

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM ve KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**N - ASETİL SİSTEİN (NAC) UYGULAMASININ MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE SENESENSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Miray BOLAT**

**Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2021
KAYSERİ**

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM ve KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**N - ASETİL SİSTEİN (NAC) UYGULAMASININ MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE SENESENSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan
Miray BOLAT

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından FYL-2020-10710 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

Aralık 2021
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde yazıldığını beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Miray BOLAT

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“N - Asetil Sistein (NAC) Uygulamasının Mezenkimal Kök Hücre Senesensi Üzerine Etkisinin İncelenmesi.” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Miray BOLAT

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Zuhel HAMURCU

Prof. Dr. Servet ÖZCAN danışmanlığında **Miray BOLAT** tarafından hazırlanan “**N - Asetil Sistein (NAC) Uygulamasının Mezenkimal Kök Hücre Senesensi Üzerine Etkisinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

... / ... / ...

JÜRİ

Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Üye: Doç. Dr. Serpil TAHERİ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Şerife AYAZ GÜNER

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, her türlü fedakarlığı ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Servet ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çok değerli hocalarım Prof. Dr. Coşkun TEZ'e ve Prof. Dr. Cem VURAL'a destekleri için teşekkür ederim. Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bilgi birikimi ve desteğiyle her zaman yanımda olan Dr. Mustafa Burak ACAR'a teşekkür ederim. Tezimin yapılmasında ilk günden beri katkıları olan, çalışmalarım süresince her türlü desteği veren değerli arkadaşlarım Biyolog Zeynep GÜNAYDIN, Moleküler Biyolog Ahmet ŞİMŞEK, Moleküler Biyolog Habibe BOZALAN ve Biyoteknolog Melis GÜZEL'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, ideallerimi gerçekleştirmem için bana her türlü desteği ve imkanı sağlayan babam Ferhat BOLAT'a, annem Ayfer BOLAT'a, canım kardeşlerime ve bu yolda daima yanımda olduğunu hissettiren nişanlım Atakan ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Miray BOLAT

Aralık 2021, KAYSERİ

N - ASETİL SİSTEİN (NAC) UYGULAMASININ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SENESENSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Miray BOLAT

Erciyes Üniversitesi, Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2021

Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ÖZET

Mezenkimal kök hücreler (MKH), çeşitli dokulardan elde edilen ve çok sayıda hücre hattına farklılaşma kapasitesine sahip multipotent progenitör hücrelerdir. Bu hücreler, uygun koşullarda *in vitro* ortamda rahatlıkla çoğaltılabilirler. Adipoz doku, MKH izolasyonu için iyi bir kaynaktır. Hücre bölünmesine bağlı olarak, hücrede zamanla telomer fonksiyonlarının bozulması, oksidatif stres ve DNA hasarı oluşmasıyla hücreler senesens sürecine girer. Hücre senesens, hücrelerin metabolik olarak aktif olduğu fakat bölünmenin kalıcı olarak durduğu bir süreçtir. N - Asetil Sistein (NAC), çeşitli mekanizmalar yoluyla hücre senesensine karşı etki gösteren glutatyon öncüsü bir antioksidandır ve doğrudan veya dolaylı olarak serbest radikallerin, özellikle oksijen radikallerinin temizleyicisi olarak görev yapar. Bu çalışmada, *BALB/c* ırkı yaşlı farelere kısa süreli NAC uygulanmıştır. Farelerden alınan adipoz dokulardan MKH izolasyonu yapılmıştır. Senesens, apoptoz, hücre döngüsü ve proliferasyon testleri yapılarak, NAC'ın senesent MKH'ler üzerindeki biyolojik etkisi incelenmiştir. Hücre bölünmesi, senesens ve apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon analizi RT - PCR ile yapılmıştır. Senesens, proliferasyon ve hücre döngüsü testi sonuçlarına göre, kontrol ve NAC grubu arasında anlamlı farklar bulunmuştur. NAC uygulanan MKH'lerde, senesent hücre ve polinükleer hücre sayısı artmıştır. Ayrıca NAC grubu hücrelerde proliferasyonun azaldığı gözlemlenmiştir. RT - PCR sonuçlarına göre, NAC uygulanan MKH'lerde *P53*, *P21*, *Rb1*, *Atm*, *Bax*, *Bcl-2*, *Cdk6* ve *Siklin B* genlerinin ifadeleri artmıştır. Sonuç olarak, NAC'ın senesens indükleyici bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Mezenkimal Kök Hücre, N - Asetil Sistein, Senesens

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF N-ACETYL CYSTEINE APPLY ON MESENCHYMAL STEM CELL SENESENCE

Miray BOLAT

Erciyes University, Institute of Gevher Nesibe Genome and Stem Cell

Master Thesis, December 2021

Supervisor: Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells obtained from various tissues and have the capacity to differentiate into a large number of cell lines. These cells can be easily grown in vitro under suitable conditions. Adipose tissue is an essential source for MSC isolation. Depending on the cell division, the cells enter the senescence process with the deterioration of telomere functions, oxidative stress, and DNA damage over time. Cellular senescence is a process in which cells are metabolically active but division permanently stops. N - Acetyl Cysteine (NAC) is a glutathione precursor antioxidant that acts against cellular degeneration through various mechanisms. Acts directly or indirectly as a scavenger of free radicals, especially oxygen radicals. In this study, short-term NAC was applied to BALB/c aged mice. MSCs were isolated from adipose tissues in mice. The biological effect of NAC on senescent MSCs was investigated by performing senescence, apoptosis, cell cycle, and proliferation tests. Expression analysis of cell division, senescence, and apoptosis-related genes was performed by RT - PCR. According to the senescence, proliferation and cell cycle test results, significant differences were found between the control and NAC groups. The number of senescent cells and polynuclear cells increased in NAC applied MSCs. In addition, it was observed that proliferation decreased in NAC group cells. According to the RT - PCR results, the expression of *P53*, *P21*, *Rb1*, *Atm*, *Bax*, *Bcl-2*, *Cdk6* and *Cyclin B* genes increased in NAC applied MSCs. As a result, it was observed that NAC has a senescence-inducing effect.

Keywords: Apoptosis, Mesenchymal Stem Cell, N - Acetyl Cysteine, Senescence

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI	3
2.1. Kök Hücre	3
2.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)	4
2.1.1.1. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Elde Edilen Dokular ..	5
2.1.1.2. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücre (ADOMKH).....	5
2.1.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Farklılaşma Potansiyeli	6
2.1.1.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Tıpta Kullanımı	8
2.2. Senesens	8
2.2.1. Embriyonik Senesens	9
2.2.2. Prematüre Hücrel (Akut) Senesens	9
2.2.3. Replikatif (Kronik) Senesens	9
2.2.4. Senesensin Moleküler Mekanizması	10
2.3. Apoptoz	12
2.3.1. Apoptoz Mekanizması.....	13
2.3.1.1. Ekstrinsik Yol	13
2.3.1.2. İnstrinsik Yol.....	14
2.4. N - Asetil Sistein (NAC)	15
2.4.1. N - Asetil Sistein (NAC) Mekanizması.....	15
2.4.2. Kimyasal Yapı ve Özellikleri	16

2.4.3. Klinikte Kullanımı.....	17
2.4.4. Yan Etkileri	17
2.5. Hücre Kültürü.....	17
2.5.1. Hücre Kültürü Kimyasalları	18
2.5.1.1. Mediumlar.....	18
2.5.1.1.1. Medium İçerisinde Bulunan Maddeler	19
2.5.1.1.1.1. Vitaminler	19
2.5.1.1.1.2. Tuzlar	19
2.5.1.1.1.3. Glukoz.....	19
2.5.1.1.1.4. Serum	19
2.5.1.1.2. Mediumların İçerisinde Bulunan Diğer Maddeler	19
2.5.1.1.2.1 Aminoasitler.....	19
2.5.1.1.2.2. Antibiyotikler	20
2.5.1.1.2.3. Hormonlar ve Büyüme Faktörleri.....	20
2.5.1.1.2.4. Tripsin	20
2.5.1.1.2.5. Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi (PBS).....	20
2.5.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar.....	20
2.6. Biyolojik Testler.....	21
2.6.1. Senesens İlişkili Beta-Galaktozidaz Aktivitesi Testi	21
2.6.2. Annexin V Apoptoz Testi.....	21
2.6.3. Hücre Döngüsü Testi.....	21
2.6.4. Ki67 Proliferasyon Testi.....	22
2.7. Moleküler Genetik Analizler.....	22
2.7.1. Hücre Döngüsü, Senesens ve Apoptoz ile İlişkili Genler	22
2.7.1.1. <i>Gapdh</i> Geni.....	22
2.7.1.2. <i>P53</i> Geni	22
2.7.1.3. <i>P21</i> Geni	23
2.7.1.4. <i>Rb1</i> Geni	23
2.7.1.5. <i>Atm</i> Geni	23
2.7.1.6. <i>Bax</i> Geni	24
2.7.1.7. <i>Bcl-2</i> Geni.....	24
2.7.1.8. <i>Cdk6</i> Geni	24

2.7.1.9. Siklin B Geni	24
2.7.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT - PCR).....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Deney Hayvanı Çalışmaları.....	27
3.1.1. Deney Hayvanı Gruplarının Oluşturulması ve Beslenmesi.....	27
3.2. Adipoz Dokudan Mezenkimal Kök Hücre Eldesi	27
3.2.1. Sakrifikasyon ve Adipoz Doku Eldesi	27
3.2.2. Besiyeri Hazırlanması	28
3.2.3. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücre Kültürü.....	28
3.2.4. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücrelerin (ADOMKH) Karakterizasyonu.....	28
3.2.5. Kültürü Yapılan MKH'lerin Çoğaltılması ve Dondurulması	29
3.2.5.1. Hücrelerin Çoğaltılması.....	29
3.2.5.2. Hücrelerin Dondurulması	29
3.3. Biyolojik Testler.....	30
3.3.1. Senesens İlişkili Beta-Galaktozidaz Aktivite (Senesens) Testi.....	30
3.3.2. Annexin V Apoptoz Testi.....	30
3.3.3. Hücre Döngüsü Testi	31
3.3.4. Ki67 Proliferasyon Testi.....	31
3.4.Moleküler Genetik Analizler.....	32
3.4.1. RNA İzolasyonu	32
3.4.2. RNA'dan cDNA Sentezi	32
3.4.3. Real Time PCR (RT - PCR)	33
3.5. İstatiksel Analiz.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları ve Biyolojik Testler	36
4.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Karakterizasyon Bulguları.....	36
4.1.2. Senesens İlişkili Beta-Galaktozidaz Aktivite Testi Bulguları	37
4.1.3. Annexin V Apoptoz Testi Bulguları.....	38
4.1.4. Hücre Döngüsü Testi Bulguları.....	40
4.1.5. Ki67 Proliferasyon Testi Bulguları	42
4.2. Genetik Analiz Bulguları	44
4.2.1. RNA İzolasyon Bulguları	44

4.2.2. Hücre Döngüsü, Senesens ve Apoptoz ile İlişkili Genlerin RT - PCR Analizi Bulguları.....	45
5. TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER	47
5.1. Tartışma.....	47
6. KAYNAKLAR	52
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	



KISALTMALAR ve SİMGELER

ΔCt	: Delta Ct
7-ADD	: 7-Aminoactinomycin D
ADOMKH	: Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücre
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive edici Faktör-1
ARF	: ADP-Ribosylation Factor
ATM	: Ataxia Telangiectasia Mutated
BAX	: Bcl-2-associated X Protein
BCL-2	: B-cell lymphoma-2
b-FGF	: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
B-GP	: Beta-Gliserofosfat
BİD	: BH3 Interacting Domain Death Agonist
CAD	: Kaspaz Aktive Edici DNaz
CD90	: Cluster of Differentiation 90
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
DDR	: DNA Hasar Yanıtı
DEX	: Deksa-metazon
DISC	: Ölüm İndükleyici Sinyalleşme Kompleksi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSB	: Çift İplik Kopmaları
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	: Epithelial–Mesenchymal Transition
ENDO-G	: Endonükleaz G
FADD	: Fas Associated Death Domain

FBS	: Fetal Bovine Serum
GAPDH	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
GVHH	: Akut Graft Versus Host Hastalığı
IL-6	: İnterlökin-6
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MIP	: Makrofaj Enflamatuvar Protein
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
NAC	: N - Asetil Sistein
NF-Kb	: Nuclear Factor kappa B
OIS	: Onkogen Uyarılmış Senesens
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RB	: Retinoblastoma
RNA	: Ribonükleik asid
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT - PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SASP	: Senesens İlişkili Salgı Fenotipi
SMAC	: İkinci Mitokondri kaynaklı Kaspaz Aktivatörü
TGF-β	: Transforming growth factor-β
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
β-Gal	: Beta-galaktozidaz

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. cDNA izolasyon karışımı.....	33
Tablo 3.2. RT - PCR cihazı parametreleri.....	33
Tablo 3.3. RT - PCR karışımı.....	34
Tablo 3.4. RT - PCR Parametreleri	34
Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan hücre döngüsü, senesens ve apoptoz ilişkili genler.....	35
Tablo 4.1. Kontrol ve NAC grubundan elde edilen ADOMKH'lerin Senesens ilişkili β -Gal Testi sonuçları.....	37
Tablo 4.2. Annexin V Apoptoz Testi sonuçları.....	39
Tablo 4.3. Hücre Döngüsü Testi sonuçları.....	41
Tablo 4.4. Ki67 Proliferasyon Testi sonuçları.....	43
Tablo 4.5. Deney gruplarına ait RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri.....	45
Tablo 4.6. Çalışmada kullanılan genlere ait RT - PCR Analizi sonuçları.....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Kök hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli.	4
Şekil 2.2.	Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması sonucu oluşan kök hücreler.	7
Şekil 2.3.	Senesensin moleküler yolakları.	10
Şekil 2.4.	Memeli hücrelerde apoptoz iki ana yolla gerçekleşir.	13
Şekil 2.5.	NAC'ın mito-koruyucu mekanizmaları.	16
Şekil 4.1.	CD44 pozitif, CD34 ve CD45 negatif belirteçleri ile yapılan MKH'lerin karakterizasyon bulguları.	36
Şekil 4.2.	Kontrol ve NAC grubuna ait ADOMKH'lerin β -Gal boyama görüntüleri. .	37
Şekil 4.3.	Senesens ilişkili β -Gal Testi sonuçlarına göre Kontrol ve NAC grubu ADOMKH'lere ait senesent hücre oranları.	38
Şekil 4.4.	Annexin V Apoptoz Testi Bulgular.	39
Şekil 4.5.	Annexin V Apoptoz Testi sonuçlarına göre Kontrol ve NAC grubuna ait ADOMKH'lerin canlı ve total apoptotik hücre oranları.	40
Şekil 4.6.	Hücre Döngüsü Testi Bulguları.	41
Şekil 4.7.	Hücre Döngüsü Testi sonuçlarına göre, Kontrol ve NAC grubuna ait ADOMKH'lerin G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre oranları.	42
Şekil 4.8.	Ki67 Proliferasyon Testi sonuçları.	43
Şekil 4.9.	Ki67 Proliferasyon Testi sonuçlarına göre, Kontrol ve NAC grubuna ait ADOMKH'lerin Ki67(+) ve Ki67(-) hücre oranları.	44

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mezenkimal kök hücreler (MKH), adipositlere, kondrositlere ve osteoblastlara farklılaşma yeteneği olan ve CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerinin varlığı ile karakterize edilen multipotent progenitör hücrelerdir. Yüksek parakrin etki potansiyeline ve çok çeşitli farklılaşma yeteneğine sahip olması, immünomodülatör etkisi ve doku onarım yetenekleri nedeniyle rejeneratif tıpta sıkça tercih edilmektedir (Dominici ve ark., 2006; Kang ve ark., 2008). MKH'ler; kemik iliği, diş pulpası, plasenta, amniyotik sıvı ve umbilikal kord gibi birçok dokudan izole edilmektedir. Yaygın çalışılan ve erişimi kolay MKH kaynağı, kemik iliğidir. Buna ek olarak, adipoz dokudan da yüksek oranda MKH elde edilmektedir (Zuk ve ark., 2002). MKH'ler, uygun koşullar altında *in vitro* ortamda kültüre edildiklerinde rahatlıkla çoğaltılabilen hücrelerdir. Fakat bu hücrelerin çoğalma kapasitesi sınırlıdır. MKH'lerin proliferasyon kapasitelerini sınırlandıran etken, senesens mekanizmasıdır.

Canlılarda meydana gelen telomer kısalması, aşırı mitojenik sinyaller, telomerik olmayan DNA hasarı ve oksidatif stres gibi çeşitli olaylar, senesensi indükleyebilir (Campisi ve Di Fagagna, 2007). Hücresel senesens, hücre bölünmesini kalıcı olarak durduran ve hücre fonksiyonlarının kaybına neden olan fizyolojik bir süreçtir. Senesent hücreler, genellikle DNA replikasyonunu sağlıklı şekilde sürdüremediği için G1 evresinde hücre döngüsü ilerlemesini kesintiye uğramaktadır. Fakat bu hücreler, metabolik olarak aktif haldedir (Sherr ve Roberts, 1995; Di Leonardo ve ark., 1994). Senesent hücrelerin β -galaktozidaz aktivitesinde artış gözlemlenir (Dimri ve ark., 1995).

Hücrede senesens gibi, stres ve diğer uyaranlara karşı tepki veren bir diğer mekanizma da apoptozdur. Hücresel senesens, hasarlı veya stresli hücrelerin büyümesini engellerken apoptoz, onları hızlı bir şekilde ortadan kaldırır. Kontrollü hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, önemli bir tümör baskılayıcı mekanizmadır (Green ve Evan, 2002). DNA hasarı, pH düşmesi, metabolik bozukluklar, hücre siklus bozuklukları ve radyasyon gibi durumlar apoptozu tetikleyebilir. (Danial ve Korsmeyer, 2004)

Apoptoza uğrayan bir hücrenin fosfatidil-serin molekül miktarında artış gözlemlenir (Elmore, 2007).

N - Asetil Sistein (NAC), akciğer, deri ve karaciğer olmak üzere çeşitli organlarda anti-mutajenik ve anti-tümörojenik etki gösteren kemopreventif bir ajan olarak bilinir (De Flora ve ark., 1986). NAC çoğu tiyol gibi, çeşitli radikaller tarafından oksitlenebilir ve ayrıca antioksidan olan glutatyon öncüsü bir moleküldür (Atkuri ve ark., 2007). Küçük yapıda bir molekül olması sebebiyle hücreler tarafından alınması kolaydır. Ayrıca kistik fibroz, kronik bronşit, KOAH ve parasetamol zehirlenmesi olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Holdiness, 1991).

Bu çalışmada, NAC uygulamasının senesent MKH'ler üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma doğrultusunda, NAC uygulanan farelerin adipoz dokularından MKH izolasyonu yapılmıştır. MKH'ler kültür ortamında çoğaltılarak biyolojik testler yapılmıştır. Bunlara ek olarak, RT - PCR kullanılarak hücre döngüsü, senesens ve apoptoz ilişkili bazı genlerin ekspresyon seviyelerinin analizleri yapılmıştır.

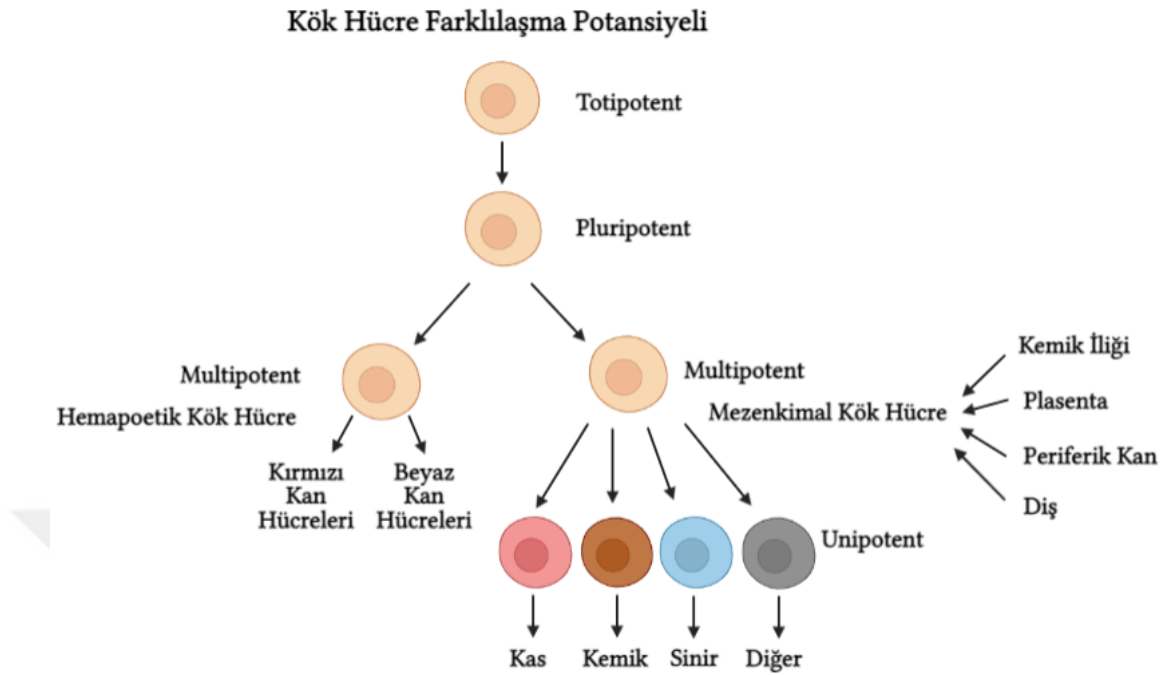
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler bölünerek kendini yenileme ve çoğalma potansiyeline sahip, çok hücreli canlıların doku ve organlarının yapısını oluşturan temel hücrelerdir. Hiyerarşik olarak çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen kök hücreler, farklılaşma (plastisite) yetenekleri açısından; totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılmaktadır (Avasthi ve ark., 2008). Totipotent kök hücreler, tüm fetüs ve plasenta dahil olmak üzere, organizmanın tamamını oluşturabilen sınırsız kapasiteye sahip hücrelerdir. Örneğin; erken memeli embriyoları, totipotent hücre kümelerinden meydana gelir.

