

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI**

**YAŞLANMAYA BAĞLI DEĞİŞİKLİKLERİN HİPOFİZ
DOKUSUNDA REJENERASYON VE miRNA İFADE DÜZEYLERİ
BAKIMINDAN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Emre KAYA**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL**

Yüksek Lisans Tezi

HAZİRAN 2019

KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

YAŞLANMAYA BAĞLI DEĞİŞİKLİKLERİN HİPOFİZ
DOKUSUNDA REJENERASYON VE miRNA İFADE DÜZEYLERİ
BAKIMINDAN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Emre KAYA

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL

Yüksek Lisans Tezi

HAZİRAN 2019
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Emre KAYA

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Yaşlanmaya bağlı değişikliklerin hipofiz dokusunda rejenerasyon ve miRNA ifade düzeyleri bakımından araştırılması” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Emre KAYA

İmza

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL

İmza

Kök Hücre Bilimleri ABD Başkanı

Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL danışmanlığında **Emre KAYA** tarafından hazırlanan **“Yaşlanmaya bağlı değişikliklerin hipofiz dokusunda rejenerasyon ve miRNA ifade düzeyleri bakımından araştırılması”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Eciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

27/06//2019


JÜRİ:

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL



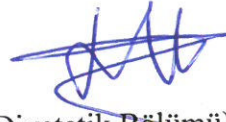
(Erciyes Üniversitesi, Tıbbi Görüntüleme Teknikleri Programı)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ



(Erciyes Üniversitesi, Radyoterapi Programı)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa NİSARİ



(Nuh Naci Yazgan Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her türlü bilgi ve desteği ile tezimin her aşamasında yardımcı olan tez danışmanım saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL'e,

Kriyokesitlerin elde edilmesi için yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Arzu YAY ve Dr. Öğr. Üyesi Erdem BAŞARAN'a,

GenKök Merkezi Müdürü ve Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a,

Çalışmamı yürüttüğüm Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) çalışanlarına

Hayatım boyunca maddi manevi desteklerini sürekli yanımda gördüğüm çok değerli aileme ve her anlamda yanımda olan desteklerini esirgemeyen mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Emre KAYA

Kayseri, Haziran 2019

**YAŞLANMAYA BAĞLI DEĞİŞİKLİKLERİN HIPOFİZ
DOKUSUNDA REJENERASYON VE miRNA DÜZEYLERİ
BAKIMINDAN ARAŞTIRILMASI**

Emre KAYA

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL

ÖZET

Yaşlanma ile birlikte hipofizer kök hücreler ve hipofizin rejeneratif kapasitesinin azaldığı bilinmektedir ancak buna sebep olan mekanizmalar halen anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, genç fareler ile orta yaşlı ve yaşlı farelerin hipofiz dokularının rejeneratif kapasitesi Sox2 kök hücre biomarkeri kullanarak incelenmiş ve yaşlanma ile birlikte doku düzeyinde kök hücre sayısının azaldığı gösterilmiştir. Hipofizer yaşlanma ve hipofizin rejeneratif kapasitesindeki azalma arasındaki ilişkinin miRNA'lar tarafından düzenlendiğine dair hipotezimiz doğrultusunda bir anti-stemness biomarkeri olan *miR-24-3p*'nin hipofiz dokusunun rejeneratif kapasitesini etkileme potansiyeli test edilmiştir.

Bilgimiz dahilinde, bu çalışma ile ilk kez hipofizer doku düzeyinde Sox2 erişkin kök hücre sayısının yaşlanma ile birlikte azaldığı gösterilmiştir. Anti-stemness markeri olan *miR-24-3p*'nin genç ve yaşlı anterior hipofiz dokusunda ifade düzeyleri karşılaştırılmış ve yaşlı farelerin anterior hipofizinde *miR-24-3p*'nin ifade düzeyinin anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Hipofizer erişkin kök hücrelerin yaşlanması ve *miR-24-3p*'nin bu süreçteki rolünün ortaya çıkarılması için ileriki çalışmalarda daha hassas ve detaylı yöntemler kullanılarak mekanistik ışık tutulması sağlanacaktır.

Anahtar kelimeler. Kök Hücre, Yaşlanma, miRNA, Hipofiz, Fare Modeli, Rejenerasyon

INVESTIGATION OF AGING FACTORS IN PITUITARY IN TERMS OF REGENERATION AND miRNA EXPRESSION LEVELS

Emre KAYA

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Stem Cell Biology

Master's Thesis, Jun 2019

Supervisor: Assistant Professor Duygu YÜCEL

ABSTRACT

Upon aging pituitary stem cells and the regenerative capacity of pituitary decline however the underlying mechanisms of this decline is poorly understood. In this study, the regenerative capacity of young, advanced and old mouse pituitary tissues were investigated with the use of Sox2 biomarker where a decline in the number of Sox2-expressing stem cells was observed. We hypothesised that the aging-associated decline in the regenerative capacity of the pituitary is regulated via miRNAs, and tested whether an anti-stemness biomarker, *miR-24-3p*, can have an effect on this regenerative capacity.

To our knowledge, this is the first time where the number of Sox2 adult stem cells residing in pituitary were shown to decrease at the tissue level upon aging. The comparison of expression levels of anti-stemness marker *miR-24-3p* in young and old anterior pituitary has shown that *miR-24-3p* is significantly downregulated in the old pituitary. More sensitive and detailed methods are required in order to decipher the role that *miR-24-3p* plays in aging of the pituitary-derived stem cells.

Key Words: Stem Cell, Aging, miRNA, Pituitary, Mouse Model, Regeneration

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kök Hücre Nedir?.....	3
2.2 Kök Hücre Türleri.....	3
2.3 Kök hücre çalışmalarının kilometre taşları.....	4
2.4 Hipofiz.....	5
2.5 Hipofizer Erişkin Kök Hücreler.....	7
2.5 Yaşlanma.....	9
2.6 miRNA.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1 GEREÇLER.....	13
3.1.1 Cihazlar.....	13
3.1.2 Sarf Malzemeler.....	13
3.2 YÖNTEM.....	15
3.2.1 Fare Hipofiz Örneklerinin Toplanması.....	15

3.2.2 Kriyokesitlerin Alınması	15
3.2.3 İmmünfloresan Boyamalar ve Görüntüleme	15
3.2.4 Total RNA İzolasyonu, cDNA eldesi ve RT-qPCR	16
3.2.5 İstatistiksel Analiz	18
4.BULGULAR	19
4.1 Fare hipofizinde Sox2 ifade eden erişkin kök hücre sayısı yaşlanma ile azalmaktadır	19
4.2 Anterior hipofiz dokularında <i>miR-24-3p</i> 'nin ifade düzeyi yaşlanma ile azalmaktadır	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
6. KAYNAKLAR	37
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

3' UTR	: Three Prime Untranslated Region
ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
AH	: Anterior Hipofiz
ARC	: Arkuat Çekirdek
AVP	: Arjinin Vasopresin
<i>C. elegans</i>	: <i>Caenorhabditis elegans</i>
CRH	: Corticotropin Releasing Hormone
DA	: Dopamin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
EV	: Ekstraselüler Vezikül
FS	: Folikülstelat
FSH :	: Follikül Stimüle Edici Hormon
GH	: Growth Hormone
GHRH	: Growth Hormone Salgılatıcı Hormone
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone
IGF-1	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü-1
Klf 4	: Kruppel-like Factor 4
LH	: Luteinize Edici Hormon
LHA	: Lateral Hipotalamik Area

miRNA	: mikroRNA
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MN	: Medial Çekirdek
MSH	: Melanokortin Stimüle Edici Hormon
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MZ	: Marijinal Zon
OCT	: Optimal cutting temperature compound
OT	: Oksitosin
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PeVN	: Periventriküler Çekirdek
PH	: Posterior Hipofiz
POMC:	: Preopiyomelanokortinin
PRL	: Prolaktin
PVN	: Paraventriküler Çekirdek
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-qPCR	: Quantitative Reverse Transcription PCR
SCN	: Suprakizmatik Çekirdek
smFISH	: Single Molekül Floresan in situ Hibridizasyon
Sox2	: Sex determining region Y-box 2
SS :	: Somatostatin
TGF β	: Transforming Growth Factor Beta
TOR	: Target of Rapamycin

TSH : Tiroid Stimüle Edici Hormon

WNT : Wingless-related integration site



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Hipotalamik-hipofizer portal sistem.	5
Şekil 2.2: Fare hipofizinin şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.3 Yaşam uzunluğu sürecinde kök hücrelerin kullanımına ilişkin model.....	9
Şekil 2.4.: miRNA biogenezinin şematik gösterimi.	11
Şekil 4.2: 2 aylık fare hipofizinin temsili kriyokesit görüntüsü.	22
Şekil 4.3: 8 aylık fare hipofizinin temsili kriyokesit görüntüsü.	24
Şekil 4.4: 16 aylık fare hipofizinin temsili kriyokesit görüntüsü.	26
Şekil 4.5: Genç ve yaşlı hayvanlarda hipofizer yetişkin kök hücrelerin temsili görüntüleri.....	28
Şekil 4.6: Anterior hipofiz dokularında <i>miR-24-3p</i> 'nin ifade düzeyi.....	29
Şekil 5.1: İnsan erişkin kök hücrelerinin ve yaşlanmaya bağlı hastalıklar ve miRNA'larla ilişkisi.....	33

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1: RT-qPCR termal döngüsü.....	17
Tablo 5.1 <i>miR-24-3p</i> 'nin kök hücre ve yaşlanma ile ilişkili hedef genleri.....	35



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bu projede yaşlanmaya bağlı değişikliklerin hipofiz dokusunda rejenerasyon ve miRNA ifade düzeyleri bakımından araştırılması amaçlanmıştır. Hipofizin yaşlanmayı düzenlediğine dair ilk çalışmalar, hipofiz dokusu çıkarılmış ratlarda yaşam sürelerinin uzadığını ve yaşlanmayı tetikleyici faktörler arasında Prolaktin ve Growth hormon ailesinin bulunduğunu göstermiştir [1]. Genç ve erişkin farelerde yapılan hipofizektomi sonucunda, yaşam uzunluğunun her iki grupta da arttığı, ancak erişkin farelerde yaşam uzunluğu artış oranının daha fazla olduğu görülmüştür [2]. Bu çalışma, yaşamın daha geç evrelerinde dahi olsa, hipofizin çıkarılmasının yaşam uzunluğunu artırabildiğini göstermiştir.

Günümüzde sağlık koşullarının iyi olması ve daha korunaklı bir ortamda bulunan tür olarak modern insan, üreme çağının çok daha ötesinde ömür uzunluğuna sahiptir. Doğada yaşayan insan türlerinin üreme çağı sonrasındaki aşamalarda ömür uzunluğuna sahip olması nadiren görüleceğinden, kök hücreleri yaşlanmada da idame ettirilmesinin sağlayan mekanizmalara dair seçim evrimsel olarak söz konusu olmamıştır [3].

Yaşlanma ile birlikte hipofizer kök hücrelerin ve hipofizin rejeneratif kapasitesinin azaldığı bilinmektedir. Bu azalmanın sebebi tam olarak bilinmemektedir ancak yaş ile birlikte Sox2 ve WNT, TGFβ gibi yollarda yer alan birçok genin ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu projede, genç, orta yaş ve yaşlı farelerin hipofizleri Sox2 kök hücre markeri ile doku düzeyinde incelenmiş ve *miR-24-3p*'nin yaşlanmaya bağlı ifade profili analiz edilmiştir.

mikroRNAlar (miRNA) kodlamayan yani proteine dönüştürülmeyen küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar yaşlanmaya bağlı gelişen kanser ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde rol oynamakta ve yaşam uzunluğunu düzenleyen genetik ağda görev almaktadır. Hipofizer yaşlanma ve hipofizin rejeneratif kapasitesindeki azalma arasındaki ilişkinin miRNA'lar tarafından nasıl düzenlendiğinin ortaya çıkarılması erişkin kök hücrelerin yaşlanmasına mekanistik ışık tutulmasını sağlayacaktır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kök Hücre Nedir?

Kök hücre denildiğine en temel ve ilk akla gelen özellik bu hücrelerin kendi kendilerini yenileyebilme yetenekleridir [4]. Kendini yenileyebilme, uzun süre / sınırsız bölünebilme, başka hücre tiplerin dönüşebilme özellikleriyle kök hücreler diğer hücre popülasyonlarına nazaran antropomorfik bir dille ifade edilecek olursa son derece renkli kişiliğe sahip ve yetenekli hücrelerdir. Kök hücreler bu karakteristiklerinden dolayı rejeneratif mekanizmaların yegane oyuncularındır. Kök hücrelerin bir diğer ilginç özelliği ise nişleri etrafındaki interselüler faktörlere rağmen değişmeden kalabilmeleri yani kök hücre özelliklerini sürdürebilmeleridir. Ancak bu süper yetenekli hücreler de zaman faktöründen etkilenmekte, yaşlanma ve ölümü tatmaktadırlar.

2.2 Kök Hücre Türleri

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa ve farklılaşma özelliklerine göre tanımlanmaktadırlar. Embriyonik kök hücreler sperm ile ovumun birleşmesi ile ortaya çıkan zigottan elde edilmektedir ve EKH'ler tüm hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler.

EKH'ler ve *in vitro* (laboratuvar ortamında) ortamda mezodermal (kan, kıkırdak, endotelial hücreler), endodermal (pankreatik hücreler) ve ektodermal (deri, nöronlar) hücre tiplerine farklılaşabilmektedir [5]. EKH'ler tek başlarına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye sahip olmalarından mütevelliit totipotent kök hücreler olarak adlandırılmaktadırlar [6]. EKH'ler fetüsün oluşumunu sağlarken bu süreçte doku kök hücrelerine, projenitor hücrelere ve organizmadaki diğer tüm hücre tiplerine farklılaşmaktadırlar.

Doku kaynaklı kök hücreler somatik ve eşey kök hücrelerini içermektedir. Bu hücreler gelişmekte olan ve yetişkin canlılarda buldukları dokunun gelişimini, tamirini ve sürerliliğini sağlayan hücrelerdir [7]. EKH'lerdeki gibi totipotent yeteneğe sahip

olmamakla birlikte, buldukları dokulardaki hücre tiplerine farklılaşma özelliği gösterebilen bu kök hücelere erişkin kök hücreler denilmektedir.

Multipotent kök hücre özelliği gösteren erişkin kök hücreler buldukları dokudaki ölen hücrelerin yerlerine yenilerinin oluşturulmasını ve böylece doku bütünlüğünün korunmasını sağlar.

Erişkin kök hücreler organizmanın yaşından bağımsız olarak, doku ve organlarda bulunan kök hücelere verilen isimdir. Erişkin kök hücreler kendilerine özgü yüzey markerlere ek olarak, farklılaşmış hücrelerin yüzey işaretlerini de ifade etmeleri tespit edilmelerini zorlaştıran faktörler arasındadır.

Erişkin kök hücreler retina, akciğer, iskelet, kas, bağırsaklar, böbrek, dalak, kemik iliği, kan ve deri gibi dokuların oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler [8]. Yakın zamanda hipofizde de erişkin kök hücrelerin varlığı ve doku bütünlüğüne katkıları olduğu gösterilmiştir [9, 10].

