

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

**LET-7E, miR-21 VE miR-150 İFADE DÜZEYLERİNİN**  
**GENÇ VE YAŞLI FARELERİN ÖN HİPOFİZ**  
**DOKUSUNDA KARŞILAŞTIRILMASI VE**  
**YAŞLANMANIN SOMATOTROP, LAKTOTROP VE**  
**KÖK HÜCRELERE ETKİSİNİN**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Hazırlayan**

**Nezaket EFESÖY**

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**HAZİRAN 2022**

**KAYSERİ**



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

**LET-7E, miR-21 VE miR-150 İFADE DÜZEYLERİNİN**  
**GENÇ VE YAŞLI FARELERİN ÖN HİPOFİZ**  
**DOKUSUNDA KARŞILAŞTIRILMASI VE**  
**YAŞLANMANIN SOMATOTROP, LAKTOTROP VE**  
**KÖK HÜCRELERE ETKİSİNİN**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Hazırlayan**

**Nezaket EFESÖY**

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL**

**HAZİRAN 2022**

**KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini 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.

Nezaket EFESOY

İmza:

## **YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI**

**“Let-7e, miR-21 ve miR-150 İfade Düzeylerinin Genç ve Yaşlı Farelerin Ön Hipofiz Dokusunda Karşılaştırılması ve Yaşlanmanın Somatotrop, Laktotrop ve Kök Hücrelere Etkisinin Değerlendirilmesi”** adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

**Nezaket EFESOY**

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL**

**Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı**

**Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

**Dr.Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL** danışmanlığında **Nezaket EFESoy** tarafından hazırlanan “**Let-7e, miR-21 ve miR-150 İfade Düzeylerinin Genç ve Yaşlı Farelerin Ön Hipofiz Dokusunda Karşılaştırılması ve Yaşlanmanın Somatotrop, Laktotrop ve Kök Hücrelere Etkisinin Değerlendirilmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Kök Hücre Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

02/06/2022

## JÜRİ

## İMZA

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL

Üye: Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Üye: Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

## ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ...../...../22 tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2022

Prof.Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin ve tez çalışmam süresince her türlü bilgi ve desteği ile yardımcı olan tez danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Duygu YÜCEL'e,

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

Tez çalışmamı yürüttüğüm Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre merkezi (GenKök) çalışanlarına,

Tüm hayatım boyunca ve zor zamanlarımda hep yanımda olan, sevgi ve destekleri ile bugüne gelmemde emekleri çok büyük olan değerli aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nezaket EFESoy

Kayseri, Haziran 2022

**LET-7E, miR-21 VE miR-150 İFADE DÜZEYLERİNİN GENÇ VE YAŞLI  
FARELERİN ÖN HİPOFİZ DOKUSUNDA KARŞILAŞTIRILMASI VE  
YAŞLANMANIN SOMATOTROP, LAKTOTROP VE KÖK HÜCRELERE  
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Nezaket EFESOY**

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Kök Hücre Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi**

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

**ÖZET**

Hipofizin yaşlanmayı düzenlediğine dair ilk bulgular kırk yıl öncesine dayanmaktadır. İnsan biyolojik sınırlarında ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, yaşlanma ile birlikte miRNA ifade profillerinde değişiklikler meydana geldiğini göstermiştir. miRNA ifade düzeylerinde meydana gelen değişikliklerin hipofizer yaşlanmayla ilişkili olabileceğine dair hipotezimiz ışığında gerçekleştirilen bu çalışmada genç ve yaşlı farelerin hipofizlerinde, rejeneratif kapasitelerini etkileyebilecek miRNA ifade düzeylerinin ve yaşlanmaya bağlı meydana gelen somatotrop, laktotrop ve Sox2 ifade eden kök hücrelerdeki değişikliklerin analiz edilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada erkek BALB/c farelerin hipofiz dokuları kullanılmıştır ve fareler 2, 4, 6 ve 16 aylık olarak gruplandırılmıştır. Hipofiz dokusunun hücrelerine ayrıştırılması vasıtasıyla 2 ve 6 aylık farelerin ön hipofizi incelendiğinde, somatotrop hücrelerinin sayısında azalma gözlemlenirken, laktotrop hücrelerinin sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Sox2 ifade eden kök hücrelerin sayısında erken yaşlanma evresinde bir farklılık gözlemlenmemiştir. Kök hücrelere dair ön hipofizin hücrelere ayrıştırılması ile elde edilen bu bulgular, ekibimizin daha önce hipofizer doku örnekleri üzerinde yaptığı çalışmada elde ettiği sonuçlarla paraleldir. miR-21'in yüz yaşındaki bireylerde daha düşük seviyede ifade olması ve miR-150 ve let-7e'nin genç ve yaşlı bireyler için biyolojik yaşları bakımında ayırt edici faktör olarak kullanılabilmesine dair bulgular ve bu üç molekülün kök hücrelerin düzenlenmesine ilişkin rolleri göz önüne alınarak hipofizer yaşlanmadaki ifade düzeyleri incelenmiştir. Genç ve yaşlı fare ön hipofizlerinde miR-21 ve miR-150 ifadelerinde anlamlı bir fark gözlenmemişken, let-7e ifadesinde anlamlı bir düşüş bulunmuştur. Let-7e üzerine yakın zamanda yapılan çalışmalar, bu miRNA'nın GH sentezlenmesinde görev aldığına işaret etmektedir. Çalışmamızda, let-7e'nin yaşlanmış hipofiz dokusunda anlamlı olarak düşük miktarlarda ifade ediliyor olması ve yaşlanmış hipofiz dokusunda somatotrop ve Sox2 kök hücre sayısının azalmış olması, let-7e'nin hipofiz homeostasisinin sağlanması açısından olası rollerini öne çıkartmaktadır. Metaverse teknolojilerinin konuşulduğu günümüzde; hipofiz, yaşlanma ve miRNA üçgeninde insanı araştırmak ve yaşlanmayla birlikte hipofizer kök hücreler ve hormon salgılayan hücrelerin fonksiyonunda meydana gelen düşüşün mekanizmasını anlamak, modern insanlar için sağlıklı bir yaşlanmanın nasıl sağlanabileceğine ışık tutacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Hipofiz; Kök Hücre; miRNA; Somatotrop; Yaşlanma

**COMPARISON OF LET-7E, miR-21 AND miR-150 EXPRESSION LEVELS  
IN THE YOUNG AND AGING ANTERIOR PITUITARY OF MICE AND  
ASSESSMENT OF EFFECTS OF AGING ON SOMATOTROPES,  
LACTOTROPES AND STEM CELLS**

**Nezaket EFESoy**

**Erciyes University, Institute of Health Sciences**

**Department of Stem Cell Biology**

**Master's Thesis**

**Supervisor: Assistant Professor Duygu YÜCEL**

**ABSTRACT**

The regulatory role of pituitary functions on aging has been demonstrated forty years ago. Studies conducted on human bodily fluids and on animal models have shown a link between miRNA expression profiles and aging. Our hypothesis on possible roles of differentially expressed miRNAs during the aging process of pituitary has been tested on young and old mice. In addition to investigation of miRNAs with putative regenerative roles, aging-mediated changes in the pituitary was investigated in terms of assessment of number of somatotropes, lactotropes and Sox2 stem cells via dispersion of pituitary cells.

In this study, anterior pituitary of male BALB/c mice were used where animals were grouped as 2, 4, 6 and 16 months-old. Dispersed pituitary of 2-month-old and 6-month-old mice were analysed for somatotrop cells where a significant decrease in cell number was observed. In contrast, lactotrop cell number was increased. Sox2 stem cell number did not show any changes. These observations at the cellular level are in line with our previous finding on the tissue level. miR-21 was found decreased in centenarians and miR-150 and let-7e were shown as biomarkers of biological aging which can differentiate between young and old subjects. These miRNAs were selected on the basis of their possible role on aging and on stem cell regulation where their expression was interrogated in 4 month-old and 16-month-old animals. There was no significant difference in the expression levels of miR-21 and miR-150 in the anterior pituitary of the old mice compared with the young ones. However, let-7e was significantly downregulated in the anterior pituitary of old mice. Let-7e has been recently demonstrated with regulatory roles on GH secretion. Given that we have found let-7e with decreased expression levels in the aging pituitary and that somatotropes and Sox2 stem cells decrease in number in the aging pituitary, let-7e might play a role in maintenance of pituitary homeostasis.

In the world of metaverse, investigation of our own species through a triangle of pituitary, aging and miRNAs and understanding the mechanism of a decrease in the function of stem cells and hormonal cells in the aging pituitary may shed light into to how healthy aging can be achieved in modern humans.

**Key Words:** Aging; miRNA; Pituitary; Somatotrope; Stem Cell

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa no

İÇ KAPAK .....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK .....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI .....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
KISALTMALAR .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xi
TABLOLAR LİSTESİ .....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 YAŞLANMA NEDİR? .....	3
2.2 KÖK HÜCRE NEDİR? .....	4
2.3 KÖK HÜCRE TÜRLERİ .....	4
2.4 miRNA .....	5
2.5 HİPOFİZ BEZİ .....	9
2.6 HİPOFİZER ERİŞKİN KÖK HÜCRELER .....	12
2.6.1 Hipofizer Erişkin Kök Hücreler ve Yaşlanma .....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	14
3.1 GEREÇ .....	14
3.1.1 Cihazlar .....	14
3.1.2 Sarf Malzemeler .....	14

3.2 YÖNTEM.....	15
3.2.1 Fare Hipofiz Örneklerinin Toplanması .....	15
3.2.2 Hücre Düzeyinde İmmünflorasan Boyamalar ve Görüntüleme.....	16
3.2.3 Real-Time Quantitatif PCR (RT-qPCR) .....	17
4. BULGULAR.....	21
4.1 2 AYLIK VE 6 AYLIK FARELERDE SOMATOTROP VE LAKTOTROPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI .....	21
4.2. 2 AYLIK VE 6 AYLIK FARELERDE SOX2 İFADE EDEN KÖK HÜCRELERİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	26
4.3 GENÇ VE YAŞLI FARE ÖN HİPOFİZLERİNDE miRNA İFADE DÜZEYLERİ .....	26
5. TARTIŞMA .....	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
7. KAYNAKLAR .....	36
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

## KISALTMALAR

<b>3' UTR</b>	: Three Prime Untranslated Region
<b>ACTH</b>	: Adrenokortikotropik Hormon
<b>AH</b>	: Anterior Hipofiz
<b>ARC</b>	: Arkuat çekirdek
<b>AVP</b>	: Arjinin Vasopresin
<b>BALB/C</b>	: İmmün Kompetan Fareler
<i>C. elegans</i>	: <i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>CRH</b>	: Corticotropin Releasing Hormone
<i>D.melanogaster</i>	: <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>DGCR8</b>	: DiGeorge Sendromu Kritik bölge geni 8
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EKH</b>	: Embriyonik Kök Hücre
<b>FS</b>	: Folikülstelat
<b>FSH</b>	: Folikül Stimule Edici Hormon
<b>GH</b>	: Growth Hormone
<b>GHRH</b>	: Growth Hormone Releasing Hormone
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin Releasing Hormone
<b>IGF-1</b>	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü-1
<b>KLF 4</b>	: Kruppel-like Factor 4
<b>LH</b>	: Luteinize Edici Hormon
<b>LHA</b>	: Lateral Hipotalamik Area
<b>LTH</b>	: Prolaktin
<b>miRNA</b>	: mikroRNA
<b>MKH</b>	: Mezenkimal Kök Hücre
<b>MN</b>	: Medial Çekirdek
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MSH</b>	: Melanokortin Stimule edici hormon

<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>MZ</b>	: Marijinal Zon
<b>OCT</b>	: Optimal Cutting Temperature Compound
<b>OT</b>	: Oksitosin
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PeVN</b>	: Periventriküler Çekirdek
<b>PH</b>	: Posterior Hipofiz
<b>PRL</b>	: Prolaktin
<b>PVN</b>	: Paraventriküler Çekirdek
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RT-qPCR</b>	: Quantitative Reverse Transcription PCR
<b>SASP</b>	: Senescence-associated secretory phenotype
<b>SCA1</b>	: Spinocerebellar ataxia type 1
<b>SCN</b>	: Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit
<b>Sox2</b>	: Sex determining region Y-box 2
<b>SP</b>	: Side Population
<b>SS</b>	: Somatostatin
<b>STH</b>	: Somatotrofik hormon
<b>TGF B</b>	: Transforming Growth Factor Beta
<b>TOR</b>	: Target of Rapamycin
<b>TSH</b>	: Tiroid Stimule edici hormon
<b>WNT</b>	: Wingless-related integration site

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b><u>Sayfa no</u></b>
Şekil 2.1. miRNA biyogenezinin şematik gösterimi .....	7
Şekil 2.2. İnsan ve fare hipofiz bezinin şematik gösterimi. ....	10
Şekil 3.1. 12x12'lik FlexSix çip .....	17
Şekil 3.2. Çip kontrolcüsü .....	18
Şekil 3.3. Biomark HD .....	18
Şekil 4.1. GH salgılayan hücreler yaşlanma ile birlikte azalmaktadır. ....	22
Şekil 4.2. PRL salgılayan hücreler yaşlanma ile birlikte artmaktadır. ....	24
Şekil 4.3. Sox2 kök hücrelerinin sayısında erken yaşlanma döneminde bir farklılık gözlemlenmemektedir .....	26
Şekil 4.4. Ön hipofiz dokularında miRNA ifade düzeyleri gösterilmektedir.....	27

## TABLULAR LİSTESİ

	<b><u>Sayfa no</u></b>
<b>Tablo 3.1.</b> Mikroflüidik ‘Assay’ ve ‘Sample’ Karışımı .....	19
<b>Tablo 3.2.</b> Real-time RT-PCR Termal Döngüsü .....	19