Pluripotent kök hücreler, gelişmiş organizmalarda yer alan ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere üç germ tabakasını oluşturma yeteneğine sahip hücrelerdir. Teorik olarak, pluripotent kök hücreler vücuttaki yaklaşık 200 hücre tipine farklılaşabilirler. Pluripotent kök hücrelere embriyonik kök hücreler, embriyonik germ hücreleri ve embriyonik karsinom hücreleri örnek verilebilir.

Multipotent kök hücreler ise tek bir germ tabakasından farklılaşabilen düşük değişme potansiyeline sahip ve organizmanın çoğu dokusunda yer alan kök hücrelerdir. Bu hücrelerin görevi bulundukları dokunun onarımı ve yenilenmesini sağlamaktır. En çok tanınan multipotent kök hücreler mezenkimal kök hücrelerdir (Şekil 2.1) (Bongso ve Richards, 2004).



Şekil 2.1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli.

2.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkimal kök hücreler (MKH), çeşitli dokulardan elde edilebilen ve uygun koşullar sağlandığında kültür ortamında hızla çoğaltılabilen hücrelerdir. MKH'ler ilk defa 1966 yılında Fridenstein ve Petrakova tarafından yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır. Fridenstein, kemik iliğinden yaptığı kültürde morfolojik olarak fibroblastlara benzer olan hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bu hücrelerin yağ ve kemik hücrelerine farklılaşma yeteneğinde olduğunu göstermiştir (Barry ve Murphy, 2004). 1976 yılında ise Fridenstein ve arkadaşları MKH'leri kemik iliğinden izole etmeyi başarmışlardır (Fridenstein ve ark., 1976).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), çeşitli hücelere farklılaşma yeteneği olan multipotent özelliğe sahip stromal kökenli kök hücrelerdir. MKH'ler, kas, vücut bağ doku, kan, vasküler ve ürogenital sistem gibi tüm dokulara ait hücreleri meydana getirirler. Kemik doku, kıkırdak doku, yağ doku, kas, tendon, ligament ve sinir gibi hücre çeşitlerine farklılaşabilirler.

MKH'ler işlevleri bakımından oldukça dikkat çekicidir. Hematopoezisi destekler ve çok sayıda doku ve organın homeostatik dengesinin korunmasında görev alır. Bulundukları dokudan ayrılıp hasarlı olan dokulara geçerek, hasarlı dokunun tamirini yaparlar (Nardi

ve da Silva, 2006). Ayrıca MKH'ler çeşitli dokularda destek hücresi görevi yaparak çok sayıda sitokin, interlökin (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 vb.) gibi hücre dışı matriks proteini ve enzim sentezler. CD29, CD44, CD73, CD90 gibi stromal karakterde yüzey antijenlerine sahip olma, yüzeye yapışma ve multipotent farklılaşma potansiyeli MKH'lerin tanımlanmasında kullanılan başlıca özelliklerdir (Pittenger ve ark., 1999).

2.1.1.1.1. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Elde Edilen Dokular

MKH'ler yetişkin organizmada bulunan kemik iliği, yağ doku, diş pulpası, umbilikal kord gibi çok çeşitli dokulardan izole edilmektedir (Zuk ve ark., 2002). Bilinen en eski ve en zengin MKH kaynağı, kemik iliğidir (Pittenger ve ark., 1999) fakat organizmada büyük oranda bulunan adipoz doku da etkin bir biçimde kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Ayrıca adipoz dokudan MKH elde etme yönteminin kemik iliğine göre daha kolay olması, az miktarda dokudan yüksek oranda kök hücre elde edilmesinden dolayı sıkça tercih edilmektedir (Gimble ve Guilak, 2003; Zhu ve ark., 2008; Zuk ve ark., 2002).

Bunların dışında bir diğer MKH kaynağı ise diş pulpasıdır. Fakat diş pulpasından elde edilen MKH miktarı, adipoz doku ve kemik iliğinden elde edilen MKH miktarına göre daha azdır. Bunlara ek olarak, MKH'ler göbek kodonu, retina, kornea, deri, kas, amniyon sıvısı, karaciğer, saç folikülleri, pankreas gibi birçok organ ve dokudan elde edilebilir (Orbay ve ark., 2012).

2.1.1.1.2. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücre (ADOMKH)

Adipoz doku, %95 oranında yağ damlacığı içeren adiposit adı verilen hücrelerden oluşur. Vücut boyunca dağılım gösteren bu doku, aktif metabolik ve oldukça dinamik yapıya sahiptir. Adipositlerin yanı sıra adipoz doku, sinir dokusu, bağ dokusu matrisi, stromovasküler hücreler ve bağışıklık hücrelerini içerir. Bu bileşenler entegre bir birim olarak işlev yaparlar. Adipoz doku sadece hormonlardan ve merkezi sinir sisteminden gelen afferent sinyallere yanıt vermekle kalmayıp, aynı zamanda önemli endokrin fonksiyonlara sahip faktörleri eksprese eden ve salgılayan endokrin bir dokudur (Kershaw ve Flier, 2004).

MKH'ler organizmadaki birçok dokudan elde edildiği gibi adipoz dokudan da elde edilmektedir. Adipoz doku orijinli MKH, ilk kez Zuk ve arkadaşları tarafından 2001 yılında izole edilmiştir (Zuk ve ark., 2001). Adipoz doku orijinli mezenkimal kök

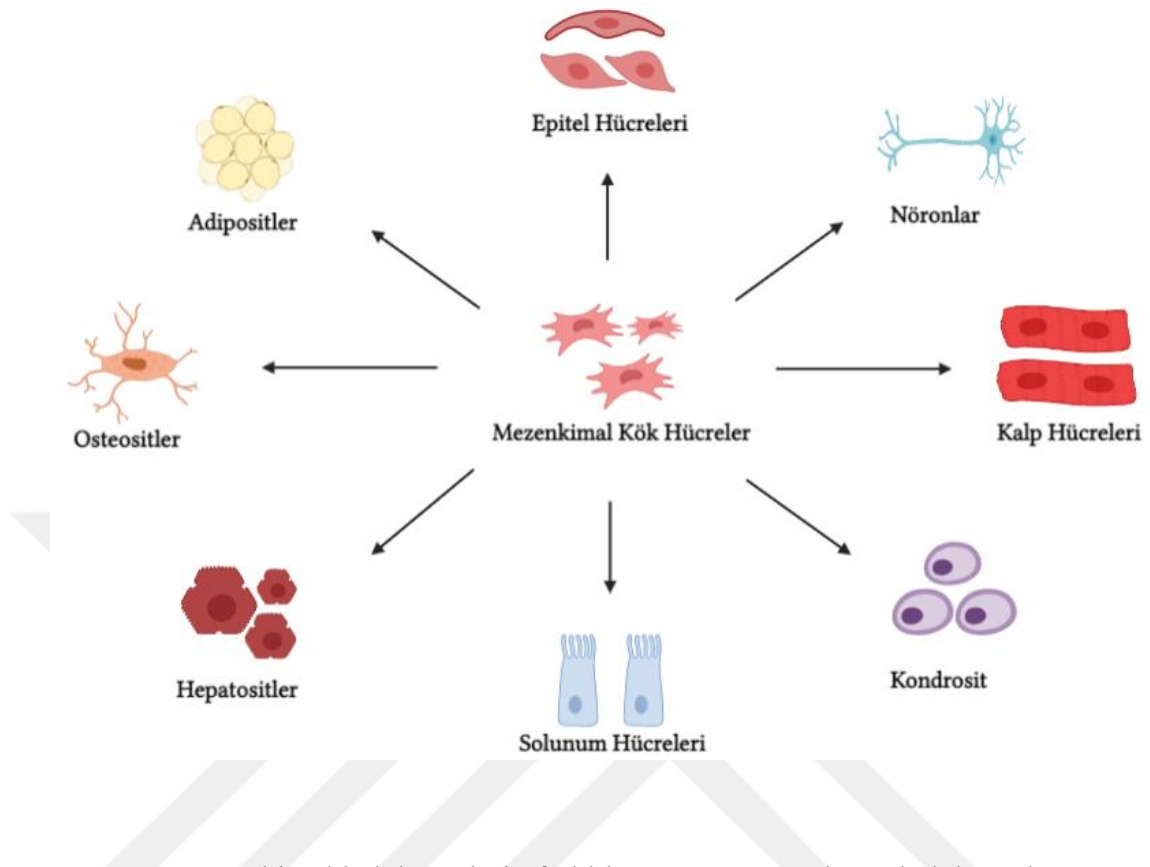
hücreler (ADOMKH), diğer tüm MKH'ler gibi yüzeye bağımlı, fibroblastik morfoloji gösteren, spesifik yüzey belirteçlerine (CD45⁻, CD31⁻, CD34⁺) sahip, multipotent özellikte olan stromal hücrelerdir (Zuk ve ark., 2002).

ADOMKH'lerin izolasyonunda, adipoz doku kaynağı olarak genellikle lipoaspiratlar tercih edilir. Ayrıca küçük boyuttaki adipoz doku biyopsilerinden de yüksek verimle ADOMKH elde edildiği bilinmektedir (Gimble ve Guilak, 2003).

7-12 gram adipoz dokusu, preadipositler olarak adlandırılan yaklaşık 350.000 multipotent hücre ve yaklaşık 5000 kök hücre içerir ve bu sayı kemik iliğinde bulunan kök hücre sayısına oranla 35 kat daha fazladır. Bu sebeple günümüzde MKH kaynağı olarak sıkça tercih edilmektedir (Özen ve ark., 2016). Primer kültür tekniği ile dokudan direk izole edilen ADOMKH'ler in-vitro koşullar altında çoğaltılabilirler ve uygun ortamda canlı kalabilirler. Ayrıca ADOMKH'ler çeşitli gelişme faktörlerinin etkisi ile in-vitro ve in-vivo ortamda farklılaşabilme kapasitesine de sahiptirler (Gimble ve Guilak, 2003).

2.1.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Farklılaşma Potansiyeli

MKH'ler uygun mikro çevre koşullarında başta bağ doku olmak üzere kemik, yağ, kondrosit, kas, nöron hücreleri ve karaciğer hücreleri gibi çeşitli mezoderm, ektoderm ve endoderm soylarına farklılaşma potansiyeline sahiptir (Şekil 2.2) (Kuo ve ark., 2009; Oishi ve ark., 2009).



Şekil 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması sonucu oluşan kök hücreler.

Farklılaşma, transkripsiyon faktörlerini de dahil eden genetik olaylar tarafından düzenlenir. Uygun bir fenotipe göre farklılaşma, progenitör hücrelerin belirli bir soyda farklılaşmasını indükleyebilen bazı düzenleyici genler tarafından kontrol edilir (Dennis ve ark., 2002). Büyüme faktörleri ve indüksiyon kimyasallarının yanı sıra, biyomateryal yapılarla oluşturulmuş uygun bir mikro ortam, MKH'ler için çoğalma ve farklılaşma koşulları sağlayabilir (Seruya ve ark., 2004; Vayssade ve Nagel, 2009).

Teorik olarak, aynı embriyonik kökene sahip olması sebebiyle MKH'lerin mezodermal farklılaşması kolay bir şekilde gerçekleştirilir (Ding ve ark., 2011). Osteojenik farklılaşmada, deksta-metazon (Dex), Beta-gliserofosfat (β -GP) ve askorbik asit kullanılarak farklılaşma gerçekleştirilir (Ouyang ve ark., 2003). Adipogenez farklılaşmasında, farklılaşma için deksta-metazon (Dex), indometazin (IM) ve 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX) kullanılır (Hung ve ark., 2004). Kondrogenez farklılaşmasında ise TGF- β 1 ve TGF- β 2 görev alır (Huang ve ark., 2004).

2.1.1.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Tıpta Kullanımı

Yüksek farklılaşma yeteneğine sahip olmaları, doku ve organ rejenerasyonuna katkıda bulunmaları, *in vitro* ortamda kolaylıkla çoğaltılabilmeleri, hasarlı dokuya migrasyon yetenekleri ve immun baskılayıcı özellikleri nedeniyle MKH'ler tıpta ve doku mühendisliğinde kullanımı kaçınılmaz bir hal almıştır. Bu hücreler insan vücudunda başta kemik iliği ve yağ dokudan olmak üzere birçok yerden kolayca izole edilebilir (Gazit ve ark., 2013; Atala ve Lanza, 2012).

Chron hastalığı, Akut Graft Versus Host hastalığının (GVHH) tedavisinde, ortopedide menisküs hasarı tamirinde, kanser hastalığında, kardiyovasküler sistem hastalıklarında, omurilik yaralanmalarında, kemik ve kıkırdak rahatsızlıklarında, osteoporoz tedavisinde olmak üzere MKH'lerin birçok alanda klinik uygulamaları mevcuttur (Barry ve Murphy, 2004).

MKH'ler genellikle hastalara intravenöz enjeksiyon verilir ya da hasarlı dokuya direkt enjeksiyon ile verilebilir. Steril ortamlarda üretimi gerçekleştirilen MKH'lerin kalite kontrol ve mikrobiyolojik testleri yapılarak hastaya verilir.

2.2. Senesens

Hücreler yaşam süreleri boyunca birçok stres faktörü ile karşılaşabilirler. Bu faktörlere onkojenik aktivite, telomer kısalması, oksidatif stres ve DNA hasarı örnek verilebilir. Stres faktörleri, hücrenin genetik materyalinde hasara veya metabolik yolların düzeninin bozulmasına sebep olur. Bunun sonucunda hücresel kontrol ve hasar tamir mekanizmaları aktif hale gelerek, hasarlı hücre bölünmesini durdurur ve onarım sürecini başlatır. Eğer hücrede hasar tamir edilemeyecek durumda ise hücre bölünmesi tamamen durdurulur. Hücre bölünmesinin kalıcı olarak durdurulduğu bu fizyolojik süreç hücresel senesens olarak adlandırılır (Campisi ve di Fagagna, 2007). Bu hücreler morfolojik olarak da farklılık gösterirler. Senesent hücreler sürekli büyürler ve çok çekirdekli bir görünüme sahip olurlar. Ayrıca bu hücrelerde β -galaktozidaz ve lizozom miktarı da fazladır (Kuilman ve ark., 2010; Van Deursen, 2014).

Senesens, tümör gelişimini durduran bir mekanizma olması sebebiyle avantajlıdır ve senesent hücreler bölünme yeteneğini kaybetse de metabolik olarak aktiftirler (Roninson, 2003). Fakat MKH'lerde meydana gelen senesensin doku ve organa dejavantajları da vardır. Senesens mekanizması sonucu, hücre döngüsü durdurulduğu

için doku onarım kapasitesi azalır. Ayrıca pro-inflamatuar ve matrisi bozan moleküllerin salgılanması, senesent MKH'lerde bir mikro ortam değişikliğine sebep olur ve bu durum organizmada önemli lokal veya sistemik etkiye yol açabilir (Lunyak ve ark., 2017).

Senesens mekanizması temel olarak; embriyonik senesens, prematüre hücrel (akut) senesens ve replikatif (kronik) senesens olmak üzere üçe ayrılır.

2.2.1. Embriyonik Senesens

Embriyonik gelişim sürecinde canlının ihtiyacı olmayan dokuların gelişimini durduran ve ortadan kaldırılmasına yardımcı olan bir mekanizmadır.

2.2.2. Prematüre Hücrel (Akut) Senesens

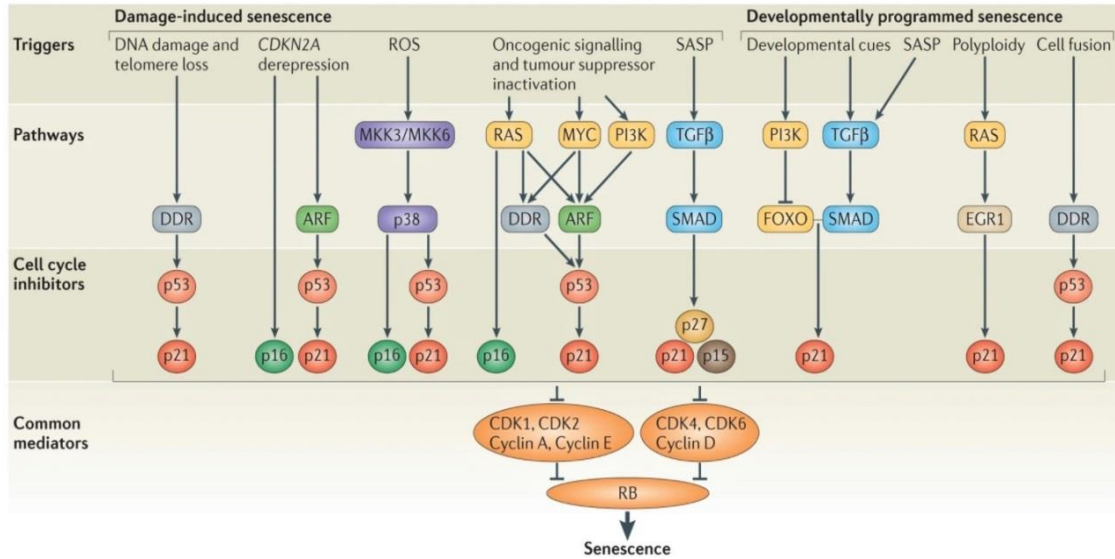
Senesens, telomer fonksiyonundaki bozulmalar sonucu olabileceği gibi farklı koşullar tarafından uyarılarak meydana gelebilir. Bu senesens mekanizması, prematüre hücrel (akut) senesens olarak adlandırılır. Prematüre senesens, tümör baskılanması ve yara iyileşmesi durumlarında rol oynayan yararlı bir mekanizmadır ve iki şekilde incelenir. Birincisi stres ile uyarılmış senesensdir. Hücrelerde senesens mekanizmasını uyaran etken; yüksek besin ve büyüme faktörü konsantrasyonu, kimyasal ajanlar (doxorubicin, cisplatin) ve serbest radikaller (hidrojen peroksit) olabilir. İkincisi ise onkogen-uyarılmış senesens (OIS) tir. OIS, onkogen aktivasyonuna karşı verilen güçlü anti-proliferatif bir cevaptır ve tümör oluşumunu erken aşamada baskılar. Burada ARF-P53 ve RB-p16INK4A sinyal yolları önemlidirler (Kuilman ve ark., 2010; Kuilman ve Peeper, 2009).

2.2.3. Replikatif (Kronik) Senesens

Ökaryotik DNA'nın uç kısımlarında kromozom bütünlüğünü koruyan telomerler yer almaktadır. DNA replikasyonunun ardından, her bölünme sonrası kültürdeki hücrelerin telomerlerinde kısalma meydana gelir Bunun nedeni, kesintili zincirdeki son Okazaki fragmentinden sonra gelen primerin çıkartılmasıyla oluşan boşluktur. Yani hücre bölünme sayısının artmasının ardından, telomeraz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak telomer yıkımı gerçekleşmektedir. Bu durum replikatif senesense yol açmaktadır (Lin ve ark., 2012).

2.2.4. Senesensin Moleküler Mekanizması

Senesensi başlatan birçok uyarıcı ajan vardır ve bunların sayısı sürekli artmaktadır (Campisi ve di Fagagna, 2007). Bu uyarıların çoğu, P53'ü aktive eden ve sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri; INK4A olarak bilinen ve CDKN2A tarafından kodlanan p16, INK4B olarak bilinen ve CDKN2B tarafından kodlanan p15, WAF1 olarak bilinen ve CDKN1A tarafından kodlanan P21 ve CDKN1B tarafından kodlanan p27'nin aktivasyonunda birleşen çeşitli yollar aracılığıyla sinyallenir (Şekil 2.3). CDK-siklin komplekslerinin inhibitörleri, senesensin gerçekleşmesinde sorumlu olan retinoblastoma (RB) aile üyelerini aktif hale getirerek hücre proliferasyonunun durmasına sebep olur ve senesensi başlatır (Şekil 2.3) (Chias ve ark., 2010).



Şekil 2.3. Senesensin moleküler yolları (Muñoz-Espín ve Serrano, 2014).

Senesense sebep olan uyarılar ve yol açan mekanizmalar, hücre tipine ve koşullarına bağlı olarak değişebilirler. Bazı stres yapıcı ve zarar verici ajanlar, hücre döngüsü inhibitörlerinin ve tümör baskılayıcı RB'nin aktivasyonunda birleşen sinyal yollarını aktive eder.

