir. Bu süreç sonucunda, nükleozomun histon proteinleri etrafındaki çift sarmal yapının oluşturduğu negatif süper sargılı DNA, RNA ve proteinlerden oluşan bir nükleer matris veya iskelet yapısına sahip nükleoit yapısı kalmaktadır. Süper sarmalların varlığını koruması ise DNA'nın serbest dönüşüm yapmasının mümkün olmadığını göstermektedir. Cook vd. (1976) DNA'nın nükleer matrikse aralıklarla bağlandığı ve böylece doğrusal bir molekül yerine etkili bir şekilde bir dizi döngü şeklinde düzenlendiği bir model önermiştir. Bu modele göre, negatif süper sarmallar ara madde (etidyum bromür) eklendiğinde çözülmekte ve döngüler, nükleoit çekirdekten dışa doğru genişleyerek bir "halo" yapısı oluşturmaktadır. Benzer şekilde, döngülerin gevşetilmesi amacıyla radyasyon uygulandığında da aynı etkiler gözlemlenmekte; tek zincirde meydana gelen bir kırığın, o döngüdeki süper sargıyı gevşetmek için yeterli olduğu belirlenmiştir (Silva-Santiago vd., 2016).

DNA zincirindeki kırılmaları doğrudan ölçmeye yönelik ilk girişim, 1978'de Rydberg ve Johanson tarafından, slaytlar üzerindeki agaroz içine gömülmesi ve hafif alkalın koşullar altında hücrelerin parçalanmasıyla yapılmıştır (Rydberg ve Johanson, 1978). 1984 yılında Ostling ve Johanson yukarıda açıklanan yaklaşıma dayanarak tek hücreli jel elektroforezi olarak da adlandırılan kuyruklu yıldız testini geliştirmişlerdir (Ostling ve Johanson, 1984).

Kuyruk yıldız testi daha sonra iki ekip tarafından modifiye edilmiştir (Olive vd., 1990; Singh vd., 1988). İlk ekip, yüksek alkali koşullar altında ( $pH > 13$ ) elektroforez işlemi gerçekleştirerek DNA süper sarmallarının gevşemesini ve çözülmesini sağlamıştır. Bu yöntem, elektroforez sırasında alkaliye duyarlı bölgelerin ve DNA'daki tek iplikçik kırıklarının yüksek hassasiyetle tespit edilmesine olanak tanımaktadır. Özellikle düşük seviyeli iplik kopmalarının belirlenmesinde son derece etkili bir yaklaşım sunmaktadır (Singh vd., 1988). İkinci ekip ise, tek iplikçik kırıklarının belirlenmesi amacıyla nötr veya hafif alkali koşullar altında elektroforez yapmıştır. Bu yöntem, ilaçlara veya radyasyona karşı değişen duyarlılıklara sahip hücre alt popülasyonlarının tespitine yönelik olarak optimize edilmiştir

(Olive vd., 1990). Bu iki modifikasyon, kuyruk yıldız testinin farklı biyolojik süreçlerin incelenmesinde geniş bir uygulama alanı bulmasını sağlamıştır.

Alkali kuyruklu yıldız testi (Comet analizi), özellikle 1990'lı yıllardan itibaren DNA hasarının belirlenmesine yönelik çalışmalarda dikkat çekici bir artışla kullanılmaya başlanmıştır. Zaman içerisinde hem uygulama kolaylığı hem de hücresel düzeyde duyarlılığı nedeniyle moleküler biyoloji araştırmalarında yaygınlaşmış ve günümüzde DNA hasar onarımıyla ilgili deneysel analizlerde başlıca tekniklerden biri haline gelmiştir (Mircheva vd., 2024). Bu yöntemin bilimsel literatürdeki yeri, yalnızca laboratuvar pratiğinde değil, aynı zamanda bibliyometrik verilerde de gözlemlenebilir düzeydedir. Örneğin, "Comet Analizi" anahtar kelimesiyle yapılan bir taramada Mart 2025 itibarıyla PubMed veri tabanında 14.590'dan fazla yayına ulaşılmış olması, yöntemin araştırma camiasındaki yerini ortaya koymaktadır.

Kuyruklu yıldız analizinde, elektroforez sonrası oluşan DNA yapılarına ait morfolojik özellikler 'özellikle DNA'nın kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve dağılım paterni' hasar düzeyinin değerlendirilmesinde belirleyici parametreler olarak kabul edilmektedir (Bowden vd., 2003). Comet analizi olarak da bilinen tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE), tekil hücrelerde DNA bozulmalarını analiz etme amacıyla geliştirilen, uygulama kolaylığı ve duyarlılığıyla öne çıkan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu yöntem, hücresel düzeyde DNA stabilitesinin ölçülmesine olanak tanıyarak, çevresel stres faktörlerinin ya da genetik bozuklukların neden olduğu hasarları doğrudan inceleyebilme avantajı sunmaktadır. Comet analizinde gerçekleştirilen "ölçümler", yöntemin temel bileşenlerinden birini oluşturmaktadır. Genel olarak kabul gören görsel puanlama yöntemi, görüntü analiz teknikleri ile karşılaştırılabilir düzeyde doğruluk sağlamaktadır. Bununla birlikte, bazı bileşiklerin genotoksik potansiyelinin karakterizasyonunda önemli olabilecek ek bilgiler sunulabilmektedir. Özellikle, DNA içeriklerinin ölçülmesi yoluyla hücrelerin hücre döngüsü durumlarının belirlenmesi gibi ek parametreler, genotoksisite değerlendirmelerinde değerli katkılar sağlamaktadır. Özellikle DNA hasarı çok fazla olduğunda bulutlu görüntünün Comet analizi ölçümünün önemli bir biçimini oluşturduğuna dikkat edilmelidir. Bu sebeple, Comet analizlerinde bulutların aktif ve doğru bir şekilde aranması, kaydedilmesi ve doğru şekilde yorumlanması önemlidir. Bu uygulama, Comet analizin temel biyolojik araştırmalar için güvenilir ve sağlam bir araç olarak kurulmasına destek olacaktır (Kumaravel vd., 2007).

Kuyruklu yıldız testi tarafından tespit edilen en basit DNA hasarı çift zincir kırıklarıdır (ÇZK'ler). ÇZK'ler DNA fragmanları ile sonuçlanır ve bunların nötr pH'ta elektroforetik hareketliliğe tabi tutulmasıyla tespit edilebilir. Tek zincir kopmaları (TZK'ler), DNA'nın iki ipliği ayrılmadıkça/denatüre edilmedikçe DNA fragmanları üretmez. Bu, DNA'nın pH 12,1'de çözülmesiyle gerçekleştirilir. Tek iplikçik kırılmalarının DNA'yı gevşetmesi de mümkündür ve dolayısıyla nötr pH'ta kuyruklu yıldız testi ile de tespit edilebilir. Genel olarak alkali kararsız alanlar (AKA) olarak adlandırılan diğer DNA hasarı türleri, DNA, pH 13'ten daha yüksek bir pH'ta alkali ile işlendiğinde eksprese edilir. DNA'nın lezyona özgü glikozilazlarla/ endonükleazlar işlenmesiyle DNA baz modifikasyonlarının olduğu bölgelerde de kırılmalar meydana gelebilir ve bu şekilde üretilen fragmanlar aynı zamanda kuyruklu yıldız testi ile de tespit edilebilir. Bu nedenle, belirli DNA lezyonlarının bulunduğu bölgelerde çentikler oluşturan koşulların kontrol edilmesiyle, kuyruklu yıldız testi, çeşitli DNA hasarı sınıflarını tespit etmek için kullanılabilir. Kırılmalar DNA göçünü artırırken, DNA bağlanması ve çapraz bağlantılar DNA göçlerini geciktirebilir ve ayrıca kuyruklu yıldız testi ile tespit edilebilir. Bu nedenle, kuyruklu yıldız testinde artan göç, iplik kopmalarına, alkali kararsız bölgelere ve eksik eksizyon onarım bölgelerine atfedilebilirken, azalan DNA göçü, çapraz bağlı DNA-DNA veya DNA-protein etkileşimlerine atfedilebilir (Piperakis, 2008; Zivkovic vd., 2024).

Comet testi, tek hücrelerde DNA hasarını ve DNA onarımını kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bukkal, nazal, epitelyal ve plasental hücreler ve hatta sperma dahil olmak üzere diğer hücre türleri incelenmiş olmasına rağmen, comet testi en sık insan biyomonitörleme çalışmalarında beyaz kan hücrelerini veya lenfositleri analiz etmek için kullanılır. Comet testi, bireysel hücre popülasyonlarında DNA hasarını ve DNA onarımını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan basit, iyi kurulmuş, çok yönlü, görsel, hızlı ve hassas bir araçtır (Gutierrez vd., 2011). Comet analizi prosedüründe, mikroskop lamı üzerine yerleştirilen hücreler agaroz matriks içerisinde sabitlenir ve ardından yüksek konsantrasyondaki tuz ve deterjanlar kullanılarak hücre zarları çözülür. Bu işlem sonucunda, nükleer matrise tutunmuş süper sarmal DNA halkalarından oluşan nükleoid yapılar açığa çıkar. Elektroforez aşamasında, alkali pH koşulları altında DNA'nın zincir kırıkları nedeniyle hareket kazanması, floresan boyalarla görselleştirildiğinde kuyruklu yıldız benzeri görüntülerin oluşmasına yol açar. Bu görüntülerde kuyruk kısmının başa oranla gösterdiği yoğunluk ve uzama miktarı, hücredeki DNA kırılma seviyesini nicel olarak değerlendirmeye olanak sağlar. Bunun muhtemel sebebi, bir kopukluk içeren ilmeklerin süper sarmallarını kaybetmeleri ve anoda doğru uzanmakta serbest hale gelmeleridir. Testin, genotoksisite için yeni kimyasalların dozlarının test edilmesinde, genotoksinlerle çevresel

kontaminasyonun izlenmesinde, insan biyolojik izleme ve moleküler epidemiyolojide ve DNA hasarı ve onarımında temel araştırmalarda uygulamaları bulunmaktadır (Ladeira vd., 2024).

### 1.3. Çalışmada Kullanılan Yerli Sığır Irkları

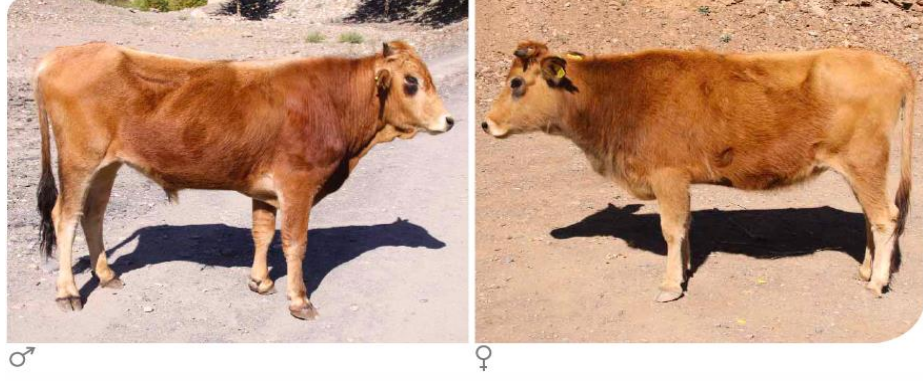
Yerli ırklar önemli genetik kaynaklarımız olması yanı sıra yetiştirildikleri bölgelere adaptasyonu ve hastalıklara dirençli olması açısından ekonomik olarak da önemlidir (Soysal vd., 2004). Sunulan tez çalışmasında yerli gen kaynakları olan Yerli Kara, Boz Irk, Doğu Anadolu Kırmızısı, Yerli Güney Sarısı, Güney Anadolu Kırmızısı ve Zavot ırkı sığırları örneklenmiştir.

Yerli Kara Sığır Şekil 1.1’de görüldüğü gibi küçük yapılı Orta Anadolu bölgesinde yetiştiriciliğı yapılan en büyük popülasyona sahip kombine yerli sığır ırkıdır. Don rengi siyah olup, verim özellikleri düşük olmasına rağmen hastalık ve direnç özellikleri iyidir (Tagem, 2009).



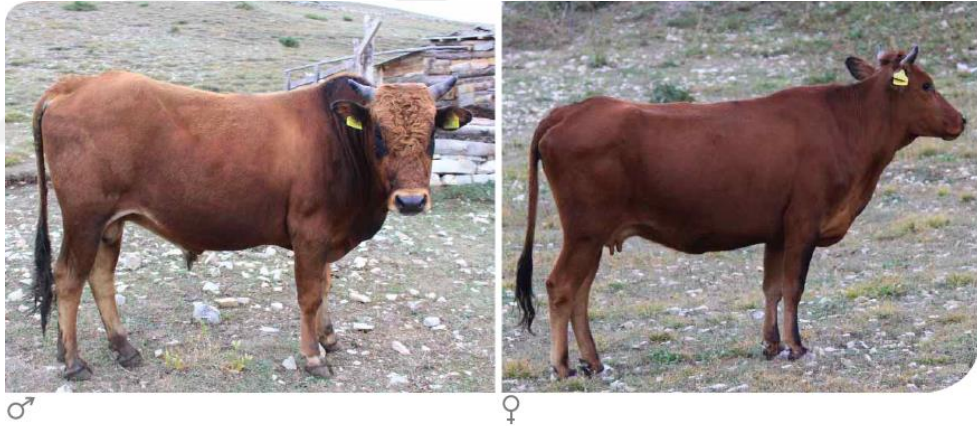
Şekil 1.1. Yerli Kara sığır ırkından erkek ve dişi (Tagem, 2009)

Yerli Güney Sarısı sığır ırkı (Şekil 1.2) Mersin Toroslar bölgesinden Hatay’a kadar uzanan bir bölgede yetiştiriciliğı yapılmaktadır. Aylarca insan müdahalesi olmadan dağlarda yaşayabilme özelliğinde ilkel bakım ve besleme koşullarına adapte olmuş küçük yapılı bir sığır ırkıdır. Don rengi göz çevresi burun ve tırnaklarda siyaha yakın kahverengi olmaktadır (Tagem, 2009).



**Şekil 1.2.** Yerli Güney Sarısı sığır ırkından erkek ve dişi (Tagem, 2009)

Doğu Anadolu Kırmızı sığır ırkı (Şekil 1.3) adından anlaşılacağı üzere Doğu ve Kuzey Doğu Anadolu bölgelerinde başta Erzurum ve Kars olmak üzere Ardahan ve çevresinde de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Küçük yapılı ve don rengi kırmızı ve tonlarında olman kombine bir ırktır. Ayrıca hastalıklara dirençli ve kötü bakım ve besleme koşullarına adapte olmuştur (Tagem, 2009).



**Şekil 1.3.** Doğu Anadolu Kırmızısı sığır ırkından erkek ve dişi (Tagem, 2009)

Zavot ırkı sığır Şekil 1.4'te görüldüğü gibi beyazdan açık sarı renklerde don rengine sahiptir. Kars ve Ardahan bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan kombine orta iri bir ırktır. Hastalıklara dirençli ve kötü hava koşullarında yaşam gücü yüksektir (Tagem, 2009).



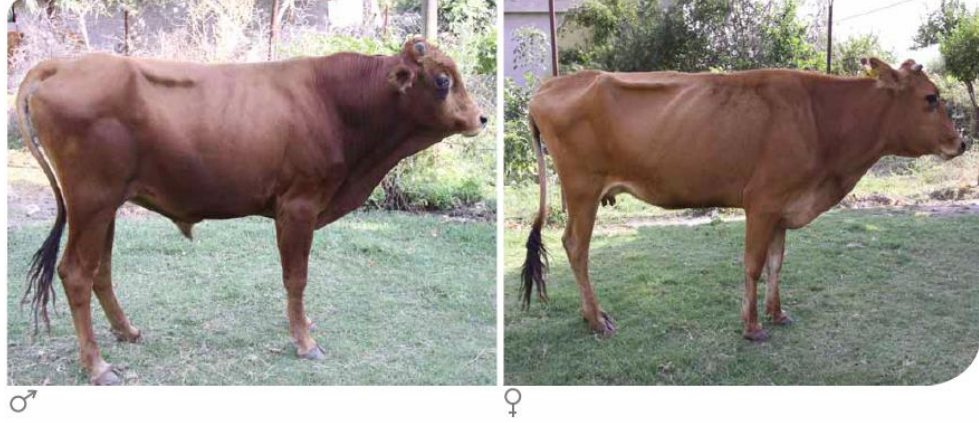
**Şekil 1.4.** Zavot sığır ırkından erkek ve dişi (Tagem, 2009)

Boz Irk (Şekil 1.5) Trakya, Marmara, Kuzey ve İç Ege Bölgelerinde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Sağlam yapılı ve don rengi çoğunlukla gri olup gümüş renginden kül rengine kadar değişmektedir. Yetersiz beslenme koşullarına adapte olmuş hastalıklara dirençlidir (Tagem, 2009).



**Şekil 1.5.** Boz ırkından erkek ve dişi (Tagem, 2009)

Güney Anadolu Kırmızısı (Şekil 1.6) Kilis ismiyle de bilinmektedir ve Mersin, Adana'dan Urfa bölgesine kadar uzanan bir alanda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Don rengi sarımsı kırmızı olup kombine bir ırktır. Hastalıklara dirençli olup yetersiz bakım ve besleme koşullarına adapte olmuştur (Tagem, 2009).



**Şekil 1.6.** Güney Anadolu Kırmızısı sığır ırkından erkek ve dişi (Tagem, 2009)

#### **1.4. Mikrosatellitlerin Önemi ve Çalışma Alanları**

30 çift kromozomdan oluşan sığır genomu ile ilk genom haritalama çalışmaları 1993 yılında Fries vd. tarafından yapılmıştır. Amerika’da 2003 yılında Richard Gibbs ve George Weinstock tarafından ilk sığır genom projesine başlanmıştır. Genomda bir lokusta kısa rastgele art arda tekrarlar (Short Tandem Repeats, STRs) olarak adlandırılan bölgeler arka arkaya gelen rastgele tekrar dizilerinden oluşmaktadır. STR’ların 1–6 baz çifti tekrarlarından oluşanlarına basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats, SSRs) veya mikrosatellit markörler denilmektedir (Liu 1998; Weber ve May 1989). Örneğin, sığır genomunda yer alan TGLA122 adlı mikrosatellit lokusu, “TAA” trinükleotid grubunun arka arkaya tekrarlarından oluşmaktadır. Bu lokusta, tekrar sayısı bireyler arasında değişkenlik gösterebilir ve bu durum farklı uzunlukta allellerin ortaya çıkmasına neden olur. Literatürde TGLA122 lokusunda 7 ila 25 arasında değişen tekrar sayıları bildirilmiştir (FAO, 2011; Heyen vd., 1997; Utsunomiya vd., 2017). Bu varyasyon, lokusun yüksek düzeyde polimorfik olmasını sağlamış ve bu nedenle TGLA122, özellikle sığırlarla ilgili genetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan mikrosatellit markörlerden biri haline gelmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) teknolojisinin gelişimi, moleküler genetikte kullanılan analiz tekniklerinin çeşitlenmesine ve hassasiyetinin artmasına olanak tanımıştır. Bu süreçte, STR’ların oluşturduğu mikrosatellit markörler, genetik analizlerde sıklıkla başvurulan araçlardan biri haline gelmiştir (Liu, 1998; Weber ve May, 1989). Her bireyin bir lokustaki allel uzunlukları, PCR ile çoğaltıldıktan sonra elektroforez yöntemiyle belirlenebilmekte ve genetik çeşitlilik analizlerinde değerlendirilmektedir. Mikrosatellit dizileri, bir tür içinde tekrarlanan motifleri çevreleyen DNA bölgeleri aynı olsa da tekrar

sayılarında bireyler arasında hatta bireyin homolog kromozomları arasında bile farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, iki baz çifti tekrarlı mikrosatellit bölgelerinin polimorfizm oranı %100'e yaklaşırken, üç baz çifti tekrar içeren bölgelerde bu oran %60 civarındadır (Metta vd., 2004). Mikrosatellitlerin genom boyunca yaygın dağılmış olmaları, PCR ile kolay çoğaltılabilmeleri, yüksek derecede polimorfizm göstermeleri ve kodominant kalıtım özelliği taşımaları; onları hem bireysel hem de popülasyon düzeyinde genetik çeşitliliğin analizinde son derece kullanışlı hale getirmiştir (Chatterjee vd., 2010; Hillel vd., 2003; Hou vd., 2025; Tadano vd., 2011). Bu markörler; evrimsel yakınlık düzeylerinin karşılaştırılmasında, soy ağacı analizlerinde, gen-yer tayini çalışmalarında, akrabalık derecesinin ölçülmesinde ve ebeveynliğin belirlenmesinde yaygın olarak tercih edilmektedir (Agung vd., 2016; Özşensoy vd., 2010). Ayrıca mikrosatellitler; sığır, koyun, keçi, kedi, köpek, at ve domuz gibi çeşitli türlerde yürütülen genetik karakterizasyon ve ebeveyn tayini çalışmalarında etkin şekilde kullanılmaktadır (Abdelkader vd., 2018; Korkmaz Ağaoğlu, 2010; Ramamorthy vd., 2006).

### **1.5. Hücre Kültürü Yöntemleri**

Hücre kültürü, canlı organizmalardan elde edilen hücrelerin, in vitro koşullarda uygun bir besiyeri içinde kontrollü bir ortamda çoğaltılması ve yaşatılması işlemidir. Bu yöntem, hem temel biyolojik araştırmalar hem de uygulamalı biyoteknolojik çalışmalar açısından vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir (Freshney, 2010). Hücre kültürü teknikleri sayesinde hücrelerin fizyolojik, biyokimyasal, genetik ve toksikolojik özellikleri incelenebilir, ilaç taramaları yapılabilir, genetik manipülasyonlar gerçekleştirilebilir ve doku mühendisliği uygulamaları yürütülebilir (Ryan, 2008; Subramaniam vd., 2024).

Hücre kültürü işlemleri genellikle steril, sabit sıcaklıkta (37°C), %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş inkübatörlerde gerçekleştirilir (Perez-Bruzon vd., 2011). Hücrelerin büyümesi için gerekli olan amino asitler, vitaminler, glikoz, inorganik tuzlar, serum (çoğunlukla fetal bovine serum - FBS) ve Pen-Strep içeren özel kültür ortamları kullanılır (Brunner vd., 2010).

Hücrelerin kaynağına ve kullanım amacına bağlı olarak farklı hücre kültürü sistemleri tercih edilebilmektedir. Örneğin, doğrudan doku ya da organlardan elde edilen hücrelerin ilk kez kültür ortamına alınmasıyla oluşturulan primer hücre kültürü, in vivo özellikleri büyük ölçüde korur ancak sınırlı bölünme kapasitesine sahiptir. Mutasyon veya transformasyon yoluyla sınırsız bölünme yeteneği kazanmış hücrelerden elde edilen sürekli hücre hatları ise özellikle deneysel çalışmalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Masters, 2000). HeLa, CHO

ve Vero bu tür hücre hatlarına örnek olarak verilebilir. Ayrıca, hücre ayrıştırması yapılmaksızın küçük doku parçalarının kültüre alınmasıyla oluşturulan primer doku kültürleri de hücreler arası etkileşimlerin korunması açısından önemlidir.

Hücre kültürü, orijinal dokudan alınan ayrılmış hücrelerden türetilen kültürleri ifade eder (birincil hücre kültürü). Hücreler (mekanik ve/veya enzimatik olarak) bir hücre süspansiyonuna dağıtılır ve daha sonra katı bir substrat üzerinde tek tabaka olarak veya kültür ortamında bir süspansiyon olarak kültürlenebilir. Böylece hücreler kültürlenerek bölünüp çoğaltılabilir. Hücre kültürleri karakterize edilebilir ve dondurularak korunan popülasyonlar tanımlanabilir. Hücre kültürünün en büyük avantajı bireysel canlı hücreleri erişilebilir kılmasıdır. Primer hücre kültürü elde etmenin en büyük zorluğu kontaminasyon riskidir (Harrison, 2024). Tripsin enzimini ilk olarak enzim aracılığı ile dokudan hücre izole edilmesi için 1916 yılında Rous ve Johns kullanmışlardır. 80 yıldan uzun bir süre tripsin enzimi dokudan primer hücre ayrımı için en çok kullanılan enzim olmuştur. Düşük konsantrasyonlarda kullanmanın hücrenin zarar görmesi açısından güvenliği olduğu ancak yoğun konsantrasyonlarda hücreye zarar verdiği bilinmektedir (Kim vd., 2024). Hücre izolasyon süreçlerinde enzimatik yöntemler yaygın olarak kullanılmakta olup, farklı enzimler farklı hücre tipleri ve doku kaynakları için tercih edilmektedir. Bu bağlamda, Accutase, Dispase ve Collagenase enzimleri, hücre izolasyonunda etkili olan başlıca enzimler arasında yer almaktadır. Accutase, hücre yüzeyi proteinlerine zarar vermeden hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarını çözerek hücre süspansiyonu elde etmekte yaygın olarak kullanılmaktadır (Mastromonaco vd., 2021). Özellikle kök hücre kültürlerinde ve hassas hücre hatlarında avantaj sağlamaktadır. Dispase, genellikle epitel hücre kolonilerini ayrıştırmak amacıyla kullanılır ve hücre adezyon proteinlerini parçalayarak hücrelerin tek hücre süspansiyonuna dönüştürülmesine olanak tanır (Freshney, 2010). Dispase'in, fibroblast kültürlerinde hücre yapısını koruyarak verimli hücre ayrışması sağladığı da literatürde belirtilmiştir (Villegas ve McPhaul, 2005). Collagenase, bağ dokusu içeren doku örneklerinden hücre izolasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu enzim, kollajen yapısının bozulmasına yol açarak, özellikle bağ dokusu ve sert matrikse sahip dokulardan hücre elde edilmesini kolaylaştırmaktadır (Mastromonaco vd., 2021). Bu enzimlerin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar, enzimatik izolasyon protokollerinin hücre canlılığı ve bütünlüğü üzerindeki etkisini vurgulamakta ve her bir enzimin belirli hücre tiplerine göre seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Fibroblastlar, bağ dokularında yapısal ve fonksiyonel çeşitlilik gösteren mezenkimal hücrelerdir. Bu hücreler, hücresele bağışıklık yanıtları, doku onarımı ve homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynarlar (Plikus vd., 2021). Fibroblast hücreler dermisin histolojik yapısının korunmasında ve yaralı bağ dokunun iyileşmesinde önemli rolü bulunan, cildin dermal tabakasındaki temel hücre yapısını oluşturmaktadır. Hücre kültürü sistemlerinde diğer hücrelere kıyasla fibroblastlar serum bulunan ortamda az besiyerine rağmen kolaylıkla çoğalabilmektedirler. Hücre içi etkiler, metabolik yollar, ilaç etkileri gibi birçok in vitro çalışmada kültüre edilmiş fibroblastların tercih edildiği düşünüldüğünde; sağlıklı primer hücre izole etmek için hızlı ve güvenilir bir yol izlemek önemlidir. Yapılan araştırmaların çoğunda ticari fibroblast hücrelerin kullanıldığı görülse de bu çalışmaların hücre kültürü ortamında doğrulanması için primer hücre izole edilmesi gerekir (Plikus vd., 2021).

Yeterli hücre hattının elde edilmesi, klonlamanın ve hücre hattı oluşturmaının başarısı için ön koşuldur. Epitel hücreler ve deriden elde edilen fibroblast hücreler en yaygın kullanılan materyaldir. Fibroblast hücreler tripsinizasyon yöntemi ile flask yüzeyine kolay yapışan ve çoğalabilen hücrelerdir. Ancak dondurma aşamasında meydana gelen hücre hasarları hücre hattının elde edilmesi için önemlidir. Hücrenin in vitro çalışmalar sırasında hücresele epigenetik mekanizmaların etkilenmesini ve klonlanma sırasında embriyonik gelişimin değişmesini pasajlanma sayısı etkileyebilmektedir (Borges vd., 2020).

## **1.6. Hücre Dondurma (Kriyoprezervasyon) İşlemi**

Kriyoprezervasyon, tüp bebek (IVF) ve diğer yardımcı üreme tekniklerinde, özellikle fazla döllenmiş oosit ve embriyoların saklanması amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Tounson, 1990). Sperm kriyoprezervasyonu, yardımcı üreme teknikleri alanında önemli bir ilerleme olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem, özellikle kemoterapi, radyoterapi veya radikal cerrahi geçiren erkeklerde üreme yeteneğinin korunması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Anger vd., 2003). Sığır spermasının kriyoprezervasyon sürecinde sperm canlılığı, reaktif oksijen türleri (ROS) sentezi ve DNA bütünlüğü arasındaki ilişkileri araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Kriyoprezervasyon, sperm canlılığı ve DNA bütünlüğü üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmekte, aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin artışına yol açmaktadır (Gürler vd., 2016).

Kriyoprezervasyonun DNA hasarına ve embriyo gelişim potansiyelinin azalmasına neden olabileceğine dair çeşitli bilimsel çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle,

kriyoprezervasyon işlemi sırasında meydana gelen hücresel stresler, DNA bütünlüğünü bozabilir ve embriyo gelişimini olumsuz etkileyebilir. Kriyoprezervasyonun gametler ve embriyolar üzerindeki etkileri, özellikle mRNA ve protein seviyeleri ile DNA bütünlüğü açısından çeşitli çalışmalarla incelenmiştir. Özellikle koyun oositlerinde yapılan araştırmalar, kriyoprezervasyonun mRNA ve protein ekspresyon düzeylerini etkileyebileceğini göstermektedir. Örneğin, yapılan bir çalışmada, koyun oositlerinin kriyoprezervasyon sonrası mRNA seviyelerinde belirgin bir azalma gözlemlenmiş ve bu durumun embriyo gelişim potansiyelini olumsuz etkileyebileceği belirtilmiştir (Silva vd., 2022). Kriyoprezervasyonun neden olduğu kriyoyaralanmaların, belirli bir çözülme süresinden sonra geri dönebileceği de rapor edilmiştir. Bu bulgular, dondurma prosedürlerinin, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile ölçüldüğü üzere, küçükbaş oositlerde mRNA seviyelerini düşürdüğünü ortaya koymaktadır (Choi vd., 2021). Çoğu sperm ve oosit çalışması, kriyoprezervasyonun DNA bütünlüğü üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Özellikle, kriyoprezervasyon işlemi sırasında meydana gelen hücresel stresler, DNA bütünlüğünü bozabilir ve embriyo gelişimini olumsuz etkileyebilir. Park vd. (2012) yaptığı bir çalışmada, kriyoprezervasyonun embriyo hasarına yol açabileceği, DNA parçalanmasına neden olabileceği ve gelişimsel yeteneği azaltabileceği belirtilmiştir. Benzer şekilde, vitrifikasyon ve yavaş dondurma yöntemlerinin insan embriyolarında DNA bütünlüğünü etkileyebileceği ve apoptotik yollarla DNA hasarına neden olabileceği rapor edilmiştir. Kriyoprezervasyon, hücrelerin uzun süreli saklanması, taşınması ve dağıtımında kritik öneme sahip olup, hücresel metabolik aktivitelerin düşük sıcaklıklarda durdurulmasına dayanır. Geleneksel yöntemler olan yavaş dondurma ve vitrifikasyonun bazı sınırlamaları bulunmakta ve büyük hacimli biyolojik materyallerin dondurulmasında güçlükler yaşanmaktadır (Alnemari vd., 2020). Ayrıca, vitrifikasyon ve yavaş dondurma yöntemlerinin, insan embriyolarında DNA bütünlüğünü etkileyebileceği ve apoptotik yollarla DNA hasarına neden olabileceği rapor edilmiştir (Gonzalez vd., 2020). Bu bulgular, kriyoprezervasyon sırasında meydana gelen moleküler değişikliklerin anlaşılmasının, üreme biyoteknolojilerinde başarı oranlarını artırmak açısından kritik olduğunu göstermektedir. Özellikle kriyoprezervasyon protokollerinin optimize edilmesi, genetik materyalin korunmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir. Bununla birlikte, kriyoprezervasyonun, stresle ilişkili ve glikoz taşıyıcı olarak bilinen (Glucose transporter, GLUT1) genlerinin yukarı regülasyonu ve apoptoz ve Tübero Skleroz (Tuberous sclerosis complex 2, TSC2) geninin aşağı regülasyonu ile görüldüğü gibi, bu genler üzerinde farklı bir etkisi vardır. Uzun vadeli etkiler üzerine yapılan çalışmalar, bu tür etkilerin açıklanması daha zor olsa da bazı genetik ilişkili etkileri saptamak için oldukça hassas olabilir.

Kriyoprezervasyonun sonuçlarını derinlemesine değerlendirmek için daha fazla moleküler biyoloji ve uzun vadeli çalışmalar gereklidir (Aarattuthodi vd., 2025; Lin ve Tsai, 2012).