2.3 Kök hücre çalışmalarının kilometre taşları

Şimdi yaşlanma yani zaman faktörünü konu alan bu tez çalışmasında kök hücelere üzerine yapılan keşiflere dair zaman yolculuğu yapalım:

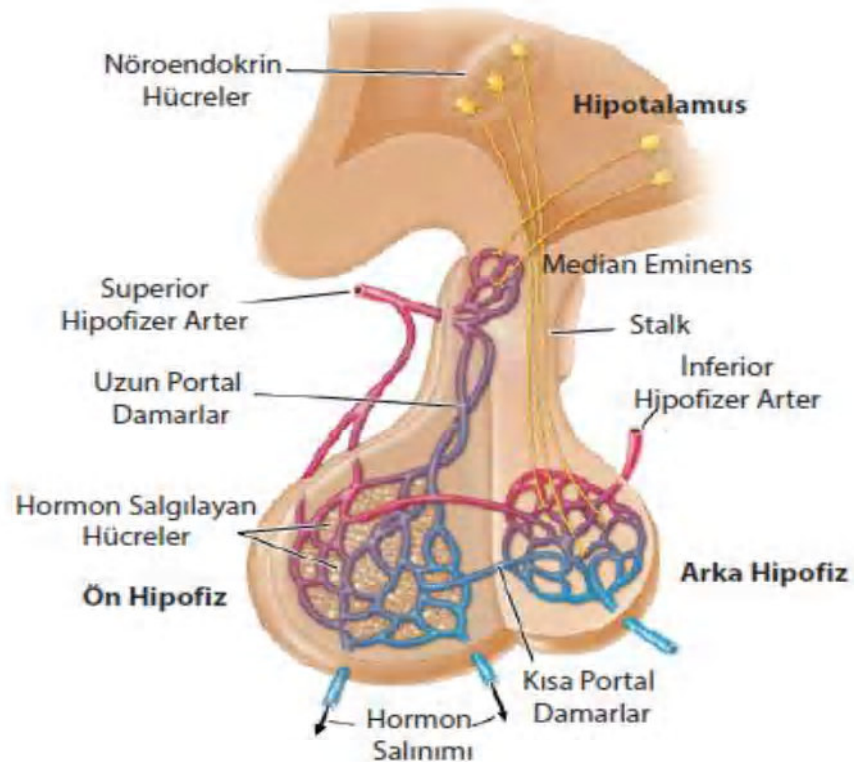
- 1961 Hematopoetik kök hücrelerin keşfi [11]
- 1974 Mezenkimal kök hücreler veya kemik iliği stromal hücreleri olarak bilinen fibroblast koloni formlarının tanımlanması [12]
- 1978 İnsan göbek kordon kanında hematopoietik kök hücrelerin tespit edilmesi
- 1992 Nöral kök hücrelerin laboratuvar ortamında idame ettirilmesi [13]
- 1997 Kanser kök hücresi kavramının keşfi [14]
- 2001 Pluripotent veya fotal kök hücrelerin transplantasyonu kronik hastalıkların tedavi edilebileceğinin hayvan modelinde gösterilmesi
- 2006 Fibroblastların pluripotent kök hücreye farklılaştırılan faktörlerin keşfi (Oct 4, Sox2, c-Myc ve Klf 4) [15]
- 2006 Göbek kordonu kanından embriyonik benzeri kök hücreler elde edilmesi [16]
- 2008 Fibroblastlara ek olarak, karaciğer ve mide hücrelerinden pluripotent kök hücre elde edilmesi [17]

- 2010 Mezenkimal kök hücrelerden ekstraselüler matriks skafold ile kartilaj hücreleri geliştirilmesi [18]
- 2011 Fare modelinde embriyonik kök hücrelerden 3 boyutlu kültürde fonksiyonel anterior hipofiz dokusuna farklılaştırılması [19]
- 2012 Fare modelinde hipofizin rejeneratif kapasitesinin olduğunun ve hipofizer erişkin kök hücrelerin doku tamirinde rol oynadığının gösterilmesi [9]

2.4 Hipofiz

Organizmanın yaşamsal faaliyetlerini düzenleyen bezelye büyüklüğündeki hipofiz bezi, hipotalamusun hemen altında bulunur (Şekil 2.1). Hipofiz vücudun gelişimi, üremesi, stresle başa çıkması gibi temel biyolojik işlevleri kontrol eden stratejik öneme sahip bir organdır.

Embriyolojik olarak ön hipofiz veya anterior hipofiz Rathke poşundan köken almakta iken posterior veya nörohipofiz ise hipotalamusun nöral kısmından köken almaktadır [20].



Şekil 2.1: Hipotalamik-hipofizer portal sistem. Adapte edilmiştir [20]

Hipotalamik-hipofizer sistem hipotalamus ve hipofizin anlık ve hızlı iletişim kurabilmesini sağlayan vasküler ağ ile çevrilidir (Şekil 2.1). Hipofiz ve hipotalamus işbirliği içerisinde büyümeyi, enerji metabolizmasını, laktasyonu, üremeyi, immün cevabı ve stres cevabını düzenler.

Hipotalamus özelleşmiş hücre gruplarına ev sahipliği yapar ve bu hücre gruplarının salgıları hipofizer hormonların salgılarını kontrol eder. Arkuat çekirdek (ARC), Paraventriküler çekirdek (PVN), Suprakizmatik çekirdek (SCN) Periventriküler çekirdek (PeVN), Medial çekirdek (MN), Anterior hipotalamus (AH) ve Lateral hipotalamik area (LHA) adı verilen hücre grupları enerji dengesi ve yeme davranışının düzenlenmesinde ve nöroendokrin fonksiyonların gerçekleştirilmesinde görev alır.

Hipotalamusun endokrin ve sinir sistemi arasında bir geçit oluşturmasını sağlayan hücre grupları magnoselüler ve parviselüler nöronlar olmak üzere iki çeşittir. Oksitosin (OT) ve Arjininvasporesini (AVP) hormonları hipotalamusun magnoselüler hücreleri tarafından salgılanır ve arka hipofizde depo edilir. Dolayısıyla arka hipofiz veya nörohipofiz bu hormonların portal sisteme geçiş yapmasını sağlayan bir elçi görevi görmektedir.

Parviselüler hücreler ön hipofizden hormon salınımını kontrol eder. Bu hücrelerden Tirotropin Salgılatıcı Hormon (TRH) ve Kortikotropin Salgılatıcı Hormon (CRH) salgılayanlar PVN çekirdekte, Somatostatin (SS) salgılayanlar PeVN'de, Growth Hormon Salgılatıcı Hormon (GHRH) ve Dopamin (DA) salgılayanlar ARC çekirdekte, Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) salgılayanlar ise LHA çekirdekte lokalize olmuştur [21].

Ön hipofizde hormon salgılayan 5 farklı tipte hücre bulunur. Somatotroplar Growth Hormon (GH), kortikotroplar Adrenokortikotropik Hormon (ACTH), laktotroplar Prolaktin (PRL), tirotroplar Tiroid Stimüle Edici Hormon (TSH), gonadotroplar Lütenize Hormon (LH) ve / veya Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) salgılar.

Hormon salgılayan bu hücelere ek olarak ön hipofiz bezi non-hormonal hücelere de ev sahipliği yapar. Bunlardan folikülstelat (FS) hücreleri sitokinlerin ve büyüme

faktörlerinin salgılandığı destekleyici hücrelerdir. Hipofizde bulunan non-hormonal hücre gruplarından biri de kök hücrelerdir [22].

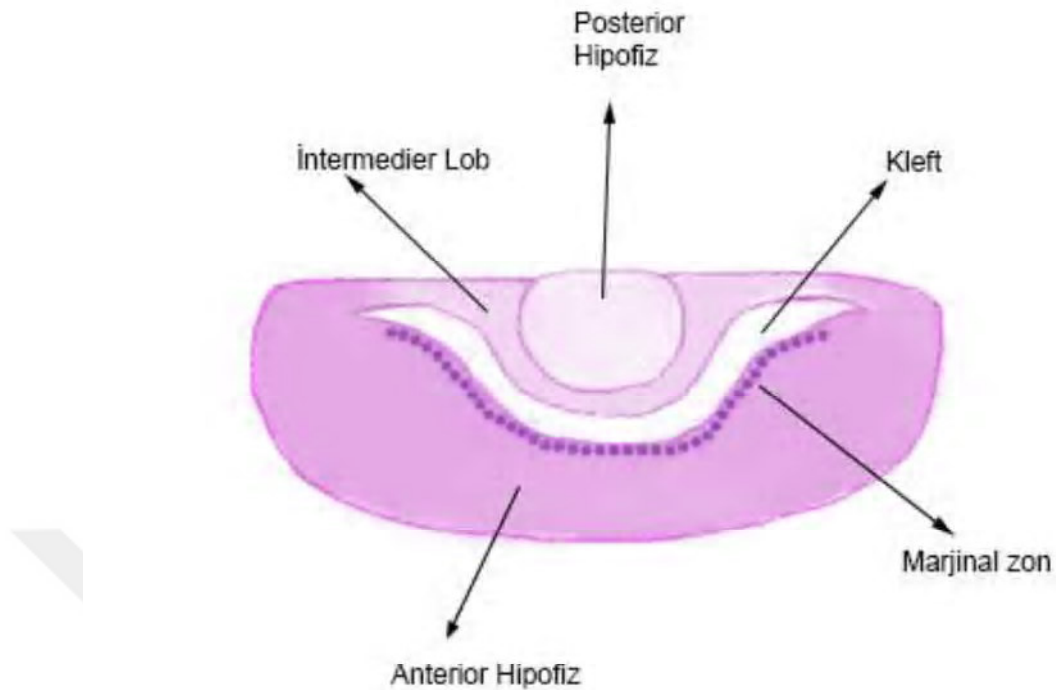
2.5 Hipofizer Erişkin Kök Hücreler

Hipofizde kök hücrelerin var olduğu yakın zamanda gösterilmiştir. Hipofiz çevresel etkenlere cevap veren dinamik bir dokudur. Örneğin, gebelik ve laktasyon sırasında PRL salgılayan laktotropların sayıları birkaç kat artmaktadır. Bu dinamik hücre adaptasyonunu sağlayan temel mekanizmanın erişkin kök hücreler olduğu gösterilmiştir [23, 24].

Hipofizer kök hücreler genel olarak “uyku”da (quiescent) olan hücreler olmakla birlikte hipofizer yetmezliğe sebep olan patolojik ve fizyolojik durumlarda aktive olmaktadır [25, 26]. Hipofiz fonksiyonu kafa travması gibi hasar durumlarında, adenomlar gibi tümör gelişimi sebebiyle ve yaşlanmaya bağlı olarak sekteye uğramaktadır. Hipofizer erişkin kök hücrelerin bu durumlarda doku bütünlüğünün sağlanmasında rol oynadıkları gösterilmiştir.

Son 10 yılda yapılan çalışmalarla hipofizer erişkin kök hücreler moleküler düzeyde deşifre edilmektedir ve moleküler markerler üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Hipofizer kök hücreleri anlamak için fare modelinin kullanıldığı bu tez çalışmasında, bu hücreleri anlamak için fare hipofizinin anatomisini bilmek önemlidir.

Hipofiz dokusu fare, rat gibi kemirgenlerde Anterior ve Posterior loblara ek olarak, insanlarda rudimenter (gelişmemiş) olan oral ektoderm orjinli intermedier bölgeye sahiptir [27]. Şekil 2.2’de fare hipofizi resmedilmiştir. Hipofizer kök hücreler marijinal zon bölgesinde yoğunlaşmış olmakla birlikte hipofiz parenkiminde de bulunmaktadır.



Şekil 2.2: Fare hipofizinin şematik gösterimi. Fare hipofizi anterior hipofiz, posterior hipofiz ve intermedier lob bölgelerinden oluşmaktadır. Anterior hipofiz ve intermedier lob arasında kalan boşluk kısım kleft olarak adlandırılmaktadır. Marjinal zon kök hücrelerin yoğun olduğu bölgelere işaret etmektedir.

Hipofizde hormon salgılamayan hücreler arasında FS hücreleri ve kök hücre benzeri özellikler gösteren ve Side Population olarak adlandırılan, hipofizer hücrelerin yaklaşık %1,5'inin oluşturan hücre popülasyonu olduğu bilinmektedir [22]. Side Population (SP) hücrelerinin özelliği, kök hücrelerde görülen toksik maddelerin hücreden atılmasını sağlayan ABC transporter moleküllerinin yüksek miktarda ifade edildiği ve aktivitesinin yüksek olduğudur. Bu mekanizmasının uzun yaşam süresine sahip olan kök hücrelerin savunma mekanizmalarından biri olduğu düşünülmektedir. Bu özelliğe sahip hücreler arasında kök hücre ile ilişkili Nanog, Sca1 gibi markerleri ifade etmektedir.

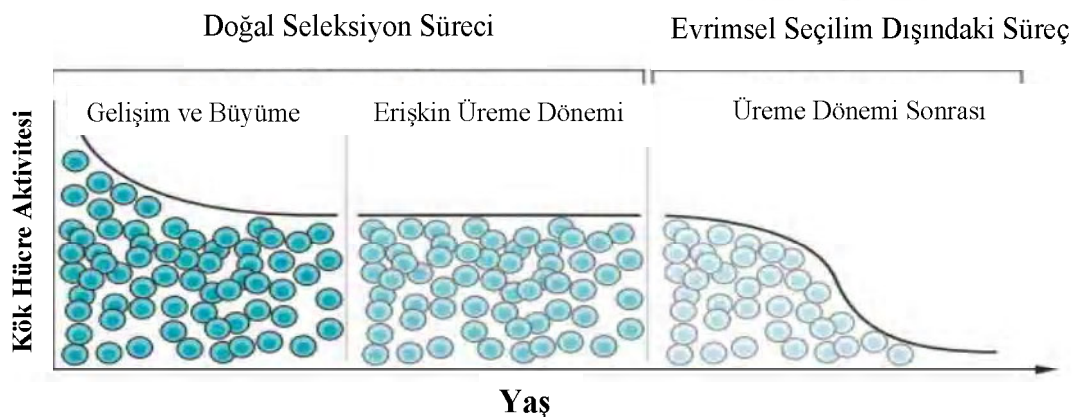
SP hücrelerinden Sca1 markerinin düşük düzeyde ifade eden hücreler, ki yaklaşık SP'nin %40'ını oluşturmaktadır, geri kalan SP hücrelerine nazaran sferojen oluşturduğu ve hipofizer hormon hücrelerine farklılaşabildiği görülmüştür. Sca1 markerinin düşük düzeyde ifade eden SP hücrelerinin yarısında Sox2 ifadesi tespit edilmiştir. Sca1 markerini yüksek düzeyde ifade eden hücrelerin FS hücrelerin subsetini veya endotel projenitör hücreleri olduğu ileri sürülmüştür.

2.5 Yaşlanma

Neden yaşıyoruz? Yaşlanma biyolojideki en gizemli süreçlerden biridir. 1800'lerden beri yaşlanmaya dair çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Yaşlanma, doğal seleksiyonun bir yan etkisi olarak düşünülmektedir. Gençlikte hayatta kalma ve üreme gibi yaşam faaliyetleri için elde edilen faydasının, yaşlılıkta oluşacak yan etkilerine tercih edildiğine dair bir yaklaşım mevcuttur [28].

Evrimsel açıdan “neden” yaşlandığımız ve organizma düzeyinde “nasıl” yaşlandığımız uzun yıllardır merak konusudur. Hem hayatta kalımı hem de üremeyi dengeleyen ve birbirini ile entegre sistemler olan genetik programların bu özelliklerini yitirmesi ile meydana gelen yaşlanma için öne sürülen teorilerden biri “disposable soma” teorisidir [29]. Bu teori yaşlanmanın doğal seleksiyon sonucu organizmanın üreme ve hayatta kalma (üreme olmayan yönlerinin yani soma'nın korunması) arasında bir seçim yapması ile meydana geldiğini öne sürer.