Birçok senesens türü, siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A)'nın epigenetik baskısının kalkması (derepresyon) sonucu indüklenir (Gil ve Peters, 2006). CDKN2A, ARF'yi kodlayarak hücre döngüsü inhibitörlerinden olan P16, P21 ve P53'ü aktif hale getirir. Bu moleküllerin aktive olması CDK2, CDK4 veya CDK6 yolu üzerinden RB

aile üyelerini aktive etmesiyle hücre döngüsü bloklanır (Muñoz-Espín ve Serrano, 2014).

Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF β), hücre döngüsü inhibitörleri P15, P21 ve P27'yi SMAD kompleksi boyunca yukarı regüle eden senesens ilişkili salgı fenotipi (SASP) yolunun önemli bir bileşenidir. TGF- β yolu üzerinden P21 yolunun aktive edilmesi ve CDK2'nin inhibisyonu ile RB'nin aktivasyonu gözlemlenir (Muñoz-Espín ve Serrano, 2014).

Canlıda meydana gelen telomer kaybı ve DNA hasarının meydana gelmesi, P53'ü harekete geçirir. P53 doğrudan P21'i aktive ederek, DNA hasar yanıtını (DDR) aktive hale getirir ve RB'nin aktivasyonu ile senesensi uyarır (Di Mocco ve ark., 2006).

Reaktif oksijen türleri (ROS) de senesensi indükleyen bir diğer etmendir. ROS, MKK3 ve MKK6 kinazları ve bunların aşağı akış kinaz efektörü olan P38 aracılığıyla P16 ve P53'ü aktive eder (Sun ve ark., 2007). P13K, Ras molekülleri ise onkojenik sinyal indüklenmesiyle DDR ve ARF yolu üzerinden P16 ve P53'ü harekete geçirerek RB'nin aktivasyonunu sağlar ve senesensi uyarır (Muñoz-Espín ve Serrano, 2014).

Senesens mekanizmaları farklılık gösterse de altta yatan moleküler mekanizmalarda benzer durumlar mevcuttur. Tüm mekanizmalarda RB proteinini aile üyelerinin aktivasyonu ortaktır. Hücre döngüsünün devam edip etmeyeceğini belirleyen kritik durum, RB proteininin fosforilasyonudur (Giacinti ve Giordano, 2006).

Hipofosforile formda olan RB proteinini, S fazı genlerinin transkripsiyonunu sağlayan E2F genlerine bağlanarak S fazı genlerinin ifade edilmesini engeller. Bu proteinin hiperfosforile formda olması sonucunda ise E2F transkripsiyon faktörü serbest kalır ve S fazı genleri nin ifade edilerek, DNA replikasyonu gerçekleşir ve hücre döngüsü devam eder.

Senesent hücreler, senesens ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) olarak bilinen karmaşık bir pro-inflamatuar yanıtı sergilerler (Coppe ve ark., 2010). SASP, transkripsiyon faktörleri, nükleer faktör-KB (NF-kB) ve CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein- β (CEBP β) aracılığıyla gerçekleşir ve proinflamatuar sitokinlerin (IL-6, IL-8), kemokinlerin (MCP), makrofaj enflamatuar proteinlerin (MIP), TGF- β 'nın, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve proteazların salgılanmasını içerir (Acosta ve ark., 2008; Coppe ve ark., 2008; Kuilman ve ark., 2008). Bu ve benzeri proteinlerin senesent hücreler

tarafından salgılanması, inflamasyona sebep olabilir ve bu durumda senesent hücrelerin fagositozla temizlenmesi için büyük öneme sahiptir (Xue ve ark., 2007; Honeicke ve Zender, 2012).

SASP bileşenleri, özellikle TGF- β , komşu hücrelerde ROS ve DNA hasarı üreten bir mekanizma yoluyla parakrin etki göstererek senesensi tetikleyebilir (Acosta ve ark., 2013; Nelson ve ark., 2012; Hubackova ve ark., 2012). Sonuç olarak, SASP güçlü otokrin ve parakrin etkiye gösterir, bu da senesensin ve senesent hücrelerin ortadan kaldırılmasına yol açabilecek inflamatuvar bir mikro ortam oluşturduğunu ortaya koyar.

2.3. Apoptoz

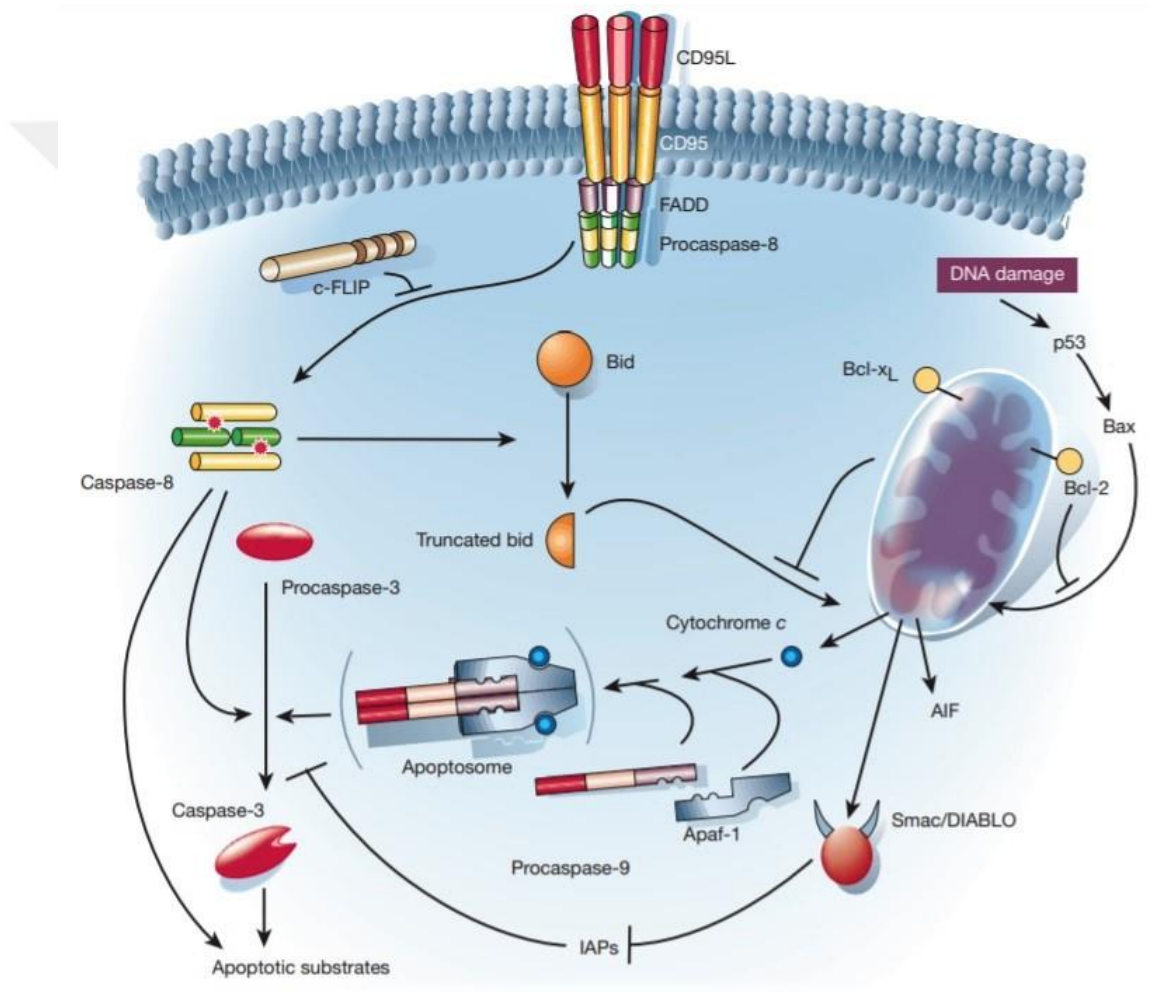
Apoptoz, programlanmış bir hücre ölümü sürecidir. Hemen hemen tüm hücre tiplerinin gelişimi ve morfogenezinde, hücre sayısını kontrol etmek ve hasta veya senesent hücrelerin yok edilmesi için apoptoz mekanizması kullanılır (Vaux ve Korsmeyer, 1999).

Genel olarak; programlı bir şekilde genlerle düzenlenerek, RNA, protein sentezi ve enerjiyi kullanarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri ve organizmada homeostazi gerçekleştiren bir olay olan apoptoz birçok aşamada gerçekleşir (Coşkun ve Özgür, 2011). İlk olarak apoptoz uyarısı alan bir hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşarak komşu hücrelerle bağlantısını koparır ve büzüşür, kromatini yoğunlaşır. Fakat hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Daha sonra hücre zarı yapısında bulunan fosfatidilserin (PS), hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne taşınır. Çekirdek küçülerek parçalara bölünür ve hücreler zarla sarılı halde koparak apoptotik cisimciklere ayrılır. Bu apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınarak fagositoza uğrar (Bellamy ve ark., 1995; Ellis ve ark., 1991).

Gözlemlenen bu morfolojik değişikliklerin çoğuna apoptotik hücrelerde aktive olan bir dizi sistein proteazı neden olur. Bu ölüm proteazları, kaspazlar olarak bilinen büyük bir protein ailesinin bir parçasıdır (Alnemri ve ark., 1996). İnsanlarda bir düzineden fazla kaspaz tanımlanmıştır; bunların yaklaşık üçte ikisinin apoptozda işlev gördüğü öne sürülmüştür (Thornberry ve Lazebnik, 1998). Apoptotik hücre ölümünü karakterize eden ve görünür değişikliklerin çoğunu meydana getirdikleri için kaspazlar apoptotik yolun merkezinde bulunan moleküller olarak düşünülebilirler.

2.3.1. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz hücrelerde iki ana yolla gerçekleşir (Şekil 2.4). Apoptoz mekanizması, hücre içi (pH azalışı, DNA hasarı, metabolik ve hücre siklus bozuklukları vb.) ve hücre dışı sinyaller (ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, UV, radyasyon, iske mi vb.) ile uyarılır. Hücre içi sinyaller instrinsik (mitokondriyal) yol ile apoptozu indüklerken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indüklerler (Danial ve Korsmeyer, 2004; Kroemer ve ark., 2007; Smaili ve ark., 2000).



Şekil 2.4. Memeli hücrelerde apoptoz iki ana yolla gerçekleşir. (Hengartner, 2000).

2.3.1.1. Ekstrinsik Yol

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (CD95, FAS, TNFR) ölüm sinyallerinin (CD95L, FasL, TNF-alfa) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Örneğin; CD95 ligandının (CD95L), CD95'e bağlanması gibi. Trimerik yapı kazanan reseptörler,

adaptör molekülleri (FADD) ile birleşerek ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu olaydan sonra inaktif halde olan prokaspaz-8, aktif kaspaz-8'e dönüşür. Aktif kaspaz-8, prokaspaz-3'ün aktivasyonunu iki şekilde gerçekleştirir.

Direkt olarak kaspaz-8, prokaspaz-3'ü aktive edebilir veya Bid'i keserek dolaylı yoldan instrinsik mekanizmada prokaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Aktif halde olan kaspaz-3, kaspaz aktive edici DNaz (CAD) aktivasyonunu sağlayarak DNA fragmentasyonuna neden olur (Adams ve Cory, 2001; Spierings ve ark., 2004; Curtin ve Cotter, 2003).

2.3.1.2. İnstrinsik Yol

Hücre içi sinyallerle (DNA hasarı, hipoksi, pH azalışı vb.) apoptotik uyarı alınmasından sonra pro-apoptotik bir protein olan Bid; anti-apoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktif hale getirerek, Bak ve Bax'ı aktive eder. Aktiflenen Bak ve Bax molekülleri mitokondri membranında por oluşumunu uyararak zar potansiyelinin değişmesine sebep olur (Spierings ve ark., 2004).

Böylelikle mitokondri membranındaki porlardan; sitokrom-c, endonukleaz-G (Endo-G), kaspazın ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü (SMAC), kalsiyum (Ca^{++}) ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını uyarır.

Sitokrom-c molekülü, oksidatif fosforilasyon için elektron taşır. SMAC, AIF'nin aktivasyonunu baskılayarak apoptozu hızlandırır ve AIF'nin ortamda bulunması kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün aktivasyonunu engeller. AIF molekülü, çekirdeğe transloke olur ve parçalanır. ENDO-G molekülü ise DNA'yı parçalar. Sitokrom-c, ATP'nin ve apoptotik proteaz aktive edici faktörün (Apaf-1) de bir araya gelmesiyle sitozolde apoptozom adında bir kompleks oluşturur (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001).

Apoptozom, kaspaz 9'u keserek aktive eder ve kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktive eder böylece aktif kaspaz-3 oluşur. Aktif kaspaz-3 de inaktif kaspaz aktive edici DNaz'ı (ICAD) inaktif hale getirerek CAD'ı serbestleştirir. CAD molekülü ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasını sağlar ve DNA'nın fragmente olmasına neden olur (Smaili ve ark., 2000; Palmer ve ark., 2000).

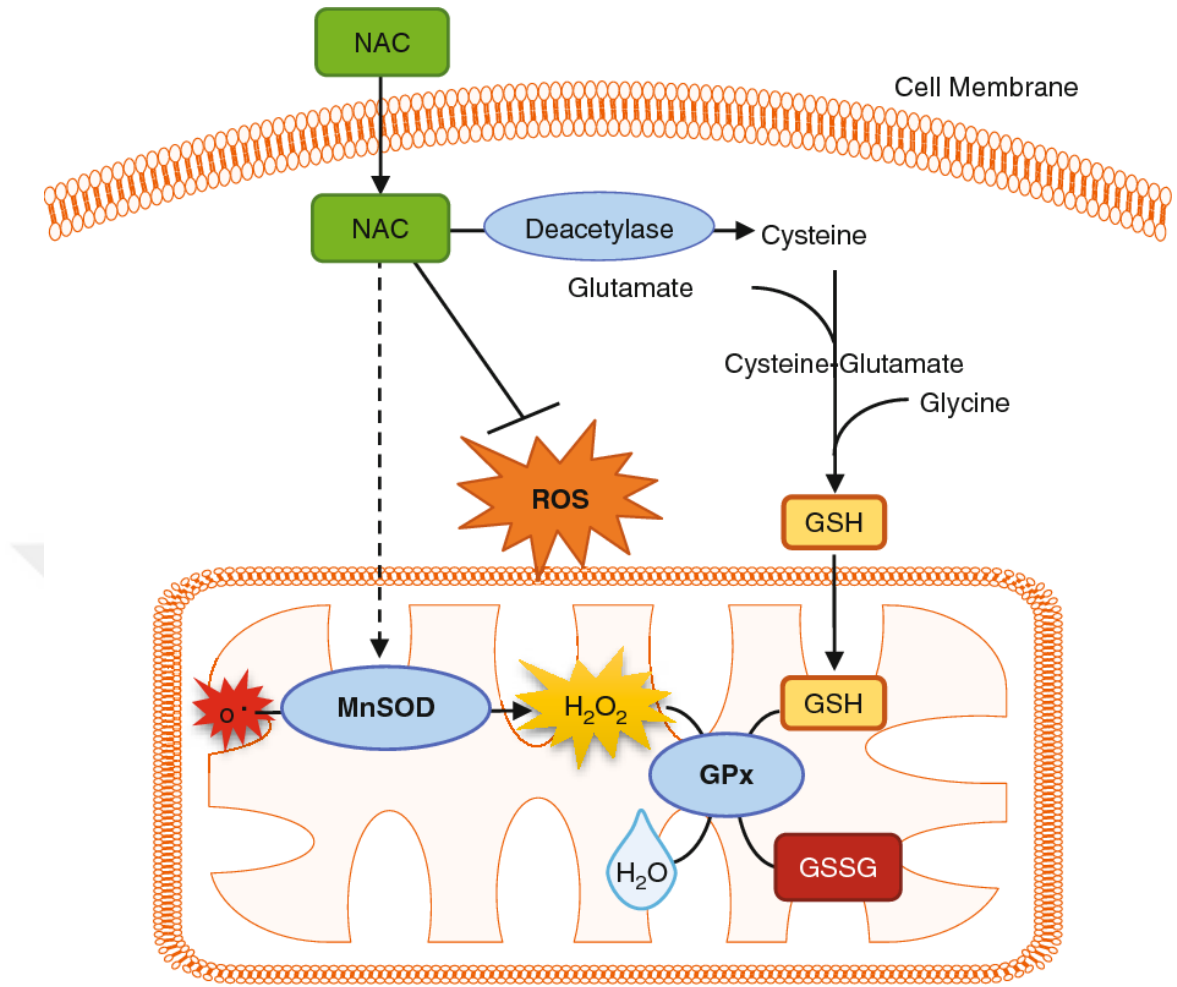
Apoptoz sürecinin deregülasyonu, kanser, otoimmünite ve dejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok patolojik sonuca neden olabilir. Yapılan çalışmalar sonucu, apoptozun moleküler mekanizması ve düzenlenmesinin aydınlatılması, birçok hastalığın

patofizyolojisinin daha derinden anlaşılması için temel oluşturmuştur. Ayrıca bu çalışmalar; kanser, inflamasyon, immün yetmezlik, otoimmün bozukluklar, iskemik kalp hastalığı, felç ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere çok çeşitli rahatsızlıklarda terapötik müdahale için stratejiler ortaya koymuştur (Nicholson, 2000).

2.4. N - Asetil Sistein (NAC)

2.4.1. N - Asetil Sistein (NAC) Mekanizması

N - Asetil Sistein (NAC), N - asetil - 1 - sistein olarak da bilinir (De Vries ve De Flora, 1993). NAC, bir hücreye girdikten sonra reaktif oksijen türleri (ROS) içeriğini azaltmak için doğrudan oksidatif maddelerle reaksiyona girer ve reaktif bir oksijen temizleyici olarak görev yapar (Liu ve ark., 2021). Hücre içinde NAC'ın deasetilasyonu sonucu glutatyon (GSH) sentezi için hız sınırlayıcı sistein aminoasidi üretilir. Sitozolde sentezlenen GSH, glutatyon peroksidazı (GPX) tarafından H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesini destekler. Manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) ise yüksek reaktif süperoksidi ($O\bullet$) daha az reaktif H_2O_2 'ye dönüştürülür (Şekil 2.5) (Frye ve Berk, 2018).



Şekil 2.5. NAC'ın mito-koruyucu mekanizmaları (Frye ve Berk, 2018).

2.4.2. Kimyasal Yapı ve Özellikleri

NAC, nitrojen atomuna bağlı asetil grubuna sahip bir sistein türevidir ve çoğu tiyol (RSH) gibi çeşitli radikaller tarafından oksitlenebilir ve ayrıca bir nükleofil görevi gören, glutatyon öncüsü bir moleküldür (Atkuri ve ark., 2007). NAC, güçlü bir antioksidan olmakla birlikte, mukolitik özelliğe sahip bir moleküldür. Yapısında bulunan sülfidril gruplarının etkisi ile serbest oksijen radikallerini nötralize eder. Ek olarak NAC, hücreye girdikten sonra deasetilasyona uğrar ve glutatyon molekülünün öncüsü olan L-sisteine dönüşür. Glutatyon molekülü, hücreyi oksidatif stresten korur ve hücre içi redoks tepkimelerinde önemli bir moleküldür (Samuni ve ark., 2013).

2.4.3. Klinikte Kullanımı

NAC, yıllardır klinik pratikte kullanılan bir bileşiktir. Tarihsel olarak ise kistik fibroz ve kronik bronşit gibi aşırı mukus salgılanması ile ilişkili olanlar başta olmak üzere, konjestif ve obstrüktif akciğer hastalıklarının tedavisi için tanıtılmıştır. Ayrıca NAC, parasetamol zehirlenmesi, KOAH, doksorubisin kardiyotoksitesisi, iskemi-reperfüzyon kalp hasarı, akut solunum sıkıntısı sendromu, bronşit, kemoterapiye bağlı toksisite, HIV/AIDS, ağır metal toksisitesi ve psikiyatrik/nörolojik bozukluklar dahil olmak üzere çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Son zamanlarda NAC'ın daha da geliştirilmesiyle uygulama alanları da genişlemiştir. Böylece insan immün yetmezlik virüsü (HIV-I) enfeksiyonları, pulmoner oksijen toksisitesi ve yetişkin solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) vakalarının tedavisinde kullanılmaya başlamıştır. NAC'ın farmakolojik uygulamalarının çeşitliliği oldukça benzersizdir. Bu durum, molekülün sisteinil tiyolünün çok yönlü kimyasal özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Moldéus ve Cotgreave, 1994; Prescott ve ark., 1977; Atkuri ve ark., 2007; Webb, 1962).

2.4.4. Yan Etkileri

Enjeksiyon ve oral yolla NAC takviyesinin etkisini karşılaştıran çalışmalar mevcuttur. Çalışmalarda, enjeksiyonun daha yüksek biyoyararlanımı olmasına rağmen, kusma, halsizlik, kalp ve dolaşım sorunları, baş ağrısı, nefes almada zorluk gibi yan etkileri nedeniyle NAC'ın oral takviye ile alınması önerilmiştir. Fakat oral NAC takviyesinde de kusma, mide bulantısı ve ishal gibi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu yan etkiler dozaj ve zamanlamanın ayarlanmasıyla hafifletilebilir. Yapılan çalışmalarda, günlük oral yolla alınan NAC dozunun iki veya dörde bölünmesiyle, benzer bir antioksidan tepki yaratırken takviyenin yan etkilerinin azaldığı gözlemlenmiştir (Rhodes ve Breakhuis, 2017). NAC, Dünya sağlık örgütü (DSÖ)'nün esansiyel ilaçlar listesinde yer almaktadır.