Ökaryotik hücrelerde, DNA bazı eksizyon onarım yolunda merkezi bir rol oynayan ve tek zincir kırıkları da dahil olmak üzere tüm DNA lezyonlarının onarımında kritik öneme sahip ana apürinik/apirimidinik endonükleazın APEX1 geni olduğu bilinmektedir (Tell vd., 2010). İnsanlarda bazı eksizyon onarımında kritik rol oynayan APEX1 enzimi, biyolojik açıdan büyük öneme sahip olup, DNA onarım sentezini başlatmak amacıyla AP bölgelerinin 5' konumunda DNA şeker-fosfat omurgasını kesmektedir. İnsan APEX1'in abazik DNA'ya bağlı üç ko-kristal yapısının incelenmesi, bu enzimin DNA sarmalını bükme ve AP-DNA ipini sarmak için sert, önceden oluşturulmuş, pozitif yüklü bir yüzey kullandığını ortaya koymuştur (Mol vd., 2000). APEX1'in hem onarım hem de redoks düzenleme alanlarına sahip olması, çekirdekte benzersiz işlevler üstlenmesine olanak tanımaktadır. Bu proteinin redoks işlevi, yalnızca memelilere özgü yeni bir evrimsel kazanım iken, onarım fonksiyonu evrimsel süreç boyunca korunmuş durumdadır. Endonükleaz APEX1, nükleotit eksizyon onarımının önemli bir üyesi olarak, polimeraz ve ligaz aktivitelerine uygun hale getirmek amacıyla yan DNA uçlarını keser. Ayrıca APEX1, transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenleyicisi olarak hareket etmekte ve RNA metabolizmasında görev alarak çok yönlü işlevler üstlenmektedir (Lopez vd., 2012).

Soniat (2019) tez çalışmasında 1960'ların sonlarında Dr. Robert Baker tarafından Doğa Bilimleri Araştırma Laboratuvarı'nda (NSRL) depolanan Genetik Kaynaklar Koleksiyonu (GRC)'na ait ilk örnekleri kullanarak, dondurma sıcaklığının tarihî biyolojik örnekler üzerindeki etkisini araştırmıştır. Otuz yıl boyunca -80°C'de saklanan örneklerin DNA fragman uzunlukları, 1, 10 ve 20 yıllık saklama sürelerine ait örneklerle göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha kısa bulunmuştur; buna karşılık 1, 10 ve 20 yıllık gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu bulgular, DNA bozulma hızının ilk on yıldan sonra yavaşladığını, ancak 30. yılın sonunda ölçülebilir düzeyde belirginleştiğini göstermektedir. Ancak Mazur (1970) dokuları saklarken, sıcaklık ne kadar düşükse, zaman içerisinde dokunun daha az etkilendiğini; bu nedenle -80°C'lik ultra soğuk mekanik dondurucular, kısa süre sonra -20°C'lik dondurucuların yerini almaya başlamıştır. Son yıllarda, doğa tarihi koleksiyonlarında -80°C'lik dondurucular yerine sıvı nitrojen (LN2) dondurucular kullanılmaya başlanmıştır (Hagedorn vd., 2018).

Bu tez çalışmasında, gen bankasında uzun süreli saklanan biyolojik materyalde DNA bütünlüğü ve hasar düzeyinin Comet analizi ile belirlenmesi ve Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APEX1) geninin ifade düzeyinin RT-qPCR yöntemiyle incelenerek olası tamir mekanizmalarının değerlendirilmesinin yanısıra UHAEM Gen Bankası'na STR aracılı karakterizasyonu yapılmış yeni materyal eklenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, gen bankasında bulunan Yerli Kara, Yerli Güney Sarısı, Güney Anadolu Kırmızısı, Doğu Anadolu Kırmızısı, Boz ve Zavot sığır ırklarına ait dondurulmuş hücre örnekleri (n=10/ırk), dondurulmamış hücre örnekleri ile karşılaştırılarak aralarındaki farklar ortaya konulmuştur. Bu amaçlar doğrultusunda,

1. Gen bankasında yaklaşık 20 yıl süreyle saklanan hücre örneklerinde Comet analizinin yapılması,
2. Yeni örneklem yapılan hayvanların kulak dokusundan hücre izolasyonunun gerçekleştirilmesi,
3. Taze olarak elde edilen dondurulmamış hücre örneklerinde Comet analizlerinin yapılması,
4. Hücre örneklerinde (Sahadan toplanan) RT-qPCR ile APEX1 geninin ifade seviyelerinin belirlenmesi,
5. Gen bankasında saklanan DNA örnekleri ile sahadan toplanan kanlardan elde edilen DNA materyalinin genetik karakterizasyonunun yapılması
6. UHAEM Gen Bankası'na STR aracılı karakterizasyonu yapılmış yeni materyal eklenmesi hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında aşağıdaki hipotezler test edilmiştir:

- 1) Gen bankasında uzun süre saklanan hücre örneklerinin DNA yapısında dondurma ve saklama koşullarına bağlı olarak hasar meydana gelmektedir,
- 2) DNA hasarına ilişkin olarak dondurulmamış örneklerle donmuş örnekler arasında Comet analizinde kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti açısından fark bulunmaktadır,
- 3) Hücre örneklerinde donmuş ve dondurulmamış örneklerde APEX1 gen ifadesi seviyelerinde farklılık bulunmaktadır,
- 4) Ayrıca, gen bankasında saklanan DNA örnekleri ile sahadan taze elde edilen DNA örnekleri karşılaştırıldığında, STR lokuslarına ilişkin parametrelerde farklılıklar bulunmaktadır.

Sunulan tez çalışması, yerli sığır ırklarında DNA hasarı yönünden gen bankası materyali üzerinde yapılan ilk çalışmadır. Güncel literatürde, sperma materyalinde Comet analizi kullanılarak yapılan analizler bulunmaktadır (Zimmerman vd., 2025). Bu nedenle, yerli sığır ırklarında ve hücre örneklerinde 10 yılı aşkın süreyle dondurmanın DNA hasarı üzerindeki etkileri ilk kez bu çalışmada ortaya konulacaktır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

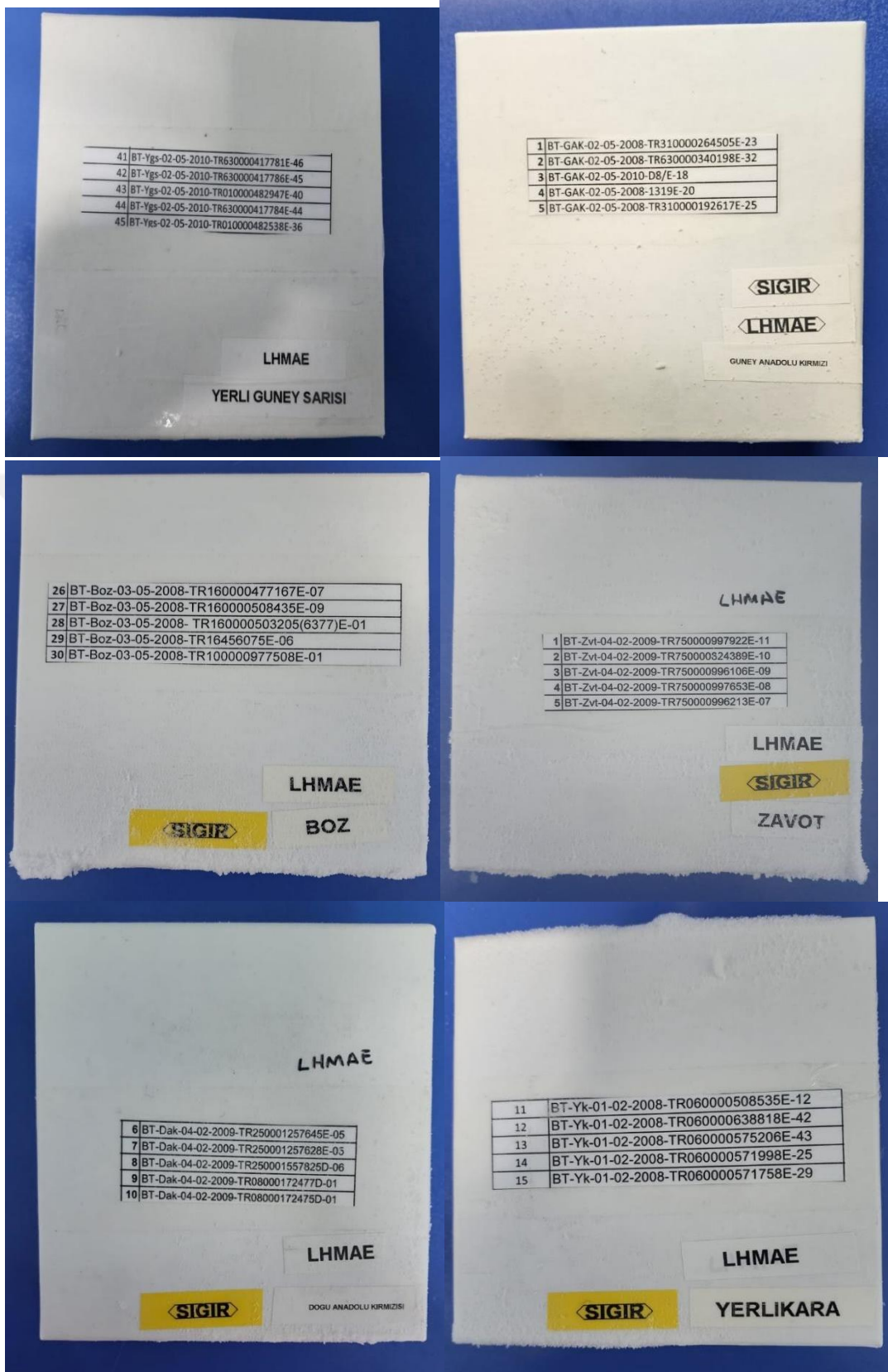
### 2.1. Materyal

Yerli Gen Kaynaklarımızı korumak ve yok olma tehlikesindeki hayvanların laboratuvar ortamında tekrar üretilmesi hedefiyle 2011-2012 yıllarında Yerli Kara, Boz Irk, Doğu Anadolu Kırmızısı, Yerli Güney Sarısı, Zavot ve Güney Anadolu Kırmızı sığırlarına ait DNA, sperma, hücre, embriyo gibi materyaller dondurularak -80°C dolaplarda ve -196°C azot tanklarında saklanarak Evcil Hayvan Gen Bankası kurulmuştur. Bu tez çalışmasında UHAEM Gen Bankasında Şekil 2.1’de görüldüğü gibi -80°C’de muhafaza edilen kutulardaki DNA örnekleri (n=10/ırk) ve fibroblast örnekleri (n=10/ırk) kullanılmıştır. Gen bankası materyeline ait Şekil 2.1’de görülen bilgiler dışında başka bir bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca güncel verilerin elde edilebilmesi için Yerli Kara örnekleri Lalahan UHAEM, Boz ırk için Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü, Güney Anadolu Kırmızısı (GAK) ve Yerli Güney Sarısı (YGS) için Doğu Akdeniz Araştırma Enstitüsü, Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ve Zavot için ise Doğu Anadolu Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü bünyesinde bulunan hayvanlardan (n=10/ırk) tam kan örnekleri toplanmıştır. Aynı zamanda Comet analizinde dondurulmamış hücre olarak kontrol grubu amacıyla yeni toplanan kulak dokusundan fibroblast hücre örnekleri (n=10 Negatif Kontrol, NK) izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan hayvan materyali ve sayıları Çizelge 2.1’de sunulmuştur. Çalışma Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurulu 31.11.2022 tarih ve 207 sayılı izin ile gerçekleştirilmiştir (EK1).

**Çizelge 2.1.** Çalışmada kullanılan materyal ve sayıları

| Sığır Irkları                | MATERYAL    |                       |         |                       |
|------------------------------|-------------|-----------------------|---------|-----------------------|
|                              | Dondurulmuş |                       | Kontrol |                       |
|                              | DNA         | Hücre<br>(Fibroblast) | DNA     | Hücre<br>(Fibroblast) |
| Yerli Kara (Lalahan)         | 10          | 10                    | 10      | 10NK                  |
| GAK (Doğu Akdeniz Araştırma) | 10          | 10                    | 10      | *                     |
| BOZ(Bandırma)                | 10          | 10                    | 10      | *                     |
| DAK (Doğu Anadolu Araştırma) | 10          | 10                    | 10      | *                     |
| YGS (Doğu Akdeniz Araştırma) | 10          | 10                    | 10      | *                     |
| ZVT (Doğu Anadolu Araştırma) | 10          | 10                    | 10      | *                     |

\*dondurulmamış hücre olarak kontrol grubu amacıyla yeni toplanan kulak dokusundan elde edilen fibroblast hücre örnekleri; NK= negatif kontrol.



Şekil 2.1. Gen Bankası DNA örneklerinin -80 °C’de saklandığı kutular

## 2.2. Kan Örneklerinin Alınması

Her ırktan (YK, BOZ GAK, DAK, YGS ve ZVT) TÜRK-HAYGEN kriterlerine uygun seçilen sağlıklı 5 yaş altında ve akrabalık ilişkisi bulunmayan n=10/ırk sığırdan DNA elde etmek için 10ml'lik EDTA'lı vakumlu tüplere kuyruk venasından (*Vena coccygea*) kan alınmıştır. Hayvan zaptrapta alındıktan sonra kuyruk dik tutularak önce alkollü pamuk ile temizlenir. Sonrasında kan alma kanülü ve holder yardımı ile kuyruk venasına girilir ve tüplere yeterli kan alınır. UHEAM bünyesinde bulunan Genetik Laboratuvarına getirilip analize başlayana kadar örnekler +4 °C dolaplarda saklanmıştır.

## 2.3. DNA Elde Edilmesi ve Fragment Analizleri

Laboratuvara getirilen tam kandan QiaCube HT cihazında DNA izolasyonu için kan materyalinde izlenen protokol takip edilmiş ve ticari bir DNA izolasyon kiti (QIAamp 96 DNA QiaCube HT, katalog no: 51331) kullanılarak DNAlar izole edilmiştir. 200µl kan örnekleri numara verilerek kuyucuklara dağıtılıp, pipet uçları ve solüsyonlar kitin içinden çıkan plastik kutulara aktararak cihazın içine yerleştirilmiş ve QiaCube HT Software programında cihaz çalıştırılmıştır. Sonrasında DNA kalite ve yoğunluk ölçümleri için UHAEM Genetik Laboratuvarında bulunan spektrofotometre (NanoPhotometer Implen N50, Almanya) cihazında ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen konsantrasyonlar PCR için önerilen 1-10ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır. PCR analizlerinin tamamlanmasından sonra elde edilmiş olan DNA örnekleri 2ml cryoviyal tüplerinde -80°C dolaplarda gen bankası materyali olarak eklenmiştir.

Tez çalışması kapsamında her ırktan 10ar adet (YK, BOZ, GAK, DAK, YGS ve ZVT) olacak şekilde toplanan 60 örnek ve Gen Bankasından seçilen 60 örnek ile birlikte toplamda 120 adet DNA örneği için UHAEM Genetik Laboratuvarında thermocycler cihazında ThermoFisher Scientific Bovine Genotypes Panel 2.1 (Katalog no: F904S) ile 11 lokus için PCR kurulmuş ve fragment analizleri yapılmıştır. Kullanılan mikrosatellitlere ait kromozom, allel uzunluğu ve Genbank erişim numarası bilgileri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Bu amaçla kitin önerdiği protokol yarı ölçülerinde mix hazırlanarak optimize edilmiş ve mix PCR tüplerine 7µl üzerine 1µl DNA örnekleri (1-10ng/ml) dağıtılıp iyi pipetleme (Çizelge 2.3) işlemi sonrasında kitin önerdiği sıcaklık ve süreler optimize edilerek (Çizelge 2.4) yükseltgenmiştir. ABI3130 cihazında BOVINE\_STR protokolü ile analiz yürütülmüştür.

**Çizelge 2.2.** Sığır örneklerinin genotiplenmesi için kullanılan mikrosatellit bölgelere ait bilgiler

| LOKUS   | Kromozom | Allel Uzunluğu | GenBank Erişim Numarası |
|---------|----------|----------------|-------------------------|
| BM1824  | 1        | 170-218        | G18394                  |
| BM2113  | 2        | 116-146        | M97162                  |
| INRA023 | 3        | 193-235        | *                       |
| ETH10   | 5        | 198-234        | GQ368902                |
| ETH225  | 9        | 135-165        | Z14043.1                |
| SPS115  | 15       | 235-265        | FJ828563                |
| TGLA53  | 16       | 143-191        | GQ368904.1              |
| TGLA227 | 18       | 64-115         | AC_000175.1             |
| ETH3    | 19       | 90-135         | Z22744.1                |
| TGLA126 | 20       | 104-131        | NT_107802.2             |
| TGLA122 | 21       | 134-193        | AC_000178.1             |

\*firma tarafından paylaşılmamıştır.

**Çizelge 2.3.** Polimeraz zincir reaksiyonu protokolü

| Kimyasallar    | Kitin önerdiği miktar | Çalışmada kullanılan miktarlar |
|----------------|-----------------------|--------------------------------|
| PCR Buffer     | 3µl                   | 1,5µl                          |
| dNTP mix       | 4µl                   | 2µl                            |
| Primer Mix     | 5,5µl                 | 2,75µl                         |
| DNA polymerase | 0,5µl                 | 0,25µl                         |
| Örnek          | 2µl                   | 1µl                            |

**Çizelge 2.4.** Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

| Aşama              | Sıcaklık | Süre      | Döngü Sayısı |
|--------------------|----------|-----------|--------------|
| Başlangıç basamağı | 95°C     | 10 dakika | 1            |
| Erime              | 94°C     | 45 saniye |              |
| Bağlanma           | 61°C     | 45 saniye | 31           |
| Uzama              | 72°C     | 60 saniye |              |
| Final Uzama        | 72°C     | 60 dakika | 1            |
| Final Basamağı     | 25°C     | 2 saat    | 1            |
| Bekleme            | 4°C      | ∞         | ∞            |

Fluoresan işaretli primerler ile çoğaltılan PCR ürünlerinin genotiplenmesi için UHAEM Genetik Laboratuvarında bulunan ABI 3130 analiz cihazı kullanılmıştır. ABI 3130 cihazında gerçekleştirilen kapiller elektroforez sonucunda oluşan fragmentlerin uzunluklarının belirlenmesinde yine bu cihaza ait yazılım olan GeneMapper kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında Gen Bankasındaki DNA örneklerine ait fragment analizleri UHAEM Genetik Laboratuvarında bulunan ABI 3130 cihazında tamamlanmış olup, sonrasında yaşanan teknik sorunlar ve cihaza ait parça ve servis desteği olmaması nedeniyle; yeni toplanan örneklerin

fragment aşaması Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Genetik Laboratuvarında bulunan ABI 3500 cihazında tamamlanmıştır.

PCR tamamlandıktan sonra örnekler fragment analizine hemen devam edilmeyecek ise örnekler +4°C dolaba kaldırılmıştır. Fragment analizi her örnek için 11,5 µl Formamide + 0,5µl ROX (GeneScan™ 500) hazırlanmıştır. Sekans cihazının plakasında her örnek için 12 µl mix dağıtıldıktan sonra 2,5 µl PCR ürünü dağıtılıp yavaşça pipetlenerek ve kısa bir spin yapıldıktan sonra denatürasyon için 94°C’de 2 dakika (dk) thermalcyclerda ısıtılarak hemen ardından 3dk buzda bekletilip ABI3130 cihazına yüklenmiştir.

Genetik çeşitliliğin değerlendirilmesinde kullanılan temel parametreler arasında allel sayısı (Na), ortalama allel sayısı (MNa), gözlemlenen (Ho) ve beklenen heterozigotluk (He), ortalama heterozigotluk ( $\hat{H}$ ), Hardy–Weinberg dengesine uygunluk düzeyi exact test, Wright’ın F-istatistikleri (FIT:popülasyon içi, FIS:popülasyonlar arası ve FST:genetik farklılıkları) ve null allel frekansları yer almaktadır (Weir ve Cockerham, 1984; Wright, 1931). Hardy-Weinberg dengesi, bir popülasyonda allel ve genotip frekanslarının nesiller boyunca sabit kaldığını varsayan bir modeldir. Bir lokusun bu dengeye uyup uymadığı, genetik sürüklenme, göç, seleksiyon ya da çiftleşme örüntülerinde bir sapma olup olmadığını gösterebilir. Elde edilen P değerleri 0,05’ten küçük ise, ilgili lokusun Hardy-Weinberg dengesinden anlamlı şekilde saptığı kabul edilmektedir (Wigginton vd., 2005). Bu değişkenler, GenAlEx yazılımı (Peakall ve Smouse, 2006; Peakall ve Smouse, 2012) ve POPGENE programı (Yeh vd., 1997) kullanılarak hesaplanmıştır. Irklar arasındaki genetik uzaklıkların görselleştirilmesinde Nei’nin Da mesafe ölçütü temel alınarak oluşturulan dendrogramlar kullanılmış; dendrogram yapılarının istatistiksel güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla 1000 bootstrap tekrarıyla analiz gerçekleştirilmiştir (Nei, 1983). Bu yaklaşım, popülasyonlar arası genetik ilişkilerin daha sağlam ve yorumlanabilir bir şekilde ortaya konmasını sağlamaktadır.

#### **2.4. Kulak Dokusunun Elde Edilmesi**

Kulak kepçesi traşlanıp %70’lik alkol ile iç ve dış yüzeyi silindikten sonra 5mm medikal punch (Şekil 2.2 solda) yardımı ile kulak dokusu 15ml’lik falkon tüplere (Şekil 2.2 sağda) alınmıştır. Dokuları Hücre Kültürü laboratuvarına ulaşana kadar 15ml’lik falkon içinde, Pen-strep (10.000 ünite/ml Penisilin ve 10mg/ml Streptomisin karışımı, VivaCell Bioscience, Almanya) ile hazırlanmış fosfat tamponlu salin (Phosphate-Buffered Saline, PBS)

solüsyonlarda muhafaza edilmiştir. Falkona alınan dokular laboratuvara 1 saat içerisinde ulaştırılmıştır.



**Şekil 2.2.** Kulak dokusu elde etmek için kullanılan 5mm steril medikal punch (solda) ve Yerli Kara sığırında kulak dokusundan punch yardımı ile örnek alım aşaması (sağda)

## 2.5. Kulak Dokusundan Hücre İzole Edilmesi

Kulak dokusundan primer hücre elde edilebilmesi için yapılan çalışmalar UHAEM Genetik Laboratuvarında bulunan Hücre Kültürü Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada TÜRK-HAYGEN projesi kapsamında Arat vd. (2008) tarafından önerilen protokol takip edilmiştir.

Uygun şekilde korunan doku örnekleri, canlılığını yaklaşık 3–4 gün süreyle sürdürebilmektedir. Doku numuneleri, Hücre Kültürü Laboratuvarı'na getirildikten sonra laminar hava akım kabini altında Pen-Strep'li PBS'den alınarak %2 Pen-Strep'li içeren yeni bir PBS çözeltisine aktarılmıştır. Kılıklı dış yüzey bistüri yardımıyla dikkatlice temizlenirken, alttaki bağ doku ve kıkırdak kısmı steril bir petri kabına alınmıştır. Dokuların kurumasını önlemek amacıyla üzerine kontrollü miktarda PBS damlatılmıştır. Steril pens ve bistüri kullanılarak, dokular iğne başı büyüklüğünde küçük parçalara ayrılmış ve 35 mm çapındaki hücre kültür petrilere dikkatlice yerleştirilmiştir. Yapışmanın gerçekleşmesi için yaklaşık 2–3dk beklenmiş ve ardından besiyeri, petri kenarından yavaşça eklenerek doku parçalarının üstü tamamen kapatılmıştır. Kültür petrilere nazikçe inkübatöre yerleştirilmiş ve sonraki günlerde olası kontaminasyon açısından gözlemlenmiştir. Kontamine olduğu saptanan kültürler %70 etanolla yüzeysel olarak kaplanarak tıbbi atık prosedürüne uygun şekilde imha edilmiştir. Ekimden itibaren ilk yedi gün boyunca kültür kaplarının hareket ettirilmemesi önerilmektedir. Yedinci günün sonunda mikroskopla (NanoEnTek, Juli™ Br-FL Station, Kore) yapılan

değerlendirme ile hücre proliferasyonu gözlemlenmiştir. İlk medyum değişimi bu aşamada gerçekleştirilmiş ve takip eden günlerde iki günde bir yenilenmeye devam edilmiştir. Hücre tabakasının petrinin tabanını kaplamasıyla birlikte, dokular pastör pipeti yardımıyla uzaklaştırılmıştır; ardından tripsin işlemi uygulanarak hücreler pasajlanmıştır. Eğer hücreler hemen kullanılmayacaksa, uygun kriyoprotektan ile dondurma prosedürüne alınarak uzun süreli saklama sağlanmıştır.

Tez önerisinde belirtilen bu protokol denenmiş ancak sonuç alınamamıştır. Bunun üzerine aynı yöntem farklı bir laboratuvar ortamında hücre kültürü aşamalarını tamamlamak amacıyla Ankara Üniversitesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda bulunan hücre kültür laboratuvarında (Şekil 2.3) devam edilmiştir. Aynı protokol denemesinde kontaminasyonla karşılaşılması ve sürecin uzun olması sebebiyle mekanik olarak primer hücre elde edilmesi aşaması yerine enzimatik yöntemler denenmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Bunun için öncelikle tripsin enzimi (Öztürk, 2022; Wiesmann, 1999) ile çalışılmıştır.



**Şekil 2.3.** Hücre Kültürü çalışmaları (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Laboratuvarı)

Kulak dokusundan hücre elde edilmesi için 15ml'lik falkonlara alınan kulak dokuları Hücre Kültürü laboratuvarına getirilerek çalışılmıştır.

- 1) Doku bisturi yardımıyla küçük parçalara ayrılarak petride yüzeyi tamamen kapanacak kadar Tripsin eklenerek ve 3-4 saat 36,5°C CO<sub>2</sub> inkübatöre kaldırılmıştır.
- 2) Hücreler mikroskopta incelenmiştir ardından enzimle aynı miktarda Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) eklenmiş ve gözlemlendikten sonra 100 mikronluk filtrelerde süzölmüştür.
- 3) Süzölen sıvı santrifüj edilmiştir.

- 4) Hazırlanan besiyerinde 100ml DMEM, 10ml Fetal Bovine Serum (FBS, 0,1µm Membran Filtered, Biological Industries, BI) ve 1ml Pen-Strep resüspanse edildikten sonra 25cm<sup>2</sup>'lik flaske aktarılmıştır. Gece boyu inkübatörde hücrelerin flask yüzeyine tutunabilmesi için inkübe edilmiştir.
- 5) Hücreler mikroskopta incelenmiş ve kontaminasyon yok ise hücre kazıyıcı (cell scraper) yardımıyla hücreler flask yüzeyinden kaldırılmıştır.
- 6) Sayım yapılarak belirlenen oranda dondurma ya da pasajlama için kaldırılmıştır.

Bu protokol ile elde edilen hücre sayısı az olup Comet sayımı için yeterli olmadığı gözlenmiştir.

Dokudan hücre izole edilmesinde mekanik ve enzimatik yöntemler denenmiştir. Tez önerisinde mekanik olarak dokunun parçalanmasından sonra inkübasyon aşamasında hücrelerin ayrılması planlanmış ancak denemeler sırasında kontaminasyon ile karşılaşmış ve farklı protokoller denenmesine ihtiyaç olmuştur. İlk olarak tripsin enziminden faydalanılmış ancak bu protokolle elde edilen hücre sayısı Comet sayımı için yeterli olmamış farklı enzim denemesine ihtiyaç olmuştur. Hücre izole etmek için accutase, dispase, collagenase enzimi gibi enzimlerin çalıştığı bilinmektedir (Reicharda ve Asosingh, 2002). Bu araştırmalar sonucunda kollajenaz (Nordmark Collagenase NB4) enziminden faydalanılmış ve kollajenaz ile bir gece boyunca muamele edilen dokulardan hücrelerin ayrıldığı gözlemlenmiştir. Üretici firma tarafından kollajenaz enziminin fare fibroblast hücre kültürü için düşük yoğunlukta gece boyu doku ile inkübatöre bırakılması önerilmiş ve bu çalışmada yapılan denemelerde sığır fibroblast için enzimde aynı yoğunluk ile deneme yapılmıştır. Ayrıca dokunun parçalara ayrılmasında bistüri dışında homojenizatör yardımı ile parçalanması da aynı enzim ile denenmiş belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Bu sebeple analizlerde dokunun küçük parçalara ayrılması için bistüri kullanılmaya devam edilmiştir.

Tez çalışmasında, sığır kulak dokusundan primer hücre kültürü elde etmek amacıyla çeşitli protokoller denenmiştir. Yetişkin insan dermal fibroblastlarının primer kültürlerinin kurulması ve sürdürülmesi için ayrıntılı prosedürler bulunmaktadır. Kollajenaz enzimi, bağ dokusundaki kollajeni parçalayarak fibroblastların serbest kalmasını sağlar. Bu süreç, hücrelerin canlılığını ve proliferasyon kapasitesini koruyarak, uzun süreli kültürler için uygun bir başlangıç noktası oluşturur (Kisiel ve Klar, 2019). Bu protokolü, sığır kulak dokusundan primer hücre kültürü elde etmek için uyarlamak mümkündür. Bazı modifikasyonlar yapılarak yeterli hücre sayısını ( $1 \times 10^5$ ) elde etmek için en uygun protokol olarak Hentzer ve Kobayasi (1978) ile Kisiel ve Klar (2019) protokollerinin modifikasyonları tercih edilmiştir.

Yukarıda özetlenen optimizasyon çalışmaları ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda örnek alımı ve primer hücre kültürü elde etme aşamaları aşağıdaki şekilde tamamlanmıştır.

1) Kulak kepçesi üzerindeki kıllar jilet yardımıyla kesilmiş ve ardından %1Dezen ile silindikten sonra %70'lik alkolle temizlenip ve pamukla silinmiştir. 5mm medikal biyopsi punch ile dokular 15ml'lik falkon içine alınmıştır. Punch ucunda kalan doku steril bistüri yardımıyla 5ml'lik Pen-Strep içeren PBS içeren falkon içine itilmiştir. Bu solüsyonlar doku alınana kadar +4°C dolapta saklanmıştır. Doku alınırken falkon tüpler buza gömülmüş ve doku alındıktan sonra da buz içinde falkonlar laboratuvara getirilmiştir. 15ml'lik falkonlarda laboratuvara getirilen dokular beklemeden çalışılmıştır.

2) Petri kabına aktarılan doku parçaları çevresindeki kıl, kan, deri gibi yapılar uzaklaştırılıp 1-2ml PBS ile yıkanmış ve sonrasında 11 numara sivri uçlu steril bistüri ucu ile küçük parçalara ayrıldıktan sonra dokuların üzeri ve petri tamamen kaplayacak kadar kollajenaz (yaklaşık 5-7ml) eklenmiştir. Mikroskopta dokudan ayrılan hücreler gözlemlenmiştir. 1 saat arayla tekrar mikroskopta izlenmiştir. Yaklaşık 2 saat sonra üzerine 2ml (enzimin 1/3 ü) DMEM eklenmiştir. 100 mikronluk hücre süzgecinden (cell strainer) geçirilen hücreler vasat (%1 Pen-Strep+DMEM) hazırlanarak flasklarda hücrelerin çoğalması için CO<sub>2</sub> inkübatörde bir gece flask yüzeyine tutunması için bırakılmıştır.

3) İnkübasyonun 20. saatinde petrideki dokularla birlikte tüm sıvı 100 mikronluk süzgeçten süzölmüştür. Öncesinde süzgeç 1-2ml PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında 50ml'lik falkona geçirilen süzgeçten tüm doku ile sıvı süzölüp santrifüj edilmeden 25'lik flaska aktarılmıştır. Yaklaşık 2 saat hücrelerin yüzeye tutunmaları beklenmiş ve 2 saat sonrasında üstteki sıvı uzaklaştırılmıştır. Serum içeren besiyeri hazırlanarak hücreler üzerine eklenip mikroskopta gözlemlenmiştir. Bu amaçla +4°C'de saklanan 100ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), -20°C'de muhafaza edilen %5 (10ml) Fetal Bovine Serum ve %2 (2ml) Pen-Strep solüsyon eklenerek falkon tüplerde karıştırılmış ve her defasında bu karışım yeniden hazırlanmıştır.

7 gün boyunca flasklardaki hücreler gözlemlenip besiyeri (hücre canlılığı ve kontaminasyon durumuna göre besiyeri veya tam besiyeri) değiştirilmiştir ve hücrelerin flask yüzeyini kaplaması sonrasında 25cm<sup>2</sup>lik flastaki hücreler, 75cm<sup>2</sup> flasklara alınarak yüzeye tutunmaları için inkubatöre kaldırılmıştır. Flaskta yüzey kaplayan hücreler steril kazıyıcı ile tek yönde kazıma işlemi sonrası Şekil 2.4'te görüldüğü gibi flask yüzeyinden kaldırılmıştır.

