

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kök Hücre Anabilim Dalı**

**NAC (N-asetilsistein) KULLANAN VE KULLANMAYAN FARE
MODELİNDE ADİPOZ DOKU ORJİNLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN SENESENSE OLAN YATKINLIKLARININ
BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Zeynep GÜNAYDIN**

**Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2022
KAYSERİ**

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

**NAC (N-asetilsistein) KULLANAN VE KULLANMAYAN FARE
MODELİNDE ADİPOZ DOKU ORJİNLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN SENESENSE OLAN YATKINLIKLARININ
BELİRLENMESİ
Yüksek Lisans Tezi**

**Hazırlayan
Zeynep GÜNAYDIN**

**Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2020-10664kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2022
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.

Zeynep GÜNAYDIN

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“NAC (N-asetilsistein) Kullanan Ve Kullanmayan Fare Modelinde Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücrelerin Senesense Olan Yatkinlıklarının Belirlenmesi.” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Zeynep GÜNAYDIN

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Prof. Dr. Servet ÖZCAN danışmanlığında **Zeynep GÜNAYDIN** tarafından hazırlanan “**NAC (N-asetilsistein) Kullanan Ve Kullanmayan Fare Modelinde Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücrelerin Senesense Olan Yatkinlıklarının Belirlenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

JÜRİ

Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN
(Erciyes Üniversitesi Biyoloji ABD)

Üye: Doç. Dr. Gökçen DİNÇ
(Erciyes Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Şerife AYZAZ GÜNER
(Abdullah Gül Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD)

ONAY

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

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilk günden itibaren yol göstericiliği, bilimsel bilgi birikimi, öz verisi ve desteğiyle yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Servet ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çok değerli hocalarım Prof. Dr. Coşkun TEZ'e ve Prof. Dr. Cem VURAL'a yüksek lisans eğitimim boyunca vermiş oldukları destekler için teşekkür ederim. Dr. Öğr. Üyesi Şerife AYZAZ GÜNER'e ve Hüseyin GÜNER'e destekleri için teşekkür ederim. Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bilgi birikimi ve desteğiyle yanımda olan Dr. Mustafa Burak ACAR'a teşekkür ederim. Tez çalışmalarım sırasında yanımda olan ekip arkadaşlarım Uzm. Biyolog Sura AL-SAMMARAIE, Moleküler Biyolog Ahmet ŞİMŞEK, Moleküler Biyolog Habibe BOZALAN, Moleküler Biyolog Miray BOLAT, Biyoteknolog Melis GÜZEL ve Biyolog Begüm BİRGÜL'e ve diğer tüm ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim hayatım süresince her daim yanımda olan, beni her zaman destekleyen, hiçbir fedakarlığı benden esirgemeyen kıymetli aileme, babam Hikmet GÜNAYDIN'a, kardeşim Aras GÜNAYDIN'a teşekkür ederim. En çok da benim için her türlü zorluğa göğüs geren ve fedakarlığı yapan hayattaki duruşunu örnek aldığım rol modelim, daimi destekçim, çok kıymetli annem Hilal SELÇUK'a minnettarım.

Zeynep GÜNAYDIN

Aralık, 2021 KAYSERİ

**NAC (N-asetilsistein) KULLANAN VE KULLANMAYAN FARE MODELİNDE
ADİPOZ DOKU ORİJİNLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN SENESENSE
OLAN YATKINLIKLARININ BELİRLENMESİ**

Zeynep GÜNAYDIN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2022

Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ÖZET

Mezenkimal kök hücreler, çeşitli dokulara farklılaşma yeteneğine sahip multipotent hücre popülasyonudur. Adipoz doku kök hücre içeriği bakımından zengindir ve kolay elde edildiğinden MKH kaynağı olarak sıklıkla tercih edilir. Hücreler, oksidatif stres, DNA hasarı ve onkogen aktivasyonu gibi çeşitli uyarıların bir sonucu olarak hücre yaşlanmaya girebilir. Hücre yaşlanma, yaşa bağlı birçok hastalık için önemli risk faktörüdür. Yaşlanan hücreler salgıladıkları moleküller aracılığıyla sadece kendilerini değil çevre dokuları da etkilerler. Glutasyon öncüsü olan N-asetilsistein, ROS'u ortadan kaldıran bir antioksidandır. Uzun süreli NAC kullanımının fare yağ dokusundan elde edilen MKH'ler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada. 7 aylık fareler 14 ay boyunca NAC solüsyonu ile beslendikten sonra. sakrifiye edilerek MKH'ler toplandı, kültürlendi ve moleküler analizlerle karakterize edildi. NAC ile beslenen hayvanlardan elde edilen MKH'lerin, daha yüksek Beta-Gal boyamasına ve Ki-67 boyamasına sahip olduğu saptandı. Hücre döngüsü verileri, kontrol grubundaki hücrelerin G0/G1'de daha fazla olduğunu gösterirken, NAC'ın hücre döngüsü durmasına ve yaşlanmasına neden olduğunu gösteren daha fazla polinükleer hücre içerdiğini göstermektedir. Aynı zamanda NAC grubunda apoptoz daha yüksek bulundu. *p53*, *BCL2*, *CDK4*, *CYCLIN B*, *p21*, *RBI*, *BAX* ve *ATM* gen ekspresyonlarının analizi de hücre döngüsü ve apoptoz verilerini destekledi. Bu çalışmanın sonucunda, NAC uygulamasından bağımsız olarak her iki grupta da yaşlanan hücrelerin stemness özelliklerini kaybetme eğilimi gösterdiği ayrıca NAC'ın uzun süreli kullanımının yaşlı mezenkimal kök hücrelerde senesens ve apoptozu artırıcı etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre; N-asetilsistein; Senesens; Senoteropatikler

**INVESTIGATION OF NAC (N-ACETYLCYSTEINE) TREATMENT ON
ADIPOSE TISSUE ORIGINATED MESENCHYMAL STEM
CELLSENESCENCE IN MOUSE MODEL**

Zeynep GÜNAYDIN

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Master Thesis, August 2021

Supervisor: Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells are multipotent cell population that has the ability to differentiate into various tissues. Adipose tissue is rich in stem cell content and is frequently preferred as a source of MSC since it is easily obtained. Cells can enter cellular senescence as a result of various stimuli such as oxidative stress, DNA damage, and oncogene activation. Cellular aging is an important risk factor for many age-related diseases. Senescent cells affect not only themselves but also the surrounding tissues via secreted molecules. In recent years, many studies have been carried out in order to eliminate or minimize aging or the damage caused by aging.

N-acetylcysteine, a glutathione precursor, is an antioxidant which eliminates reactive oxygen species. In our study, we investigated the effects of long-term use of NAC on MSC's obtained from mouse adipose tissue. We feeded 7 months-old mice for 14 month with NAC solution. After scarification of animals MSCs were collected, cultured and characterized by molecular assays. The MSCs obtained from NAC fed animals had higher Beta-Gal senescence staining and Ki-67 staining. Our cell cycle analysis data show that the cells in the control group in G0/G1, while NAC group cells contains more polynuclear cells that which indicate that NAC causes cell cycle arrest and senescence. At the same time apoptosis was higher in the NAC group. The analysis of p53, BCL2, CDK4, CYCLIN B, p21, RB1, BAX and ATM gene expression also supported the cell cycle and apoptosis data. As a result of this study, it was observed that senescent cells in both groups tended to lose their stemness properties, regardless of NAC application, and long-term use of NAC had an increasing effect on senescence and apoptosis in aged mesenchymal stem cells.

Key Words: Mesencaymal Stem Cell; N-asetilsistein; Senescence; Senothropatics

İÇİNDEKİLER

KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kök Hücre.....	3
2.2. Senesens.....	4
2.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Yaşlanması.....	4
2.2.2. Yaşlanmış Mezenkimal Kök Hücre Tedavisi.....	5
2.2.2.1. Senolitikler.....	5
2.2.2.2. Gençleştirme: Antioksidan ve Diğer Bileşikler.....	6
2.2.2.3. Gençleştirme: MikroRNA Manipülasyonu.....	7
2.2.3. Mezenkimal Kök Hücreleri Yeniden Programlama.....	7
2.3. Apoptoz.....	8
2.3.1. Ekstrinsik Yol.....	12
2.3.2. İnstrinsik Yol.....	12
2.4. N-Asetil sistein (NAC).....	15

2.5. Deney Hayvanları <i>BALB/c</i>	16
3. MATERYAL METHOD	20
3.1. Deney Hayvanı Çalışmaları.....	20
3.1.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması, Beslenmesi ve Bakımı ..	20
3.1.2. Deney Hayvanına N –asetilsistein Uygulaması	21
3.1.3. Deney Hayvanı Sakrifikasyonu	21
3.2. Primer Kültür ve Hücre Kültürü.....	22
3.2.1. Visseral Adipoz Doku ile Primer Hücre Kültürü	22
3.2.2. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücre Kültürü (İdame, Pasaj, Dondurma)	22
3.3. Flow Sitometri ile Karakterizasyon.....	23
3.4. Biyolojik Etki Testleri	24
3.4.1. Senesens İlişkili β -Galaktosidaz Boyaması.....	24
3.4.2. Ki-67 Proliferasyon Testi	25
3.4.3. Annexin V ile Apoptoz Testi.....	25
3.4.4. Hücre Döngüsü Testi.....	26
3.5. Histolojik Hazırlıklar.....	26
3.6. Parafin Bloktan RNA İzolasyonu.....	27
3.7. RNA'dan cDNA Sentezi	28
3.8. RT-PCR ile Gen İfadelerinin İncelenmesi	28
3.9. İstatistik	30
4. BULGULAR	31
4.1. Deney Hayvanı Bakımı İlaç Uygulaması ve Sakrifikasyon Bulguları.....	31
4.2. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücre Kültürü Bulguları	31
4.3. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyon Bulguları	31
4.4. Senesens İlişkili Beta Galaktosidaz Testi Bulguları	32
4.5. Ki-67 Proliferasyon Testi Bulguları	34

4.6. Annexin V Apoptoz Testi Bulguları	35
4.7. Cell Cycle Hücre Döngüsü Testi Bulguları.....	37
4.8. Parafin Bloktan RNA İzolasyonu.....	39
4.9. Gen İfadelerinin RT-PCR Yöntemi ile Tayini	39
5.TARTIŞMA- SONUÇ ve ÖNERİLER.....	41
6.KAYNAKÇA.....	46

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



KISALTMALAR ve SİMGELER

Δ Ct	: 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
<i>ARF</i>	: <i>ADP-Ribosylation Factor</i>
<i>ATM</i>	: Ataxia Telangiectasia Mutated
<i>BAX</i>	: Bcl-2-associated X Protein
<i>BCL-2</i>	: B-cell lymphoma-2
b-FGF	: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
B-GP	: Beta-Gliserofosfat
<i>BID</i>	: 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
ISCT	: Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MIP	: Makrofaj Enflamatuar Protein

MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
NAC	: N- Asetil Sistein
NF-Kb	: Nuclear Factor kappa B
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüleri
OIS	: Onkogen Uyarılmış Senesens
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>RB</i>	: 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
SNC	: Senesens
TGF- β	: Transforming growth factor- β
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
β -Gal	: Beta-galaktozidaz

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Thermal Cycler (Sensoquest, Almanya) cihazında gerçekleştirilen revers transkripsiyon işlemine ait parametreler.....	28
Tablo 3.2. RT-PCR çalışmalarında kullanılan parametreler	29
Tablo 3.3. Çalışmalarda kullanılan genler ve primer dizileri	30
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan genlere ait RT-PCR analiz sonuçları	40



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Programlanmış hücre ölümü ve nekroz. Programlanmış hücre ölümü esas olarak; Apoptoz ve apoptoz olmayan programlanmış hücre ölümü; otofaji, nekroptoz ve apoptoz gibi programlanmış hücre ölümü 9
- Şekil 2.2.** Apoptoz yolları. Apoptoz esas olarak iki ana yoldan oluşur ve üçüncüsü apoptozun uygulayıcı yoludur. 14
- Şekil 2.3.** N-asetilsistein formülü. Moleküler formül C₅H₉NO₃S'dir. Kimyasal yapısı gösterilmiştir 15
- Şekil 4.1.** CD44, CD90, CD105 pozitif ve CD45 negatif yüzey belirteçleri ile deney grubu için yapılan MKH karakterizasyon bulguları. 32
- Şekil 4.2.** Kontrol ve deney gruplarına ait ADOMK'lerin senesens ilişkili β-Gal boyamasına ilişkin mikroskop görüntüleri. 33
- Şekil 4.3.** Senesens ilişkili β-Gal boyaması sonuçlarına göre senesent hücre oranları 34
- Şekil 4.4.** Kontrol ve NAC grubu Ki-67 proliferasyon testi bulguları 34
- Şekil 4.5.** Kontrol ve NAC grubu Ki-67 proliferasyon testi oranlarına ait hücre oranları 35
- Şekil 4.6.** Deney gruplarına ait Annexin V apoptoz testi bulguları..... 36
- Şekil 4.7.** Annexin V apoptoz testi sonuçlarına göre deney gruplarındaki canlı ve apoptotik hücre oranları 37
- Şekil 4.8.** Kontrol ve NAC gruplarına ait Cell Cycle hücre döngüsü testi bulguları ... 38
- Şekil 4.9.** Kontrol ve NAC grubu Cell Cycle hücre döngüsü testi sonuçlarına göre hücre oranları..... 39

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mezenkimal kök hücreler farklı kaynaklardan elde edilebilen (kemik iliği, diş pulpası, umbilikal kord, adipoz doku) ve birçok dokuya farklılaşabilen multipotent stromal hücrelerdir. Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler kök hücre sayısı bakımından zengin olması sebebiyle sıkça MKH kaynağı olarak kullanılır. ADOMKH'lar uygun koşullar sağlandığında *in vitro* ortamda adipojenik, kondrojenik, miyojenik ya da ostrojenik dokulara farklılaşabilirler (Zuk ve ark., 2001). Bu nedenle adipoz doku kaynaklı kök hücreler alternatif bir multipotent kök hücre kaynağıdır. Çeşitli yüzey belirteçleri varlığıyla karakterize edilirler. Bunlardan en sık kullanılanları CD44, CD90 ve CD105'tir. MKH'ler proliferasyon kapasitesi sınırlı bir hücre popülasyonudur ve bu durumun temel sebebi senesens mekanizmasıdır. Senesens hücrelerin çeşitli endojen ve eksojen streslere karşı verdiği bir yanıttır. Oksidatif stres, IR radyasyon, çeşitli kimyasallar ve telomer kısalması gibi çeşitli olaylar senesensin sebebi olabilir. Yaşlanmış hücrelerin yaşa bağlı olarak dokuda biriktiği ve yaşa bağlı hastalıkların oluşumuna sebebiyet verdiği bilinmektedir. Bunun sebebi sınırlı bölünme kapasitesine sahip olan somatik hücrelerin doğal bir özelliği olan replikatif senesens (Liu, Y., ve Chen, Q. 2020). Kronik senesens, birçok hastalık için sorun oluşturan bir risk faktörüdür. Bu açıdan değerlendirildiğinde, yaşlanmaya neden olan mekanizmaların aynı zamanda yaşa bağlı hastalıkları da teşvik edebileceği düşünülmektedir. Hücrel stresin neden olduğu kalıcı hücre döngüsü durması olarak tanımlanan hücrel senesens, son zamanlarda kanser, ateroskleroz ve osteoartrit gibi ileri yaş hastalıklarına da katkıda bulunan temel bir yaşlanma mekanizması olarak ortaya çıkmıştır. Terapötik stratejiler, senesent hücrelerin (SNCs) seçici olarak ortadan kaldırılması veya SNC sekretomunun bozulması gibi hücrel yaşlanmanın zararlı etkilerine güvenli bir şekilde müdahale edilmektedir. Terapötik stratejiler, insan klinik çalışmalarına yaklaşan birkaç programla birlikte önemli ölçüde dikkat çekmektedir (Childs ve ark., 2017). N-asetilsistein (NAC) kolay ulaşılabilir, bilinen ve sık kullanılan bir antioksidandır.