2.5. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücreleri kontrollü şartlar altında çeşitli yöntemlerle izole ederek bu hücrelerin *in vitro* koşullarda yaşamına devam ettirilmesine denir. *In vitro* koşullarda kültüre edilen hücreler, canlılık özelliklerini göstermeye devam ederler. Böylece bir canlıya ait hücrelerin çeşitli koşullara ve ilaçlara nasıl tepki vereceği hakkında, canlı dışında yapılan deneylerle cevap verilebilir (Lodish ve ark., 2011).

Canlı organizmaya kıyasla, kültüre edilmiş hücrelerin kontrol altında olması ve daha hızlı bir şekilde yetiştirilerek çoğaltılması çeşitli çalışmalar için avantaj sağlar. Hücre kültürü çalışmaları başlıca; monoklonal antikor, aşı, enzim ve çeşitli hormonların üretimi, sinyal üretim yollarının netliğe kavuşturulması ile bunlara yönelik hedef ilaç moleküllerinin belirlenmesi, viral ve bakteriyel enfeksiyon araştırmaları, toksisite çalışmaları, doku ve gen tedavilerinin geliştirilmesi amacıyla tıbbın birçok alanında kullanılmaktadır.

2.5.1. Hücre Kültürü Kimyasalları

2.5.1.1. Mediumlar

Mediumlar hücrelerin yaşamını idame ettirebilmesi için gerekli olan besiyerleridir. Süspanse (yüzey) hücreler bu besiyerleri içerisinde askıda, yüzeyde yaşamını idame ettirebilir. Monolayer (tutunarak büyüyen) hücreler ise kültür kabının tabanına tutunup üstü bu besiyerleri ile kaplanarak beslenirler.

Mediumların hidrojen iyonu konsantrasyonu, hücrelerin kültüre edilmesinde önemli bir faktördür. Hücreler genellikle pH:7.4'te yaşarlar. Mediumlar içerisinde kullanılan pH indikatörü, fenol kırmızısı olarak adlandırılır. Böylece medium pH'sında gözlemlenen artış ve azalış durumuna göre fenol kırmızısı mediumun rengini değiştirir. Asidik bir pH'da medium rengi sarıya yaklaşır. Bazik pH'da ise medium koyu kırmızı veya pembe bir renk alır.

Mediumlarda diğer önemli birleşenler ise sodyum bikarbonat (NaHCO_3), karbodikoksit (CO_2) ve HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) tir. CO_2 , medium içerisinde gaz halde iken çözünür. Medium içerisinde biriken laktik asit pH'ı düşürür. Ortamın pH'sını dengede tutmak için medium içerisine bu birleşenler eklenir. HEPES, bunlar arasında en çok tercih edilen tampon birleşenlerden biridir.

Bir diğer önemli kriter ise mediumun oksijen (O_2) yoğunluğudur. Ayrıca hücre kültürü mediumlarının sıcaklıkları da hücreleri etkileyen önemli bir unsurdur. Hücreler -80°C 'de birkaç gün durabilirler ve uzun süreli olarak, -196°C 'de saklanabilirler. Bu hücreler için en uygun kültür sıcaklığı 37°C 'dir. Hücre kültüründe kullanılan mediumlar soğutucularda muhafaza edildiğinden, hücrelerin üzerine eklenmeden önce sıcaklıklarının bu sıcaklığa yaklaştırılması kültürdeki hücrelerin canlılığı açısından önem arz etmektedir (Freshney, 2010).

2.5.1.1.1. Medium İçerisinde Bulunan Maddeler

Mediumların içerisinde; vitaminler, tuzlar, glukoz, serum olmak ezitli maddeler bulunmaktadır.

2.5.1.1.1.1. Vitaminler

Mediumlarda bulunan vitaminler; A, D, E, K, B vitaminleri, inositol, biyotin, nikotinamit ve folik asittir. Bu vitaminler hücre metabolizmasında büyük öneme sahiptir. Bu yüzden, besiyeri içerisinde uygun konsantrasyonda olması gerekir (Freshney, 2010).

2.5.1.1.1.2. Tuzlar

Tuzlar mediumun osmolaritesini dengeleyen birleşendir. Medium içerisinde bulunan bazı tuzlar; Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , PO_4^{3-} ‘tür. Bu tuzlar hücrelerin büyüme ve gelişmesine önemli bir katkıda bulunur. (Freshney, 2010).

2.5.1.1.1.3. Glukoz

Glukoz, hücrenin temel enerji kaynağıdır. Hücre tipine göre glukoz konsantrasyonları farklı olan mediumlar kullanılabilir. Medium içeriğine dahil edilen diğerk maddeler ise serum, aminoasitler, antibiyotikler, hormonlar ve büyüme faktörleridir (Freshney, 2010).

2.5.1.1.1.4. Serum

Serumlar hücrelerin büyümesini ve gelişmesini destekleyen maddelerdir. Serumlar genellikle atlardan, büyükbaş hayvanlardan ve insanlardan elde edilebilir. Mezenkimal kök hücre kültüründe Fetal Bovin Serum (FBS) sıkça tercih edilir. Medium içerisine, hücrenin fizyolojik durumu ve hücre tipi baz alınarak farklı oranlarda eklenebilir (Freshney, 2010).

2.5.1.1.2. Mediumların İçerisinde Bulunan Diğerk Maddeler

2.5.1.1.2.1. Aminoasitler

Aminoasitler, hücrelerin büyümesinde ve yaşamını idame ettirmesinde önemli role sahip olan maddelerdir. Aminoasitler bazal mediumların içerisinde bulunabilir veya ihtiyaç halinde sonradan da eklenebilirler. Hücre kültüründe en çok kullanılan aminoasit glutamindir (Freshney, 2010).

2.5.1.1.2.2. Antibiyotikler

In vitro hücre kültüründe hücreler için hazırlanan besiyerinin steril olması gerekir. Bu yüzden hücreleri bakteri ve fungus kontaminasyonundan korumak amacıyla hücre kültürü mediumlarının içerisine antibiyotikler eklenir. Hücre kültüründe sıklıkla kullanılan antibiyotikler; penisilin, amfoterisin, streptomisin, gentamisin'dir (Freshney, 2010)

2.5.1.1.2.3. Hormonlar ve Büyüme Faktörleri

Hücre kültürü mediumlarına eklenen bir diğer madde ise büyüme faktörleridir. Bu maddeler hücre kültüründe sıklıkla kullanılımsalar da bazı hücrelerin büyümesini ve gelişmesini desteklemek için medium içerisine eklenebilirler. Genellikle tercih edilen büyüme faktörleri b-FGF ve EGF'dir (Freshney, 2010).

2.5.1.1.2.4. Tripsin

Tripsin, plastik yüzeyde tutunmuş halde olan hücreleri tutundukları yüzeyden ayırmak için kullanılan bir enzimdir. Hücreler ile tripsin enziminin temas ettiği süre önemlidir. Çünkü hücreler tripsine uzun süre maruz kalırlarsa, membran yüzeyinde bulunan protein yapılar tripsin tarafından parçalanır. Bu durum hücrenin canlılığını olumsuz yönde etkiler. Tripsin enzimin aktivasyonunu durdurmak için bol miktarda protein içeren bir serum (FBS vb.) ya da tripsin inhibitörü kullanılır (Freshney, 2010).

2.5.1.1.2.5. Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi (PBS)

Hücre kültüründe PBS genellikle yıkama işlemi aşamasında kullanılır. Hücre kültüründe kullanılan iki farklı tipi vardır. Bunlardan ilki içerisinde kalsiyum ve magnezyum bulunmayan PBS'tir. Bu PBS yıkama işleminde tercih edilir. Diğer ise içerisinde kalsiyum ve magnezyum içeren ve hücre izolasyonu sırasında kollajenaz enzimi ile kullanılan PBS'tir. Kalsiyum ve magnezyum gibi +2 değerlikli iyon içeren PBS'ler yıkama işleminde kullanılmaz. Çünkü tripsin enzimi kalsiyum ve magnezyum varlığında çalışmaz (Freshney, 2010).

2.5.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar

Hücrelerin kültüre edilmesi için gerekli olan, hücre kültürü laboratuvarlarında kullanılan birçok ekipman bulunur. Hücre çalışmaları temel bir ekipman olan steril kabinde yapılır. Kültürü yapılan hücrelere uygun ortam %5 CO₂ içeren ve sıcaklığı 37 °C olan

karbondioksit inkübatörü tarafından sağlanır ve hücrelerin durumuna bakmak için invert mikroskop kullanılır. Buna ek olarak, kullanılan diğer ekipmanlar ise; santrifüj cihazı, lam, lamel kültür malzemelerinin muhafaza etmek için çeşitli sıcaklık derecelerine sahip (+4 °C, -20 °C, -80 °C) soğutucular ve hücrelerin uzun dönem saklanması için gerekli azot tankıdır (-196 °C) (Pittenger, 2008).

2.6. Biyolojik Testler

2.6.1. Senesens İlişkili Beta-Galaktozidaz Aktivitesi Testi

Bu tez çalışmasında, senesent hücreleri tespit etmek amacıyla beta-galaktozidaz (β -gal) boyaması metodu kullanılmıştır. Senesent hücrelerde, lizozomal enzimlerin artması sonucu lizozom miktarındaki artış bu hücrelerin karakteristik özelliklerinden birisidir. Bu enzimlere β -gal örnek verilebilir. Senesens ilişkili β -gal aktivitesi, kültürdeki bulunan senesent hücreleri belirlemeye yarayan ve pH:6'da gözlemlenebilen sitokimyasal bir boyama metodudur. Bu metotta X-gal kullanılır. X-gal, β -gal ile tepkimeye girdiğinde çözünemeyen mavi renkte ürün oluşturan bir substrattır. Boyama sonrasında hücreler glutaraldehit ile fikse edilerek, senesent hücrelerde mavi renk oluşumu gözlenir. Bunlara ek olarak, senesent hücre belirlenmesinde hücre büyüklüğü ve çekirdekçik miktarı da dikkate alınır (Debacq-Chainiaux ve ark., 2009).

2.6.2. Annexin V Apoptoz Testi

Bu tez çalışmasında kültüre edilen ADOMKH'lerin apoptoz oranını belirlemek amacıyla Muse Cell Analyzer cihazına ait Annexin V/Dead Cell kiti kullanılmıştır. Apoptotik süreç tamamlandıktan sonra fosfolipid membranının iç yüzeyinde bulunan negatif (-) yüklü fosfatidilserinler (PS) membranın dış yüzeyine taşınırlar. Annexin V, hücre yüzeyinde bulunan PS moleküllerine bağlanarak apoptotik hücreleri belirleyen bir belirteçtir (Koopman ve ark., 1994). Ayrıca bu kitin içerisinde 7-aminoactinomycin-D (7-AAD) boyası da vardır. Ölü hücreleri boyamaya yarayan 7-AAD, hasarlı fosfolipid zardan geçerek DNA'ya bağlanan bir moleküldür. Mikro santrifüj tüpünde bulunan hücreler, Annexin ile muamele edilip akış sitometri temelli bir cihaz olan Muse Cell Analyzer'da incelenir ve apoptoz yüzdesi belirlenir.

2.6.3. Hücre Döngüsü Testi

Bu tez çalışmasında, kültüre edilen ADOMKH'lerin hücre döngüsü aşamalarındaki (G0/G1, S ve G2/M) hücre miktarını tespit etmek amacıyla Muse Cell Analyzer

cihazına ait Cell Cycle kiti kullanılmıştır. Cell Cycle kiti içerisinde nükleer DNA'ya bağlanan Propidyum Iyodür (PI) boyası ve RNAz A içeren bir solüsyon yer almaktadır. Hücre döngüsü testinin temeli, DNA içeriğinin PI ile boyamasına dayanmaktadır. PI, RNAz varlığında hücrelerin farklı DNA içeriğine dayanarak, hücre döngüsünün aşamalarındaki hücreleri ayırır. Bunun sonucunda hücre döngüsünün her fazındaki (G0/G1, S ve G2/M) hücre miktarı yüzdesel olarak ölçülür (Darzynkiewicz ve ark., 2006).

2.6.4. Ki67 Proliferasyon Testi

Bu tez çalışmasında kültüre edilen ADOMKH'lerin proliferasyon oranını belirlemek amacıyla Muse Cell Analyzer cihazına ait Ki67 Proliferation Kit kullanılmıştır. Ki67, hücre döngüsünün tüm evrelerinde tüm memeli hücrelerinde eksprese edilen bir nükleer protein antijenidir. G0 fazında kuvvetli bir şekilde aşağı regüle edilir (Gerdes ve ark., 1984). Bu özelliğinden dolayı Ki67, proliferasyonu değerlendirmek için kritik bir biyobelirteç haline gelmiştir (Dowsett ve ark., 2011). Ki67 ile muamele edilen hücreler Muse Cell Analyzer'da incelenir ve proliferasyon yüzdesi belirlenir.

2.7. Moleküler Genetik Analizler

2.7.1. Hücre Döngüsü, Senesens ve Apoptoz ile İlişkili Genler

2.7.1.1. *Gapdh* Geni

Gapdh geni, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz protein ailesinin bir üyesini kodlayan housekeeping genlerden birisidir (Mustafa ve ark., 2009). Hücre iskeletinin organizasyonunu ve yapımını düzenler. TRAF2 ve TRAF3 etkileşim yoluyla TNF ile indüklenen NF-kB aktivasyonunu gerçekleştirir ve tip I interferon üretimini uyararak doğal bağışıklıkta görev alır. Ayrıca, transkripsiyon, DNA replikasyonu, RNA taşınması ve apoptoz gibi olaylara katılır (Tajima ve ark., 1999).

2.7.1.2. *P53* Geni

P53, tümör baskılayıcı, DNA hasarı ve hipoksi gibi hücre streslere yanıt olarak hücre döngüsü durmasına aracılık eder. Ayrıca apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonunu sınırlar (Shen ve White, 2001). Bu işlemi gerçekleştirmek için gerekli bir kısım geni kontrol eder ve hücre döngüsü düzenlemesinde yer alır. Aktive edilmiş genlerden biri, CDK'lerin bir inhibitörüdür. Apoptozun indüklenmesine, BAX ve FAS antijen ekspresyonunun uyarılması ya da *Bcl-2* ekspresyonunun baskılanması sebep

olabilir (Haupt ve ark., 2003). DNA hasarına yanıt olarak CAK kompleksi ile hareket ettiğinde, CDK7 kinaz aktivitesini önleyerek hücre döngüsü ilerlemesini durdurur (Miki ve ark., 2013).

2.7.1.3. *P21* Geni

Bu gen, güçlü bir CDK inhibitörünü kodlar. Kodlanmış protein, CDK2 veya CDK4 komplekslerine bağlanarak bunların aktivitesini inhibe eder ve dolayısıyla G1 fazında hücre döngüsü ilerlemesini düzenlemede rol oynar. Bu genin ekspresyonu, tümör baskılayıcı olarak görev yapan *P53* proteini tarafından kontrol edilir. *P21* proteini, çeşitli stres uyaranlarına yanıt olarak *P53*'e bağlı hücre döngüsünün G1 fazında durmasına aracılık eder (Karimian ve ark., 2016). Ayrıca bu protein, S fazı DNA replikasyonu ve DNA hasar onarımında düzenleyici bir rol oynar (Hauge ve ark., 2019).

2.7.1.4. *Rb1* Geni

Hücre döngüsünün G1/S geçişinde temel düzenleyici olarak görev yapan tümör baskılayıcı bir genidir. *Rb1* geninin, hipofosforile formu, E2F ailesinin transkripsiyon düzenleyicilerini bağlayarak E2F'ye yanıt veren genlerin transkripsiyonunu engeller. *RB1*'in siklin ve CDK'ye bağlı fosforilasyonu, onun E2F'lerden ayrılmasını indükler böylece E2F'ye yanıt veren genlerin transkripsiyonunu aktive eder ve S fazına girişi tetikler. *Rb1* geni ayrıca CDK3/siklin-C tarafından fosforilasyon ve aktivasyon üzerine G0-G1 geçişini de destekler. Genel kromatin yapısını ve özellikle de histon metilasyonunu stabilize ederek yapısal heterokromatinin yapısını koruyarak heterokromatin oluşumuna doğrudan katılır (Gonzalo ve ark., 2005).

2.7.1.5. *Atm* Geni

Serin/treonin protein kinaz; apoptoz, çift iplik kopmaları (DSB) ve iyonlaştırıcı ultraviyole A ışığı (UVA) gibi genotoksik stresler üzerine kontrol noktası sinyalini etkin hale getirerek bir DNA hasar sensörü görevi görür. Ve substrat konsensüs dizisini [ST]-Q tanır. Çift iplik kopmalarında histon varyantı H2AX'in 'Ser-139'unu fosforile ederek DNA hasar tepki mekanizmasını düzenler. Ayrıca sinyal iletimi ve hücre döngüsü kontrolünde yer alır. Vezikül ve protein taşınmasında, T hücre gelişiminde, gonad ve nörolojik fonksiyonlarda rol oynayabilir. DNA uçlarını bağlar ve replikasyona bağlı histon mRNA bozulmasında görev yapar (Burma ve ark., 2001).

2.7.1.6. *Bax* Geni

Apoptoz baskılayıcı *BCL-2* veya onun adenovirüs homologu olan E1B-19k proteinine bağlanarak onu harekete geçirerek programlanmış hücre ölümünü hızlandırır. Stres koşulları altında, mitokondri zarında translokasyona neden olan bir konformasyon değişikliğine uğrar ve sitokrom c'nin salınmasına yol açarak apoptozu tetikler (Oltval ve ark., 1993; Ku ve ark., 2011).

2.7.1.7. *Bcl-2* Geni

Bcl-2 geni, B hücreli lenfoma-2 protein ailesinin bir üyesini kodlar. Bu ailenin üyeleri, çoklu hücre tiplerinde hücre ölümünü düzenler ve proapoptotik veya antiapoptotik aktivitelere sahiptir. Bu protein, apoptotik uyarılara yanıt olarak mitokondriyal geçirgenliği kontrol eden sinyal yolunun bir parçası olarak işlev görür ve bir dış mitokondriyal zar proteinidir. Ayrıca *Bcl-2* tarafından kodlanan protein, mitokondriyal aracılı apoptozu (intrinsik yolla) inhibe eder (Burlacu, 2003; Brunelle ve Letai, 2009). Bu protein aynı zamanda nöron hücrelerinin hayatta kalmasında ve otofajide de rol oynayabilir. Bu genin anormal ekspresyonu ve kromozomal translokasyonları, birçok dokuda kanser ilerlemesi ile ilişkilidir.

2.7.1.8. *Cdk6* Geni

Cdk6 geni, hücre döngüsü ve farklılaşmasının kontrolünde rol oynayan serin/treonin-protein kinazın G1/S fazı geçişine katkıda bulunur ve RB'yi fosforile eder. Bir pRB/RB1 kinazı oluşturmak için interfazda sırasında G1 fazındaki G1 siklinleri ile etkileşime girer ve hücre döngüsüne girişi kontrol eder (Beukelaers ve ark., 2011). Hücre farklılaşması sırasında, hücre döngüsünün başlatılması ve devam etmesinde rol oynar. Hücrede proliferasyonu önler fakat spesifik hücre tiplerinin (Eritroid ve hematopoietik hücreler gibi.) proliferasyonu için gereklidir.

2.7.1.9. *Siklin B* Geni

Siklin B geni, hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli bir düzenleyici olarak görev yapar. *Siklin A*'ya bağlı CDK2'nin kinaz aktivitesini inhibe ederek G1 fazında tutuklanmaya neden olur (Toyoshima ve Hunter, 1994).

2.7.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT - PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Kary Mullis tarafından 1985 yılında spesifik bir DNA dizilerini amplifiye etmek için icat edildi. PCR reaksiyonu; denatürasyon, hibridizasyon (annealing) ve uzama (polimerizasyon) olmak üzere temelde üç basamaktan oluşan basit ve enzimatik bir yöntemdir (Garibyan ve ark., 2013).

Denatürasyon evresinde çift iplikli DNA, yüksek sıcaklıkta (94 °C) ayrıştırılarak tek iplik haline getirilir. Bu tek iplikçikler primerler için hedeftir. Sıcaklık düşürülerek hedef bölgenin primerler ile bağlanması sağlanır ve bu evre hibridizasyon (annealing) evresidir. Annealing derecesi sabit olmamakla birlikte, primerin uzunluğuna ve baz içeriğine bağlı olarak değişen bir değerdir. Her primer için ayrı hesaplanması gerekmektedir. Bağlanan primerlerin ardından, DNA polimeraz enziminin hedef bölgeye spesifik bir şekilde bazları eklemesi ve hedef DNA bölgesinin çoğaltılması ise uzama (polimerizasyon) evresi olarak adlandırılır. Bu aşamanın gerçekleştiği sıcaklık genellikle 72 °C'dir. Bu üç evrenin her bir tekrarı sonucunda DNA iki katına çıkar (Stahlberg ve ark., 2012).