Hücreler falkon tüpünde 15dk 15.000rpm’de santrifüj edildikten sonra. 1:1 oranında trypan blue ile boyanarak hücre sayımları yapılmıştır.



**Şekil 2.4.** Falkon tüpte laboratuvara getirilen dokular petriye alındıktan sonra (solda). Dokular bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılıp enzim ile yüzeyi kaplandıktan sonra(ortada). Hücre kazıyıcı yardımı ile hücrelerin flasktan kaldırılması (sağda)

75 cm<sup>2</sup>’lik flasklerdeki hücreler 3 kısma bölünüp, bir kısım dondurma amacıyla tutulurken, bir kısım Comet analizi diğer kısım ise RNA analizleri için ayrılmıştır. Comet analizi için ayrılan hücreler vasat içinde tutulup aynı gün analize alınmış, RNA izolasyonu için ise RNAProtect ile muamele edilerek çalışmalara devam edilmiştir.

## 2.6. Hücre Örneklerinin Dondurulması

Dondurma aşaması Borges vd. (2020) domuz fibroblast dondurma aşamasında kullandıkları protokol modifiye edilerek aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

1) 37°C’de inkübatöre bırakılan besiyerinde hücreler inkübatörden çıkarılmıştır ve hücrelere zarar vermeden besiyeri aspire edilmiştir.

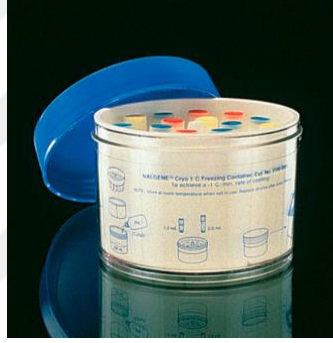
2) 6 ml Dulbecco’nun fosfat tamponlu salini (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS) ile yıkanıp DPBS aspire edilmiştir.

3) Hücreleri flasktan kaldırmak için steril kazıyıcı yardımı ile flask yüzeyinde kazıma işlemi sonrası flasklar mikroskopta gözlemlenmiştir ve flask yüzeyinde kalan hücre var ise 2ml Trypsin ile muamele edilmiştir ve mikroskopta yassı hücrelerin toplandığı gözlemlenmiştir. Bu aşama 2-3 dakikayı geçmemeli ve hemen ardından 4 ml besiyeri (2X Trypsin) eklenmiştir. 15 ml falkona aktararak 2000rpm’de 5 dk santrifüj edilip santrifüj

sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan besiyeri 1ml hücreye eklenip kibarca pipetleme yapılmıştır.

4)%80 Fetal Bovine Serum ve %20 Dimetil Sülfoksit (DMSO) ile hazırlanan dondurma solüsyondan 1ml ve 1ml de besiyerinde hazır olan hücrelerden alınarak total hacim 2ml olacak şekilde karıştırılmıştır (Arat vd., 2008).

5) Kriyoviyale alınan örnekler Mr. Frosty (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) kaplarında dondurulmuştur (Şekil 2.5'te Mr. Frosty kabına %100 isopropanol eklenmiş ve içindeki süngerlere kryovialler yerleştirilmiştir). Dakikada 1°C soğuma sağlayan kaplara yerleştirilen örnekler gece boyu -80°C dolapta saklandıktan sonra uzun süreli saklama için -196°C azot tanklarına transfer edilmiştir (Abreu vd., 2012).



**Şekil 2.5.** Mr. Frosty dondurma kabı

Bu çalışmada, primer hücre kültürü elde etmek amacıyla aşağıdaki iş akışı (Şekil 2.6) izlenmiştir. İlk olarak, materyal kaynağı olarak kullanılacak uygun hayvanların seçimi yapılmıştır. Seçim kriterleri, hayvanların genetik arka planı, sağlık durumu ve deneysel gereksinimlere göre belirlenmiştir. Doku örnekleri, steril şartlar altında medikal punch yardımıyla alınmıştır. Elde edilen doku örnekleri steril falkon tüpler içerisine konularak, soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılmıştır. Laboratuvar ortamında dokular küçük parçalara ayrılarak, uygun enzim (örneğin kollajenaz veya tripsin) içeren solüsyonlarla inkübe edilmiştir. Bu işlem, hücrelerin doku matrisinden ayrılmasını sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Enzimatik inkübasyon sonrası örnekler mikroskop altında gözlemlenerek hücre ayrışması değerlendirilmiştir. Hücre sayımları trypan blue ile boyama sonrası otomatik ölçüm ile değerlendirilmiştir. COMET analizi, RNA izolasyonu ve kriyoprezervasyon çalışmaları, her bir işlem için  $1 \times 10^5$  hücre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.6. Hücre Kültürü iş akış şeması

## 2.7. RNA Elde Edilmesi ve RT-qPCR Analizleri

### 2.7.1. Total RNA İzolasyonu

Bu uygulama Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı RNA Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. RNase AWAY™ (ThermoFisher Scientific, İngiltere) ile uygulamanın gerçekleştirileceği laboratuvar ortamı ve laboratuvar ekipmanının temizliği sağlanarak ve işlemler tamamen RNAase ari şartlarda sürdürülmeye gayret edilmiştir. Gen bankasından çözdürülen hücre örnekleri 1:5 oranında RNA protect (Qiagen, Almanya) kullanılarak 5 haftaya kadar +4°C'de saklanabilmektedir. RNA stabilizasyonu sağlanması amacıyla -80°C'de saklanan hücre kültürü örnekleri ( $1 \times 10^5$  hücre/ml) buz üzerinde oda sıcaklığında çözdürülmüş ve ardından +4°C'de 2600g'de 15dk boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlemin ardından hücresel bileşenleri tamamen uzaklaştırmak için +4°C'de 10000g'de 5dk daha santrifüj işlemi tekrarlanmış ve hücrelerden yoksun süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. DMSO ile dondurulmuş hücrelerde bu etkiyi kaldırmak için +4°C dolapta soğuk tercih edilen PBS ile yıkama yapılmıştır. Total RNA izolasyonu silika kolon bazlı ticari bir kit (Qiagen-RNeasy Mini Kit-50) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri spektrofotometre (NanoDrop ND2000, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile farklı dalga boylarında ölçülerek saflık ve kalite açısından değerlendirilmiştir. İzolatlar bir sonraki işleme kadar -80°C'de saklanabilecektir.

Bir ml RNA protect solüsyonu üzerine 200 µl donmuş ve donmamış hücre örneklerinden eklenerek, RNA izolasyonu için kitin tavsiye ettiği protokol doğrultusunda çalışılmıştır.

1. Maximum 3000rpm'de hücreler çöktürülmüştür, hücre peletini kaldırmadan RNA protect uzaklaştırılmıştır.
2. 1 ml RLT buffer içinde 10µl Betamerkaptaetonol eklenmiştir (bu karışım oda sıcaklığında 1 ay kadar durabilir).
3. RPE buffer içinde 4 katı etanol eklenerek buffer hazırlanmıştır.
4.  $5 \times 10^5$  hücre yoğunluğundaki hücreler için 350µl RLT buffer eklenerek lizat oluşturulmuştur.
5. Bu lizatın üzerine 350µl %70'lik Etanol eklenmiştir. Pipetlenerek karıştırılmıştır.
6. Toplam 700 µl olan karışım alınarak RNeasy Mini Spin kolonlara aktarılmıştır. Bu spin kolonlar kapakları kapatılarak 10000rpm'de 15 saniye santrifüj yapılır ve alttaki sıvı uzaklaştırılmıştır.

7. 700 µl buffer RW1 RNeasy spin kolon üzerine eklenmiş, bu spin kolonlar kapakları kapatılarak 1000rpm'de 15 saniye santrifüj edilip ve alttaki sıvı uzaklaştırılmıştır.
8. 500 µl buffer RPE RNeasy spin kolon üzerine eklenmiş, bu spin kolonlar kapakları kapatılarak 1000rpm'de 15 saniye santrifüj edilip ve alttaki sıvı uzaklaştırılmıştır.
9. 500 µl buffer RPE RNeasy spin kolon üzerine eklenip, bu spin kolonlar kapakları kapatılarak 1000rpm'de 2dk santrifüj edilir ve alttaki sıvı uzaklaştırılmıştır.
10. 1dk maximum hızda santrifüj yapılarak membranda kalan etanol uzaklaştırılmıştır.
11. Temiz ependorf tüplere spin kolonlar aktarılıp ve 30-50 µl arasında RNase free su eklenip ve 10000rpm'de 1dk santrifüj edilmiştir.

Bütün bu işlemler tamamlandıktan sonra spektrofotometre (NanoDrop ND2000, Thermo Fisher Scientific, ABD) ölçümleri yapılarak analiz için kullanılacak sulandırma oranları hesaplanmıştır.

### 2.7.2. cDNA Eldesi

Elde edilen izolatlardan ticari kit (Qiagen, Quantitect Reverse Transcription Kit) ile üreticinin talimatları doğrultusunda cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kitin önerisi doğrultusunda en iyi oran 100 ng ölçülen RNA ile cDNA eldesi olmuştur. Sonraki işlemlerin hemen yapılmaması durumunda cDNA örneklerinin degradasyonunu engellemek amacıyla -20°C'de saklanması mümkündür. Sulandırılmamış cDNA örnekleri 2-8°C'de 4 gün, -20°C'de 5 hafta saklanabilmektedir. Revers transkripsiyon reaksiyonu için izlenen protokol aşağıdaki gibidir.

DNA kontaminasyonunu engellemek amacıyla, kitin içinden çıkan gDNA wipeout çözündürülüp vorteks edilmiştir. RNA degradasyonu en aza indirmek için bütün reaksiyon buzda çalışılmıştır. RNase inhibitörü ve dNTP'ler kitin içinde temin edildiği için ekleme yapmaya gerek yoktur. Dondurularak saklanan RNA örnekleri, analiz öncesinde çözündürülmek üzere buz üzerinde bekletilerek oda sıcaklığına getirilmiştir. Revers transkripsiyon işlemine hazırlık amacıyla kullanılan gDNA Wipeout buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT buffer, RT Primer Mix ve RNase-free su, çözünme işlemi tamamlanana kadar oda sıcaklığında tutulmuştur (Çizelge 2.5). Reaktifler karıştırılırken, her tüp hafifçe vurularak homojenizasyon sağlanmış; ardından karışımlar kısa süreli santrifügasyon ile dibe çöktürülüp,

buz üzerinde stabil kalacak şekilde muhafaza edilmiştir. Bu adımlar, reaksiyonun verimli bir şekilde ilerlemesini sağlamak için dikkatle gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 2.5.** Genomik DNA uzaklaştırmak için kurulan reaksiyon protokolü

| Bileşen                  | Hacim    | Deneyde Kullanılan Hacim |
|--------------------------|----------|--------------------------|
| gDNA Wipeout Buffer, 7x  | 2 µl     | 7 µl                     |
| Template RNA, up to 1 µl | Değişken | 1 µl                     |
| RNase-free su            | Değişken | 6 µl                     |
| Toplam reaksiyon hacmi   | 14 µl    | 14 µl                    |

Reverse transkripsiyon reaksiyon bileşenleri karıştırıldıktan 15dk 42°C’de inkübasyona bırakılır. Bu reaksiyonu inaktive etmek için 95°C’de 3dk inkübe edilir. Real-time PCR için devam etmek için örnekler buzun üzerinde bekletilir ya da -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.6’da bileşenleri verilen Reverse-transcription master mix buz üzerinde hazırlanmıştır. Karışımlar hazırlandıktan sonra buz üzerinde dağıtılmıştır. Reverse transkripsiyon reaksiyon bileşenleri karıştırıldıktan 15dk 42°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bu reaksiyonu inaktive etmek için 95°C’de 3dk inkübe edilmiştir. Real-time PCR öncesinde örnekler de buz üzerinde bekletilmiş ya da -20°C’de muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 2.6.** Reverse transkripsiyon reaksiyon bileşenleri

| Bileşen                               | Hacim |
|---------------------------------------|-------|
| Quantiscription Reverse Transcriptase | 1 µl  |
| Quantiscript RT Buffer, 5x            | 4 µl  |
| RT Primer Mix                         | 1 µl  |
| RNA örneği (Önceki basamaktan)        | 14 µl |
| Toplam Hacim                          | 20 µl |

### 2.7.3. RT-qPCR Analizi

Analizde kullanılacak olan cDNA’lar uygun yoğunluğa ulaşması için sulandırıldıktan sonra PCR analizlerine devam edilmiştir. Çalışmada fibroblast dokusunda housekeeping genler olarak önerilen Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Degrelle vd., 2012) ve GUSB (Toorani vd., 2021) genleri ile DNA hasarıyla ilişkili olduğu bilinen APEX1 geninin (Barzilay ve Hickson, 1995; Tell vd., 2009) kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla bu genlere özgü ileri ve geri yönlü primer dizileri Primer3 programı (Koressaar ve Remm, 2007; Untergasser vd., 2012) kullanılarak tasarlanıp, NCBI BLAST çevrimiçi programı (Altschul

vd., 1990; Altschul vd., 1997) aracılığıyla spesifikliğı kontrol edilmiştir. RT-qPCR analizi için sentezlenen APEX1 geni ile Housekeeping olarak seçilen GAPDH ve GUSB genlerine yönelik seçilen primerlere ait bilgiler Çizelge 2.7’deki gibidir.

**Çizelge 2.7.** RT-qPCR’da çalışılan gen bölgelerine ait bilgiler

| Gen adı ve<br>Ensembl erişim numarası | Baz Dizisi 5’-3’         | TM (°C) | GC(%) |
|---------------------------------------|--------------------------|---------|-------|
| APEX1                                 | F-AGCCCAAGACTGAGCCAGAG   | 61      | 60    |
| ENSBTAG00000002745                    | R-ATACAGAACTGCGCCCTCTC   | 59      | 55    |
| GAPDH                                 | F-AAGGTCGGAGTGAACGGATTC  | 60      | 52    |
| ENSBTAG00000014731                    | R-ATTGATGGCGACGATGTCCA   | 57      | 50    |
| GUSB                                  | F-TCATGACTAACCAGTCACCAGT | 58      | 45    |
| ENSBTAG00000000704                    | R-GCTGCACTCTTTGGTTGTCTC  | 60      | 52    |

TM: Primer Erime Sıcaklığı; GC: GC oranı

BioRad CFX connect cihazı ile SYBR Green temelli ticari bir kit (Qiagen-SYBR Green PCR kiti) üreticinin önerileri doğrultusunda Çizelge 2.8’deki protokole ve Çizelge 2.9’da sunulan koşullara göre gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi kurulmuştur.

**Çizelge 2.8.** Syber Green ile RT-qPCR protokolü

| Bileşen     | Hacim  |
|-------------|--------|
| Syber Green | 5 µl   |
| Primer F    | 0,5 µl |
| Primer R    | 0,5 µl |
| RNase-Water | 3 µl   |
| cDNA        | 1 µl   |
| Total Hacim | 10 µl  |

**Çizelge 2.9.** RT-qPCR reaksiyon koşulları

| Aşama                  | Sıcaklık | Süre      | Döngü Sayısı |
|------------------------|----------|-----------|--------------|
| Reverse Transkripsiyon | 50°C     | 30 dakika | 1            |
| Başlangıç İnkübasyonu  | 95°C     | 3 dakika  |              |
| Denatürasyon           | 94°C     | 15 saniye | 39           |
| Primer Bağlanma        | 55°C     | 30 saniye |              |
| Uzama                  | 72°C     | 30 saniye | ∞            |

Gerçek zamanlı qPCR için RT SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen, Almanya) üretici firmanın protokolleri takip edilerek kullanılan gen ifade seviyeleri ilgilenilen genin housekeeping genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilmiştir. Göreceli gen ifadesi farklılıkları  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü (Livak ve Schmittgen, 2001) ile hesaplanmıştır. Her gen için 2 tekrarlı RT-qPCR yapılarak ve Comet verileri arasında korelasyon indeksi hesaplanmıştır.

Analizler 2 tekrarlı gerçekleştirilerek ve ortalamaları analizde kullanılmıştır. Göreceli ifade farklılıkları ise her bir örnek ve housekeeping geni için elde edilen Cycle threshold (Ct) değerleri kullanılarak 2-Delta DeltaCT formülü (Livak ve Schmittgen, 2001) (Şekil 2.7) ile hesaplanmıştır.

$$\Delta Ct_{örnek} = Ct_{hedef} - Ct_{referans\ gen}$$

$$\Delta\Delta Ct_{örnek} = \Delta Ct_{örnek} - \Delta Ct_{kontrol}$$

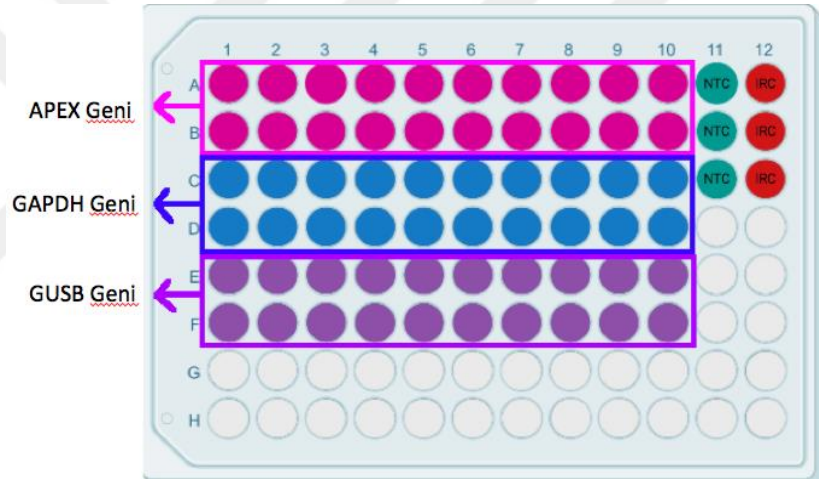
$$Kat\ Değişimi\ RQ_{örnek} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

**Şekil 2.7.** Göreceli gen ifadesi farklılıklarının belirlenmesinde kullanılan  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü (Relative Quantification, RQ)

Gerçek-zamanlı kantitatif PCR deneylerinde hedef genlerin doğru normalize edilebilmesi için kararlı housekeeping gen(ler) seçilmesi gereklidir. Bu çalışmada GAPDH ve GUSB genlerinin tekil kullanımları ile bu iki genin geometrik ortalamasının (Geo\_ort) toplu kararlılık performansı, RefFinder çevrimiçi programı (Xie vd., 2012) kullanılarak değerlendirilmiştir. RefFinder programı  $\Delta Ct$ , BestKeeper, NormFinder ve geNorm algoritmaları üzerinden çalışmaktadır. GAPDH, hücre metabolizmadaki rol oynayan evrensel olarak ifade edilen bir housekeeping gen olup, normalize edici standart olarak kullanılmıştır (Degrelle vd., 2012; Toorani vd., 2021). GUSB geni de GAPDH gibi hücre içi ekspresyon stabilitesi yüksek olan housekeeping genlerden biridir ve karşılaştırmalı analizlerde güvenilir normalize edici olarak tercih edilmiştir.

Bu çalışmada gen ifadesi analizlerini gerçekleştirmek amacıyla 96 kuyucuklu bir RT-qPCR plaka dizaynı (Şekil 2.8) kullanılmıştır. Plaka tasarımı, hedef gen ve housekeeping genlerin ayrı satırlarda organize edilmesi esasına dayanarak gerçekleştirilmiştir. Plaka A ve B satırlarında, hedef gen olarak seçilen APEX1 genine ait örnekler yer almaktadır. Bu dizilim, gen ekspresyonunun teknik tekrarları değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. C ve D satırları

housekeeping genlerinden biri olan GAPDH genine ait reaksiyonlar için, E ve F satırları ise diğer bir housekeeping gen olan GUSB genine ait reaksiyonlar için kullanılmıştır. Plakanın 11. kolonunda yer alan kuyucuklar, negatif kontrol (No Template Control, NTC) ve iç referans kontrol (Inter Run Calibrator, IRC) olarak düzenlenmiştir. NTC'ler, olası kontaminasyonları tespit etmek amacıyla kullanılırken, IRC'ler analizin genel performansını doğrulamak için eklenmiştir. Bu tasarım hem teknik tekrarları içermesi hem de birden fazla housekeeping genle normalize etme imkanı sunması açısından güvenilir ve valide edilmiş gen ekspresyon analizleri elde edilmesine olanak sağlar. Plakalar arası teknik varyasyonu denetlemek ve ifade verilerini doğru biçimde normalize edebilmek amacıyla, her plakanın aynı kuyucuğunda IRC olarak GAK1 örneği kullanılmıştır. Aynı referans örnek üzerinden APEX1, GAPDH ve GUSB genlerine ait Ct değerleri elde edilmiştir. Söz konusu Ct değerlerinin ortalama ve  $\pm$  standart sapma değerleri hesaplanmıştır.



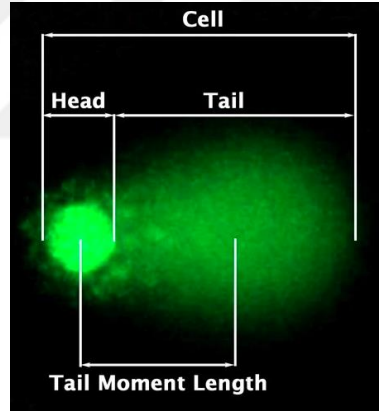
**Şekil 2.8.** RT-qPCR 96 well plaka tasarımı. Bir plaka tek bir ırka ait 1’den 10’a kadar sırasıyla 10 adet sıgır örneklerini incelemek üzere tasarlanmıştır. A ve B sıraları APEX1 geni; C ve D GAPDH geni, E ve F sıraları ise GUSB geni ve bunların teknik replikalarını temsil etmektedir. 11.sıradaki A-B-C kuyucukları APEX1, GAPDH ve GUSB genleri için negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 12. Sıranın A-B-C kuyucukları ise iç referans kontrol olarak çalışılmıştır

## 2.8. Comet Analizleri ve Değerlendirmesi

Dondurulmuş hücrelerin dondurulmamış hücrelerle, DNA hasarı yönünden kıyaslanması için Kuyruklu Yıldız analizi (Comet analizi) yapılmıştır. Comet analizi (tek hücreli jel elektroforezi), ökaryotik hücrelerde deoksiribonükleik asit (DNA) iplik kopmalarını ölçmek için basit bir yöntemdir (Collins, 2004). Bu amaçla gen bankasındaki dondurulmuş hücre örneklerinden her ırka ait 10ar adet ve taze hücre kültüründe çalışılmak üzere yeni toplanan dondurulmamış 10 adet hayvana ait kulak dokusundan elde edilen hücre örnekleri

kullanılmıştır. Comet analizi analizleri Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Elektroforez sırasında, hasar gören hücresel DNA, yapısal harabiyete uğramamış DNA'dan ayrılarak mikroskop altında "kuyruklu yıldız" görünümü verir. Hasarın boyutu genellikle "kuyruklu yıldız kuyruğu" ölçümü ile görsel olarak tahmin edilir. İlk olarak, uygulamadan önce hücreler erimiş agaroz ile karıştırılır. Agaroz jel içerisinde homojen olarak dağılmış hücreler, DNA'yı denatüre eden ve lizise uğratan alkalik içerikli bir tampon çözelti ile işleminden geçirilir. Bu uygulamanın ardından, DNA hasar durumuna göre farklı hareketlilik sergileyen iplikçikleri ayrıştırmak amacıyla numuneler yatay elektroforez sistemine yerleştirilerek belirli bir süre boyunca akım uygulanır. Elektroforez sonrasında numuneler bir DNA boyası (Syber Green) ile boyanır ve floresan mikroskopi ile görüntülenir. Bu durum sonucunda, hasarlı DNA (bölünme ve iplik kopmaları içeren), sağlam DNA'dan uzağa göç eder ve Şekil 2.9'daki gibi bir "kuyruklu yıldız" şekli üretir (Cell Biolabs Kullanım Klavuzu, 2025).



**Şekil 2.9.** Comet analizi Sonucu tek hücrede DNA hasar tespiti (CellBiolabs kullanım klavuzu, 2025)

Comet Analizi için ilk olarak OxiSelect Comet kit STA- 351 75 (Cell Biolabs, ABD) denenmiş olup, aşağıda açıklanan sebeple manuel slayt hazırlama yoluna gidilmiştir. Bu protokol kapsamında önce hücreler erimiş agaroz ile karıştırılmış, agaroz içerisinde sabitlenen hücreler, DNA moleküllerinin gevşemesini ve denatürasyonunu sağlayan lizis tamponu ile alkali çözeltisine maruz bırakılmıştır. Ardından, DNA zincirlerindeki bütünlük bozulmasına bağlı olarak oluşan hareket farklılıklarını ortaya koymak amacıyla numunelere yatay elektroforez uygulanmıştır. Elektroforez süreci tamamlandıktan sonra numuneler kurutulmuş, floresan özellikteki özel DNA boyaları ile boyanıp sonuçlar epifloresan mikroskopi kullanılarak görsel olarak değerlendirilmiştir. Ancak kitin içinden çıkan agar yoğun gelmiş ve

hücrelerin fazla gömülmesinden dolayı görüntü elde edilememiştir. Ayrıca Comet Analizleri için Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvar'ında bulunan mikroskopta, kitin içinden çıkan boya ile uyumlu floresan filtre olmadığından preparatların manuel hazırlanmış, uygun boya (Ethidium Bromür) ile boyanıp ve yüksek çözünürlüklü kamera ile analizlere devam edilmiştir.

Bu tez çalışmasında Comet analizi için kullanılan protokol aşağıdaki gibidir (Singh vd., 1988 modifiye edilerek çalışılmıştır).

1. -80°C'de donmuş saklanan hücreler Comet çalışılacak laboratuvara azot tankında getirilir ve buz üzerinde çözülmesi beklenmiştir. Çözöldükten sonra beklemeden santrifüjde 700G'de 2 dk çöktürölmüştür. Süpernatant uzaklaştırılıp 200µl soğuk PBS ile resüspanse edilmiştir. Sonra tekrar 700G'de 2dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant tekrar uzaklaştırılıp 200µl PBS eklenip kibarca çözdürölmüştür.

2. Kullanılacak solüsyonlar (Lysis Buffer ve Alkalın Solüsyonu) hazırlanmış ve +4°C ortamda muhafaza edilmiştir. Bir gün öncesinden hazırlık yapılarak çalışmaları devam edilmiştir. Çalışmanın yapılacağı gün 95°C ve 37°C su banyoları hazırlanmıştır. Düşük erime sıcaklığındaki agaroz (low melting agarose, LMA) 90-95°C'de su banyosunda 20dk veya sıvı olana kadar ısıtılmıştır. Çalışma kırmızı ışık altında yapılmıştır. Bu sırada lamalar etiketlenmiştir.

3. Lamların (25mm x 75mm) üzerindeki lamel (24mm x 50mm) kibarca sıyrılarak şalelerin içinde bulunan Lysis solüsyonlarına daldırılmış ve 1 saat Lysis solüsyonunda bekletilmiştir.

4. Lizis işlemi tamamlandıktan sonra lamalar, yaklaşık 350 mL elektroforez tamponu içeren tanka, agar kaplı yüzeyleri yukarı gelecek ve rodaj kısımları hizalı olacak şekilde dikkatlice yerleştirilmiştir ve 20dk beklenmiştir. Bu yerleşim elektroforez süresince elektrik alanının tüm numunelere eşit dağılmasını sağlamak açısından kritik öneme sahiptir. Bu sürenin sonunda 350mA 25V akımda 20dk yürütme işlemi yapılmıştır.

5. Preparatlar kibarca kaldırılarak şalelerin içine yerleştirilmiştir. Nötralizasyon solüsyonu şalelerin üstünü kapatacak kadar eklenmiş ve +4°C'de 5 dk beklenmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır.

6. Sonrasında EthidiumBromür (EtBr) ile preparatlar boyanmıştır. Her preparat için 50µl EtBr kullanılır ve 15 dk +4°C’de bekletilmiştir. Sonrasında Comet sayımı için mikroskoba yerleştirilmiştir.

7. Preparatların değerlendirilmesi 40X büyütme ile gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca ölçümlerin hesaplanmasında Comet IV programında (Perceptive Instruments Ltd., UK) kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu hesaplamaları tamamlanmıştır. DNA hasarını görece değerlendirebilmek için pozitif kontrol elde edilmiştir. Aynı zamanda metodu optimize edebilmek için her analizde bir örnek pozitif kontrol olarak çalışılmıştır.

Pozitif kontrol elde edilmesi amacıyla izole edilmiş örnekler (200µl) mikrojel slaytları, büyük tek sarmallı DNA hasarı oluşturmak için 15dk boyunca 20µl 1U/µL DNase enzimi (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile muamele edilmiştir. Slaytlar, 37°C’de 30dk süreyle PBS ile hafifçe yıkanmıştır ve daha önce tarif edildiği gibi kuyruklu yıldız testi için işlenmiştir (Gutierrez vd., 2011). DNase enzimi dışında DNA hasarı elde etmek için UV ışın (254nm) altında 24 saat maruz bırakmak ya da %3’lük hidrojen peroksit ile muamele etmek de uygulanabilmektedir (Evans vd., 2016). Negatif kontrol grubunun oluşturulmasında, sahadan elde edilen kulak dokusundan izole edilen primer hücreler referans materyal olarak kullanılmıştır.

40X büyütme EtBr (eksitasyon uyarılma filtresi 546nm, barrier filtresi 590nm dalga boyunda) boya için uygun kamera (yüksek çözünürlüklü CCD kamera) sayımlar yapılmıştır ve ölçümler Comet Assay IV programında (Perceptive Instruments Ltd., UK) analiz edilmiştir. Bu analiz programında, DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan üç temel parametre hesaplanmaktadır: kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu yüzdesi ve kuyruk momenti. Kuyruk uzunluğu, comet (komet) yapısında baş bölgesinden itibaren elektroforezle göç eden DNA segmentinin mikrometre (µm) cinsinden uzunluğunu ifade eder. Kuyruk yoğunluğu yüzdesi, kuyruk bölgesinde bulunan DNA miktarının toplam hücresel DNA’ya oranının yüzde olarak ifadesidir. Kuyruk momenti ise, DNA hasarını niceliksel olarak değerlendiren bir parametre olup, kuyruk uzunluğu ile kuyruk bölgesindeki DNA oranının çarpımı şeklinde hesaplanır (Collins vd., 2023).

Gen Bankası örneklerindeki dondurmanın etkilerini Comet analizi ile değerlendirmek için kulak dokusundan izole edilen dondurulmamış hücrelerden Comet analizi yapılmış ve kontrol grubu olarak değerlendirmeye alınmıştır. Deneysel gruplarla karşılaştırmalarda referans olarak kullanılacak kontrol grubu için, varyasyonu azaltmak ve deneysel gücü artırmak amacıyla tek bir ırk (Yerli Kara) tercih edilmiştir. Böylelikle, gözlemlenen DNA hasarının yalnızca uygulanan muameleye atfedilmesi ve ırksal farklılıklardan kaynaklanan olası karışıklıkların önlenmesi sağlanmıştır.

Veriler kuyruktaki DNA yüzdesinin ortalama ve standart sapması olarak hesaplanmıştır. Her örnek için 100 Comet hücre sayımı hesaplanarak değerlendirilmiştir. Test toplamda 6 defa gerçekleştirildiği için DNase ile elde edilen pozitif kontrol grubu için toplamda 600 Comet hücresi sayılmış ve değerlendirilmiştir.

## 2.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler kullanılan materyal ve veri setine göre değerlendirilmiştir.

Bu tez kapsamında, DNA örneklerinden elde edilen fragment analizi verileri üzerinden popülasyonların genetik çeşitliliği çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Analiz sürecinde, allel sayısı ( $N_a$ ), ortalama allel sayısı ( $MNa$ ), gözlemlenen ( $H_o$ ) ve beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ), ortalama heterozigotluk ( $\hat{H}$ ), Hardy–Weinberg dengesine uyum düzeyi, Wright’a ait F-istatistikleri ( $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ ) ile null allel frekansları gibi parametreler dikkate alınmıştır (Weir ve Cockerham, 1984; Wright, 1931). Bu hesaplamalar GenAlEx (Peakall ve Smouse, 2006; Peakall ve Smouse, 2012) ve POPGENE (Yeh vd., 1997) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, popülasyonlar arasındaki genetik uzaklıkları incelemek amacıyla Nei’nin Da uzaklık matrisi temel alınarak oluşturulan dendrogramlarda, topolojik güvenilirlik 1000 tekrar içeren bootstrap analizi ile test edilmiştir (Nei, 1983). Bu yöntemsel yaklaşım, farklı ırklar arasındaki genetik yapısal ilişkilerin detaylı şekilde ortaya konmasına olanak sağlamıştır.