Glutatyon öncüsü ve ROS inhibitörü olarak görev yapar. NAC genel olarak mukolitik bir ajan olarak bilinse de klinikte pek çok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu çalışma ile NAC'ın uzun süreli kullanımının fare adipoz dokusundan elde edilmiş mezenkimal kök hücre senesensi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla doğumunun 7. ayından itibaren 20. ayı tamamlayana kadar BALB/c ırkı erkek fareler *ad libitum* olarak NAC çözeltisi ile beslenmiştir. Süre sonunda sakrifiye edilen hayvanların adipoz dokularından primer kültür ile mezenkimal kök hücreler kültür edilmiştir. Karakterizasyon sonrasında; apoptoz, senesens, proliferasyon ve hücre döngüsü testleri yapılmış bu bulguları desteklemek için hücre döngüsü, senesens ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kök Hücre

Kök hücrenin genel tanımı, “hem kendisinin bir kopyasını hem de en az bir özelleşmiş, farklılaşmış hücre tipini meydana getirebilmek için bölünebilen hücredir”. Organizmayı oluşturan birçok normal hücre gibi kök hücreler de bölünebilir ve kendilerinin yeni bir kopyasını üretebilirler. Ayrıca kök hücreler organizmayı meydana getiren diğer hücre tiplerine farklılaşabilme ve özelleşebilme yeteneğine sahiptir. Eğer bir kök hücre, germ hücreleri ve plasenta gibi fetüse bağlı embriyonik olmayan yapılar da dahil olmak üzere embriyoyu ve yetişkin tüm hücre tiplerini oluşturabiliyorsa, totipotent kök hücre olarak kabul edilir. Totipotent kök hücreler döllenmiş yumurtanın blastosist oluşumuna kadar geçen sürede bulunabilirler. Bir kök hücre tüm bunları yapabiliyor fakat embriyonik olmayan (ekstra embriyonik olarakta adlandırılır) yapıları oluşturamıyorsa bu kök hücre grubuna pluripotent kök hücre adı verilir. Embriyonik kök hücreler pluripotenttir. Pluripotent kök hücreler plasenta ve yolk kesesi gibi ekstra embriyonik parçaları oluşturamazlar. İnsan vücudunda 210'dan fazla hücre tipi vardır ve pluripotent hücreler bu hücrelere farklılaşabilir (Sikorski, 2015). Fetüsün ya da erişkin canlının özelleşmiş dokularında bulunan diğer tüm kök hücreler, tüm doku hücrelerini oluşturmasa da çoğunu oluşturabildikleri anlamına gelen multipotent olarak adlandırılır. Multipotent kök hücreler, yalnızca buldukları organ ya da dokuda bulunan hücre tiplerine özelleşebilme yeteneğine sahiptir. Mezenkimal kök hücreler buldukları dokunun rejenerasyonunda ve yeniden oluşumunda görev alırlar.

Kendini yenileyebilme ve farklılaşma kapasitesine sahip olan hücre grubu kök hücreler olarak adlandırılır. Farklı hiyerarşik gruplardaki hücrelere farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler.

2.2. Senesens

Hücreler sürekli olarak eksojen ve veya endojen kaynaklardan stres ve hasar yaşar ve tepkileri tam iyileşmeden hücre ölümüne kadar değişir. Çoğalan hücreler, hücre yaşlanma olarak adlandırılan kalıcı bir hücre döngüsü durdurma durumunu benimseyerek ek bir tepki başlatabilir.

“Ölüm, yıpranmış bir dokunun kendini sonsuza kadar yenileyemediği ve hücre bölünmesi yoluyla çoğalma kapasitesi sürekli değil, sınırlı olduğu için gerçekleşir” (Weismann, 1891). Weismann'ın geniş kapsamlı fikri -hücre bölünmesinin doğal bir sınırının yaşlanmaya katkıda bulunduğu- 80 yıldan fazla bir süre göz ardı edildi, ta ki L. Hayflick'in 1961'deki çalışması, memeli hücrelerinin gerçekten de hücre bölünmesi için sınırlı bir kapasiteye sahip olduğunu gösterene kadar, ki bu artık bir kavramdır. 'Hayflick Limiti' olarak anılır (Hayflick ve Moorhead, 1961).

2.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Yaşlanması

Kök hücre yaşlanması, hücre bölünmesinin ve hücre fonksiyonlarının sınırlandığı endojen veya eksojen streslere karşı hücrel bir yanıtıdır. MKH yaşlanması, oksidatif stres, DNA hasarı, onkogen aktivasyonu veya irradyasyon da dahil olmak üzere çeşitli uyarılardan oluşabilir. Yaşlanmış hücrelerin yaşlı dokuda biriktiği ve yaşa bağlı hastalıkların patogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Neri ve Borzi, 2020). Yaşlanmış hücrelerin sebebiyet verdiği bu durum sınırlı bölünme yeteneğine sahip yetişkin somatik hücrelerin doğal özelliğidir (Hayflick ve ark., 1961).

Senesent mezenkimal kök hücrelerin belirgin bir takım özellikleri vardır. Bu hücreler genişlemiş ve daha granüler bir morfoloji gösterirler. Ayrıca artan lizozomik aktivite ve değişen sitozolik pH SA- β -gal ekspresyonunu da artırır (Zhou ve ark., 2008). Yaşlanan MKH'lerin çekirdekleri, yaşlanmayla ilişkili heterokromatik odaklar (SAHF) olarak adlandırılan küçük ve yoğun heterokromatin yapılar oluşturur (Herbig ve ark., 2006). Yaşlanan MKH'lerde epigenetik regülasyonda da bir değişiklik söz konusudur. MKH senesensini tahmin etmede bir diğer epigenetik belirteç DNA metilasyonudur. Yaşa bağlı hipometilasyon, transkripsiyon faktörlerine müdahale eder ve gen ekspresyonunu etkiler (Franzen ve ark., 2017). Ayrıca hücre yaşlanma ve yaşlanmanın temel bir özelliği olan telomer kısalması senesent mezenkimal hücrelerin bir diğer özelliğidir. Her replikasyon döngüsünde, hücre yaşlanmayı indükleyen MKH'lerde telomer kısalması meydana gelir. Yaşlanan MKH'ler farklılaşma potansiyellerini değiştirme

eğilimindedir. MKH'lerin hem osteogenez hem de adipogenez için farklılaşma potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, bazı yaşlanmış MSCS'lerin osteogenezden ziyade adipogeneze doğru farklılaşması daha olasıdır (Andrzejewska ve ark., 2019).

Yaşlanmış MKH'ler yalnızca kendi kendilerine etki etmezler. Parakrin mekanizmalar yoluyla komşu hücrelerini etkileme eğilimindedirler. Bu aynı zamanda yaşlanmayla ilişkili salgı fenotipi (SASP) olarak da bilinir. Yaşlanmış MKH'ler, interlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, matris metalloproteinaz1 (MMP1), TNF-a ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) dahil SASP faktörlerini salgılar (Rodier ve Campisi, 2011). Hücre yaşlanma, salınan SASP düzeylerini önemli ölçüde artırır. MKH'lerin sitokinler ve büyüme faktörleri gibi geniş bir sekresyon faktör yelpazesi üretmesi nedeniyle, yaşla ilişkili fenotiplere katkıda bulunan inflamasyondan da yaşlanan MKH'ler sorumludur (Reitinger ve ark., 2015).

Yaşlanmış MKH'lerin mikro çevrelerini etkilemelerinin bir başka yolu da sekretomlarıdır. Mikroveziküller (MV'ler), hücre sekretomunun önemli bir bileşenidir. Bunlar immünomodülatör düzenlemede ve tümör büyümesinin inhibisyonunda işlev görür (Akyurekli ve ark., 2015; Xie ve ark., 2016).

2.2.2. Yaşlanmış Mezenkimal Kök Hücre Tedavisi

Tedavide MKH'lerden tam olarak yararlanmak için, kendi kendini yenileme yeteneklerini ve farklılaşma özelliklerini eski haline getirmek için kök hücre dejenerasyonu ve hücre yaşlanmanın üstesinden gelinmelidir. Yaşlanan MKH'leri çıkarmak, gençleştirmek veya değiştirmek (3R'ler) için çeşitli stratejiler önerilmiştir.

2.2.2.1. Senolitikler

Senolitikler, yaşlanmayı ve yaşa bağlı hastalıkları geciktirmek için yaşlanan hücrelerin hedeflenerek ortadan kaldırılmasını ifade eder. Farelerde, senolitik ilaçların yaşlanan hücreleri etkili bir şekilde ortadan kaldırdığını ve yaşa bağlı kas kaybı, yaşa bağlı osteoporoz, kardiyak fonksiyon bozukluğu, vasküler fonksiyon bozukluğu, pulmoner fibroz, metabolik sendrom, diyabet ve demans gibi birçok hastalığı hafiflettiği gösterilmiştir (Kirkland ve ark., 2017). İlk nesil senolitikler, dasatinib ve kersetin, Kirkland Group tarafından test edildi. Dasatinib, yaşlanan yağ hücresi progenitörlerinde apoptozu daha etkili bir şekilde indüklemiştir. Yaşlanan endotel hücrelerinde Quercetin

kaynaklı apoptoz daha etkilidir (Zhu ve ark., 2015). Aynı grup, bir BCL-2 ailesi inhibitörü olan başka bir senolitik ilaç navitoclax'ı bildirdi (Zhu ve ark., 2016). Birinci nesil senolitiklere dayalı olarak, A1331852 ve A1155463 gibi diğer ilaçlar da BCL-2 ailesi üyelerini inhibe etmede çalışmıştır (Justice ve ark., 2019).

Her ne kadar vaatler sunsa da mevcut senolitiklerin birkaç sınırlaması var. İlk olarak, uzun süreli kullanım için istenmeyen yan etkiler olabilir. Navitoklax'ın ciddi trombositopenik ve nötropenik etkilere neden olduğu bilinmektedir (McHugh ve Gil, 2018). İkincisi, yaşlanan hücrenin senolitik ilaçlarla uzaklaştırılması doku atrofisine neden olabilir. Farklı dokularda çeşitli yüzdelerde yaşlanan hücreler bulunduğundan, spesifik hedefleme olmadan ani çıkarma, yara iyileşmesi, hücresel yeniden programlama ve doku rejenerasyonu gibi yaşlanan hücrelerin normal rollerinin kaybolmasına neden olabilir (Mosteiro ve ark., 2016; Ritschka ve ark., 2017). Bu nedenle, senolitik ilaçları ve bunların yaşlanan hücrelerin yok edilmesi üzerindeki etkilerini iyileştirmek için tedavi zamanlaması, dozajı, doku biyoyararlanımı ve uygulama yolu ve süresi konusunda dikkatli bir değerlendirme yapılmalıdır.

2.2.2.2. Gençleştirme: Antioksidan ve Diğer Bileşikler

Birçok çalışma, genetik ve hücresel yaklaşımlar kullanarak yaşlanan MKH'leri gençleştirmeye odaklandı. Yaşlanan MKH'lerin yaşlanmasının ana nedenlerinden biri ROS birikimidir. Birkaç çalışma, MKH yaşlanmasının, azaltılmış ROS üretimi yoluyla antioksidan tarafından tersine çevrilebileceğini göstermiştir. Askorbik asidin, MKH'lerde AKT/mTOR sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla ROS üretimini engellediği gösterilmiştir (Yang ve ark., 2018). Laktoferrin, kaspaz-3'ü aşağı regüle ederek hidrojen peroksit tarafından indüklenen ROS üretimini inhibe eder. AKT'yi aktive ederek apoptozu azaltır (Park ve ark., 2017). *N*-asetil-L-sistein (NAC) doğrudan bir ROS süpürücüsüdür ve ROS'un zarar verici etkilerini azaltmak için kullanılmıştır (Lin ve ark., 2005). MKH'ler *Cirsium setidens* ile ön işleme tabi tutulan MKH'ler, ROS üretimini inhibe eder ve fosforile edilmiş-p38 mitojenle aktive olan protein kinaz ve p53'ün ekspresyonunu azaltır (Lee ve ark., 2016).

