

## Anadolu boz sığır klonlarında plasentanın incelenmesi

Çaputcu Tas A<sup>1</sup>, Arat S<sup>1\*</sup>, Akkoc T<sup>1</sup>, Cetinkaya G<sup>1</sup>, Bağıs H<sup>1,3</sup>, Pabuccuoğlu S<sup>2</sup>, Cirit U<sup>2</sup>, Demir K<sup>2</sup>, Senunver A<sup>2</sup>, Kılıcaslan R<sup>2</sup>, Sağırkaya H<sup>4</sup>, Nak Y<sup>4</sup>, Nak D<sup>4</sup>, Tuna B<sup>4</sup>

<sup>1</sup>.TUBITAK MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli,  
<sup>2</sup> İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama AD.  
Avcılar İstanbul,  
<sup>3</sup>.Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adıyaman  
<sup>4</sup>. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama AD.  
Görükle Bursa.

Giriş: Nükleer transferin (NT) uygulama alanlarından biri de nesli tükenmekte olan canlıların sayılarını arttırmaktır. Bu teknoloji bize somatik hücrelerin geri programlanmaları konusunda da önemli bilgiler sağlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda Boz sığırları klonlanmıştır. Klonlamada kullanılan farklı hücreler karşılaştırılmış ve klon plasentaların immunohistokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Mezbahadan alınan ovaryumlardan yumurtaların eldesi sonrasında oositler 18 saat boyunca olgunlaştırılmıştır. Olgunlaşmış yumurtalar enükle edilmiştir. Hücre kaynağı olarak Boz ırktan elde edilen kıkırdak, fibroblast ve granüloza hücreleri kullanılmıştır. Füzyon ve aktivasyonu takiben NT çiftleri 8 mg/ml BSA içeren Sage cleavage® kültür medyumunda 72 saat kültüre edildikten sonra 4 mg/ml BSA + 5% FCS içeren Sage blastocyst® medyumunda 4 gün daha kültüre edilmiştir. Klonlama sonucunda; kıkırdak hücrelerinden bir, fibroblast hücrelerinden bir ve granüloza hücrelerinden üç adet sağlıklı klon elde edilmiştir. Kıkırdak hücrelerinden elde edilen bir gebelik 254. gününde kaybedilmiştir. Normal ve klon plasentalar %4 PFA ile fikse edilerek H-E ve immunohistokimyasal boyamaları yapılmıştır. Leptin (1/50), VEGF(1/50) ve IGF-1 (1/50) antikorları ile boyamalar yapılmıştır.

Sonuçlar: Farklı hücrelerden elde edilen blastosist gelişim oranları incelendiğinde granüloza hücrelerinin gelişim oranı (%33.33; 90/270) kıkırdak ve fibroblast hücrelerinin gelişim oranlarından (kıkırdak:%21.5; 134/623, fibroblast:%19.48; 30/154) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. H-E boyamalarında genel morfoloji bakımından gruplar arasında fark görülemediği. Dev nükleuslu trofoblast hücre sayılarının klon plasentalarda normal plasentaya oranla daha az sayıda olduğu tespit edilmiştir. IGF-1 ve VEGF boyamalarında her grupta epitellerde boyanma tespit edilmiş klon ve normal plasentalarda fark görülmemiştir. Leptin antikorunda ise hiçbir grupta boyanma tespit edilememiştir.

Tartışma: Granüloza hücrelerinin klon blastosist gelişim oranlarını arttırdığı tespit edilmiştir. IGF-1, VEGF ve Leptin ile yapılan boyama sonuçları klon plasentalarda anormal bir bulguyu işaret etmemiş ve literatür çalışmaları ile uyumlu bulunmuş olmakla birlikte dev nükleuslu trofoblast sayıları klon plasentalarda düşük olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma TOVAG 104O360 ve KAMAG 106G005 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

Elektronik İletişim Adresi:sezen.arat@mam.gov.tr

**Anahtar Kelime:** Nükleer Transfer, İmmunohistokimya, Plasenta

## Investigation of the clon anatolian grey bull's placentas

Çaputcu Tas A<sup>1</sup>, Arat S<sup>1\*</sup>, Akkoc T<sup>1</sup>, Cetinkaya G<sup>1</sup>, Bağıs H<sup>1,3</sup>, Pabuccuoğlu S<sup>2</sup>, Cirit U<sup>2</sup>, Demir K<sup>2</sup>, Senunver A<sup>2</sup>, Kılıcaslan R<sup>2</sup>, Sağırkaya H<sup>4</sup>, Nak Y<sup>4</sup>, Nak D<sup>4</sup>, Tuna B<sup>4</sup>

<sup>1</sup>.TUBITAK MRC, Research Institute for Genetic Engineering, Gebze, Kocaeli, Turkey,

<sup>2</sup> Istanbul University Faculty of Veterinary Medicine Department of Reproduction and Artificial Insemination , Avcılar Istanbul, Turkey

<sup>3</sup>.Adiyaman University Medicine Faculty, Adiyaman

<sup>4</sup>. Uludağ University Faculty of Veterinary Medicine Department of Reproduction and Artificial Insemination Gorukle Bursa, Turkey

**Introduction:** One of the application fields of nuclear transfer (NT) is to increase the population of endangered mammals. This technology gives us some important information of reprogramming of somatic cells.

**Material and Methods:** In the present study, cloning of native Anatolian Grey Cattle living semi-wildly especially in Marmara Region was aimed. Different cell types and clon placentas were compared. Bovine oocytes isolated from slaughterhouse ovaries were matured for 18 hours. After removing the cumulus cells of matured oocytes (MII), meiotic spindles and first polar bodies were removed. Cartilage, fibroblast and granulosa cells obtained from an Anatolian grey cows were used as nuclear material source. After transfer of single cells to enucleated oocytes, oocyte-cell couples were fused and activated with chemical compounds. After activation, NT units were cultured in Sage cleavage® medium supplemented with 8 mg/ml BSA for 72 hours and Sage blastocyst® media supplemented 4 mg/ml BSA + 5% FCS for additional 4 days. One healthy male calf from fibroblast, one female calf from cartilage and three female calves from granulosa cells were born healthy and normal weight. One of the male calf from cartilage died at the 254 days of pregnancy. Normal and clon placentas were fixed at 4% PFA. H-E and immunohistochemical stainings were done. Immunohistochemical stainings were done with leptin (1/50), VEGF(1/50) and IGF-1 (1/50) antibodies.

**Results:** Development rates of embryos from cartilage, fibroblast and granulosa cells were compared. Development rate to blastocyst of embryos from granulosa cells (33.33%; 90/270) was significantly higher than the rate of embryos from cartilage cells and fibroblast cells (%21.5; 134/623, %19.48; 30/154 respectively). There were no morphologic differences between normal and clon placentas. The number of the giant trophoblastic cells in clon placentas were lower than the normal placentas. IGF-1 and VEGF antibodies were observed in all groups' epithelium however there were no differences between normal and clon plasenta gruops. Leptin was not determinated in all groups.

**Discussion:** Development rates of embryos from granulose cells were higher the than the embryos from other cells. The results of the IGF-1, VEGF and leptin staining were not shown the anormal diagnosis and the results were shown to be compatible with the literature but the number of the giant trophoblastic cells were determinated in low numbers in the clon placentas. This study was supported by grants from TUBITAK, Turkey (TOVAG-104O360 and KAMAG-106G005).

Contact E-mail: sezen.arat@mam.gov.tr

**Key words:** Nuclear transfer, immunohistochemistry, placentas