RT-qPCR analizlerinin sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesi Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories, 2019) yazılımı üzerinden hesaplanmıştır. Bütün istatistiksel analizlerde  $\Delta C_t$  değeri kullanılmış ve IBM SPSS Statistics (IBM Corp., 2023) paket programında bağımsız t-testi ile değerlendirilmiştir.

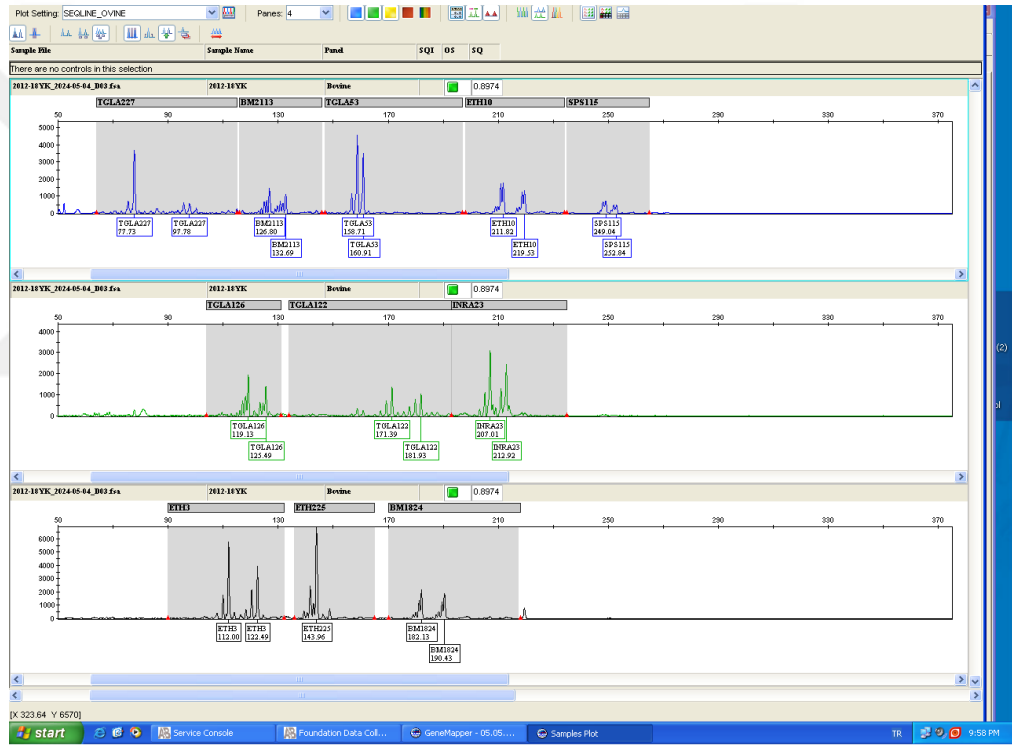
Comet analizinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi IBM SPSS Statistics yazılımı (Version 30.0; IBM Corp., 2023) ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve Gen Bankası grubu arasında DNA hasarı yönünden farklılıklarının belirlenmesi amacıyla istatistiksel analizi için tanımlayıcı istatistikler (ANOVA testleri) ve Dunnet t-testi uygulanmıştır. p değerinin 0,05'ten yüksek olması durumunda, verilerin normal dağılım gösterdiği kabul edilmiştir. Varyans analizlerinde bağımsız faktörler olarak ırk, dondurulmuş ve dondurulmamış örnekler tanımlanırken bağımlı faktörler olarak kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirilmek için kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki farklar, anlamlılık düzeyi  $p \leq 0,05$  olan en az anlamlı test ile değerlendirilmiştir.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. DNA İzolasyonu ve Fragment Analizleri

Kutuların üzerinde yazan numaralar, kulak küpe numaraları, DNA konsantrasyonları, 260/280 oranları ile sulandırma oranları her ırk için ayrı tablo olarak Ek3'te verilmiştir. Tüm DNA örnekleri fragment analizi için ABI 3130 programında çalıştırıldıktan sonra elde edilen amplikonlar GeneMapper yardımı görselleştirilmiş ve mikrosatellitlere ait allel uzunlukları belirlenmiştir. Analiz tamamlandıktan sonra elde edilen pikler için Şekil 3.1'de örnek verilmiştir.



Şekil 3.1. Gen Bankası örneklerinde bir Yerli Kara DNA'sına ait mikrosatellit allel görüntüleri

Mikrosatellit analizlerinin değerlendirilmesi için GenAIEx, GenePOP ve Structure analizleri ile hesaplanmıştır. Çalışma kapsamında, altı farklı popülasyonda (ırklar bazında) incelenen 11 mikrosatellit lokusu üzerinden toplamda 266 allel tespit edilmiştir. En yüksek allel çeşitliliği, Yerli Kara (YK) popülasyonunda TGLA122 lokusunda gözlenmiş ve bu lokusta 20 farklı allel saptanmıştır. Buna karşılık, Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) popülasyonunda ETH10 lokusunda sadece 5 allel tanımlanarak en düşük varyasyon belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** Popülasyonlarda ırklara göre gözlenen allel sayıları

|                | <b>YK</b> | <b>BOZ</b> | <b>DAK</b> | <b>YGS</b> | <b>Zavot</b> | <b>GAK</b> |
|----------------|-----------|------------|------------|------------|--------------|------------|
| <b>TGLA227</b> | 11        | 13         | 12         | 14         | 14           | 9          |
| <b>BM2113</b>  | 10        | 12         | 11         | 14         | 13           | 11         |
| <b>TGLA53</b>  | 11        | 15         | 12         | 14         | 16           | 13         |
| <b>ETH10</b>   | 10        | 11         | 5          | 8          | 6            | 7          |
| <b>SPS115</b>  | 8         | 8          | 9          | 11         | 8            | 10         |
| <b>TGLA126</b> | 12        | 8          | 7          | 9          | 8            | 6          |
| <b>TGLA122</b> | 20        | 13         | 12         | 17         | 18           | 14         |
| <b>INRA23</b>  | 7         | 7          | 9          | 10         | 10           | 8          |
| <b>ETH3</b>    | 12        | 12         | 10         | 10         | 10           | 10         |
| <b>ETH225</b>  | 7         | 7          | 9          | 9          | 11           | 8          |
| <b>BM1824</b>  | 10        | 6          | 7          | 12         | 11           | 11         |

Bütün ırklarda çalışılan mikrosatellit lokuslar bakımından genetik çeşitlik parametreleri Çizelge 3.2’de sunulmuştur. Lokus başına gözlenen alel sayısı (Na) TGLA126 için 12 ve TGLA122 için 28 arasında değişmiş olup, yüksek allel sayıları popülasyonun zengin bir genetik yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Etkili alel sayısı (Ne), tüm lokuslarda görece yüksek olup, genetik çeşitliliğin eşit dağılmadığı durumları da yansıtacak şekilde ETH10 için 4,79 ile TGLA53 için 11,28 arasında değerler almıştır. Çalışmada belirlenen gözlenen heterozigotluk (Ho) değerleri, en düşük SPS115 için 0,60 ve en yüksek TGLA227 için 0,88 olarak hesaplanmıştır. Beklenen heterozigotluk (He) düzeyleri ise SPS115 için 0,79 ile TGLA53 için 0,91 aralığında değişim göstermiştir; bu durum, genel olarak değerlendirilen mikrosatellit lokuslarının yüksek düzeyde genetik çeşitlilik sergilediğini ortaya koymaktadır.

Fis istatistiği lokuslar arasında farklılık göstermekte olup 0,019 (TGLA227) ile 0,245 (SPS115) arasında değişmektedir. Pozitif Fis değerleri, popülasyon içerisinde inbreeding düzeyinin düşük ila orta seviyede olduğunu göstermektedir. PIC değerleri ise tüm lokuslarda 0,75’in üzerinde bulunmuş ve en yüksek bilgilendirici güce sahip lokusun TGLA53 olduğu belirlenmiştir (PIC=0,905) (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Bütün popülasyonda çalışılan mikrosatellit lokuslar bakımından gözlenen allel sayısı (Na), etkili allel sayısı (Ne), gözlenen heterozigotluk (Ho), beklenen heterozigotluk (He), polimorfizm bilgi içeriği (PIC) ve akrabalı yetiştirme katsayısı (FIS). Koyu renkle belirtilen değerler en yüksek ve en düşük değerleri ifade etmektedir

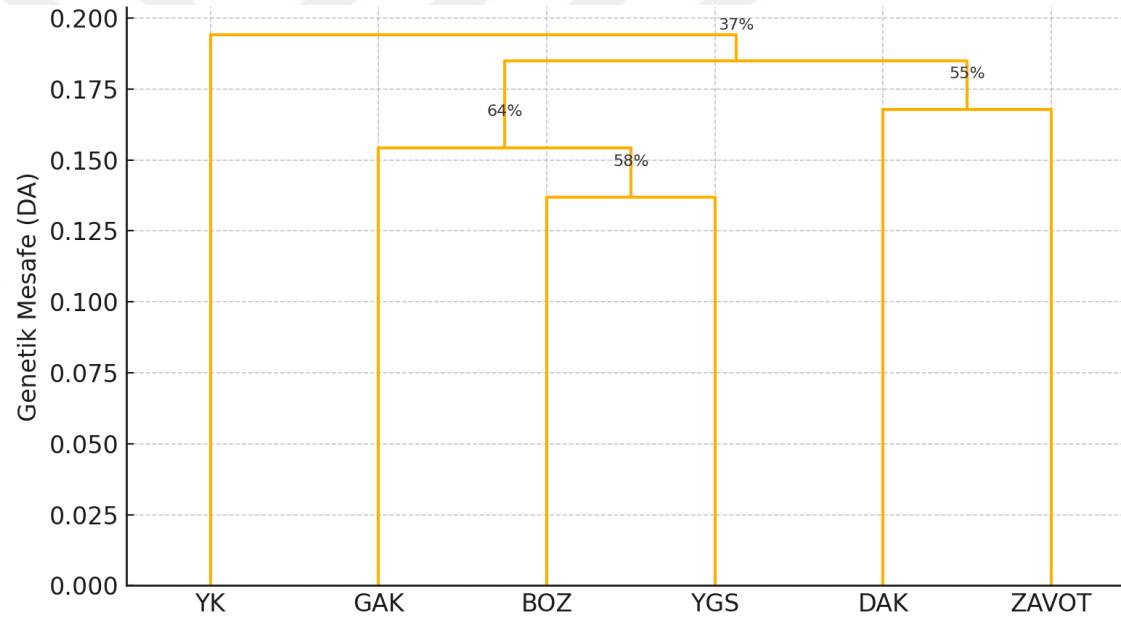
| Lokus   | Na        | Ne              | Ho              | He              | Fis             | PIC             |
|---------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| TGLA227 | 15        | 9,559089        | <b>0,878261</b> | 0,895388        | 0,019128        | 0,886051        |
| BM2113  | 19        | 8,927464        | 0,841667        | 0,887986        | 0,052162        | 0,877744        |
| TGLA53  | 21        | <b>11,28527</b> | 0,783333        | <b>0,911389</b> | 0,140506        | <b>0,904862</b> |
| ETH10   | 16        | <b>4,795205</b> | 0,633333        | <b>0,791458</b> | 0,199789        | <b>0,76655</b>  |
| SPS115  | 14        | 4,8698          | <b>0,6</b>      | 0,794653        | 0,244953        | 0,775323        |
| TGLA126 | <b>12</b> | 4,902128        | 0,816667        | 0,796007        | <b>-0,02595</b> | 0,768183        |
| TGLA122 | <b>28</b> | 9,789259        | 0,858333        | 0,897847        | 0,04401         | 0,890713        |
| INRA23  | 15        | 6,464646        | 0,683333        | 0,845313        | 0,19162         | 0,828902        |
| ETH3    | 18        | 7,1982          | 0,816667        | 0,861076        | 0,051575        | 0,846671        |
| ETH225  | 14        | 6,985205        | 0,608333        | 0,85684         | <b>0,290027</b> | 0,840287        |
| BM1824  | 15        | 5,361132        | 0,758333        | 0,813472        | 0,067782        | 0,787705        |

Farklı sığır ırklarında 11 mikrosatellit lokus için hesaplanan exact test p değeri sonuçları Çizelge 3.3'te sunulmuştur. Bu p değerleri, her bir lokusun Hardy-Weinberg Denge (HWD) durumunu değerlendirmek amacıyla yapılan testler sonucunda elde edilmiştir.

İrklar arası mesafenin belirlenmesinde kullanılan Ne'nin Da mesafe analizi sonuçlarına göre çizdirilen filogenetik ağaç (dendrogram) (Şekil 3.2), çalışmaya dahil edilen bireyler arasında genetik mesafeye dayalı olarak oluşan alt grupları göstermektedir. Genetik benzerliğe göre yapılan kümeleme sonucunda bireyler, belirgin alt gruplar halinde sınıflandırılmıştır. Bu durum, popülasyon içi genetik çeşitliliğin varlığına ve bazı bireylerin birbirine genetik olarak daha yakın olduğuna işaret etmektedir.

**Çizelge 3.3.** Irklara göre 11 lokusun p değerleri (Kesin P-değerlerinin Markov zinciri yöntemiyle hesaplanması)

| <b>İrk adı</b> | <b>Örnek sayısı</b> | <b>TGLA227</b> | <b>BM2113</b> | <b>TGLA53</b> | <b>ETH10</b> | <b>SPS115</b> | <b>TGLA126</b> | <b>TGLA122</b> | <b>INRA23</b> | <b>ETH3</b> | <b>ETH225</b> | <b>BM1824</b> |
|----------------|---------------------|----------------|---------------|---------------|--------------|---------------|----------------|----------------|---------------|-------------|---------------|---------------|
| YK             | 20                  | 0,5358         | 0,3981        | 0,0231        | 0,1110       | 0,0011        | 0,7612         | 0,6511         | 0,7359        | 0,2966      | 0,3856        | 0,0763        |
| BOZ            | 20                  | 0,1092         | 0,2159        | 0,3873        | 0,1251       | 0,9879        | 0,0043         | 0,6008         | 0,0177        | 0,9175      | 0,0001        | 0,1160        |
| DAK            | 20                  | 0,0395         | 0,0497        | 0,0262        | 0,0711       | 0,0002        | 0,7662         | 0,1705         | 0,0419        | 0,0168      | 0,0019        | 0,0988        |
| YGS            | 20                  | 0,2047         | 0,1676        | 0,0863        | 0,5849       | 0,0000        | 0,0132         | 0,1196         | 0,0186        | 0,4428      | 0,5205        | 0,7888        |
| ZVT            | 20                  | 0,9817         | 0,6174        | 0,2450        | 0,0084       | 0,1487        | 0,0111         | 0,1222         | 0,0412        | 0,1162      | 0,0032        | 0,5356        |
| GAK            | 20                  | 0,3576         | 0,1890        | 0,1043        | 0,0124       | 0,1758        | 0,1463         | 0,2785         | 0,9735        | 0,1842      | 0,0195        | 0,0838        |



**Şekil 3.2.** Ne'nin Da Dendogramında ırkların genetik mesafesi(filogenetik ağaç)

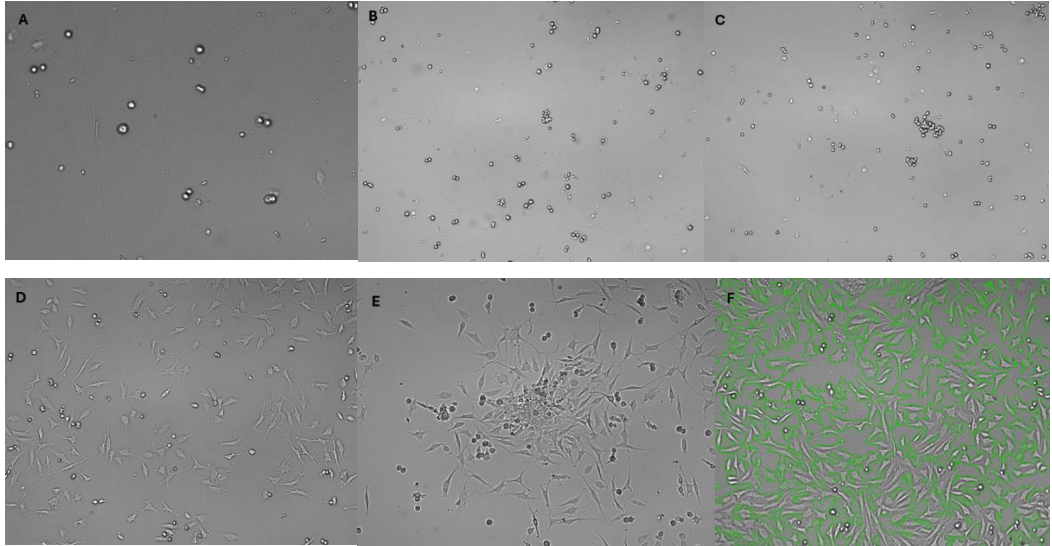
En yakın ırklar: YGS–BOZ sığır ırkları ile BOZ–GAK sığır ırklarına ait dalı en düşük Da değerleriyle birbirine yaklaşıyor; genetik olarak en benzer çiftler ırklar iken en uzak ırklar: ZAVOT ile YK/BOZ/YGS arasındaki dallanma 0,18-0,20 civarında; bu da ZAVOT ırkının çalışmadaki diğer sığır ırklarından belirgin biçimde ayrıldığını gösteriyor.

### 3.2. Primer Hücre Kültürü Bulguları

Dokudan hücre izole etmek için çeşitli protokoller denenmiş ve kollajenaz enziminin hücre ayrılmasında etkili olduğu tespit edilip uygun protokol belirlendikten sonra yaklaşık 1-2 haftalık bir süreçle hücreler Comet analizlerine devam edebilecek yeterli miktara getirilmiştir. Kollajenaz enzimi ile 20.saatin sonunda dokudan ayrılan hücreler Şekil 3.3'te görülmektedir. Mikroskop altında 7 gün boyunca hücrelerin farklılaşma süreçleri gözlemlenmiş (Şekil 3.4) ve besiyeri değişimleri hücrelerin durumuna göre uygulanmıştır.

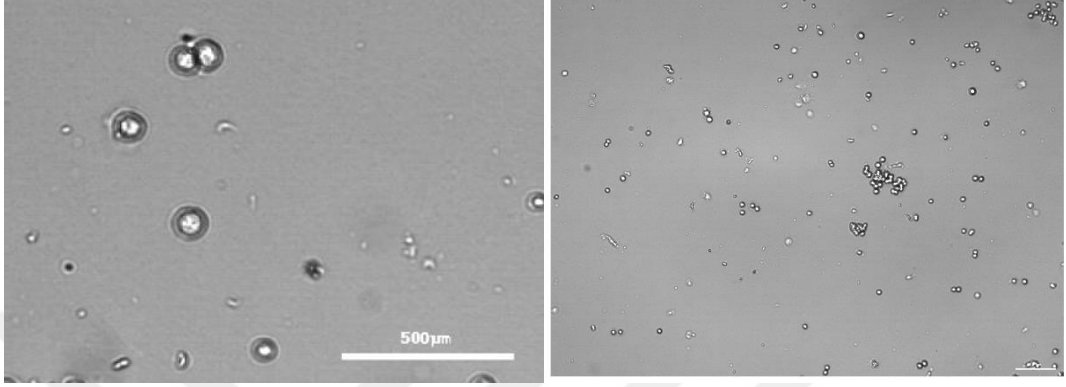


**Şekil 3.3.** Petride kollajenaz enzimi ile 20 saat sonra kulak dokusundan hücrelerin ayrılması (Scale 0-50µm). Solda dokuya yakın yerlerdeki hücreler, sağda ise petrinin herhangi bir yerinden alınan hücre görüntüleri



**Şekil 3.4.** 2. Gün Hücreler 25cm<sup>2</sup>'lik flaska alındığında mikroskop görüntüsü(A), Aynı gün besiyeri eklendikten sonra mikroskop görüntüsü(B), 3. Gün mikroskop görüntüsü(C), 4. Gün besiyeri eklendikten sonra mikroskop görüntüsü(D), 5. Gün mikroskop görüntüsü(E) 7. Gün mikroskop görüntüsü(F) %60 konfluensi

Kültür ortamında elde edilen hücreler (Şekil 3.5), tipik fibroblast morfolojisine uygun olarak iğ-ipliksi (spindle-shape) yapı sergilemiştir (D’Urso vd., 2024). Hücreler, substrata düzgün bir şekilde tutunmuş, uzamış formları ile yaygın dizilim göstermiştir. Mikroskopik değerlendirmede hücrelerin çoğunlukla aynı eksende hizalandığı, çekirdek-zar bütünlüğünün korunduğu ve kültür sağlıklı proliferasyon gösterdiği gözlemlenmiştir.



**Şekil 3.5.** Sığır kulak dokusundan izole edilen fibroblast hücrelerin 500µm (Solda) 50µm’yi (Sağda) temsil eden ölçü çizgisinde görüntüsü

Şekil 3.6’da görüldüğü üzere, dondurulmuş ve dondurulmamış fibroblast hücre örneklerinde hücre canlılık ve sayım analizleri otomatik hücre sayım cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemi için Trypan Blue vital boyası kullanılmış; bu bağlamda, mavi renkle işaretlenen hücreler canlı, kırmızı renkle işaretlenen hücreler ise ölü hücreleri temsil etmektedir. Canlı hücre yoğunluğu  $2 \times 10^6$  hücre/mL olarak belirlenmiş, ardından hücre konsantrasyonu  $1 \times 10^5$  hücre/mL’ye seyreltilerek ileri analizlere geçilmiştir. Morfolojik olarak değerlendirildiğinde; fibroblast hücrelerin yüksek canlılık oranına sahip olduğu, çoğunlukla yuvarlağa yakın, homojen yapıda ve iyi korunmuş hücresel bütünlük sergilediği gözlemlenmiştir.



**Şekil 3.6.** Sığır kulak dokusundan izole edilen fibroblast hücrelerin canlılık oranları ve otomatik sayım görüntüsü

### 3.3.RNA Kalite ve Miktarları

Gen Bankasındaki hücre örneklerinden RNA protect içinde saklanan örneklerden QiaGen kiti ile elde edilen RNA'lara ait 260/280 ölçümleri ve miktarları her ırk için ayrı çizelgelerde verilmiştir (Çizelge 3.4-Çizelge 3).

**Çizelge 3.4.** Zavot Sığırlarında Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrki  | Kulak No    | RNA           |         |         |          |
|------|-------|-------------|---------------|---------|---------|----------|
|      |       |             | konsatrasyonu | 260/280 | Su (µl) | RNA (µl) |
| 1    | ZAVOT | ZVT-2012-01 | 83,2          | 2,14    | 10,8    | 1,2      |
| 2    | ZAVOT | ZVT-2012-02 | 132,2         | 2,09    | 11,25   | 0,75     |
| 3    | ZAVOT | ZVT-2012-03 | 89,7          | 2,1     | 10,9    | 1,1      |
| 4    | ZAVOT | ZVT-2012-04 | 166,4         | 2,09    | 11,4    | 0,6      |
| 5    | ZAVOT | ZVT-2012-05 | 189,2         | 2,1     | 11,48   | 0,52     |
| 6    | ZAVOT | ZVT-2012-06 | 78,9          | 2,13    | 10,75   | 1,25     |
| 7    | ZAVOT | ZVT-2012-07 | 156,3         | 2,1     | 11,36   | 0,64     |
| 8    | ZAVOT | ZVT-2012-08 | 193           | 2,1     | 11,49   | 0,51     |
| 9    | ZAVOT | ZVT-2012-09 | 193,1         | 2,08    | 11,49   | 0,51     |
| 10   | ZAVOT | ZVT-2012-10 | 100,6         | 2,08    | 11      | 1        |

**Çizelge 3.5.** Yerli Kara Sığır Irkı Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrki       | Kulak No   | RNA konsatrasyonu | 260/280 | Su (µl) | RNA (µl) |
|------|------------|------------|-------------------|---------|---------|----------|
| 1    | Yerli Kara | YK-2012-01 | 43,3              | 2,13    | 9,7     | 2,3      |
| 2    | Yerli Kara | YK-2012-02 | 41,8              | 2,16    | 9,7     | 2,3      |
| 3    | Yerli Kara | YK-2012-03 | 58,4              | 2,13    | 10,3    | 1,72     |
| 4    | Yerli Kara | YK-2012-04 | 35,5              | 2,16    | 9,2     | 2,8      |
| 5    | Yerli Kara | YK-2012-05 | 31,9              | 2,15    | 9       | 3,1      |
| 6    | Yerli Kara | YK-2012-06 | 93,4              | 2,09    | 11      | 1,07     |
| 7    | Yerli Kara | YK-2012-07 | 15,6              | 2,16    | 5,75    | 6,25     |
| 8    | Yerli Kara | YK-2012-08 | 36                | 2,11    | 9,3     | 2,7      |
| 9    | Yerli Kara | YK-2012-09 | 75,7              | 2,07    | 10,7    | 1,3      |
| 10   | Yerli Kara | YK-2012-10 | 58,7              | 2,1     | 10,3    | 1,7      |

**Çizelge 3.6.** Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) Sığırları Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | Irkı | Kulak No    | RNA konsatrasyonu | 260/280 | Su (µl) | RNA (µl) |
|------|------|-------------|-------------------|---------|---------|----------|
| 1    | DAK  | DAK-2012-01 | 148,3             | 2,06    | 11,3    | 0,7      |
| 2    | DAK  | DAK-2012-02 | 60,2              | 2,09    | 10,3    | 1,7      |
| 3    | DAK  | DAK-2012-03 | 40,8              | 2,12    | 9,5     | 2,5      |
| 4    | DAK  | DAK-2012-04 | 27,5              | 2,13    | 8,3     | 3,7      |
| 5    | DAK  | DAK-2012-05 | 39,1              | 2,05    | 9,5     | 2,5      |
| 6    | DAK  | DAK-2012-06 | 19,4              | 2,15    | 7       | 5        |
| 7    | DAK  | DAK-2012-07 | 92,2              | 2,01    | 11      | 1        |
| 8    | DAK  | DAK-2012-08 | 42,5              | 2,09    | 9,7     | 2,3      |
| 9    | DAK  | DAK-2012-09 | 32,6              | 2,1     | 9       | 3        |
| 10   | DAK  | DAK-2012-10 | 47,9              | 2,09    | 10      | 2        |

**Çizelge 3.7.** Yerli Güney Sarısı (YGS) Sığırları Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | Irkı | Kulak No    | RNA konsatrasyonu | 260/280 | Su (µl) | RNA (µl) |
|------|------|-------------|-------------------|---------|---------|----------|
| 1    | YGS  | YGS-2012-01 | 105               | 2,08    | 11      | 1        |
| 2    | YGS  | YGS-2012-02 | 145               | 2,09    | 11,3    | 0,7      |
| 3    | YGS  | YGS-2012-03 | 81,9              | 2,1     | 10,8    | 1,2      |
| 4    | YGS  | YGS-2012-04 | 126,9             | 2,09    | 11,2    | 0,8      |
| 5    | YGS  | YGS-2012-05 | 133,2             | 2,08    | 11,25   | 0,75     |
| 6    | YGS  | YGS-2012-06 | 148,9             | 2,08    | 11,3    | 0,7      |
| 7    | YGS  | YGS-2012-07 | 143,5             | 2,1     | 11,3    | 0,7      |
| 8    | YGS  | YGS-2012-08 | 99,3              | 2,19    | 11      | 1        |
| 9    | YGS  | YGS-2012-09 | 152,7             | 2,09    | 11,35   | 0,65     |
| 10   | YGS  | YGS-2012-10 | 50                | 2,19    | 10      | 2        |

**Çizelge 3.8.** Boz Irk Sığırları Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | Irkı    | Kulak No    | RNA konsatrasyonu | 260/280 | Su(µl) | RNA (µl) |
|------|---------|-------------|-------------------|---------|--------|----------|
| 1    | Boz Irk | BOZ-2012-01 | 68,2              | 2,12    | 10,5   | 1,5      |
| 2    | Boz Irk | BOZ-2012-02 | 142               | 2,09    | 11,3   | 0,7      |
| 3    | Boz Irk | BOZ-2012-03 | 100,8             | 2,09    | 11     | 1        |

**Çizelge 3.8. Devam.** Boz Irk Sığırları Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

|    |         |             |       |      |       |      |
|----|---------|-------------|-------|------|-------|------|
| 4  | Boz Irk | BOZ-2012-04 | 87,8  | 2,1  | 10,9  | 1,1  |
| 5  | Boz Irk | BOZ-2012-05 | 148,8 | 2,08 | 11,3  | 0,7  |
| 6  | Boz Irk | BOZ-2012-06 | 145,4 | 2,08 | 11,3  | 0,7  |
| 7  | Boz Irk | BOZ-2012-07 | 132,4 | 2,08 | 11,25 | 0,75 |
| 8  | Boz Irk | BOZ-2012-08 | 119,2 | 2,08 | 11,2  | 0,8  |
| 9  | Boz Irk | BOZ-2012-09 | 133,8 | 2,09 | 11,25 | 0,75 |
| 10 | Boz Irk | BOZ-2012-10 | 107,1 | 2,08 | 11    | 1    |

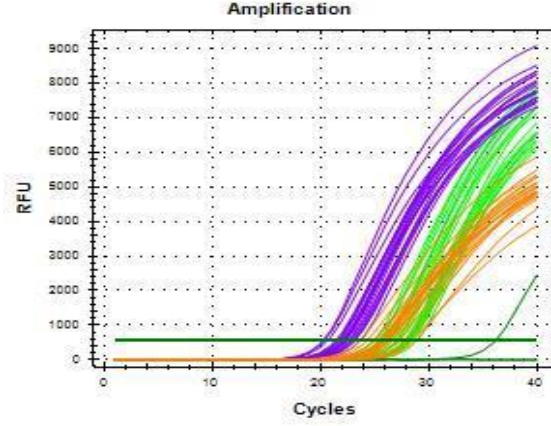
**Çizelge 3.9.** Güney Anadolu Kırmızısı (GAK) Sığırları Gen Bankası hücre örneklerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | Irkı | Kulak No    | RNA konsatrasyonu | 260/280 | Su(μl) | RNA (μl) |
|------|------|-------------|-------------------|---------|--------|----------|
| 1    | GAK  | GAK-2012-01 | 16,5              | 2,06    | 6      | 6        |
| 2    | GAK  | GAK-2012-02 | 17,3              | 2,18    | 6      | 6        |
| 3    | GAK  | GAK-2012-03 | 138,3             | 2,04    | 11,2   | 0,8      |
| 4    | GAK  | GAK-2012-04 | 13,6              | 2,04    | 5      | 7        |
| 5    | GAK  | GAK-2012-05 | 139,3             | 2,08    | 11,2   | 0,8      |
| 6    | GAK  | GAK-2012-06 | 102,7             | 2,09    | 11     | 1        |
| 7    | GAK  | GAK-2012-07 | 23,9              | 2,1     | 10     | 2        |
| 8    | GAK  | GAK-2012-08 | 104,8             | 2,07    | 11     | 1        |
| 9    | GAK  | GAK-2012-09 | 43,8              | 2,11    | 10     | 2        |
| 10   | GAK  | GAK-2012-10 | 34,2              | 2,14    | 9      | 3        |

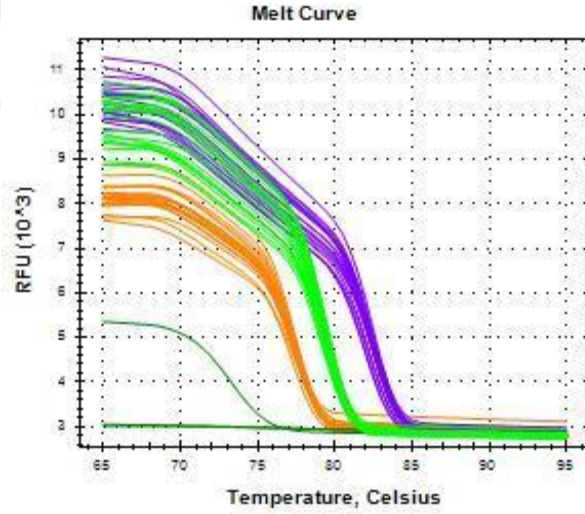
**Çizelge 3.10.** Yerli Kara Sığırlarında sahadan toplanan kulak dokusundan elde edilen hücre örneklerinden RNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | Irkı       | Kulak No    | RNA konsatrasyonu | 260/280 | Su(μl) | RNA (μl) |
|------|------------|-------------|-------------------|---------|--------|----------|
| 1    | Yerli Kara | TR061125655 | 4,6               | 2,18    | YOK    | 21,7     |
| 2    | Yerli Kara | TR061017357 | 19,3              | 2,19    | 7      | 5        |
| 3    | Yerli Kara | TR062166251 | 17,4              | 2,2     | 6,3    | 5,7      |
| 4    | Yerli Kara | TR062166456 | 12,2              | 2,2     | 3,7    | 8,3      |
| 5    | Yerli Kara | TR061520660 | 9,4               | 2,3     | 1,4    | 10,6     |
| 6    | Yerli Kara | TR062166310 | 19,8              | 2,2     | 7      | 5        |
| 7    | Yerli Kara | TR061520630 | 14,9              | 2,2     | 5,3    | 6,7      |
| 8    | Yerli Kara | TR061520623 | 25,9              | 2,1     | 8      | 4        |
| 9    | Yerli Kara | TR061520689 | 17,7              | 2,2     | 6,4    | 5,6      |
| 10   | Yerli Kara | TR061343107 | 7,6               | 2,38    | YOK    | 13       |

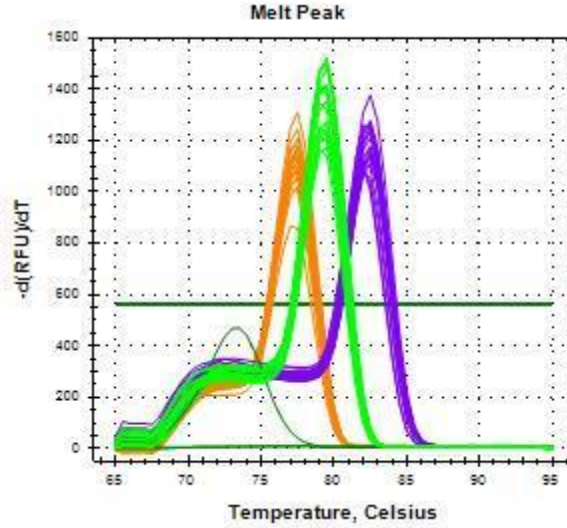
Gen bankasında bulunan Boz sığır ırkı hücre örneklerinden APEX1, GAPDH ve GUSB genleri RT-qPCR yükseltgenme pik görüntüleri Şekil 3.7’de, erime eğrileri Şekil 3.8’de ve erime pikleri Şekil 3.9’de verilmiştir.