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipofizin yaşlanmayı düzenlediğine dair ilk bulgular kırk yıl öncesine dayanmaktadır (Everitt vd., 1983). Hipofizer fonksiyonların yaşlanma üzerindeki etkilerine dair ilk çalışmalar, hipofizektomi işlemi uygulanan ratlarda yaşam süresinin uzadığını ve prolaktin (PRL) ve growth hormonunun (GH) yaşlanmayı tetikleyen faktörler arasında bulunduğunu göstermiştir. Yaşlanma her canlıda görülen, tüm işlevlerde azalma ve yavaşlamaya neden olan evrimsel bir süreçtir. İnsan biyolojik sıvılarında ve hayvan modellerinde gerçekleştirilen çok sayıda çalışma hormonlar ve yaşlanma arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Yaşlanma üzerindeki etkilerine dair son yıllarda öne çıkan moleküller arasında mikroRNA'lar (miRNA) bulunmaktadır. miRNA'lar kodlamayan proteine dönüştürülmeyen küçük RNA molekülleridir. 20-25 nükleotid uzunluğa sahiptirler. miRNA'ların yaşlanma ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda, genç ve yaşlı bireylerde miRNA ifade düzeylerinin anlamlı farklılık gösterdiği ve miRNA'ların yaşlanma ile birlikte ifade düzeylerinin çoğunlukla düştüğü görülmektedir (Noren Hooten vd., 2010). miR-21'in yüz yaşındaki bireylerde daha düşük seviyede ifade olması ve miR-150 ve let-7e'nin genç ve yaşlı bireyler için biyolojik yaşları bakımından ayırt edici faktör olarak kullanılabileceğine dair bulgular ve bu üç molekülün kök hücrelerin düzenlenmesine ilişkin rolleri göz önüne alınarak bu projede fare modeli kullanılarak bahsi geçen miRNA'ların hipofizer yaşlanmadaki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Yaşlanma ile birlikte kök hücre sayısının ve hipofizin rejeneratif kapasitesinin azaldığı fare modelinde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Fu & Vankelecom, 2012). Hipofiz dokusunda Sox2 ifade eden erişkin kök hücre sayısının yaşlanmaya bağlı olarak azaldığını doku düzeyinde ilk kez gösteren önceki çalışmalarımızın ışığında (Kaya, 2019), bu tez çalışmasında genç ve yaşlı farelerin

hipofizlerinde, rejeneratif kapasitelerini etkileyebilecek miRNA ifade düzeyleri incelenmesine ek olarak, hipofizde yaşlanmaya bağlı meydana gelen somatotrop, laktotrop ve Sox2 ifade eden kök hücrelerdeki değişiklikler, genç ve erken yaşlanma evresindeki fare hipofizlerinin hücrelerine ayrıştırılması vasıtasıyla analiz edilmesi hedeflenmiştir. İnsan biyolojik sınırlarında ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, yaşlanma ile birlikte miRNA ifade profillerinde değişiklikler meydana geldiğini ortaya koymuştur. miRNA ifade düzeylerinde meydana gelen bu değişikliklerin hipofizer yaşlanmayla ilişkili olabileceğine dair hipotezimiz ışığında gerçekleştirilen bu çalışma, hipofizer yaşlanmaya mekanistik ışık tutulmasını sağlayacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Yaşlanma Nedir?

Yaşlanma, zaman içinde, canlı organizmalarda çeşitli değişikliklere neden olan karmaşık bir süreçtir. Arking (1999) yaşlanma için şu tanımlı önermektedir; ‘‘Genellikle üreme olgunluğunda kendilerini göstermeye başlayan ve sonunda ölümle sonuçlanan, zamandan bağımsız kümülatif, ilerleyici, içsel ve zararlı işlevsel ve yapısal değişiklikler dizisi.’’ Bu süreçlerin nasıl meydana geldiğini açıklamaya yardımcı olmak için birçok teori geliştirilmiştir (Cannon, 2015). Yaşlanma süreci hem evrimsel hem mekanik perspektiften biyolojinin temel gizemlerinden biri olmaya devam etmektedir. Bir organizmanın yetişkin yaşamı boyunca sağlıklı bir işlev görebilmesi, hemeostatik mekanizmalara bağlıdır (Goodell & Rando, y.y.). Yaşlanma, bir organizmanın yapısının ve fonksiyonunun, moleküler ve hücrel modifikasyonların bir ömür boyunca bireysel düzeyde çeşitli etkilere sahip olabileceği bozulmayı ifade etmektedir. Yaşlanma, genetik ve çevresel faktörlerin belirlediği çok faktörlü bir süreçtir. Genotip, türler veya bireyler arasındaki yaşam süresindeki değişimi belirler; bu varyasyon, yetişkin kök hücre fonksiyonunu tehlikeye atan moleküler hataların birikme eğiliminden, spesifik bir genetik programdan daha ciddi biçimde etkilenmektedir (Rodríguez-Rodero vd., 2011).

Yaşlanmada birçok genetik faktör rol oynar. Spesifik gen kombinasyonları yaşam süresini belirler. Örneğin IGF1R, PON1, APOC3 ve PI3K genlerindeki yaşlanma ile ilişkili polimorfizmler ve IIS yoluyla uzun ömürlülüğün evrimsel olarak korunan uzantısı, aşırı uzun ömürle ilgili genetik faktörlerdir. Memelilerdeki IIS eşdeğeri, vücut büyümesini düzenleyen somatotropik eksenin bir parçasıdır. Somatik büyümeye, hipofiz tarafından salınan büyüme hormonu (GH) aracılık etmektedir.

Dolaşımdaki GH, GH reseptörünü (GHR) aktive eder; bu da hedef hücrelerde IGF-1 reseptörünü (IGF-1R) bağlayan, hücre büyümesini ve hayatta kalmasını tetikleyen IGF-1'in salgılanmasına yol açar. Plazma IGF-1 konsantrasyonlarında bir azalma ile ilişkili spesifik polimorfizmler, Aşkenazi Yahudi'lerinde yüz yaşına kadar yaşayan bireylerde sıklıkla bulunmaktadır. Bu bulgular, GH ve IGF-1 sinyalinin regülasyonunun insan ömründe bir rolü olduğuna işaret etmektedir (Rodríguez-Rodero vd., 2011).

## **2.2. Kök Hücre Nedir?**

Kök hücreler, kendini yenileyebilen, farklılaşmamış fakat zamanla bulunduğu doku veya organa farklılaşabilme yeteneği olan hücrelerdir (Verfaillie vd., 2002). Uzun süre bölünebilme, kendi kendini yenileyebilme, farklılaşmamış olma, özelleşmemiş hücrelere dönüşebilme ve çoğalabilme özelliklerine sahip hücreler kök hücreler olarak sınıflandırmaktadır (Verfaillie vd., 2002). Kök hücrelerin vücutta yaşam boyu kalıcılığı, onları hücre ölümü, yaşlanma veya rejeneratif fonksiyon kaybına yol açabilecek hücre hasarının birikmesine karşı özellikle duyarlı hale getirmektedir. Birçok dokudaki kök hücrelerin yaşla birlikte derin değişikliklere uğradığı, doku hasarına karşı yanıtı, proliferatif aktivitelerin düzensizliği ve azalan fonksiyonel kapasiteler sergilediği bulunmuştur. Bu değişiklikler, yaşlı organizmalarda hücre replasmanının ve doku rejenerasyonunun etkinliğinin azalması ile sonuçlanmaktadır (Oh vd., 2014).

## **2.3. Kök Hücre Türleri**

Kök hücreler genel anlamda embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Embriyodan, fetal dokulardan, kord kanı, kemik iliği, beyin, deri, göz, kalp, böbrek, gastrointestinal sistem, pankreas, karaciğer, meme, prostat, ve testis gibi dokulardan kök hücre izole etmek mümkündür (Mimeault & Batra, 2006). Somatik kök hücre de denilen erişkin kök hücrelerinin esas görevleri, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır (Sağsöz & Ketani, 2008).

Günümüzde rejeneratif tıp uygulamaları için embriyonik ve erişkin kök hücreler kullanılmaktadır. Erişkin kök hücreler hem immunolojik açıdan sorunsuzdur hem de etik sorunlar oluşturmadıkları için sıklıkla tercih edilirler. Erişkin kök hücreler,

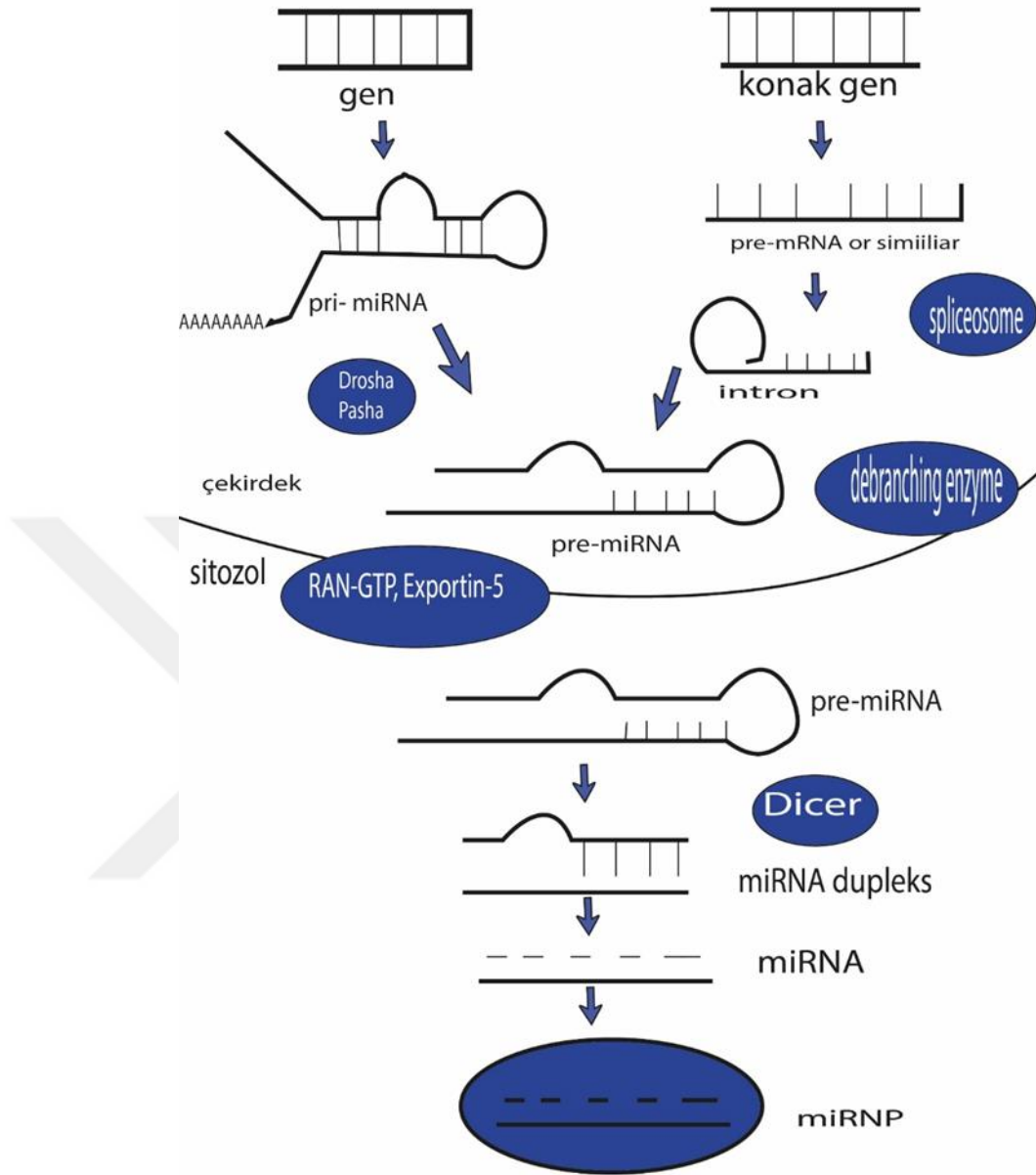
farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Her canlıda bulunan bu hücreler kendilerini yenileyebilir ve gerektiğinde farklı hücre türlerine dönüşebilmektedir. Erişkin kök hücreleri; multipotent mezenkimal kök hücre özelliğinde olup embriyonik kök hücrelere göre gelişme kapasitesi daha azdır. Önemli bir özellikleri ise, dokuya özgü farklılaşabilmeleri. Kas hücresinin bazal membranının hemen altında bulunan satellit hücrelerini kas dokuya ait erişkin kök hücreler olarak tanımlamıştır. Bu tanımlamalar erişkin kök hücrelerin ilk sınıflandırması olmuştur. Bundan sonra 1960'lı yılların sonunda çalışmalar hız kazanmış ve sırasıyla kemik iliği mezenkimal kök hücreler (MKH); kordon kanında erişkin hematopoetik kök hücreler ve nöral kök hücreler bulunmuştur (Çerçi & Erdost, 2019). Uzmanlar erişkin kök hücrelerinin embriyonik kök hücrelerinde olduğu gibi her çeşit dokuya kaynaklık edebileceği konusunda henüz görüş birliğine varmış değildirler. Somatik kök hücre de denilen erişkin kök hücrelerinin esas görevleri, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır (Sağsöz & Ketani, 2008).

#### **2.4. miRNA**

microRNA (miRNA) ilk olarak *Caenorhabditis elegans'ta* gözlemlendi ve en bol bulunan küçük RNA çeşididir. Şimdi hemen hemen tüm model organizmalarda tespit edildi. İnsanlarda yaklaşık 2000 açıklamalı miRNA geni vardır ve açıklamalı toplam mikro RNA lokus sayısı 206 türde 24, 521 lokustur. İnsan genomu, tahmin edilen tüm insan genlerinin %1-5'ini oluşturan çok sayıda miRNA geninden oluşur ve memeli miRNA'ları tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unu düzenlediği bilinmektedir. Ambros ve Ruvkun, 1993 yılında miRNA'yı ilk keşfeden kişilerdir. Lin-4, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans'ta*) keşfedilen ilk miRNA'ydı ve 2000 yılında let-7 adında ikinci bir miRNA keşfedildi. *C.elegans*, *Drosophila melanogaster* ve insan genomları miRNA küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır, tek sarmallı RNA uzunlukları yaklaşık 21-23 nükleotit olan moleküller. miRNA 5' ucunda bir üridin bulunur ve haberci RNA'nın (mRNA) 3' uç çevrilmemiş bölgelerine kısmen tamamlayıcıdır. miRNA Argonaute (AGO) protein kompleksini bir tamamlayıcıya alır hedef mRNA, mRNA'nın translasyon baskılanması veya bozulması veya dedenilasyonu ile sonuçlanır (Vishnoi & Rani, 2017). mikroRNA'lar (miRNA'lar), mRNA bozulmasını arttırdığı veya transkripsiyon sonrası translasyonu

engellediği bulunan, yüksek oranda korunmuş küçük kodlayıcı olmayan RNA'ların bir grubudur (Bavelloni vd., 2017).

miRNA'lar, gen ekspresyonunu, transkripsiyonel baskı veya mRNA bozunması yoluyla transkripsiyon sonrası kontrol eden kısa, kodlamayan RNA'ların bir sınıfıdır. miRNA'ların, gelişimsel zamanlama ve konakçı-patojen etkileşimlerinin yanı sıra hücre farklılaşması, proliferasyon, apoptoz ve tümörjenez de dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda çalışan düzenleyici mekanizmalarda önemli roller oynadığı bilinmektedir. miRNA'ların bir alt kümesi kodlayıcı olmayan RNA'lar, transkripsiyonel sonrası hedef mRNA bölünmesini düzenlemek için kabul ya da baskı altında olan ~ 22-nt uzunluğunda, endojen başlatılan kısa RNA molekülleridir. Nematod, sinek ve memelilerde tüm genlerin yaklaşık %1'ini miRNA'ların oluşturduğu tahmin edilmektedir. miRNA'ların yarısından fazlası konakçı genlerinin intronlarında bulunur ve komşu protein kodlama dizileriyle birlikte eksprese edilir ve bazıları ortak birincil transkriptlerden türetilir ve hatta aynı promotörleri paylaşabilir. Tek bir miRNA'nın birden fazla hedef mRNA'nın ekspresyonunu kontrol edebildiği ve her mRNA'nın birden fazla miRNA tarafından düzenlenebileceği gösterilmiştir. Daha uzun 3' UTR'leri olan genlerin genellikle daha yüksek miRNA bağlama bölgeleri yoğunluğuna sahip olduğunu ve esas olarak gelişimsel modülasyonlarda yer aldığını, oysa daha kısa 3' UTR'leri olan genlerin genellikle daha düşük miRNA bağlama bölgelerine sahip olduğunu ve eğiliminde olduğunu gösterdi. Bildiğimiz gibi, büyüyen bir miRNA gövdesi gelişim ve dokuya özgü düzenleme mekanizmaları gösterir, ancak bilinen miRNA'ların önemli bir kısmı evrensel olarak çeşitli dokularda ve türlerde eksprese edilmektedir. Buna göre, miRNA'ların biyogenezini (Şekil 2.1.) ve işlevlerini düzenlemek için düzenleme ağlarının var olabileceği açığa çıkmıştır (Cai vd., 2009).