Bir antioksidan olmamasına rağmen, melatonin ayrıca mitofajiyi artırarak ve mitokondriyal fonksiyonu güçlendirerek MKH yaşlanmasını tersine çevirebilir. Bu etki, sonunda mitokondriyal antioksidan enzim aktivitesinde artışa yol açacak olan bir ısı

şoku proteini HSPA1L'nin yukarı regülasyonu yoluyla meydana gelir (Lee ve ark., 2020). Dolaylı olarak ROS'u aşağı yönlü olarak düzenler.

Birçok uyarın ROS üretimini artırabileceğinden, her durumda antioksidan seçimi önemlidir. En verimli ROS aşağı regülasyonunu sağlayabilen spesifik antioksidanı belirlemek çok önemlidir. Antioksidan tedavisinin bir başka potansiyel sorunu da dozajdır. Çalışma, yüksek dozlarda antioksidanın DNA hasarına neden olabileceğini ve erken yaşlanmayı indükleyebileceğini bulmuştur (Kornienko ve ark., 2019). Bu nedenle, MKH'leri gençleştirmek için antioksidan kullanımı, ROS üretimini düzenlemeleri için dikkatlice değerlendirilmelidir.

2.2.2.3. Gençleştirme: MikroRNA Manipülasyonu

Birçok mikroRNA'nın MKH yaşlanmasını çoklu hedefler aracılığıyla düzenleyebildiği gösterilmiştir. miR-217, steroidle ilişkili osteonekroz sırasında DKK1'i inhibe ederek kemik iliği kaynaklı MKH'nin hücre proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmasını destekler (Dai ve ark., 2019). miR-10b, TGF- β sinyal yolu yoluyla adipoz kaynaklı MKH'nin osteojenik farklılaşmasını ve kemik oluşumunu destekler ve osteojenik ve adipojenik farklılaşmanın dengelenmesinde rol oynar (Li ve ark., 2018). miR-1292, adipozdan türetilen MKH'lerde yaşlanma belirteçleri ile pozitif ve kemik oluşumu belirteçleri ile negatif olarak ilişkilidir. Yol analizi, miR-1292'nin Wnt/ β -katenin sinyal yolu yoluyla yaşlanmayı ve osteogenezini düzenlediğini göstermektedir (Fan ve ark., 2018). Çok çeşitli miRNA'lar MSC yaşlanmasını düzenlemek için olası bir çözüm sunsa da bu çalışmalar doğada in vitro ve bağıntılı olarak gerçekleştirilmiştir. Gelecekteki hedeflerin, hücre yaşlanma sürecini düzenlemedeki etkinliğini belirlemek için miRNA'nın in vivo hedefli teslimine odaklanması gerekecektir.

2.2.3. Mezenkimal Kök Hücreleri Yeniden Programlama

MKH tabanlı hücre tedavisi, MKH'lerde yaşlanmanın neden olduğu fonksiyon değişiklikleri nedeniyle sınırlıdır. Yaşlanan MKH'lerin sınırlamalarının üstesinden gelmek için, MKH'ler hücre yeniden programlama ile modifiye edilmiştir. İki tür yeniden programlanmış MKH vardır. İlk tip, iPSC'lerde tam yeniden programlamadır. Fonksiyonel MSC'ler, geliştirilmiş hücre canlılığına sahip iPSC'lerden başarıyla indüklenmiştir. Bu indüklenmiş MKH'ler (iMSC'ler), az epigenetik değişiklikle MKH'lerin tipik özelliklerini sergiler (Hynes ve ark., 2013). Yaşlı bireylerden elde edilen iMSC'lerde hücreler gençleşmiş bir profil gösterir ve yaşa bağlı

DNA metilasyonu tamamen silinir (Spitzhorn ve ark., 2019). Bununla birlikte, bu yöntemin düşük verimlilik, sınırlı kullanılabilir iMSC'ler ve yüksek maliyet gibi çeşitli dezavantajları vardır. Laboratuvar geliştirme ve klinik uygulama arasında hala büyük bir boşluk bulunmaktadır.

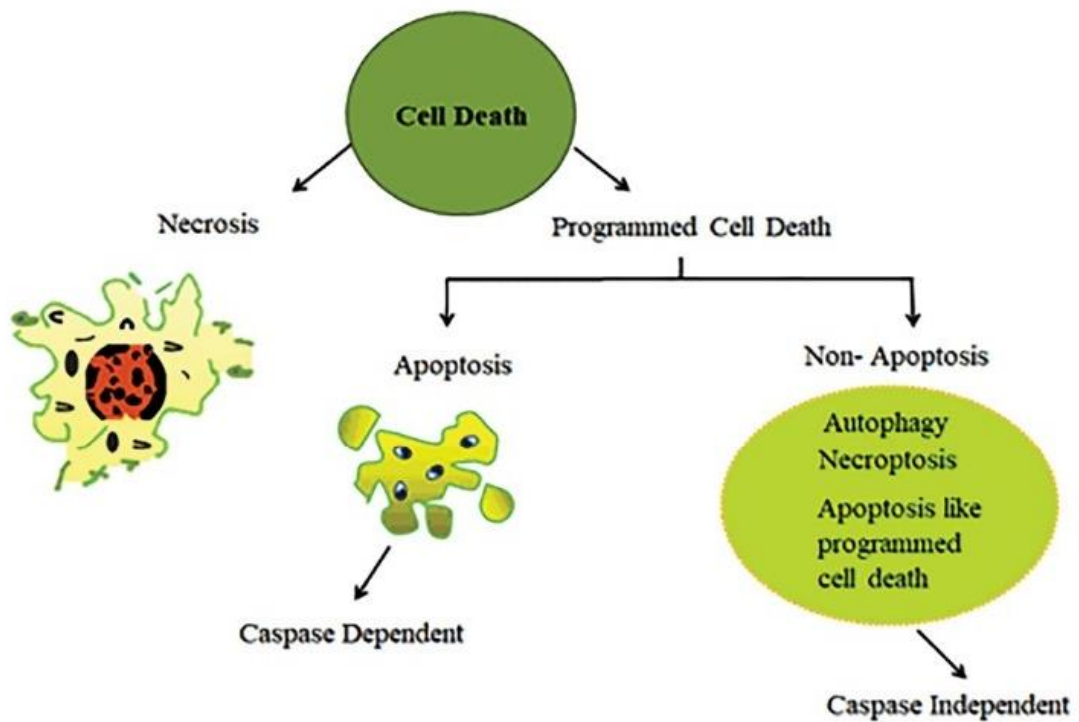
İkinci tip, epigenetik değişiklikler yoluyla kısmi yeniden programlamadır. Bu yöntem, tam yeniden programlamadan daha basittir, çünkü gençleştirilmiş MKH'lerin üretilmesi bir farklılaşma döngüsü gerektirmez. MKH'ler, DNA metilasyonundaki değişiklikler gibi zaman içinde yaşlanmayla ilişkili modifikasyonlar kazanır (Fernandez-Rebollo ve ark., 2020). Yaşlanan MKH'ler üzerindeki ilk epigenetik modülasyon, promotör bölgelerinin susturulması yoluyla DNA metilasyonunu düzenlemektir. 5-Azasitidin ve RG108 gibi DNA metiltransferaz inhibitörleri, MKH'lerin yaşlı fenotipini tersine çevirebilir veya normal fenotipinin korunmasında anahtar proteinlerin ekspresyonunu indükleyebilir (Kornicka ve ark., 2017; Assis ve ark., 2018). İkinci epigenetik modülasyon, histon modifikasyonudur. Tetrametilpirazin, bir histon-lizin N-metiltransferaz enzimi EZH2'yi düzenleyerek hücre yaşlanma fenotipini önemli ölçüde inhibe eder (Gao ve ark., 2018; Ito ve ark., 2018).

2.3. Apoptoz

Birçok biyolog ve sitolog tarafından birkaç kez keşfedilen programlı hücre ölümü uzun zamandır çeşitli isimlerle adlandırılmıştır (Vaux ve Korsmeyer, 1999). Son olarak Cuurie ve meslektaşları tarafından 1972 yılında birçok doku ve hücre tipinde tekrar tekrar gözlemlenen ortak bir programlanmış hücre ölümünü tanımlamak için apoptoz terimini kullanmıştır (Kerr ve ark., 1972). Ölmekte olan bu hücrelerin patolojik ve nekrotik hücre ölümü gerçekleşen hücrelerden çok daha farklı morfolojik özelliğe sahip olduğunu ve bu morfolojik özelliklerin altında yatan korunmuş endojen kaynaklı bir programlı hücre ölümü sonucu olabileceğini araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür (Wyllie ve ark., 1980).

Programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz, fetal gelişimden itibaren gelen süreçlerin tamamında kritik rollere sahiptir. Canlı doku ve hücrelerinde meydana gelen ölümlerin birçoğu fizyolojik hücre ölümü olarak bilinen nekroz yerine apoptoz yoluyla gerçekleşir. Hücreleri ölüme götüren apoptoz mekanizması düzenlemesinde meydana gelebilecek hasarlar (kalp yetmezliği, AIDS, norodejenerasyonlar ve inme gibi) çok çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunur (Reed, 2000).

Hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişimi, doku homeostazı ve bütünlüğünde önemli bir süreçtir. Hücre proliferasyonu ve eliminasyonu, yetişkin organizmada fizyolojik bir homeostaz sürecini sürdürmek için gereklidir (Galluzzi ve ark., 2012; Galluzzi ve ark., 2007). Metamorfoz, embriyogenez, patogenez ve doku döngüsü sırasında istenmeyen hücreler çıkarılır (Trump ve ark., 1997). Hücre ölümü tipik olarak geniş olarak tanımlanmış iki mekanizmayı içerir: Programlanmış hücre ölümü ve nekroz (Şekil 2.1) (Fuchs ve Steller, 2011).



Şekil 2.1. Programlanmış hücre ölümü ve nekroz. Programlanmış hücre ölümü esas olarak; Apoptoz ve apoptoz olmayan programlanmış hücre ölümü; otofaji, nekroptoz ve apoptoz gibi programlanmış hücre ölümü (Jan, ve ark., 2019).

Belirli sinyallere yanıt olarak genetik olarak programlanmış bir hücre intiharı sürecini içeren hücre ölümüne programlanmış hücre ölümü denir (Gorski ve Marra, 2002). Programlanmış hücre ölümü genellikle, hücrenin çevresi ve hücre içi sinyaller tarafından yönlendirilen çeşitli hücre dışı ve hücre içi sinyaller tarafından kontrol edilir (LeBlanc, 2003). Programlı hücre ölümü, farklı morfolojik özelliklere sahip olması, doku homeostazını sürdürmesi ve istenmeyen hücreleri ortadan kaldırarak çok hücreli organizmalarda uygun hücre sayısını düzenlemesi ile hücre nekrozundan ayrılır (Rizzuto ve ark., 2008). Farklı endojen dokuya özgü ajanlar ve eksojen hücreye zarar

veren ajanlar, kritik fizyolojik koşullar altında belirli hücre tipinde programlanmış hücre ölümünü başlatır (Neuman ve ark., 2002). Programlanmış hücre ölümünün eksojen aktivasyonları, çoğu hücre tipi üzerinde etkili olan fiziksel ajanları ve enfeksiyöz ajanları içerir. Fiziksel ajanlar radyasyon, fiziksel travma ve kemoterapötik ilaçları içerirken, bulaşıcı ajanlar virüsleri ve bakteriyel toksinleri içerir (Duckett ve ark., 1998). Ayrıca, büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, bir trofik hormonun ablasyonu, glukokortikoidlerle tedavi ve matris ekinin kaybı gibi iç dengesizlikler apoptozu tetikleyebilir. Çeşitli araştırma grupları sıklıkla programlanmış hücre ölümünü apoptoz ile eşitlese de, son çalışmalar apoptoz mekanizmasının katılımından yoksun apoptotik olmayan programlanmış hücre ölüm biçimlerinin de var olduğunu kanıtlamıştır. Bu nedenle programlanmış hücre ölümü ve apoptoz asla eş anlamlı olarak düşünülmemelidir (Bredesen ve ark., 2006; Venderova ve Park, 2012). Apoptoz, geniş ölçüde, yalnızca hücre hasarı veya dış stresin bir sonucu olarak değil, aynı zamanda normal gelişim ve morfogenez sırasında da meydana gelen, düzenlenmiş ölümün önemli bir mekanizması olarak tanımlanır (Nikoletopoulou ve ark., 2013). Apoptoz, çeşitli moleküllerin farklı grupları tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Apoptotik hücre ölümünün etki mekanizması tipik olarak kromatin materyalinin yoğunlaşması, çekirdekte meydana gelen DNA parçalanması, hücre büzülmesi, dinamik membran kabarması ve hücre dışı matrislere yapışma kaybı ile karakterize edilir. Ayrıca, biyokimyasal değişiklikler fosfatidilserinin dışsallaştırılması ve hücre ölümüne yol açan kaspazlar adı verilen sistein aspartil proteazlarının aktivasyonunu içerir (Nikoletopoulou ve ark., 2013; Hudayah ve ark., 2017).

Apoptoz, tipik olarak, şiddetli ve karşı konulmaz travmaya yanıt olarak düzensiz bir hücre patlamanın zıt bir yolunu temsil ettiği varsayılan nekrozdaki ayırt edilir. Apoptotik olmayan hücre ölümü türleri arasında otofaji, nekroptoz ve apoptoz benzeri programlanmış hücre ölümü bulunur. Otofaji veya otofajik hücre ölümü Tip II hücre ölümü olarak adlandırılır. Otofajik hücre ölümü, kendi kendini parçalayan bir süreçtir ve ölmekte olan hücre içindeki hücre bileşenlerin otofajik vakuollerde bozulmasında hayati bir rol oynar. Otofaji, vakuolar hücre ölümü olarak da bilinir ve omurgasız dokusunda çok yaygındır (Mizushima, 2007; Glick ve ark., 2010). Nekroptoz, programlanmış bir nekrotik ölüm şeklidir ve apoptozu indükleyen aynı ölüm sinyalleriyle başlatılır (Najafov ve ark., 2017). Nekroptoz, *in vivo*, fiziksel travmalarda, enfeksiyondan kaynaklanan ölümlerde ve çeşitli nörodejenerasyon biçimlerinde çok

yaygındır. Apoptozu indüklediği bilinen FAS ve TNFR gibi birkaç Ölüm Reseptörü (DR'ler) de farklı hücre tiplerinde nekroptozisi indükler. Bununla birlikte, programlanmış nekroz, yalnızca apoptoz kimyasal veya genetik olarak baskılandığında veya bloke edildiğinde belirli bir koşul altında görülmüştür (Nikoletopoulou ve ark., 2013). Ayrıca, başka bir form olarak apoptoz benzeri programlanmış hücre ölümü, apoptotik özellikler içeren hücre ölümünün tipini tanımlar, ancak hücre ölümü kaspazdan bağımsız bir şekilde gerçekleşir (Kaczanowski ve ark., 2011).