Her PCR reaksiyonu hedef bir DNA bölgesinin çoğaltılması için kalıp DNA, nükleotitler, primerler ve DNA polimeraz enzimine ihtiyaç duyar. Nükleotitler, DNA'nın yapısında bulunan adenin, timin, sitozin ve guanin bazlarıdır. Çoğaltılacak hedef DNA dizisini tamamlayan kısa DNA parçaları primer olarak adlandırılır. Primerler her hedef bölge için özel üretilirler ve DNA polimeraz enzimi için uzama noktası sağlarlar. DNA polimeraz enzimi ise nükleotitleri birbirine bağlayarak PCR ürününü meydana getirir. Tüm bu bileşenler belirli miktarlarda reaksiyon tüpünde karıştırılarak 'Thermal Cycler' cihazına koyulur. Böylece DNA amplikasyonu gerçekleştirilir (Garibyan ve ark., 2013).

PCR analizi, DNA dizi analizinde ve DNA haritalanmasında, sistematik ve evrim çalışmalarında, genetik hastalıkların teşhisinde, DNA parmakizi analizinde, adli tıp örneklerinin genetik analizlerinde olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır.

PCR'ın zamanla geliştirilmesiyle gerçek zamanlı PCR (RT - PCR) ortaya çıkmıştır. RT-PCR, adlandırılan teknik gen ekspresyon seviyesinin kantitatif ölçümlerinin yapılmasının sağlar. RT - PCR, sadece DNA'yı belirlemekten ziyade DNA hakkında da bilgi verir. Bu yöntem, DNA'ya nonspesifik olarak bağlanan florasan boyaların (Syber

Green) kullanılması veya florasan etiketli, diziye spesifik olan DNA problemlerinin kullanılmasıyla iki şekilde gerçekleştirilebilir (Matthews ve Kricka, 1988).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı Çalışmaları

Çalışmada kullanılan canlı hayvanlar üzerinde deneyler, 09.09.2020 tarihli 20/123 karar numarasıyla alınmış olan Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) izni ile yapılmıştır. Çalışmada deney hayvanı olarak kullanılan *BALB/c* ırkı erkek fareler, Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Transgenik Hayvan Birimi tarafından üretilmiştir. Fareler, taban alanı 67 sq. In/435 sq.cm olan 191 mm x 292 mm x127 mm kafes ölçülerinde, 12 saat gündüz/gece döngüsünde, oda sıcaklığı 20-24 °C ve nisbi nem miktarı %45-75 olacak şekilde barındırılmıştır. Her bir kafesteki hayvan sayısı, 4 olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.1.1. Deney Hayvanı Gruplarının Oluşturulması ve Beslenmesi

Tez çalışmasında, *BALB/c* ırkı normal dişi ve erkek farenin çiftleşmesiyle meydana gelmiş, yavru farelerden sadece erkek yavrular kullanıldı. Doğumdan 21 gün sonra (anne sütüyle beslenmeden sonra) anne fareden ayrılan yavru fareler kafeslere alındı ve deney grupları; kontrol ve NAC olacak şekilde iki grup olarak belirlendi. Her grupta 10 fare olmak üzere toplam 20 fare kullanıldı. *BALB/c* ırkına ait kontrol grubunda bulunan farelerin beslenmesinde 20 ay boyunca normal (standart pellet) yem ve çeşme suyu kullanıldı. Fakat; NAC grubunda yer alan fareler, 18. aydan itibaren 20. aya kadar NAC içeren su ile *ad libitum* beslenmeye devam etmiştir. Deneyde kullanılmak üzere ayrılan farelerin sağ kalımları, yetersiz beslenme ve yemle beslenme sırasında meydana gelen olumsuzluklar veya farelerin çok yaşlı olması nedeniyle kontrol grubunda hayvan sayısı 7'ye ve NAC grubunda ise hayvan sayısı 9'a düşmüştür.

3.2. Adipoz Dokudan Mezenkimal Kök Hücre Eldesi

3.2.1. Sakrifikasyon ve Adipoz Doku Eldesi

DeneySEL çalışmanın son aşamasına gelindiğinde (20. ayın sonunda), deney hayvanlarına servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi uygulandı. Farelerin ölüm

durumları kontrol edildi. Yaşamına son verilmiş olan fareler, %70'lik ethanol içerisinde birkaç dakika bekletilerek ön sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi ve ardından cerrahi işlemle kontrol ve NAC grubu farelerin adipoz dokuları alındı. Kontrol ve NAC grubu tüm farelerden alınan adipoz dokular, etiketleri yapılmış olan 50 mL'lik falkonlardaki %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (Biological Industries) solüsyonu içerisine aktarıldı. Dokular uygun koşullar altında taşınarak steril laminar hava akış kabin içerisine alındı.

3.2.2. Besiyeri Hazırlanması

Fare adipoz doku mezenkimal kök hücreleri (ADOMKH) için glikoz oranı düşük DMEM (1 g/L Glikoz-Biological Industries) besiyeri içerisine %10 oranında FBS (Biological Industries), %1 oranında Penisilin-Streptomisin, %1 oranında L-Glutamin ve 5 ng/mL bFGF eklendi.

3.2.3. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Falkon tüpler içerisinde yer alan adipoz dokular, iki kez DPBS (1X)'le yıkandı. Her bir doku, steril petri kabı içerisinde bistüri ucu ile fiziksel parçalama işlemiyle 1-2 mm³'lük küçük doku parçalarına ayrıldı ve kan damarları uzaklaştırıldı. Parçalara ayrılan dokular steril 50 mL'lik falkonlara alındı. Daha sonra falkon tüplere tip II kollejenaz (Sigma C6885-25 mg) eklendi ve 37 °C'de 10-15 dakika inkübe edilerek enzimatik aktivite ile hücrelerin bağımsız hale gelmesi sağlandı. Bu basamağın ardından kollejenazın aktivitesini azaltmak için falkon tüpüne soğuk Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen DPBS eklendi. Solüsyon DPBS'le 350 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen ADOMKH'lere ait pelletler, 8-10 mL tam besiyeri içerisinde 75 cm²'lik hücre kültürü flasklarına alındı. Takibinde flasklar %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklığa ve nemli ortama sahip inkübatöre kaldırıldı.

3.2.4. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücrelerin (ADOMKH) Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan adipoz dokudan elde edilen hücreler, CD34-FITC ve CD45-FITC negatif belirteçleriyle ve CD44-FITC pozitif belirteçleri ile işaretlenerek flow sitometrik karakterizasyon yapıldı. Tüplerde bulunan 5x10⁵ ADOMKH, 100 µL BD Cell Wash ile çözülerek üzerine 2'şer µL fluorokrom konjuge antibody eklendi. +4 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 1 kez yıkama yapıldı. Yıkama işleminden sonra hücreler flow

sitometri tüplerine alınarak BD FACS Aria III cihazında analiz edildi. Analiz sonucu değerlendirmeler, BD FACS Diva 8.0.1 programında yapıldı.

3.2.5. Kültürü Yapılan MKH'lerin Çoğaltılması ve Dondurulması

3.2.5.1. Hücrelerin Çoğaltılması

75 cm²'lik flasklara ekilen kontrol ve NAC grubu ADOMKH'ler, inkübatör içerisinde inkübe edildi. Tam besiyeri içerisindeki plastik yüzeye yapışma özelliği gösteren ADOMKH'lere her üç günde bir taze tam besiyeri değişimi yapılarak idame işlemi gerçekleştirildi.

Yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerin 1. pasajı (P1), 5 mL Tripsin-EDTA (1X) solüsyonu (03-054-1B, Biological Industries) kullanılarak 1-3 dakika inkübatör içerisinde bekletildi. Ardından tripsin aktivasyonunun durdurulması için tripsin miktarının %10'u kadar FBS eklendi. Daha sonra hücreler falkon tüp içerisine toplandı ve 350 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 8-10 mL DPBS eklenilerek hücreler resüspanse edildi ve 350 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp pellet 18-20 mL tam besiyeriyle resüspanse edilip 175 cm²'lik flaska alınarak inkübatöre kaldırıldı.

2. Pasajda (P2) yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler 8-9 mL tripsin-EDTA(1X) solüsyon C (03-054-1B, Biological Industries) kullanılarak hücreler flasktan kaldırıldı ve tripsin aktivasyonunun durdurulması için tripsinin miktarının %10'u kadar FBS konularak 350 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti üzerine DPBS eklendi ve 350 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından hücre dondurma işlemine geçildi.

3.2.5.2. Hücrelerin Dondurulması

İlk olarak hücre dondurma işlemi için %70 FBS, %20 DMEM ve %10 DMSO içeren hücre dondurma solüsyonu (Freezing Medium) hazırlandı. 2. Pasajdan (P2) sonra pellet halindeki kontrol ve NAC grubu ADOMKH'lerin üzerine her vialde 1×10^6 hücrenin olduğu son hacmi 1.5 mL olacak şekilde hücre dondurma solüsyonuyla homojenize hale getirilip cryo vial tüplere alındı. Kademeli hücre dondurma işlemi için cryo vial tüpler, Myster Frosty Container içerisine alınarak -20 °C'de bir saat ön soğutma işlemi yapıldı. Daha sonra -80 °C'de bir gün bekletildikten sonra uzun süreli saklama için -196 °C azot tankına kaldırıldı.

3.3. Biyolojik Testler

3.3.1. Senesens İlişkili Beta-Galaktozidaz Aktivite (Senesens) Testi

X-gal Stok Solüsyonu: 200 mg toz formundaki X-gal (Thermo), 5 mL N, N - Dimetilformamid içerisinde çözüldü. Konsantrasyonu 40 mg/mL olan stok solüsyonu uzun süre saklamak amacıyla -80 °C'ye kaldırıldı.

Boyama Solüsyonu: 0.165 gr K₃ [Fe (CN)₆] (Potasyum ferrisiyanür) ve 0.22 gr K₄ [Fe (CN)₆] (Potasyum ferrosiyanür) (Sigma, ABD) hassas terazide tartıldı. Tartılan maddeler 100 mL DPBS içerisinde çözüldü ve üzerine 200 µL 1M MgCl₂ eklendi. pH: 6 olacak şekilde ayarlandı.

Tam Boyama Solüsyonu: Hazırlanan boyama solüsyonundan 19.5 mL alınarak üzerine 500 µL X-gal stok solüsyonu eklenerek toplamda 20 mL tam boyama solüsyonu elde edildi.

Fiksatif Solüsyonu: %0.2 konsantrasyonda 20 mL fiksatif solüsyonu elde etmek için %25 Gluteraldehit'ten (Sigma, ABD) 160 µL alınarak 19.84 mL DPBS'e eklendi.

Kontrol ve NAC grubu hücrelerinin 6 well plate'in her bir kuyucuğuna 1x10⁵ hücre gelecek şekilde ekimi yapıldı ve tutunmaları beklendi. Ekim sonrası tutunup belirli bir yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılıp hücreler DPBS ile yıkandı ve fiksatif solüsyonu eklenerek 15 dakika boyunca fikse edildi. Fiksasyondan sonra yıkanan hücreler (DPBS ile 5'er dakika arayla 3 kez yıkama) tam boyama solüsyonunda, etrafı parafilm ve aliminyum folyo ile kaplanarak 18 saat 37 °C'de inkübe edildi. 18. saatin sonunda hücreler DBPS ile yıkandı ve sonrasında gliserol eklendi. Her kuyucuktaki hücreler sayılarak senesens yüzdesi belirlendi (Debacq-Chainiaux ve ark., 2009). İstatistiksel analiz GraphPad Prism 8 ile yapıldı.

3.3.2. Annexin V Apoptoz Testi

Kontrol ve NAC grubu ADOMKH'ler, 25 cm²'lik flasklara her flaska 2.5x10⁵ hücre gelecek şekilde ekildi. Kontrol ve NAC grubu hücrelerin flaska tutunması ve yeterli yoğunluğa ulaşması için birkaç gün beklendi. Apoptoz testi, Muse Cell Analyzer cihazına ait Annexin V Dead Cell Kit protokolü baz alınarak yapıldı. Hücreler Annexin V/Dead Cell Reagent (Muse-Millipore) ile muamele edilip karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Flasklardaki uygulamaya dahil edilmeyen hücreler Muse Cell Analyzer cihazında test ayarları yapmak ve kapı belirlemek için kullanıldı.

Uygulama yapılan hücreler cihazda okutularak apoptoz yüzdesi belirlendi. Her deney grubu için 3 tekrarlı okuma yapıldı (Koopman ve ark., 1994).

3.3.3. Hücre Döngüsü Testi

Hücre döngüsü testi, Muse™ Cell Cycle Kit protokolü (Merck Millipore, ABD) baz alınarak gerçekleştirildi. Kontrol ve NAC gruplarından 5×10^5 hücre alınarak vorteks yapıldı. Vorteks esnasında hücrelerin üzerine yavaşça 1 mL %70'lik soğuk etanol eklendi ve 1 gece boyunca $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de bekletildi. Fikse edilmiş hücreler 200 μL yeni ependorf tüplere alındı. $300 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp hücre pelleti 250 μL DPBS ile resüspanse edildi. Yeniden $300 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet üzerine 200 μL Muse™ Cell Cycle Reagent (Merck Millipore, ABD) eklendi ve 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Deney gruplarına ait örnekler inkübasyon sonrası Muse™ Cell Analyzer (Merck Millipore, ABD) cihazında her örnek için 3 tekrarlı okuma yapılarak analiz edildi.

3.3.4. Ki67 Proliferasyon Testi

Ki67 testi, Muse Cell Analyzer cihazına ait Ki67 Proliferation Kit (Merck Millipore, ABD) protokolü baz alınarak yapıldı. Ki67 testi için deney grubuna ait ADOMKH'ler, 25 cm^2 'lik flasklara her flaska 2.5×10^5 hücre gelecek şekilde ekildi. Flask içerisinde yeterli yoğunluğa ulaşan kontrol ve NAC grubu hücreleri 15 mL'lik falkon tüplere alınarak $350 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pelleti DPBS ile yıkandı. Her bir örnek üzerine 50 μL 1X fiksasyon solüsyonu eklendi.

Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra hücrelerin ve fiksasyon solüsyonunun bulunduğu tüpün 150 μL 1X assay buffer eklendi. $350 \times g$ ' de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra her tüpe hazır permeabilizasyon solüsyonundan 100 μL eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ardından her tüpe 100 μL assay buffer eklendi. $350 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra her tüpe 50 μL assay buffer eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Bekleme süresi bittikten sonra tüplere 10 μL Hu Ki67-PE antibody eklendi. Antibody ekleme işleminin ardından örnek tüpleri oda sıcaklığında 30 dakika beklemeye bırakıldı. Tüplere 150 μL assay buffer eklendi ve örnekler Muse Cell Analyzer cihazında her grup için 3 tekrarlı okuma yapılarak Ki67 proliferasyon testi tamamlandı.

3.4. Moleküler Genetik Analizler

3.4.1. RNA İzolasyonu

Kontrol ve NAC gruplarına ait 5×10^6 hücre içeren pellet alındı. RNA izolasyon işlemi, NucleoSpin® RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel, İsviçre) protokolüne göre yapıldı. İlk olarak hücrelerin homojenizasyonu gerçekleştirildi. Pellet halindeki hücrelerin üzerine 350 μ L RA1 Buffer ve 3,5 μ L β -Merkaptoetanol eklendi. Vorteks yapılarak homojen bir lizat elde edildi. Kit içeriğinde yer alan NucleoSpin® RNA filtresi, bir toplama tüpüne (2 mL'lik) yerleştirilerek homojenize olmuş hücrelerin filtreden geçmesi için 11.000 x *g*'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından filtre atılarak homojenize lizata 350 μ L %70'lik etanol eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.

Karışım yeni bir mikrosantrifüj tüpüne (1,5 mL'lik) aktarıldı ve 350 μ L %70'lik etanol eklendi. Vorteks yapılarak karıştırıldı. Toplama tüpüne yerleştirilmiş bir NucleoSpin® RNA kolonuna lizat yüklendi ve 11.000 x *g*'de 30 saniye santrifüj edildi.

Kolon yeni bir toplama tüpüne (2 mL'lik) yerleştirildi ve üzerine 350 μ L MDB (Membrane Desalting Buffer) eklendi. Membranı kuruyana kadar 11.000 x *g*'de 1 dakika santrifüj işlemi yapıldı. 1,5 mL mikrosantrifüj tüpü içerisine rDNaz için 90 μ L Reaction Buffer'a 10 μ L sulandırılmış rDNaz eklenerek DNaz reaksiyon karışımı hazırlandı.

Karışımdan 95 μ L alınarak kolonun silika membranının merkezine aktarıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Ardından silika membran yıkandı. Yıkama işlemi 3 kez yapıldı. İlk yıkama için NucleoSpin® RNA kolonuna 200 μ L RAW2 Buffer eklendi ve 11.000 x *g*'de 30 saniye santrifüj yapıldı.

Kolon yeni bir toplama tüpüne (2 mL'lik) yerleştirilerek üzerine 600 μ L RA3 Buffer eklendi. Ardından 11.000 x *g*'de 30 saniye santrifüj edildi ve kolon yeni toplama tüpüne alındı. 250 μ L RA3 Buffer eklendi. Membran tamamen kuruyana kadar 11.000 x *g*'de 2 dakika santrifüj edildi. Daha sonra kolon nükleaz içermeyen bir toplama tüpüne (1.5 mL'lik) yerleştirildi. Son olarak, kolon üzerine 60 μ L RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika boyunca 11.000 x *g*'de santrifüj edilerek RNA elüsyon işlemi gerçekleştirildi.

3.4.2. RNA'dan cDNA Sentezi

Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000, ABD) cihazı ile RNA konsantrasyon ve saflık ölçümü yapıldı. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher

Scientific, ABD) protokolü baz alınarak konsantrasyonları belirlenen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Tablo 3.1’de verilen miktarlarda cDNA reaksiyon içeriği buz üzerinde hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı, NAC ve kontrol grubu olarak etiketlenen 2 PCR tüpüne 10’ar μL dağıtıldı. Tablo 3.2’de verilen parametrelerde revers transkripsiyon, Thermal Cycler (Sensoquest, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Protokoldeki işlemler tamamlandıktan sonra cDNA örnekleri kullanılacağı süreye kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de saklandı.

Tablo 3.1. cDNA izolasyon karışımı.

cDNA Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (μL)
Reverse Transkriptaz Solüsyonu (10X)	2
dNTP Mix	0.8
Random Primer	2
Transkriptaz	1
Nükleaz İçermeyen Su	4.2
Total	10

Tablo 3.2. RT - PCR cihazı parametreleri.

Parametreler	1.Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	25 $^{\circ}\text{C}$	37 $^{\circ}\text{C}$	85 $^{\circ}\text{C}$	4 $^{\circ}\text{C}$
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.4.3. Real Time PCR (RT - PCR)

Kontrol ve NAC grubu farelerin gen ekspresyon değişiminin incelenmesi amacıyla Roche LightCycler 480 II cihazında iQTM Syber® Green Supermix Manuel (Biorad, ABD) kiti kullanılarak RT - PCR çalışmaları gerçekleştirildi. Tablo 3.3’te içeriği verilen reaksiyon karışımı, cDNA’lar hariç olacak şekilde iki grubun (Kontrol ve NAC) örneği için hazırlandı. 96 kuyucuklu plağa hazırlanan karışım bütün kuyucuklara 13’er μL olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra üzerine 2’şer μL cDNA’lar eklendi. Kuyucukların üzeri kapatıldı ve santrifüj edilerek cihaza yerleştirildi. PCR çalışmaları, Tablo 3.4’teki

parametrelere göre gerçekleştirildi. RT - PCR çalışmalarında kullanılan primerlere ait bilgiler, Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.3. RT - PCR karışımı

RT - PCR Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µL)
Syber Green Supermix (2X)	7.5
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
Nükleaz İçermeyen Su	3.5
cDNA	2
Total	15

Tablo 3.4. RT - PCR parametreleri

Analiz modu	Döngü	Bölüm	Sıcaklık Değişim Hızı (°C/s)	Hedef Sıcaklık	Süre	Ölçüm
Denatürasyon						
Yok	1	-	4.4 (°C/s)	95 °C	15 dakika	Yok
Çoğalma						
Miktar ölçümü	38	Bozunma	4.4 (°C/s)	95 °C	15 saniye	Yok
		Bağlanma	2.2 (°C/s)	58 - 62 °C	30 saniye	Yok
		Uzama	4.4 (°C/s)	72°C	30 saniye	Tek
Soğuma						
Yok	1	-	2.2 (°C/s)	50 °C	10 saniye	Yok
Melting curve						
	1	-	0.11 (°C/s)	95 °C	-	-

RT - PCR çalışmasından elde edilen Ct değerlerinin analizi yapıldıktan sonra ifade değişimleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak belirlendi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri aşağıda gösterilen formül kullanılarak hesaplandı:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[NAC \text{ grubu geni (Hedef gen CT'si-Referans gen CT'si)-Kontrol grubu geni(Hedef gen CT'si-Referans gen CT'si)]}$$

Bu denklem sonucuna göre elde edilen değerler, 0,9 ile 1,1 aralığına göre değerlendirildi.