Günümüzde sağlık koşullarının iyi olması ve daha korunaklı bir ortamda bulunan tür olarak modern insan, üreme çağının çok daha ötesinde ömür uzunluğuna sahiptir. Doğada yaşayan insan türlerinin üreme çağı sonrasındaki aşamalarda ömür uzunluğuna sahip olması nadiren görüleceğinden, kök hücreleri yaşlanmada da idame ettirilmesinin sağlayan mekanizmalara dair seçim evrimsel olarak söz konusu olmamıştır (Şekil 2.3) [3].



Şekil 2.3 Yaşam uzunluğu sürecinde kök hücrelerin kullanımına ilişkin model. Adapte edilmiştir [3].

Genlerin yaşam uzunluğuna katkıda bulunmakta olduğu kesindir. Yine de genetik ve genetik olmayan faktörlerin yaşlanmaya hangi derecede ve nasıl etki ettiği halen anlaşılammıştır. İkiz insanlar üzerine yapılan çalışmalara göre, genlerin yaşlanmaya olan etkisinin %20-30 olduğu düşünülmektedir [30]. Fakat yine de genlerin nasıl böyle bir varyasyona yol açtığı bilinmemektedir. Programlanmışlık teorisine göre içsel bir biyolojik saat gelişim, büyüme, olgunlaşma ve yaşlanmamızı, genleri belirli bir düzene göre açıp kapatarak düzenlemektedir [31]. Programlanmış yaşam uzunluğunun savunucularına göre, yaşam uzunluğunun çok anlamlı bir şekilde artmasına rağmen, yine de insanın maksimum yaşayabileceği sürenin değişmediğine dikkat çekmektedirler.

Model organizmalarda yapılan çalışmalarda genlerin yaşam uzunluğu ile ilgili bir rol oynadığına kesin kanıt oluşturmuştur. Örneğin, *C. elegans*'ın insülin reseptöründe meydana gelen mutasyon, kurtçuğun yaşam süresini 2 katına çıkarmıştır [32]. Fakat şimdiye kadar yaşlanma geni gibi tek bir gen tanımlanmamıştır bu da yaşlanmanın genetik kontrolünün de multifaktöryel olduğunu bize göstermektedir. Yaşlanma genleri olarak tabir edilen genler, biyokimyasal metabolik yolları yavaşlatan, durduran genler olarak tanımlanmıştır. Bunlar arasında IGF-1 ve TOR yolları bu konuda en çok çalışılan yollardandır. Fakat bu mekanizmaların tam olarak nasıl yaşam uzunluğunu düzenledikleri halen belli değildir [33].

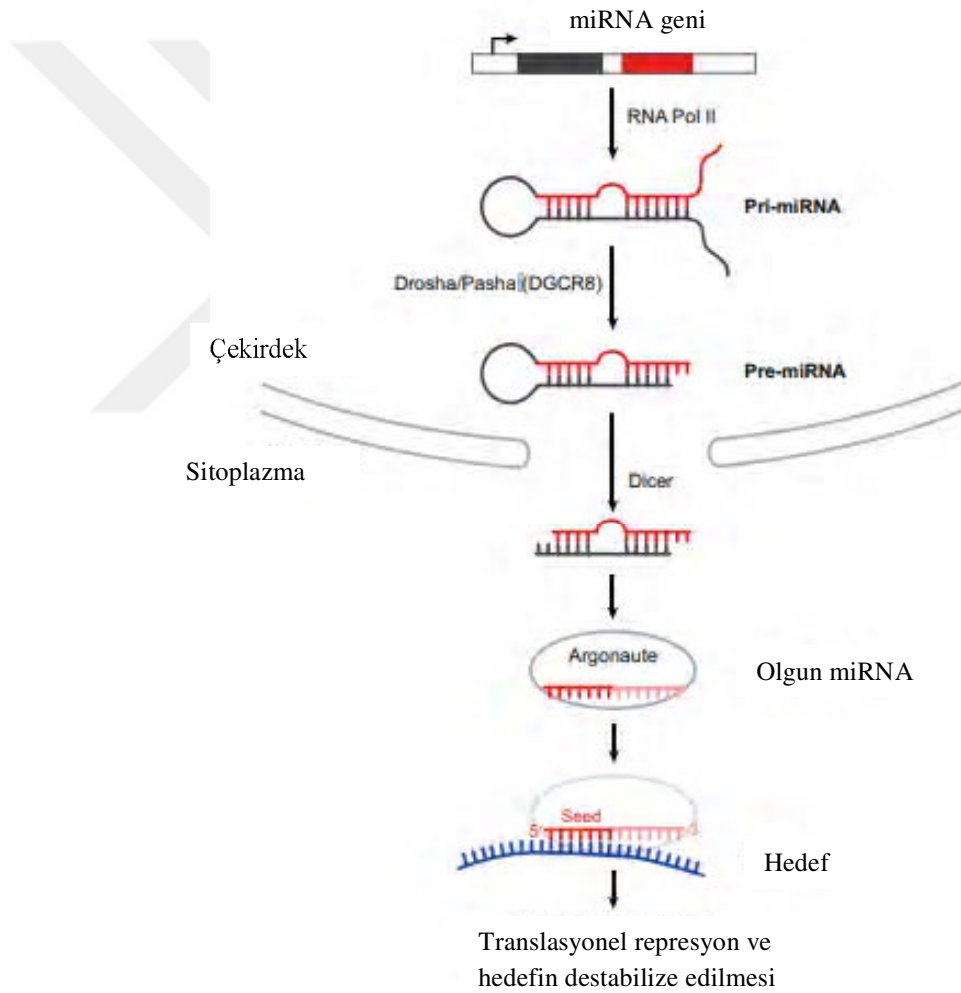
Hipofizin yaşlanmayı düzenlediğine dair ilk çalışmalar, hipofiz dokusu çıkarılmış ratlarda yaşam sürelerinin uzadığını ve yaşlanmayı tetikleyici faktörler arasında Prolaktin ve Growth Hormon ailesinin bulunduğunu göstermiştir [1]. 1 aylık ve 9 aylık farelerde yapılan hipofizektomi sonucunda, yaşam uzunluğunun her iki grupta da arttığı, ancak 9 aylık farelerde yaşam uzunluğu artış oranının daha fazla olduğu görülmüştür [2]. Bu çalışma, yaşamın daha geç evrelerinde dahi olsa, hipofizin çıkarılmasının yaşam uzunluğunu artırabildiğini göstermiştir. Yaşlanma ile birlikte hipofizer kök hücrelerin ve hipofizin rejeneratif kapasitesinin azaldığı bilinmektedir [34]. Bu azalmanın sebebi tam olarak bilinmemektedir ancak yaş ile birlikte Sox2 ve WNT, TGFβ gibi yollarda yer alan birçok genin ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

2.6 miRNA

mikroRNAlar (miRNA) kodlamayan yani proteine dönüştürülmeyen küçük RNA molekülleridir. Boyutları 20-25 nükleotid uzunluğunda olan bu RNA moleküllerine

karşı olan ilgi, 2000’li yılların başlarında çeşitli hastalıklarla ilişkilendirildiklerinden beri oldukça artış göstermiştir.

miRNA’lar çeşitli aşamalardan geçerek olgun miRNA haline gelirler ve genlerin 3’ UTR (Untranslated Region: Translasyon olmayan bölge) bölgelerini hedef alarak ilgili genin baskılanmasını sağlamaktadırlar (Şekil 2.4) [35]. Bunun için miRNA’ların hedef gen bölgesiyle tam eşleşmesi şart değildir. miRNA’lar hedef genin transkribe olmuş mRNA ürününün yıkılması veya translasyonun inhibe edilmesi suretiyle fonksiyonlarını gerçekleştirirler.



Şekil 2.4.: miRNA biogenezinin şematik gösterimi. Adapte edilmiştir [35].

miRNA’lar yaşlanmaya bağlı gelişen kanser ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayan ve yaşam uzunluğunu düzenleyen genetik ağda görev alan moleküllerdir. miRNA’ların proliferasyon, apoptoz, kemoterapi ve radyoterapi

direnci, metastaz ve relaps gibi kanser patogenezinin kritik aşamalarında rol aldığı bilinmektedir [36]. Yaşa bağlı farklı ifade profilleri gösterdiği tespit edilen miRNA'ların, yaşla ilişkili hastalıklarda da ifadeleri değişmektedir ve bu miRNA'ların potansiyel hedeflerinin çoğunun hastalıklarla ilişkili yollar olduğu görülmüştür.

İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, mononükleer hücreleri kullanılarak genç ve yaşlı bireylerde miRNA ifade değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu çalışmada miRNA'ların birçoğunun yaşlanmayla birlikte ifade düzeyinin düştüğü belirtilmiştir. Yaşlanmaya bağlı düşüklük gösteren bu miRNAların tahmin edilen hedeflerinin de c-kit, PI3K, H2AX'in de yaşlanmayla birlikte miktarlarının arttığı gözlemlenmiştir.

Farklı kök hücre tiplerinin kendilerine has miRNA ifade profilleri olduğu ortaya konmuştur. miRNA'ların kök hücrelerin yeniden programlanmasında rolü olduğu gibi, kök hücrelerin pluripotent kapasitelerinin düzenlenmesinde de görev almaktadırlar [37, 38].

Otokrin ve parakrin faktörler doku gelişimi ve rejenerasyonun aktive olmasını sağlayan mekanizmalardan biridir. Parakrin faktörler arasında ekstraselüler vezikül (EV) kaynaklı miRNA'lar bulunmaktadır. Kök hücrelerin kendini yenilemesi, idame ettirilmesi ve farklılaşması için önem arz eden bioaktif kargo molekülleri olan EV'ler, derive oldukları kök hücrelerin imzasını taşımaktadırlar.

Kök hücreler klinik olarak son derece değerli kaynaklardır ve miRNA'ların kök hücrelerin farklılaşması, pluripotent kapasitelerini düzenlenmesi, tekrar programlanmasında önemli ve kritik görevleri olduğu göz önüne alındığında, miRNA'lar terapötik hedefler olarak öne çıkmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇLER

3.1.1 Cihazlar

LightCycler 480 II (Roche)

PCR cihazı (Bio-Rad)

Kriyostat (Thermo)

Invert Mikroskop (Leica)

Pipet Tabancası (Thermo)

DNA RNA Çalışma Kabini (Biosan)

Vorteks (Heidolph)

Mikrofüj (Thermo)

Mikropipet (Gilson)

-80°C Soğutucu (Binder)

-20°C Soğutucu (Vestel)

4°C Soğutucu (Samsung)

Timer (Isolab)

3.1.2 Sarf Malzemeler

Goat anti-human Sox2 (R&D Systems, AF2018)

Cy™3 AffiniPure Donkey Anti-Goat (Jackson Immuno Research, 705-165-003)

Donkey Serum (Sigma, D9663)

DAPI (sigma)

Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche)

Mm_miR-24_1 miScript Primer Assay (Qiagen, MIMAT0000219)

SNORD96A_11 miScript Primer Assay (Qiagen, NR_002592)

RNU6-2_11 miScript Primer Assay (Qiagen, NR_125730)

RNA Later (Qiagen)

Cryomatrix (Shandon)

miRVANA PARIS RNA Purification Kit (Thermo)

miScript Microfluidics PreAMP Kit (Qiagen)

miScript II RT kiti (Qiagen)

Paraformaldehid (Sigma)

Triton (Sigma)

Mikrofüj Tüpler (Axygen)

10 -200µl Filtreli Pipet Uçları (Axygen)

1000µl Filtreli Pipet Uçları (Vertex)

10 - 1000µl Filtresiz Pipet Uçları (Greiner)

Lam, Lamel (Thermo)

Pap Pen (Abcam)

Alkol (Tekel)

Distile Su (Millipore)

Tüp Standı (Isolab)

3.2 YÖNTEM

3.2.1 Fare Hipofiz Örneklerinin Toplanması

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 13.17.2017 tarihli ve 17 / 127 karar numaralı etik kurul izni ile gerçekleştirilen bu çalışmada, 2 aylık, 4 aylık, 8 aylık, 10 aylık, 12 aylık ve 16 aylık erkek Balb/c farelerinin hipofizleri kullanılmıştır. Kriyokesitler için her bir zaman diliminde 3 adet hayvan, toplamda ise 18 adet hayvan kurban edilmiştir. Gen ifade analizi için 4 aylık 3 adet ve 16 aylık 3 adet hayvan hipofizi kullanılmıştır. Çalışmada kurban edilen toplam hayvan sayısı 24 adettir.

3.2.2 Kriyokesitlerin Alınması

Hipofiz dokusunu çıkarılması için fareler servikal dislokasyon ile kurban edilmiş ve ardından deney hayvanları üzerinde kullanıma uygun cerrahi set kullanılarak makas ile farenin kafası kesilerek kafatası ekspoz edilmiştir.

- Hipofiz çıkartılarak %4'lük paraformaldehid solüsyonunda 2,5 saat oda sıcaklığında fikse edilmiştir
- Ardından %30'luk sükröz çözeltisinde çöktürülmüş ve
- Akabinde OCT adlı materyal içerisine gömülmüştür
- OCT'ye gömülen doku sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve kriyostat kullanılarak 10 mikronluk kesitler elde edilmiştir.
- Kesitler boyama yapılabilecek kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.3 İmmüno Floresan Boyamalar ve Görüntüleme

- Hipofizer kriyokesitler 10 dakika PBS solüsyonunda bekletildikten sonra, % 0,25'lik Triton çözeltisinde iki kez 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- Akabinde 30 dakika boyunca %10'luk donkey serumda bekletilmiş ve Sox2 antikoru (R&D Systems, AF2018) ile gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün, kesitler 3 kez % 0,25'lik Triton ile yıkanmış ve CyTM3 AffiniPure Donkey Anti-Goat antikoru (Jackson Immuno Research, 705-165-003) ile oda sıcaklığında 2,5 saat inkübe edilmiştir.
- 3 kere % 0,25'lik Triton ile yıkandıktan sonra DAPI ile 10 dakika inkübe edilmiştir.

- Bir kere Triton ve bir kere PBS ile 10'ar dakika yıkandıktan sonra mounting medium kullanılarak mikroskop analizi için hazırlanmıştır.
- Görüntülemek için Leice DMI4000 floresan mikroskobu kullanılmıştır.
- Elde edilen görüntüler Image J programında cell counter plug-in kullanılarak sayılmıştır.

3.2.4 Total RNA İzolasyonu, cDNA eldesi ve RT-qPCR

Gen ifade analizi için posterior hipofiz lobu çıkartılmış yani yalnızca anterior hipofiz lobu kullanılmıştır. Anterior hipofiz dokuları RNA later solüsyonunda total RNA izolasyonu yapılabildiği kadar -20°C 'de saklanmıştır.

Total RNA izolasyonu miRVANA PARIS RNA Purification Kit (catalog no AM1556, Ambion-ThermoFisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- Dokular RNA later solüsyonundan çıkartılarak kit kapsamında sunulan Cell Disruption Buffer içerisinde homojenize edilmiştir
- Ardından eşit hacimde 2xDenaturing Solution (denatüre edici çözelti) ile 5 dakika buz üzerinde muamele edilmiştir.
- Acid-Phenol:Chloroform 1:1 oranında eklenerek 45 saniye boyunca vortekslenmiş ve 5 dakika boyunca 10.000g'de santrifüj edilmiştir.
- Aköz supernatanta 1,25 kat EtOH eklenerek kolonlara aktarılmış ve 10.000g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- 700µl miRNA Wash Solution I ile bir kez ve 500µl miRNA Wash Solution 2/3 ile iki kez olmak üzere her bir yıkama aşamasında 10.000g'de 30 saniye santrifüj edilmiş ve total RNA nükleaz-free su kullanılarak elute edilmiştir.