Apoptoz mekanizması temel olarak apoptozun indüklenmesinde rol oynayan iki temel yoldan oluşur; dışsal yol ve içsel yol. Dışsal yol, DR aracılı yola atıfta bulunur ve içsel yol, mitokondriyal aracılı bir yoldur (Elmore, 2007). Bu apoptotik yolların her ikisi de dışsal ve içsel yollar aynı terminale (execution yolu) yol açabilir (Elmore, 2007).

Hem dışsal hem de içsel yollar aynı noktada birleşir (execution aşaması). Execution aşaması, apoptozun son yolunu ifade eder. Kaspaz-8 ve 9 başlatıcı kaspazlar iken, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7, Kaspaz-10, CAD (Kaspaz ile aktive olan DNAs) ve PARP (Poli (ADP-riboz) polimeraz) efektör kaspazlardır (Sankari ve ark., 2012). Otoklevajın bir sonucu olarak aktive olan başlatıcı kaspazlar, daha sonra apoptoza yol açan bazı substratları proteolize eden kaspazları daha da aktive eder. Multimerizasyonu teşvik eden ve diğer kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanan büyük adaptör moleküllerini birbirine bağlayan uzun pro-domenlere sahiptirler. Bununla birlikte, efektör kaspazlar, başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edildiğinde apoptozu gerçekleştiren kısa ön alanlara sahiptir. Kaspazlar, çok sayıda hedef proteinin bölünmesi yoluyla apoptotik hücre ölümünü düzenler (Green ve Evan, 2002). Yol, sitoplazmik endonükleazı daha da aktive eden execution kaspazlarının aktivasyonu ile başlar. Sitoplazmik endonükleaz, nükleer materyali ve proteazları, ardından nükleer ve hücre iskeleti proteinlerinin bozunmasını bozar. Endonükleaz CAD, çekirdek içinde kromozomal DNA'nın bozulmasına ve kromatinin yoğunlaşmasına neden olan kaspaz-3 tarafından aktive edilir. Execution kaspazları, sitoplazmik kabarcıkların ve apoptotik cisimlerin sitoskeletal yeniden düzenlenmesi ve oluşumunda önemli bir rol oynar (Elmore, S. 2007; Los ve ark., 1995).

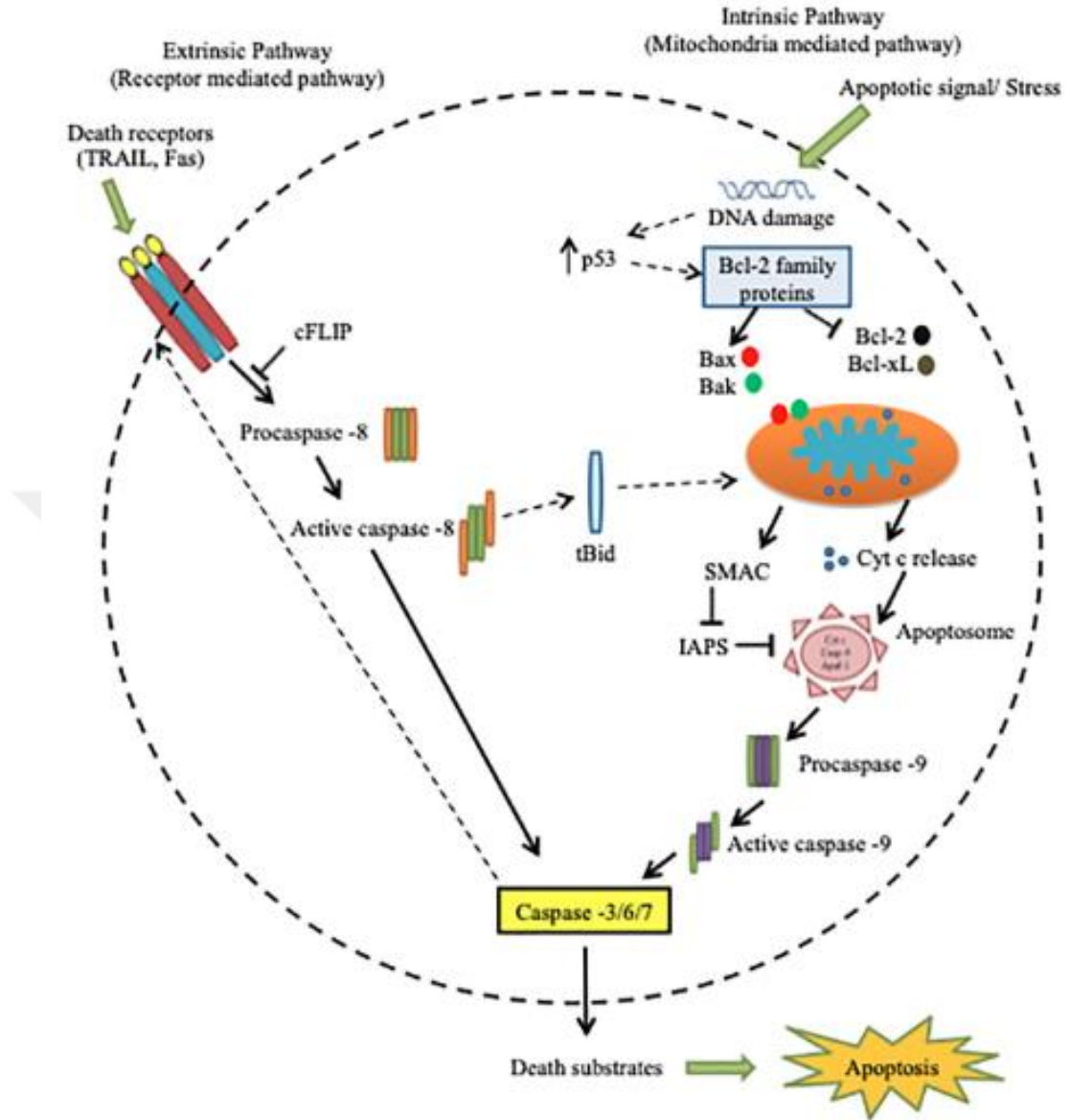
2.3.1. Ekstrinsik Yol

TNF (tümör nekroz faktörü), Fas-L (CD95/Apo-1 olarak da adlandırılır) ve TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand) gibi hücre dışı ligandlar, DR'nin (transmembran) hücre dışı alanına eklendiğinde, ekstrinsik yol boyunca apoptotik sinyalleşme devreye girer. Apoptozun ekstrinsik fazında yer alan olayların sırası, FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri ile iyi karakterize edilmiştir (Jin ve El-Deiry, 2005; Guicciardi ve Gores, 2009; Elmore, 2007). DR'lerin spesifik ölüm ligandları (DL'ler) tarafından bu tetiklenmesi, ölümü indükleyen bir sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuyla sonuçlanır. Bu DISC, adaptör molekül olarak DD içeren Fas ile ilişkili ölüm alanından (DD), procaspaz-8, procaspase-10 ve hücrel FLICE inhibitör proteinlerinden (c-FLIP'ler) oluşur. Kaspaz 8, kaspaz 8'in prodomain DISC'de kalacak şekilde aktive olurken, aktif kaspaz 8, apoptozun Execution aşamasını oluşturan kaspaz aktivasyonunun kaskadını başlatmak için DISC'den ayrışır. Deneysel veriler, apoptozda kaspazların aşırı rolünü göstermektedir (Los ve ark., 1995; Medema ve ark., 1997; Stergiou ve Hengartner, 2004). Kaspazlar, apoptozun temel başlatıcıları ve uygulayıcılarıdır ve işlevleri, farklı substrat tercihlerine sahip yapısıyla çok yakından ilişkilidir. Bazı kaspazlar, ölüm efektör alanı (DED) ve diğer proteinlerle etkileşime izin veren ve sinyal yollarıyla bağlanan kaspaz alım alanları (CARD) gibi belirli motifleri içeren uzun ön alanlara sahiptir. DED, kaspaz-8 ve kaspaz-10'u içerirken, CARD kaspaz-1, kaspaz-2, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-9, kaspaz-11 ve kaspaz-12'yi içerir (Ghavami ve ark., 2009). Kaspazlar, apoptotik sinyalleşme basamaklarındaki konumlarına göre geleneksel olarak başlatıcı ve efektör veya uygulayıcı kaspazlar olarak sınıflandırılır (Şekil 2.3).

2.3.2. İnstrinsik Yol

İnstrinsik yol, esas olarak mitokondriyal aracılı apoptotik yola karşılık gelir. Oksidatif stres, ışınlama ve sitotoksik ilaçlarla tedaviyi içeren çeşitli hücre dışı ve hücre içi stresler tarafından tetiklenen içsel yol (Ghavami ve ark., 2004). Apoptozun yollarını gösterir, instrinsik yola Bax/Bak'in mitokondriyal membrana eklenmesi aracılık eder ve ardından sitokrom c mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitozole salınır (Kim, 2005). Bcl-2 ve Bcl-xL (Bcl-2 ailesi üyesi), sitokrom c salınımını engelleyen anti-apoptotik proteinlerdir (Ghobrial ve ark., 2005). Sitokrom c, apoptozom üretmek için Apaf-1 ve procaspaz-9 ile birleşir. Apoptozom, kaspaz 9'u tetikleyen, ardından hücrelerin yıkımına

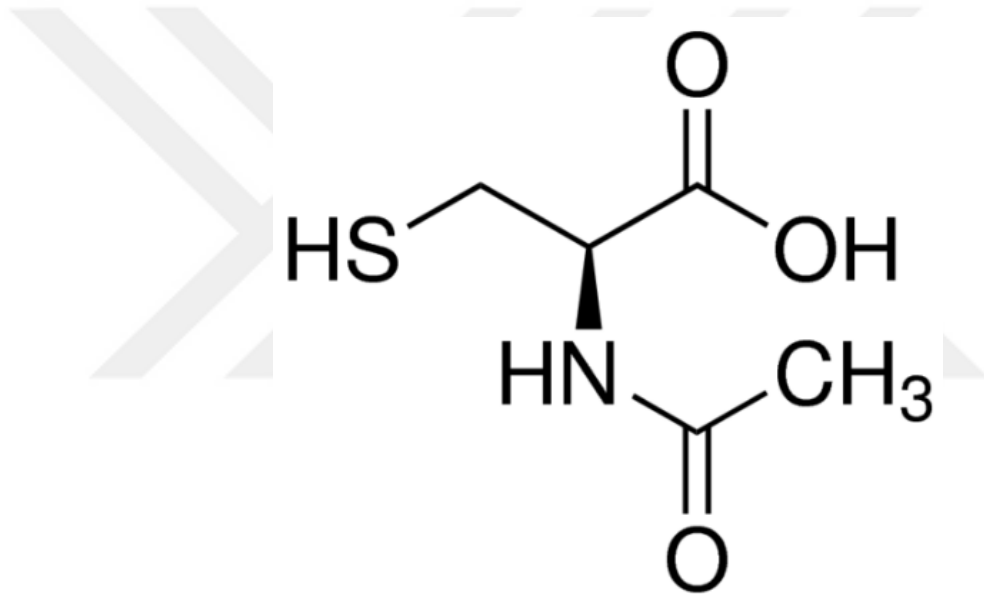
yol açan ve apoptoza yol açan kaspaz-3 sinyal kaspaz kaskadının aktivasyonunu tetikleyen yedi kollu halka şeklinde bir kompleksten oluşan çok proteinli bir komplekstir (Yuan ve Akey, 2013). Genel olarak instrinsik yola dahil olan proteinler arasında SMAC/DIABLO (kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü/düşük P1'i doğrudan IAP bağlayıcı protein), Kaspaz-9 (Sisteinil aspartik asit-proteaz-9), Bcl-2 (B-hücre lenfoma proteini) bulunur. 2), Bcl-w (Bcl-2 benzeri protein), Nox (Phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1), Aven (Hücre ölüm düzenleyicisi Aven) ve Myc (Oncogene Myc) vardır. İşlevsel olmayan mitokondriyal, iç mitokondriyal zar potansiyelinin kaybı, süperoksit iyonlarının aşırı üretimi, mitokondriyal biyogeneze bozukluk, matris kalsiyum glutatyonunun dışarı akışı ve zar proteinlerinin salınması ile sonuçlanır (Elmore, 2007) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Apoptoz yolları. Apoptoz esas olarak iki ana yoldan oluşur ve üçüncüsü apoptozun uygulayıcı yoludur. Dış uyarılar veya ligand molekülü tarafından tetiklenen ve özellikle ölüm reseptörlerini (DR'ler) içeren ekstrinsik yol. İnstrinsik yolak, Bax/Bak'in mitokondriyal membrana eklenmesi ve ardından apoptozom üretmek için Apaf-1 ve procaspaz-9 ile birleşen sitokrom c'nin salınması ve ardından kaspaz 3 apoptoz kaskadının aktivasyonu ile aracılık eder. TNF ile ilgili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL), hücreli FLICE inhibitör proteinleri (cFLIP), Kesilmiş bid (tBid), B-hücreli lenfoma proteini 2 (Bcl-2), Bcl-2 homolog ek varyantları (Bcl-xL), Sitokrom (Cyt) C, Kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü (SMAC), Apoptoz proteinlerinin inhibitörü (IAP'ler) (Jan, ve ark., 2019).