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan hücre döngüsü, senesens ve apoptoz ilişkili genler

Genler	Primer Dizisi	PCR Ürünü Uzunluğu (bp)
<i>Gapdh</i>	5' CCCAGCTTAGGTTTCATCAGGTA 3' 5' TACGGCCAAATCCGTTTACA 3'	91
<i>P53</i>	5' CACTCCATGGCCCCTGTCATCT 3' 5' TGAGGGGAGGAGAGTACGTG 3'	128
<i>P21</i>	5' GCAAAGTGTGCCGTTGTCTC 3' 5' CGTCTCCGTGACGAAGTCAA 3'	128
<i>Rb1</i>	5' ACCCAGCAGTGC GTTATCTAC 3' 5' TTGTATGGCTCTCTGAGTAGTGC 3'	192
<i>Atm</i>	5' TCACCAGAGGATGCTGTTTAC 3' 5' TGCTTCACACACCCGTTTTC 3'	182
<i>Bax</i>	5' GCAATATGGAGCTGCAGAGGAT 3' 5' GCCTTGAGCACCAGTTTGCTAG 3'	157
<i>Bcl-2</i>	5' TCTTTGAGTTCGGTGGGGTC 3' 5' AGTTCCACAAAGGCATCCCAG 3'	154
<i>Cdk6</i>	5' TCGTGATCTGAAACCGCAGA 3' 5' TGCAAAGATGCAACCGACAC 3'	202
<i>Siklin B</i>	5' GGTTGATAATCCCTCTCCAAGC 3' 5' TCTGCGTCTACGTCACTCACT 3'	114

3.5. İstatiksel Analiz

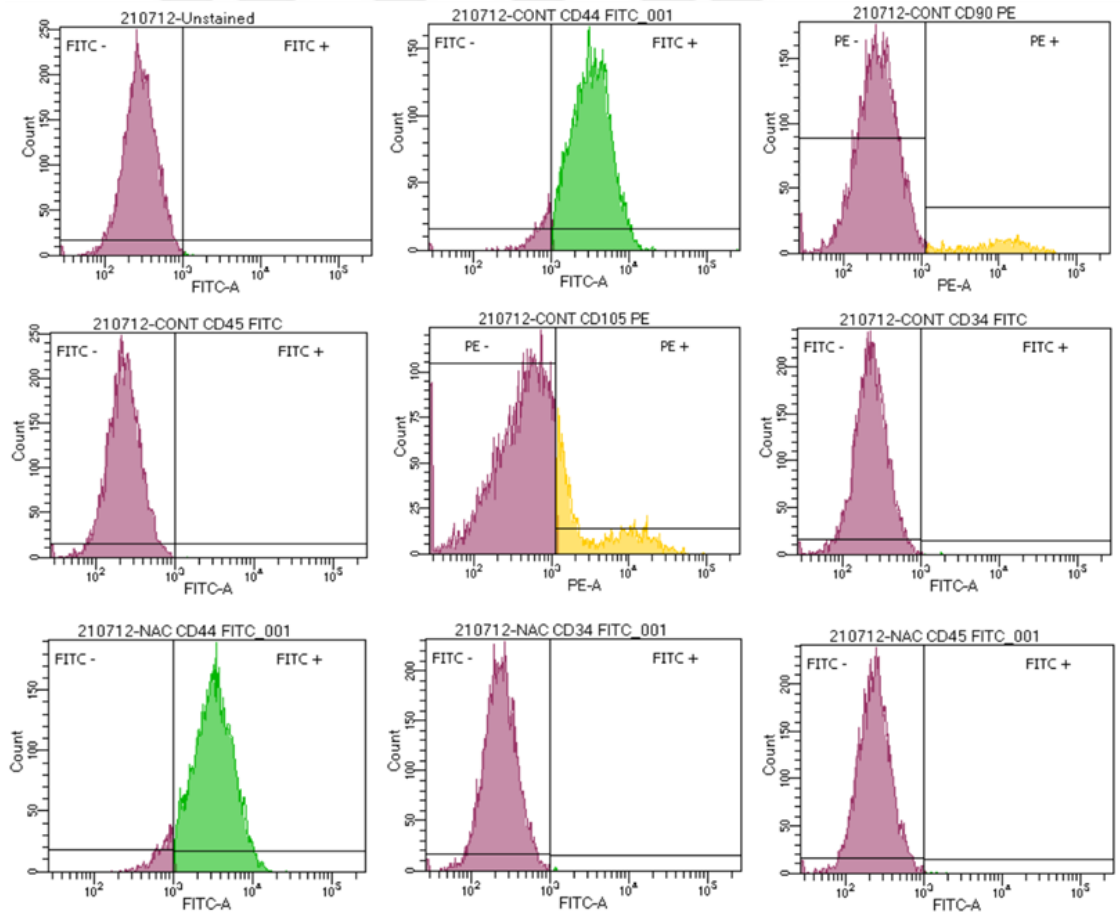
Bu çalışmada, biyolojik testlerden elde edilen bulgular sonucu deney grupları arasındaki farkların anlamlılığını belirlemek için yapılan istatistiksel analizler GraphPad Prism 8.0.2. (GraphPad Prism, San Diego, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre döngüsü, apoptoz ve proliferasyon testinde Two way Anova senesens testinde ise T-test metodu kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. $[0.01 \leq p < 0.05 (*)$: İstatistiksel anlamlılık. $0.001 \leq p < 0.01 (**)$: Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. $p < 0.001 (***,****)$: Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. $0.05 \leq p < 0.10$: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.

4. BULGULAR

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları ve Biyolojik Testler

4.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Karakterizasyon Bulguları

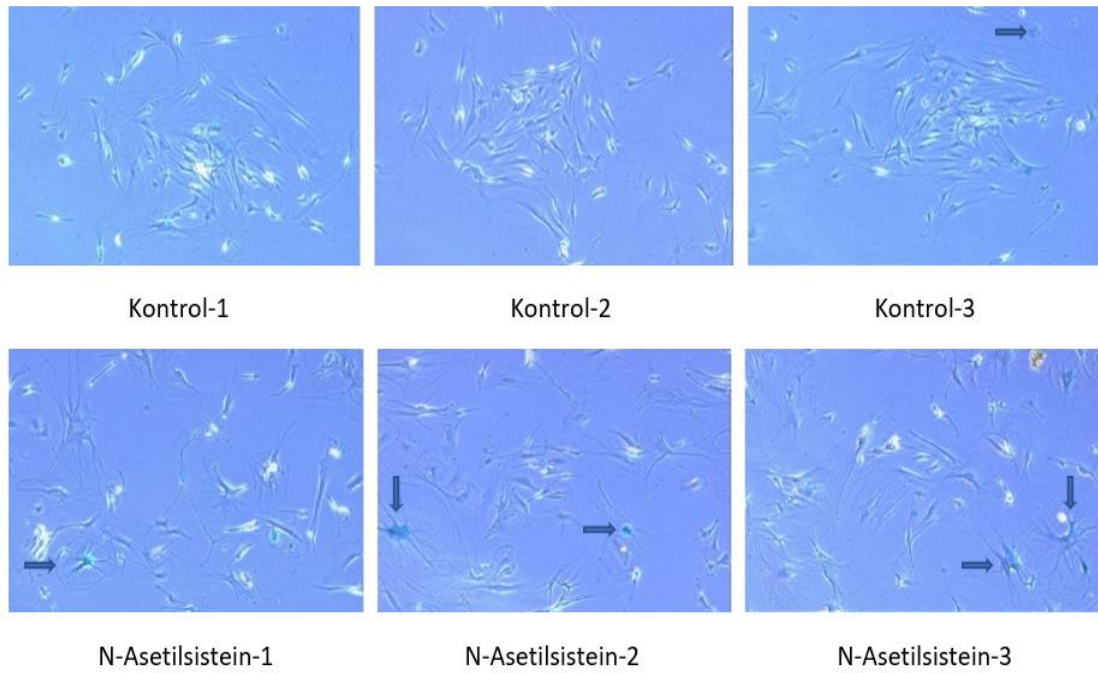
Primer kültür izolasyonu yapılan MKH'ler, biyolojik testlere başlamadan önce MKH belirteçleri ile karakterize edilmiştir. Flow sitometri (BD Facs Aria III) analizine göre, kontrol grubundan elde edilen MKH'ler pozitif belirteçlerden CD44 için %92.4, negatif belirteçlerden CD34 için %99.7 ve CD45 için %99.7 olarak belirlenmiştir. NAC grubundan elde edilen MKH'ler pozitif belirteçlerden CD44 için %92.1, negatif belirteçlerden CD34 için %99.8 ve CD45 için %99.6 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. CD44 pozitif, CD34 ve CD45 negatif belirteçleri ile yapılan MKH'lerin karakterizasyon bulguları.

4.1.2. Senesens İlişkili Beta-Galaktozidaz Aktivite Testi Bulguları

Bu tez çalışmasında, kontrol ve NAC grubundaki farelere ait ADOMKH'lerin senesens hücre yüzdesini belirlemek için senesens ilişkili β -Gal testi kullanılmıştır. Hücrelerin morfolojik özellikleri de baz alınarak (yayvan şekil, çoklu çekirdek gibi) senesens hücreler belirlenmiştir (Şekil 4.2). Belirlenen mavi renkli senesens hücreler sayılarak hücre yüzdesi hesaplanmıştır (Tablo 4.1).



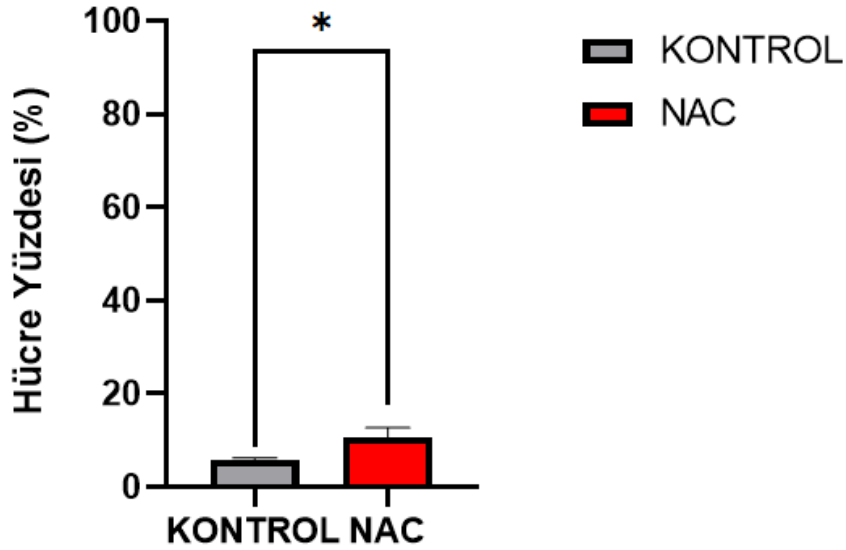
Şekil 4.2. Kontrol ve NAC grubuna ait ADOMKH'lerin β -Gal boyama görüntüleri.

Senesens testi bulgularına göre kontrol grubundaki ortalama hücre oranı, %5.6 iken NAC grubunda bu oran %10.6 tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla NAC grubu senesens hücre miktarında %5 oranında bir artış gözlemlenmiştir (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Kontrol ve NAC grubundan elde edilen ADOMKH'lerin Senesens İlişkili β -Gal Testi sonuçları.

Deney Grupları	β -Gal Pozitif Hücre Yüzdesi
Kontrol Grubu	%5.6
NAC grubu	%10.6

Bu tez çalışmasına ait verilerin istatistiksel analizi sonucunda, Kontrol ve NAC gruplarında senesens hücre yüzdesi arasında istatistiksel anlamlılık (*) gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).

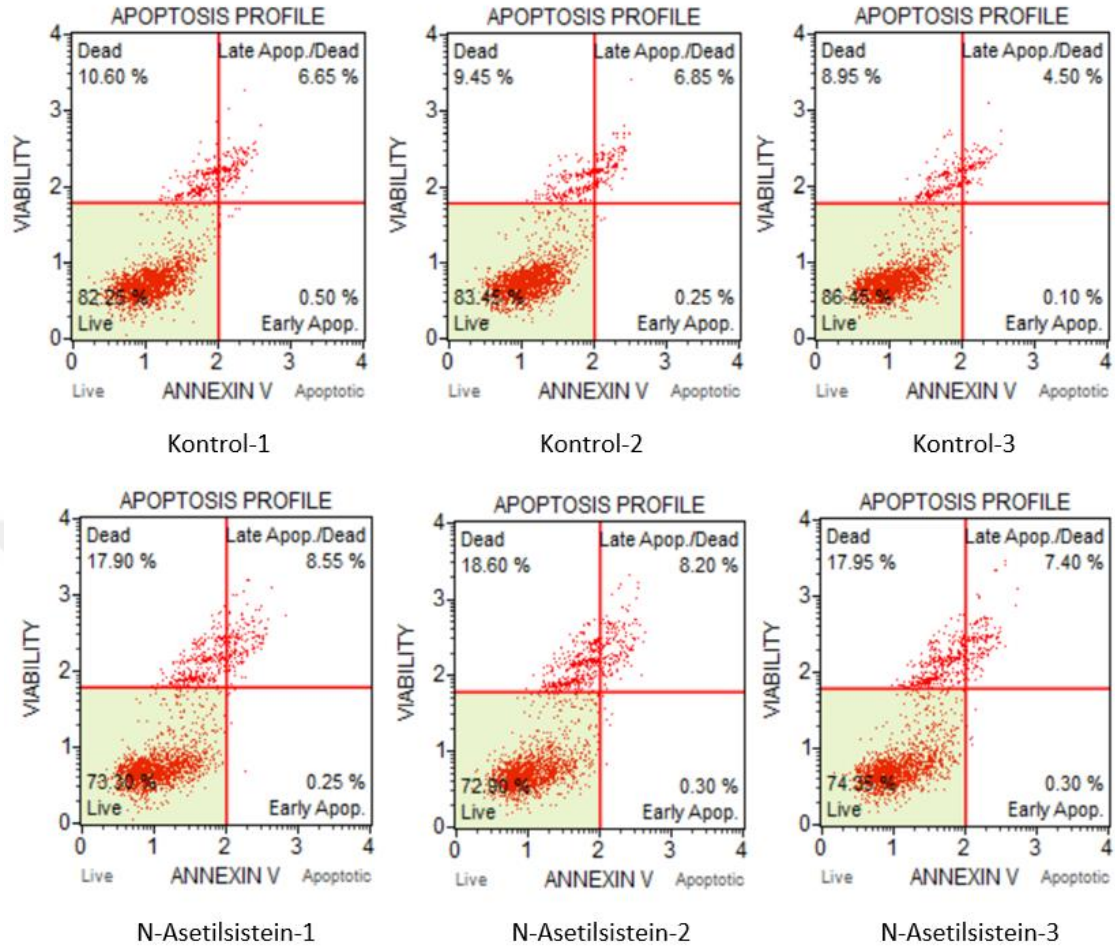


Şekil 4.3. Senesens ilişkili β -Gal Testi sonuçlarına göre Kontrol ve NAC grubu ADOMKH'lere ait senesent hücre oranları.

[0.01 $\leq$ p < 0.05 (*): İstatistiksel anlamlılık. 0.001 $\leq$ p < 0.01 (**):Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. p < 0.001 (***,****): Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. 0.05 $\leq$ p 0.10: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.]

4.1.3. Annexin V Apoptoz Testi Bulguları

Deney gruplarında yer alan ADOMKH'lerin apoptoz oranını belirlemek amacıyla Annexin V boyama yapılmıştır (Şekil 4.4).



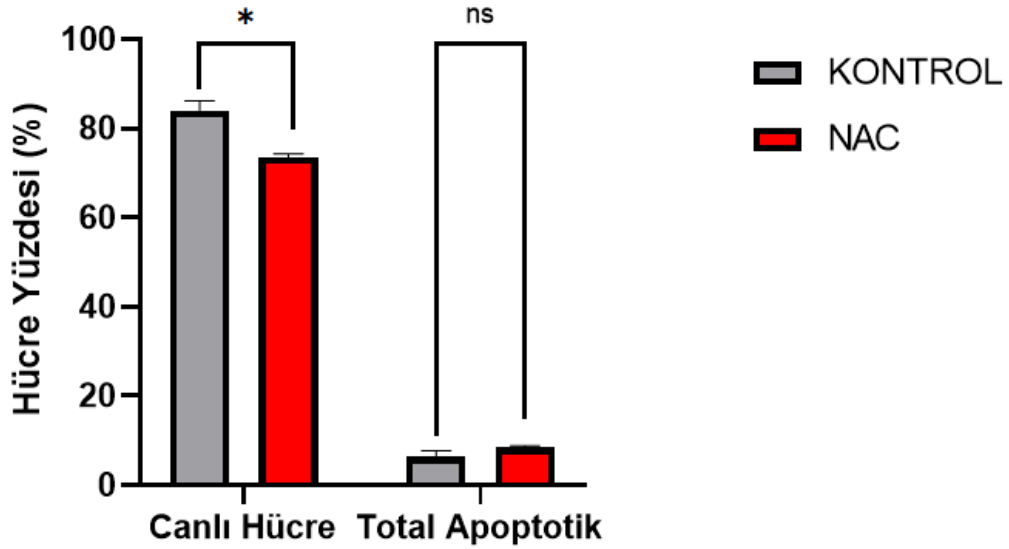
Şekil 4.4. Annexin V Apoptoz Testine ait bulgular.

Tez çalışması bulgularına göre, kontrol grubundaki ortalama apoptoz oranı %6.28 iken NAC grubunda %8.33 olarak belirlenmiştir. NAC grubu apoptoz oranında kontrol grubu apoptoz oranına göre %2 oranında bir artış gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda bulunan ortalama canlı hücre yüzdesi %84.05 oranında iken, NAC grubunda bu oran %73.53'tür (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Annexin V Apoptoz Testi sonuçları.

Deney Grupları	Canlı Hücre Yüzdesi	Total Apoptotik Hücre Yüzdesi
Kontrol Grubu	%84.05	%6.28
NAC Grubu	%73.53	%8.33

Bu tez çalışmasına ait verilerin istatistiksel analizi sonucunda, kontrol ve NAC gruplarında canlı hücre yüzdesi arasında istatistiksel anlamlılık (*) gözlemlenmiştir. Total apoptotik hücre oranına bakıldığında ise, bu iki grup arasında anlamlı bir farkın olmadığı (ns) gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).

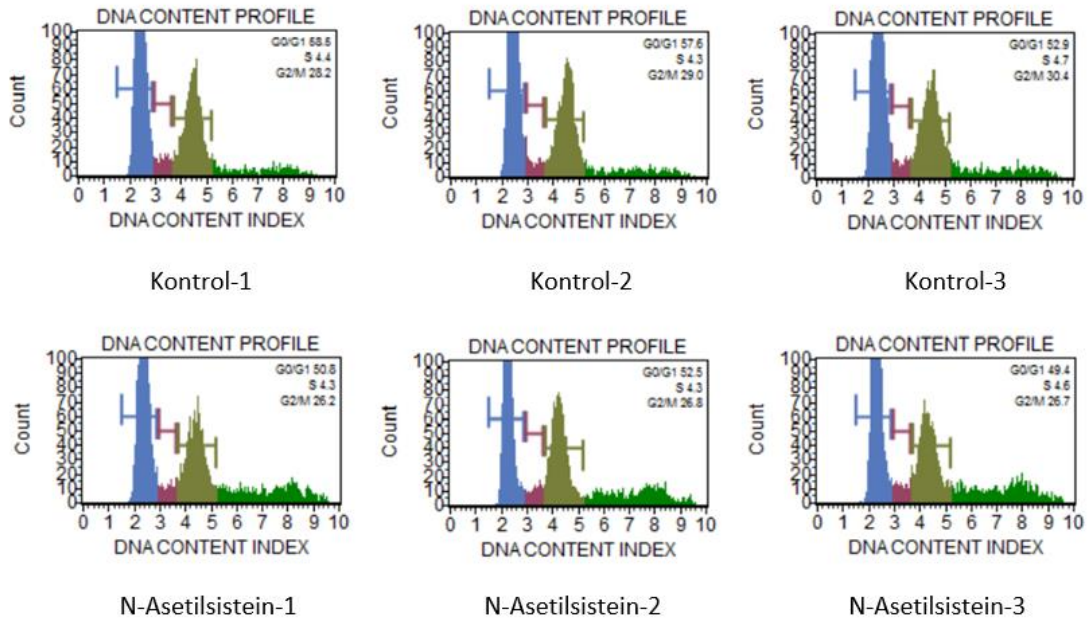


Şekil 4.5. Annexin V Apoptoz Testi sonuçlarına göre Kontrol ve NAC grubuna ait ADOMKH'lerin canlı ve total apoptotik hücre oranları.

[0.01 ≤ p < 0.05 (*): İstatistiksel anlamlılık. 0.001 ≤ p < 0.01 (**):Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. p < 0.001 (***,****): Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. 0.05 ≤ p < 0.10: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.]

4.1.4. Hücre Döngüsü Testi Bulguları

Deney gruplarında yer alan ADOMKH'lerin G0/G1, S ve G2/M fazındaki hücre oranını belirlemek amacıyla hücre döngüsü testi yapılmıştır (Şekil 4.6).