Total RNA'dan cDNA eldesi miScript II RT kiti (Qiagen) kullanılmıştır.

- RNA örneklerine 5X miScript HiSpec Buffer, 10x Nucleics Mix, RNase-free water ve miScript reverse transcriptase mix üretici talimatlarına göre eklenmiştir.
- Karışım 37°C 'de 60 dakika ve 95°C 'de 5 dakika inkübe edilmesinin ardından seyretilerek preamplifikasyon aşamasına geçilmiştir.

Örnekler miScript Microfluidics PreAMP Kit (Qiagen) kullanılarak üretici talimatlarına göre amplifiye edilmiştir.

- cDNA örneklerine 5xPreamp Buffer, Preamp Primer Mix, Universal Primer ve HotStarTaq® DNA Polymerase üretici talimatlarına göre eklendikten sonra;
- 95°C’de 15 dakika ve 12 döngü olacak şekilde 94°C’de 30 saniye, 60°C’de 3 dakika inkübe edilmiştir.
- Daha sonra örneklere Side Reaction Reducer eklenerek 37°C’de 15 dakika, 95°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir.

Preamplifiye edilmiş örneklere Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche) ve 10X Universal Primer ve 5µM *miR-24-3p* primeri (Mm_miR-24_1 miScript Primer Assay, Qiagen, MIMAT0000219) eklenerek LightCycler 480 II (Roche) cihazına yüklenmiştir. Termal döngü olarak Tablo 3.1’de gösterilen basamaklar kullanılmıştır.

Tablo 3.1: RT-qPCR termal döngüsü

1. basamak	15 dakika 95°C	
2. basamak	15 saniye 94°C	x 45 (ramp rate 1°C / s)
3. basamak	30 saniye 55°C	
4. basamak	30 saniye 70°C	
5. basamak	30 saniye 40°C	
		ramp rate 2,2°C / s

miR-24-3p’nin genç ve yaşlı fare ön hipofizlerindeki ifade seviyesi farklılığının belirlenmesi için referans genler olarak SNORD96A ve RNU6-2 kullanılmıştır.

Katsayı değişimi (fold change) $\Delta\Delta C_q$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bunun için $2^{- (\Delta C_{qyaşlı} - \Delta C_{qgenç})}$ formülü kullanılmıştır. ΔC_q değerlerinin hesaplanması için $\Delta C_q = C_{qmiR-24} - C_{qreferans}$ formülü kullanılmıştır.

3.2.5 İstatistiksel Analiz

Graphpad Prism 6.0 (deneme sürümü) kullanılarak yapılan analizlerde zaman dilimleri arasında kök hücre sayısı karşılaştırılması One-way ANOVA post-test Tukey ile yapılmıştır ($p < 0,05$).

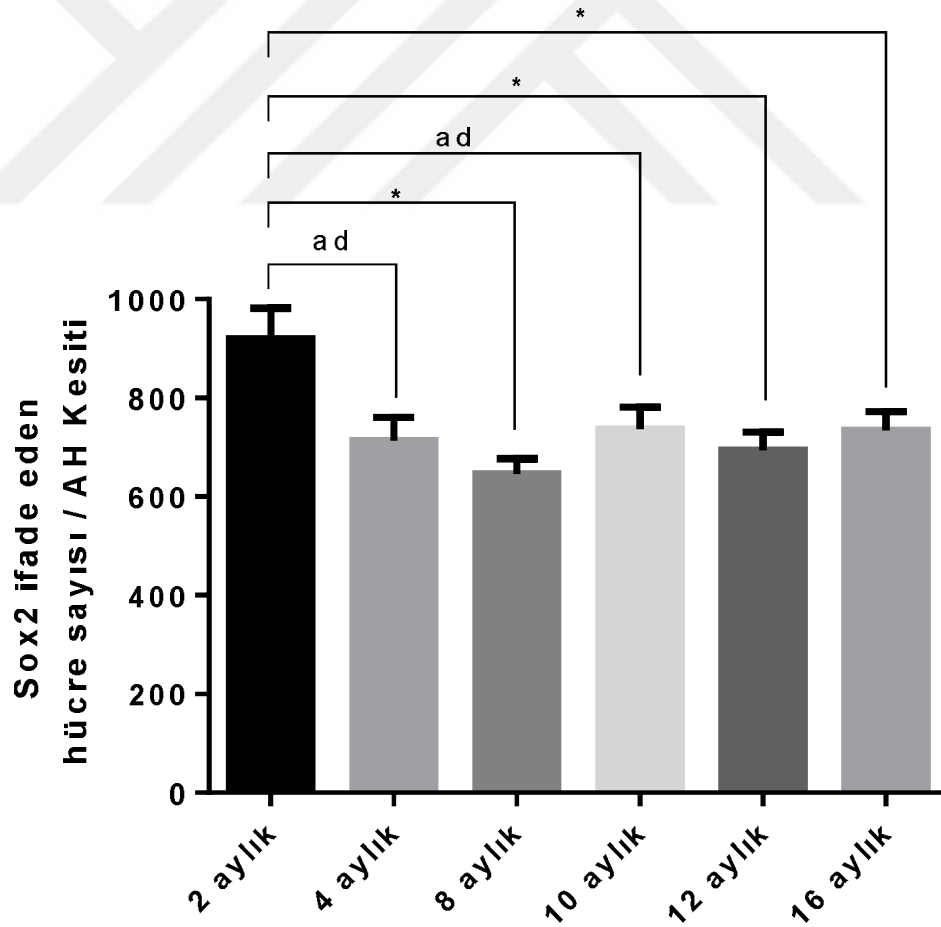
Genç ve yaşlı fare anterior hipofizlerindeki miRNA ifade düzeyleri Student's t-test ile karşılaştırılmıştır ($p < 0,05$).



4.BULGULAR

4.1 Fare hipofizinde Sox2 ifade eden erişkin kök hücre sayısı yaşlanma ile azalmaktadır

Hipofizer kriyokesitler her bir zaman dilimi için Sox2 kök hücre sayısı bakımından analiz edildiğinde genç fare hipofizi ile karşılaştırıldığında, yaşlı farelerde Sox2 ifade eden kök hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (şekil 4.1).



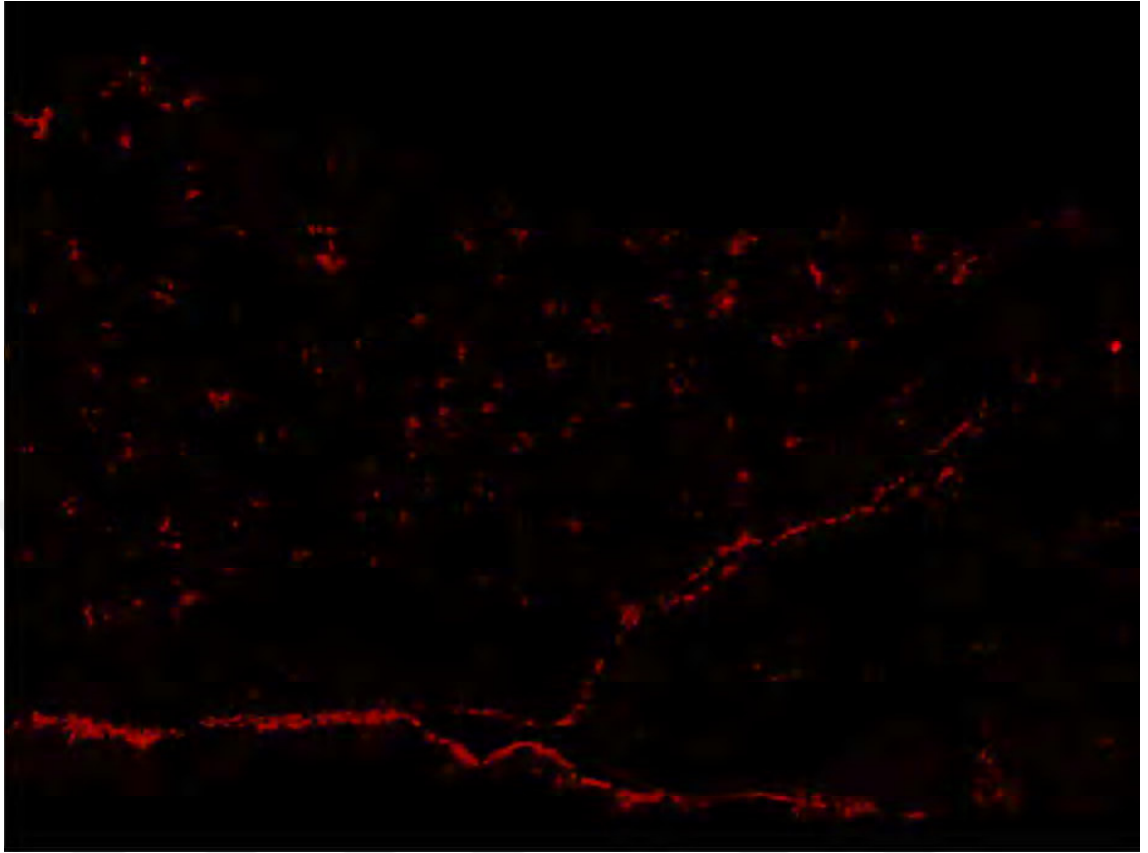
şekil 4.1: Yaşlanmaya bağlı olarak Sox2 ifade eden kök hücre sayısı azalmaktadır.

2 aylık (n=3), 4 aylık (n=3), 8 aylık (n=3), 10 aylık (n=3), 12 aylık (n=3) ve 16 aylık (n=3) farelerin hipofiz kriyokesitlerinde Sox2 ifade eden kök hücre sayısı karşılaştırılmıştır. Her bir zaman dilimi için 7 – 17 farklı kesit için ortalama değerler gösterilmektedir. 2 aylık fareler ile karşılaştırıldığında, 4 aylık ($p= 0,06$) ve 10 aylık ($p= 0,12$) farelerin kök hücre sayısında anlamlı bir fark gözlemlenmezken, 8 aylık ($p= 0,01$), 12 aylık ($p= 0,02$) ve 16 aylık ($p= 0,04$) farelerin kök hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (One way ANOVA, Tukey post-test, $*p < 0,05$; ad: anlamlı değil). Veriler ortalama \pm sem olarak grafikte gösterilmektedir. AH: Anterior Hipofiz

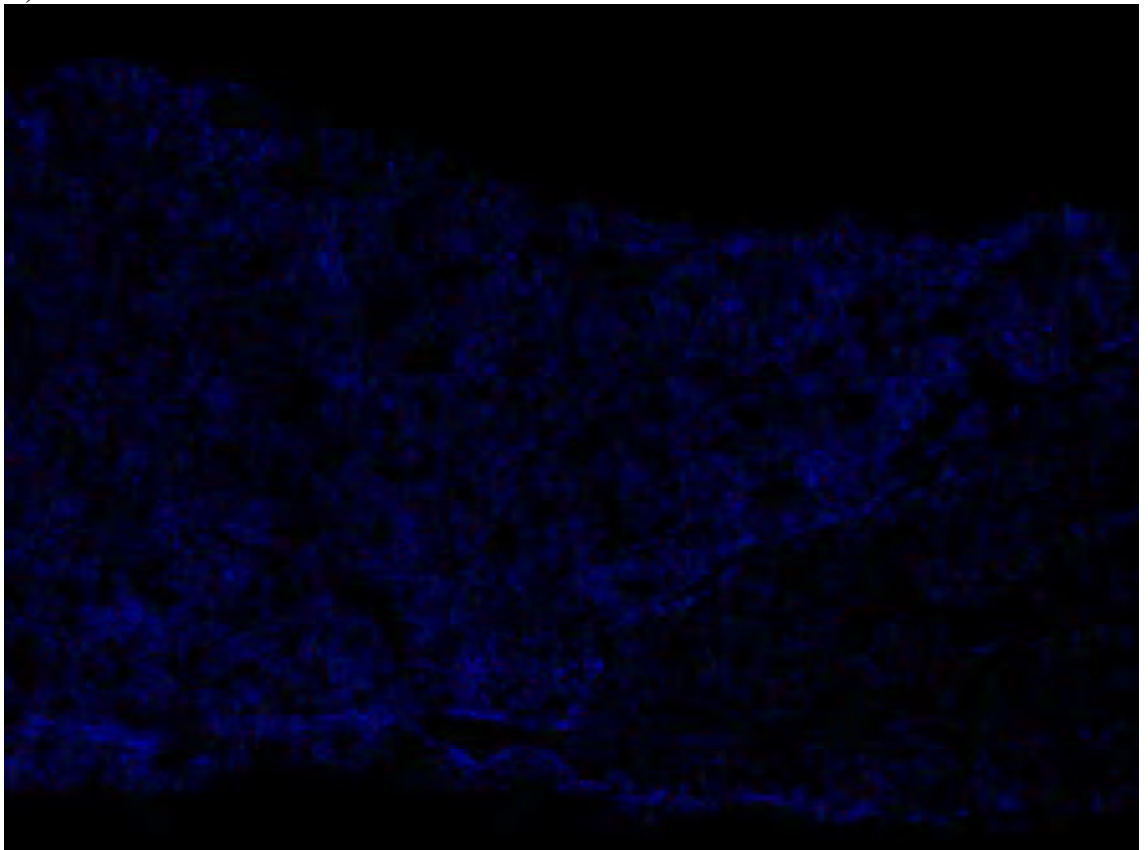
Hipofizer kesitler için sayımlar her bir zaman dilimi için 3 biyolojik replikat kullanılırken, teknik replikatlar 7 – 17 arasında değişen hipofiz kesiti kullanılarak elde edilmiştir. 2 aylık hayvanlar ile 4 aylık hayvanlar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmezken, 2 aylık ve 8 aylık hayvanlar arasında anlamlı olarak kök hücre sayısının azaldığı tespit edilmiştir ($p= 0,01$).

Yaşlarına göre gruplandırılmış farelerden en genç olan 2 aylık farelere ait hipofizin temsili kriyokesit görüntüsü Şekil 4.2’de gösterilmektedir.