2.4. N-Asetil sistein (NAC)

N-asetilsistein (NAC), mukolitik özelliklere sahip, orijinal olarak 1960 yılında patenti alınmış ve tıpta kullanımı ilk olarak 1967 yılında rapor edilmiş, sülfhidril içeren bir bileşiktir (Lillibridge ve ark., 1967). Kimyasal yapısı ve terminolojisi Şekil 2.3'de gösterilmektedir. Moleküler formül C₅H₉NO₃S'dir. Klinik olarak 1969'dan beri kistik fibrozda kullanılmaktadır (Gracey ve ark., 1969). O zamandan beri, NAC kullanımı asetaminofen doz aşımı ve kronik obstrüktif akciğer hastalığını kapsayacak şekilde genişletilmiştir ve rolü klinik olarak sürekli genişlemektedir.



Şekil 2.3. N-asetilsistein formülü. Moleküler formül C₅H₉NO₃S'dir. Kimyasal yapısı gösterilmiştir

Sistein et, balık, tahıllar, süt ürünleri, soya fasulyesi ve yumurta ürünlerinde doğal olarak bulunur (Vasdev ve ark., 2009). Bir besin takviyesi olarak NAC, bazı meyve ve sebzelerde doğal olarak küçük miktarlarda bulunur (Demirkol ve ark., 2004).

NAC'nin özellikleri arasında glutatyon S-transferaz aktivitesinin artırılması, glutatyonun yenilenmesi, serbest radikallerin temizlenmesi ve antioksidan, anti-inflamatuar ve mukolitik özellikleriyle birlikte sistein disülfid moleküllerinin çapraz bağlanmasıyla protein yapılarının stabilize edilmesi yer alır. (Schwalfenberg, G. K. 2021) İnsanlarda oral NAC'nin biyoyararlanımı bir çalışmada % 4 ila % 9.1 arasında

(Olsson ve ark., 1988) ve başka bir çalışmada % 6 ila % 10 arasında (Borgström ve ark., 1986) bulunmuştur. Bu nedenle günde 1200 mg'den daha az kullanılan çalışmalar önemli bir fayda göstermeyebilir. NAC'nin yarı ömrü 6.25 saattir ve klerensi, bulantı, kusma ve diyare gibi yan etkilerle birlikte hem renal hem de nonrenaldir (Holdiness, 1991).

Bazıları, yaşlandıkça sistein eksikliğinin gençliğin kaybından, sağlık ve yaşam kalitesi kaybından sorumlu olduğunu ve özellikle sistein tüketiminin optimalin altında olduğu düşünüldüğünden sarkopeniye katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir (Dröge, 2005).

Son yıllarda psikiyatri ve nöroloji, metabolik hastalık, akciğer hastalığı aşağıdakiler gibi akut solunum yolu sendromlarında olası kullanımını da dahil olmak üzere enfeksiyöz hastalıklarda çeşitli klinik deneyleri inceleyen NAC'nin birkaç sistematik incelemesi yapılmıştır.

2.5.Deney Hayvanları *BALB/c*

BALB/c, ev farelerinin laboratuvar ortamında bir takım ortak alt türlerin türetilmesiyle elde edilmiş bir albinosoyudur. Hayvan deneylerinde en sık kullanılan “inbred strain” yani doğal soylardandır. Günümüzde 200’den fazla nesil BALB/c fareleri New York’tan tüm dünyaya dağıtılmaktadır (Beck ve ark., 2000).

Bu türün oluşmasını sağlayan ilk hayvanlar, New York, Memorial Hastanesi'nden Halsey J. Bagg tarafından 1913 yılında Ohio’daki bir fare satıcısından edinilmiştir. BALB adı Bagg ve Albino kelimelerinin birleşiminden meydana gelmiştir. 1920 yılından itibaren orijinal koloni 15 yıl boyunca 26 kuşak sistematik olarak çoğalmışlardır. BALB farelerinin BALB/c olarak adlandırılması bu fareleri 1935 yılında onları The Jackson Labrotory’ye taşıyan George Davis Snell tarafından yapılmıştır. Bu stok, şu anda dünyada kullanılan bütün BALB/c alt türlerinin temelini oluşturmaktadır (Potter, M. 1985).

BALB/c ırkı, BALB/CheAn, BALB/cJ, BALB/cRI ve BALB/cWt gibi alt türlere sahiptir. Üreme performansı ve üreme ömrü bakımından avantajlıdır. Aynı zamanda saldırganlık seviyesi düşük, açık alan aktivitesi düşük olmaları sebebiyle birçok çalışma için laboratuvar çalışmalarına uygun bir türdür. Ayrıca BALB/c ırkı monoklonal antikor üretimi için oldukça uygun bir ırktır yine benzer şekilde birçok kanser türlerinin

gelişimi bu ırk ile rahatlıkla çalışılabilir. Diyete bağlı ateroskleroza dirençli oldukarı için kardiyovasküler çalışmalarda tercih edilen bir hayvan modelidir (Beck ve ark., 2000).

2.6 Hücre Kültürü

Hücre kültürü, farklı yollarla izole edilmiş hücrelerin belirli şartlarda kontrollü olarak in vitro ortamda yaşamları devam etmesi ve çoğaltılması ile gerçekleşir. İn vitro ortamda gerekli şartlar sağlandığında kültüre edilen hücreler canlılık faaliyetlerini göstermeye devam eder. Bir organizmaya ait hücrelerin laboratuvar ortamında büyütülebilmesiyle çeşitli biyolojik sorulara cevaplar araştırılabilir (Lodish ve ark., 2011).

Çeşitli çalışmaların canlı organizmada değilde kültüre edilen hücreler üzerinde gerçekleştirilmesi zaman ve maliyet açısından avantaj sağladığı gibi planlanan çalışmanın kontrollü olarak gerçekleştirilebilmesi açısından da avantaj sağlar. Hücre kültürü çalışmaları; monoklonal antikor üretimi, aşı çalışmaları, ilaç etkileşimleri, gen tedavisi, çeşitli enfeksiyonların araştırılması, hücre içi ve hücreler arası çeşitli yolakların aydınlatılması gibi çok çeşitli alanda kullanılmaktadır.

2.6.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

Mediumlar kültür ortamındaki hücrelerin yaşamlarını idame ettirebilmeleri için çeşitli bileşenleri içeren besiyerleridir. Besiyeri içerikleri hücrenin ihtiyaçlarına göre farklılıklar gösterir. Hücreler süspanse (yüzen) ya da monolayer (tutunarak büyüyen) hücre tiplerinde olmaksızın hücrel ihtiyaçlarını bu besiyerlerinden karşılarlar.

Hücre kültüründe kullanılan besiyerinde hidrojen iyonu konsantrasyonu hücre gelişimi için önemli faktörlerden birisidir. Hücreler genellikle pH:7.4'te yaşarlar. Besiyeri içersindeki hidrojen iyonu konsantrasyonunu gözle yapılabilmesi adına indikatör olarak fenol kırmızısı kullanılır. Böylece besiyerindeki pH değişimi gözle takip edilebilir. Mediumdaki renk değişimi kırmızıdan sarıya yaklaştıkça ortamın daha asidik pH'da olduğu, kırmızıdan pembeye yaklaştıkça ortamın daha bazik bir pH'da olduğu anlaşılabilir.

Hücre kültürü için kullanılan mediumlarda önemli diğer bileşenler sodyum bikarbonat (NaHCO_3), karbokdioksit (CO_2) ve HEPES'tir (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). Besiyerinde CO_2 ancak gaz halde çözünebilir. Mediumda meydana gelen laktik asit artışı besiyerinin pH'ını düşürür. HEPES medium pH'sını dengede tutmak için sıklıkla kullanılan tampon bileşenlerden birisidir. Bu

biyeşenlere ek olarak medium oksijen yoğunluğuda ve sıcaklık diğer önemli faktörlerdendir. 37 °C hücre kültüründe tercih edilen optimum sıcaklıktır. Kültürde kullanılan mediumların 37 °C'ye yakın olması hücrelerin strese girmemesi bakımından önemlidir. Kültür ortamı dışında stoklanması ya da saklanması gereken hücreler birkaç gün -80 °C'de, daha uzun süreli saklamalarda ise -196 °C'de azot tankında muhafaza edilmelidir (Freshney, 2010).

Mediumlar içerisinde çeşitli vitamin, mineral, tuz, glukoz ve serumları barındıran kompleks besiyeleridir. Kültürde kullanılacak bu mediumlar hücre metabolizmasında çeşitli görevlere sahip biyotin, nikotinamid folik asit, B vitaminleri, A, D, E ve K vitamini gibi çeşitli vitaminleri uygun konsantrasyonlarda içermelidir (Freshney, 2010).

Besiyeri osmolaritesi medium içerisindeki tuzlarla dengelenmektedir. Hücre gelişimine katkı sağlayan tuzlara örnek olarak Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , SO_4^{2-} , ve PO_4^{3-} verilebilir (Freshney, 2010).

Hücreler canlılık faaliyetlerini devam ettirebilmek için ihtiyaç duydukları enerjiyi gluzdan sağlarlar. Besiyerinde kullanılacak glukoz miktarı kültür edilen hücre tipine göre farklılık gösterir (Freshney, 2010).

Hücre kültüründe hücrelerin büyüme ve gelişimini desteklemek için çeşitli serumlar eklenebilir. Serumlar yapılan çalışmanın ve kültüre edilen hücrenin tipine göre at, tavşan, büyükbaş hayvan ya da insan gibi canlılardan elde edilmiş olabilir. Fetal Bovin Serum (FBS) kök hücre kültüründe en sık kullanılan serumlardan biridir (Freshney, 2010).

Kültür ortamında hücrelerin canlılığını sürdürmesi için gerekli olan aminoasitler kültürde kullanılan medium içeriğinde zaten bulunuyor olabilir ya da sonradan eklenebilir. Glutamin yarılanma ömrü kısalığı sebebiyle medium içerisine taze olarak eklenen aminoasitlerden en yağın olanıdır (Freshney, 2010).

Kültür ortamındaki hücrelerin gelişimini desteklemek için zaman zaman çeşitli hormonlar ve büyüme faktörleri kullanılmaktadır. Kültüre edilen hücrenin ya da yapılan çalışmanın türüne göre bu faktörler çeşitlilik gösterir b-FGF ve EGF sık kullanılan büyüme faktörlerindendir (Freshney, 2010).

Hücre kültüründe bakteri ya da fungus kontaminasyonlarından korunmak için çeşitli antibiyotikler kullanılır. Penisilin, streptomisin, yaygın kullanılan antibiyotiklerdir ek

olarak amfoterisin ve gentamisinde gibi antibiyotikler de kullanılabilir (Freshney, 2010).

Hücre kültüründe hücreleri ölü hücrelerden, hücre kalıntılarından, besiyerinde biriken diğer atıklardan ya da çeşitli kimyasallardan arındırmak kısaca yıkama işlemi yapmak için fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi olan PBS kullanılır. Hücre kültüründe yağın olarak iki tip PBS vardır. Birincisi kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS diğeri ise kalsiyum ve magnezyum gibi +2 değerlikli iyon içeren PBSlerdir. +2 değerlikli iyon içeren PBS varlığında tripsin enzimi çalışmayacağı için bu PBS tipi genellikle hücre izolasyonu sırasında kollejenaz gibi doku parçalayan enzimlerle birlikte kullanılır (Freshney, 2010).

Kültür sırasında hücreleri tutundukları yüzeyden ayırmak için tripsin enzimi kullanılır. Hücrelerin tripsine maruz alma süreleri yapılan çalışma ve hücre tipine göre değişmekle birlikte hücreleri uzun süre tripsine maruz bırakmak hücre canlılığını olumsuz yönde etkileyeceğinden tercih edilmez. Tripsin enzim aktivasyonunu durdurmak ya da azaltmak için protein içeriği yüksek olan serumlar (FBS gibi) veya tripsin inhibitörleri kullanılır (Freshney, 2010).

2.6.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan temel ekipmanlar vardır. Bu ekipmanlardan bir tanesi çalışmalarda kontaminasyon riskini minimuma indirmek için kullanılan steril kabinlerdir. Steril kabinlerde laminar akış sistemi mevcuttur. Kültüre edilen hücreler karbondioksit inkübatöründe saklanır bu inkübatör içerisinde iç ortama nem sağlayacak olan bir tabla bulunur. Hücre kültürü çalışmaları genellikle %5 CO₂ oranı ve 37 °C'de gerçekleştirilir. Hücreleri gözlemlemek için invert mikroskop kullanılır. Hücre kültürü laboratuvarında bulunması gereken diğer cihazlar santrüj, soğutucular(+4 °C, -20 °C, -80 °C), uzun dönem saklama ve stok işlemleri için azot tankıdır (-196 °C) (Pittenger, 2008).

3.MATERYAL METHOD

3.1. Deney Hayvanı Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında kullanılan deney hayvanları, 09.10.2019 tarihli 19/189 karar numaralı Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu kararı ile (Ek: 1) hayvan etiği açısından uygun bulunmuştur. Bu çalışma deney hayvanları, Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) Transgenik Hayvan Birimi'nde barınan hayvanlar ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan fareler doğumdan itibaren 21. günde deney gruplarına göre farklı kafeslere ayrılmıştır. Fareler 7 aylık olana kadar GENKÖK Transgenik Hayvan Birimi'nde fare ünitesinde barınan diğer farelere uygulanan standart prosedüre göre beslenmiştir ve 7. aydan itibaren 20. aya kadar aynı deney protokolü uygulanmıştır Fareler 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, 19.1cm x 29.2cm x 12.7cm ölçülerinde 558 cm² yüzey alanına sahip kafeslerde barındırılmıştır. Kafes içerisinde MBD (MBD Feed Trading, Gebze, Turkey) marka altlık kullanılmıştır. Fareler kafes başına en fazla 3 hayvan düşecek şekilde gruplandırılmıştır.