**Şekil 3.7.** Gen Bankasında bulunan Boz sığır ırkı hücre örneklerinde RT-qPCR yükseltgenme pik görüntüleri; APEX1 mor, GAPDH turuncu ve GUSB yeşil renkle gösterilmiştir

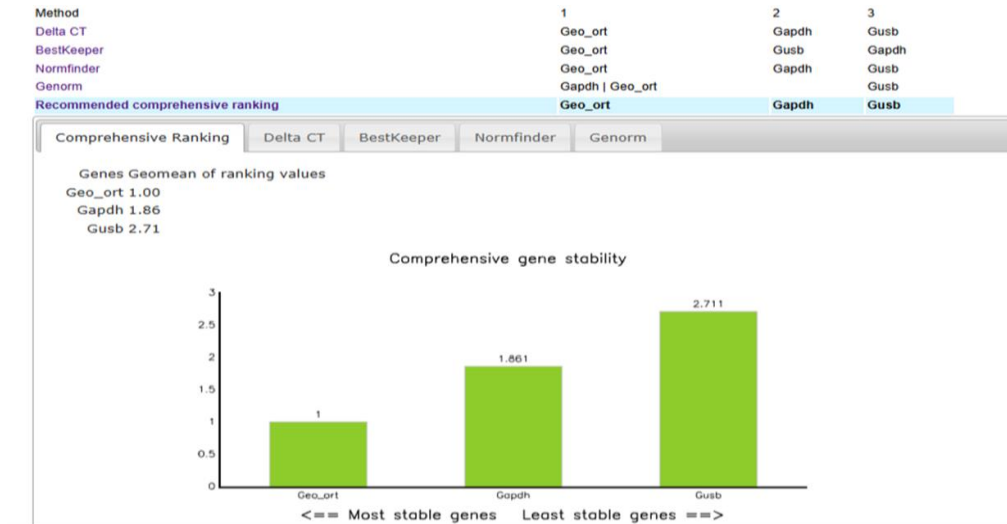


**Şekil 3.8.** Gen Bankasında bulunan Boz sığır ırkı hücre örneklerinde RT-qPCR erime eğrileri; APEX1 mor, GAPDH turuncu ve GUSB yeşil renkle gösterilmiştir



**Şekil 3.9.** Gen Bankasında bulunan Boz sığır ırkı hücre örneklerinde RT-qPCR erime pikleri; APEX1 mor, GAPDH turuncu ve GUSB yeşil renkle gösterilmiştir

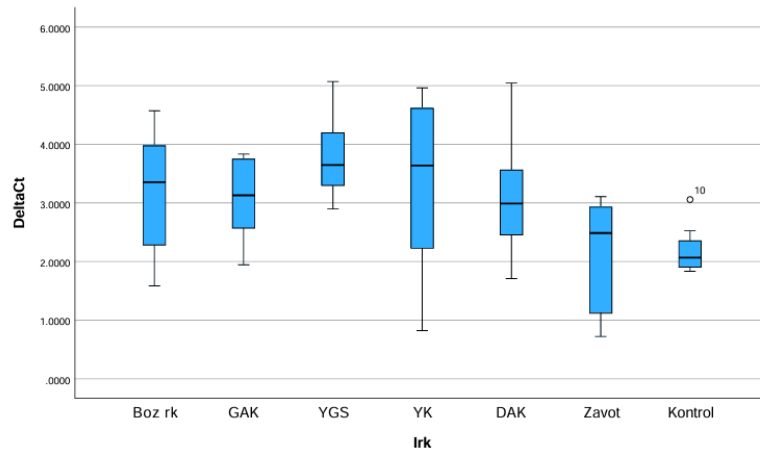
Gerçek-zamanlı PCR (RT-qPCR) deneylerinde hedef genlerin doğru normalize edilebilmesi için kararlı housekeeping gen(ler) seçilmesi gereklidir. Bu çalışmada GAPDH ve GUSB genlerinin tekil kullanımları ile bu iki genin geometrik ortalamasının (Geo\_ort) toplu kararlılık performansı;  $\Delta Ct$ , BestKeeper, NormFinder ve geNorm algoritmaları kullanılarak değerlendirilmiştir. Gen stabilitesi bakımından en düşük değer (1,00) iki genin geometrik ortalamalarından elde edilmiştir (Şekil 3.10). Bunu, stabilite değeri 1,86 olan GAPDH geni takip etmektedir. En yüksek stabilite değerine (2,71) sahip olan GUSB geni ise, çalışmada kullanılan genler arasında en az stabil olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 3.10.** RT-qPCR analizinde seçilen GAPDH ve GUSB housekeeping genlerinin geometrik ortalama isabet tablosu (RefFinder)

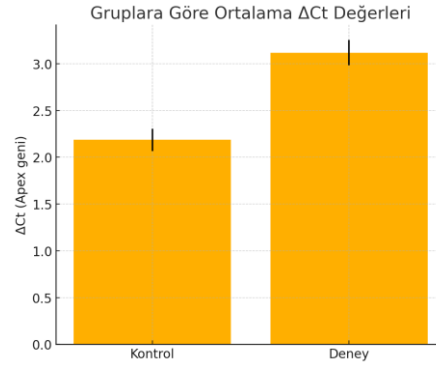
Plakalar arası teknik varyasyonu denetlemek ve ifade verilerini doğru biçimde normalize edebilmek amacıyla, her plakanın aynı kuyucuğunda İç Referans Kontrolü (IRC) olarak GAK1 örneği kullanılmıştır. Aynı referans örnek üzerinden APEX1, GAPDH ve GUSB genlerine ait Ct değerleri elde edilmiştir. Söz konusu Ct değerlerinin ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri APEX1 için  $24,60 \pm 1,07$ , GAPDH için  $19,40 \pm 0,87$  ve GUSB için  $23,49 \pm 0,67$  olarak hesaplanmıştır.  $\Delta$ Ct değerleri için elde edilen  $p=0,716$  olup, bu değer 0,05 anlamlılık düzeyinin üzerinde kaldığından plakalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ct değerlerindeki düşük standart sapmalar, tüm plakaların tutarlı şekilde çalıştırıldığını ve teknik varyasyonun minimal düzeyde olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, çalışmanın güvenilirliğini desteklemekte ve farklı plakalar arasındaki sonuçların doğru biçimde normalize edildiğini doğrulamaktadır.

Bu çalışmada, APEX1 geninin kontrol ve deney gruplarındaki ekspresyon düzeyleri, RT-qPCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Normalize Ct değerleri, iki farklı housekeeping genin (GAPDH ve GUSB) geometrik ortalaması kullanılarak hesaplanmış, ardından hedef genin Ct değeri ile bu ortalama arasındaki fark alınarak  $\Delta$ Ct değerleri elde edilmiştir (Şekil 3.11).  $\Delta$ Ct değerleri üzerinden  $\Delta\Delta$ Ct ve kat değişimi ( $2^{-\Delta\Delta$ Ct) hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS paket programı ile değerlendirilmiştir.



**Şekil 3.11.** Gen bankasında farklı ırklara ait dondurulmuş hücre materyalinde RT-qPCR analizinden elde edilen DeltaCT ortalamaları plot görseli

Şekil 3.12’de gösterilen grafik APEX1 genine ait ortalama  $\Delta$ Ct değerlerini ( $\pm$ SE) göstermektedir. Kontrol grubu: Referans olarak kabul edilir (kat değişimi  $\approx 1,0$ ). Çalışma (Deney) grubu: Ortalama kat değişimi değeri yaklaşık 0,68 civarındadır. Yani APEX1 gen ekspresyonu yaklaşık %32 azalmış durumdadır.



**Şekil 3.12.** Hücre materyalinde RT-qPCR analizinde kontrol ve deney grubu APEX1 Geni için DeltaCT değerleri

Hücre örneklerinden izole edilen RNA örneklerinden çalışılan RT-qPCR verileri ise BioRad CFX Maestro ile hesaplanmıştır. APEX1 genine ait  $\Delta C_t$  değerlerinin grup ortalamaları incelendiğinde (Çizelge 3.11), Kontrol grubunun ortalaması 2,19 (SD = 0,38), Deney grubunun ortalaması ise 3,12 (SD = 1,04) olarak bulunmuştur.  $\Delta C_t$  değerlerinin yüksek olması, gen ekspresyonunun düşük olduğuna işaret ettiğinden, bu bulgu Deney grubunda APEX1 geninin ekspresyonunun azaldığını göstermektedir. Bu farkın anlamlılığı Welch t-testi ile doğrulanmış ve etki büyüklüğü büyük bulunmuştur ( $p < 0,001$ ,  $d \approx 0,95$ ). Bu analizler sonucunda deney grubundaki ırkların APEX1 geninin ekspresyonu, kontrol grubuna göre yaklaşık 0,52 katına düşmüştür. Yaklaşık %48 azalma olduğunu gösteren bu durum dondurmanın olumsuz etkisi yanında biyolojik olarak baskılanma olabileceği ve ileri araştırma çalışmaları ile aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

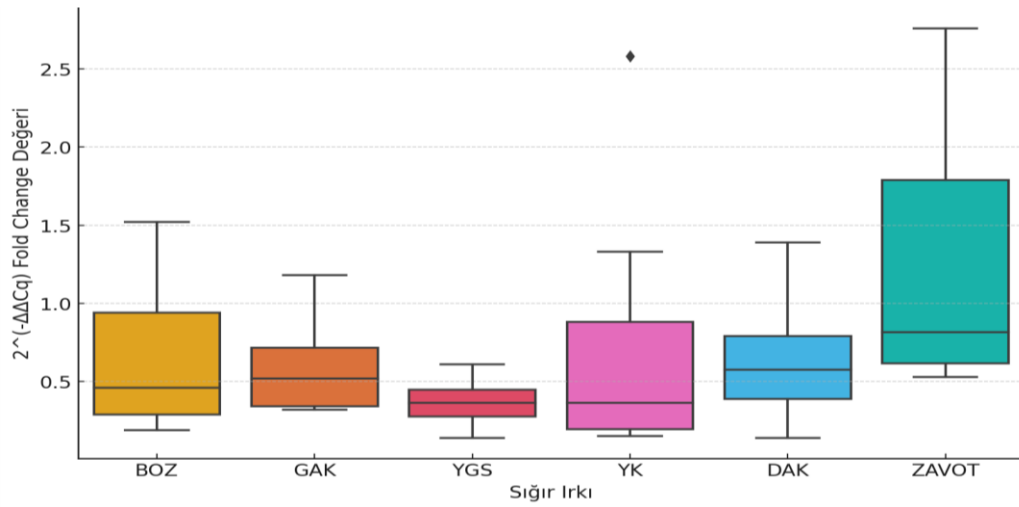
**Çizelge 3.11.** Hücre materyalinde RT-qPCR analizinde DeltaCT kontrol ve deney grubu ortalamaları, SPSS analizleri

|                | İrk     | N  | Ortalama | Standart Sapma | Standart Hata Ort. |
|----------------|---------|----|----------|----------------|--------------------|
| <b>DeltaCT</b> | Kontrol | 10 | 2,186492 | 0,3807006      | 0,1203881          |
|                | Deney   | 60 | 3,118907 | 1,0407838      | 0,1343646          |

$\Delta \Delta C_t$  yöntemi ile yapılan analiz sonucunda, APEX1 genine ait ortalama  $\Delta C_t$  değeri kontrol grubunda 2,19, deney grubunda 3,12 olarak bulunmuştur. Bu fark,  $2^{(-\Delta \Delta C_t)}$  formülüne göre yaklaşık 0,52 katlık bir azalmaya karşılık gelmektedir. Sonuçlar, hedef gen ekspresyonunun deney grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde baskılandığını göstermektedir.

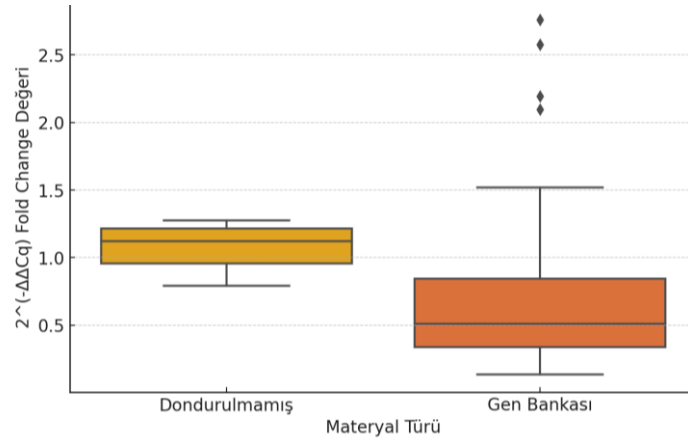
Grafikte (Şekil 3.13), farklı sığır ırkları arasındaki  $2^{(-\Delta \Delta C_t)}$  kat değişimi değerlerinin dağılımı kutu grafiği (boxplot) ile gösterilmiştir. Kruskal-Wallis testi sonucunda

elde edilen p değeri ( $p=0,0328$ ), ırklar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ( $p<0,05$ ). Bu sonuç, en az bir ırk grubunun diğerlerinden farklı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu verilere göre, YK ırkının gen ekspresyon seviyesi, diğer sığır ırklarının ortalama gen ekspresyon seviyesine göre daha düşüktür. Bu durum, YK ırkında ilgili genin ekspresyonunun diğer ırklara göre baskılanmış veya azalmış olduğunu göstermektedir. Gen ekspresyon seviyesinin düşük olması, bu genin YK ırkında daha az aktif olduğu veya genetik olarak daha düşük ekspresyon potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir. Irklar arası bu varyasyon, genetik farklılıklar veya çevresel faktörlerin etkisiyle ilişkili olabilir.



**Şekil 3.13.** RT-qPCR analizinde ırklar arası kat değişimi dağılımı (Kruskal-Wallis Test  $p$ -value=0,0328)

Şekil 3.14’de dondurulmamış ve gen bankası hücre örneklerinde APEX1 gen ekspresyonu için RT-qPCR sonucu hesaplanan  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  kat değişimi dağılımını gösteren kutu grafiği verilmiştir. Dondurulmamış hücre örneklerinde elde edilen kat değişimi değerleri, ortanca değerin etrafında yoğunlaşmakta olup, dağılımın genişliği nispeten dardır. Gen ekspresyon düzeyinin daha homojen bir dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. Gen ifadesi, gen bankası hücre örneklerine göre daha yüksek görünmektedir. Gen bankası hücre örneklerinde ise kat değişimi değerlerinin ortanca değeri daha düşük olup Welch t-test sonucunun anlamlı olduğunu ( $p=0,001$   $p<0,05$ ) vurgulamaktadır. Dağılımda daha geniş bir varyasyon gözlemlenmiştir. Gen ifadesi dondurulmamış örneklere kıyasla azalmakta ve gen ekspresyonunda heterojen bir yapının bulunduğu görülmektedir.

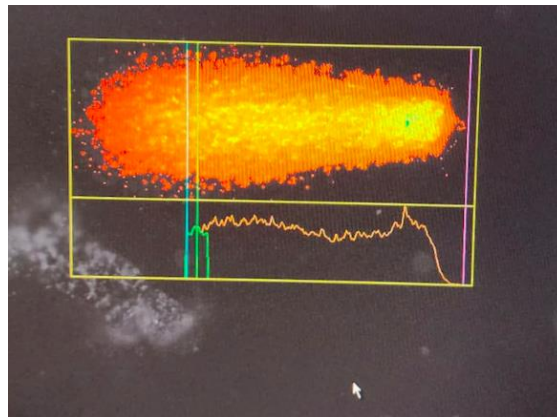


**Şekil 3.14.** Hücre materyalinde RT-qPCR analizinde dondurulmamış ve gen bankası hücre örneklerinde APEX1 Geni için kat değişimi değerleri (\*\*= p< 0,01)

### 3.4. COMET Analizi Bulguları

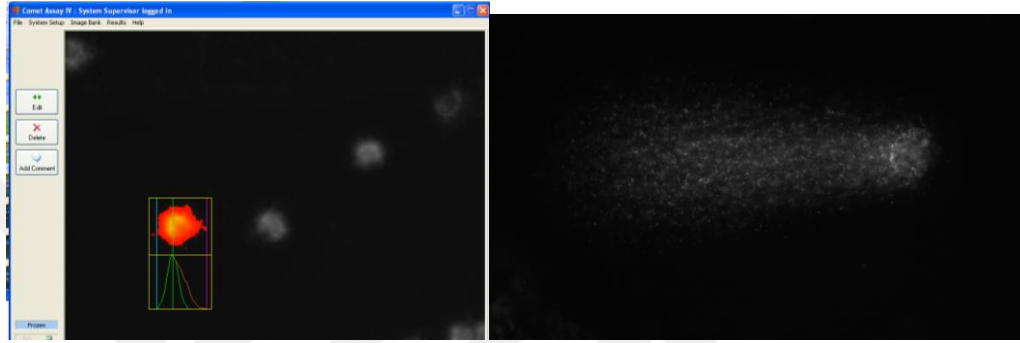
Gen Bankası'nda -80°C'de saklanan hücre örneklerinden Yerli Kara, Boz Irk, Doğu Anadolu Kırmızısı, Güney Anadolu Kırmızısı, Yerli Güney Sarısı ve Zavot ırkı sığırlara ait örnekler her ırktan 10'ar adet olarak çalışılmıştır. Şekil 3.15'de pozitif kontrol için DNase ile muamele edilen pozitif kontrol görüntüsü bulunmaktadır. DNase ile hücrede meydana gelen hasarın sonucunda Comet analizinde tipik kuyruklu yıldız görüntüsü elde edilmiştir.

DNase I ile muamele edilmiş fibroblast hücrelerinde gözlemlenen (Şekil 3.15) Comet Analizi görüntüsü, şiddetli DNA hasarını açıkça göstermektedir. Kuyruk uzunluğu ve DNA'nın baş kısmında tutunamaması, hücrelerin büyük ölçüde fragmente olmuş DNA taşıdığını ve böylece pozitif kontrol işlevinin başarıyla sağlandığını göstermektedir. Bu yapı, yöntemin duyarlılığını ve DNase'in hasar oluşturma etkinliğini doğrulamaktadır.



**Şekil 3.15.** Alkali Comet Analizi ile görüntülenen DNase I ile muamele edilmiş sığır kulak fibroblast hücresi. Kuyruk yapısının yoğunluğu ve uzunluğu, enzim kaynaklı yüksek düzeyde DNA hasarını göstermektedir. Bu hücre pozitif kontrol olarak kullanılmıştır

Comet Analizi IV yazılımı ile yapılan analiz (Şekil 3.16 Solda), değerlendirilen hücrede belirgin DNA hasarı olduğunu ortaya koymuştur. Kuyruk oluşumu ve DNA yoğunluğu dağılım grafikleri, genetik materyalin elektroforez boyunca göç ettiğini ve hücrede zincir kırıkları bulunduğunu göstermektedir. DNase enzimi, DNA'nın fosfodiester bağlarını hidrolize ederek kontrollü bir şekilde çift ve tek zincirli kırıklar oluşturur (Şekil 3.16 Sağda). Bu işlem, tekniğin çalıştığını doğrulamak ve diğer deney gruplarındaki DNA hasarı ile karşılaştırma yapabilmek için kritik öneme sahiptir.



**Şekil 3.16.** Solda Gen Bankası -80°C'de saklanan Boz Irka ait hücre örneğinde Comet görüntüsü. Sağda Yerli Kara Sığır kulak dokusundan elde edilen hücrede DNase ile muamele sonucu pozitif kontolde Comet kuyruk görüntüsü (40X)

Mikroskobik görüntüsü verilen Şekil 3.17'da sığır kulak dokusundan izole edilen (dondurulmamış) fibroblast hücrelerinin alkali Comet Analizi ile değerlendirilmesine aittir. Görüntüde her biri ayrı bir hücreye karşılık gelen Comet (kuyruklu yıldız) morfolojileri gözlemlenmektedir.



**Şekil 3.17.** Yerli Kara Sığır kulak dokusundan elde edilen hücrelerde hasarsız Comet görüntüsü (40X)

### 3.4.1. Kuyruk Yoğunluğu

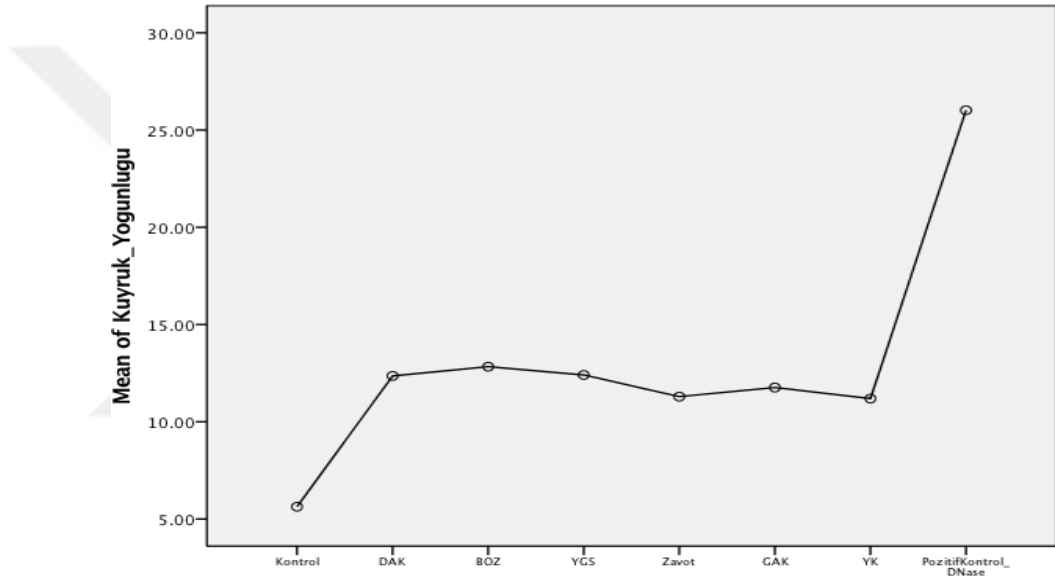
Çalışmada kullanılan farklı ırklar arasında Comet analizine ait kuyruk yoğunluğu bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum, DNA hasarı açısından ırklar arasında benzer bir seviyenin bulunduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, deneysel gruplarla karşılaştırmalarda referans olarak kullanılacak kontrol grubu için, varyasyonu azaltmak ve deneysel gücü artırmak amacıyla tek bir ırk (Yerli Kara) tercih edilmiştir. Böylelikle, gözlemlenen DNA hasarının yalnızca uygulanan muameleye atfedilmesi ve ırksal farklılıklardan kaynaklanan olası karışıklıkların önlenmesi sağlanmıştır.

Bu çalışmada kontrol grubunda (dondurulmamış örnekler), kuyruk yoğunluğu ortalaması 5,63 olarak belirlenmiştir. Bu değer, diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde daha düşük bir düzeydedir. Dondurulmuş gen bankası örneklerinden oluşan deney grupları arasında belirgin farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek kuyruk yoğunluğu ortalamaları sırasıyla BOZ (12,83), YGS (12,41), DAK (12,36), ZVT (11,29), GAK (11,76) ve YK (11,19) gruplarında tespit edilmiş ve birbirine yakın ortalama değerlere sahiptir (Çizelge 3.12). Pozitif kontrol grubunda, DNase enzimi uygulanmış örneklerdeki kuyruk yoğunluğu ortalaması 26,02 ile tüm gruplar içinde en yüksek değer olarak kaydedilmiştir. Bu gruptaki yüksek varyasyon, DNase etkisiyle hücre yapı bütünlüğünde belirgin farklılıklar oluştuğunu göstermektedir. Tüm gruplar genelinde ortalama kuyruk yoğunluğu 12,25 olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, örneklerin dondurulma durumu ve enzimatik işlem geçmişinin, kuyruk yoğunluğu gibi hücresel parametreler üzerinde anlamlı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir.

**Çizelge 3.12.** Hücre örneklerinde Comet analizinde ırklara göre kuyruk yoğunluğu (SPSS-Anova Testi)

| Grup                  | N (Örnek sayısı) | Ortalama   | Standart Sapma |
|-----------------------|------------------|------------|----------------|
| Kontrol               | 1000             | 5,63±0,31  | 9,69           |
| DAK                   | 1000             | 12,35±0,57 | 18,15          |
| BOZ                   | 1000             | 12,83±0,51 | 16,21          |
| YGS                   | 1000             | 12,40±0,58 | 18,40          |
| ZVT                   | 1000             | 11,29±0,55 | 17,69          |
| GAK                   | 1000             | 11,76±0,54 | 17,16          |
| YK                    | 1000             | 11,19±0,55 | 17,61          |
| Pozitif Kontrol DNase | 600              | 26,01±1,28 | 31,47          |
| Total                 | 7600             | 12,24±0,21 | 18,83          |

Şekil 3.18 farklı gruplara ait kuyruk yoğunluğu ortalamalarının dağılımını göstermektedir. Grafik incelendiğinde, pozitif kontrol DNase grubunun diğer tüm gruplardan belirgin şekilde daha yüksek bir kuyruk yoğunluğu değerine sahip olduğu dondurulmamış hücre örneklerinden oluşan kontrol grubunun kuyruk yoğunluğu ortalamasının ( $\approx 5,63$ ) deney gruplarına kıyasla belirgin biçimde daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, taze örneklerin DNA hasarı açısından daha stabil olduğunu göstermektedir. Genel olarak, grafiksel dağılım kuyruk yoğunluğu değerlerinin örnek tipi (dondurulmuş/taze) ve enzimatik işlem durumuna bağlı olarak değiştiğini açıkça ortaya koymaktadır. Görsel bulgular, tanımlayıcı istatistiklerle tutarlıdır ve gruplar arası farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemek için yapılan Dunnet t-testi analizlerinin temelini oluşturmaktadır.



**Şekil 3.18.** Irklar arasında comet kuyruk yoğunluğu

Kuyruk yoğunluğu değişkeni için yapılan Dunnet t-testi sonuçlarına göre, tüm ırklar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek değerlere sahiptir ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 3.13). Kontrol grubunda kuyruk yoğunluğu ortalaması  $5,63 \pm 9,69$  iken, deney gruplarında bu değerler 11,19 ile 13,29 arasında değişmiştir. Özellikle pozitif kontrol DNase grubunda kuyruk yoğunluğu ortalamasının  $26,02 \pm 31,47$  olduğu ve bu değer kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3.13.** Farklı ırklara ait hücre örneklerinde Comet analizinde Dunnet t-testi ortalama kuyruk yoğunluğu

| Karşılaştırılan Irk | Karşılaştırma grubu (Dondurulmamış) | Kuyruk yoğunluğu ortalama farkı |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| DAK                 | Kontrol                             | *6,72                           |
| BOZ                 | Kontrol                             | *7,20                           |
| YGS                 | Kontrol                             | *6,77                           |
| ZVT                 | Kontrol                             | *5,66                           |
| GAK                 | Kontrol                             | *6,12                           |
| YK                  | Kontrol                             | *5,56                           |

\*Ortalama farkı, 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

### 3.4.2. Kuyruk Uzunluğu

Kontrol grubunda kuyruk uzunluğu ortalaması 72,62 olarak ölçülmüştür. Bu değer, deney gruplarının tamamından daha yüksektir (Çizelge 3.14). Deney grupları arasında en düşük ortalama değer GAK grubunda (42,87) gözlenirken, YK (62,46) ve YGS (57,64) gruplarında bu değer daha yüksek olduğu saptanmıştır. BOZ, DAK ve ZVT gruplarında ise ortalama kuyruk uzunluğu sırasıyla 50,71; 47,25 ve 44,92  $\mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 3.14.** Hücre örneklerinde Comet Analizinde Irklara Göre Kuyruk Uzunluğu (Tanımlayıcı İstatistik-SPSS)

| Grup                  | N(Örnek sayısı) | Ortalama         | Standart Sapma |
|-----------------------|-----------------|------------------|----------------|
| Kontrol               | 1000            | 72,61 $\pm$ 0,80 | 25,40          |
| DAK                   | 1000            | 47,24 $\pm$ 0,58 | 18,32          |
| BOZ                   | 1000            | 50,71 $\pm$ 0,78 | 24,61          |
| YGS                   | 1000            | 57,63 $\pm$ 0,78 | 24,70          |
| ZVT                   | 1000            | 44,92 $\pm$ 0,53 | 16,68          |
| GAK                   | 1000            | 42,87 $\pm$ 0,45 | 14,16          |
| YK                    | 1000            | 62,46 $\pm$ 0,72 | 22,79          |
| Pozitif Kontrol DNase | 600             | 80,14 $\pm$ 2,70 | 66,05          |
| Total                 | 7600            | 56,12 $\pm$ 0,34 | 30,08          |

Dunnet t-testi sonuçlarına göre, DAK, BOZ, YGS, ZVT, GAK ve YK ırklarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Bununla birlikte, pozitif kontrol DNase grubunda kuyruk uzunluğu ortalaması  $80,14 \pm 66,05$  olup, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artış göstermiştir ( $p<0,05$ ) (Çizelge 3.15). Bu sonuçlar, kuyruk uzunluğu bakımından yalnızca pozitif kontrol DNase grubunun kontrol

grubuna göre anlamlı farklılık gösterdiğini, diğer ırklar arasında ise belirgin bir fark olmadığını ortaya koymaktadır.

**Çizelge 3.15.** Hücre örneklerinde Comet Analizinde Kuyruk Uzunluğuna ilişkin Dunnet t-testi

| Karşılaştırılan ırk   | Karşılaştırma grubu<br>(Dondurulmamış) | Kuyruk Uzunluğu<br>Ortalama farkı |
|-----------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|
| DAK                   | Kontrol                                | -25,36                            |
| BOZ                   | Kontrol                                | -21,90                            |
| YGS                   | Kontrol                                | -14,97                            |
| ZVT                   | Kontrol                                | -27,69                            |
| GAK                   | Kontrol                                | -29,74                            |
| YK                    | Kontrol                                | -10,15                            |
| Pozitif Kontrol DNase | Kontrol                                | *7,52                             |

\*Ortalama farkı, 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

### 3.4.3. Kuyruk Momenti

Kuyruk momenti değişkeni açısından kontrol grubunda ortalama  $1,52 \pm 4,32$  olarak ölçülmüştür. Dunnet t testi ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda, DAK, BOZ, YGS, ZVT, GAK, YK ve Pozitif Kontrol (DNase) gruplarında ölçülen kuyruk momenti değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). DAK (3,41) ve YGS (3,44) gruplarında en yüksek ortalamalar saptanırken, BOZ (3,18) ve YK (3,28) ZVT (3,02) ve GAK (2,90) gibi gruplarda da benzer düzeyde kuyruk momenti değeri sergilemiştir (Çizelge 3.16). Bu bulgu, söz konusu gruplarda DNA hasarının daha belirgin olduğunu ve dondurma işleminin ya da genetik yapının DNA stabilitesini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Özellikle pozitif kontrol DNase grubunda kuyruk momenti ortalaması  $12,99 \pm 24,35$  olarak tespit edilmiş ve bu grup kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış sergilemiştir. Analiz sonuçları, farklı sığır ırklarından elde edilen numunelerin kuyruk momenti açısından kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı varyasyonlar sergilediğini ortaya koymuştur (Çizelge 3.17). Bu durum, genetik arka planın ya da tür içi biyolojik farklılıkların DNA hasar düzeyleri üzerinde etkili olabileceğine işaret etmektedir.