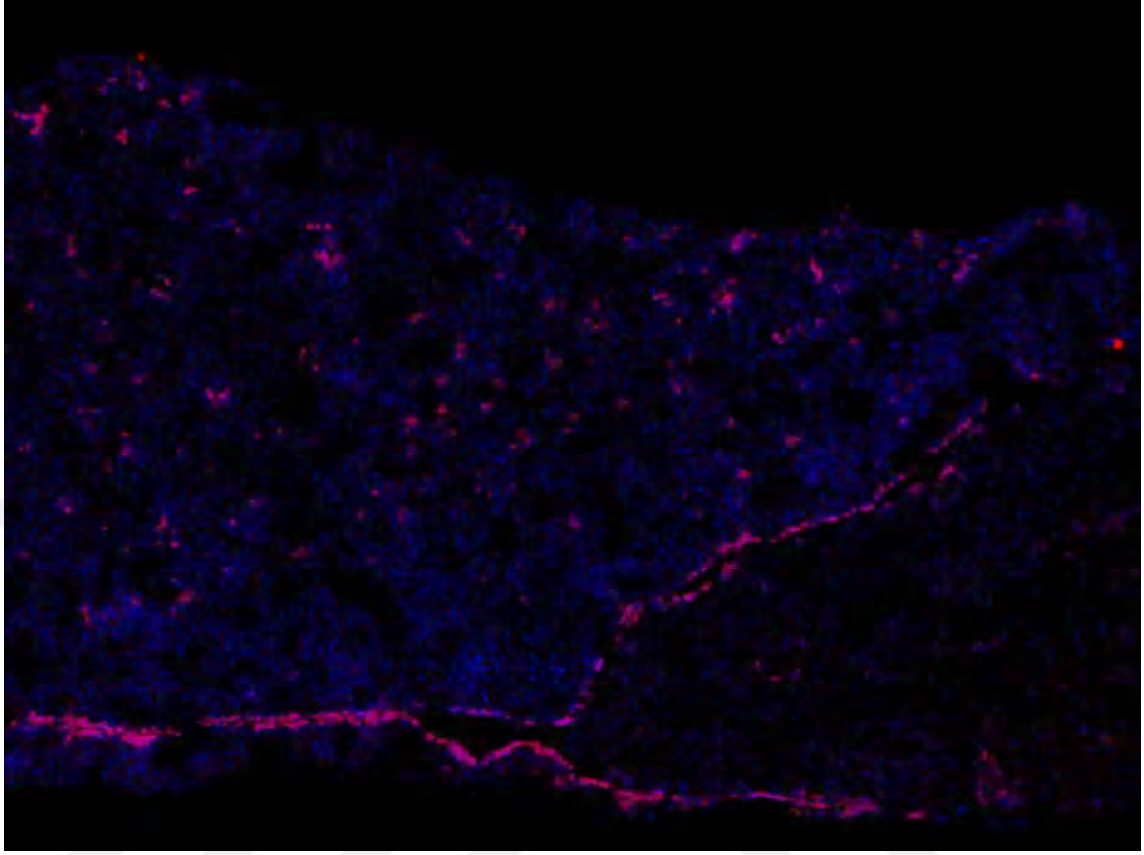
A)



B)



C)

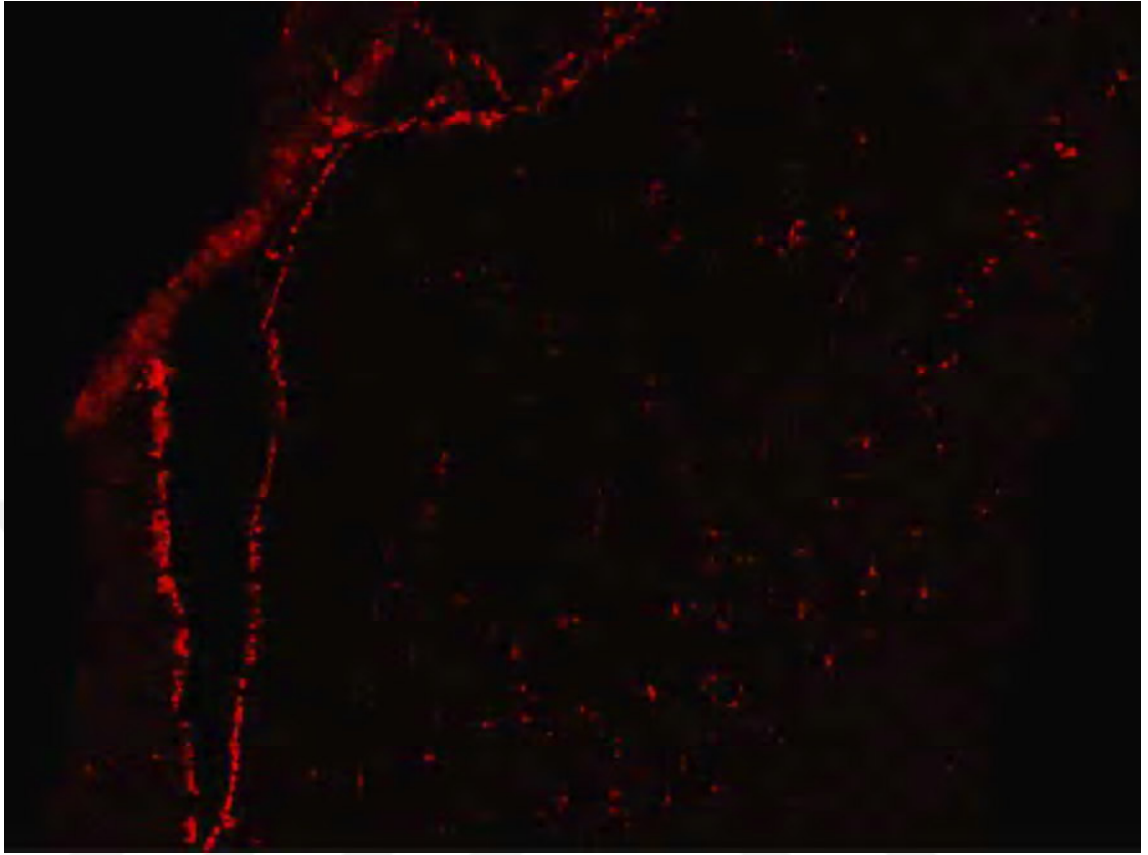


Şekil 4.2: 2 aylık fare hipofizinin temsili kriyokesit görüntüsü.

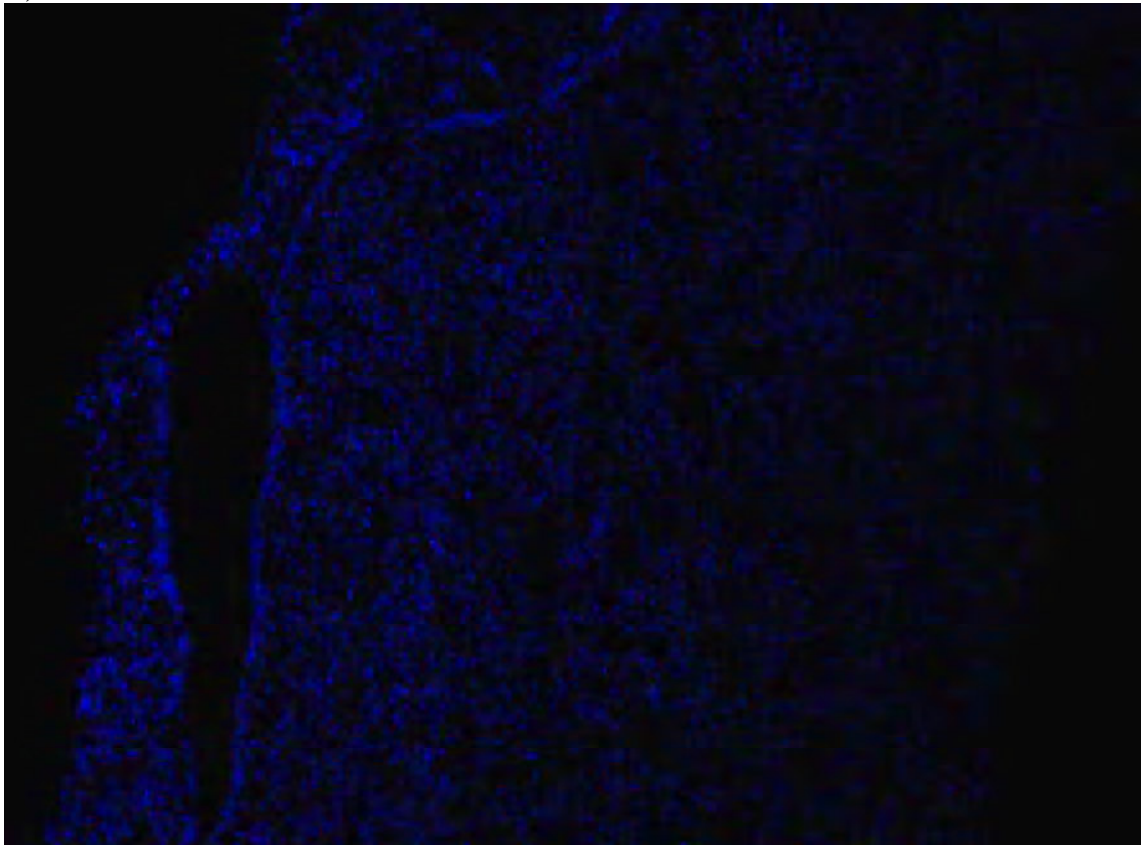
A) Sox2 kök hücre markeri B) DAPI C) Sox2 ve DAPI kanallarının birleştirilmiş görüntüsü

Orta yaşlı olarak ifade edilebilecek 8 aylık farelerin hipofiz kriyokesitlerinin ayrıntılı görüntüsü Şekil 4.3'te gösterilmektedir.

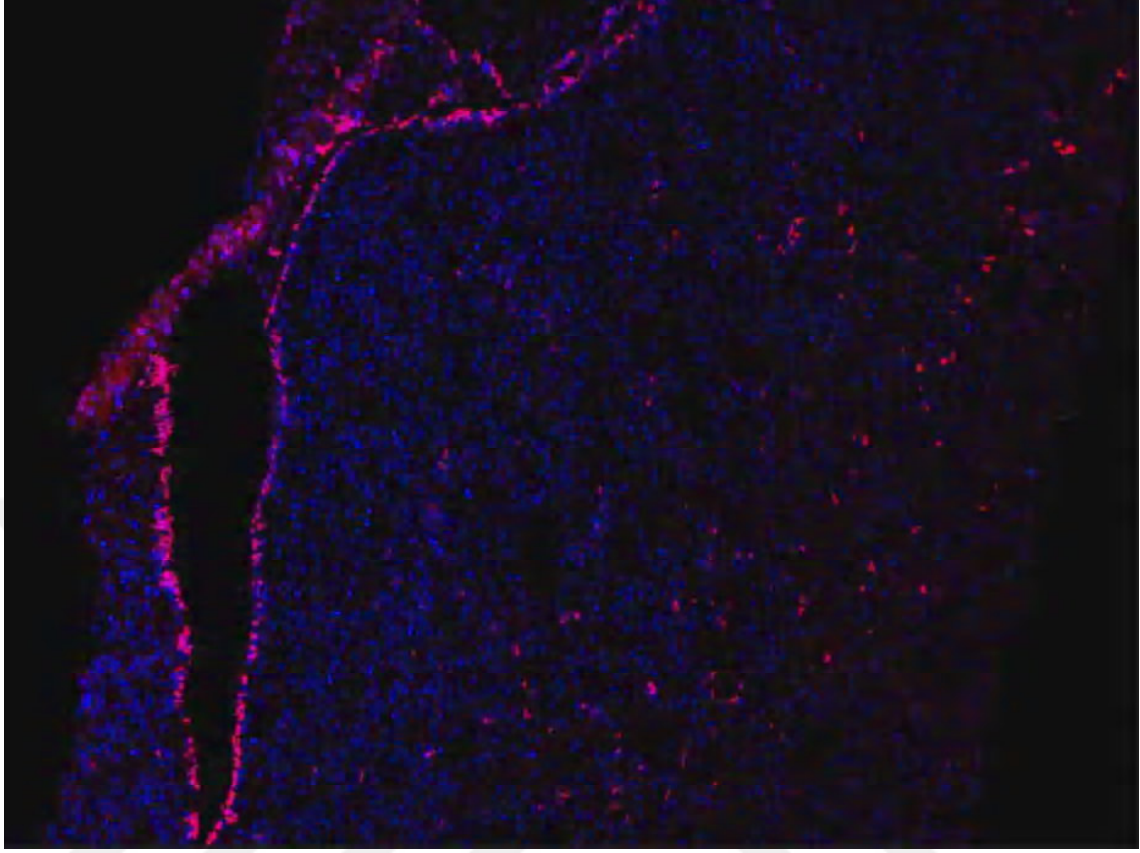
A)



B)



C)

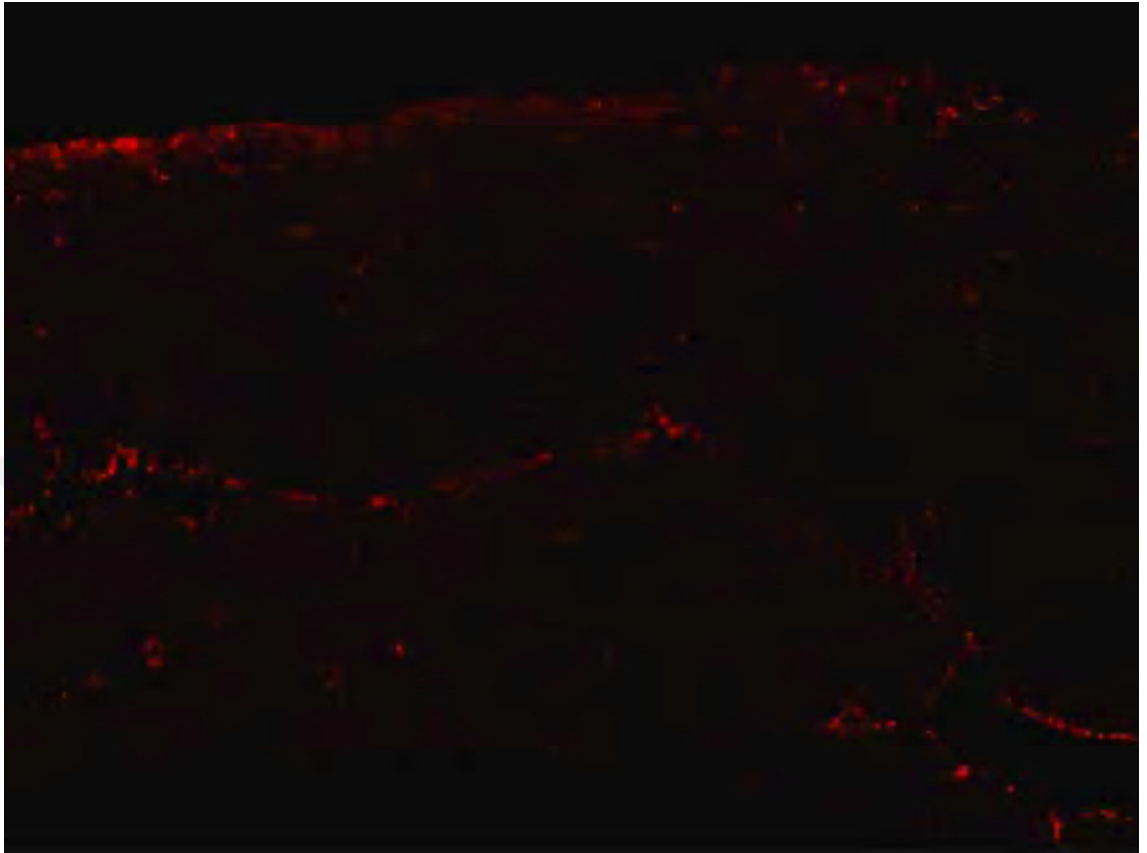


Şekil 4.3: 8 aylık fare hipofizinin temsili kriyokesit görüntüsü.