3.1.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması, Beslenmesi ve Bakımı

Tez çalışması, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu onayıyla 28 hayvan ile başlatılmıştır. Fareler Balb/c ırkı normal dişi ve erkek bireylerin çiftleşmesiyle doğan normal farelerden seçilmiştir. Doğan farelerden yalnızca erkek cinsiyetli fareler kullanılmıştır. Doğumdan itibaren 21 gün anne fareler ile birlikte barınan yavru fareler 21 gün sonunda ayrı kafeslere alınarak Optima (Optima Nutrient Industry and Trade Joint Stock Company, Bolu, TURKEY) marka standart pellet yem ile beslenmiştir. Kafeslerde, 250ml'lik suluk içerisinde taze çeşme suyu kullanılmıştır. Fare içme suları, suluklardaki suların bitmesi beklenmeksizin gün aşırı olarak tazelenmiştir. Fare ünitesinde barınan, tez çalışması hayvanlarının altlıkları, altlıkların

dolması beklenmeksizin haftada 2 kez değiştirilmiştir. Tez çalışması boyunca kullanılacak fareler kontrol ve deney grubu olarak 2 gruba ayrılmıştır.

3.1.2. Deney Hayvanına N –asetilsistein Uygulaması

Tez çalışmasında eczanelerde ticari olarak satılan NAC 900 mg (Basel) N –asetilsistein kullanılmıştır. Tez çalışmasında farelere uygulanan N –asetilsistein oral yolla içme suyu ile *ad libitum* olarak verildi. Uygulanan N –asetilsistein miktarı, tezin hipotezi doğrultusunda, orta yaştan itibaren (yaklaşık olarak 30 yaş) yaşlılık dönemine kadar (ortalama insan ömrü 80 yıl) erişkin bir insanın gün aşırı N –asetilsistein kullanımı kurgulanarak planlandı. Çalışmalarda N –asetilsistein klinik kullanımda önerilen ortalama mukolitik miktarının fareye mimik edilmesiyle oluşturuldu. Her kafes için 900 mg/ml N –asetilsistein çözeltisi çeşme suyu ile ve taze olarak hazırlandı. Tez çalışmasında denek olan farelere doğumdan sonra 30. haftadan itibaren (215 gün) N –asetilsistein uygulamasına başlanmış ve 53 hafta boyunca (368 gün) boyunca N –asetilsistein uygulaması devam etti. Fareler 83 haftayı (582 gün) tamamladıktan sonra sakrifiye edildi.

3.1.3. Deney Hayvanı Sakrifikasyonu

Tez çalışması kapsamında yaklaşık 20 ay boyunca Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi Transgenik Hayvan Biriminde barınan hayvanlar, 582 gün sonunda sakrifiye edildi. Sakrifikasyon işlemi en az ağrı, acı ve ıstıraplı olacak şekilde, %70 karbondioksit (CO₂) gazı verilen chamberlarda gerçekleştirildi. Bu işlem her denek için sırayla tekrarlandı. Sakrifiye edilen denekler yaklaşık 2 dakika boyunca %70'lik etanol içerisinde bekletildi ve böylece kısmi yüzey sterilizasyonu sağlanmış oldu. Ardından daha önceden otoklavlanmış steril cerrahi setler yardımıyla, cerrahi işlem uygulanarak Visceral Adipoz dokular (VAT) çıkarıldı. Deneklerden çıkarılan visceral adipoz dokular %5 penisilin-streptomisin-amfisilin (PSA) içeren DMEM-low (Biological Industries) besi yeri ile hazırlanmış taşıma solüsyonları içerisine alındı. Bahsi geçen işlemler her bir denek için sırasıyla takip edildi. Aseptik koşullarda alınmış olan dokular steril kabin içerisine taşındı.

3.2. Primer Kültür ve Hücre Kültürü

3.2.1. Visseral Adipoz Doku ile Primer Hücre Kültürü

Taşıma solüsyonu içerisinde bulunan visseral adipoz dokular steril kabin içerisine alındı. Dokular ilk olarak Ca^{++} & Mg^{++} içermeyen DPBS ile iki kez iyice yıkandı. Ardından her bir fareye ait dokular ayrı ayrı steril petri kaplarına aktarıldı. Dokular steril bistüri yardımıyla olabildiğince küçük parçalara ayrıldı yağ dokusu dışında görülen farklılıklar (kan damarı gibi) uzaklaştırıldı. Dokular fiziksel parçalama sonrasında içerisinde yaklaşık 2-3 ml ılık ($37^{\circ}C$) tip-II kollejenaz (Sigma C6885-25 mg) olan steril falkonların (15 mL'lik) içerisine aktarıldı ve $37^{\circ}C$ derecelik inkübatörde enzimatik parçalanma sağlandı. Falkonlar 5 dk'da bir alt üst edildi. İnkübasyonda geçen sürenin ardından enzim aktivitesini durdurmak amacıyla falconların üzeri soğuk, Ca^{++} & Mg^{++} içermeyen DPBS ile tamamlandı. Fazla doku parçalarını uzaklaştırmak ve parçalama sonrasında açığa çıkan hücreleri ayırmak amacıyla 350xg'de 5 dakika sanrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 1ml DMEM-low glikoz % 10 FBS (Biological Industries) içeren tam besiyeri içerisinde çözüldükten sonra içerisinde yaklaşık 8 mL tam besiyeri olan 75 cm^2 yüzey alanına sahip kültür flasklarına ekildi ardından CO_2 içeren hücre kültürü için uygun $37^{\circ}C$ 'de inkübatöre kaldırıldı. Kültür flaskları 24 saat boyunca hiç hareket ettirilmedi.

3.2.2. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücre Kültürü (İdame, Pasaj, Dondurma)

Hücreler ekim işleminden sonra, 24 saatlik inkübasyonun ardından mikroskop ile gözlemlendi. Adipoz doku orijinli mezenkimal kök hücrelerin istenilen konfluensiye ulaşması ve çoğaltılması için, 3 günde bir taze hazırlanan besiyeri ile idameleri yapıldı. İdame işlemi için kullanılan tüm malzemeler, işlem öncesi $37^{\circ}C$ 'ye getirildi. Ardından flask yüzeyine yapışmayan hücre parçaları ve ölü hücrelerin hareklendirilerek rahatça uzaklaştırılması için ileri-geri, yukarı-aşağı hareketlerle, vakum pompası yardımıyla eski besi uzaklaştırıldı. Üzerine taze ve ılık ($37^{\circ}C$) besiyeri eklendi, hücre kültürü için kullanılan CO_2 'li inkübatöre kaldırıldı. Bu işlem hücreler yeterli konfluensiye ulaşmaya kadar her 3 günde bir tekrarlandı. Her deneğe ait flask birbirinden bağımsız olarak takip edildi. Flaskların ihtiyacı doğrultusunda besiyeri içerisindeki FBS oranı kimi zaman % 15'e çıkarıldı.

Yapılan idame işlemleri sonrasında yeterli konfluensiye ulaşan flasklar daha fazla hücre eldesi için pasajlandı. Pasaj işlemi %70-80 konfluent olan flasklara uygulandı. İlk olarak flaskın içerisindeki besiyeri vakum pompası yardımıyla uzaklaştırıldı. Ardından iki kez önceden 37 °C’de inkübe edilen Ca⁺⁺&Mg⁺⁺ içermeyen DPBS ile yıkandı. Bu işlem sonrasında flask yüzeyine tutunan hücreler yaklaşık 4-5 mL önceden 37 °C’ye getirilen tripsin eklenerek 1,5-2 dakika inkübatörde tutuldu. Mikroskopta hücrelerin flask yüzeyinden kalkıp kalkmadığına bakıldı ve hala kalkmayan hücreler flaska hafif darbeler uygulanarak fiziksel olarak kalkması sağlandı. Steril kabin içerisine alınan flaskların içerisine, flask başına eklenen tripsinin % 10’u kadar FBS eklenerek hücrelere etki eden tripsin oranı minimuma indirilmiştir. Ardından flask içerisinde bulunan hücreler falcona alındı ve 350xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemine ikinci yıkama ile devam edildi. Bu sırada kabin içerisinde etiketlemesi yapılan 175 cm²’lik flasklara 19 mL tam besiyeri eklendi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 mL tam besiyeri içerisinde çözülen hücreler flasklara ekildi. 37 °C CO₂’li inkübatöre kaldırıldı. Devam eden günlerde gerekli flasklara 3 günde bir olacak şekilde idame yapıldı.

Yeterli sayıya ulaşan hücreler tez çalışmasında yapılması planlanan deneyler için azot tankında -196 °C’de saklandı. Hücre dondurma işlemi için ilk olarak flask içerisindeki besiyeri daha önce anlatıldığı şekilde vakum pompası ile çekildi. Ardından, flasklar Ca⁺⁺&Mg⁺⁺ içermeyen DPBS ile yıkandı. Flaskların içerisine gerektiği kadar (75 cm²’lik olanlara 4-5 ml 175 cm²’lik flasklara yaklaşık 10 mL) Tripsin-EDTA (1X) solüsyonu (03-054-1B, Biological Industries) eklendi inkübatörde yaklaşık olarak 2 dakika inkübe edildi. Flasklara yapışık halde bulunan hücrelerin kaldırıldığı mikroskop ile teyit edildikten sonra falkonlara toplandı ve iki kez Ca⁺⁺&Mg⁺⁺ içermeyen DPBS ile yıkandı. Kademeli soğutma işlemi uygulanacağı için Myster Frosty Container içerisinde soğumaya bırakıldı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet, vial başına 1-1,5 mL olacak şekilde (Cryo vialler içerisinde yaklaşık 1x10⁶ hücre ile) etiketlemesi yapılmış cryo viallere aktarıldı. Ardından bir gün -80 °C dolaplarında ardından -196 °C sıvı azot tankında depolandı.

3.3. Flow Sitometri ile Karakterizasyon

Deney hayvanlarından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu CD44-FITC pozitif, CD90-FITC pozitif, CD105-PE pozitif ve CD45-FITC negatif yüzey

belirteçleri kullanılarak işaretlendi ve flow sitometrik karakterizasyon yapıldı. Karakterizasyon için ayrılan hücreler her bir yüzey belirteci için ayrı ayrı tüplere bölündü ve deney grubu hücreleri 200 µl BD Cell Wash solüsyonu içerisinde çözüldü. Ardından tüp başına 1'er µl olacak şekilde florokrom belirteçler, izotip kontrol belirteci ve pozitif belirteç kokteyli eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında (25 °C) inkübe edildi. Ardından 1 kez yıkanan hücre pelletleri 500 µl BD wash solüsyon ile çözülerek flow okumalarının yapılacağı tüplere aktarıldı. Ayrıca hücrelerin otofloresan özelliği olduğundan intensite eşik değerini belirlemek amacıyla içerisinde hücre olan bir tüpe yalnızca wash solüsyon ekleyek okuma yapıldı. Yapılan okumalar BD FACS Aria III Cell Sorter (BD Biosciences, ABD) flow sitometri cihazı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar BD FACS Diva 8.0.1 programı kullanılarak değerlendirildi.

3.4. Biyolojik Etki Testleri

3.4.1. Senesens İlişkili β-Galaktosidaz Boyaması

Tez çalışması kapsamında, yaşlanan hücrelerin varlığını fizyolojik olarak gösterebilmek için senesens ilişkili beta galaktosidaz boyaması yapıldı. Beta-Gal boyaması kit yardımı ile yapıldı.

Fiksasyon Solüsyonu: %0.2 gluteraldehit (Sigma) kullanılarak fiksasyon solüsyonu hazırlandı.

Boyama Solüsyonu: 5 mM Potasyum ferrisiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Sigma) ve yine 5 mM Potasyum ferrosiyanür ($K_4[Fe(CN)_6]$) (Sigma) ve 2 mM $MgCl_2$ içeren DPBS boyama solüsyonu olarak hazırlandı.

X-Gal Stok: 40 mg/ml (w/v), X-Gal (Thermo) çözeltisi N,N- dimetilformamit ile çözülerek hazırlandı.

Tam Boyama Solüsyonu: Daha önce hazırlanan X-Gal stok solüsyonu 1 mg/ml olacak şekilde (1:40 (v/v)) seyreltilerek hazırlandı.

Senesens ilişkili betagalaktosidaz boyaması için ilk olarak kontrol ve NAC uygulanmış farelerden elde edilen hücreler ilk olarak 6 kuyucuklu kültür flasklarına ekildi. Hücreler flasklara tutunduktan sonra ilk olarak besi yeri uzaklaştırıldı ardından DPBS ile yıkandı ardından hücrelerin fiksasyonu için kuyucukların üzerini kaplayacak kadar fiksasyon solüsyonu eklendi 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından fiksasyon solüsyonu uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kere DPBS ile yıkandı ve üzerlerine kuyucukların üzerini

kaplayacak kadar tam boyama solüsyonu eklendi 6 kuyucuklu flask etrafı parafilmle sarılarak 1 gece boyunca (yaklaşık 18 saat) 37 °C CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon sonrasında boyama solüsyonu uzaklaştırıldı hücreler DPBS ile yıkandı ve %50 gliserol eklendi. Yeniden parafilm ile sarıldı ve her grup için (kontrol ve NAC grubu) 3'er kuyucuğa ekilmiş hücreler 100'er hücre mikroskop ile sayılarak senesens yüzdeleri belirlendi.

3.4.2. Ki-67 Proliferasyon Testi

Yapılan çalışmada hücrelerin proliferasyon oranlarını belirleyebilmek için, Ki-67 proliferasyon testi ticari olarak satın alınan Ki67 Proliferation Kit (Merck Millipore, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Kitin çalışma mekanizması memeli canlıların hücrelerinin yalnızca çekirdeğinde bulunan ve hücre bölünmesi sırasında eksprese bir protein olan Ki-67'nin belirteç olarak kullanılması mantığına dayanmaktadır.

Ki-67 proliferasyon testinde kullanılacak hücreler tripsin ile kaldırılmadan önce test için kullanılacak solüsyonlar hazırlandı. Kit beraberinde gelen 5X fiksasyon solüsyonu ve 5X deney tampon solüsyonu 1X olacak şekilde PBS ile dilüe edildi. Ardından tripsinle kaldırılan hücreler üzerine kit protokolü doğrultusunda 50 µl fiksasyon solüsyonu eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Fiksasyon sonrasında ependorfların üzerine 150 µl 1X deney tamponu eklendi 350xg'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından ependorfların üzerine 100 µl permobilizasyon solüsyonu eklendi ve pipetajlandı sonrasında oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonrasında 100 µl deney tamponu eklenip 350xg'de santrifüj edildi süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerlerine yeniden 50 µl 1X deney tamponu eklenen ependorflar 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 10 µl Muse® Hu Ki67-PE antibadi eklendive ependorflar 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak ependorf başına 150 µl 1X deney tamponu eklendi. Okuma işlemine Blank okumasıyla başlandı ve kapılama yapıldıktan sonra deney grupları sırasıyla Muse cell analyzer cihazı ile yapıldı.