**Şekil 2.1.** miRNA biyogenezinin şematik gösterimi

İnsandaki miRNA biyogenezi, nükleer ve sitoplazmik bölünme olayı ile iki aşamalı bir süreci takip etmektedir. Çekirdekte miRNA'lar, ya kendi promotörleri tarafından ya da konakçı genlerinin promotörlerini paylaşarak, pri-miRNA adı verilen uzun bir transkript olarak kopyalanır. İki RNA polimeraz arasında miRNA'nın çoğunluğu için RNA pol II ve RNA pol III, RNA pol II'nin pri-miRNA transkripsiyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Pri-miRNA, pol III transkripsiyonunu sonlandıran üridin kalıntıları dizileri içermektedir. Transkripsiyon için genellikle pol II tercih

edilmektedir. pri-miRNA'nın istisnası olmasına rağmen, miR-142'nin transkripsiyonu RNA pol III tarafından gerçekleştirilmektedir. Yukarıda belirtilen özelliklere ek olarak, transkripsiyonel başlangıç bölgeleri genlerden çok uzakta bulunur ve promotörler, RNA pol II'nin tipik özelliklerini içermektedir. miRNA'nın transkripsiyonel regülasyonu bazen miRNA'nın pozitif veya negatif regülasyonu kendi ekspresyonlarını aşağı regüle ettiği veya çoğalttığı geri besleme döngüsünü takip eder. İntronlarda bulunan miRNA'lar, mirtronlar olarak bilinir. Mirtron varlığı *Drosophila*, *C. elegans*, omurgalılar ve bitkilerde yaygındır. Öncelikle mirtronlar için olan transkripsiyon, konakçı genden bağımsız olarak gerçekleştirilmektedir (Vishnoi & Rani, 2017).

Pri-miRNA'nın nükleer bölünmesi, Drosha RNase III endonükleaz tarafından gerçekleştirilir. Drosha RNase III endonükleaz, birincil gövde döngüsünün tabanına yakın bölgelerde gövdenin her iki sarmalını da keser ve ~60–70 nt uzunluğunda kök döngü ara maddesini serbest bırakır, miRNA öncüsü veya pre-miRNA olarak adlandırılır. Sadece bu, pri-miRNA, esnek bir terminal döngüsüne ( $\geq 10$  bp) ve 5' fosfata ve ~2 nt 3' tek sarmallı RNA çıkıntısına sahip fonksiyonel miRNA'ya olgunlaşır. RNase III endonükleaz Drosha ve çift sarmallı RNA bağlayıcı protein DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8) aracılığıyla pasha olarak da bilinir. PremiRNA, 5' fosfat ve 3' 2 nükleotid çıkıntısı ile kademeli bir kesime sahiptir. Mirtronlar istisnadır ve öncü eklemeyi serbest bırakan Drosha yolunu atlar. Bu premiRNA, exportin-5 ve Ran-GTP'nin etkileşimi yoluyla sitoplazmaya taşınır (Vishnoi & Rani, 2017).

Sitoplazmada pre-miRNA olgunlaşması ayrıca RNase III endonükleaz Dicer tarafından gerçekleştirilir. Tabandan yaklaşık olarak iki sarmal dönüşte 5' fosfat ve 3' çıkıntıyı tanır ve çift ipliği keser. Bölünme, ilmek yapısını ayırır ve kusurlu çift sarmal, miRNA:miRNA\* kompleksi olarak bilinir. miRNA, olgun bir miRNA iken miRNA\*, miRNA'nın karşıt koludur, bu kompleks ve miRNA\*, miRNA'nın klonlanmasıyla ortaya çıktığı gibi kısa ömürlüdür. Dicer, sarmal, bir PAZ alanı, çift sarmallı RNA bağlama alanı ve bir RNAIII alanı varlığı ile karakterize edilir. PAZ alanı 3' bölgesini tanır ve tüm prosedür sadece miRNA kompleksi Dicer'a yüklendiğinde gerçekleştirilmektedir (Vishnoi & Rani, 2017).

## 2.5. Hipofiz Bezi

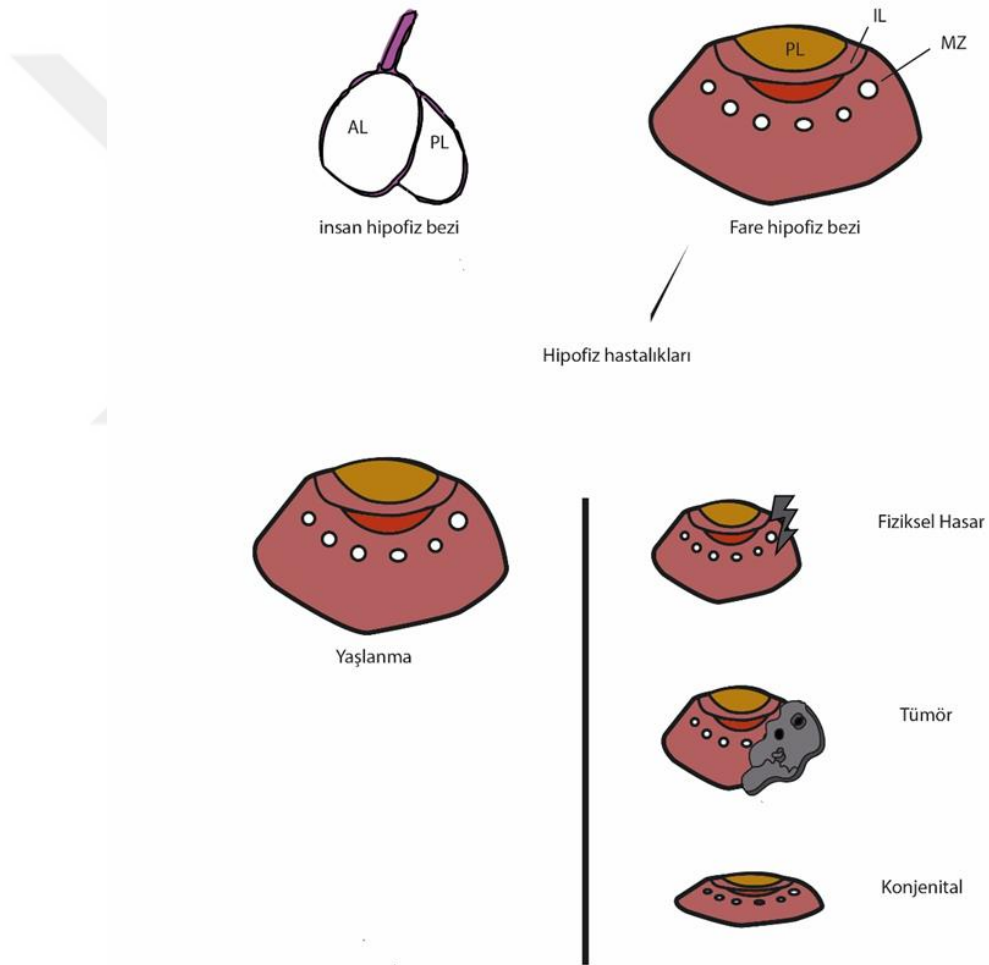
Beyin tabanında, hipotalamusun altında bulunan 0,5 gram ağırlığında endokrin bir bezdir. Görevi hormon üretip, salgılayarak hemeostasiyi düzenlemek. Bunu hipotalamusun uyarımları ile iç salgı bezlerini denetleyerek yapmaktadır. Ön, orta ve arka olmak üzere üç parçadan oluşmaktadır. Ön lopta epitel doku, arka lop sinir hücrelerinden oluşmuş ara lop ise birçok canlıdan bulunmakla birlikte yetişkin insanlarda körelmiş haldedir. Hipofizin her üç lobu da hipotalamus ile bağlıdır ve hipotalamusun kontrolündedir (Vankelecom & Chen, 2014).

Hipotalamik-hipofizer sistem vasküler bir ağ ile çevrilidir. Bu ağ sayesinde hipotalamus ile hipofiz anlık iletişim kurabilmektedir. Hipotalamus, hipofizer hormonların salgısını kontrol eden özelleşmiş hücre grupları içermektedir. Parventriküler çekirdek (PVN), Arkuat çekirdek (ARC), Medial çekirdek (MN), Suprakizmatik çekirdek (SCN), Periventriküler çekirdek (PeVN) ve Lateral Hipotalamik Area (LHA) isimli hücre grupları enerji dengesi, yeme davranışının düzenlenmesi ve nöroendokrin fonksiyonların düzenlenmesi gibi önemli fonksiyonların gerçekleşmesinde yardımcı olmaktadır.

Magnoselüler nöronlar ve parviselüler nöronlar, hipotalamusun endokrin ve sinir sistemi arasında köprü oluşturan hücre gruplarıdır. Ön hipofizden hormon salımını kontrol eden parviselüler hücreler, Tritopin Salgılatıcı Hormon (TRH) ve Kortikopin Salgılatıcı Hormon (CRH) salgılayanlar PVN çekirdekte, Somastotasin (SS) salgılayanlar PeVN'de, Growth Hormone Salgılatıcı Hormon (GHRH) ve Dopamin (DA) salgılayanlar ARC çekirdekte, Gonadotropin Salgılatıcı hormon ise LHA çekirdekte bulunmaktadır. Arka hipofizde depo edilen magnoselüler hücreler ise Oksitosin (OT) ve Arjinovasporesini (AVP) hücrelerinin salgılanmasını sağlamaktadır (Szarek vd., 2010).

Adrenokortikotropik hormon (ACTH), tiroid uyarıcı hormon (TSH), büyüme hormonu (STH), prolaktin (PRL), eşey hormonları (gonadotropinler), luteinleştirici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) hipofizin ön lobunda sentezlenen ve salgılanan hormonlardır (Vankelecom & Chen, 2014). Hipofiz tarafından hormonların sentezi ve salgılanması, hipotalamustan gelen uyarıcı ve engelleyici faktörler ve hedef bezlerden gelen geri bildirim habercileri dahil olmak üzere

merkezi ve çevresel sinyaller tarafından düzenlenir (Nys & Vankelecom, 2021). Hipofiz fonksiyon bozukluğu ve hatalık organizmanın biyolojisini güçlü bir şekilde etkiler. Fiziksel hasar, tümör gelişimi ve yaşlanma hipofiz işlevselliğini olumsuz etkilemektedir. Hormon hücrelerinin üstünde hipofiz, bir kök hücre popülasyonu içermektedir. Bu kök hücrelerin fizyolojik rolleri henüz bilinmemektedir aynı zamanda bu kök hücrelerin piyitif hastalığa dahil olup olmadığı ve kusurlu işlevselliğin geri kazanılması belirsizliğini korumaktadır (Nys & Vankelecom, 2021).



**Şekil 2.2.** İnsan ve fare hipofiz bezinin şematik gösterimi. İnsan hipofizi anterior hipofiz ve posterior hipofiz olmak üzere iki bölgeden oluşmaktadır. Fare hipofizi ise anterior hipofiz, posterior hipofiz ve intermedier lob bölgelerinden oluşmaktadır. Ayrıca Marjnal zon, kök hücrelerin yoğun olarak bulunduğu bir bölge de içermektedir. Yaşlanma, fiziksel hasar, tümör ve konjenital sorunlar nedeniyle oluşan hipofiz hastalıkları şematize edilmiştir.

Hipofiz, GH üretiminin azalmış hipotalamik stimülasyonunun somatopozda gözlenen büyüme hormonu düşüşünde rol oynadığına dair göstergeler vardır ancak, azalmış işlevsellik ile hipofiz yaşlanmasının bir rol oynayıp oynamadığı henüz bilinmemektedir (Nys & Vankelecom, 2021). Gonadotropolar ayrıca yaşlanma ile ilişkili değişiklikler göstermektedir. Yapılan çalışmalarda erkek sıçan hipofizinde, hücrelerdeki büyük veziküllerden küçük veziküllere doğru fenotipik bir kayma ve gonadotrop hücre sayısının ve boyutunun azaldığı bulunmuştur. FSH ve LH seviyeleri erkek sıçanlarda yaşlanma ile beraber azalırken, dişi sıçanlarda sabit kalır hatta yükselebilmektedir. Farelerde ve insanlarda GH'daki hücre sayısı yaşlanma ile birlikte azalmaktadır (Laporte vd., 2021). GH seviyesindeki düşüşün homozigot GH reseptörü nakavt farelerde daha uzun yaşam ömrü görülmesi, bunun aksine GH aşırı ekspresyonun yaşam süresini önemli ölçüde kısaltması nedeniyle yaşam süresinin altında yatan ana neden olduğu düşünülmektedir. Azalan GH, karaciğer tarafından üretilen IGF1 düzeylerin düşmesine neden olur. GH/IGF eksenini, artan yaşam süresi ile giderek daha fazla ilişkilendiren kalori kısıtlaması tarafından da düşmektedir. Hipofiz GH üretimi azalmış hipotalamik stimülasyonun, somatotroplarda gözlenen GH düşüşünde rol oynadığına dair göstergeler vardır. Ancak azalmış işlevsellik ile hipofiz yaşlanmasının bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Nys & Vankelecom, 2021).