**Çizelge 3.16.** Hücre örneklerinde Comet Analizinde Irklara Göre Kuyruk Momenti (Tanımlayıcı İstatistik-SPSS)

| Grup                  | N (Örnek Sayısı) | Ortalama   | Standart Sapma |
|-----------------------|------------------|------------|----------------|
| Kontrol               | 1000             | 1,52±0,13  | 4,32053        |
| DAK                   | 1000             | 3,40±0,24  | 7,81462        |
| BOZ                   | 1000             | 3,17±0,13  | 4,24323        |
| YGS                   | 1000             | 3,43±0,23  | 7,29384        |
| ZVT                   | 1000             | 3,02±0,21  | 6,73257        |
| GAK                   | 1000             | 2,90±0,17  | 5,31956        |
| YK                    | 1000             | 3,28±0,24  | 7,71088        |
| Pozitif Kontrol DNase | 600              | 12,99±0,99 | 24,53506       |
| Total                 | 7600             | 3,75±010   | 9,5789         |

**Çizelge 3.17.** Hücre örneklerinde Comet Analizinde Dunnet t-testi Kuyruk Momenti

| Karşılaştırılan Irk   | Karşılaştırma grubu (Dondurulmamış) | Kuyruk Momenti Ortalama farkı |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| DAK                   | Kontrol                             | *1,88                         |
| BOZ                   | Kontrol                             | *1,65                         |
| YGS                   | Kontrol                             | *1,91                         |
| ZVT                   | Kontrol                             | *1,49                         |
| GAK                   | Kontrol                             | *1,37                         |
| YK                    | Kontrol                             | *1,75                         |
| Pozitif Kontrol Dnase | Kontrol                             | *11,46                        |

\*Ortalama farkı, 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

Kuyruk momenti bakımından tüm deney gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Pozitif kontrol DNase grubunda kuyruk yoğunluğu, uzunluğu ve momenti bakımından diğer gruplardan belirgin şekilde ayrılan sonuçlar elde edilmiştir.

## 4. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında Türkiye'de yetiştirilen altı sığır ırkına ait örneklerde 11 kısa ardışık tekrar (STR) lokusunun analizi gerçekleştirilmiş ve genetik çeşitliliğe ilişkin kapsamlı veriler elde edilmiştir. STR'lar, yüksek mutasyon oranları ve polimorfizm düzeyleri sayesinde genetik çeşitliliğin izlenmesinde etkin araçlar olup; popülasyon yapısının belirlenmesi, ıslah stratejilerinin yönlendirilmesi ve adli genetik uygulamalarda sıkça kullanılmaktadır (Frankham vd., 2010; Shang vd., 2024; van de Goor vd., 2009).

Araştırma sonuçları, analiz edilen tüm STR lokuslarının Hardy-Weinberg dengesini sağladığını ( $p \geq 0,05$ ) göstermiştir. Bu lokuslar ıslah çalışmalarında uygun ve güvenilir bir belirteç olduğunu, genetik sürüklenme, seçilim vs den etkilenmediğini göstermektedir. Bu durum, popülasyonlarda yakın geçmişte ciddi bir seçilim baskısı, genetik sürüklenme veya inbreeding etkisinin bulunmadığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, Altınalan (2005) ve Özkan (2005) tarafından yürütülen çalışmalarda da çoğu lokusun genetik dengede olduğu bildirilmiştir. Bu bulgu, yerli sığır ırklarının büyük oranda doğal popülasyon dinamiklerini koruduğunu desteklemektedir.

Gözlenen ( $H_o$ ) ve beklenen ( $H_e$ ) heterozigotluk değerleri arasındaki farklar bazı lokuslarda anlamlı seviyededir. Özellikle  $H_o < H_e$  durumunun birçok lokusta gözlenmiş olması, popülasyon içerisinde potansiyel heterozigotluk eksikliğine işaret etmektedir. Bu durum Wahlund etkisi, örnekleme hataları, inbreeding ya da popülasyon alt yapısının varlığı ile açıklanabilir (Frankham vd., 2010; Hartl ve Clark, 2007; Wahlund, 1928). ETH225 lokusunda pozitif FIS değerinin (0,29) yüksek olması, heterozigotluk eksikliğini destekleyen önemli bir bulgudur. Buna karşın, TGLA126 lokusunda negatif FIS değeri (-0,025) gözlenmiş olup, bu lokusa özgü heterozigotluk fazlalığı dikkate değerdir. Bu bulgular, genetik yapının lokus düzeyinde farklı selektif ve popülasyonel dinamikler altında şekillenmiş olabileceğini göstermektedir.

Analiz edilen lokuslar arasında TGLA122, TGLA227 ve BM2113 en yüksek alel çeşitliliğine sahip olup, bu belirteçlerin genetik farklılaşma analizlerinde güçlü göstergeler sunduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgu, Özşensoy vd. (2010) tarafından bildirilen TGLA53 ve TGLA122 lokuslarının yüksek polimorfizm potansiyeli ile de uyumludur. Söz konusu çalışmada tespit edilen alel sayıları, bu tezde elde edilen değerlerle benzerlik göstermekte; bu da analiz edilen lokusların farklı popülasyonlar arasında tutarlı polimorfik özellikler sergilediğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada elde edilen PIC değerleri (0,766–0,905), analiz edilen tüm lokusların yüksek düzeyde bilgilendirici olduğunu ve genetik çeşitliliğin kantitatif değerlendirilmesi açısından güvenilir göstergeler sunduğunu göstermektedir. Bu sonuç, Altınalan (2005) tarafından bildirilen yerli ırklarda yüksek allel sayısı ve geniş PIC aralıkları ile tutarlıdır. Ayrıca, PIC değerlerinin 0,5'in üzerinde olması, mikrosatellitlerin genetik analizlerdeki ayırt edici gücünü desteklemektedir.

Dendrogram analizleri, bireylerin belirli alt kümelerde yoğunlaştığını ve bazı grupların diğerlerinden genetik olarak anlamlı derecede ayrıştığını göstermiştir. Bu durum, popülasyon yapısının homojen olmadığını ve ırklar arasında belirgin genetik sınırların bulunduğunu ortaya koymaktadır. Özşensoy vd. (2010) tarafından bildirilen yüksek FST değerleri de (örneğin GAK-ZAV arasında 0,148) bu genetik ayrışmayı desteklemekte; popülasyonlar arasında sınırlı gen akışının olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde daha önce yapılmış bazı çalışmalarda da benzer eğilimler bildirilmiştir. Örneğin, Özkan (2005) tarafından yapılan analizlerde yerli sığır ırklarının kültür ırklarına kıyasla daha yüksek ortalama allel sayısına sahip olduğu ve bu ırkların Asya kökenli Zebu etkileri taşıyabileceği belirtilmiştir. Bu durum, çalışmamızda gözlemlenen yüksek alel çeşitliliği ve bazı bireylerin genetik olarak farklı alt gruplarda yer alması ile örtüşmektedir. Altınalan (2005) çalışmasında yerli ırklarda gözlenen yüksek FIS değeri (0,497), bireyler arası heterojenliğin belirgin olduğunu ve popülasyon içi genetik yapıların oldukça kompleks olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, bu tez kapsamında elde edilen dendrogram dallanması ve genetik mesafe analizleri, Altınalan (2005)'in çalışmasını doğrular niteliktedir.

Sunulan tez çalışmasında elde edilen STR analizi sonuçlar doğrultusunda UHAEM Gen Bankası'na eklenmek üzere karakterizasyonu yapılan örneklerin ait oldukları ırkları temsil ettikleri TÜRKHAYGEN (2007) çalışmasından bu yana incelenen ırkların Hardy Weinberg dengesini ve genetik çeşitliliklerini korudukları belirlenmiştir. Ayrıca kullanılan ISAG tarafından önerilen 11 STR lokusunun adli uygulamalar için yeterli bilgi sağlayacağı ve yüksek doğruluk sunduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, analiz edilen STR lokusları Türkiye'deki sığır popülasyonlarının genetik yapısında anlamlı farklılıkları ortaya koymakta ve yerli ırkların genetik mirasının korunması açısından değerli ipuçları sunmaktadır. Bu veriler hem genetik kaynakların sürdürülebilir yönetimi hem de gelecek ıslah programlarının daha stratejik bir şekilde planlanması için temel teşkil etmektedir. Popülasyonlar arası genetik farklılıkların daha ayrıntılı biçimde ortaya konulması, bölgesel ıslah politikalarının yerel genetik kaynaklar dikkate alınarak yapılandırılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada kullanılan STR analizine benzer genetik analiz yöntemleri, yalnızca yerli sığır ırklarında değil, farklı coğrafyalara ait çeşitli sığır ırklarında da uygulanmış ve bu alanda birçok bilimsel çalışma gerçekleştirilmiştir.

Machado vd. (2003) Holstein (HO), Gyr (GI), Guzerat (GU) ve Nellore (NE) ırklarına ait bireylerde dokuz mikrosatellit (STR) lokusunu kullanarak genetik çeşitliliği değerlendirmiştir. Araştırma kapsamında toplam 64 allel tanımlanmış; bu allellerin yaklaşık %53'ünün tüm ırklarda ortak olarak bulunduğu belirlenmiştir. Dokuz lokusa ait ortalama heterozigotluk değeri 0,350 olarak rapor edilmiş ve bu görece düşük düzeyin, popülasyonlar içerisindeki yüksek akrabalı yetiştirme oranlarından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Genetik bilgilendiricilik açısından lokusların etkinliği değerlendirildiğinde, BSM3004 ve BL4 lokuslarının en az bilgi taşıdığı, buna karşılık BMS1126, BMS1237 ve BMS518 lokuslarının daha yüksek ayırt edici güce sahip olduğu ifade edilmiştir.

Shang vd. (2024) toplamda 158 sığıra (Şarole(n=10), Holstein(n=4), Simental(n=4) ve Liao(n=140)) ait 17 STR bölgesi için PCR çalışmaları yapmışlardır. Tür özgüllüğü, hassasiyet, sapma (stutter) analizi ve popülasyon genetik parametreleri detaylı şekilde değerlendirilmiştir. Liaoyu beyaz sığırlarında 176 allel tespit edilmiş, 24 yeni allel bildirilmiştir. Beklenen heterozigotluk oranı 0,1272–0,8802 arasında değişmiştir. STR analizleri sığır bireylerinin tanımlanmasında ve ebeveynlik testlerinde kullanılabilecek hızlı, hassas ve ekonomik bir araçtır. Bu sistem, selektif ıslah programları, popülasyon genetik araştırmaları ve adli genetik çalışmaları için önemli bir kaynak sağlayacaktır.

Van der Goor vd. (2009) sığır (*Bos taurus*) popülasyonlarında adli genetik analizlerde kullanılmak üzere 16 kısa tandem tekrar (STR) lokusunun değerlendirmişlerdir. 20 farklı sığır ırkından rastgele seçilen 4,162 birey üzerinde yapılan analizlerde, ebeveyn dışlama, beklenen ve gözlenen heterozigotluk (HE ve HO), kimlik doğrulama olasılığı ve null allel frekansları hesaplanmıştır. Sonuçlar, kullanılan 16 STR lokusunun adli uygulamalar için yeterli bilgi sağladığını ve bireylerin doğru ırka atanmasında yüksek doğruluk sunduğunu göstermiştir. Ayrıca, ISAG tarafından önerilen 12 lokusa ilaveten dört ek STR kullanılması ile ebeveynlik doğrulamasında doğruluk oranlarının belirgin şekilde arttığı bulunmuştur.

Kriyoprezervasyon, biyolojik örneklerin uzun süreli saklanması sağlayan bir yöntemdir. Ancak, dondurma ve çözme işlemleri sırasında oluşabilecek fiziksel ve kimyasal stresler, DNA bütünlüğünü etkileyebilir. Bu nedenle, kriyoprezervasyonun DNA hasarı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi önemlidir (Ladeira vd., 2021). Kriyoprezervasyon,

hücrelerin ve dokuların düşük sıcaklıklarda dondurularak uzun süreli muhafazasını sağlayan bir biyoteknolojik yöntemdir (Medeiros vd., 2002). Özellikle hayvancılıkta genetik kaynakların korunması, suni tohumlama ve embriyo transferi gibi uygulamalar için vazgeçilmezdir. Ancak dondurma ve çözme süreçleri sırasında meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişimler, DNA bütünlüğü dahil olmak üzere hücre yapılarında çeşitli hasarlara neden olabilir (Watson, 2000).

Kriyoprezervasyon, hayvan genetik materyalinin korunmasında önemli avantajlar sunmasına rağmen, dondurma ve çözme süreci sırasında oluşan kriyojenik stres, hücresel yapıların yanı sıra DNA üzerinde de potansiyel olarak geri dönüşü olmayan hasarlara yol açabilir. Bu hasarların başlıca nedenleri arasında buz kristali oluşumu, ozmotik şok, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve kriyoprotektan toksisitesi yer alır (Baust vd., 2009).

DNA hasarı, hücresel işlevlerin bozulmasına, mutasyonlara ve çeşitli hastalıklara yol açabilen kritik bir biyolojik olaydır. Bu nedenle, DNA hasarının hassas ve güvenilir bir şekilde tespiti, genetik toksikoloji, çevresel biyomonitöring ve klinik araştırmalar gibi birçok alanda büyük önem taşımaktadır. Çevresel kirleticilerin canlılar üzerindeki etkilerini değerlendirmek için Comet Assay sıklıkla kullanılır. Özellikle sucul organizmalarda, pestisitler ve ağır metaller gibi genotoksik ajanların DNA üzerindeki etkileri bu teknikle incelenmiştir (Yadam, 2023). Comet Assay, bu amaçla geliştirilen ve tek hücre düzeyinde DNA hasarını değerlendirebilen duyarlı bir tekniktir (Collins, 2004). Comet Assay, hücrelerin agaroz jel içinde enkapsülasyonu, lizisi ve ardından elektroforez uygulanmasıyla gerçekleştirilir. DNA'daki kırıklar, elektrik alanı altında DNA'nın jel içinde hareket etmesine neden olur ve bu hareket, floresan boyalarla boyandığında mikroskop altında "kuyruklu yıldız" (comet) benzeri bir görüntü oluşturur. Kuyruğun uzunluğu ve yoğunluğu, DNA hasarının derecesini yansıtır (Speit ve Hartmann, 2006). Comet Assay, kimyasal maddelerin genotoksik potansiyelini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Hem in vitro hem de in vivo sistemlerde uygulanabilirliği, bu tekniği toksikolojik değerlendirmelerde değerli kılar (Cordelli vd., 2021).

Comet Assay, insan popülasyonlarında DNA hasarının değerlendirilmesinde de kullanılır. Sigara içimi, diyet, yaşam tarzı ve mesleki maruziyet gibi faktörlerin DNA üzerindeki etkileri bu teknikle araştırılmıştır (Liao vd., 2009). Comet Assay, çeşitli hastalıkların patogeneğinde DNA hasarının rolünü araştırmak için kullanılmıştır. Örneğin, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, Alzheimer ve kanser gibi durumlarda artan DNA hasarı seviyeleri gözlemlenmiştir (Liao vd., 2009). Ayrıca, bu teknik, bireylerin DNA onarım kapasitesini değerlendirmek için de kullanılmaktadır (Cordelli vd., 2021). Comet Assay'ın

güvenilirliğini artırmak için standart protokollerin geliştirilmesi önemlidir. Minimum Bilgi Raporlama Kriterleri (MIRCA), bu amaçla önerilen bir standarttır ve deneysel koşulların detaylı raporlanmasını teşvik eder (Azqueta ve Collins, 2013).

Fibroblast kriyoprezervasyonuna yönelik çalışmalarda Comet testinin kullanılmasının temel hedefleri, dondurma ve çözme süreçlerinde meydana gelen DNA hasarının boyutunu değerlendirmek ve hücrelerin çözülme sonrası canlılık ve metabolik fonksiyonlarını karşılaştırmaktır. Kriyoprezervasyonun hücre içi buz kristallerinin oluşumuna bağlı olarak DNA parçalanması ve mitokondriyal fonksiyonlarda değişiklikler gibi önemli hücresel değişikliklere yol açabileceğini bildirmiştir (Borges vd., 2020). Benzer şekilde, başka bir çalışmada hem kriyoprezervasyonun hem de uzun süreli kültür koşullarının hücresel stres ve apoptozu tetikleyebileceğini vurgulayarak, hücre sağlığının korunması açısından etkin saklama yöntemlerinin önemine dikkat çekmiştir (Silva vd., 2021).

Koruma genetiği kapsamında, fibroblast hücre hatlarının kriyoprezervasyon teknikleriyle uzun vadeli olarak muhafaza edilmesi, biyolojik çeşitliliğin sürdürülebilirliği açısından stratejik bir araç olarak değerlendirilmektedir. Fibroblastlardan elde edilen somatik hücre bankaları, tehlike altındaki hayvan türlerinin genetik kaynaklarının saklanması etkili bir yöntem sunmakta; bu durum, ilerleyen dönemlerde klonlama ya da yardımcı üreme teknolojileri yoluyla türlerin yeniden canlandırılmasına olanak tanımaktadır (Holt ve Pickard, 1999; Shorokhova vd., 2024). Özellikle popülasyon büyüklüğü doğal eşiklerin altına inmiş türlerde, canlı bireylerin temin edilememesi durumunda bu hücre hatları, genetik çeşitliliğin korunması adına alternatif bir biyolojik rezervuar işlevi görebilmektedir. Ancak, somatik hücrelerin uzun süreli dondurulması sürecinde karşılaşılan temel sorunlardan biri, hücrelerde oluşabilecek genomik instabilite, apoptoz aktivasyonları ve senesens (hücresel yaşlanma) süreçleridir. Bu nedenle, kriyoprezervasyonun tüm aşamaları –örnek alımı, dondurma protokolleri, çözme koşulları ve sonrasında kültürleme süreçleri– hücrelerin biyolojik bütünlüğünü maksimum düzeyde koruyacak şekilde optimize edilmelidir (Best, 2015; Kuleshova ve Lopata, 2002). Bu bağlamda, antifriz proteinleri, kontrollü soğutma sistemleri ve kriyoprotektan ajanların doğru kombinasyonlarla kullanımı, hücre canlılığını ve fonksiyonelliğini artırmak adına kritik önem taşımaktadır.

Kriyoprezervasyon araştırmalarında farklı fibroblast hücre hatları kullanılmış olup, elde edilen sonuçlar çeşitlilik göstermektedir. Örneğin Arap devesinden elde edilen fibroblastların kriyoprezervasyon sonrasında fonksiyonlarını koruduğunu ortaya koyarak, uzun vadeli saklama açısından bu hücrelerin potansiyelini gözler önüne sermiştir (Saadeldin

vd., 2019). Öte yandan hücre tipleri arasındaki yapısal farklılıkların –örneğin hücre yoğunluğu ve boyutu– kriyoprezervasyon protokollerinin başarısını etkileyebileceğini, özellikle soğutma hızları ve kriyoprotektan seçimiyle ilişkili olarak bildirmiştir (Naaldijk vd., 2016). Kriyoprotektan seçimi bu süreçte kritik bir öneme sahiptir; zira hatalı konsantrasyonlar hücreleri korumak yerine hasara uğratabilir ve bu durum, optimum koşulların titizlikle belirlenmesini zorunlu kılar (Borges vd., 2017).

Son yıllarda, biyobankacılık ve koruma çalışmaları bağlamında çeşitli hayvan türlerinden elde edilen fibroblastların kriyoprezervasyonu önemli ölçüde ilgi görmüştür. Bu teknik, hücrelerin son derece düşük sıcaklıklarda dondurularak saklanmasını içerir ve temel amacı genetik materyalin ve hücre canlılığının ileride kullanılmak üzere korunmasıdır (Ji vd., 2017). Bu tür çalışmalarda en sık tercih edilen hücre tiplerinden biri, izolasyonunun ve kültürünün görece kolay olması nedeniyle fibroblastlardır (Henrot vd., 2020). Kriyoprezervasyonun hücresel DNA üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılan en değerli araçlardan biri ise, DNA bütünlüğünü tek hücre düzeyinde analiz eden Comet testidir. Comet testi (alkalin elektroforez yöntemi), DNA hasarının tespitinde yaygın olarak kullanılan hassas ve hızlı bir yöntemdir. Özellikle lenfosit örneklerinde DNA hasar düzeyini değerlendirmek amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir (Singh vd., 1988). Günümüzde, sperm örneklerinin dondurma ve çözündürme işlemlerine maruz kaldıktan sonra DNA bütünlüğündeki değişiklikleri değerlendirmek için Comet analizi yaygın olarak kullanılmaktadır (Donnelly vd., 2001; Thomson vd., 2009). Comet testi, dondurma-çözündürme sonrası sperm DNA bütünlüğünün korunup korunmadığını değerlendirmek amacıyla kullanılmakta ve DNA hasar seviyelerindeki artışı yüksek duyarlılıkla ortaya koyabilmektedir (Hughes vd., 1996). Dondurma işlemi sırasında sperm hücre zarlarının yapısal bütünlüğü bozulabilir ve buz kristallerinin oluşumu, hücresel stres ve oksidatif hasara neden olabilir (Watson, 2000). Dondurma protokollerinde kullanılan kriyoprotektanlar (örneğin, gliserol veya dimetil sülfoksit) bu hasarın azaltılmasında önemli rol oynasa da bazı ajanların toksik etkileri de göz ardı edilmemelidir (Aitken ve Clarkson, 1988; Watson, 2000). Çalışmamızda, hücre örneklerinin uzun süreli dondurulmasının DNA bütünlüğü üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla Comet analizi kullanılmış ve elde edilen bulgular, kontrol grubunu oluşturan dondurulmamış taze örneklerle karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu olarak hiçbir kriyoprezervasyon işlemine tabi tutulmamış örneklerin seçilmesi, dondurma sürecinin tek başına DNA hasarına katkısını izole edebilmemizi sağlamıştır.

DNA hasarı düzeyi, yalnızca hücre tipine değil, aynı zamanda hayvan türüne, kullanılan kriyoprotektanlara ve uygulanan kriyoprezervasyon protokolüne göre değişiklik

gösterir. Örneğin, gliserol genellikle boğa spermi için uygunken, domuz sperminde daha yüksek toksisite gösterebilir (Watson, 2000). Ayrıca, dondurma hızları ve çözme sıcaklıkları gibi fiziksel parametrelerin optimizasyonu, DNA bütünlüğünün korunması açısından büyük önem taşır (Mazur, 2004). Bazı türlerde (örneğin, atlarda) kriyoprezervasyona karşı daha yüksek direnç gözlenirken, diğerlerinde (örneğin tavşan veya keçilerde) DNA hasarına karşı daha duyarlı bir profil ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle tür-spesifik kriyoprezervasyon protokolleri geliştirilmesi, DNA bütünlüğünün korunmasında kritik rol oynar.

Çeşitli çalışmalarda, kriyoprezervasyon sonrası sperm, oosit ve embriyolarda farklı düzeylerde DNA hasarları gözlemlenmiştir. Örneğin, boğa spermleri üzerinde yapılan bir çalışmada, dondurma-çözme işlemi sonrası comet assay ile belirgin DNA kuyruk uzunluklarında artış kaydedilmiştir (Pena vd., 2005). Benzer şekilde, domuz oositlerinde kriyoprezervasyonun DNA bütünlüğünü olumsuz etkilediği rapor edilmiştir (Silva vd., 2015).

Sperm hücreleri, kriyoprezervasyona en sık maruz kalan hücre tiplerinden biridir. Yapılan araştırmalar, özellikle boğa, koç ve domuz gibi evcil hayvanların sperm hücrelerinde kriyoprezervasyonun, DNA'nın tek sarmal kırıkları (SSB) ve çift sarmal kırıkları (DSB) gibi hasar türlerine neden olabileceğini göstermektedir (Thomson vd., 2009). Comet assay ile yapılan analizlerde, kuyruk uzunluğu ve DNA yüzdesi gibi parametrelerde anlamlı artışlar rapor edilmiştir (Pena vd., 2005). Bu tür hasarlar, fertilizasyon başarısını ve embriyo kalitesini doğrudan etkileyebilir. Örneğin, boğa spermlerinde yapılan bir çalışmada, gliserol gibi kriyoprotektanların DNA üzerinde oksidatif strese bağlı hasarları artırabildiği gösterilmiştir. Antioksidan takviyesi ile bu etkilerin azaltılabileceği de aynı çalışmada gösterilmiştir (Khalifa vd., 2008). Oosit ve embriyo hücreleri, spermden farklı olarak daha büyük ve metabolik olarak daha aktiftir. Bu da onları kriyoprezervasyon sırasında hem fiziksel hem de kimyasal streslere karşı daha savunmasız hale getirir (Rizos vd., 2003). Oositlerde zona pellucida ve kortikal granül yapısındaki değişiklikler, DNA koruyuculuğunu olumsuz etkileyebilir. Comet assay ile analiz edilen vitrifiye edilmiş domuz oositlerinde, kuyruk momenti ve DNA kuyruk oranının anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir (Silva vd., 2015).

Koç spermi, plazma membran yapısı nedeniyle orta düzeyde bir kriyotoleransa sahiptir. DNA hasarı boğa ve domuzla karşılaştırıldığında daha düşük seviyededir (Karoui vd. 2012). At spermi, bazı türlere göre kriyoprezervasyona daha toleranslıdır. DNA hasarı daha az görülmekle birlikte, yine de dondurma-çözme sürecine bağlı sınırlı düzeyde hasar bildirilmiştir. Tavşan spermi kriyoprezervasyona karşı oldukça duyarlıdır. DNA hasarı genellikle hem ROS artışı hem de yetersiz zar stabilizasyonundan kaynaklanır (Arenas vd.,

2017). Domuz spermi kriyoprezervasyona oldukça hassastır. Plazma zarının lipid içeriği ve su geçirgenliği, düşük sıcaklıklarda yapısal bozulmalara ve yüksek oranda DNA hasarına neden olur (Cerolini vd., 2001).

Domuz sperminde Comet analizinin etkin bir şekilde uygulanabilmesi için kromatin yapısının tamamen ayrılması gerektiğini vurgulamaktadır. Özellikle proteinase K ile yapılan uzun süreli inkübasyonların, DNA hasarının daha hassas bir şekilde tespit edilmesine olanak sağladığı belirtilmiştir (Ribas-Maynou vd., 2021). Farklı domuz bireylerinin kriyoprezervasyon sonrası sperm DNA hasarına karşı gösterdiği değişkenliği incelemiştir. Comet assay kullanılarak değerlendirilen DNA hasarı, bireysel farklılıkların önemini vurgulamaktadır (Fraser vd., 2017). Domuz sperminde DNA hasarının embriyo gelişimini olumsuz etkilediğini, ancak oosit fertilizasyonunu etkilemediğini göstermektedir. Comet assay kullanılarak değerlendirilen DNA bütünlüğü, embriyo gelişim sonuçlarıyla ilişkilendirilmiştir (Mateo-Otero vd., 2022).

Bu çalışmada farklı ırklara ait fibroblast hücre örneklerinde comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti özellikleri incelenmiş ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olup olmadığı değerlendirilmiştir. Kuyruk yoğunluğu değişkeni bakımından tüm deney grupları, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek değerlere sahip bulunmuştur. Bu durum, farklı ırkların Comet kuyruk yapısında yoğunluk açısından genetik varyasyonlara sahip olmadığı ancak kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği düşündürmektedir. Özellikle pozitif kontrol DNase grubunda gözlenen anlamlı artış, bu grubun deneysel müdahaleye (DNase enzimine) güçlü bir yanıt verdiğini göstermektedir. Kuyruk yoğunluğu hem hücresel düzeydeki yapısal bütünlük hem de olası dayanıklılık göstergesi olması açısından önem arz etmektedir. Kuyruk uzunluğu değişkeninde ise genel olarak ırklar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu bulgu, kuyruk uzunluğunun, genetik faktörlerden ziyade çevresel faktörlerden veya gelişimsel süreçlerden daha fazla etkilenebileceğini düşündürmektedir. Ancak pozitif kontrol DNase grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış tespit edilmesi, spesifik bir deneysel müdahalenin kuyruk uzunluğu üzerinde de etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Kuyruk momenti değişkeninde ise tüm deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artışlar gözlenmiştir. Moment değerlerindeki bu artış, kuyruk yapısında hem yoğunluk hem de uzunluk kombinasyonlarının değişim gösterdiğini ve bunun mekanik özellikler üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen sonuçlar, dondurulmuş örneklerde DNA molekülünün daha belirgin şekilde kuyruk formasyonu gösterdiğini, dolayısıyla kriyoprezervasyonun hücresel düzeyde genotoksik stres yaratabileceğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, daha önce memeli

hücrelerinde dondurma ve çözme işlemlerinin DNA hasarına neden olabileceğini bildiren çalışmalarla (Morris vd., 2012; Pegg, 2015) uyumludur. Ayrıca, kontrollü soğutma protokollerine rağmen meydana gelen bu hasarın, özellikle genetik analizler veya ileri biyoteknolojik uygulamalarda kullanılacak hücreler için önemli sonuçlar doğurabileceği değerlendirilmektedir. Dolayısıyla, dondurma koşullarının optimizasyonu ve potansiyel DNA hasarını minimize edecek kriyoprotektan stratejilerin geliştirilmesi, hücre biyobankacılığı ve genetik araştırmalar açısından kritik öneme sahiptir.

Silva vd. (2021) jaguar kulak derisinden elde ettikleri fibroblast hücrelerinde in vitro koşullarda kültüre edilmiş ve dondurulmuşlardır. Brezilya'nın farklı şehirlerinden 5 jaguardan elde ettikleri kulak dokusundan in vitro çalışmalarda elde ettikleri fibroblast hücrelerde 1., 3. ve 10. pasajlardan sonra ve kriyopreservasyondan sonra hücrelerdeki canlılık ve çoğalma aktivitesinin değişmediğini bildirmişlerdir. Dondurulmamış grubu kontrol grubu olarak kullanmışlardır. Dondurma işlemi uygulanmamış canlı hücre sayısını  $92,5 \pm 6,2$  ve uygulanmış hücre sayısını  $73,2 \pm 9,8$  olarak bildirmişlerdir. Ayrıca hücrelerde metabolizma olarak farklılık gözlemlemişler ve dondurulmamış hücrelerde metabolizma hızı  $100,0 \pm 6,0$  iken dondurulmuş hücrelerde metabolizma hızı  $32,7 \pm 2,8$  olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada mitokondriyal membran potansiyelinin dondurulmuş hücrelerde azaldığını bildirmişlerdir. 1. 3. ve 10 pasajları kıyaslandığında dondurulmuş örneklerde 10. pasajdan sonra kültüre edilen hücrelerde apoptozisin arttığı gözlemlenmiştir.

İsmail vd. (2013) Boer Keçilerinde çözülme sonrası spermiler hem alkali (pH 13) hem de nötr (pH 10) koşullarda comet analizi ile değerlendirmişlerdir. Yaptıkları çalışma ile alkali ve nötral Comet analizinde spermada tek ve çift zincir DNA kırıklarında farklar olduğunu ortaya koymuşlardır. Nötral Comet analizinde kuyruk momentini  $158,49 \pm 11,80 \mu\text{m}$  ve kuyruk momenti yüzdesi  $9,49 \pm 1,23$  iken Alkali Comet analizinde kuyruk momentini  $25,07 \pm 4,77 \mu\text{m}$  yüzdesi  $3,03 \pm 0,16$  olarak anlamlı derecede daha yüksektir ( $p < 0,05$ ). DNA zincirindeki kırıkların pH 10 değerinde maksimum olduğunu açıklamışlardır. Elde edilen sonuçlar, Boer keçisi spermasında dondurma-çözme sürecinin çift iplikçikli DNA kırıklarına neden olduğunu göstermektedir. Bu durum, düşük DNA tamir kapasitesi ve oksidatif stres kaynaklı serbest radikal üretimiyle ilişkilendirilebilir. Türler arası farklılıkların, sperm hücrelerinin kriyotolerans seviyelerinde belirleyici olduğu düşünülmektedir. Boer keçisi spermasının, düşük kriyoresistans nedeniyle dondurma işlemi sırasında DNA bütünlüğünü koruma kapasitesinin sınırlı olduğu ileri sürülmektedir (İsmail vd., 2013).