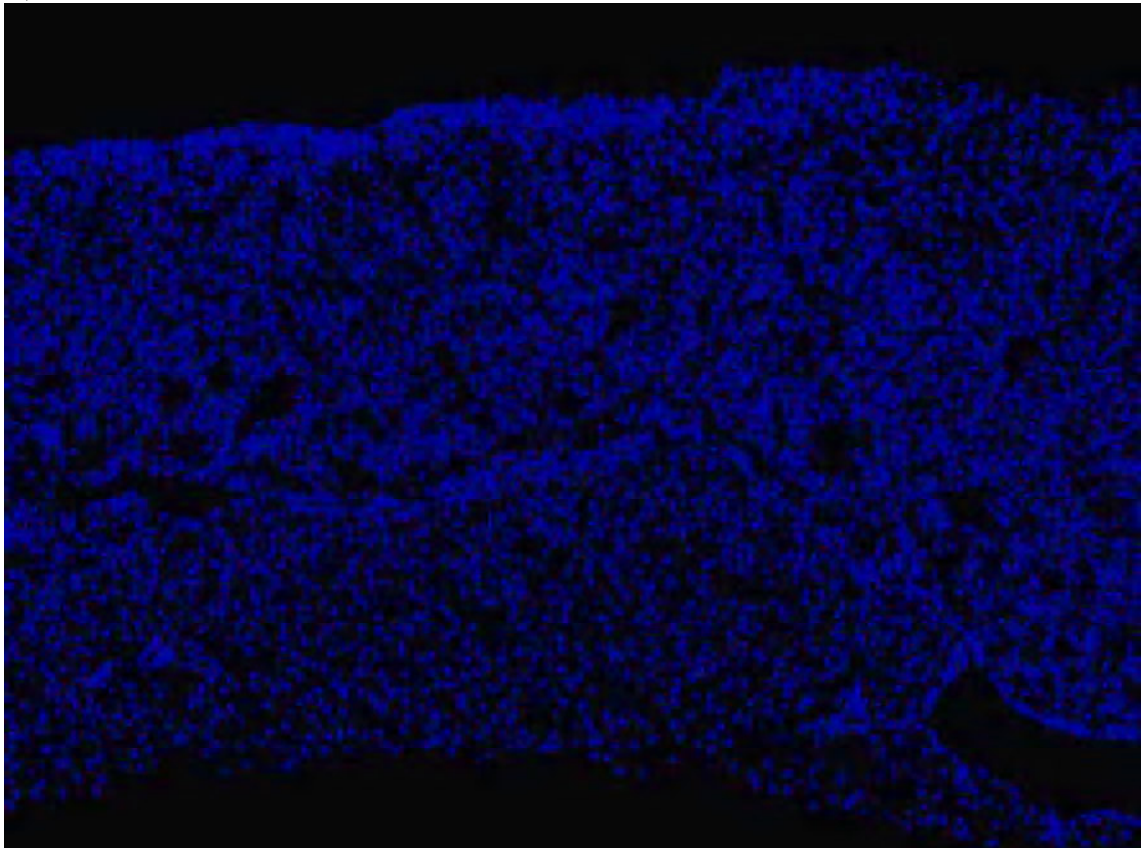
A) Sox2 kök hücre markeri B) DAPI C) Sox2 ve DAPI kanallarının birleştirilmiş görüntüsü

Fare grupları arasındaki en yaşlı farelere ait olan 16 aylık hipofiz kriyokesitlerinin detaylı görüntüleri Şekil 4.4'te gösterilmektedir.

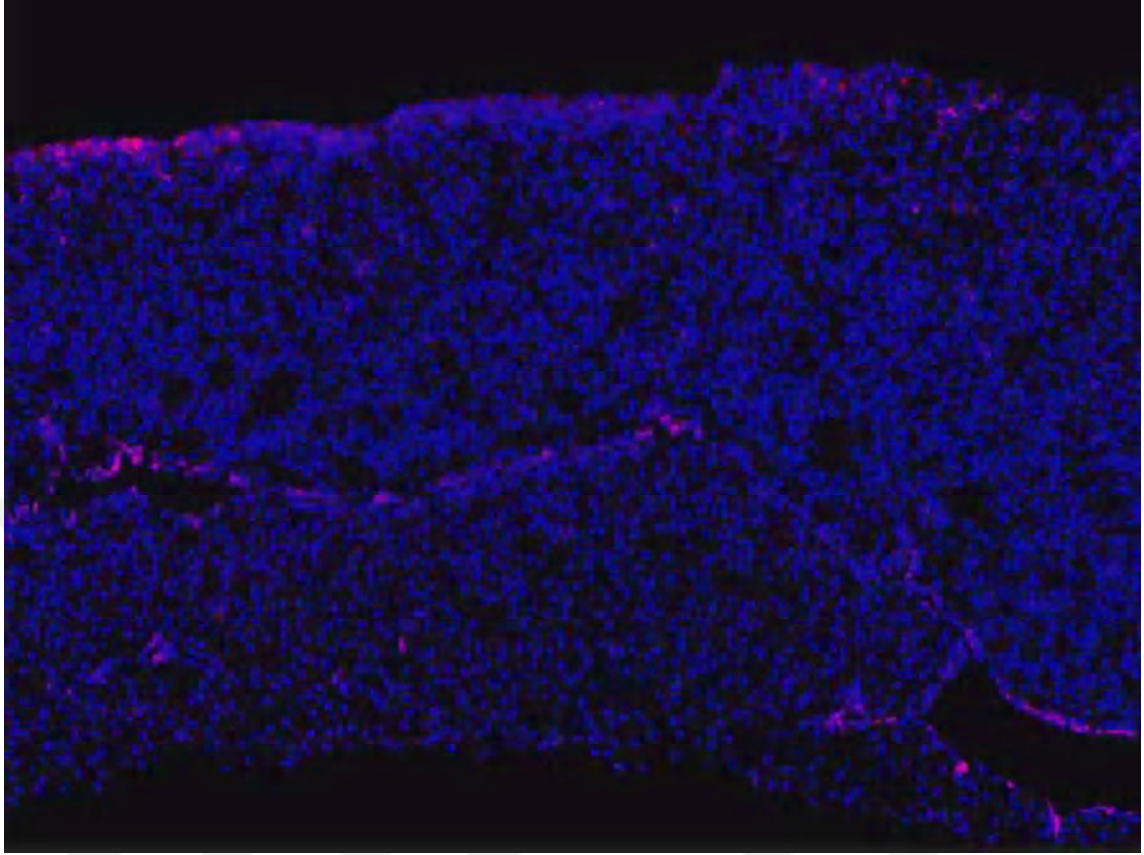
A)



B)



C)



Şekil 4.4: 16 aylık fare hipofizinin temsili kriyokesit görüntüsü.

A) Sox2 kök hücre markeri B) DAPI C) Sox2 ve DAPI kanallarının birleştirilmiş görüntüsü

8 aylık orta yaşlı hayvanların anterior hipofizinde tespit edilen Sox2 kök hücrelerinin miktarının azalması, bu hayvanlardan iki ay daha yaşlı olan 10 aylık farelerin hipofizlerinde %20 oranında düşüş gözlemlenmesine rağmen bu oran istatistiksel analizlerde anlamlı bulunmamıştır ($p=0,12$).

12 ve 16 aylık yaşlı farelerde ise hipofizer Sox2 kök hücre sayısı anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla $p=0,02$ ve $p=0,04$).

Yaşlı fare hipofizleri genç olan fare hipofizleri ile genel olarak karşılaştırıldığında, 2 aylık genç fare hipofizlerine nazaran ortalama %25 oranında daha az Sox2 ifade eden erişkin kök hücreye sahip oldukları tespit edilmiştir.

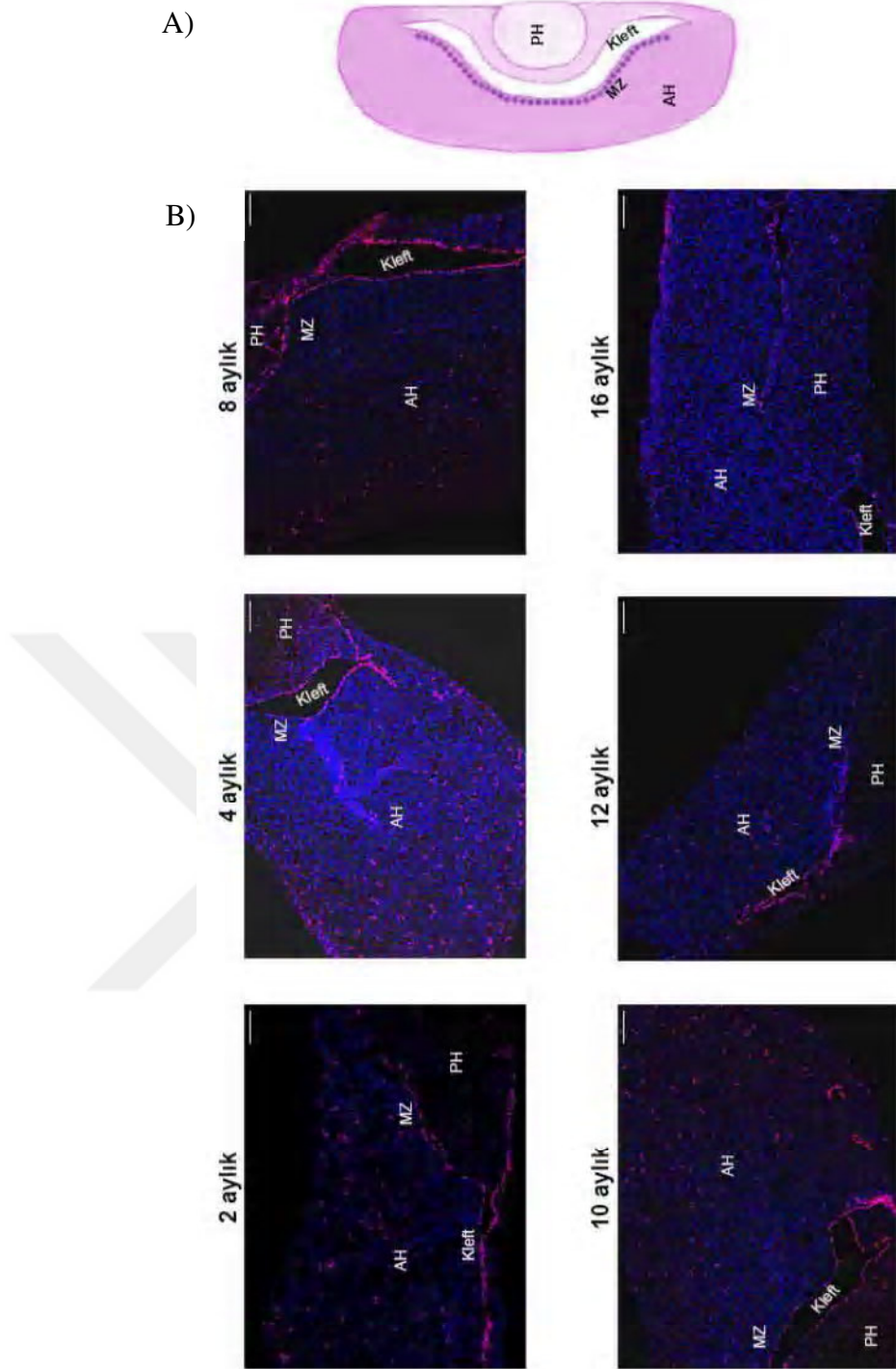
Genç, orta yaşlı ve yaşlı farelerin hipofizer kesitlerinin analizi ve morfolojik yapısı Şekil 4.5'te temsili olarak gösterilmektedir.

2 aylık ve 4 aylık farelerin anterior hipofizlerinin (AH) parenkim bölgelerinde çok sayıda Sox2 kök hücresi dikkat çekmektedir.

Şekil 4.5 A'da şematik olarak gösterilen hipofiz morfolojisi kılavuz olarak kullanıldığında, mikroskop görüntülerinde kök hücrelerin özellikle marijinal zon (MZ) ve kleft bölgelerinde yoğunlaştığı görülmektedir.

Temsili mikroskop görüntülerinde AH bölgesine yoğunlaştığında (Şekil 4.5 B), yaşlanma ile beraber gradyen olarak özellikle bu bölgedeki Sox2 kök hücrelerinin giderek azaldığı gözlemlenmektedir.





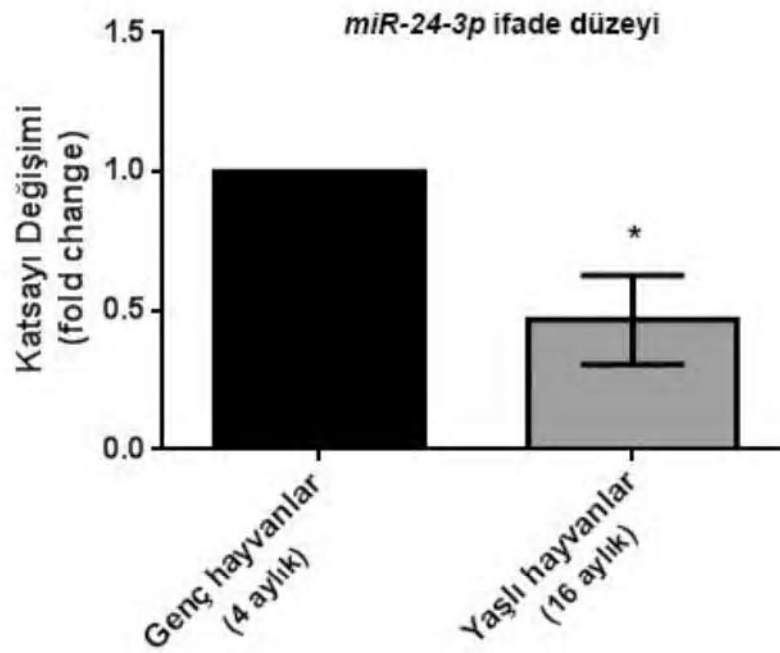
Şekil 4.5: Genç ve yaşlı hayvanlarda hipofizer yetişkin kök hücrelerin temsili görüntüleri.

A) Mikroskop görüntülerinin anlaşılması için kılavuz olarak kullanılması amacıyla hipofizin şematik olarak gösterimi B) Hipofizer kriyokesitler Sox2 kök hücre biomarkeri için boyanmıştır. Sox2 sinyali çekirdekte lokalize ve sekonder antikor olarak Cy3 konjugatı kullanıldığı için kırmızı renktedir. Çekirdekler DAPI ile boyanmış ve mavi ile gösterilmektedir. İki sinyalin birlikte lokalize olduğu hücrelerin çekirdekleri

pembe görünmektedir. Ölçü belirteci (scale bar) 75 μm göstermektedir. (AH: Anterior Hipofiz, PH: Posterior Hipofiz, MZ: Marijinal Zon).

4.2 Anterior hipofiz dokularında *miR-24-3p*'nin ifade düzeyi yaşlanma ile azalmaktadır

Kök hücre biyolojisinde rolü olan miRNA moleküllerinden biri olan *miR-24-3p*'nin genç ve yaşlı fare hipofizlerindeki ifade düzeyleri sorgulanmıştır.



Şekil 4.6: Anterior hipofiz dokularında *miR-24-3p*'nin ifade düzeyi.

Genç farelerde (n=3) ve yaşlı farelerde (n=3) *miR-24-3p* ifade düzeyi relatif olarak RT-qPCR ile ölçülmüştür. Genç anterior hipofiz örnekleri için 4 aylık fareler kullanılırken, yaşlı anterior hipofiz örnekleri için 16 aylık fareler kullanılmıştır. Normalizasyon SNORD96A ve RNU6-2 genleri ile yapılmıştır. Her biri üç farklı bağımsız örnekten elde edilen veriler ortalama \pm sem olarak grafikte gösterilmektedir. (Student's t-test, $p=0,03$).

miR-24-3p ifade düzeyleri hipofizin tüm dokusunda değil, yalnızca anterior bölgesinden elde edilen RNA örnekleri kullanılarak incelenmiştir. Genç ve yaşlı anterior hipofiz dokusu RT-qPCR ile *miR-24-3p*'nin relatif ifade düzeyi için analiz edildiğinde, genç

anterior hipofizlere nazaran yaşı anterior hipofizlerin %50 oranında daha az miktarda *miR-24-3p* ifade ettiği bulunmuştur (Şekil 4.6).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada hipofizer kök hücreler fare modelinde incelenmiş ve kök hücre sayısındaki azalma doku düzeyinde gösterilmiştir. Hipofiz hücre yenilenme hızı düşük olan bir organdır ve bazal mitotik hızın 10 hafta kadar olduğu tahmin edilmektedir [39, 40]. Çeşitli çevresel ve fizyolojik faktörlerin hipofizer dokuda hücre popülasyonunda değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir. Strese maruz kalındığında kortikotrop hücre sayısı, hamilelikte laktotrop hücre sayısı, adrenolektomi sonrası gonadotrop hücre sayısı artmaktadır.