Hipofizde salgılanan, kök hücre benzeri özellikler gösteren, Side Population (SP) adında bir hücre popülasyonu olduğu bilinmektedir. Bu hücrelerin kök hücreler ile olan benzer özelliği, toksik maddelerin hücreden atılmasını sağlayan ABC transporter moleküllerinin ifade edildiği ve yüksek aktiviteye sahip olmasıdır. SP'nin biyokimyasal analizi sonucunda kök hücreler ile ilgili birkaç belirtecin (sca1, Nanog, Oct-4, CD133) ve kendini yenilemenin moleküler efektörlerinin aşırı ekspresyon göstermesi bulunmuştur. Ayrıca SP hücreleri yapışmayan küreler şeklinde klonal olarak büyüebilmektedir, bu özellik sayesinde seri geçişlerden sonra tutulduğunda kendini yenileme aktivitesi olarak kabul edilir ve çoklu dokuların kök/progenetör hücreleri olarak paylaşılmaktadır (Florio, 2011).

## 2.6. Hipofizer Erişkin Kök Hücreler

Hipofiz tümörü oluşumu ile kök hücreler arasındaki bağlantı henüz netlik kazanmamıştır. Yerleşik hipofiz (sox2) kök hücreleri, bezlerinde tümör oluşumu sırasında aktive olmuş gibi görünür ancak doğrudan tümöre yol açmazlar (Vankelecom & Chen, 2014). Son 15 yılda, hipofiz bezinin yerleşik bir kök hücre bölmesi barındırdığına dair kanıtlar birikmiştir. Hipofiz kök hücrelerinden büyüyen ve kök hücre fenotipi ve aktivasyon durumunu özetleyen organoidler olarak adlandırılan yeni ve güçlü bir in vitro araştırma modeli bulunmaktadır. Marjinal bölge (MZ) embriyonik olarak gelişen hipofizin projenitör hücrelerini barındırır. Sox2 topografyası doğumdaki hücreler, MZ'de çok hücreli katmanlar gösterir, özellikle ön ve orta lobun (kamalar olarak adlandırılır) birleşme bölgesinde belirgindir, burada Sox2 + kök hücrelerinin "akımları" gelişmekte olan AP'ye doğru hareket eder. Ayrıca, kök hücre bölmesi, çoğalan Sox2 + hücrelerinin daha büyük bir oranını içeren daha yüksek bir aktivasyon durumu gösterir. Kök hücrelerin canlı yeni doğan büyüme evresinde kilit oyuncular olup olmadığı ve yaşlılıkta hipofiz fonksiyonundaki düşüşün azalmış kök hücre zindeliği ile ilişkili olup olmadığı gibi birçok soru çözülmemiştir. Ayrıca, hipofiz plastisitesinin altında yatan moleküler mekanizmalar, özellikle kök hücre bağlantılı olanlar, hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Hipofiz kök hücrelerinin bezin yaşlanma fenotipine dahil olduğu düzenli olarak varsayılmış olsa da, bu varsayım şu anda yalnızca çok az desteklenmektedir. Hipofiz kök hücrelerini kapsadığı bilinen folekülstelat (FS) hücrelerinin sayısı yaşlı sıçanlarda azalır (genç sıçanlarda referans alan başına 4,5 hücreden yaşlı sıçanlarda 1,5'e düşmektedir). Ancak insan hipofizinde FS hücre sayısının genişlediği bulunmuştur. İlginç bir şekilde, hipofizin onarıcı kapasitesi de yaşlanmayla birlikte oldukça hızlı bir şekilde azalmaktadır. Birlikte ele alındığında, yaşlanma sırasında hipofizin hücre yapısında ve hormonal çıktısında çeşitli değişiklikler meydana gelir, ancak şu anda, yaşlanmanın yerel kök hücreler üzerindeki etkisi ve bu değişikliklere katılımı hakkında neredeyse hiçbir şey bilinmemektedir (Laporte vd., 2021).

### 2.6.1. Hipofizer Erişkin Kök Hücreler ve Yaşlanma

Hipofiz ve hormonal faktörlerin yaşlanma sürecini etkilediği, genetik fare modellerinden anlaşılmaktadır. Yaşlanmış hücrelerde, geri dönüşü olmayacak bir şekilde hücre döngüsünün durması, interlökin-6 (IL-6) gibi inflamatuvar sitokinler ve ‘yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi’ (SASP) faktörlerin salgılanması ile karakterize edilir. İlginç bir şekilde hipofizin onarıcı kapasitesi de yaşlanma ile birlikte hızlı bir şekilde azalır. Dokuların hemeostatik ve rejeneratif kapasitesi de yaşlanma ile birlikte azalır ve doku kök hücrelerin, organların fiziksel ve fonksiyonel düşüşüne katkıda bulunabilecek bir yaşlanma süresine girdiğine dair giderek daha fazla kanıt bulunmaktadır (Nys & Vankelecom, 2021).

Kök hücre yaşlanması hem yerel hem de sistemik düzeyde kök hücre işlevi ve düzenlenmesinde dejeneratif değişikliklerden kaynaklanabilir. Hipofizde kök hücre yaşlanmasının meydana gelip gelmediği net değildir. Yapılan bir çalışmada, hipofizin yenilenme kapasitesinin yaşlı farelerde kaybolduğu keşfedildi ve bunun nedeni olarak da hipofizer kök hücre yaşlanması işaret edildi. Başka bir çalışmada ise kas gibi dokularda kök hücre yaşlanma da içsel işlevlerini koruduğu ancak mikro çevre tarafından baskı altına alındığı böylece mikro çevre genç bir ortam ile değiştirildiğinde gençleşme gösterdiği bulunmuştur (Nys & Vankelecom, 2021).

Hipofiz kök hücrelerin bezin yaşlanma fenotipine dahil olduğu varsayılmış olsa da bu varsayım şu anda çok az desteklenmektedir. Kök hücrelerini kapsadığı bilinen FS hücrelerinin sayısı yaşlı sıçanlarda zamanla azalmaktadır. Bununla beraber insan hipofizinde, FS hücre sayısının genişlediği bulundu. Birlikte ele alındığında yaşlanma sırasında hipofizin hücre yapısında ve hormonal çıktısında çeşitli değişiklikler meydana gelir, ancak şu anda yaşlanmanın yerel kök hücreler üzerindeki etkisi ve bu değişikliklere katılımı hakkında neredeyse hiçbir şey bilinmemektedir. Bildiklerimiz dahilinde olanlar, diğer birçok dokudaki kök hücrelerde olduğu gibi sayılarının, aktivitelerinin ve uygunluklarının zamanla azalmasıdır (Laporte vd., 2021).

## **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1. Gereç**

#### **3.1.1. Cihazlar**

Biomark HD (Fluidigm)

Invert Mikroskop (Leica)

Sitospin santrifüjü (Thermo)

Pipet Tabancası (Thermo)

DNA RNA Çalışma Kabini (Biosan)

Vorteks (Heidolph)

Mikrofüj (Thermo)

Mikropipet (Gilson)

-80°C Soğutucu (Binder)

-20°C Soğutucu (Vestel)

4°C Soğutucu (Samsung)

Timer (Isolab)

#### **3.1.2. Sarf Malzemeler**

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

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

Rabbit anti-rat GH (Dr A. F. Parlow)

Rabbit anti-rat PRL (Dr A. F. Parlow)

Donkey Serum (Sigma, D9663)

DAPI (sigma)

Mm\_miR-21 miScript Primer Assay (Qiagen)

Mm\_miR-150 miScript Primer Assay (Qiagen)

Mm\_let-7e miScript Primer Assay (Qiagen)

SNORD96A\_11 miScript Primer Assay (Qiagen, NR\_002592)

RNU6-2\_11 miScript Primer Assay (Qiagen, NR\_125730)

RNA Later (Qiagen)

miRVANA PARIS RNA Purification Kit (Thermo)

miScript Microfluidics PreAMP Kit (Qiagen)

miScript II RT kiti (Qiagen)

Saponin (Sigma)

Mikrofüj Tüpler (Axygen)

10 -200 l Filtreli Pipet Uçları (Axygen)

1000 l Filtreli Pipet Uçları (Vertex)

10 - 1000 l Filtresiz Pipet Uçları (Greiner)

Lam, Lamel (Thermo)

Pap Pen (Abcam)

Alkol (Tekel)

Distile Su (Millipore)

T p Standı (Isolab)

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Fare Hipofiz  rneklerinin Toplanması**

Bu projede daha önce etik kurul izinleri alınmış iki ayrı çalışma için kullanılan hayvanların  l  dokuları kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında daha önceki çalışmalarda sakrifiye edilen hayvanların  l  dokuları kullanılmış olup hayvan

sakrifiye edilmemiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar, 13.12.2017 tarihli, karar no:17/127, “Yaşlanmaya bağlı değişikliklerin hipofiz dokusunda rejenerasyon ve miRNA ifade düzeyleri bakımından araştırılması” başlıklı proje ve 15.01.2014 tarihli, karar no: 14 / 003, “Travmatik Beyin Hasarlı Fare Modellerinde Hipotalamik-Hipofizer Aksın İncelenmesi” başlıklı proje için kullanılmış olan farelerin ölü dokularının bu tez çalışması için kullanılmasının uygunluğunda dair alınan 08.09.2021 tarihli etik kurul onayı ile gerçekleştirilmiştir. Mevcut ölü dokular için örnek sayısı 3 ile 10 arasında değişmektedir. Çalışmada erkek BALB/c farelerin dokuları kullanılmıştır ve fareler 2 aylık, 4 aylık, 6 aylık ve 16 aylık olarak gruplanmıştır.

### **3.2.2. Hücre Düzeyinde İmmünflorasan Boyamalar ve Görüntüleme**

Daha önce hücrelerine ayrıştırılmış hipofiz preparatları kullanılmıştır. Hücrelere ayrıştırmak için hipofiz posterior lobdan çıkartıldıktan sonra ön hipofiz dokusunun hücrelere ayrıştırılması için öncelikle %2,5’lik tripsin solüsyonunda 37°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir (Denef et al., 1989). Ardından DNase enzimi ile bir dakika bekletilmiştir ve hipofizlerin tüpün dibine çökmesi sağlanarak supernatant atılmıştır. Ön hipofiz dokusuna tripsin inhibitörü eklenerek 37°C’de 15 dakika muamele edilmiştir. Süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra hipofizler modifiye edilmiş hipofize özgü medyalarla önce 5 dakika sonra 15 dakika 37°C’de bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin dolmasına müteakip hipofiz hücrelere ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılmış hipofiz hücrelerinden preparat hazırlanması için sitospin santrifüjü kullanılmıştır.

Hazır hipofizer preparatlarının immunfloresan tayini için, 2 aylık ve 6 aylık farelere ait ayrıştırılmış hücreler Rabbit anti-rat GH (Dr A. F. Parlow), Rabbit anti-rat PRL (Dr A. F. Parlow), Sox2 (R&D Systems, AF2018) antikorları kullanılarak boyanmıştır. Hipofizer hücreler üç kez 10 dakika % 0,125’lik saponin çözeltisinde yıkandıktan sonra, sekonder antikor ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından bir kez % 0,125’lik saponin ile, üç kez PBS ile yıkandıktan sonra DAPI mounting medium eklenerek mikroskop analizi için hazır hale gelmiştir. Görüntülemek için Leice DMI4000 floresan mikroskobu kullanılmıştır. Elde edilen görüntüler Image J programında cell counter plug-in kullanılarak sayılmıştır.

### 3.2.3. Real-Time Quantitatif PCR (RT-qPCR)

4 aylık ve 16 aylık fare ön hipofizinden elde edilmiş total RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Bunun için miScript II RT kiti (Qiagen) kullanılarak üretici talimatlarına göre RNA örneklerine 5X miScript HiSpec Buffer, 10x Nucleics Mix, RNase-free water ve miScript reverse transcriptase karışımı eklenmiştir. Hazırlanan reaksiyon 37°C’de 60 dakika ve 95°C’de 5 dakika inkübe edilmiş ve 10ul hacmindeki solüsyon 40ul RNaz-free su ile seyreltilmiştir.

Genç ve yaşlı hipofiz dokularının let-7e, miR-21 ve miR-150 miRNA (Primer Assays, Qiagen) ifade düzeyleri tespit edilmesi için mikrofluidik tabanlı Real-time RT-PCR yöntemi (Fluidigm Biomark) kullanılmıştır. 12x12 olarak organize edilmiş FlexSix çiplerine örneklerin ve ilgili miRNA primer assay’lerinin yüklenmiştir.



**Şekil 3.1.** 12x12’lik FlexSix çip

Mikrofluidik PCR kit komponentleri ve çip için özel sarf malzemeleri bu çipin “assay” yani deney kısmına yüklenirken “sample” yani örnek kısmına yüklenmiştir. Yüklenen solüsyonların çip içerisine dağıtılması şekil 3.2 ‘de gösterilen çip kontrolcüsü içerisindeki yazılım ile yapılmıştır. Yaklaşık 1,5 saat süren bu işlemin ardından, çip Biomark HD sistemine yüklenecektir (Şekil 3.3.).



**Şekil 3.2.** Çip kontrolcüsü



**Şekil 3.3.** Biomark HD

**Tablo 3.1.** Mikrofluidik ‘Assay’ ve ‘Sample’ Karışımı

<b>Mikrofluidik "Assay" Karışımı</b>	
Mikrofluidik Universal Primer	165 ul
2X Assay Loading Reagent	30 ul
Rnaz-free su	165 ul
Total	660 ul
<b>Mikrofluidik "Sample" Karışımı</b>	
Mikrofluidik Master Miks	330 ul
20X DNA Binding Dye	33 ul
Rnaz-free su	77 ul
Total	440 ul

Real-time RT-PCR termal döngüsü mikrofluidik sistem için Tablo 3.2.’de gösterildiği gibi ayarlanmıştır.