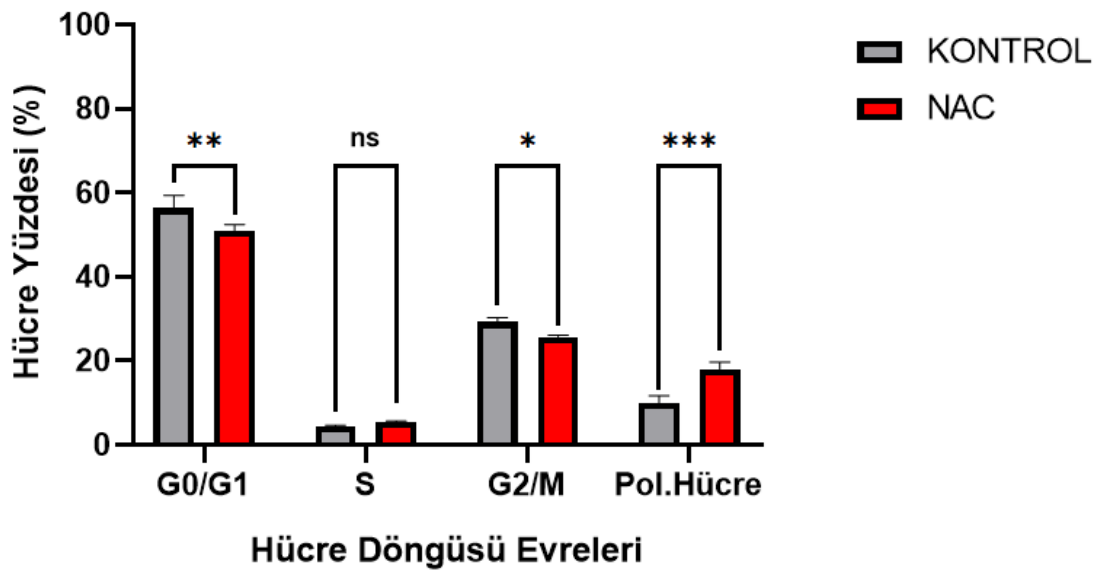
Şekil 4.6. Hücre Döngüsü Testi Bulguları.

Tez çalışması bulgularına göre, G0/G1 fazında kontrol grubundaki ortalama hücre oranı %56.33 iken NAC grubunda bu oran %50.9'a düşerek yaklaşık %6 oranında bir azalma gözlemlenmiştir. S fazına değerleri incelendiğinde, kontrol grubundaki ortalama hücre oranı %4.46 iken bu oran NAC grubunda artış göstererek %5.36 olarak belirlenmiştir. G2/M fazında ise kontrol grubu ortalama hücre oranı %29.2 iken NAC grubunda bu oran %25.7 olarak ölçülmüştür. G2/M fazında kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda %3.5'lik bir azalma saptanmıştır. Bunlara ek olarak, polinükleer hücre varlığı da tespit edilmiştir. Kontrol grubunda polinükleer hücre oranı %10.1 iken, NAC grubunda bu oran %18.04 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda %8 oranında daha fazla polinükleer hücre tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hücre Döngüsü Testi sonuçları.

Deney Grupları	Hücre Döngüsü Evreleri			Polinükleer Hücre
	G0/G1	S	G2/M	
Kontrol Grubu	%56.33	%4.46	%29.2	%10.1
NAC Grubu	%50.9	%5.36	%25.7	%18.04

Bu tez çalışmasına ait verilerin istatistiksel analizi sonucunda, kontrol ve NAC gruplarında hücre döngüsünün G0/G1 fazındaki hücre yüzdesi arasında yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (**) gözlemlenmiştir. S fazındaki hücre oranına bakıldığında ise bu iki grup arasında anlamlı bir farkın olmadığı (ns) gözlemlenmiştir. G2/M fazındaki hücre yüzdeleri incelendiğinde bu iki grup arasında istatistiksel anlamlılık (*) olduğu tespit edilmiştir. Son olarak polinükleer hücre yüzdelere bakıldığında ise bu iki grup arasında çok yüksek düzey istatistik anlamlılık (***) bulunmuştur (Şekil 4.7).

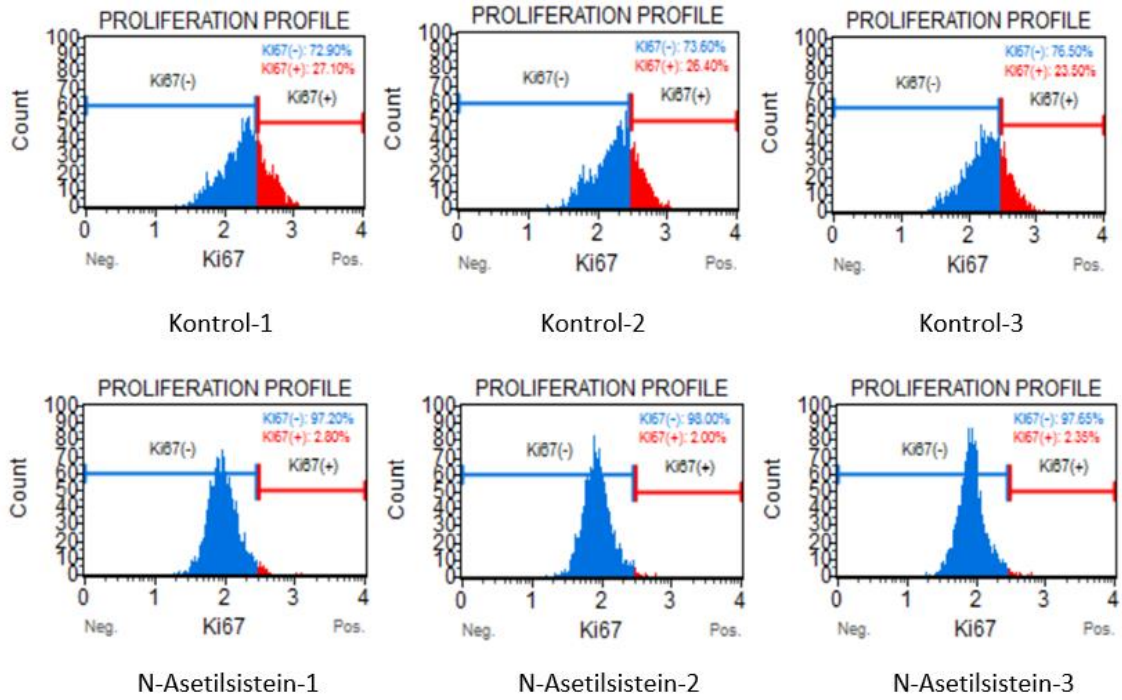


Şekil 4.7. Hücre Döngüsü Testi sonuçlarına göre, Kontrol ve NAC grubuna ait ADOMKH'lerin G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre oranları.

[0.01 ≤ p<0.05 (*): İstatistiksel anlamlılık. 0.001 ≤ p<0.01 (**): Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. p<0.001 (***,****): Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. 0.05 ≤ p 0.10: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.]

3.1.5. Ki67 Proliferasyon Testi Bulguları

Kontrol ve NAC grubuna ait ADOMKH'lerin proliferasyon düzeyini belirlemek amacıyla Ki67 proliferasyon testi yapılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Ki67 Proliferasyon Testi sonuçları.

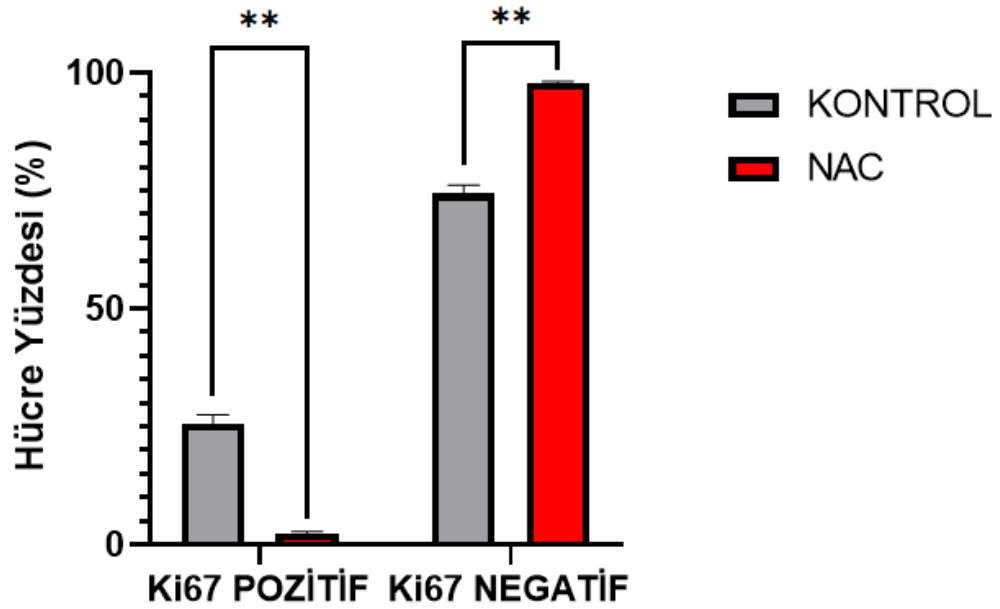
Tez çalışması bulgularına göre, ortalama Ki67 (+) hücre oranı kontrol grubunda %25.66 iken NAC grubunda bu oran %2.4 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda Ki67 (+) hücre oranında %23 oranında bir azalış gözlemlenmiştir. Ki67 (-) hücre oranlarına bakıldığında, kontrol grubu Ki67 (-) hücre oranı %74.33 iken NAC grubunda bu oran %97.96 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda Ki67 (-) oranında yaklaşık %27 oranında bir artış gözlemlenmiştir (Tablo 4.4)

Tablo 4.4. Ki67 Proliferasyon Testi sonuçları.

Deney Grupları	Ki67 (+) Hücre	Ki67 (-) Hücre
Kontrol Grubu	%25.66	%74.33
NAC Grubu	%2.4	%97.96

Tez çalışmasına ait verilerin istatistiksel analizi sonucunda, kontrol ve NAC gruplarındaki Ki67 (+) hücre yüzdesi arasında yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (**)

gözlemlenmiştir. Bu iki grubun Ki67 (-) hücre yüzdesi arasında da yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (**) gözlemlenmiştir. Kontrol grubu, NAC grubuna göre daha fazla proliferasyon olmuştur (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. Ki67 Proliferasyon Testi sonuçlarına göre, Kontrol ve NAC grubuna ait ADOMKH'lerin Ki67 (+) ve Ki67 (-) hücre oranları.

[0.01 ≤ p<0.05 (*): İstatistiksel anlamlılık. 0.001 ≤ p<0.01 (**): Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. p<0.001 (***,****): Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık. 0.05 ≤ p 0.10: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.]

4.2. Genetik Analiz Bulguları

4.2.1. RNA İzolasyon Bulguları

Kontrol ve NAC gruplarına ait MKH'lerin RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri, Nanodrop 2000 cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile ölçülmüştür. Çalışma bulgularına göre, NAC grubunda RNA konsantrasyonu 45.3 ng iken, saflık değeri 2.23 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda RNA konsantrasyonu 42.6 ng iken, saflık değeri 2.18 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Deney gruplarına ait RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri.

Deney Grupları	RNA Konsantrasyonu (ng)	Saflık-A (260/280)
NAC Grubu	45.3	2.23
Kontrol Grubu	42.6	2.18

4.2.2. Hücre Döngüsü, Senesens ve Apoptoz ile İlişkili Genlerin RT - PCR Analizi Bulguları

Senesens, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili genlerin cDNA'ları kullanılarak RT - PCR analizi yapılmıştır. Tez çalışmasından elde edilen bulgulara göre, *P53* geninin ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda %93 oranında artmıştır. *P21* ve *Rb1* genlerinin ekspresyon seviyesinde ise kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda %128 oranında bir artış gözlemlenmiştir. *Atm* geninin ekspresyon ifadesi incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda %51 oranında artış mevcuttur. *Bax* geninin ekspresyon ifadesi, kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda %173 oranında artış göstermiştir. *Bcl-2* gen ekspresyon seviyesinde ise kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda %133 oranında bir artış gözlemlenmiştir. *Cdk6* gen ekspresyon seviyesine bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda %243 oranında bir artış gözlemlenmiştir. Son olarak *Siklin B* geninin ekspresyonu seviyesi incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda %136 oranında bir artış gözlemlenmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Çalışmada kullanılan genlere ait RT - PCR Analizi sonuçları.

GEN	HÜCRE	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Değişen/No Değişmeyen (0.9-1.1)
P53	NAC ADOMKH	-10.43	-0.95	1.93	%93 Artış
	KONTROL ADOMKH	-9.48	0	1	
P21	NAC ADOMKH	-12.51	-1.19	2.28	%128 Artış
	KONTROL ADOMKH	-11.32	0	1	
Rb1	NAC ADOMKH	-9.49	-1.19	2.28	%128 Artış
	KONTROL ADOMKH	-8.3	0	1	
Atm	NAC ADOMKH	-7.33	-0.59	1.51	%51 Artış
	KONTROL ADOMKH	-6.8	0	1	
Bax	NAC ADOMKH	-12.54	-1.45	2.73	%173 Artış
	KONTROL ADOMKH	-11.09	0	1	
Bcl-2	NAC ADOMKH	-6.76	-1.22	2.33	%133 Artış
	KONTROL ADOMKH	-5.54	0	1	
Cdk6	NAC ADOMKH	-8.47	-1.78	3.43	%243 Artış
	KONTROL ADOMKH	-6.69	0	1	
Siklin B	NAC ADOMKH	-8.67	-1.24	2.36	%136 Artış
	KONTROL ADOMKH	-7.43	0	1	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Mezenkimal kök hücreler (MKH), standart koşullar altında kültüre edildiklerinde plastik yüzeye yapışabilen, kendi kendini yenileyebilen ve çok çeşitli mezodermal soylara farklılaşma yeteneğine sahip multipotent progenitör hücrelerdir (Pittenger ve ark., 1999; Kadivar ve ark., 2006). Farklılaşma ve yüksek parakrin etki potansiyellerine bağlı olarak MKH'ler, immünomodülatör yetenekleri, yara ve neoplazmaya yönelik hedef arama ve doku onarım yetenekleri nedeniyle geniş bir terapötik potansiyele sahiptir ve rejeneratif tıpta sıklıkla kullanılırlar (Kang ve ark., 2008; Ponte ve ark., 2007).

En iyi çalışılan ve erişimi kolay MKH kaynağı kemik iliği olarak bilinmesine rağmen MKH'ler; diş pulpası, plasenta, amniyotik sıvı, umbilikal kord ve umbilikal kordda bulunan Wharton jeli gibi çok çeşitli dokulardan da izole edilmektedir (Igura ve ark., 2004; Wang ve ark., 2004). Bunlara ek olarak, bir diğer önemli MKH kaynağı ise adipoz dokudur (Zuk ve ark., 2002). Adipoz dokudan elde edilen MKH oranı, kemik iliğine göre daha fazladır ve MKH elde etme yöntemi daha kolaydır. Bu sebeple, tez çalışmasında adipoz doku orijinli mezenkimal kök hücreler (ADOMKH) kullanılmıştır.

MKH'ler kültür ortamında rahatlıkla çoğaltılabilirler. Fakat diğer hücrelerde olduğu gibi bu hücrelerin de belirli bir proliferasyon kapasitesi ve maksimum bölünme limiti vardır. Bu maksimum bölünme limitine "Hayflick Limiti" denir (Reddel, 2000). MKH'lerin proliferasyon kapasitelerini sınırlandıran bir mekanizmalardan birisi senesensdir.

Senesens; telomer kısalması, reaktif oksijen türleri, telomerik olmayan DNA hasarı, kromatin organizasyonunun değişmesi ve aşırı mitojenik sinyaller gibi çeşitli faktörler sonucu indüklenebilen hücre bölünmesinin kalıcı olarak inhibe eden fizyolojik bir süreçtir (Campisi ve di Fagagna, 2007). Çeşitli senesens mekanizmaları vardır. Fakat bu

mekanizmaların ortak noktası, artan siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörlerinin RB aile üyelerinin aktif hale getirilmesiyle hücre döngüsünün bloklanması temeline dayanır.

Hücreler için diğer önemli mekanizma ise, apoptozdur. Programlanmış bir hücre ölümü süreci olan apoptoz, neredeyse tüm hücre tiplerinin gelişimi ve morfogenez için, hücre sayısının kontrolünün sağlanması ve senesent hücrelerin yok edilmesi için gerekli bir mekanizmadır (Vaux ve Korsmeyer, 1999).

N - asetilsistein (NAC), akciğer, deri, karaciğer ve kolon dahil olmak üzere çeşitli organlarda anti-mutajenik ve anti-tümörojenik etki gösteren kemopreventif bir ajan olarak bilinir (De Flora ve ark., 1986; Izzotti ve ark., 1994). NAC, hücre içi tiyol ve antioksidan olan glutatyon (GSH) öncüsüdür. Böylece NAC, antioksidan olarak, tek başına ya da dolaylı olarak reaktif oksidatif ara ürünlerini temizlemede görev alır (Aruoma ve ark., 1989). NAC, küçük bir molekül olması sebebiyle hücreler tarafından kolaylıkla alınabilir. Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, NAC uygulamasının P21WAF1/CIP1 ve p16INK4a gen ifadesini yukarı regüle ettiğini ve p16INK4a yoluyla G1 fazında hücre döngüsü durmasını indüklediği belirtilmiştir (Liu ve ark., 1999).

Literatür bilgilerinden yola çıkarak, NAC'ın potansiyel olarak senesensin neden olduğu dejeneratif süreçlerde etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında, NAC uygulamasının MKH senesensi üzerindeki biyolojik etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, 20 aylık kontrol ve NAC grubu farelerden elde edilen MKH'ler kullanılmıştır. İlk olarak MKH'lerin primer kültürü yapılmıştır. Kültüre edilen MKH'lerin karakterizasyonu flow sitometri kullanılarak yapılmıştır.

Sung ve arkadaşları *BALB/c* ırkı farelerden izole ettiği adipoz doku orijinli MKH'lerin karakterizasyonu için CD34, CD44 ve CD45 dahil olmak üzere birçok belirteç kullanmışlardır. Çalışma sonucunda CD34 ve CD45 belirteçlerinin negatif, CD44 belirtecinin ise pozitif ifade edildiğini göstermişlerdir (Sung ve ark., 2008). Bu tez çalışmasında, kontrol ve NAC grubu MKH'lerin karakterizasyonu CD44, CD34 ve CD45 belirteçleri kullanılarak yapılmıştır. Karakterizasyon sonucunda çalışmada kullanılan hücrelerin, saf MKH'ler olduğu doğrulanmıştır ve MKH'lerin kök hücre karakterlerini kaybetmedikleri gözlemlenmiştir.

Karakterizasyondan sonra hücreler; senesens, hücre döngüsü apoptoz ve Ki67 proliferasyon gibi çeşitli biyolojik testlere tabi tutulmuştur. Senesens testi sonucunda kontrol grubunda %5.6 senesent hücre ve NAC grubunda %10.6 senesent hücre

belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda, kontrol grubuna göre NAC grubu MKH'lerde senesens mekanizmasının daha aktif olduğu gözlemlenmiştir.

Senesent bir MKH'nin belirteçlerinden birisi de hücre döngüsünün durmasıdır. NAC uygulamasının senesent MKH'lerin hücre döngüsü üzerinde nasıl bir etki oluşturduğunu gözlemlemek amacıyla hücre döngüsü testi yapılmıştır. Yapılan test bulgularına göre, G0/G1 ve G2/M fazında hücre oranı kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda azalmıştır. S fazındaki hücre oranı incelendiğinde ise NAC grubunda artış gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, kontrol grubuna kıyasla NAC uygulanan grupta %8 oranında daha fazla polinükleer hücre tespit edilmiştir. NAC grubunda polinükleer hücre sayısının fazla olması, NAC uygulanan hücrelerin bölünmeye zorlandığının fakat hücre bölünmesinin tam olarak gerçekleşmediğinin göstergesidir. Senesent hücreler, sürekli büyüyen ve çok çekirdekli morfolojik yapıya sahip olan hücrelerdir (Kuilman ve ark., 2010). NAC grubunda fazla miktarda çok çekirdekli hücrenin tespit edilmesi, senesensin göstergesidir. Sonuç olarak, NAC'ın senesense neden olduğu gözlemlenmiştir.

Alessio ve arkadaşları senesent fenotipe sahip bir hücreyi net bir şekilde tanımlamak için β -gal aktivitesine ek olarak, Ki67 ifadesinin de değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (Alessio ve ark., 2021). MKH'lerin proliferasyon oranını belirlemek amacıyla Ki67 testi yapılmıştır. Yaptığımız çalışmada proliferasyon testi verileri incelendiğinde, kontrol grubu Ki67 (+) hücre oranı %25.66 iken NAC grubunda bu oran %2.4'tür. Kontrol grubuna kıyasla NAC grubu Ki67(+) hücre oranında %23.26'lık bir azalış söz konusudur.

Proliferasyon testi sonuçlarına göre, NAC uygulanan hücrelerde proliferasyonun azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum iki farklı şekilde açıklanabilir. İlk olarak, NAC grubunda yüksek oranda polinükleer hücrelerin olması, Ki67 (+) hücre oranının az olması sonucunu destekler niteliktedir. Endl ve arkadaşları, kültüre edilmiş hücrelerde Ki67 düzeyinin en yüksek G2 fazında ve mitozda bulunduğunu belirtilmişlerdir (Endl ve Gerdes, 2000). Mitozda sitokinezin gerçekleşmemesi sonucu oluşan polinükleer hücreler, hücre döngüsünün tamamlanamadığını ve böylece Ki67 ifadesinin azaldığının göstergesidir.