Hipofizer yetişkin kök hücrelerin, hipofizin gelişimi, rejenerasyonu ve organ homeostasisini sağlamakta rol oynadığı yakın zamanda gösterilmiştir [9, 41].

Yetişkin hipofiz hücrelerinin ön hipofizindeki hücre sayısının yüzde 3-5 arasında olduğuna dair bulgulara ek olarak, bizim ve diğer ekiplerin çalışmalarında yüzde 5-8 arasında değişen sonuçlar elde edilmiştir [41-43]. Ön hipofiz hücreleri çeşitli hücre tiplerini içermektedir. Bunlar arasında klasik olarak bilinen hormonal hücrelere ek olarak, erişkin kök hücreler, kök hücre özelliği gösteren side population tekniği ile diğer hücrelerden ayrıştırılabilen hücre popülasyonu ve follüküler stellat hücreleri bulunmaktadır. Sox2 hücrelerinin yetişkin fare hipofizindeki sayısı yaklaşık 50.000 hücre kadardır [10].

Sox2 hücre sayısı 3 aylık yetişkin farelerde ön hipofiz hücrelerinin yüzde %10'unu oluşturmaktadır [44]. Bu kök hücre grubunun farelerin gelişim aşamasında, doğumdan hemen sonra ve yetişkinlikte, kök hücre oranlarının gelişim süresince giderek azaldığı, %25'ten %10'lara düştüğü bilinmektedir.

Başka bir çalışmada, 8-12 haftalık farelerde hipofizer harabiyet sonucu rejeneratif kapasite gözlemlenirken, yaşlı farelerde, 8 aylık farelerde bu rejeneratif kapasite kaybedilmektedir [10]. 2 aylık fareler ile karşılaştırıldığında, 8 aylık farelerin rejeneratif

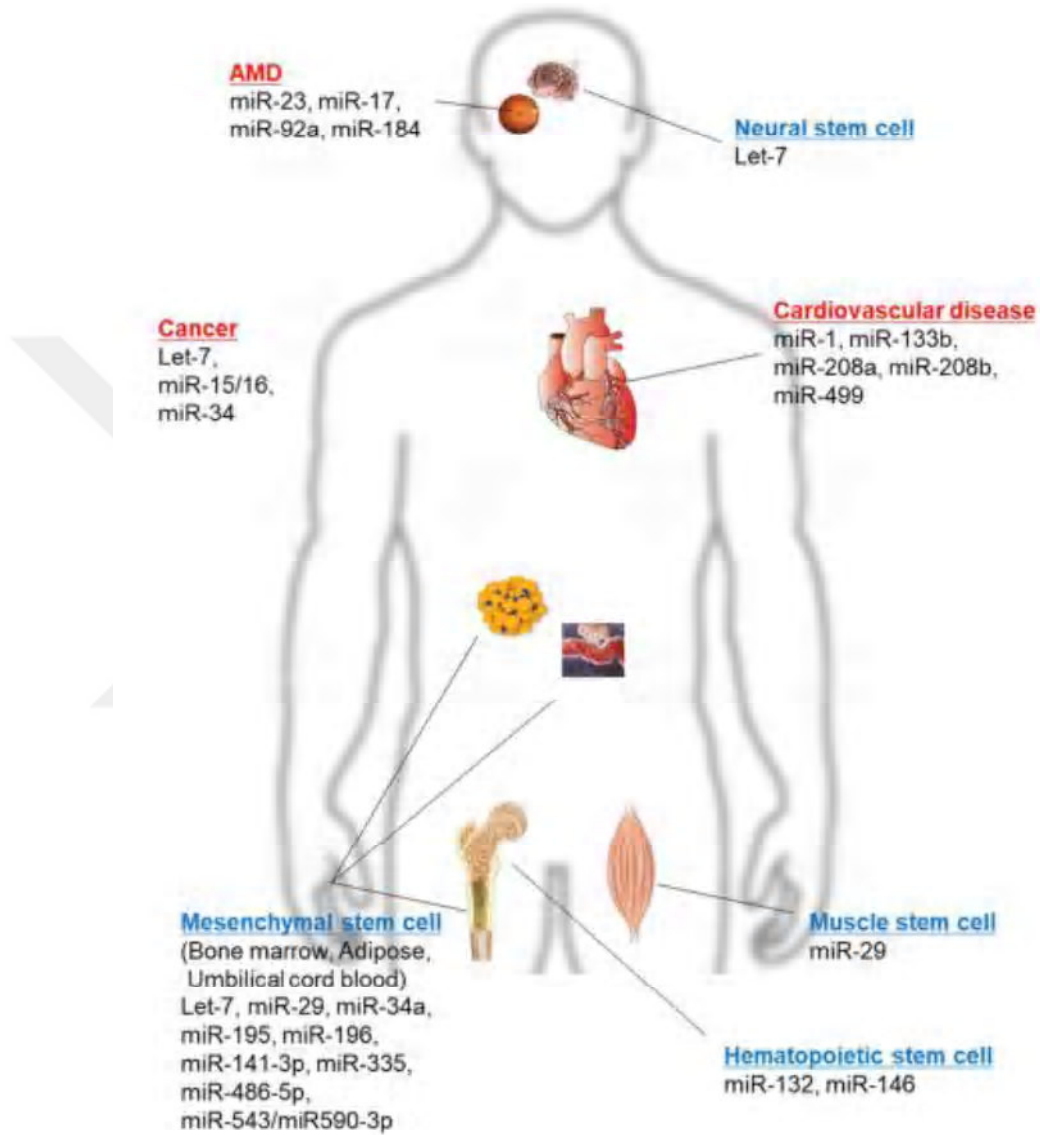
kapasitesinde %50 oranında düşüş gözlemlenmektedir. Yaşlı hayvanların Sox2 ifade eden kök hücrelerinin kök hücre karakteristiklerinin de azaldığı görülmektedir. Kök hücre sayısındaki azalma, 8 aylık fare hipofizlerinin rejeneratif kapasitesini etkilediğine işaret etmektedir. Burada hipofizer harabiyetin sebebi de önem arz etmektedir. Bahsi geçen bulgular transgenik fareler üzerinde somatotropların hedefli olarak yüzde 80 oranlarına kadar ortadan kaldırılmasıyla gerçekleşmektedir. Ancak bu oranlar harabiyetin şiddet ve sebebine göre değişiklik gösterebilir. Başka sebeplerle, travmatik beyin hasarı gibi, hipofizer harabiyet olduğunda rejeneratif kapasite değişiklik gösterebilir.

Bu tez çalışmasında tespit edilen 2 aylık ve 8 aylık fare hipofizinde %25 oranında meydana gelen erişkin kök hücre sayısındaki azalma, yukarıda bahsi geçen çalışmada 8 aylık fare hipofizinin rejeneratif kapasitesinin yarı yarıya azalması birbirini doğrulayan niteliktedir.

Kök hücre ve yaşlanmaya dair çalışmaların temeli, kök hücrelerin nasıl doku sağlığını sürdürebildiğini anlamak üzerinedir. Yetişkin dokulardaki kök hücreler dokuların idame ettirilmesi ve rejenerasyonu doğrultusunda oldukça önemli rollere sahiptir. Doku homeostazisinin üreme evresi sonrası yaşamda kaybedilmesi kök hücre fonksiyonlarının azalması ile ilişkilendirilmektedir. Yaşlanmanın temel göstergeleri moleküler hasarın kümülatif olarak artması, metabolik farklılıklar ve epigenome stabilitesi ile ilgili değişiklikler sayılabilir. Erişkin kök hücreler yaşam boyunca kendilerini idame ettirirken, bu hücrelerde hücresel hasar birikmekte ve bu da hücresel senesansa ve sonuçta da ölüme yol açmaktadır. Dolayısıyla erişkin kök hücreler buldukları dokuların bakımını sağlarken, yaşam boyunca akümüle olan hasar ve bunun etkileriyle kök hücre kapasiteleri azalmakta ve böylece dokuların rejeneratif fonksiyonları da azalmaktadır.

Bu çalışmada genç hayvanlardan alınan hipofiz örnekleri orta yaş ve yaşlı fare hipofizleri ile karşılaştırılmış ve kök hücre sayısında anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak 2 aylık ve 8, 12, 16 aylık hayvanlar arasında gözlemlenen anlamlı fark, 10 aylık hayvanlar incelendiğinde tespit edilmemiştir. İstatistiksel analiz kriterlerinin sıkı tutulduğu yani One-way ANOVA sonrası post-test olarak Tukey seçilmesi ile elde edilen bu sonuçlarda; post-test yapılmadan analiz yapıldığında 10 aylık farelerde de anlamlı farklılık gözlemlenmektedir. Bu tür durumlarda, istatistiksel kriterleri

esnetmektense, örnek sayısını artırmak daha doğru bir tercih olacağından, ileriki çalışmalarda 10 aylık zaman dilimi için boyamalar ve sayımlar yeni kriyokesitler ile tekrar edilerek analiz yapılması gerekmektedir.



Şekil 5.1 İnsan erişkin kök hücrelerinin ve yaşlanmaya bağlı hastalıklar ve miRNA'larla ilişkisi. Adapte edilmiştir [45]. AMD: Age-related macular degeneration

miR-24-3p farklı hücre tiplerinde farklı fonksiyon gösterebilmektedir. *miR-24-3p*'nin hem tümör supresör hem de onkogen olarak rol oynadığı çalışmalar mevcuttur. Meme kanseri, prostat kanserleri ve küçük hücreli akciğer kanserlerinde *miR-24-3p* hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu baskımlarken, glioma hücrelerinde ise indüklemektedir [46-48]. *miR-24-3p*'nin ifade seviyesi metastatik kanserlerde

azalmaktadır, *miR-24-3p*'nin seviyesi ne kadar düşükse kanser hastalarının hayatta kalma oranları da o kadar düştüğü gözlemlenmiştir [47].

Tümör supresör p16'nın ifadesi yaşlanma ve replikatif senesens sırasında arttığı ve insan diploid fibroblast hücrelerinde *miR-24-3p*'nin p16 ifadesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir [49, 50]. Hücre senesans yaşlanma ile direkt ilişkilidir. Fare modelinde p16'da meydana gelen fonksiyon kaybının, yaşlanmaya bağlı olarak gözlemlenen doku fonksiyonunun ve hücre proliferasyonundaki azalmanın önüne geçtiği görülmüştür.

miR-24-3p'nin kök hücre fonksiyonunu düzenlemesinde de farklı fonksiyon gösterebilmektedir. *miR-24-3p* bazı kök hücre tiplerinde bu hücrelerin farklılaşmasını engelleyen ve kök hücre olarak kalmasını sağlayacak şekilde fonksiyonunu gerçekleştirirken, bazı kök hücre tiplerinde ise bu hücrelerin farklılaşmasını sağlayacak şekilde görev yapmaktadır. Örneğin, *miR-24-3p*, hücre döngüsünün kontrolünde ve eritroid hücre farklılaşmasında, mezenkimal kök hücrelerden human periodontal ligament kök hücrelerinin farklılaşmasını baskılayıcı etki gösterirken, fare embriyonik kök hücrelerinde ise anti-stemness markeri olarak fonksiyon gerçekleştirdiği tespit edilmiştir [51].

Fare embriyonik kök hücrelerinin stemness yani kök hücre özelliklerinin sürdürülebilirliğini sağlayan önemli faktörlerden birisi PRMT7 adlı arjinin metil transferaz enzimidir. Transkripsiyonel ko-represör olan bu molekülün fonksiyonu azaltıldığında, *miR-24-3p*'nin ifadesinin arttığı ve EKH'lerin farklılaşmasının indüklendiği, pluripotensi faktörlerinden *Oct4*, *Nanog*, *Klf4*, ve *c-Myc* mRNA'larının 3'UTR bölgelerini hedef olarak direkt olarak bu faktörlerin ifadesini inhibe ettiği belirlenmiştir [52].

Birçok pluripotent faktörün onkojenik olaylarla ilişkili olduğu görülmektedir, c-Myc onkoprotein özelliği pluripotent markeri olduğundan çok daha önceleri biliniyordu. PRMT7 de hem bir pluripotent faktör iken aynı zamanda onkojenik özelliğe de sahiptir [53].

miR-24-3p'nin inhibe edilmesi ile fare embriyonik kök hücrelerin kendi kendilerini yenilemesi ve pluripotent kapasitelerini etkilememekle birlikte, EKH'lerin farklılaşmasını indüklemektedir. EKH'ler farklılaşırken, *miR-24-3p*'nin inhibe edildiği

durumda apoptoza uğrayan hücre sayısında artış olmaktadır [54]. EKH'lerde *miR-24-3p*'nin yüksek seviyelerde ifade olduğu ve bu hücrelerin farklılaşma sırasında apoptoza uğramasını engellediği gözlemlenmiştir.

miR-24-3p'nin yaşlanma ile ilişkisine dair bulgular mevcuttur. İmmun hücrelerden T hücrelerinin yaşlanmasıyla birlikte *miR-24-3p*'nin miktarının bu hücrelerde arttığı tespit edilmiştir [55]. Benzer artış, yaşlı bireylerin tükürüklerinde izole edilen eksozomlardan derive olan miRNA ifade düzeyleri genç bireylerle karşılaştırılmış ve yaşlı bireylerde *miR-24-3p*'nin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir [56].

Hücre düzeyinde yapılan çalışmaların aksine, yaşlı ve genç insanların serumları miRNA ifade profil farklılığı için karşılaştırıldığında, yaşlı bireylerde serum kaynaklı *miR-24-3p*'nin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir [57].

Tablo 5.1 *miR-24-3p*'nin kök hücre ve yaşlanma ile ilişkili hedef genleri

<i>miR-24-3p</i> Hedef Geni	Görevi	<i>miR-24-3p</i> Artarsa Ne Olur?
<i>p16</i>	Tümör supresör	Yaşa bağlı hücre proliferasyonu azalmasının ve doku fonksiyon bozukluğunun önüne geçilir (Fare modeli) [58]
<i>p53</i>	Tümör supresör	Kanser hücrelerinin invazyonu artar [59]
<i>H2AX</i>	DNA tamiri	Hücreler DNA hasarına meyilli olur [60]
<i>PRMT7</i>	Histone metil tranferaz	EKH'ler farklılaşır [52]
<i>Oct4</i>	Pluripotensi markeri (transkripsiyon faktörü)	EKH'ler farklılaşır [52]
<i>Nanog</i>	Pluripotensi markeri (transkripsiyon faktörü)	EKH'ler farklılaşır [52]
<i>c-Myc</i>	Pluripotensi markeri (transkripsiyon faktörü)	EKH'ler farklılaşır [52]
<i>Klf4</i>	Pluripotensi markeri (transkripsiyon faktörü)	EKH'ler farklılaşır [52]

Bu tez çalışmasında, *miR-24-3p*'nin yaşlanmış anterior hipofiz dokusunda anlamlı olarak azalmış olması ve bu molekülün yaşlanmayla ve kök hücrelerin düzenlenmesi ile ilgili fonksiyonları göz önüne alındığında, hipofizer yaşlanmada rolü olabileceğine işaret etmektedir. Ancak gen ifade düzeyinin belirlenmesi, *miR-24-3p*'nin hipofizer yaşlanmayı etkileyebilecek fonksiyonları kök hücreler üzerinden mi kontrol edip etmediği bu tez çalışması kapsamında kullanılan yöntemlerle belirlenememiştir ve dolayısıyla çalışmanın limitlerinden biridir. *miR-24-3p*'nin single molekül floresan in situ hibridizasyon (smFISH) tekniği ile Sox2 hücrelerine lokalize olup olmadığı ve genç ve yaşlı bireylerdeki ifade miktarı ileriki çalışmalar ile belirlendiği takdirde, *miR-24-3p*'nin hipofizer yaşlanmayı nasıl düzenlediğine dair mekanistik açıklamaya bir adım daha yaklaşmış olacaktır. *miR-24-3p* sadece kök hücrelerde değil, hormon salgılayan hücrelerde de yaşlanmayı düzenleyici etki gösteriyor olabilir. Sox2 kök hücrelerine ek olarak, hormonal hücrelerin düzenlenmesine olan etkisi ileriki çalışmalarla ortaya çıkarılacaktır.