**Tablo 3. 2.** Real-time RT-PCR Termal Döngüsü

<b>Basamak</b>	<b>Zaman</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
<b>Termal karışım</b>	120 saniye	50 °C	1
	1800 saniye	70 °C	1
	600 saniye	25 °C	1
<b>Aktivasyon</b>	600 saniye	95 °C	1
<b>3 aşamalı döngü</b>	15 saniye	94 °C	40
	30 saniye	55 °C	
	30 saniye	70 °C	

Biomark HD cihazından elde edilen olan ham veriler, GraphPad Prism 9.3.1 programı kullanılarak Two-way ANOVA testi analiz edilmiştir. Normalizasyon için SNORD96A ve RNU6-2 kullanılmıştır.

$\Delta Cq$  değerlerinin hesaplanması için  $\Delta Cq = Cq_{miRNA} - Cq_{referans}$  formülü kullanılmıştır. Katsayı değişimi (fold change)  $\Delta\Delta Cq$  yöntemi ile için  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

#### **3.2.4. İstatistiksel Analiz**

Graphpad Prism 9.3.1 kullanılarak yapılan analizlerde GH, PRL ve Sox2 hücre sayısı 2 aylık ve 6 aylık farelerde Student's t-test ile karşılaştırılmıştır ( $p < 0,05$ ). 4 aylık ve 16 aylık farelerde gen ifade düzeylerinin Two-way ANOVA post-test Tukey ile yapılmıştır ( $p < 0,05$ ).

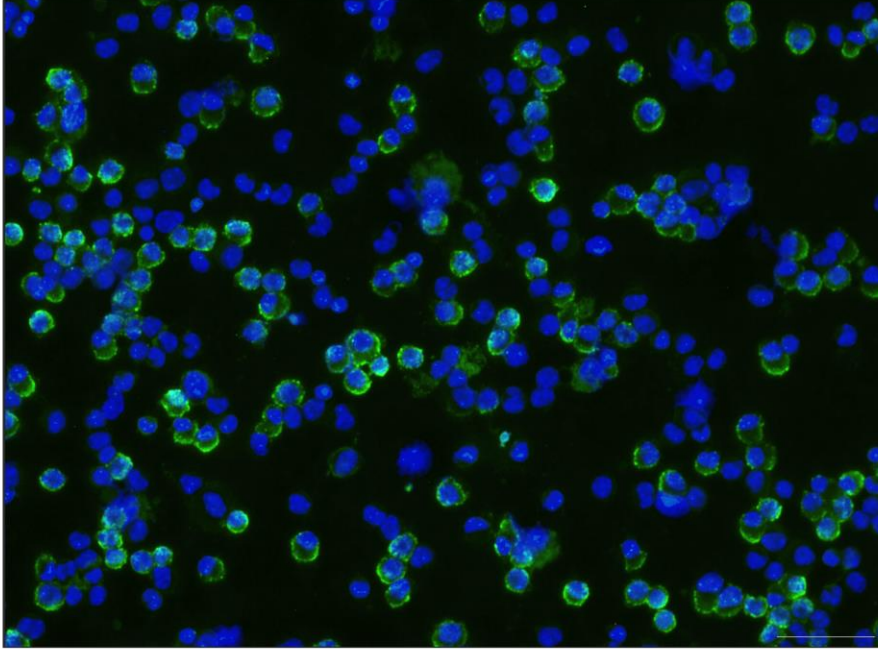
## 4. BULGULAR

### 4.1. 2 Aylık ve 6 Aylık Farelerde Somatotrop ve Laktotropların Karşılaştırılması

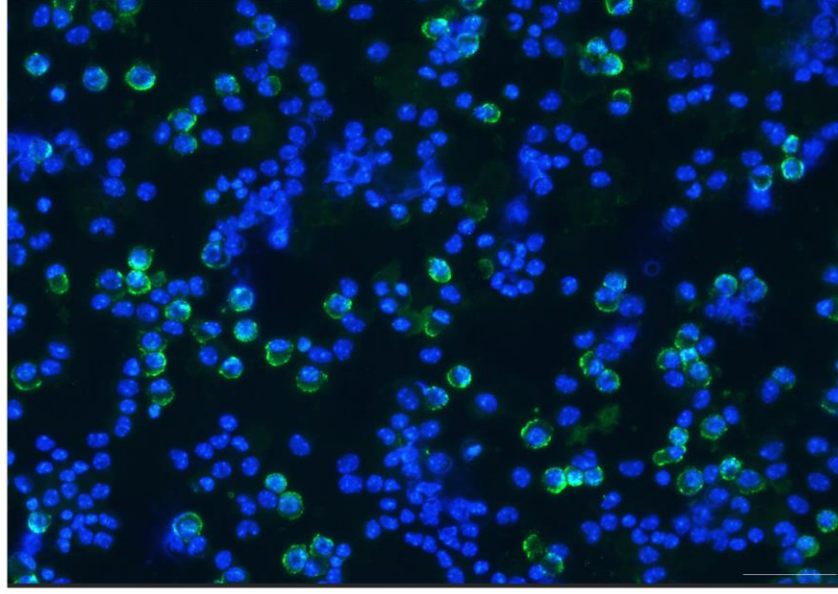
Hücrelerine ayrıştırılmış 2 aylık ve 6 aylık farelerin ön hipofizi incelendiğinde, GH salgılayan somatotrop hücrelerinin sayısında azalma gözlemlenirken, PRL salgılayan laktotrop hücrelerinin sayısının arttığı gözlemlenmiştir.

2 aylık (n=4), 6 aylık (n=7) farelerin hücrelerine ayrıştırılmış hipofiz dokusunda somatotrop hücrelerinin temsili görüntüleri Şekil 4. 1'de gösterilmektedir. Her bir zaman dilimi için 5 farklı teknik replikat kullanılmıştır.

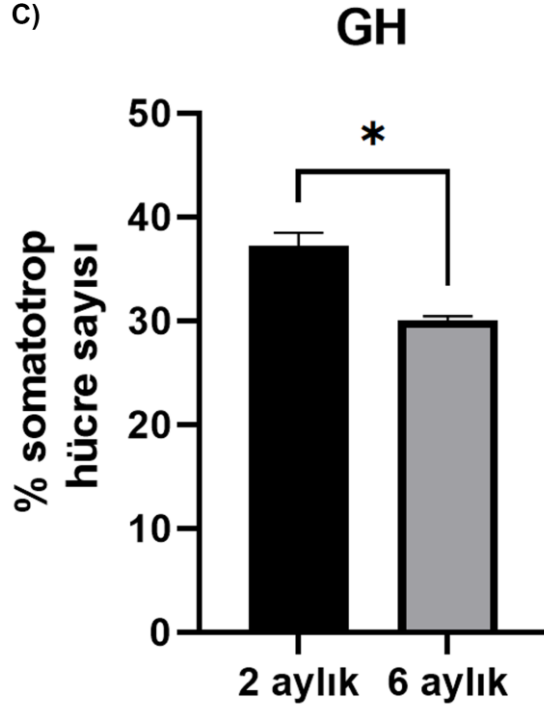
**A)**



B)



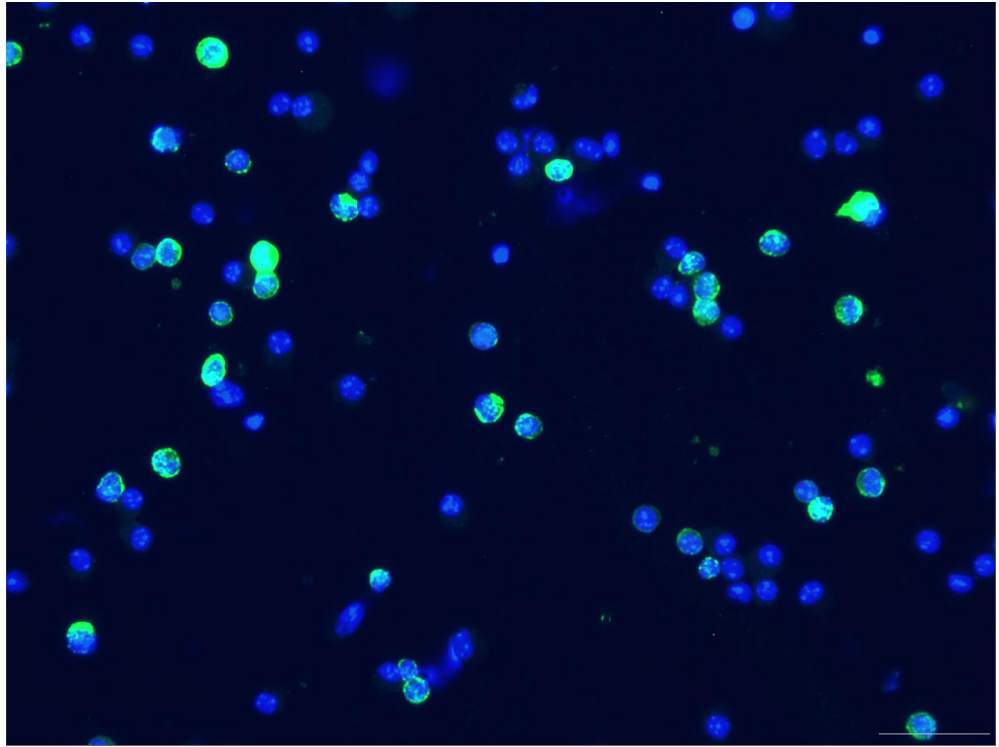
c)



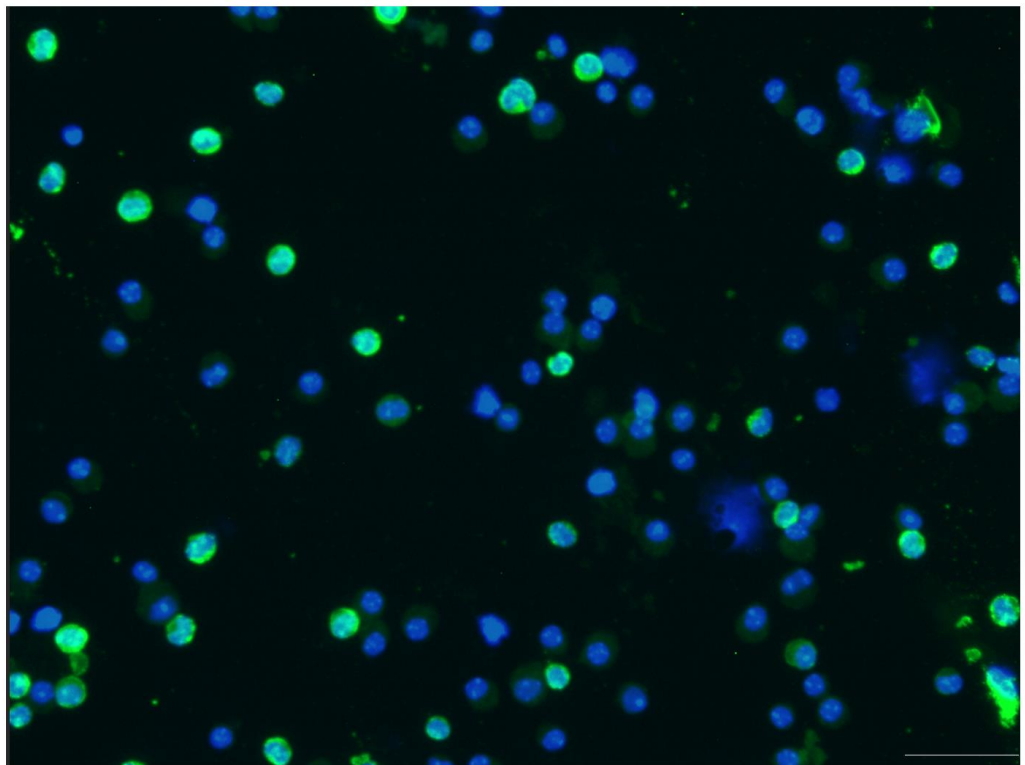
**Şekil 4.1.** GH salgılayan hücreler yaşlanma ile birlikte azalmaktadır. Somatotropların 2 aylık ve 6 aylık hücrelerine ayrıştırılmış fare hipofizinde temsili görüntüleri A) 2 aylık (n=4), B) 6 aylık (n=7) fare hipofizinde C) hücre sayıları karşılaştırılmıştır (Student's t test, \*p= 0,0147). Veriler ortalama  $\pm$  sem olarak grafikte gösterilmektedir. Ölçü belirteci 50 mikronu göstermektedir.

2 aylık (n=7), 6 aylık (n=10) farelerin hücrelerine ayrıştırılmış hipofiz dokusunda laktotrop hücrelerinin temsili görüntüleri Şekil 4.2.'de gösterilmektedir.

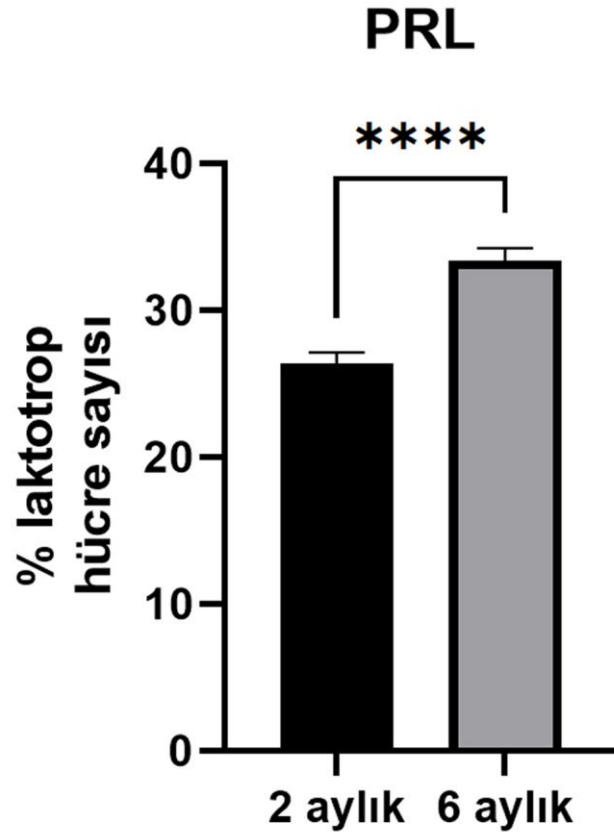
A)



B)



C)

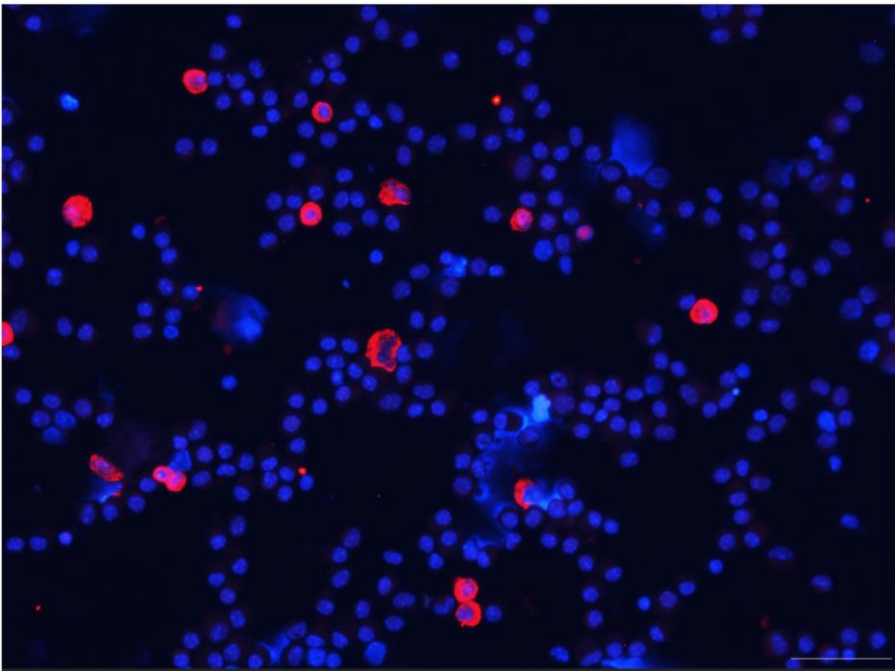


**Şekil 4.2.** PRL salgılayan hücreler yaşlanma ile birlikte artmaktadır. Laktotropların A) 2 aylık (n=7) ve B) 6 aylık (n=10) hücrelerine ayrıştırılmış fare hipofizinde temsili görüntüleri ve C) hücre sayılarının karşılaştırılması (Student's t test, \*\*\*\*p < 0,0001). Veriler ortalama  $\pm$  sem olarak grafikte gösterilmektedir. Ölçü belirteci 50 mikronu göstermektedir.