Fraser ve Strezezek (2004) Boer Keçi sperma örneklerinde dondurma sonrası çözündürmenin etkilerini görmek için Comet analizi ile çalışmışlardır. Dondurma-çözme işlemi, sperm DNA bütünlüğünde anlamlı bozulmalara yol açmıştır ( $p \leq 0,05$ ). Özellikle koruyucu madde içermeyen K-3 dolgu maddesinde dondurulan sperm, diğer gruplara göre daha fazla DNA hasarına sahiptir. Laktöz-HEY-G ve laktöz-LPFO-G dolgu maddeleri (trilaminat bazlı dolgu çözeltileridir) ile dondurulan spermde ise DNA hasar oranı belirgin şekilde daha düşüktür. Ayrıca, dondurma sonrası motilite ve membran bütünlüğü azalmış, bu durum sperm kalitesinde genel bir düşüşle ilişkilendirilmiştir. Çalışma sonuçları, kriyoprezervasyon sürecinin keçi spermasında DNA bütünlüğünü önemli derecede etkilediğini göstermiştir. Özellikle antioksidan içeriği yüksek dolgu maddelerin kullanımı, kriyojenik stres kaynaklı DNA hasarını azaltmada etkili olmuştur. Buna rağmen, bireyler arası farklılıklar gözlemlenmiştir; bu durum bireysel sperm kriyotolerans farklarının önemine işaret etmektedir. Ayrıca, çalışmada comet analizi yönteminin sperm DNA hasarının hassas bir göstergesi olduğu bir kez daha doğrulanmıştır. Dondurma-çözme işlemleri keçi spermatozoalarının DNA bütünlüğünde bozulmaya yol açtığı görülmektedir. Nötral comet analizi, dondurulmuş spermde DNA bütünlüğü değerlendirmesinde güvenilir bir yöntem olarak önerilmektedir.

2025 yılında gerçekleştirilen bir meta-analiz, çiftlik hayvanlarında sperm DNA parçalanması (SDF) ile düşük fertilite arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, Comet Assay dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle yapılan değerlendirmelerin, yüksek kaliteli damızlık erkeklerin seçilmesinde önemli olabileceğini vurgulamaktadır (Abah vd., 2025).

Hu vd. (2002) yılında Sprague-Dawley sıçanlarından alınan karaciğer ve böbrek dokuları, homogenizasyon veya kollajenaz enzimi ile hücre izole edip donmuş ve donmamış örneklerde Comet Analizi ile değerlendirmişlerdir. Taze dokularda, kollajenaz enzimi homogenizasyona kıyasla daha az DNA hasarı ile sonuçlanmıştır. Dondurma işlemi tek başına ciddi DNA hasarına yol açarken, DMSO veya gliserol ile kriyoproteksiyon bu hasarı belirgin şekilde azaltmıştır. Özellikle %10 DMSO ile kriyoproteksiyonun DNA bütünlüğünü daha iyi koruduğu tespit edilmiştir. Optimum kollajenaz konsantrasyonunun karaciğer için 150 ünite/g ve böbrek için 300 ünite/g olduğu belirlenmiştir.

Volobaev vd. (2021) yılında insan periferik kan lökositlerini DMEM ortamında kültüre edilmiş insan akciğer fibroblast hücreleri (FLECH-104) üzerinde, kısa (6–24 saat) ve uzun süreli (1–4 hafta,  $-80^{\circ}\text{C}$  ve  $-196^{\circ}\text{C}$ ) kriyoprezervasyonun Comet analizi sonuçlarına etkileri araştırmıştır. Sonuçlar, kısa süreli oda sıcaklığı veya  $4^{\circ}\text{C}$ 'de saklamanın hem insan

periferik kan lökositleri hem de FLECH-104 hücrelerinde DNA hasarında belirgin artışa neden olduğunu göstermiştir. Uzun süreli dondurulmuş örneklerde, FLECH-104 hücrelerinde DNA hasarında anlamlı artış gözlenmiş, ancak insan periferik kan lökosit örneklerinde DNA hasar parametrelerinde genel bir azalma kaydedilmiştir. Buna rağmen, her iki hücre tipinde de yüksek derecede hasar görmüş hücrelerin (HDC) frekansında artış tespit edilmiştir. Çalışma, biyolojik örneklerde Comet analizi uygulamalarında kriyoprezervasyonun dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Kısa ve uzun süreli kriyoprezervasyon, hem insan periferik kan lökositlerini hem de FLECH-104 hücrelerinde Comet analizi ile saptanan DNA hasar parametrelerini önemli ölçüde etkilemektedir. Özellikle uzun süreli dondurma, FLECH-104 hücrelerinde DNA bütünlüğünü olumsuz etkilerken, HPBL'lerde genel bir azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, kriyoprezervasyonun araştırmalarda standartlaştırılmasının ve hücre tipi spesifik protokollerin geliştirilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Stachowiak vd. (2009) seçilmiş vitrifikasyon yöntemlerine maruz kalan sığır oositlerinde Comet analizi ile DNA hasar düzeylerinin karşılaştırılmıştır. Bu çalışma, sığır oositlerinde farklı vitrifikasyon yöntemlerinin DNA bütünlüğü üzerindeki etkilerini alkaline Comet analizi kullanarak değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Oositler, damla vitrifikasyonu, Open Pulled Straw (OPS) ve klasik 0,25 ml payet vitrifikasyonu yöntemleriyle vitrifiye edilmiştir. Sonuçlar, damla sistemi ve OPS ile vitrifiye edilen oositlerde DNA bütünlüğünün büyük ölçüde korunduğunu, buna karşın payet yönteminde vitrifiye edilen oositlerin %15,4'ünde belirgin DNA fragmentasyonu ( $p \leq 0,05$ ) meydana geldiğini göstermiştir. Minimum örnek hacmi bazlı vitrifikasyon yöntemlerinin, oositlerin DNA bütünlüğünü daha etkin şekilde koruyarak daha yüksek blastosist gelişim oranları sağladığı ortaya konmuştur. Ayrıca, çalışma, oosit yüzeyindeki granüloza hücrelerinin uzaklaştırılmasının, vitrifikasyon esnasında oositin yeterli kriyoprotektan penetrasyonuna olanak sağladığını ve bu nedenle DNA korunmasına katkı sunduğunu ileri sürmektedir.

Comet analizleri ile ortaya konulan DNA hasarının gen ifadesi düzeyinde bir değişiklik oluşturup oluşturmadığını test etmek üzere, DNA tamir mekanizmalarında rol oynayan bir genin (Apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APEX1) iki housekeeping gen (HKG) ile göreceli ifade değişimi de değerlendirilmiştir. Toorani vd. (2021) GUSB geninin kulak fibroblastlarında en yüksek kararlılığa sahip genlerden biri olduğunu bildirmiş; böylece transkriptom çalışmalarında klasik GAPDH/ACTB'den daha güvenilir olabileceğini vurgulamıştır. Barber (2005) ve Degrelle vd. (2012) tarafından yapılan çalışmalarda ise GAPDH geni hala sık tercih edilen, özellikle ısı stresi veya yeniden programlama

protokollerinin temel kontrolü olarak kullanılan “altın standart” gen olarak belirtilmiştir. Sunulan tez çalışmasında ise, farklı algoritmalar üzerinden çalışan RefFinder uygulaması sonuçlarına göre her iki genin geometrik ortalamalarının alınarak kullanılması en ideali olduğu belirlenmiş ancak bunun yanı sıra GAPDH geninin de kabul edilebilir stabiliteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Buna karşın, GUSB geninin stabilitesi düşük olduğu için tek başına housekeeping gen olarak kullanılmasının uygun olmadığı düşünülmektedir. RefFinder çıktıları, Vandesompele vd. (2002) tarafından da önerildiği gibi, iki housekeeping genle normalizasyonun (GAPDH + GUSB) tekil referans kullanımına göre daha güvenilir olduğunu göstermektedir.

APEX1 geni, DNA baz eksizyon onarım mekanizmasında merkezi bir rol üstlenen çok yönlü bir proteini kodlamaktadır. Bu genin başlıca işlevi, DNA sarmalında oluşan apürinik/apirimidinik (AP) bölgeleri tanıyarak endonükleaz aktivitesiyle bu bölgeleri kesmek ve böylece onarım sürecini başlatmaktır (Tell vd., 2009; Xanthoudakis vd., 1994). Bununla birlikte, APEX1’in hücre içi redoks dengesini düzenleyici özellikleri sayesinde p53, NF- $\kappa$ B ve HIF-1 $\alpha$  gibi önemli transkripsiyon faktörlerinin DNA’ya bağlanmasını da etkilediği ve bu yolla hücrel stres yanıtlarını modüle ettiği gösterilmiştir (Bhakat vd., 2009). DNA hasarının arttığı durumlarda APEX1 geninin ekspresyon düzeyinin artması, onarım kapasitesinin aktive olduğunu düşündürmektedir. Nitekim, insan hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda UV ışını ya da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi genotoksik ajanlara maruz kalındığında APEX1, mRNA ve protein seviyelerinde anlamlı yükselişler rapor edilmiştir (Audebert vd., 2004; Kim vd., 2024; Yamakawa vd., 2004).

Sunulan tez çalışmasında, APEX1 genine ve iki farklı Housekeeping gene yönelik yapılan RT-qPCR analizleri, kriyoprezervasyon sürecinin DNA tamir mekanizması üzerinde aynı etkiyi göstermediğini ortaya koymuştur. RT-qPCR sonuçlarına göre, deney grubunda APEX1 gen ekspresyonu anlamlı bir şekilde azalmış ( $p < 0,001$ , kat değişimi  $\approx 0,52$ ) ve bu durum, dondurma koşullarının APEX1 genini transkripsiyonel seviyede baskıladığını düşündürmüştür. Ayrıca, kontrol ( $2,19 \pm 0,38$ ) ve deney ( $3,12 \pm 1,04$ ) gruplarının ortalama  $\Delta C_t$  değerleri arasında  $\approx 0,93$  döngülük fark gözlenmiş olup, deney grubundaki standart sapmanın daha yüksek olması ( $SD = 1,04$ ) varyans homojenliği varsayımını ihlal etmiştir. Bu nedenle uygulanan Welch bağımsız örneklem t-testi anlamlı bir farklılık ortaya koymuştur ( $t(36,7) = -5,17$ ;  $p < 0,001$ , Cohen’in  $d = 0,95$ ). Bu bulgular, dondurarak saklama sürecinin hedef gen ekspresyonunu kayda değer oranda baskıladığını göstermektedir.

Bu bilgiler ışığında yürütülen çalışmamızda, uzun süreli kriyoprezervasyon koşullarında saklanan primer fibroblast hücrelerinde DNA bütünlüğü Comet Assay ile

değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kontrol grubuna kıyasla belirgin DNA hasarını ortaya koymuştur. Kuyruk formasyonlarının izlendiği Comet analizleri, çift zincir kırıkları da dahil olmak üzere çeşitli düzeylerde DNA hasarının göstergesi olarak yorumlanmaktadır (Olive ve Banath, 2006). Bu bulgular, DNA onarım mekanizmalarının devreye girmesi gerektiğine işaret ederken, aynı hücrelerde APEX1 gen ekspresyonunun düşmüş olması beklenmedik bir durum yaratmıştır. Bu durumun arkasında yatan olası nedenler birkaç başlık altında ele alınabilir. Öncelikle, kriyoprezervasyona maruz kalmış primer hücrelerde metabolik aktivitenin azaldığı ve hücrelerin yaşlanma (senesens) ya da apoptoz gibi süreçlere girebildiği bilinmektedir. Literatürde, yaşlanan fibroblastlarda tamir mekanizmalarına ilişkin yollara ait genlerin transkripsiyonel olarak baskılandığı gösterilmiştir (Chen vd., 2020; Sedelnikova vd., 2004). Dolayısıyla, DNA hasarının varlığına rağmen onarım yanıtlarının yetersiz kalması yaşlanma ile ilişkili olabilir.

Bir diğer olasılık, çözülme sonrası oluşan hasara yanıtta rol oynayan moleküler sinyallerin aktifleşmesi için yeterli süre verilmemiş olmasıdır. Bu da APEX1 ekspresyonunun, analiz yapıldığı sırada henüz yeterince artmamasına neden olabilir. Ayrıca, uzun süreli dondurmanın ardından RNA bütünlüğünün bozulması da gen ekspresyon düzeylerinin mevcut biyolojik süreçleri tam olarak yansıtmamasını engelleyebilir. Bu durum, özellikle primer hücrelerde RNA izolasyon kalitesiyle ilgili zorluklar yaşayan birçok çalışmada vurgulanmıştır (Hale vd., 2017).

Sonuç olarak, Comet Assay ile doğrulanan DNA hasarına rağmen APEX1 geninin baskılanmış olması, hücrelerin onarım yerine alternatif yanıt yollarına (örneğin apoptoz ya da transkripsiyonel sessizlik) yönelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu durumun daha iyi anlaşılabilmesi için, yalnızca APEX1 değil, DNA hasar yanıtında yer alan diğer onarım genlerinin de sistematik olarak analiz edilmesi önem taşımaktadır. Gelecekte, Comet Assay'in yüksek verimli versiyonlarının geliştirilmesi, otomatik görüntü analiz sistemlerinin entegrasyonu ve diğer moleküler biyoloji teknikleriyle kombinasyonu, bu tekniğin uygulama alanlarını genişletebilir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tezinde, Türkiye'de yetiştirilen farklı sığır ırklarının genetik çeşitliliği değerlendirilmiş ve biyobankacılık koşullarında uzun süre saklanan hücre örneklerinin moleküler bütünlükleri incelenmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan 11 STR lokusu aracılığıyla gerçekleştirilen genetik analizler, incelenen popülasyonlarda Hardy-Weinberg dengesinin genel olarak korunduğunu ve genetik yapının belirgin bir seçim ya da genetik sürüklenmeden etkilenmediğini ortaya koymuştur. Buna karşılık, Comet analizleri uzun süreli dondurma işleminin DNA bütünlüğü üzerinde olumsuz etkiler yarattığını açıkça göstermiştir. Bu bulgu, gen bankalarında saklanan biyolojik materyallerin belirli aralıklarla yenilenmesi veya koleksiyona taze örneklerin eklenmesi gerektiğini gündeme getirmektedir. Bu tez, Türkiye'deki sığır popülasyonlarının genetik yapısına ilişkin güncel ve detaylı veriler sunmanın yanı sıra, gen bankalarında uzun süreli olarak saklanan hücre örneklerinin moleküler bütünlüğü hakkında da önemli bilgiler sağlamaktadır. Elde edilen bulgular, hem hayvan genetik kaynaklarının korunmasına yönelik stratejilerin şekillendirilmesi hem de biyobankacılık uygulamalarının sürdürülebilirliği açısından dikkate değer katkılar sunmaktadır.

STR analizlerinden elde edilen veriler, incelenen lokusların yüksek düzeyde polimorfizm içerdiğini ve bu yönüyle hem popülasyon genetiği hem de adli genetik uygulamalar açısından güçlü belirteçler olduklarını göstermiştir. TGLA122, TGLA227 ve BM2113 gibi lokusların yüksek allel çeşitliliğine sahip olması, bu belirteçlerin ırklar arası genetik ayrımı değerlendirmede etkili olabileceğini göstermektedir. Gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri karşılaştırıldığında bazı lokuslarda heterozigotluk eksikliği dikkat çekmiş; bu durum popülasyon alt yapısı, sınırlı örnekleme ya da inbreeding etkileriyle açıklanabilir niteliktedir. Dendrogram analizleri ise popülasyonun genetik yapısının homojen olmaktan uzak olduğunu ve bireyler arasında anlamlı genetik farklılıkların bulunduğunu doğrulamıştır.

Genetik analizlerin ardından, aynı popülasyonlardan elde edilen hücre örneklerinin DNA bütünlükleri Comet analizi yöntemiyle değerlendirilmiştir. Uzun süreli dondurma koşullarına maruz bırakılmış örneklerde, kontrol grubuna (dondurulmamış) kıyasla belirgin DNA hasarı tespit edilmiştir. Özellikle kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti gibi parametrelerde gözlenen artışlar, kriyoprezervasyon sürecinin hücre düzeyinde genotoksik stres oluşturduğuna işaret etmektedir. Tüm biyolojik materyal örnekleri, -80°C'de güvenli bir

şekilde yalnızca birkaç ay süreyle saklanabilmekte olup, uzun süreli depolama koşullarında DNA hasarında belirgin bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle, standart kriyoprezervasyon ve çözme protokollerinin iyileştirilmesine yönelik ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Gen Bankası verilerinden faydalanarak, farklı hayvan ırkları ve çeşitli biyolojik materyaller üzerinde geniş kapsamlı araştırmalar yürütmek büyük önem arz etmektedir. Ayrıca, biyobankalarda uzun süre saklanan hücre örneklerinin ileri moleküler analizlerde kullanılmadan önce kalite kontrol testlerine tabi tutulması gerektiğini ortaya koymaktadır.

DNA hasarının biyolojik yanıtlarını değerlendirmek amacıyla yürütülen RT-qPCR analizlerinde, DNA tamirinde görevli APEX1 geninin ekspresyon seviyesinin deney grubunda anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir. DNA hasarının doğrulanmasına rağmen bu genin baskılanmış olması, hücrelerin onarım mekanizmalarını devreye sokmak yerine, muhtemelen yaşlanma, apoptoz veya transkripsiyonel sessizlik gibi alternatif hücresel süreçlere yöneldiğini düşündürmektedir. Bu durum, dondurularak saklanan primer hücrelerde metabolik aktivitenin azaldığını ve gen ekspresyon yanıtlarının değişebileceğini göstermektedir.

Bu çalışma sonucunda aşağıdaki öneriler sunulabilir:

1. **Genetik karakterizasyon açısından**, kullanılan 11 STR lokusunun hem popülasyon yapısının belirlenmesinde hem de bireyler arası ayırım gücü açısından yeterli olduğu görülmüştür. Bu lokusların, biyobankalarda depolanan örneklerin kimliklendirilmesinde güvenle kullanılabileceği değerlendirilmektedir.
2. **Kriyoprezervasyon koşullarında saklanan hücre örneklerinin**, ileri moleküler analizlere konu edilmeden önce DNA bütünlüğü açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Comet analizi gibi duyarlı yöntemler, biyobankacılıkta kalite kontrol sürecine entegre edilmelidir.
3. **Genetik Materyalin Düzenli Yenilenmesi:** Uzun süreli biyobanka koşullarında materyalin belirli aralıklarla yenilenmesi veya eklenmesi sağlanmalıdır. Gen Bankası uygulamalarında materyalin periyodik olarak kalitesinin değerlendirilmesi, olası DNA hasarlarının tespiti için gereklidir.
4. **Geniş Kapsamlı Araştırmaların Yürütülmesi:** Farklı sığır ırkları ve farklı biyolojik materyaller üzerinde yapılacak ileri çalışmalarda, genetik materyalin uzun süreli saklanabilirliğine ilişkin daha fazla veri toplanmalıdır. DNA tamir mekanizmalarının dondurma sonrası aktivasyon düzeylerini araştıran kapsamlı RT-qPCR (daha fazla gen bölgesi ve daha fazla hayvan sayısı gibi) ve protein ekspresyon analizlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

5. **DNA onarım genlerinin ekspresyon düzeyleri**, dondurma sonrası örneklerin biyolojik uygunluğunun belirlenmesinde tamamlayıcı bir parametre olarak kullanılabilir. Ancak tek bir onarım geni üzerinden değerlendirme yapılmaması, daha geniş bir panel ile analiz yapılması önerilmektedir.
6. **Uzun süreli dondurulmuş örneklerle yapılan gen ekspresyon analizlerinde**, RNA kalitesi ve transkripsiyonel sessizlik gibi potansiyel sınırlayıcı faktörler dikkate alınmalı; analizlerin yorumlanmasında bu değişkenler göz önünde bulundurulmalıdır.
7. **Gelecekteki araştırmalarda**, yalnızca DNA hasar düzeyi değil, aynı zamanda hücre canlılığı, metabolik aktivite ve apoptoz göstergeleri de birlikte değerlendirilerek biyobankadaki hücrelerin fonksiyonel bütünlüğü daha bütüncül bir yaklaşımla incelenmelidir.

Sonuç olarak, kontrollü soğutma protokollerine rağmen meydana gelen DNA hasarının, genetik analizler ve ileri biyoteknolojik uygulamalarda kullanılacak hücreler açısından olumsuz etkiler doğurabileceği değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, dondurma koşullarının optimizasyonu ve potansiyel DNA hasarını en aza indirecek kriyoprotektan stratejilerin geliştirilmesi, hücre biyobankacılığı ve genetik araştırmaların sürdürülebilirliği açısından kritik bir gereklilik olarak karşımıza çıkmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abah, K.O., Ligocka-Kowalczyk, Z., Itodo, J.I., Ameh, G., Partyka, A. & Nizanski, W. (2025). Association between sperm DNA fragmentation and fertility parameters in farm animals: A systematic review and meta-analysis. *BMC Veterinary Research*, 21, Article 204. <https://doi.org/10.1186/s12917-025-04652-9>
- Aarattuthodi, S., Kang, D., Gupta, S.K., Chen, P., Redel, B., Matuha, M., Mohammed, H. & Sinha, A. K. (2025). Cryopreservation of biological materials: applications and economic perspectives. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 61(2), 123–135. <https://doi.org/10.1007/s11626-025-01027-0>
- Alnemari, R., Sukumar, P., Deliorman, M. & Qasaimeh, M.A. (2020). Paper-Based Cell Cryopreservation. *Advanced Biosystems*, 4(2), 1900203. DOI: [10.1002/adbi.201900203](https://doi.org/10.1002/adbi.201900203)
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Anger, J.T., Gilbert, B.R. & Goldstein, M. (2003). Cryopreservation of Sperm: Indications, Methods, and Results. *The Journal of Urology*, 170(4), 1079–1084. DOI: [10.1097/01.ju.0000084820.98430.b8](https://doi.org/10.1097/01.ju.0000084820.98430.b8)
- Aitken, R.J. and Clarkson, J.S. (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9(6), 367–376.
- Amstislavskii, S.I. and Trukshin, I.S. (2010). Cryobanking mammalian embryos: Priorities and the optimal choice of reproductive technologies. *Ontogenez (Russia)*, 41(1), 19–31. <https://doi.org/10.1007/0475-1450>
- Arat, S., Çaputcu, A., Akkoç, T., Pabuccuoğlu, S., Sağırkaya, H., Cirit, U., Nak, Y., Koban, E., Bağış, H., Demir, K., Nak, D., Senunver, A., Kılıçaslan, R., Tuna, B., Çetinkaya, G., Denizci, M. & Aslan, Ö. (2011). Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: The production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23, 1012–1023.
- Arenas, C., Gil, L., Malo, C., González, N., Garde, J.J. & Espeso, G. (2017). Effect of antioxidants and omega-3 fatty acids on sperm quality in rabbit semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(Suppl 2), 269–275. <https://doi.org/10.1111/rda.12893>
- Audebert, M., Salles, B. & Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55117–55126. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409234200>
- Awad, M. ve Kato, T.A. (2025). Modified Alkaline Comet Assay to Detect Oxidative DNA Damage. *Methods in Molecular Biology*, 2933, 1–7. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4574-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4574-1_1)

- Azqueta, A. and Collins, A.R. (2013). The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949–968. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
- Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A. & Clark, B.J. (2005). *GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues*. *Physiological Genomics*, 21(3), 389–395. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2005>
- Barzilay, G. and Hickson, I.D. (1995). Structure and function of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Bioessays*, 17(8), 713–719.
- Baust, J.M., Van Buskirk, R. & Baust, J.G. (2009). Cellular cryopreservation: Evolution of molecular based strategies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 574, 13–26. [https://doi.org/10.1007/0-387-32442-9\\_2](https://doi.org/10.1007/0-387-32442-9_2)
- Best, B.P. (2015). Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*, 18(5), 422–436. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>
- Bhakat, K.K., Mantha, A.K. & Mitra, S. (2009). Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(3), 621–638. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2194>
- Bio-Rad CFX Maestro: Bio-Rad Laboratories. (2019). *CFX Maestro for Windows and Mac OS: User Guide*.
- Borges, A.A., Lima, V.C. & Carvalho, R.S. (2017). Optimization of cryoprotectant concentrations for effective fibroblast cryopreservation. *Cell and Tissue Banking*, 18(3), 357–365. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9621-4>
- Borges, A.A., Silva, A.M. & Souza, R.T. (2020). Effects of cryopreservation on fibroblast mitochondrial activity and DNA integrity. *Cryobiology*, 92, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.01.004>
- Bowden, R.D., Fox, B.W. & Mortimer, R.K. (2003). Comet assay measures of DNA damage are predictive of radiation sensitivity in murine lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 529(1-2), 45–58. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00108-1)
- Brown, A., Smith, R. & Jones, M. (2021). Preservation of Genetic Material in Long-term Storage: Cryopreservation Techniques and Challenges. *Journal of Genetic Resources*, 15(3), 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.genres.2021.03.007>
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W. & Gstraunthaler, G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*. 2010;27(1):53–62.
- Camacho-Sanchez, M., Burraco, P., Gomez-Mestre, I. & Leonard, J.A. (2013). Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 663–673. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12110>
- Casas-Marce, M., Revilla, E. & Goody, J.A. (2010). Searching for DNA in museum specimens: A comparison of sources in a mammal species. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 502–507. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02861.x>
- Cell Biolabs, I. (2017). *OxiSelect™ Comet Assay Kit*. Retrieved from <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-351-comet-assay-kit.pdf>

- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F. & Gliozzi, T.M. (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, 121(3), 395–401. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210395>
- Chen, X., Song, M., Zhang, B., Zhang, Y. & Liu, J. (2020). DNA damage and repair in aging. *Ageing Research Reviews*, 64, 101170. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101170>
- Choi, Y., Kim, H., Lee, S., Park, J. & Kang, H. (2021). Recovery of mRNA levels in cryopreserved ovine oocytes after thawing. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19(1), 88–95. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00750-z>
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Collins, A.R., Møller, P., Gajski, G., Duthie, S.J., Vodenková, S., Langie, S.A.S. & Azqueta, A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: A compendium of protocols. *Nature Protocols*, 18, 929–989. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>
- Cook, P., Brazell, I. & Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science*, 22, 303–324.
- Cordelli, E., Bignami, M. & Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, 10(1), 68–78. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa093>
- Dean, M.D. and Ballard, J.W.O. (2001). Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98(3), 279–283. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00934.x>
- Degrelle, S., Campion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P. & Hue, I. (2012). *Maternal transcripts in the bovine oocyte and preimplantation embryo*. *Molecular Reproduction and Development*, 79(2), 106–121. <https://doi.org/10.1002/mrd.22007>
- Diaz, S., Settele, J., Brondizio, E.S., Ngo, H.T., Agard, J., Arneth, A. & Zayas, C.N. (2019). Pervasive human-driven decline of life on Earth points to the need for transformative change. *Science*, 366(6471), eaax3100. <https://doi.org/10.1126/science.aax3100>
- Donnelly, E.T., Steele, E.K., McClure, N. & Lewis, S.E.M. (2001). Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction*, 16(6), 1191–1199.
- Doyle, A. and Griffiths, J.B. *Cell and tissue culture: laboratory procedures*. 2nd ed. Chichester: Wiley; 2000.
- D’Urso, M., Jorba, I., van der Pol, A., Bouten, C.V.C. & Kurniawan, N.A. (2024). Spatial regulation of substrate adhesion directs fibroblast morphotype and phenotype. *PNAS Nexus*, 3(8), pgae289. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgae289>
- FAO. (2011). *Molecular genetic characterization of animal genetic resources*. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 9. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/3/i2413e/i2413e00.pdf>
- FAO. (2015). *The Second Report on the State of the World’s Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*. Edited by B.D. Scherf & D. Pilling. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/3/i4787e/i4787e00.htm>

- FAO. (2021). *Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/CB4935EN>
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. (2010). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Fraser, L. and Strzeżek, J. (2004). The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 42(1), 49–55. [Viamedica Journals+1scholar.google.pl+1](https://www.viamedica.com/journals/1scholar.google.pl+1)
- Fraser, L., Zasiadczyk, Ł. & Pareek, C. (2017). Effects of boar variability on comet-detected sperm-DNA damage following cryopreservation. *Animal Production Science*, 57(5), 1017–1024. <https://doi.org/10.1071/AN16274>
- Freshney, R.I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Wiley.
- Gamarra, D., Taniguchi, M., Aldai, N., Arakawa, A., Lopez-Oceja, A. & de Pancorbo, M.M. (2020). Genetic characterization of the local Pirenaica cattle for parentage and traceability purposes. *Animals*, 10(9), 1584. <https://doi.org/10.3390/ani10091584>
- Golenberg, E.M., Bickel, A. & Weihs, P. (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(24), 5026–5033. <https://doi.org/10.1093/nar/24.24.5026>
- González, R., Martínez, M., Pérez, L. & Sánchez, A. (2020). DNA integrity in vitrified human embryos: An overview. *Reproductive Medicine Online*, 41(6), 1021–1029. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.08.012>
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J.P. & Bollwein, H. (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.007>
- Hagedorn, M.M., Daly, J.P., Carter, V.L., Cole, K.S., Jaafar, Z., Lager, C.V.A. & Parenti, L.R. (2018). Cryopreservation of fish spermatogonial cells: The future of natural history collections. *Scientific Reports*, 8(1), 6149. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24269-3>
- Hale, M.W., Rottman, J.N. & Rittenhouse, K.D. (2017). Assessment of RNA integrity and quality for microarray analysis. *Biotechniques*, 43(4), 576–578. <https://doi.org/10.2144/000112606>
- Harrison, Kate. Technologynetworks. (2024). Types of Cell Culture Contamination and How To Prevent Them. *Technology Networks*. <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/types-of-cell-culture-contamination-and-how-to-prevent-them-397776>
- Hartl, D.L. and Clark, A.G. (2007). *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates.
- Henrot, P., Laurent, P., Levionnois, E., Leleu, D., Pain, C., Truchetet, M.-E. & Cario, M. (2020). A method for isolating and culturing skin cells: Application to endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes from punch biopsies in systemic sclerosis skin. *Frontiers in Immunology*, 11, 566607. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.566607>
- Hentzer, B. and Kobayasi, T. (1978). Enzymatic liberation of viable cells of human skin. *Acta Dermatovenere (Stockholm)*, 58, 197–202.
- Heyen, D.W., Beattie, C.W. & Kelley, D.H. (1997). Microsatellite markers for genetic mapping of bovine chromosome 5. *Mammalian Genome*, 8(6), 436–438. <https://doi.org/10.1007/s003359900481>

- Hiemstra, S.J., Drucker, A.G., Tvedt, M.W., Louwaars, N., Oldenbroek, K., Awgichew, K. & Da Silva, M. (2006). *Farm animal genetic resources: Safeguarding national assets for food security and trade*. Wageningen: Centre for Genetic Resources, the Netherlands (CGN). <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/41937>
- Holt, W.V. and Pickard, A.R. (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of Reproduction*, 4(3), 143–150. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0040143>
- Hou, Q., Ji, W., An, K., Tan, Y., Liu, P. & Su, J. (2025). Genomic microsatellite characterization and development of polymorphic microsatellites in *Eospalax baileyi*. *Scientific Reports*, 15, Article 524. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-84631-6>
- Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J. & Thompson, W. (1996). A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular Human Reproduction*, 2(8), 613–619.
- IBM SPSS Statistics: IBM Corp. (2023). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 30.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
- Iudica, C.A., Whitten, W.M. & Williams, N.H. (2001). Small bones from dried mammal museum specimens as a reliable source of DNA. *BioTechniques*, 30(4), 732–736. <https://doi.org/10.2144/00304st03>
- Iyama, T. and Wilson, D.M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8), 620–636. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>
- Jaroudi, S., Kakourou, G., Cawood, S., Doshi, A., Ranieri, D.M., Serhal, P., Harper, J.C. & SenGupta, S. B. (2009). Expression profiling of DNA repair genes in human oocytes and blastocysts using microarrays. *Human Reproduction*, 24(10), 2649–2655. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep224>
- Ji, X., Wang, M., Li, L., Chen, F., Zhang, Y., Wang, Y. & Wang, J. (2017). The impact of repeated freeze-thaw cycles on the quality of biomolecules in four different tissues. *Biopreservation and Biobanking*, 15(5), 475–483. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0064>
- Karoui, S., Hernandez, P., Bormann, J., Deloche, M.C. & Schibler, L. (2012). Genetic parameters for sperm head morphometry traits of ejaculates collected with artificial vagina in Lacaune rams. *Theriogenology*, 78(5), 1222–1229. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.021>
- Kim, J.H., Lee, S.Y. & Park, J.H. (2024). Role of APE1/Ref-1 in hydrogen peroxide-induced apoptosis in HK-2 cells. *Kidney Research and Clinical Practice*, 43(2), 186–201. <https://doi.org/10.23876/j-krcp.22.171>
- Kim, T.E., Lim, J.W., Jeong, J.H. & Ryu, H.W. (2024). Differential cytotoxicity, inflammatory responses, and aging effects of human skin cells in response to fine dust exposure. *Environments*, 11(11), 259. <https://doi.org/10.3390/environments11110259>
- Kisiel, M.A., and Klar, A.S. (2019). Isolation and culture of human dermal fibroblasts. In S. Böttcher-Haberzeth & T. Biedermann (Eds.), *Skin Tissue Engineering: Methods and Protocols* (Vol. 1993, pp. 71–78). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9473-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9473-1_6)
- Koressaar, T. and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(10), 229–232.
- Kuleshova, L.L. & Lopata, A. (2002). Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility*, 78(3), 449–454. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03221-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03221-4)

- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P. & Jha, A.N. (2009). Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>
- Ladeira, C., Møller, P., Giovannelli, L., Gajski, G., Haveric, A., Bankoglu, E.E., Azqueta, A., Gerić, M., Stopper, H., Cabêda, J., Tonin, F.S. & Collins, A. (2024). The Comet Assay as a Tool in Human Biomonitoring Studies of Environmental and Occupational Exposure to Chemicals—A Systematic Scoping Review. *Toxics*, 12(4), 270. <https://doi.org/10.3390/toxics12040270>
- Liao, W., McNutt, M.A. & Zhu, W.-G. (2009). The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.016>
- Lin, C. and Tsai, S. (2012). The effect of cryopreservation on DNA damage, gene expression, and protein abundance in vertebrates. *Italian Journal of Animal Science*, 11(1), 119–122. <https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e21>
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Lopez-Vaamonde, C., Breman, F.C., Lees, D.C., Van Houdt, J. & De Prins, J. (2012). Analysis of tissue dependent DNA yield for optimal sampling of micro-moths in large-scale biodiversity surveys. *European Journal of Entomology*, 109(1), 1–6. <https://doi.org/10.14411/eje.2012.001>
- López, D.J., Rodríguez, J.A. & Bañuelos, S. (2021). Molecular mechanisms regulating the DNA repair protein APE1: A focus on its flexible N-terminal tail domain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22126308>
- Mandrioli, M., Borsatti, F. & Mola, L. (2006). Factors affecting DNA preservation from museum-collected lepidopteran specimens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 120(3), 239–244. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00407.x>
- Mara, L., Casu, S., Carta, A. & Dattena, M. (2013). Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Animal Reproduction Science*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.006>
- Masters, J.R. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(3):233–236.
- Mazur, P. (1970). Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, 168, 939–949. <https://doi.org/10.1126/science.168.3934.939>
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D. & Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327–344. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4)
- Mircheva, A., Vangrieken, P., Al-Nasiry, S., van Schooten, F.-J., Godschalk, R.W.L. & Langie, S.A.S. (2024). Optimizing the Comet Assay-Based In Vitro DNA Repair Assay for Placental Tissue: A Pilot Study with Pre-Eclamptic Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 187. <https://doi.org/10.3390/ijms25010187>
- Moldovan, C., Onaciu, A., Toma, V., Munteanu, R.A., Gulei, D., Moldovan, A.I., Stiufiuc, G.F., Feder, R.I., Cenariu, D., Iuga, C.A. & Stiufiuc, R.I. (2023). Current trends in luminescence-based assessment of apoptosis. *RSC Advances*, 13(45), 31641–31658. <https://doi.org/10.1039/d3ra05809c>

- Naaldijk, Y., Staude, B., Fedorova, V., Stolzing, A. & Stolk, M. (2016). Impact of donor age and tissue source on cryopreservation success of fibroblasts: A comparative analysis. *CryoLetters*, 37(1), 41–49. PMID: 26914847
- Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Nsubuga, A.M., Robins, M.M., Roeder, A.D., Morin, P.A., Boesch, C. & Vigilant, L. (2004). Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology*, 13(7), 2089–2094. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02259.x>
- Olive, P.L., Banáth, J.P. & Durand, R. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet assay". *Radiation Research*, 122, 86–94. <https://doi.org/10.2307/3577522>
- Olive, P.L. and Banáth, J.P. (2006). The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>
- Ostling, O. and Johanson, K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291–298. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)91224-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)91224-2)
- Özşensoy, Y., Kurar, E., Doğan, M., Bulut, Z., Altunok, V., Işık, A., Çamlıdağ, A. & Nizamlioğlu, M. (2010). Türkiye’de bulunan bazı yerli sığır ırklarının STR markörler ile genetik karakterizasyonu. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3(1), 155–163.
- Öztürk, Z. (2022). Böbrek hücrelerinin elde edilmesinde üç farklı primer kültür yönteminin karşılaştırılması [Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi]. Academia.edu. <https://www.academia.edu/94650176>
- Park, S., Kim, J., Lee, H., Choi, Y. & Kang, H. (2012). Cryopreservation-induced DNA damage and embryo developmental competence. *Theriogenology*, 78(3), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.019>
- Payne, R.B. and Sorenson, M.D. (2002). Museum collections as sources of genetic data. *Bonner Zoologische Beiträge*, 51, 97–104.
- Pena, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M. & Rodriguez-Martinez, H. (2005). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 72(2), 388–395. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036806>
- Pérez-Bruzón, R. N., Del Moral, A., Pérez-Castejón, C., Llorente, M., Vera, A., & Azanza, M.J. (2011). Validation of an original incubator set-up for the exposure of human astrocyte cells to X-band microwaves in a GTEM-chamber. *Histology and Histopathology*, 26(9), 1187–1196. <https://doi.org/10.14670/HH-26.1187perez>
- Piperakis, S.M. (2009). Comet assay: A brief history. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 1–3. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9081-y>
- Plikus, M.V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S.M., Herzog, E.L., Driskell, R.R., Rosenthal, N., Biernaskie, J. & Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*, 184(15), 3852–3872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>
- Post, R.J., Flook, P.K. & Millest, A.L. (1993). Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(1), 85–92. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90115-C](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90115-C)

- Ribas-Maynou, J., Delgado-Bermúdez, A., Garcia-Bonavila, E., Pinart, E., Yeste, M. & Bonet, S. (2021). Complete chromatin decondensation of pig sperm is required to analyze sperm DNA breaks with the Comet assay. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 675973. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.675973>
- Roos, W.P. and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), 440–450. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.007>
- Ryan, J.A. Introduction to cell culture. *Methods Mol Biol.* 2008;420:1–15.
- Rydberg, B. and Johanson, K.J. (1978). Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg & C.F. Fox (Eds.), *DNA repair mechanisms* (pp. 465–468). Academic Press.
- Saadeldin, I.M., Swelum, A.A., Khalil, W.A. & Elsayed, A. (2019). Functional recovery of Arabian camel fibroblasts post-cryopreservation. *Scientific Reports*, 9(1), 10251. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46432-2>
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 39–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>
- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M. & Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, 6(2), 168–170. <https://doi.org/10.1038/ncb1095>
- Shorokhova, K., Ivanova, N. & Petrov, A. (2024). Advances in somatic cell preservation for endangered species: Fibroblast cryobanking as a conservation tool. *Journal of Wildlife Biotechnology*, 11(1), 55–68.
- Silva, A.M., Borges, A.A. & Mendes, F. (2021). Cellular stress and apoptosis induced by prolonged in vitro culture and cryopreservation in fibroblasts. *Biopreservation and Biobanking*, 19(4), 289–296. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0125>
- Silva, J., Souza, R., Oliveira, M., Pereira, L. & Santos, A. (2022). Effects of cryopreservation on mRNA expression in sheep oocytes. *Journal of Animal Reproduction*, 48(2), 115–123.
- Silva-Santiago, E., Rivera-Mulia, J.C. & Aranda-Anzaldo, A. (2016). The set of structural DNA–nuclear matrix interactions in neurons is cell-type specific and rather independent of functional constraints. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(12), 2759–2770. <https://doi.org/10.1002/jcb.25852>
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R. & Schneider, E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90210-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90210-3)
- Skuterud, L., Gaare, E., Eikermann, I.M., Hove, K. & Steinnes, E. (2005). Chernobyl radioactivity persists in reindeer. *Journal of Environmental Radioactivity*, 83(2), 231–252. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2005.02.006>
- Smith, R. and Jones, M. (2018). Advances in Tissue Preservation for Genomic Studies. *Genomics & Evolution*, 12(4), 223–230. <https://doi.org/10.1002/ge.2018.12.4.223>
- Soniat, T. (2019). Assessing levels of DNA degradation in frozen tissues archived under various preservation conditions in a natural history collection. 36.

- Speit, G. and Hartmann, A. (2006). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology*, 314, 275–286. <https://doi.org/10.1385/1-59259-973-7:275>
- Subramaniam, V., Abraham, C., Higgins, B.R., Chisolm, S.J., Sweeney, B., Duraivel, S., Balzano-Nogueira, L., Palmer, G.D. & Angelini, T.E. (2024). A Functional Human Liver Tissue Model: 3D Bioprinted Co-culture Discoids. *arXiv preprint arXiv:2501.00086*. <https://arxiv.org/abs/2501.00086>
- Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. (2009). *Türkiye evcil hayvan genetik kaynakları tanıtım kataloğu* (1. baskı). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. <https://www.tagem.gov.tr>
- Tell, G., Quadrioglio, F., Tiribelli, C. & Kelley, M.R. (2009). The many functions of APE1/Ref-1: Not only a DNA repair enzyme. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(3), 601–619. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2194>
- Thomson, L.K., Fleming, S.D., Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Zieschang, J.A. & Clark, A.M. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24(9), 2061–2070.
- Toorani, T., Mackie, P.M. & Mastromonaco, G.F. (2021). Validation of reference genes for use in untreated bovine fibroblasts. *Scientific Reports*, 11, Article 10253. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89657-8>
- Trounson, A.O. (1990). Cryopreservation. *British Medical Bulletin*, 46(3), 695–708.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.
- Utsunomiya, Y.T., Milanesi, M., Fortes, M.R.S., Porto-Neto, L.R., Utsunomiya, A.T.H., Silva, M.V.G. B. & Garcia, J.F. (2017). Genomic clues of the evolutionary history of *Bos indicus* cattle. *Animal Genetics*, 48(6), 704–709. <https://doi.org/10.1111/age.12602>
- Xanthoudakis, S., Miao, G.G. & Curran, T. (1994). The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 23–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.23>
- Xie, F., Wang, J., Zhang, B., RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Funct Integr Genomics*. 2023 Apr 15;23(2):125. doi: 10.1007/s10142-023-01055-7. PMID: 37060478.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L. & Zhang, B. (2012). *miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs*. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75–84.
- Villegas, J. and McPhaul, M. (2005). Establishment and culture of human skin fibroblasts. *Current Protocols in Molecular Biology*, 74, 28–33.
- Wahlund, S. (1928). Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*, 11(1), 65–106.
- Wandeler, P., Smith, S., Morin, P.A., Pettifor, R.A. & Funk, S.M. (2003). Patterns of nuclear DNA degeneration over time—A case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology*, 12(4), 1087–1093. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01862.x>
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492.

- White, E.-L.F., Kjetså, M., Peippo, J., Morgan, L., Kantanen, J., Comizzoli, P. & Honkatukia, M. (2025). Across borders – the status and future opportunities for long-term conservation of Nordic animal genetic resources. *Genetic Resources*, 6(11), 57–70. <https://doi.org/10.46265/genresj.BAIQ2696>
- Wigginton, J.E., Cutler, D.J. & Abecasis, G.R. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *The American Journal of Human Genetics*, 76(5), 887–893. <https://doi.org/10.1086/429864>
- Wong, P., Lee, H. & Kim, S. (2020). The Role of Frozen Tissue in Modern Genomics Research. *Molecular Ecology Resources*, 20(5), 789–795. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13156>
- Yadam, S. (2023). *The comet assay: A straight way to estimate geno-toxicity*. 21st Century Pathology, 3(2), 145. <https://21stcenturypathology.com/articles/the-comet-assay-a-straight-way-to-estimate-genotoxicity.pdf>
- Yamakawa, Y., Ishida, T. & Sugioka, K. (2004). DNA repair response in UV-irradiated human fibroblasts: roles of APE1 and XRCC1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(3), 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.000>
- Zimmerman, H. and Jenkins, T. (2025). The correlation between sperm DNA methylation and DNA damage: A comparison of Comet and TUNEL. *Frontiers in Reproductive Health*, 7, 1523386. <https://doi.org/10.3389/frh.2025.1523386>
- Živković, L., Topalović, D., Đelić, N., Popović, P., Marković, M., Gunjić, I. & Spremo-Potparević, B. (2024). The basic principles of DNA damage detection by the alkaline comet assay. *Arhiv za farmaciju*, 74, 556–568. <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/0004-1963/2024/0004-19632404556Q.pdf>

## EKLER

### Ek- 1. Etik Kurul

T.C.  
TARIM ve ORMAN BAKANLIĞI  
Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

#### BAŞVURU DEĞERLENDİRME FORMU

|                             |                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Evrak Kayıt                 | : E- 8681579                                                                                                                                                                    |
| Geliş Tarihi                | : 16.09.2022                                                                                                                                                                    |
| Karar Tarihi ve Sayısı      | : 31.11.2022 -207                                                                                                                                                               |
| Araştırma Yürütücüsü        | : Aylin DEMİRAY                                                                                                                                                                 |
| Projenin Adı:               | Gen Bankası Materyalinde Dondurma ve Saklama Koşullarının DNA Temelli Değerlendirilmesi ve Yeni Materyal Eklenmesi                                                              |
| Hayvan türleri ve sayıları: | Yerli Kara Sığır 10 (on) adet, Boz İrk Sığır 10 (on) adet, Güney Anadolu Kırmızısı Sığır 10 (on) adet, Güney Anadolu Kırmızısı (DAK) 10 (on), Güney Sarısı 10(on), Zavot 10(on) |

|                                                                                                                                                                                                                                                      |                                          |                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Araştırma daha önce yapılmış mı?                                                                                                                                                                                                                     | Evet <input type="checkbox"/>            | Hayır <input checked="" type="checkbox"/> |
| Araştırma için seçilen hayvan türü uygun mu?                                                                                                                                                                                                         | Evet <input checked="" type="checkbox"/> | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Araştırma için öngörülen hayvan sayıları yeterli mi?                                                                                                                                                                                                 | Evet <input checked="" type="checkbox"/> | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Mümkün olan en az sayıda hayvan kullanımı amaçlanmış mıdır?                                                                                                                                                                                          | Evet <input checked="" type="checkbox"/> | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Hayvanlar için optimum şartlar sağlanmış mıdır?                                                                                                                                                                                                      | Evet <input checked="" type="checkbox"/> | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Araştırmacıların deney hayvanı sertifikası / yetkisi var mı?                                                                                                                                                                                         | Evet <input checked="" type="checkbox"/> | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Araştırma protokolünde hayvanlara en az ağrı ve acı verecek önlemler alınmış ve bu konudaki standartlar gözetilmiş mi?                                                                                                                               | Evet <input checked="" type="checkbox"/> | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Araştırmada çevre ve/veya iş sağlığını tehdit edecek kimyasal, biyolojik radyoaktif maddelerin bulaşması riski var mıdır?                                                                                                                            | Evet <input type="checkbox"/>            | Hayır <input checked="" type="checkbox"/> |
| Araştırma sonunda hayvanlara yapılacak işlemler konusunda gerçekçi tespitler yapılmış mıdır?                                                                                                                                                         | Evet <input checked="" type="checkbox"/> | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Hayvanlara ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?                                                                                                                                                                                     | Evet <input type="checkbox"/>            | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?                                                                                                                                                  | Evet <input type="checkbox"/>            | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi edildi ise atıkların imhası için gerekli önlem alınmış mıdır?                                                                                                                                  | Evet <input type="checkbox"/>            | Hayır <input type="checkbox"/>            |
| Açıklamalar: Proje, Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Araştırma Komitesinde tartışılmış ve kabul edilmiştir. Müdürlüğümüzün "Deney Hayvanı Üretici, Kullanıcı ve Tedarikçi Kuruluşlara Mahsus Çalışma İzni" mevcuttur. |                                          |                                           |

Tarafımızdan değerlendirilen bu çalışma Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, hayvan deneyleri yerel Etik Kurulu Çalışma Yönergesi'nde belirtilen ilkelere uygun bulunmaktadır.

## Ek- 2. Çalışma İzni



T.C.  
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI  
Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü

Sayı : E-92190712-020[020;0002]-3731689

14.12.2021

Konu : Hayvan Materyali Kullanım İzni

ULUSLARARASI HAYVANCILIK ARAŞTIRMA VE EĞİTİM MERKEZİ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 02.12.2021 tarihli ve E-66091008-020[0002]-3600081 sayılı yazınız.

İlgi yazınızda bahse konu projelerden enstitü bünyesindeki hayvanların kullanılmasına ilişkin başvurunuz uygun görülmüş olup, yerli hayvan gen bankasındaki biyolojik materyalin kullanılmasına ilişkin ise araştırmada kullanılacak olan biyolojik materyal miktarının aynı şekilde gen bankasına geri konulması halinde uygun görülmektedir.

Gereğini rica ederim.

Doç. Dr. İlhan AYDIN  
Genel Müdür Yardımcısı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.  
Doğrulama Kodu: 529A55CB-C453-439E-9BB9-520551D2F8BA Doğrulama Adresi: <https://www.turkiye.gov.tr/tarim-ebys>  
Üniversiteler Mah. Dumlupınar Bulvarı, Eskişehir Yolu 10. Km, 06800  
Çankaya/Ankara Bilgi için: Ömer Faruk KARA ÖR  
Tel: (0312) 307 60 00 Faks: Veteriner Hekim  
<http://www.tarim.gov.tr/TAGEM> [tagem@gttb.hsgb.gov.tr](mailto:tagem@gttb.hsgb.gov.tr)



### Ek- 3. DNA Ölçüm ve Sulandırma Oranları

**Çizelge 1.** Yerli Kara Sığır Irkı Gen Bankası DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrki       | Kulak No     | DNA kons.<br>(konsatrasyon) | 260/280 | 260/230 | Sulandırma<br>Oranı |
|------|------------|--------------|-----------------------------|---------|---------|---------------------|
| 01   | Yerli Kara | TR-060508535 | 15,35                       | 2,02    | 0,33    | 2:1                 |
| 02   | Yerli Kara | TR-060638818 | 9,4                         | 2,26    | 0,14    | <b>YOK</b>          |
| 03   | Yerli Kara | TR-060575206 | 10,8                        | 2,32    | 0,25    | <b>YOK</b>          |
| 04   | Yerli Kara | TR-060571998 | 11,5                        | 2,23    | 0,22    | <b>YOK</b>          |
| 05   | Yerli Kara | TR-060571758 | 16,9                        | 2,02    | 0,37    | 2:1                 |
| 06   | Yerli Kara | TR-060571862 | 7,8                         | 2,16    | 1,66    | <b>YOK</b>          |
| 07   | Yerli Kara | TR-060575207 | 14,9                        | 2,04    | 0,37    | 2:1                 |
| 08   | Yerli Kara | TR-060638846 | 12,08                       | 2,04    | 0,25    | <b>YOK</b>          |
| 09   | Yerli Kara | TR-060698953 | 36,4                        | 1,89    | 0,63    | 4:1                 |
| 10   | Yerli Kara | TR-060638815 | 8,05                        | 2,23    | 0,14    | <b>YOK</b>          |

**Çizelge 2.** Boz Irk Sığırlarında Gen Bankası DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrki    | Kulak No   | DNA kons. | 260/280 | 260/230 | Sulandırma<br>Oranı |
|------|---------|------------|-----------|---------|---------|---------------------|
| 01   | Boz Irk | TR16477167 | 4,5       | 2,57    | 0,17    | <b>YOK</b>          |
| 02   | Boz Irk | TR16508435 | 5,3       | 2,65    | 0,19    | <b>YOK</b>          |
| 03   | Boz Irk | TR16503205 | 4,05      | 3,37    | 0,15    | <b>YOK</b>          |
| 04   | Boz Irk | TR16456075 | 6,15      | 2,51    | 0,21    | <b>YOK</b>          |
| 05   | Boz Irk | TR10977508 | 2,85      | 5,18    | 0,11    | <b>YOK</b>          |
| 06   | Boz Irk | TR10977510 | 4,85      | 3,03    | 0,17    | <b>YOK</b>          |
| 07   | Boz Irk | TR10977518 | 4,65      | 3       | 0,17    | <b>YOK</b>          |
| 08   | Boz Irk | TR10977521 | 1,45      | 4,14    | 0,07    | <b>YOK</b>          |
| 09   | Boz Irk | TR16508082 | 7,3       | 3,65    | *       | <b>YOK</b>          |
| 10   | Boz Irk | TR10977506 | 5,5       | 2,64    | *       | <b>YOK</b>          |

**Çizelge 3.** Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) Sığırlarında Gen Bankası DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrki | Kulak No        | DNA kons. | 260/280 | 260/230 | Sulandırma<br>Oranı |
|------|------|-----------------|-----------|---------|---------|---------------------|
| 1    | DAK  | TR08000214483   | 7,85      | 2,01    | 0,29    | <b>YOK</b>          |
| 2    | DAK  | TR08000165899   | 18,65     | 1,98    | 0,34    | 2:1                 |
| 3    | DAK  | TR08000220670   | 16,5      | 2,01    | 0,31    | 2:1                 |
| 4    | DAK  | TR08000172403   | 24,65     | 1,95    | 0,39    | 3:1                 |
| 5    | DAK  | TR250001257642  | 11,9      | 2       | 0,28    | <b>YOK</b>          |
| 6    | DAK  | TR250001257645  | 17,2      | 1,94    | 0,32    | 2:1                 |
| 7    | DAK  | TR250001257628  | 15,5      | 1,89    | 0,35    | 2:1                 |
| 8    | DAK  | TR2500015578250 | 26,35     | 1,88    | 0,51    | 3:1                 |
| 9    | DAK  | TR08000172477   | 17,25     | 1,94    | 0,33    | 2:1                 |
| 10   | DAK  | TR08000172475   | 14,85     | 1,99    | 0,29    | 2:1                 |

**Çizelge 4.** Yerli Güney Sarısı (YGS) Sığırlarında Gen Bankası DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | Irkı | Kulak No      | DNA kons. | 260/280 | 260/230 | Sulandırma Oranı |
|------|------|---------------|-----------|---------|---------|------------------|
| 1    | YGS  | TR01000015927 | 8,55      | 2,08    | 0,25    | <b>YOK</b>       |
| 2    | YGS  | TR01000334733 | 10,25     | 2,18    | 0,27    | 2:1              |
| 3    | YGS  | TR010004316   | 8,6       | 2,23    | 0,24    | <b>YOK</b>       |
| 4    | YGS  | TR01000240800 | 8,4       | 2,21    | 0,26    | <b>YOK</b>       |
| 5    | YGS  | TR01000414648 | 1,45      | —       | 0,05    | <b>YOK</b>       |
| 6    | YGS  | TR01000302892 | 35,8      | 1,86    | 0,63    | 5:1              |
| 7    | YGS  | TR01000275230 | 9         | 2,14    | 0,25    | <b>YOK</b>       |
| 8    | YGS  | TR01000302893 | 9         | 2,14    | 0,24    | <b>YOK</b>       |
| 9    | YGS  | TR01000334739 | 12,2      | 1,9     | 0,31    | <b>YOK</b>       |
| 10   | YGS  | TR01000246675 | 53,15     | 1,51    | 0,78    | 10:1             |

**Çizelge 5.** Zavot Sığırlarında Gen Bankası DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | Irkı | Kulak No       | DNA kons. | 260/280 | 260/230 | Sulandırma Oranı |
|------|------|----------------|-----------|---------|---------|------------------|
| 1    | ZVT  | TR750000997922 | 2,6       | 742     | 0,08    | <b>YOK</b>       |
| 2    | ZVT  | TR750000824389 | 4,75      | 4,52    | 0,12    | <b>YOK</b>       |
| 3    | ZVT  | TR750000996106 | 17,85     | 2       | 0,35    | 2:1              |
| 4    | ZVT  | TR750000997653 | 3,65      | 5,61    | 0,1     | <b>YOK</b>       |
| 5    | ZVT  | TR750000996213 | 3,95      | 4,93    | 4,93    | <b>YOK</b>       |
| 6    | ZVT  | TR750000997408 | 353,45    | 1,93    | 1,79    | 50:1             |
| 7    | ZVT  | TR750000996153 | 3,85      | 4,05    | 0,11    | <b>YOK</b>       |
| 8    | ZVT  | TR750000997810 | 89,25     | 1,96    | 1       | 50:1             |
| 9    | ZVT  | TR750000996083 | 543,75    | 1,92    | 1,71    | 100:1            |
| 10   | ZVT  | TR750000950869 | 242,9     | 1,94    | 1,55    | 50:1             |

**Çizelge 6.** Güney Anadolu Kırmızısı (GAK) Sığırlarında Gen Bankası DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | Irkı | Kulak No   | DNA kons. | 260/280 | 260/230 | Sulandırma Oranı |
|------|------|------------|-----------|---------|---------|------------------|
| 1    | GAK  | TR31264505 | 321,15    | 1,58    | 1,48    | 50:1             |
| 2    | GAK  | TR63340198 | 6,65      | 3,5     | 0,12    | <b>YOK</b>       |
| 3    | GAK  | TR-D8      | 25,1      | 1,88    | 0,58    | 2:1              |
| 4    | GAK  | TR1319E-20 | 334,7     | 1,72    | 1,59    | 50:1             |
| 5    | GAK  | TR31192617 | 10,8      | 2,18    | 0,22    | <b>YOK</b>       |
| 6    | GAK  | TR31251640 | 26        | 1,87    | 0,58    | 2:1              |
| 7    | GAK  | TR63340431 | 9,1       | 2,24    | 0,24    | <b>YOK</b>       |
| 8    | GAK  | TR31313683 | 13,5      | 1,74    | 0,39    | 2:1              |
| 9    | GAK  | TR31313682 | 7,3       | 2,02    | 0,24    | <b>YOK</b>       |
| 10   | GAK  | TR63208301 | 7,15      | 2,04    | 0,25    | <b>YOK</b>       |

**Çizelge 7.** Yerli Kara Sığır Irkı sahadan toplanan DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrki       | Kulak No      | DNA kons. | 260/280 | 260/230 | Sulandırma Oranı |
|------|------------|---------------|-----------|---------|---------|------------------|
| 01   | Yerli Kara | 6458-2024YK01 | 44,95     | 1,82    | 1,35    | 4:1              |
| 02   | Yerli Kara | 6400-2024YK02 | 24,55     | 1,68    | 0,97    | 2:1              |
| 03   | Yerli Kara | 6408-2024YK03 | 57,00     | 1,82    | 1,5     | 5:1              |
| 04   | Yerli Kara | 6410-2024YK04 | 34,65     | 1,73    | 1,05    | 3:1              |
| 05   | Yerli Kara | 6399-2024YK05 | 78,35     | 1,87    | 1,8     | 10:1             |
| 06   | Yerli Kara | 6416-2024YK06 | 54,65     | 1,82    | 1,46    | 5:1              |
| 07   | Yerli Kara | 379-2024YK07  | 69,9      | 1,85    | 1,73    | 10:1             |
| 08   | Yerli Kara | 6368-2024YK08 | 28,45     | 1,73    | 0,84    | 2:1              |
| 09   | Yerli Kara | 374-2024YK09  | 71,7      | 1,85    | 1,66    | 10:1             |
| 10   | Yerli Kara | 378-2024YK10  | 22,05     | 1,71    | 0,82    | 2:1              |

**Çizelge 8.** Boz Irk Sığır Irkı sahadan toplanan DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

|    | İrki    | Kulak No   | DNA kons. | 260/280 | Sulandırma Oranı |
|----|---------|------------|-----------|---------|------------------|
| 01 | Boz Irk | 2024-Boz01 | 71,6      | 2,17    | 7:1              |
| 02 | Boz Irk | 2024-Boz02 | 72,8      | 2,14    | 7:1              |
| 03 | Boz Irk | 2024-Boz03 | 71,6      | 2,14    | 7:1              |
| 04 | Boz Irk | 2024-Boz04 | 60        | 2,18    | 6:1              |
| 05 | Boz Irk | 2024-Boz05 | 52,1      | 2,25    | 5:1              |
| 06 | Boz Irk | 2024-Boz06 | 80,2      | 2,12    | 8:1              |
| 07 | Boz Irk | 2024-Boz07 | 66,5      | 2,16    | 6:1              |
| 08 | Boz Irk | 2024-Boz08 | 55,7      | 2,18    | 5:1              |
| 09 | Boz Irk | 2024-Boz09 | 58,5      | 1,5     | 6:1              |
| 10 | Boz Irk | 2024-Boz10 | 57,4      | 2,18    | 6:1              |

**Çizelge 9.** DAK Sığır Irkı sahadan toplanan DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrki | Kulak No   | DNA kons. | 260/280 | Sulandırma Oranı |
|------|------|------------|-----------|---------|------------------|
| 01   | DAK  | 2024-DAK01 | 69,1      | 1,94    | 7:1              |
| 02   | DAK  | 2024-DAK02 | 73,3      | 2,08    | 7:1              |
| 03   | DAK  | 2024-DAK03 | 122,9     | 2,02    | 12:1             |
| 04   | DAK  | 2024-DAK04 | 120,8     | 2,03    | 12:1             |
| 05   | DAK  | 2024-DAK05 | 79,7      | 1,84    | 8:1              |
| 06   | DAK  | 2024-DAK06 | 68,9      | 2,1     | 7:1              |
| 07   | DAK  | 2024-DAK07 | 97,3      | 2,05    | 9:1              |
| 08   | DAK  | 2024-DAK08 | 51,9      | 2,13    | 5:1              |
| 09   | DAK  | 2024-DAK09 | 54,4      | 1,9     | 5:1              |
| 10   | DAK  | 2024-DAK10 | 67,4      | 2,1     | 6:1              |

**Çizelge 10.** Zavot Sığır Irkı sahadan toplanan DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrkı | Kulak No     | DNA kons. | 260/280 | Sulandırma Oranı |
|------|------|--------------|-----------|---------|------------------|
| 01   | ZVT  | 2024-ZVT01   | 17,4      | 2,57    | 2:1              |
| 02   | ZVT  | 2024- ZVT 02 | 25,2      | 2,35    | 3:1              |
| 03   | ZVT  | 2024- ZVT 03 | 48,9      | 2,25    | 5:1              |
| 04   | ZVT  | 2024- ZVT 04 | 32,5      | 2,18    | 3:1              |
| 05   | ZVT  | 2024- ZVT 05 | 99,3      | 2,07    | 10:1             |
| 06   | ZVT  | 2024- ZVT 06 | 43,2      | 2,22    | 4:1              |
| 07   | ZVT  | 2024- ZVT 07 | 56,9      | 2,19    | 5:1              |
| 08   | ZVT  | 2024- ZVT 08 | 20,5      | 2,52    | 2:1              |
| 09   | ZVT  | 2024- ZVT 09 | 35,2      | 2,23    | 3:1              |
| 10   | ZVT  | 2024- ZVT 10 | 91,6      | 2,08    | 9:1              |

**Çizelge 11.** GAK Sığır Irkı sahadan toplanan DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrkı | Kulak No    | DNA kons. | 260/280 | Sulandırma Oranı |
|------|------|-------------|-----------|---------|------------------|
| 01   | GAK  | 2024-GAK01  | 39,2      | 1,9     | 4:1              |
| 02   | GAK  | 2024- GAK02 | 24,8      | 2,38    | 2:1              |
| 03   | GAK  | 2024- GAK03 | 31,6      | 2,69    | 3:1              |
| 04   | GAK  | 2024- GAK04 | 57,2      | 2,13    | 5:1              |
| 05   | GAK  | 2024- GAK05 | 50,7      | 2,18    | 5:1              |
| 06   | GAK  | 2024- GAK06 | 48,7      | 2,16    | 5:1              |
| 07   | GAK  | 2024- GAK07 | 147,6     | 1,9     | 15:1             |
| 08   | GAK  | 2024- GAK08 | 64,4      | 2,11    | 6:1              |
| 09   | GAK  | 2024- GAK09 | 104,6     | 2,01    | 10:1             |
| 10   | GAK  | 2024- GAK10 | 45,7      | 2,2     | 4:1              |

**Çizelge 12.** YGS Sığır Irkı sahadan toplanan DNA örneklerinin nanodrop ölçüm ve sulandırma oranları

| Nosu | İrkı | Kulak No     | DNA kons. | 260/280 | Sulandırma Oranı |
|------|------|--------------|-----------|---------|------------------|
| 01   | YGS  | 2024- YGS 01 | 39,7      | 2,16    | 4:1              |
| 02   | YGS  | 2024- YGS 02 | 33,4      | 2,22    | 3:1              |
| 03   | YGS  | 2024- YGS 03 | 22,5      | 2,24    | 3:1              |
| 04   | YGS  | 2024- YGS 04 | 45        | 2,2     | 5:1              |
| 05   | YGS  | 2024- YGS 05 | 51,4      | 2,18    | 5:1              |
| 06   | YGS  | 2024- YGS 06 | 49,5      | 2,2     | 5:1              |
| 07   | YGS  | 2024- YGS 07 | 58,4      | 2,12    | 6:1              |
| 08   | YGS  | 2024- YGS 08 | 39,2      | 2,28    | 4:1              |
| 09   | YGS  | 2024- YGS 09 | 47,9      | 2,21    | 4:1              |
| 10   | YGS  | 2024- YGS 10 | 28,9      | 2,62    | 3:1              |