3.4.3. Annexin V ile Apoptoz Testi

Tez çalışmasında kullanılan hücrelerin apoptotik durumunu ölçmek için, apoptoza gitmiş hücrelerin normalde iç yüzeyinde bulunan fakat apoptoz ile birlikte dış yüzeye çıkmış fosfatidilserinlere beraberindeki kloroform ile bağlanan Annexin V analizi apoptotik hücrelerin belirlenmesine yardımcı olur.

Tez çalışmasında apoptoz testleri için ayrılan hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra 1 kez DPBS ile yıkanarak süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından kit protokolüne uygun olarak her bir örnek tüpü içerisine 100 µl Annexin V dead cell (Merck Millipore, ABD) reaktifi eklenmiş ve her bir örnek tüpü içerisine %1 FBS içeren DPBS ile çözülmüş hücre süspansiyonu eklendi. Bu işlemin ardından tüpler 20 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir hücre tüpü Muse Cell Analyzer (Millipore) cihazı ile okundu. Analiz sonrası sonuçlar cihazın kendi yazılımı ile gerçekleştirildi.

3.4.4. Hücre Döngüsü Testi

Hücre döngüsü testi Muse cell analyzer cihazı ile kit protokolüne Cell Cycle (Merck Millipore, ABD) kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Test prensibi yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliği gösteren, nükleer DNA interaksiyon boyası olan Propidium İyodür (PI) ve tek zincir bağlanmalarını önleyecek olan RNase içermektedir. Böylelikle boyama sonucunda hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücrelerin ayırt edilmesine olanak sağlanır. Dinlenme durumundaki (G0/G1 fazı) her kromozomun iki kopyasını içerir. Hücreler döngüye başladıkça kromozomal DNA'yı sentezlerler (S fazı) ve PI'dan gelmekte olan floresan yopunluğu, tüm kromozom iki katına çıkana kadar (G2/M) artar. Bu aşamada, G2/M fazındaki hücreler sonunda iki hücreye bölünür. Test, her fazdaki (G0/G1, S ve G2/M) hücrelerin yüzdesini ayırt etmek için DNA içeriğinin PI bazlı boyanmasını kullanır. Hücre döngüsü testi için ilk olarak her grup hücreleri flasklardan tripsin ile kaldırıldı ardından iki kez DPBS ile yıkandı ve son yıkamadan önce ependorflara alındı. Pelletler 50 µl DPBS ile çözülen hücrelerin üzerine fiksasyon için 1 ml soğuk %70'lik etanol vorteks üzerinde yavaş yavaş eklendi. Fiksasyon için hücreler 1 gece -20 °C'de inkübe edildi (en az 3 saat inkübe edilmesi gereken hücreler 2 aya kadar bu şekilde saklanabilir). Fikse edilmiş hücreler santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ardından pelletler 1 kez 250 µl DPBS ile yıkandı. Son olarak pelletlerin üzerine 200 µl Muse cell cycle reagent solüsyon eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilen hücreler MuseCell Analyzer ile 3 tekrarlı okuma yapıldı.

3.5. Histolojik Hazırlıklar

Çalışmada kullanılan adipoz dokuların bir kısmı primer hücre kültürü için ayrıldıktan sonra bir kısmı ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere histolojik prosedür uygulandı.

Sakrifiye edilen hayvanlardan çıkarılan adipoz doku, doku tespiti için % 4'lük formaldehit içerisinde alınarak 72 saat bekletildi. Ardından musluk suyu içerisinde bekletilerek yıkandı. Yıkama işleminden sonra sırasıyla %50, %70, %80 ve %96'lık alkol serilerinde 1'er saat bekletildi. Daha sonra 3'er kez 20'şer dakikalık sürelerle ksilenle muamele edilen dokular eriyik parafinde (60 °C) 1 gece bırakıldı ardından bloklama işlemi gerçekleştirildi.

3.6. Parafin Bloktan RNA İzolasyonu

Gen ifadesi düzeyinde çalışmalarımızı gerçekleştirmek için RNA izolasyonunu parafin dokulardan gerçekleştirildi. Parafin dokudan RNA izolasyonu için parafin bloklardan ependorf tüpler içerisinde kesitler alındı. Dokuların üzerine bir gece önceden 45 °C'de beklemiş ksilol tüp başına 1ml damla damla eklendi. Ksilol eklenen örnekler 55 °C'de 30 ile 60 dakika arasında inkübe edildi. 15 dakikada bir vortekslendi. İnkübasyon sonrasında örnekler 1600 xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Eğer doku ependorf tüpe tam olarak çökmediyse üzerine 800 µl ksilol daha eklenerek 15- 20 dakika aynı sıcaklıkta yeniden inkübe edildi, vortekslenir ve santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında süpernatant tüpün içerisinde 0.5 ml çizgisine kadar olan kısmı uzaklaştırıldı ve üzerine etanol eklenip, vortekslendi ve aynı parametrelerde santrifüj edildi. Ardından süpernatant tamamen uzaklaştırıldı ve üzerine 1 ml etanol eklenip aynı şekilde santrifüjlendi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Kalan etanolün kuruması için deney tüpleri 37 °C'de en az 30 dakika kurutuldu. Tamamen kuruyan pelletlerin üzerine 100ul Tissue Lysis Buffer, 16 µl SDS (%10) ve 50ul proteinaz-K eklendi ve tüpler 85 °C'de 1 saat inkübe edildi ara ara vortekslendi. İnkübasyon sonrasında tüpler oda sıcaklığında 55 °C'ye soğurken üzerine 80 µl proteinaz-K eklendi ve 55 °C'de 1 saat inkübe edildi. Örnekler ara ara vortekslendi ve pelletlerin şeffaf renkte olmasına dikkat edildi. Lizat üzerine 325 ul RNA binding buffer ve 325 µl absölu etanol eklendi pipetaj yapıldı. Lizatın tamamı RNA izolasyon kolonlarına aktarıldı. 6000xg'de 1 dakika santrifüj edildi ve kolon temiz bir toplama ependorfuna alındı. 14000xg'de yeniden santrifüj edildi. HPF tüplerdeki filtre üzerine 100 µl DNase eklenip 15-20 °C'de 10 dakika inkübe edildi. HPF kolon üzerine 500 µl Wash Buffer-I eklenip 6000xg'de santrifüj edildi lizatın kolondan tamamen süzülmesine dikkat edildi. Ardından kolona 500 ul Wash Buffer-II solusyonu 500 ul eklendi yine 6000xg'de santrifüj edildi. Yıkama işlemi tekrarlandı. Yıkama işleminin ardından kolona tutulu RNA üzerine 25-50 µl elution

buffer eklendi. Kolonlar yeni toplama tüplerine alındı. 15-20 °C’de yaklaşık 3 dakika beklendikten sonra son kez 6000xg’de 2 dakika sanrifüj edildi. Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000, ABD) ile RNA miktarı ve saflığı ölçülen örnekler -20 °C’de saklandı.

3.7. RNA’dan cDNA Sentezi

Daha önce nanodrop ölçümleri yapıлып -20 °C’de saklanan örnekler cDNA sentezi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Konsantrasyonu belirlenen örneklerin üzerine kit protokolüne göre cDNA reaksiyon karışımı hazırlandı. İşlemlerin tamamı buz üzerinde gerçekleştirildi. Kontrol ve Deney grubu için 10’ar µL cDNA reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışımın içrisine; Reverse Transkriptaz Solüsyonu (10X) 2 µL, dNTP Mix 0.8 µL, Random primer 2 µL, Transkriptaz 1 µL, Nükleaz içermeyen su 4.2 µL eklendi. Her iki deney grubuna hazırlanan karışım 2 PCR tüpüne eklenip, etiketlendi. Thermal Cycler (Sensoquest, Almanya) cihazında gerçekleştirilen revers transkripsiyon işlemine ait parametreler Tablo 3.1’de verilmiştir. İşlemler sonrasında örnekler -20’de saklandı.

Tablo 3.1. Thermal Cycler (Sensoquest, Almanya) cihazında gerçekleştirilen revers transkripsiyon işlemine ait parametreler.

Parametreler	1.Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Sıcaklık (°C)	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.8. RT-PCR ile Gen İfadelerinin İncelenmesi

RT-PCR ile gen ifadelerinin incelenmesi işlemi Roche LightCycler 480 II cihazında iQTM Syber® Green Supermix Manuel (Biorad, ABD) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. RT-PCR reaksiyon bileşikleri total hacim örnek başına 15 µL olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyon içersine; 7.5 µL Syber Green Supermix (2X), 1 µL Forward Primer, 1 µL Reverse Primer, 3.5 µL Nükleaz içermeyen su ve 2 µL cDNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım 96 kuyucuklu plaklara 13’er µL olacak şekilde eklendi. En son üzerlerine 2’şer µL cDNA’lar eklenip kuyuların üzeri kapatıldı. Çalışmalarda kullanılan parametreler ve primer dizileri Tablo2 ve Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. RT-PCR çalışmalarında kullanılan parametreler

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	-	-

Tablo 3.3: Çalışmalarda kullanılan genler ve primer dizileri

Genler	Primer Dizisi	PCR Ürünü Uzunluğu (bp)
<i>GAPDH</i>	5' CCCAGCTTAGGTCATCAGGTA 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' ACCCAGCAGTGCCTTATCTAC 3' 5' TTGTATGGCTCTCTGAGTAGTGC 3'	192
<i>ATM</i>	5' TCACCAGAGGATGCTGTTTAC 3' 5' TGCTTCACACACCCGTTTTT 3'	182
<i>BAX</i>	5' GCAATATGGAGCTGCAGAGGAT 3' 5' GCCTTGAGCACCAGTTTGCTAG 3'	157
<i>BCL-2</i>	5' TCTTTGAGTTCGGTGGGGTC 3' 5' AGTTCACAAAGGCATCCCAG 3'	154
<i>CDK6</i>	5' TCGTGATCTGAAACCGCAGA 3' 5' TGCAAAGATGCAACCGACAC 3'	202
<i>SİKLİN B</i>	5' GGTGATAATCCCTCTCCAAGC 3' 5' TCTGCGTCTACGTCACTACT 3'	114

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.

3.9. İstatistik

Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular GraphPad Prism 8.0.2. (GraphPad Prism, San Diego, CA) istatistik programı kullanılarak istatistiksel analiz ve grafiklendirme yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda Two way Anova ve 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 olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Deney Hayvanı Bakımı İlaç Uygulaması ve Sakrifikasyon Bulguları

Tez çalışmalarında Balb/c ırkı erkek fareler kullanılmıştır. Tez hipotezi doğrultusunda yaklaşık 84 hafta boyunca Transgenik Hayvan Biriminde barınan farelerin günlük suluk, pellet yem ve altlık kontrolleri gerçekleştirilmiştir. İlaç uygulaması *ad libitum* olarak gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanı besleme süresi tamamlandıktan sonra sakrifiye edilen hayvan fenotipleri karşılaştırıldığında genel olarak iki fare grubunda da yaşlanma fenotipleri (kıl dökülmesi, deri sarkmaları, kilo kaybı, kamburluk v.b) gözlenirken NAC uygulaması yapılan farelerin sakrifikasyonu sırasında bazı farelerde iç organlarda ve çeşitli dokularda tümör benzeri yapılar olduğu gözlenmiştir.

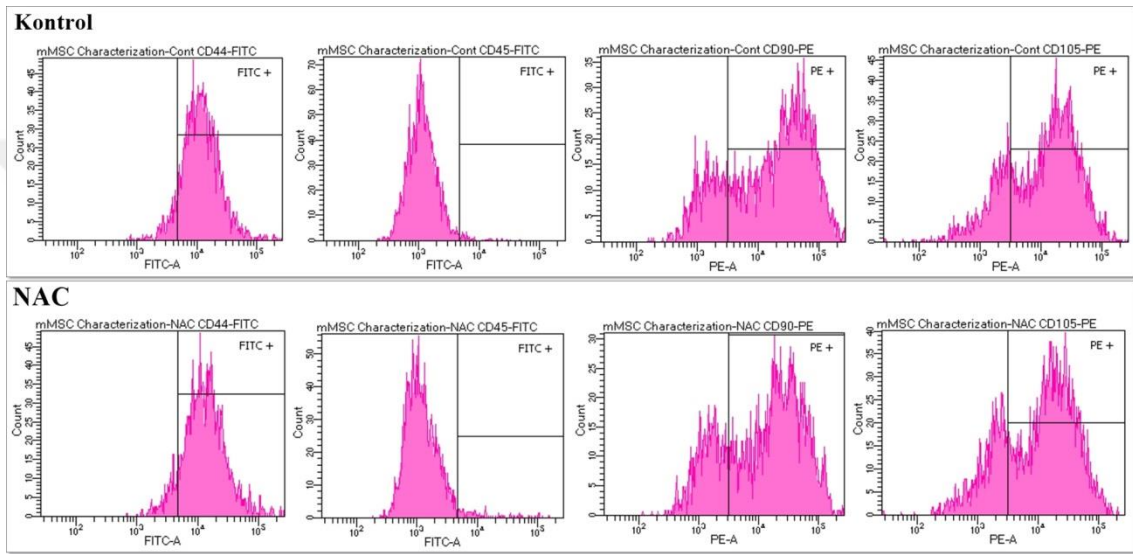
4.2. Adipoz Doku Orijinli Mezenkimal Kök Hücre Kültürü Bulguları

Sakrifikasyon sonrası hâlihazırda kullanılan dokuların yaşlı farelerden elde edilmesi sebebiyle primer kültür ile elde edilen hücrelerde yavaş büyüme ve genel senesens hücre profili gözlenmiştir. Bu nedenle hücrelerde gözlenen senesent profilin kültürde geçen süre kaynaklı olmaması adına kültür süresi 14 günü geçmemiştir. Tez çalışmasında kullanılan hücre gruplarının (kontrol grubu ve NAC grubu hücreler) morfolojileri klasik senesens hücre profiline (sitoplazması dağılmış, fazla çekirdekli ve geniş hücre çeperine sahip dallanmış büyük hücreler) tekabül etmektedir. Çalışmalar sırasında kültüre elden hücreler her idame öncesinde mikroskop altında genel morfolojiyi takip edebilmek adına incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında deney grubunun kontrol grubuna göre daha fazla senesent hücre profiline sahip olduğu gözlenmiştir.