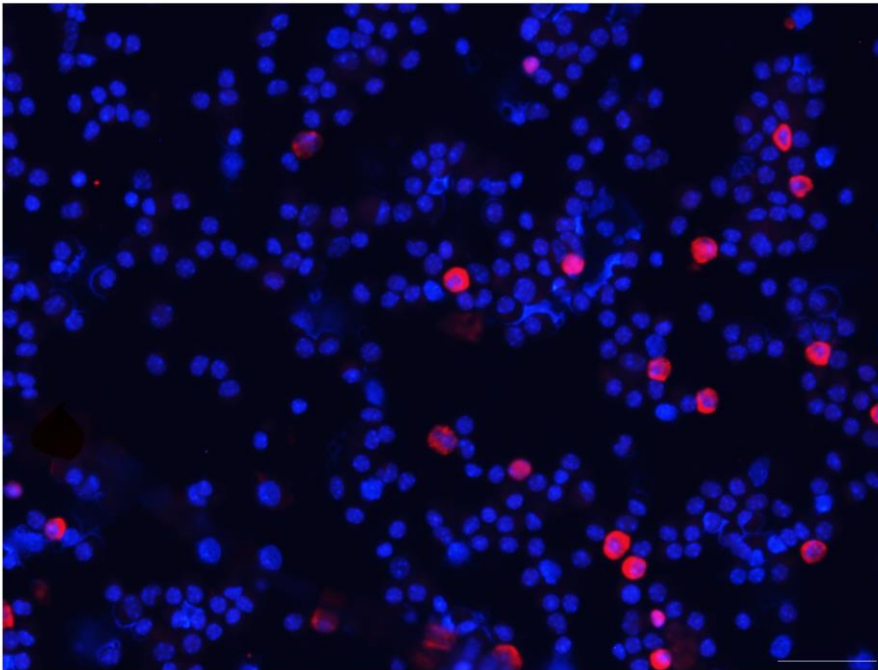
#### **4.2. 2 Aylık ve 6 Aylık Farelerde Sox2 İfade Eden Kök Hücrelerin Karşılaştırılması**

Hücrelerine ayrıştırılmış 2 aylık ve 6 aylık farelerin ön hipofizi incelendiğinde, Sox2 ifade eden kök hücrelerin sayısında bir farklılık gözlemlenmemiştir.

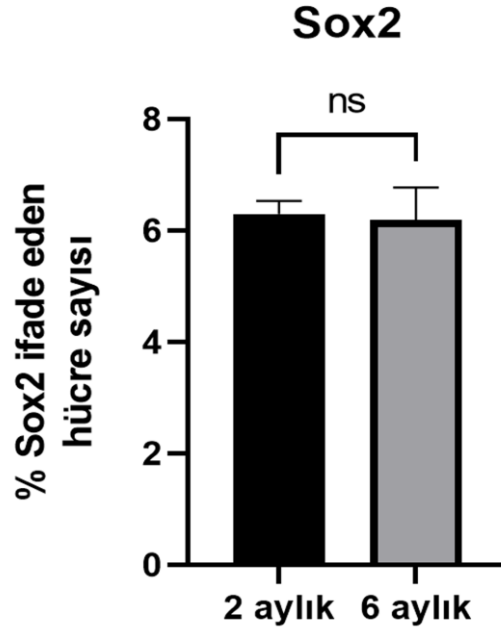
A)



B)



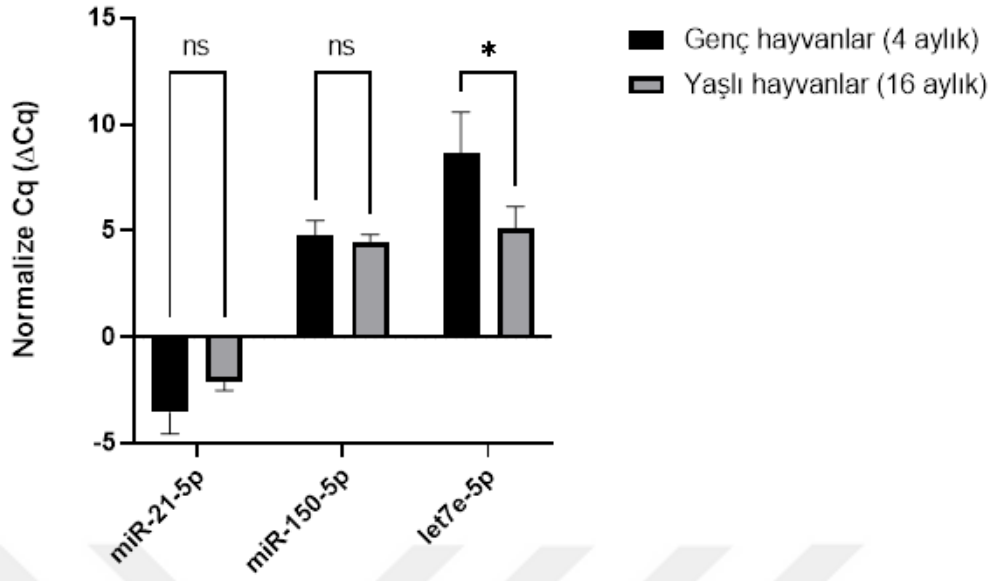
c)



**Şekil 4.3.** Sox2 kök hücrelerinin sayısında erken yaşlanma döneminde bir farklılık gözlemlenmemektedir. Kök hücrelerin A) 2 aylık (n=4) ve B) 6 aylık (n=6) fare hipofizinde temsili görüntüsü ve C) hücre sayılarının karşılaştırılması (Student's t test, p= 0,3661) Veriler ortalama  $\pm$  sem olarak grafikte gösterilmektedir. Ölçü belirteci 50 mikronu göstermektedir.

#### 4.3. Genç ve Yaşlı Fare Ön Hipofizlerinde miRNA İfade Düzeyleri

Genç (n=3) ve yaşlı farelerde (n=3) miR-21-5p, miR-150-5p ve let-7e miRNA ifade düzeyleri ön hipofiz dokularında RT-qPCR ile ölçülmüştür. Genç ön hipofiz örnekleri için 4 aylık fareler kullanılırken, yaşlı anterior hipofiz örnekleri için 16 aylık fareler kullanılmıştır. Normalizasyon SNORD96A ve RNU6-2 genleri ile yapılmıştır. Her biri üç farklı bağımsız örnekten elde edilen veriler sonucunda, miR-21 ve miR-150-5p ifade düzeylerinde anlamlı bir fark gözlemlenmezken, yaşlı farelerde let-7e ifade düzeyinin genç farelerle karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiştir.



**Şekil 4.4.** Ön hipofiz dokularında miRNA ifade düzeyleri gösterilmektedir. Genç farelerde (n=3) ve yaşlı farelerde (n=3) miR-21-5p (p=0,2908) miR-150-5p (p=0,7731), let-7e (p=0,0292) miRNA ifade düzeyi relatif olarak RT-qPCR ile ölçülmüştür. Genç ön hipofiz örnekleri için 4 aylık fareler kullanılırken, yaşlı anterior hipofiz örnekleri için 16 aylık fareler kullanılmıştır. Normalizasyon SNORD96A ve RNU6-2 genleri ile yapılmıştır. Her biri üç farklı bağımsız örnekten elde edilen veriler ortalama  $\pm$  sem olarak grafikte gösterilmektedir. (Two-way ANOVA, \*p< 0,05).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada erken yaşlanma döneminde (2 aylık ve 6 aylık) olan farelerin somatotrop ve laktotrop hücreleri karşılaştırılmış ve somatotrop hücrelerinin sayısında azalma gözlemlenirken laktotrop hücre sayısında artış gözlemlenmiştir. Sox2 ifade eden erişkin kök hücre sayısında erken yaşlanma döneminde bir farklılık tespit edilmemiştir. Ön hipofiz bezinde başlıca growth hormon (GH), prolaktin (PRL), adrenakortikotrop hormon (ACTH), follikül stimulan hormon (FSH), luteinizan hormon (LH) ve tiroid stimulan hormon (TSH) üretilip salgılanmaktadır. Tüm bu hormonların üretimi ve salgılanması hipotalamustan, hipotalamo-hipofizer portal sistem aracılığıyla ön hipofize ulaşan salgılatıcı ve/veya baskılayıcı diğer hormonların kontrolü altında olmaktadır (Emral, 2014). Hipofiz, sella turcica'da hipotalamusun altında yer alan küçük bir bezdir. Kortikotroplar, tirotroplar, gonadotroplar, somatotroplar ve laktotroplar dahil olmak üzere beş ana hücre tipi aracılığıyla hipotalamus ve periferik hedef organlar arasında bir rol görevi gören “ana” endokrin organdır. Somatotroplar spesifik olarak büyüme hormonu (GH) üretir ve hücre popülasyonunun yaklaşık %50'sini oluşturan ön hipofizin ana hücre tipini oluşturmaktadır (H. Zhang vd., 2018).

Hipofizer fonksiyonların yaşlanma üzerinde etkilerine dair ilk çalışmalar, hipofizektomi işlemi uygulanan ratlarda yaşam süresinin uzadığını göstermiştir (Everitt vd., 1983; Powers vd., 2006) Bu çalışmalar, Prolaktin ve Growth hormon ailesinin yaşlanmayı tetikleyici etkileri bulunduğunu göstermiştir. İnsan biyolojik sıvılarında ve hayvan modellerinde gerçekleştirilen çok sayıda çalışma hormonlar ve yaşlanma arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (Caglar vd., 2015; Chesnokova & Melmed, 2022; Console vd., 1993; Noren Hooten vd., 2010; Veldhuis, 2013). Ancak bu çalışmalarda GH ve PRL düzeyleri serumda veya doku

örneklerinde immunohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir. GH salgılayan hipofizer hücrelerin, yani somatotropların yaşlanma ile birlikte sayıca azaldığına dair doku kesitleri kullanılarak yapılan gözlemler mevcut iken, bu çalışmalar hipofizer yaşlanmayı hücre düzeyinde, hipofizi hücelere ayrıştırarak analiz etmemiştir (Laporte vd., 2021). Bu tez çalışmasında, hipofizer yaşlanma ilk kez hipofizin hücrelerine ayrıştırılarak incelenmiş ve somatotrop sayısında erken yaşlanma döneminde azalma olduğu tespit edilmiştir. İnsanlarda büyüme hormonu seviyeleri yaşla birlikte azalmaktadır. Somatopoz yaşlanmaya bağlı endokrin değişikliklerin en başında gelmektedir. Somatopoz, kas kütlesi, kemik yoğunluğu ve deri kalınlığındaki azalmalar gibi yaşlanma ile ilişkili çeşitli durumlarla bağlantılıdır. Somatotropik sinyal yolağı yaşlanma ve yaşam uzunluğu ile ilişkili hayvan modelleri ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda son yirmi yıldır öne çıkmaktadır. Ames dwarf (cüce) fare modeli, ön hipofiz dokusunun farklılaşmasında rol alan transkripsiyon faktörü PIT-1'de meydana gelen bir mutasyondan dolayı, bu fare modelinin normal farelere göre üçte bir oranında daha küçük olmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Ames dwarf farelere dair en önemli gözlemlerden biri vücutlarının küçüklüğünün aksine, yaşam uzunluklarının normal farelerinin iki katı olduğunun tespit edilmesidir (Brown-Borg vd., 1996). Bu fareler somatotrop, laktotrop ve tirotrop hücrelerine sahip değildir dolayısıyla dolaşımında GH, PRL ve TSH hormonları bulunmamaktadır. Bu üç hormonun eksikliğine rağmen, yaşam uzunluğunu düzenleyen primer faktörün GH eksikliği olduğu gösterilmiştir. Benzer bir dwarf fare modelinde yapılan çalışmada, PRL takviyesinin yaşam uzunluğu üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (Flurkey vd., 2001).

Farklı yaşlardaki erkek ve dişi sıçanlarda laktotrop hücre popülasyonunun yanı sıra prolaktin (PRL) salgısının kantitatif immunohistokimyasal değerlendirmesini yapıldığı bir çalışmada, genç (3 aylık) ve yaşlı (20 aylık ve 29 aylık) erkek ve dişi Sprague-Dawley ratlarının hipofizleri incelenmiştir. Her iki cinsiyetten hayvanlarda PRL hücre popülasyonunda yaşa bağlı değişikliklerin ortaya çıktığı, prolaktin serum seviyesinin kadınlarda yaşla birlikte belirgin bir artış gösterdiği, ancak erkeklerde sadece düşük düzeyde bir yükselme gösterdiği bulunmuştur (Cónsole vd., 1997).