İkinci durum ise hücre proliferasyonu ve senesens ilişkisidir. Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, hücrede senesens mekanizmasının aktif hale gelmesi sonucunda hücre proliferasyonunun azaldığı belirtilmiştir (Lunyak ve ark., 2017). Sonuç olarak, NAC

uygulanan hücrelerde proliferasyonun azalması NAC'ın senesensi indüklediğinin göstergesi olabilir.

MKH'lerin apoptoz testi verileri incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda total apoptotik hücre oranı %2 artmıştır. Hücre grubunun heterojen bir popülasyona sahip olduğu düşünüldüğünde, NAC uygulanan hücrelerin çok az bir kısmının apoptoza uğraması muhtemeldir. Fakat NAC grubundaki hücrelerin genellikle senesense eğiliminin olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada biyolojik testlere ek olarak, MKH'lerde *P21*, *P53*, *Atm*, *Bax*, *Bcl-2*, *Cdk6*, *Siklin B* ve *Rb1* genlerinin NAC uygulaması sonucu ifadelerinin nasıl değiştiğini incelemek amacıyla bu genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Housekeeping genlerden birisi olan *Gapdh* geni referans olarak seçilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan *P53*, *P21*, *Atm* ve *Rb1* genlerinin ekspresyon seviyeleri NAC uygulanan hücrelerde artmıştır. Senesensin moleküler mekanizmasında aktif rol alan bu genlerin ifadesinin artması, NAC'ın senesensi indüklediğini göstermektedir.

Bax geninin ekspresyon seviyesi, kontrol grubuna kıyasla NAC grubunda artmıştır. *Bax*, apoptoz baskılayıcı *Bcl-2*'ye bağlanıp onu antagonize ederek programlanmış hücre ölümünü hızlandıran apoptotik bir gendir (Oltval ve ark., 1993). Bu çalışmada, NAC uygulanan hücrelerde apoptotik bir genin ifadesinin artmasına rağmen apoptoz gerçekleşmemiştir. Anti-apoptotik bir gen olan *Bcl-2* geninin ifadesinin artması bu bulguyu destekler niteliktedir.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Tez çalışmasındaki temel amacımız, N - Asetil Sistein (NAC) uygulamasının MKH senesensi üzerindeki biyolojik etkisini incelenmektir. Bu çalışmanın sonucunda, NAC uygulanan grupta senesent hücre ve polinükleer hücre oranı artmıştır. Ayrıca, NAC uygulanan hücrelerde proliferasyonun azaldığı gözlemlenmiştir. RT - PCR sonuçlarına göre NAC grubunda *P21*, *P53*, *Atm*, *Bax*, *Bcl-2*, *Cdk6*, *Siklin B* ve *Rb1* genlerinin ifadeleri artmıştır. Sonuç olarak, NAC uygulanan MKH'lerde senesens mekanizmasının aktif hale geldiği ve NAC'ın senesensi indüklediği gözlemlenmiştir.

P21, *P53*, *Atm*, *Bax*, *Bcl-2*, *Cdk6*, *Siklin B* ve *Rb1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişikliklerin protein düzeyinde nasıl bir yol izlediğini anlamak

amacıyla bu genlerin Western Blot veya Proteomiks analizlerinin yapılması önerilmektedir.

Bu tez çalışmasında, NAC'ın reaktif oksijen türlerini temizleyici bir etkiye sahip olmasına rağmen senesensi indüklediği gözlemlenmiştir. Bu konuyla ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, NAC'ın efervesan tablet formu kullanılmıştır. Efervesan tablet içeriğinde içeriğinde çeşitli maddeler (aspartam vb.) mevcuttur. Sonraki yapılacak olan çalışmalarda, NAC'ın sade formunun kullanılması önerilmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Acosta JC. Banito A. Wuestefeld T. Georgilis A. Janich P. Morton J. P. Gil J. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, 2013;15(8):978-990.
- Acosta JC. O'Loughlen A. Banito A. Guijarro MV. Augert A. Raguz S. Gil J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 2008; 133(6):1006-1018.
- Adams JM. Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001;26(1):61-66.
- Adrain C. Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001;26(6):390-397.
- Alessio N. Aprile D. Cappabianca S. Peluso G. Di Bernardo G. Galderisi U. Different Stages of Quiescence, Senescence, and Cell Stress Identified by Molecular Algorithm Based on the Expression of Ki67, RPS6, and Beta-Galactosidase Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021;22(6):3102.
- Alnemri ES. Livingston DJ. Nicholson DW. Salvesen G. Thornberry NA. Wong WW. Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996;87(2):171-177.
- Aruoma OI. Halliwell B. Hoey BM. Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 1989;6(6):593-597.
- Atkuri KR. Mantovani JJ. Herzenberg LA. Herzenberg LA. N-Acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current Opinion in Pharmacology*, 2007;7(4):355-359.

- Avasthi S. Srivastava RN. Singh A. Srivastava M. Stem cell: past, present and future-- a review article. *Internet Journal of Medical Update*, 2008;3(1):22-31.
- Barry FP. Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 2004; 36(4):568-584.
- Bellamy CO. Malcolmson RD. Harrison DJ. Wyllie AH. (). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. In *Seminars in Cancer Biology* 1995;6:3-16.
- Beukelaers P. Vandenbosch R. Caron N. Nguyen L. Belachew S. Moonen G. Malgrange B. Cdk6-Dependent Regulation of G1 Length Controls Adult Neurogenesis. *Stem Cells*, 2011;29(4):713-724.
- Bongso A. Richards M. History and perspective of stem cell research. *Best Practice Research Clinical Obstetrics Gynaecology*, 2004;18(6):827-842.
- Brunelle JK. Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of Cell Science*, 2009;122(4):437-441.
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2003;7(3):249-257.
- Burma S. Chen BP. Murphy M. Kurimasa A. Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 2001;276(45):42462-42467.
- Campisi J. Di Fagagna FDA. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007;8(9):729-740.
- Chicas A. Wang X. Zhang C. McCurrach M. Zhao Z. Mert O. Lowe SW. Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell*, 2010;17(4):376-387.
- Coppé JP. Desprez PY. Krtolica A. Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2010;5:99-118.
- Coppé JP. Patil CK. Rodier F. Sun YU. Muñoz DP. Goldstein J. Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous

- functions of oncogenic RAS and the P53 tumor suppressor. *Plos Biology*, 2008;6(12):301-307.
- Coşkun G. Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2011;20(3):145-158.
- Curtin JF. Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular Signalling*, 2003;15(11):983-992.
- Danial NN. Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, 2004;116(2):205-219.
- Darzynkiewicz Z. Pozarowski P. Gloria J. Cell cycle analysis by flow and laser-scanning cytometry. In *Cell Biology* 2006;279-289.
- De Flora S. Astengo M. Serra D. Bennicelli C. Inhibition of urethan-induced lung tumors in mice by dietary N-acetylcysteine. *Cancer Letters*, 1986;32(3):235-241.
- De Vries N. De Flora S. N-acetyl-l-cysteine. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1993;53(S17F):270-277.
- Debacq-Chainiaux F. Erusalimsky JD. Campisi J. Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 2009;4:1798-1806.
- Dennis J E. Carbillet JP. Caplan AI. Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*, 2002;170(2-3):73-82.
- Di Leonardo A. Linke S P. Clarkin K. Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged P53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Development*, 1994;8(21):2540-2551.
- Di Micco R. Fumagalli M. Cicalese A. Piccinin S. Gasparini P. Luise C. di Fagagna FDA. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 2006;444(7119):638-642.
- Dimri GP. Lee X. Basile G. Acosta M. Scott G. Roskelley C. Pereira-Smith, O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995;92(20):9363-9367.
- Ding DC. Shyu WC. Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 2011; 20(1):5-14.

- Dominici MLBK. Le Blanc K. Mueller I. Slaper-Cortenbach I. Marini FC. Krause DS. Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006;8(4):315-317.
- Dowsett M. Nielsen TO. A'Hern R. Bartlett J. Coombes RC. Cuzick, J. Hayes, D. F. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of The National Cancer Institute*, 2011;103(22):1656-1664.
- Ellis RE. Yuan J. Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology*, 1991;7(1):663-698.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007;35(4):495-516.
- Endl E. Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Experimental Cell Research*, 2000;257(2):231-237.
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells Sixth Edition*. Wiley-Blackwell, New Jersey, 1979;796-782.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, et al. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976;4(5):267-274.
- Friedenstein AJ. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method, 1974;2(2):83-92.
- Frye RE. Berk M. The therapeutic use of N-acetylcysteine (NAC) in medicine. *Adis Singapore*, 2018;3-394.
- Garibyan L. Avashia N. (). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, 2013;133(3):6-11.
- Gazit Z. Pelled G. Sheyn D. Kimelman N. Gazit D. Mesenchymal Stem Cells, 2013;513-524.
- Gerdes J. Lemke H. Baisch HE. Wacker HH. Schwab U. Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology*, 1984;133(4):1710-1715.

- Giacinti C. Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 2006;25(38):5220-5227.
- Gil J. Peters G. Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 2006;7(9):667-677.
- Gimble JM. Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 2003;5(5):362-369.
- Gonzalo S. García-Cao M. Fraga MF. Schotta G. Peters AH. Cotter SE. Blasco M. A. Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nature Cell Biology*, 2005;7(4):420-428.
- Green DR. Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*, 2002;1(1):19-30.
- Hauge S. Macurek L. Syljuåsen RG. P21 limits S phase DNA damage caused by the Wee1 inhibitor MK1775. *Cell Cycle*, 2019;18(8):834-847.
- Haupt S. Berger M. Goldberg Z. Haupt Y. Apoptosis-the P53 network. *Journal of Cell Science*, 2003;116(20):4077-4085.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000;407(6805):770-776.
- Hirao A. Cheung A. Duncan G. Girard PM. Elia AJ. Wakeham A. Mak TW. Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Molecular and Cellular Biology*, 2002;22(18):6521-6532.
- Hoenicke L. Zender L. Immune surveillance of senescent cells—biological significance in cancer-and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*, 2012;33(6):1123-1126.
- Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clinical Pharmacokinetics*, 1991;20(2):123-134.
- Huang CYC. Hagar KL. Frost LE. Sun Y. Cheung HS. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2004;22(3):313-323.
- Hubackova S. Krejčíková K. Bartek J. Hodny Z. IL1-and TGFβ-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine ‘bystander senescence’. *Aging (Albany NY)*, 2012;4(12):932.

- Hung SC. Chang CF. Ma HL. Chen TH. Ho LT. Gene expression profiles of early adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Gene*, 2004;340(1):141-150.
- Igura K. Zhang X. Takahashi K. Mitsuru A. Yamaguchi S. Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 2004;6(6):543-553.
- In: Handbook of Stem Cell Volume 1 Pluripotent Stem Cell. (Eds. A. Atala, R. Lanza) Elsevier Inc, San Diego, 2016;524-528.
- Izzotti A. D'Agostini F. Bagnasco M. Scatolini L. Rovida A. Balansky RM. De Flora S. Chemoprevention of carcinogen-DNA adducts and chronic degenerative diseases. *Cancer Research*, 1994;54:7-17.
- Jin HJ. Park SK. Oh W. Yang YS. Kim SW. Choi SJ. Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009;381(4):676-681.
- Kadivar M. Khatami SH. Mortazavi Y. Taghikhani M. Shokrgozar MA. Multilineage differentiation activity by the human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Iranian Biomedical Journal*, 2006;175-184.
- Kang SG. Jeun SS. Lim JY. Kim SM. Yang YS. Oh WI. Park CK. Cytotoxicity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against human malignant glioma cells. *Child's Nervous System*, 2008;24(3):293-302.
- Karimian A. Ahmadi Y. Yousefi B. Multiple functions of P21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*, 2016;42:63-71.
- Kershaw EE. Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 2004;89(6):2548-2556.
- Kirshner M. Rathavs M. Nizan A. Essers J. Kanaar R. Shiloh Y. Barzilai A. Analysis of the relationships between ATM and the Rad54 paralogs involved in homologous recombination repair. *DNA Repair*, 2009;8(2):253-261.
- Koopman G. Reutelingsperger CP. Kuijten GA. Keehnen RM. Pals ST. Van Oers, MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994;84(5):1415-1420.

- Kroemer G. Galluzzi L. Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 2007;87(1):99-163.
- Ku B. Liang C. Jung JU. Oh BH. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Research*, 2011;21(4):627-641.
- Kuilman T. Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*, 2009;9(2):81-94.
- Kuilman T. Michaloglou C. Mooi WJ. Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Development*, 2010;24(22):2463-2479.
- Kuilman T. Michaloglou C. Vredeveld LC. Douma S. van Doorn R. Desmet CJ. Peeper DS. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 2008;133(6):1019-1031.
- Kuo TK. Ho JH. Lee OK. Mesenchymal stem cell therapy for nonmusculoskeletal diseases: emerging applications. *Cell Transplantation*, 2009;18(9):1013-1028.
- Lin IT. Chao JL. Yao MC. An essential role for the DNA breakage-repair protein Ku80 in programmed DNA rearrangements in *Tetrahymena thermophila*. *Molecular Biology of the Cell*, 2012;23(11):2213-2225.
- Liu J. Liu Q. Han J. Feng J. Guo T. Li Z. Peng X. N-Acetylcysteine Inhibits Patulin-Induced Apoptosis by Affecting ROS-Mediated Oxidative Damage Pathway. *Toxins*, 2021;13(9):595-601.
- Liu M. Pelling J C. Ju J. Chu E. Brash DE. Antioxidant action via P53-mediated apoptosis. *Cancer research*, 1998;58(8):1723-1729.
- Liu M. Wikonkal NM. Brash DE. Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G1 prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine. *Carcinogenesis*, 1999;20(9):1869-1872.
- Lodish H. Berk A. Kaiser CA. Krieger M. Scott MP. Bretscher A. Ploegh H. Moleküler Hücre Biyolojisi Altıncı Baskıdan Çeviri (Çev Ed. Geçkil, H. Özmen, M. Yeşilada, Ö). Palme Yayıncılık, Ankara, 2011;3:1150-1157.
- Lunyak VV. Amaro-Ortiz A. Gaur M. Mesenchymal stem cells secretory responses: senescence messaging secretome and immunomodulation perspective. *Frontiers in Genetics*, 2017;8:220-227.

- Matthews JA. Kricka LJ. Analytical strategies for the use of DNA probes. *Analytical Biochemistry*, 1988;169(1):1-25.
- Miki T. Matsumoto T. Zhao Z. Lee CC. P53 regulates Period2 expression and the circadian clock. *Nature Communications*, 2013;4(1):1-11.
- Moldéus P. Cotgreav IA. N-acetylcysteine. *Methods in Enzymology*, 1994;234:482-492.
- Muñoz-Espín D. Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014;15(7):482-496.
- Mustafa AK. Gadalla MM. Sen N. Kim S. Mu W. Gazi SK. Snyder S. H. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling*, 2009;2(96):72-77.
- Nardi NB, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. *Stem Cells*, 2006;249-282.
- Nelson G. Wordsworth J. Wang C. Jurk D. Lawless C. Martin-Ruiz C. von Zglinicki T. A senescent cell bystander effect: Senescence-induced senescence. *Aging Cell*, 2012;11(2):345-349.
- Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 2000;407(6805):810-816.
- Oishi K. Noguchi H. Yukawa H. Hayash S. Differential ability of somatic stem cells. *Cell Transplantation*, 2009;18(5-6):581-590.
- Oltval ZN. Milliman CL. Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993;74(4):609-619.
- Orbay H. Tobita M. Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells International*, 2012.
- Ouyang HW. Goh JC. Thambyah A. Teoh SH. Lee EH. Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon. *Tissue Engineering*, 2003;9(3):431-439.
- Özen A. Sancak İG. Ceylan A. Özgenç Ö. Isolation of adipose tissue-derived stem cells. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2016;40(2):137-141.

- Palmer AM. Greengrass PM. Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News Perspectives*, 2000;13(6):378-384.
- Pittenger MF. Mackay AM. Beck SC. Jaiswal RK. Douglas R. Mosca JD. Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999;284(5411):143-147.
- Pittenger MF. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. In *Mesenchymal Stem Cells Humana Press* 2008;27-44
- Ponte AL. Marais E. Gallay N. Langonné A. Delorme B. Hérault O. Domenech, J. The *in vitro* migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem cells*, 2007;25(7):1737-1745.
- Prescott LF. Ballantyne A. Proudfoot AT. Park J. Adriaenssens P. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *The Lancet*, 1977;310(8035):432-434.
- Reddel RR. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2000;21(3):477-484.
- Rhodes K. Braakhuis A. (Performance and side effects of supplementation with N-acetylcysteine: a systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*, 2017;47(8):1619-1636.
- Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Research*, 2003;63(11):2705-2715.
- Samuni Y. Goldstein S. Dean OM. Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013;1830(8):4117-4129.
- Sasaki M. Ikeda H. Sato Y. Nakanuma, Y. Proinflammatory cytokine-induced cellular senescence of biliary epithelial cells is mediated via oxidative stress and activation of ATM pathway: a culture study. *Free Radical Research*, 2008;42(7):625-632.
- Seruya M. Shah A. Pedrotty D. Du Laney T. Melgiri R. McKee JA. Niklason L. E. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplantation*, 2004;13(2):93-101.

- Shen Y. White E. P53-dependent apoptosis pathways. *Advances in Cancer Research*, 2001;55-84.
- Sherr CJ. Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Development*, 1995;9(10):1149-1163.
- Sung JH, Yang HM, Park JB. Choi GS. Joh J. W, Kwon CH. Kim SJ. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. In *Transplantation Proceedings*, October 2008;40,8:2649-2654.
- Smaili SS. Hsu YT. Youle RJ. Russell JT. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2000;32(1):35-46.
- Spierings DC. de Vries EG. Vellenga E. van den Heuvel FA. Koornstra JJ. Wesseling J. de Jong S. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 2004;52(6):821-831.
- Ståhlberg A. Thomsen C. Ruff D. Åman P. Quantitative PCR analysis of DNA, RNAs, and proteins in the same single cell. *Clinical Chemistry*, 2012;58(12):1682-1691.
- Stein GH. Dulić V. Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts. *Bioessays*, 1995;17(6):537-543.
- Sun P. Yoshizuka N. New L. Moser BA. Li Y. Liao R. Han J. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell*, 2007;128(2):295-308.
- Tajima H. Tsuchiya K. Yamada M. Kondo K. Katsube N. Ishitani R. Over-expression of GAPDH induces apoptosis in COS-7 cells transfected with cloned GAPDH cDNAs. *Neuroreport*, 1999;10(10):2029-2033.
- Thornberry NA. Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998;281(5381):1312-1316.
- Toyoshima H. Hunter T. P27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to P21. *Cell*, 1994;78(1):67-74.
- Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 2014;509(7501):439-446.
- Vaux DL. Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*, 1999;96(2):245-254.
- VayssadeM. Nagel MD. Stromal cells. *Front Biosci*, 2009;14:210-24.

- Velarde MC. Demaria M. Campisi J. Senescent cells and their secretory phenotype as targets for cancer therapy. *Cancer and Aging*, 2013;38:17-27.
- Wang HS. Hung SC. Peng ST. Huang CC. Wei HM. Guo, YJ. Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 2004;22(7):1330-1337.
- Webb WR. Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetyl-cysteine. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1962;44(3):330-343.
- Xue W. Zender L. Miething C. Dickins RA. Hernando E. Krizhanovsky V. Lowe S. W. Senescence and tumour clearance is triggered by P53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 2007;445(7128):656-660.
- Zhu Y. Liu T. Song K. Fan X. Ma X. Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 2008;26(6):664-675.
- Zuk PA. Zhu MIN. Mizuno H. Huang J. Futrell JW. Katz AJ. Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 2001;7(2):211-228.

Sayı : 68742022- 622.99-075
Konu: Değerlendirme Onay

28/09/2020

Sayın; Prof.Dr.Servet ÖZCAN

“NAC (N-Asetil Sistein) Uygulamasının Mezenkimal Kök Hücre Senesensi Üzerine Etkisinin İncelenmesi” başlıklı proje çalışmanızı Merkezimiz Proteomiks,Transgenik,Görüntüleme ve Kök Hücre Birim’ lerinde yapılması tarafımızca uygun bulunmuştur.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.



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



Tarih: 09.09.2020

Toplantı Sayısı: 09

Karar No:20/123

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 09.09.2020 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Eray AKTUĞ	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜT
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Gencay EKİNCİ	Arş. Gör. Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji A.D.'dan Prof. Dr. Servet ÖZCAN tarafından sunulan "NAC (N-asetil sistein) Uygulamasının Mezenkimal Kök Hücre Senesensi Üzerine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 09.09.2020

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

N-ASETİLSİSTEİN (NAC) UYGULAMASININ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SENESENSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%6	%6	%0	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	docplayer.biz.tr	%1
2	tez.sdu.edu.tr	%1
3	dergipark.org.tr	<%1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	<%1
5	9lib.net	<%1
6	adudspace.adu.edu.tr:8080	<%1
7	acikerisim.bartın.edu.tr	<%1
8	acikerisim.dicle.edu.tr	<%1
9	earsiv.kastamonu.edu.tr:8080	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Miray BOLAT

Uyruğu: T.C

EĞİTİM

DERECE

KURUM

MEZUNİYET

Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi	-
Lisans	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi	2019
Lise	Şehit Mehmet Atıcı Anadolu Lisesi	2014

YABANCI DİL

İngilizce