Yaşlanma ile birlikte kök hücre fonksiyonunda meydana gelen düşüşün mekanizmasını anlamak, erişkin kök hücrelerin rejeneratif kapasitelerinin nasıl tetiklenebileceğini ve sağlıklı bir yaşlanmanın nasıl sağlanabileceğine ışık tutacaktır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Everitt, A. V., Wyndham, J. R., and Barnard, D. L., 1983, "The anti-aging action of hypophysectomy in hypothalamic obese rats: effects on collagen aging, age-associated proteinuria development and renal histopathology," *Mechanisms of ageing and development*, 22(3-4), pp. 233-251.
- [2] Powers, R. W., 3rd, Harrison, D. E., and Flurkey, K., 2006, "Pituitary removal in adult mice increases life span," *Mechanisms of ageing and development*, 127(8), pp. 658-659.
- [3] Goodell, M. A., and Rando, T. A., 2015, "Stem cells and healthy aging," *Science (New York, N.Y.)*, 350(6265), pp. 1199-1204.
- [4] Nishikawa, S., Jakt, L. M., and Era, T., 2007, "Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology," *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(6), pp. 502-507.
- [5] Moon, S. Y., Park, Y. B., Kim, D. S., Oh, S. K., and Kim, D. W., 2006, "Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications," *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 13(1), pp. 5-14.
- [6] Bieback, K., Kern, S., Kluter, H., and Eichler, H., 2004, "Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood," *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(4), pp. 625-634.
- [7] Schwab, K. E., Chan, R. W., and Gargett, C. E., 2005, "Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle," *Fertility and sterility*, 84 Suppl 2, pp. 1124-1130.

- [8] Montagnani, S., Rueger, M. A., Hosoda, T., and Nurzynska, D., 2016, "Adult Stem Cells in Tissue Maintenance and Regeneration," *Stem cells international*, 2016, p. 7362879.
- [9] Fu, Q., Gremeaux, L., Luque, R. M., Liekens, D., Chen, J., Buch, T., Waisman, A., Kineman, R., and Vankelecom, H., 2012, "The adult pituitary shows stem/progenitor cell activation in response to injury and is capable of regeneration," *Endocrinology*, 153(7), pp. 3224-3235.
- [10] Willems, C., Fu, Q., Roose, H., Mertens, F., Cox, B., Chen, J., and Vankelecom, H., 2016, "Regeneration in the Pituitary After Cell-Ablation Injury: Time-Related Aspects and Molecular Analysis," *Endocrinology*, 157(2), pp. 705-721.
- [11] Till, J. E., and Mc, C. E., 1961, "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells," *Radiation research*, 14, pp. 213-222.
- [12] Fridenshtein A Ia, D. I., Kulagina NN., 1973 "Cloning of cell-precursors of fibroblasts in monolayer cell cultures," *Biull Eksp Biol Med.* , Oct;75(10):90-4.
- [13] Reynolds, B. A., and Weiss, S., 1992, "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system," *Science (New York, N.Y.)*, 255(5052), pp. 1707-1710.
- [14] Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H., 1997, "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells," *Nature*, 385(6619), pp. 810-813.
- [15] Takahashi, K., and Yamanaka, S., 2006, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors," *Cell*, 126(4), pp. 663-676.
- [16] McGuckin, C., Forraz, N., Baradez, M. O., Basford, C., Dickinson, A. M., Navran, S., and Hartgerink, J. D., 2006, "Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling," *Acta neurobiologiae experimentalis*, 66(4), pp. 321-329.
- [17] Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S., 2008, "Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells," *Science (New York, N.Y.)*, 321(5889), pp. 699-702.
- [18] Choi, K. H., Choi, B. H., Park, S. R., Kim, B. J., and Min, B. H., 2010, "The chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells on an extracellular matrix

- scaffold derived from porcine chondrocytes," *Biomaterials*, 31(20), pp. 5355-5365.
- [19] Suga, H., Kadoshima, T., Minaguchi, M., Ohgushi, M., Soen, M., Nakano, T., Takata, N., Wataya, T., Muguruma, K., Miyoshi, H., Yonemura, S., Oiso, Y., and Sasai, Y., 2011, "Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture," *Nature*, 480(7375), pp. 57-62.
- [20] K.D. Fauci AS, B. E., Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J., *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Companies.
- [21] Szarek, E., Cheah, P. S., Schwartz, J., and Thomas, P., 2010, "Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus," *Molecular and cellular endocrinology*, 323(1), pp. 115-123.
- [22] Chen, J., Hersmus, N., Van Duppen, V., Caesens, P., Deneff, C., and Vankelecom, H., 2005, "The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics," *Endocrinology*, 146(9), pp. 3985-3998.
- [23] Vankelecom, H., 2012, "Pituitary Stem Cells Drop Their Mask," *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), pp. 36-71.
- [24] Vankelecom, H., and Gremeaux, L., 2010, "Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field," *General and Comparative Endocrinology*, 166(3), pp. 478-488.
- [25] Barker, N., Bartfeld, S., and Clevers, H., 2010, "Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs," *Cell stem cell*, 7(6), pp. 656-670.
- [26] Vankelecom, H., 2012, "Pituitary stem cells drop their mask," *Current stem cell research & therapy*, 7(1), pp. 36-71.
- [27] Fauci AS, K. D., Braunwald E., Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Companies.
- [28] Cannon, M. L., 2015, "What is aging?," *Disease-a-month : DM*, 61(11), pp. 454-459.
- [29] Kirkwood, T. B., 2005, "Understanding the odd science of aging," *Cell*, 120(4), pp. 437-447.
- [30] Gurland, B. J., Page, W. F., and Plassman, B. L., 2004, "A twin study of the genetic contribution to age-related functional impairment," *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 59(8), pp. 859-863.

- [31] Lipsky, M. S., and King, M., 2015, "Biological theories of aging," *Disease-a-month : DM*, 61(11), pp. 460-466.
- [32] Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R., 1993, "A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type," *Nature*, 366(6454), pp. 461-464.
- [33] Boehm, M., and Slack, F., 2005, "A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*," *Science (New York, N.Y.)*, 310(5756), pp. 1954-1957.
- [34] Fu, Q., and Vankelecom, H., 2012, "Regenerative capacity of the adult pituitary: multiple mechanisms of lactotrope restoration after transgenic ablation," *Stem cells and development*, 21(18), pp. 3245-3257.
- [35] Alberti, C., and Cochella, L., 2017, "A framework for understanding the roles of miRNAs in animal development," *Development (Cambridge, England)*, 144(14), pp. 2548-2559.
- [36] Farazi, T. A., Hoell, J. I., Morozov, P., and Tuschl, T., 2013, "MicroRNAs in human cancer," *Advances in experimental medicine and biology*, 774, pp. 1-20.
- [37] Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H. K., Beyer, T. A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A., and Wrana, J. L., 2010, "Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming," *Cell stem cell*, 7(1), pp. 64-77.
- [38] Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. A., and Kosik, K. S., 2009, "MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells," *Cell*, 137(4), pp. 647-658.
- [39] Levy, A., 2008, "Stem cells, hormones and pituitary adenomas," *Journal of neuroendocrinology*, 20(1), pp. 139-140.
- [40] Nolan, L. A., Kavanagh, E., Lightman, S. L., and Levy, A., 1998, "Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment," *Journal of neuroendocrinology*, 10(3), pp. 207-215.
- [41] Andoniadou, C. L., Matsushima, D., Mousavy Gharavy, S. N., Signore, M., Mackintosh, A. I., Schaeffer, M., Gaston-Massuet, C., Mollard, P., Jacques, T. S., Le Tissier, P., Dattani, M. T., Pevny, L. H., and Martinez-Barbera, J. P., 2013, "Sox2(+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ

- homeostasis and have tumor-inducing potential," *Cell stem cell*, 13(4), pp. 433-445.
- [42] Fauquier, T., Rizzoti, K., Dattani, M., Lovell-Badge, R., and Robinson, I. C., 2008, "SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp. 2907-2912.
- [43] Roose, H., Cox, B., Boretto, M., Gysemans, C., Vennekens, A., and Vankelecom, H., 2017, "Major depletion of SOX2(+) stem cells in the adult pituitary is not restored which does not affect hormonal cell homeostasis and remodelling," *Scientific reports*, 7(1), p. 16940.
- [44] Gremeaux, L., Fu, Q., Chen, J., and Vankelecom, H., 2012, "Activated phenotype of the pituitary stem/progenitor cell compartment during the early-postnatal maturation phase of the gland," *Stem cells and development*, 21(5), pp. 801-813.
- [45] Choi, S. W., Lee, J. Y., and Kang, K. S., 2017, "miRNAs in stem cell aging and age-related disease," *Mechanisms of ageing and development*, 168, pp. 20-29.
- [46] Lynch, S. M., McKenna, M. M., Walsh, C. P., and McKenna, D. J., 2016, "miR-24 regulates CDKN1B/p27 expression in prostate cancer," *The Prostate*, 76(7), pp. 637-648.
- [47] Kang, H., Rho, J. G., Kim, C., Tak, H., Lee, H., Ji, E., Ahn, S., Shin, A. R., Cho, H. I., Huh, Y. H., Song, W. K., Kim, W., and Lee, E. K., 2017, "The miR-24-3p/p130Cas: a novel axis regulating the migration and invasion of cancer cells," *Scientific reports*, 7, p. 44847.
- [48] Pan, B., Chen, Y., Song, H., Xu, Y., Wang, R., and Chen, L., 2015, "Mir-24-3p downregulation contributes to VP16-DDP resistance in small-cell lung cancer by targeting ATG4A," *Oncotarget*, 6(1), pp. 317-331.
- [49] Lal, A., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann, R., Jr., Srikantan, S., Subrahmanyam, R., Martindale, J. L., Yang, X., Ahmed, F., Navarro, F., Dykxhoorn, D., Lieberman, J., and Gorospe, M., 2008, "p16(INK4a) translation suppressed by miR-24," *PloS one*, 3(3), p. e1864.
- [50] Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F., and Sherr, C. J., 1997, "Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging," *Oncogene*, 15(2), pp. 203-211.

- [51] Li, Z., Sun, Y., Cao, S., Zhang, J., and Wei, J., 2019, "Downregulation of miR-24-3p promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells by targeting SMAD family member 5," *Journal of cellular physiology*, 234(5), pp. 7411-7419.
- [52] Lee, S. H., Chen, T. Y., Dhar, S. S., Gu, B., Chen, K., Kim, Y. Z., Li, W., and Lee, M. G., 2016, "A feedback loop comprising PRMT7 and miR-24-2 interplays with Oct4, Nanog, Klf4 and c-Myc to regulate stemness," *Nucleic acids research*, 44(22), pp. 10603-10618.
- [53] Yao, R., Jiang, H., Ma, Y., Wang, L., Wang, L., Du, J., Hou, P., Gao, Y., Zhao, L., Wang, G., Zhang, Y., Liu, D. X., Huang, B., and Lu, J., 2014, "PRMT7 induces epithelial-to-mesenchymal transition and promotes metastasis in breast cancer," *Cancer research*, 74(19), pp. 5656-5667.
- [54] Musto, A., Navarra, A., Vocca, A., Gargiulo, A., Minopoli, G., Romano, S., Romano, M. F., Russo, T., and Parisi, S., 2015, "miR-23a, miR-24 and miR-27a protect differentiating ESCs from BMP4-induced apoptosis," *Cell death and differentiation*, 22(6), pp. 1047-1057.
- [55] Teteloshvili, N., Dekkema, G., Boots, A. M., Heeringa, P., Jellema, P., de Jong, D., Terpstra, M., Brouwer, E., Pawelec, G., Kok, K., van den Berg, A., Kluiver, J., and Kroesen, B. J., 2018, "Involvement of MicroRNAs in the Aging-Related Decline of CD28 Expression by Human T Cells," *Frontiers in immunology*, 9, p. 1400.
- [56] Machida, T., Tomofuji, T., Ekuni, D., Maruyama, T., Yoneda, T., Kawabata, Y., Mizuno, H., Miyai, H., Kunitomo, M., and Morita, M., 2015, "MicroRNAs in Salivary Exosome as Potential Biomarkers of Aging," *International journal of molecular sciences*, 16(9), pp. 21294-21309.
- [57] Noren Hooten, N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A. B., and Evans, M. K., 2010, "microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age," *PloS one*, 5(5), p. e10724.
- [58] Kim, W. Y., and Sharpless, N. E., 2006, "The regulation of INK4/ARF in cancer and aging," *Cell*, 127(2), pp. 265-275.
- [59] Chen, L., Luo, L., Chen, W., Xu, H. X., Chen, F., Chen, L. Z., Zeng, W. T., Chen, J. S., and Huang, X. H., 2016, "MicroRNA-24 increases hepatocellular carcinoma

cell metastasis and invasion by targeting p53: miR-24 targeted p53," *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 84, pp. 1113-1118.

- [60] Lal, A., Pan, Y., Navarro, F., Dykxhoorn, D. M., Moreau, L., Meire, E., Bentwich, Z., Lieberman, J., and Chowdhury, D., 2009, "miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells," *Nature structural & molecular biology*, 16(5), pp. 492-498.





T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 13.12.2017

Toplantı Sayısı: 12

Karar No:17/127

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 13.12.2017 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	KATILMADI
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	KATILMADI
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nden Yrd. Doç. Dr. Duygu YÜCEL tarafından sunulan "Yaşlanmaya Bağlı Değişikliklerin Hipofiz Dokusunda Rejenerasyon ve miRNA ifade Düzeyleri Bakımından Araştırılması" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 13.12.2017
Etik kurul Başkanı : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA
İmza :

Yaşlanmaya bağlı değişikliklerin hipofiz dokusunda rejenerasyon ve miRNA ifade düzeyleri bakımından araştırılması

ORJINALLIK RAPORU

% 5	% 2	% 1	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
2	dosya.bdutae.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Türkiye ve Orta Doğu Amme İdaresi Enstit Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to Vrije Universiteit Brussel Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
6	hal-amu.archives-ouvertes.fr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Imperial College of Science, Technology and Medicine Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Emre KAYA

Uyruğu: Türkiye (T.C.)

Doğum Tarihi ve Yeri: 15 Ekim 1990, Kayseri

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 536 661 56 70

email: emrefzt@gmail.com

Yazışma Adresi: Kocatepe Mahallesi Dağönü Sokak Beyza Apt. 25/31

Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Ahi Evran Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	2014
Lise	Melikgazi Mustafa Eminoğlu Anadolu Lisesi	2009

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2014-2015	Aksaray Özel Hacettepe Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Merkezi	Fizyoterapist
2015-Halen	Kayseri Özel Yaşam Pınarı Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Merkezi	Fizyoterapist

YABANCI DİL

İngilizce