Ratlarda yapılan başka bir çalışmada, dişi hayvanlarda PRL mRNA seviyesinde artış gözlemlenmiştir (Seo vd., 1987). Bu gözlemler dişilerdeki laktasyon süreci ile ilişkili

olabilir. Dwarf fare modelinde gösterildiği gibi, bu farelerin yaşam uzunluğuna PRL'nin etki etmediği göz önüne alınacak olursa, çalışmamızda erken yaşlanma dönemindeki erkek farelerde laktotrop artışının gözlemlenmesi dikkat çekicidir. Yaklaşık dört yüz şempanze üzerinde yakın zamanda yapılan bir araştırmada, yaşam uzunluğu ve serum PRL seviyeleri araştırılmıştır. İnsanda PRL serum seviyesi erkek ve kadınlarda karşılaştırıldığında, kadınlarda daha yüksek düzeydedir (Sawin vd., 1989). Şempanzeler üzerine yapılan çalışmada, serum PRL seviyesi dişi ve erkek şempanzeler karşılaştırıldığında insanlardakine benzer bir sonuç elde edilmesine nazaran, yaşlanma ve PRL seviyeleri karşılaştırıldığında şempanzelerde yaşla birlikte PRL seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Şempanzelerdeki gözlemin aksine, insanlarda yaşlanmayla birlikte PRL seviyesinde azalan bir trend gösterdiği rapor edilmiştir (Sawin vd., 1989). Fare modeli kullandığımız çalışmamızda, şempanze çalışmasına benzer şekilde yaşlanmayla birlikte PRL sekrete eden laktotrop hücrelerinin sayısında anlamlı bir artış gözlemlenmektedir. Bu bulgular, insanlarda yapılan çalışmaların örnek sayısı artırılarak tekrar edilmesi gerekliliğini öne çıkartmaktadır. Obezite, somatopozun önemli bir nedeni olarak gösterilse de yaşlanmanın büyüme hormonu seviyesindeki değişkenliğinin arkasındaki faktörlerin çoğu bilinmemektedir (Pamphlett vd., 2019). Yaşlı erkeklerde büyüme hormonu replasmanı bu değişikliklerin bazılarını düzeltildiği gösterilmiştir, ancak somatopozdaki büyüme hormonu replasmanının değeri tartışmalıdır. Bununla birlikte, somatopozun altında yatan faktörlerin bazılarını bulmak, azalan büyüme hormonu seviyelerini önlemek veya tedavi etmek için yöntemler geliştirmede değerli olabilir (Pamphlett vd., 2019). İnsanlar ve laboratuvar kemirgenleri de dahil olmak üzere çeşitli memeli türlerinde dolaşımdaki GH düzeylerinin yaşla birlikte azaldığı gösterilmiştir (Bartke, 2019).

Sox2, kök hücre fenotipinin korunmasından sorumlu transkripsiyon faktörlerinden biridir. Normal hipofiz ve hipofiz nöroendokrin tümörlerinde kök hücrelerin bir belirteci olarak gösterilmiştir. Sox2 hücreleri bu nedenle büyüme hormonu üreten tümörlerde ve normal hipofizlerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu hücrelerin çoğu, olası bir kök hücre popülasyonu olarak folikülo-stellat hücrelerin bir alt popülasyonunu temsil etmektedir (Soukup vd., 2020). Sox2, yaşam boyu kök hücre bakımı ve farklı soylara bağlılık arasındaki dengede önemli bir rol oynadığından,

Sox2'nin kök hücre yaşlanma süreçlerini düzenleyebileceği varsayılmaktadır (Sarlak & Vincent, 2016).

Gelişim, stres ve östrus siklusunda hipofizer hücre kompozisyonunda değişiklikler meydana gelmektedir. Bunlardan en öne çıkanı gebelik ve laktasyon sırasında sayıları birkaç kat artan PRL salgılayan laktotroplardır. Hipofizin çevresel etkenlere cevap veren dinamik bir doku olmasını sağlayan temel mekanizmanın erişkin kök hücreler olduğu gösterilmiştir (Vankelecom, 2012; Vankelecom & Gremeaux, 2010; Vennekens vd., 2021).

Yaşlanma ile birlikte hipofizer kök hücrelerin ve hipofizin rejeneratif kapasitesinin azaldığı bilinmektedir. Bu azalmanın sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte, Sox2, TGFβ ve WNT gibi yollarda yer alan genlerin ifade düzeylerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, erken yaşlanma dönemindeki farelerin hipofizer kök hücre sayısı genç farelerle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu gözlem, ekibimizin daha önce yaptığı çalışmada elde ettiği bulgularla paraleldir ( Kaya, 2019) Yaşlı farelerde kök hücre sayısındaki azalmanın doku düzeyinde gösterildiği önceki çalışmamızda hipofiz hücrelerine ayrıştırılmadan incelenmiştir. Doku kesitlerinin kök hücre rezervi açısından ilk kez incelendiği önceki çalışmamızda, 2 aylık genç farelerle karşılaştırıldığında, hipofizer kök hücre sayısının azaldığına dair ilk farklılık 8 aylık farelerde tespit edilmiştir. 4 aylık farelerde bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu tez çalışmasında, hücrelerine ayrıştırılarak yapılan analizlerde, 2 aylık ve 6 aylık farelerde kök hücre sayısında anlamlı bir fark tespit edilmemesi doku düzeyindeki ve hücre düzeyindeki bulguların birbiri ile örtüştüğünü göstermektedir. Aynı zamanda, hipofizin hücrelere ayrıştırılması sırasında yapılan işlemler ve uygulanan yöntemlerin muntazam bir şekilde gerçekleştirildiğine de işaret etmektedir. Bütünlüğü bozulmayan doku düzeyindeki analizler, hücrelerine ayrıştırılmış preparatlardaki analizlerle doğrulanmıştır.

Kodlamayan yani proteine dönüştürülmeyen küçük RNA molekülleri olan miRNA'lara karşı ilgi, 2000'li yılların başlarında çeşitli hastalıklarla ilişkilendirildiklerinden itibaren oldukça artmıştır (Krichevsky & Gabriely, 2009). Hedef aldıkları genlerle etkileşimleri sayesinde miRNA'lar birçok biyolojik süreci kontrol edebilmektedir ve başta kanser olmak üzere Alzheimer ve Parkinson gibi

yaşa bağılı hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadıkları gösterilmiştir. miRNA'ların yaşlanmanın biyolojisinde rol aldığına dair model organizmalardan insanlara çeşitli kanıtlar mevcuttur. miRNA'lar, kök hücrelerin yeniden programlanmasında ve pluripotent kapasitelerinin düzenlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (Xu vd., 2009).

Bu çalışmada miR-21, miR-150 ve let-7e miRNA'larının seçilmesinin nedeni bu faktörlerin yaşlanmayla olan ilişkisine dair bulgulara dayanmaktadır. İnsanlarda yapılan bir çalışmada, miR-21'in yüz yaşındaki bireylerde daha düşük seviyede ifade olduğu gözlemlenmiştir (Elsharawy vd., 2012). Başka bir çalışmada, ortalama yaşı altmışaltı olan bireylerde miR-150 ve let-7e'nin genç ve yaşlı bireyler için biyolojik yaşları bakımında ayırt edici faktör olarak kullanılabilceğini göstermiştir (Huan vd., 2018). İnsanlar üzerine yapılan her iki çalışmada kan örnekleri kullanılmıştır. Fare modeli üzerinde yapılan bir çalışmada, travmatik beyin hasarı sonrası genç ve yaşlı fareler moleküler düzeydeki travma cevabı açısından değerlendirildiğinde, miR-21'in genç farelerde aktive olurken, yaşlı farelerde bu cevap gözlemlenmemiştir (Sandhir vd., 2014). miR-21'in hipofizer doku homeostasisi üzerindeki rolünün ortaya konması açısından çalışmamızda 4 aylık ve 16 aylık farelerin ön hipofizleri incelenmiş ancak miR-21 ifade düzeyleri arasında bir fark gözlemlenmemiştir. Benzer şekilde çalışmamızdaki genç ve yaşlı ön hipofiz dokularında, miR-150 ifade düzeyleri arasında bir fark bulunmamaktadır. Yaşlanma ve kök hücreler üzerinde düzenleyici rolleri bulunmakla birlikte, miR-21 ve miR-150 hipofiz dokusunda etkin görev alan miRNA'lar olmayabilir. Bunun yanında, single molekül floresan in situ hibridizasyon (smFISH) tekniği ile miR-21 ve miR-150'nin somatotroplar, laktotroplar ve Sox2 kök hücrelerindeki lokalizasyonu ve yaşlı ve genç farelerde hücre düzeyinde smFISH ile ifade düzeyine dair çalışmalar bu miRNA'ların hipofizer hücreler üzerindeki rolüne dair daha net bir veri sağlayacaktır.

Lethal-7 (let-7) geni başlangıçta *C. elegans*'ta önemli bir gelişimsel gen olarak keşfedilmiştir. Let-7, tespit edilen ilk insan miRNA'sıdır. Let-7 ve aile üyeleri, dizi ve işlev bakımından türler arasında yüksek oranda korunur ve let-7'nin yanlış düzenlenmesi, daha az farklılaşmış bir hücresel duruma ve kanser gibi hücre temelli hastalıkların gelişmesine yol açmaktadır (Roush & Slack, 2008). Let-7 ailesinin farklı kanser tipleri ve nöronal kök hücrelerde anti-proliferatif rol oynadığı

gösterilmiştir (Nishino vd., 2008). Let-7e üzerine yakın zamanda yapılan çalışmalar, bu miRNA'nın GH sentezlenmesinde görev aldığına işaret etmektedir (Cheng vd., 2020; Teng vd., 2022). Çalışmamızda, let-7e'nin yaşlanmış hipofiz dokusunda anlamlı olarak düşük miktarlarda ifade ediliyor olması ve yaşlanmış hipofiz dokusunda somatotrop ve Sox2 kök hücre sayısının azalmış olması, let-7e'nin hipofiz homeostasisinin sağlanması açısından olası rollerini öne çıkartmaktadır.

miR -21'in gelişim, onkoloji, kök hücre biyolojisi ve yaşlanma gibi çeşitli alanlardaki rolleri üzerine çalışmalar bulunmaktadır. let-7, miR-17-92 kümesi ile birlikte en çok çalışılan miRNA'lardan biri haline gelmiştir. Olgun miR-21, diğer birçok miRNA gibi memelilerde korunmuştur ve tek bir gen tarafından kodlanır. Olgun miR-21 çoğu kanserli hücre hattında yüksek düzeyde bulunduğundan, miRNA ekspresyonu ve olgunlaşmasını incelemek için bir model olarak kullanılan ilk miRNA'lar arasındadır (Krichevsky & Gabriely, 2009). Örneğin, normal beyindeki düşük miR-21 seviyeleri, beyinde yüksek düzeyde eksprese edilen ve beyin gelişiminde rol oynayan bir faktör olan NFIB'nin neden olduğu baskılanmış transkripsiyonuyla açıklanabilir. Spesifik hücrelerde miR-21 ekspresyonunun arttırılabileceği ek bir mekanizma, transkripsiyonel düzenleyici dizilerinin epigenetik modifikasyonudur. Hastalıkta miR-21 indüksiyonunun epigenetik mekanizmalarını araştırmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Doğrudan miR-21 hedeflerinin belirlenmesinde, hayvan hücrelerinde miRNA'lar ve hedefleri arasında sadece kısmi bir tamamlayıcılık olduğundan, belirli bir miRNA için spesifik hedef genlerin tanımlanması, miRNA işlevini anlamamızda hala büyük bir zorluk teşkil etmektedir. Birkaç hesaplama algoritması, yüzlerce mRNA'yı miR-21 için olası hedefler olarak tahmin edilebilmektedir. miR-21 hedeflerini belirlemek için hem gen tahminine dayalı hem de sistematik tarama yaklaşımları yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. miRNA'lar hem mRNA stabilitesini hem de translasyonu düzenleyebildiğinden, mRNA'lar veya ekspresyonu miR-21'den etkilenen proteinler arasında doğrudan hedefler tanımlanabilmektedir. Bu nedenle, her biri belirli avantajlara ve kusurlara sahip olan mRNA dizi ifadesi ve proteomik, anti-miR-21 ile hücre tedavisinden sonra kullanılmıştır. miRNA inhibisyonunu veya aşırı ekspresyonunu takiben mRNA dizisi analizi, hedef tanımlama için nispeten basit ve sağlam bir yöntem olsa da, bu yaklaşım, tanım gereği, özel olarak translasyonel

baskıya maruz kalan mRNA'ları tanımlayamaz. Bu bariz sınırlama başlangıçta düşünüldüğü kadar güçlü olmayabilir, çünkü son bulgular miRNA düzenlemesinin çoğunluğunun mRNA seviyelerinde saptanabileceğini düşündürmektedir. Yukarıda açıklanan birkaç doğrulanmış miR-21 hedefine (PDCD4, RECK, TPM1 ve NFIB) ek olarak, hesaplamalı olarak tahmin edilen hedefler gerçekten de hem artan hem de azalan miR seviyelerine yanıt verdiği bulunmuştur. Bunlar arasında STAT3, SOX2, PELI1, Yod1, PPARA, GPR64, RASGRP1, FAM63B, TIMP3, CDC25A, GLCCI1, TRIM59, CCDC14, PLEKHA1, CPEB3, MSH2, TNFRSF11B, ANKRD46, Sesn1, FAM3c ve APAF1 bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada yaşlanmaya bağlı böbrek fibrozunun, kalori kısıtlaması ile miRNA-21 ifadesini düzenleyerek yaşlanmaya bağlı fibrozu engellediği bulunmuştur (Liu vd., 2020).

miR-150, spesifik olarak olgun lenfositlerde eksprese edilen, ancak progenitörlerinde olmayan bir mikroRNA'dır. miR-150'nin en yüksek tahmin edilen hedefi, lenfosit gelişiminin çoklu aşamalarını kontrol eden ve üretimi için gerekli olan bir transkripsiyon faktörü olan c-Myb'dir (Xiao vd., 2007). miR-150, 19q13 kromozomu üzerinde bulunmaktadır ve hematopoezde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Son araştırmalar, miR-150'nin birçok kanserle de korelasyon içinde olduğunu bildirilmektedir. Örneğin, miR-150 proapoptotik gen EGR2'yi negatif olarak düzenlediği ve bu da mide kanseri hücre proliferasyonunu teşvik ettiği bulunmuştur. Bununla birlikte, miR-150'nin akciğer kanserinde tümör oluşumunu nasıl düzenlediği hala tam olarak anlaşılamamıştır (N. Zhang vd., 2013). miR-150'nin hipofizer yaşlanma üzerinde etkisini inceleyen çalışmalar sınırlı sayıdadır. Çalışmamızda yaşlanma ile birlikte düzeylerinin düştüğü fakat anlamlı bir derecede olmadığı bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında, let-7e'nin yaşlanmış anterior hipofiz dokusunda anlamlı olarak azalmış olması ve bu molekülün yaşlanmayla ve GH sentezlenmesi ile ilgili fonksiyonları göz önüne alındığında, hipofizer yaşlanmada rolü olabileceğine işaret etmektedir. smFISH tekniği ile let-7e'nin hangi hipofizer hücrelerde lokalize olduğu, hipofizer kök hücrelerin düzenlenmesinde görevi olup olmadığına dair veriler ileriki çalışmalar ile belirlendiği takdirde, let-7e'nin hipofizer yaşlanmayı nasıl düzenlediğine dair mekanistik ışık tutabilecektir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, yaşlanma ve kök hücreler üzerinde etkisi olabilecek spesifik miRNA'ların ifade düzeyleri ve somatotrop, laktotrop ve kök hücrelerde yaşlanma ile birlikte meydana gelen değişiklikler genç fareler, erken yaşlanma dönemindeki ve yaşlı fare ön hipofiz dokularında incelenmiştir. Erken yaşlanma döneminde somatotrop sayısında anlamlı bir azalma görülürken, laktotrop sayısında artış gözlemlenmiştir. GH sentezinde düzenleyici görev alan let-7e'nin, yaşlı farelerde anlamlı olarak ifade düzeyinin düştüğü tespit edilmiştir. miR-21 ve miR-150 ifade düzeyleri genç ve yaşlı fareler karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir. Let-7e üzerine yakın zamanda yapılan çalışmalar, bu miRNA'nın GH sentezlenmesinde görev aldığına işaret etmektedir. Çalışmamızda, let-7e'nin yaşlanmış hipofiz dokusunda anlamlı olarak düşük miktarlarda ifade ediliyor olması ve yaşlanmış hipofiz dokusunda somatotrop ve Sox2 kök hücre sayısının azalmış olması, let-7e'nin hipofiz homeostasisinin sağlanması açısından olası rollerini öne çıkartmaktadır. Bunun yanında, single molekül floresan in situ hibridizasyon (smFISH) tekniği ile let-7e'nin somatotroplar, laktotroplar ve Sox2 kök hücrelerindeki lokalizasyonu ve yaşlı ve genç farelerde hücre düzeyinde smFISH ile ifade düzeyine dair çalışmalar hipofizer hücreler üzerindeki rolüne dair daha net bir veri sağlayacaktır.

Metaverse teknolojilerinin konuşulduğu günümüzde; hipofiz, yaşlanma ve miRNA üçgeninde insanı araştırmak ve yaşlanmayla birlikte hipofizer kök hücreler ve hormon salgılayan hücrelerin fonksiyonunda meydana gelen düşüşün mekanizmasını anlamak, modern insanlar için sağlıklı bir yaşlanmanın nasıl sağlanabileceğine ışık tutacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- Bartke A. Growth hormone and aging: Updated review. *World J Mens Health*, 2019; 37(1): 19–30.
- Bavelloni A, Ramazzotti G, Poli A, Piazzini M, Focaccia E, Blalock W, Faenza I. Mirna-210: A current overview. *Anticancer Research* 2017; 37, 12: 6511–6521.
- Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process *Nature*, 2019; 384: 6604: 33-39.
- Caglar AS, Kapucu A, Dar KA, Ozkaya HM, Caglar E, Ince H, Kadioglu P. Localization of the aromatase enzyme expression in the human pituitary gland and its effect on growth hormone, prolactin, and thyroid stimulating hormone axis. *Endocrine*, 2015; 49(3): 761–768.
- Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Içinde Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 2009; (7), 4: 147–154.
- Cannon ML. What is aging? *Disease-a-Month*, 2015; (61), 11: 454–459.
- Çerçi E, Erdost H. Stem cell. *Ataturk Universitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2019; 14(2): 221–228.
- Cheng Y, Chen T, Song J, Teng Z, Wang C, Wang S, Lu G, Feng T, Qi Q, Xi Q, Liu S, Hao L, Zhang Y. Pituitary miRNAs target GHRHR splice variants to regulate GH synthesis by mediating different intracellular signalling pathways. *RNA Biology*, 2020; 17(12): 1754–1766.
- Chesnokova V, Melmed S. GH and Senescence: A New Understanding of Adult GH Action. *JES*, 2022; 6(1): 1–7.
- Console GM, Gomez Dumm CLA, Goya RG. Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev.*, 1993; 70(1–2): 45–51.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev.* 1997; 95(3): 157–166.
- Elsharawy A, Keller A, Flachsbart F, Wendschlag A, Jacobs G, Kefer N, Brefort T, Leidinger P, Backes C, Meese E, Schreiber S, Rosenstiel P, Franke A, Nebel

- A. Genome-wide miRNA signatures of human longevity. *Aging Cell*, 2012; 11(4): 607–616.
- Emral R. Ön Hipofiz Bezi Yetersizliğinin Nedenleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 2014; 57(01): 45–52.
- Everitt AV, Wyndham JR, Barnard DL. The Anti-Aging Action Of Hypophysectomy In Hypothalamic Obese Rats: Effects On Collagen Aging, Age-Associated Proteinuria Development And Renal Histopathology. *Mech Ageing Dev.*, 1983.
- Florio T. Adult pituitary stem cells: From pituitary plasticity to adenoma development. *Neuroendocrinology*, 2011; 94(4): 265–277.
- Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *PNAS*, 2001; 98(12): 6736–6741.
- Fu Q, Vankelecom H. Regenerative capacity of the adult pituitary: Multiple mechanisms of lactotrope restoration after transgenic ablation. *Stem Cells and Development*, 2012; 21(18): 3245–3257.
- Goodell MA, Rando TA. Stem cells and healthy aging. *Science*, 2015; (350) 6265: 1199-1204.
- Huan T, Chen G, Liu C, Bhattacharya A, Rong J, Chen BH, Seshadri S, Tanriverdi K, Freedman JE, Larson MG, Murabito JM, Levy D. Age-associated microRNA expression in human peripheral blood is associated with all-cause mortality and age-related traits. *Aging Cell*, 2018; 17(1): 1–10.
- Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: A small multi-faceted RNA. *J. Cell. Mol. Med.*, 2009; 13(1): 39–53.
- Laporte E, Vennekens A, Vankelecom H. Pituitary Remodeling Throughout Life: Are Resident Stem Cells Involved? *Frontiers in Endocrinology*, Frontiers Media S.A. 2021.
- Liu JR, Cai GY, Ning YC, Wang JC, Lv Y, Guo YN, Fu B, Hong Q, Sun XF, Chen XM. Caloric restriction alleviates aging-related fibrosis of kidney through downregulation of miR-21 in extracellular vesicles. *Aging*, 2020; 12(18): 18052–18072.
- Mimeault M, Batra SK. Concise Review: Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies. *Stem Cells*, 2006; 24(11): 2319–2345.
- Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ. Hmga2 Promotes Neural Stem Cell Self-Renewal in Young but Not Old Mice by Reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell*, 2008; 135(2): 227–239.
- Noren Hooten N, Abdelmohsen K, Gorospe M, Ejiogu N, Zonderman AB, Evans MK. microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS ONE*, 2010; 5(5): 17-21.

- Nys C, Vankelecom H. Pituitary disease and recovery: How are stem cells involved? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2021; (525): 16-32.
- Oh J, Lee YD, Wagers AJ . Stem cell aging: Mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature Medicine*, 2014; (20), 8: 870–880).
- Pamphlett R, Jew SK, Doble PA, Bishop DP. Elemental analysis of aging human pituitary glands implicates mercury as a contributor to the somatopause. *Frontiers in Endocrinology*, 2019; 10: 1–10.
- Powers RW, Harrison DE, Flurkey K. Pituitary removal in adult mice increases life span. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2006; 200127(8): 658–659.
- Rodríguez-Rodero S, Luis Fernández-Morera J, Menéndez-Torre E, Calvanese V, Fernández AF, Fraga MF, Clavería J. Aging Genetics and Aging. *Gene and Aging Aging and Disease* , 2011; (2), 3: 22-27.
- Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, 2008; 18(10): 505–516.
- Sağsöz H, Ketani MA. Kök Hücreler Dicle Üniv Vet Fak Derg, 2008; (1), 2: 24-27.
- Sandhir R, Gregory E, Berman NEJ. Differential response of miRNA-21 and its targets after traumatic brain injury in aging mice. *Neurochemistry International*, 2014; 78: 117–121.
- Sarlak G, Vincent B. The Roles of the Stem Cell-Controlling Sox2 Transcription Factor: from Neuroectoderm Development to Alzheimer’s Disease? *Molecular Neurobiology*, 2016; 53(3): 1679–1698.
- Sawin CT, Carlson HE, Geller A, Castelli WP, Bacharach P. Serum prolactin and aging: Basal values and changes with estrogen use and hypothyroidism. *Journals of Gerontology*, 1989; 44(4): 131–135.
- Seo H, Kawashima S, Matsui N. (1987). Age-Related Changes Messenger in Growth Hormone RNA Levels in the and Rat Prolactin Messenger RNA Levels İn the Rat. *Endocrinologia Japonica*, 1990; (37) 6: 827-840.
- Soukup J, Česak T, Hornychová H, Michalová K, Michnova Ľ, Netuka D, Čap J, Gabalec F. Stem Cell Transcription Factor Sox2 Is Expressed in a Subset of Folliculo-stellate Cells of Growth Hormone–Producing Pituitary Neuroendocrine Tumours and Its Expression Shows No Association with Tumour Size or IGF1 Levels: a Clinicopathological Study of 1. *Endocrine Pathology*, 2020; 31(4): 337–347.
- Szarek E, Cheah PS, Schwartz J, Thomas P. Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010; (323) 1: 115–123.
- Kaya E. Yaşlanmaya Bağlı Değişikliklerin Hipofiz Dokusunda Rejenerasyon ve miRNA ifade düzeyleri bakımından araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2019; 5-45
- Teng Z, Hao L, Yang R, Song J, Wang Z, Jiao Y, Fang J, Zheng S, Ma Z, Chen X,

- Liu S, Cheng Y. Key pituitary miRNAs mediate the expression of pig GHRHR splice variants by regulating splice factors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022; 208: 208–218.
- Vankelecom H. Pituitary Stem Cells Drop Their Mask. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2012; 7(1): 36–71.
- Vankelecom H, Chen J. Pituitary stem cells: Where do we stand? *MCE*, 2014; (385), 1–2: 2–17.
- Vankelecom H, Gremeaux L. Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field. *General and Comparative Endocrinology*, 2010; 166(3): 478–488.
- Veldhuis JD. Changes in pituitary function with ageing and implications for patient care. *Nature Reviews Endocrinology*, 2013; 9(4): 205–215.
- Vennekens A, Laporte E, Hermans F, Cox B, Modave E, Janiszewski A, Nys C, Kobayashi H, Malengier-Devlies B, Chappell J, Matthys P, Garcia MI, Pasque V, Lambrechts D, Vankelecom H. Interleukin-6 is an activator of pituitary stem cells upon local damage, a competence quenched in the aging gland. *PNAS*, 2021; 118 (25): 1–11.
- Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem Cells: Hype and Reality I. The Telomere Checkpoint. *Hematology*, 2002; <http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2002/1/369/1713613/369hem1028.pdf>(E.T.12.12.2021)
- Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview. *Methods in Molecular*, 2017; C. 1509, ss. 1–10. Humana Press Inc.
- Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K. MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell*, 2007; 131(1): 146–159.
- Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 2009; 137(4): 647–658.
- Zhang H, Qi Q, Chen T, Luo J, Xi Q, Jiang Q, Sun J, Zhang Y. Age-related changes in microRNA in the rat pituitary and potential role in GH regulation. *J. Mol. Sci.*, 2018; 19(7): 14-21.
- Zhang N, Wei X, Xu L. MiR-150 promotes the proliferation of lung cancer cells by targeting P53. *FEBS Letters*, 2013; 587(15): 2346–2351.



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



08.09.2021

Sayı : 21/181  
Konu : 21/181

**Sayın Dr.Öğr.Üyesi Duygu YÜCEL**

Erc. Üniv. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, **Yaşlanmaya Bağlı Değişikliklerin Hipofiz Dokusunda Rejenerasyon ve MIRNA İfade Düzeyleri Bakımından Araştırılması** ve **"Travmatik Beyin Hasarlı Fare Modellerinde Hipotalamik-Hipofizer Aksın İncelenmesi"** konulu proje için kullanılmış olan farelerinin ölü dokularının Kök Hücre Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Nezaket Efesoğlu'nun **"let-7e, miR-21 ve miR-150 İfade Düzeylerinin Genç ve Yaşlı Farelerin Ön Hipofiz Dokusunda Karşılaştırılması ve Yaşlanmanın Somatotrop, Laktotrop ve Kök Hücrelere Etkisinin Değerlendirilmesi"** başlıklı çalışmada kullanılması husundaki dilekçeniz 08.09.2021 tarihinde görüşülmüş ve HADYEK yönergesinin 8.Maddesi K fıkrasının 2. Bendinde belirtilen "Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar ile yapılan prosedürler" çerçevesinde çalışmanız HADYEK iznine tabi değildir, oybirliği ile karar vermiştir.

Gereğini bilgilerinize arz/rica ederim.

## Let-7e, miR-21 ve miR-150 İfade Düzeylerinin Genç ve Yaşlı Farelerin Ön Hipofiz Dokusunda Karşılaştırılması ve Yaşlanmanın Somatotrop, Laktotrop ve Kök Hücrelere Etkisinin Değerlendirilmesi

### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>14</b>	% <b>13</b>	% <b>1</b>	% <b>8</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>Submitted to Erciyes Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	% <b>6</b>
<b>2</b>	<b>acikbilim.yok.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>3</b>	<b>dergipark.org.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>4</b>	<b>www.medicine.ankara.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	<b>docplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	<b>tr.wikipedia.org</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<b>Submitted to Mersin Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<b>www.ncbi.nlm.nih.gov</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Ad Soyadı: Nezaket EFESoy

Uyruđu: T.C.

## Eđitim Bilgileri

2015-2019 Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakóltesi Beslenme ve Diyetetik  
Bólümü

2011-2015 Sami Yangın Anadolu Lisesi

## Yabancı Dil

İngilizce

Felemenkçe