4.3. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyon Bulguları

Tez çalışması için primer kültür ile elde edilen fare adipoz doku orijinli mezenkimal kök hücreler, biyolojik etki testleri öncesinde flow sitometri cihazıyla MKH belirteçleri ile işaretlenerek karakterize edilmiştir. Yapılan karakterizasyon sonrasında kontrol

grubu için pozitif yüzey belirteçlerinden CD44 %91.2, CD90 %77.1 ve CD105 %74.9 oranında pozitif hücre belirlenirken negatif yüzey belirteci CD45 ile işaretlenen hücrelerin %2'si pozitif olarak işaretlenmiştir (şekil 4). Deney grubunda ise pozitif yüzey belirteçlerinden CD44 %89.8, CD90 %73.5 ve CD105 %73 oranında pozitif hücre belirlenirken negatif yüzey belirteci CD45 ile işaretlenen hücrelerin %4.7'si pozitif olarak işaretlenmiştir. Flow sitometri cihazi ile karakterizasyonu yapılan hücrelere ait grafikler aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.1).

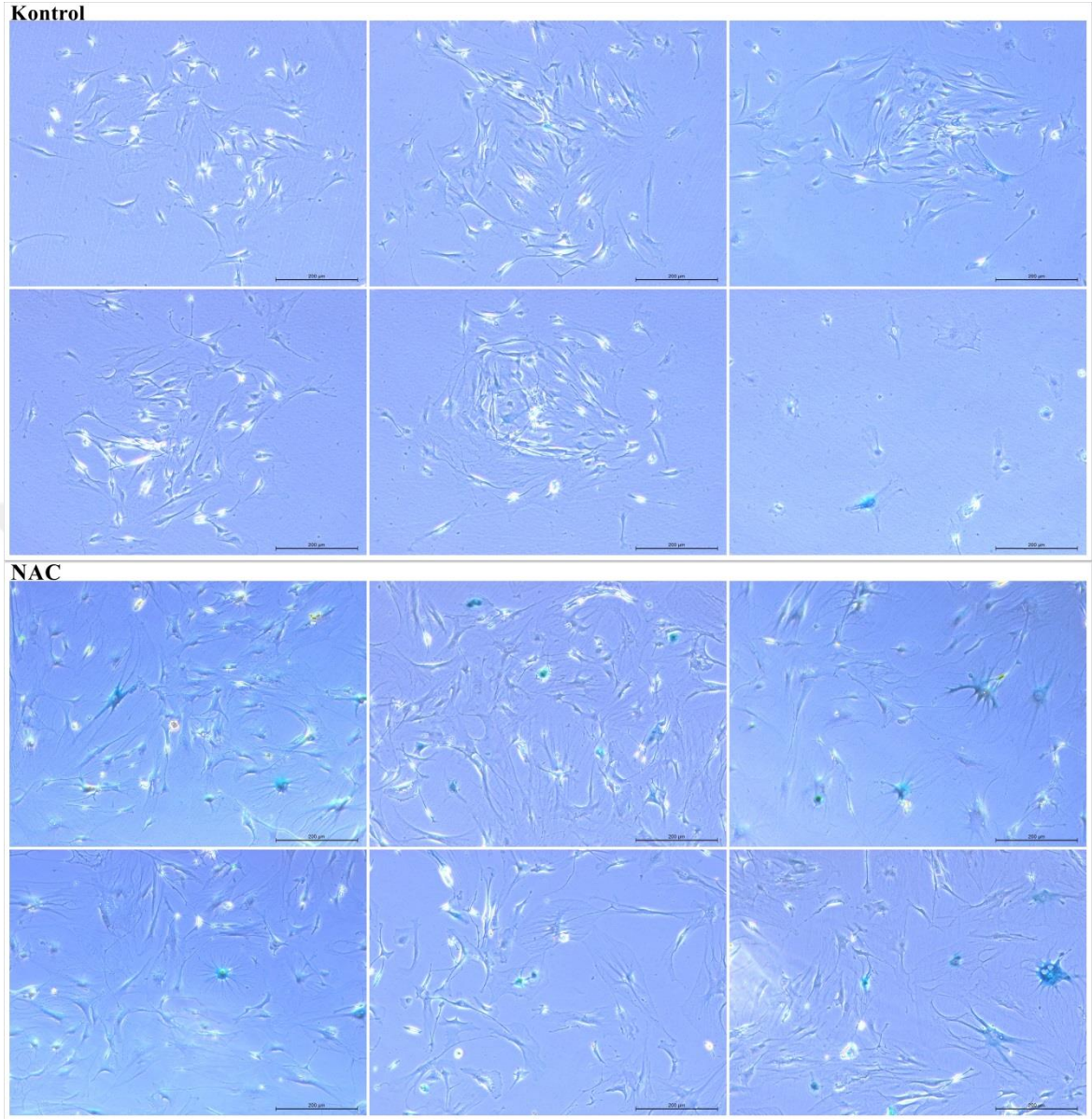


Şekil 4.1. CD44, CD90, CD105 pozitif ve CD45 negatif yüzey belirteçleri ile deney grubu için yapılan MKH karakterizasyon bulguları.

Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu sonrasında elde edilen bulgular deney çalışmalarında kullanılan hücrelerin büyük çoğunluğu MKH belirteçleri bakımından pozitif olduğunu göstermektedir.

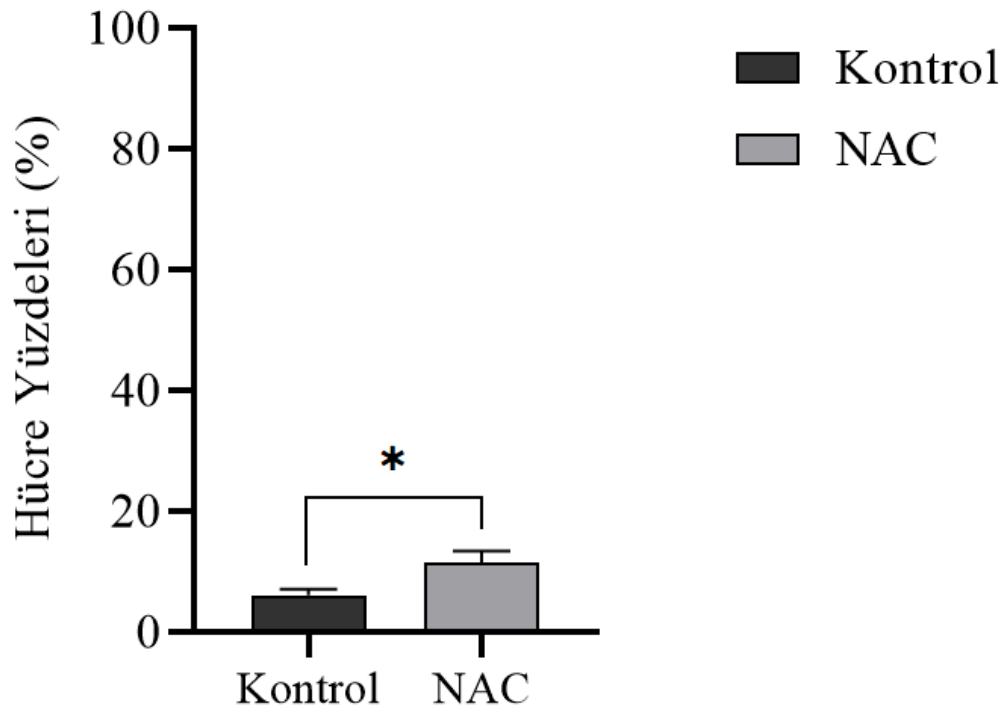
4.4. Senesens İlişkili Beta Galaktosidaz Testi Bulguları

Deneylerde kullanılan hücrelerin senesens oranlarını belirleyebilmek adına sık kullanılan bir yöntem olan senesens ilişkili beta galaktosidaz testi yapılmıştır. B-Gal testi uygulamasının hesaplaması yapılırken yalnızca mavi boya içeren sitoplazması genişlemiş ve fazla çekirdek içeren hücreler oranlamaya dahil edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarına ait ADOMK'lerin senesens ilişkili β -Gal boyamasına ilişkin mikroskop görüntüleri.

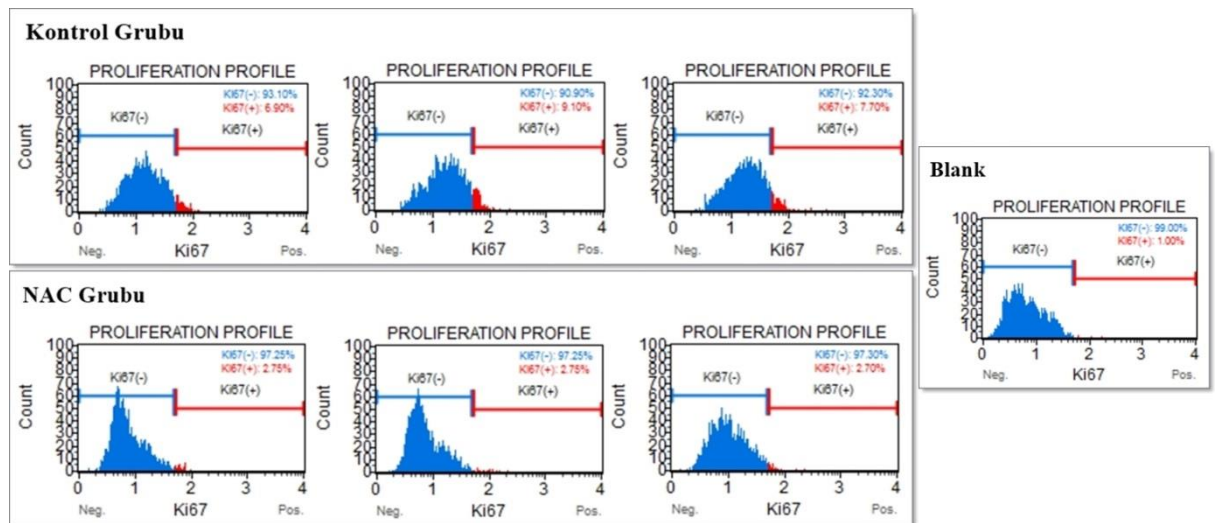
NAC uygulaması yapılan hücrelerdeki boyama yüzdesinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Yapılan boyama sonrasında kontrol grubu hücrelerindeki boyama yüzdesi %6 olarak hesaplanırken bu oran NAC uygulaması yapılmış hücrelerde %11.3 olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir. Boyalı hücre sayımlarına göre hazırlanan senesent hücre grafiği Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Senesens ilişkili β -Gal boyaması sonuçlarına göre senesent hücre oranları

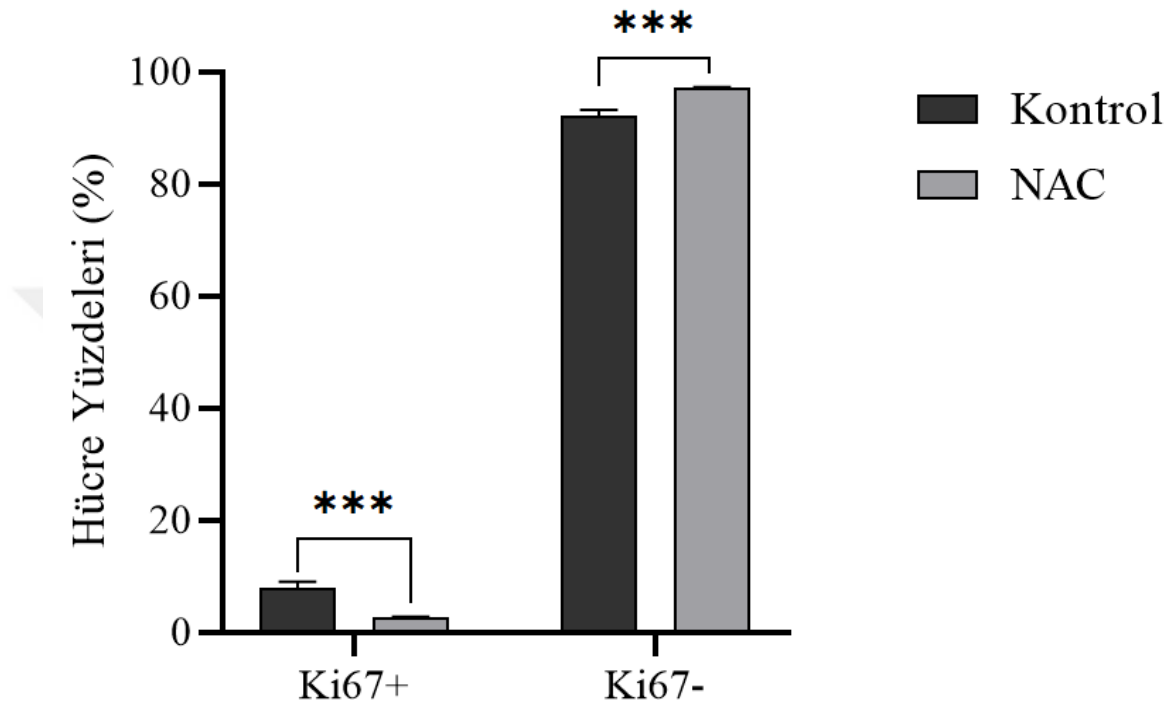
4.5. Ki-67 Proliferasyon Testi Bulguları

Yapılan çalışmalarda deney gruplarının hücre proliferasyonunu değerlendirmek adına Ki-67 proliferasyon testi yapılmıştır. Kit kullanılarak yapılan test sonuçları Muse Cell analizer cihazı yardımıyla ölçülmüştür. Ölçümlere ait görüntüler Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kontrol ve NAC grubu Ki-67 proliferasyon testi bulguları

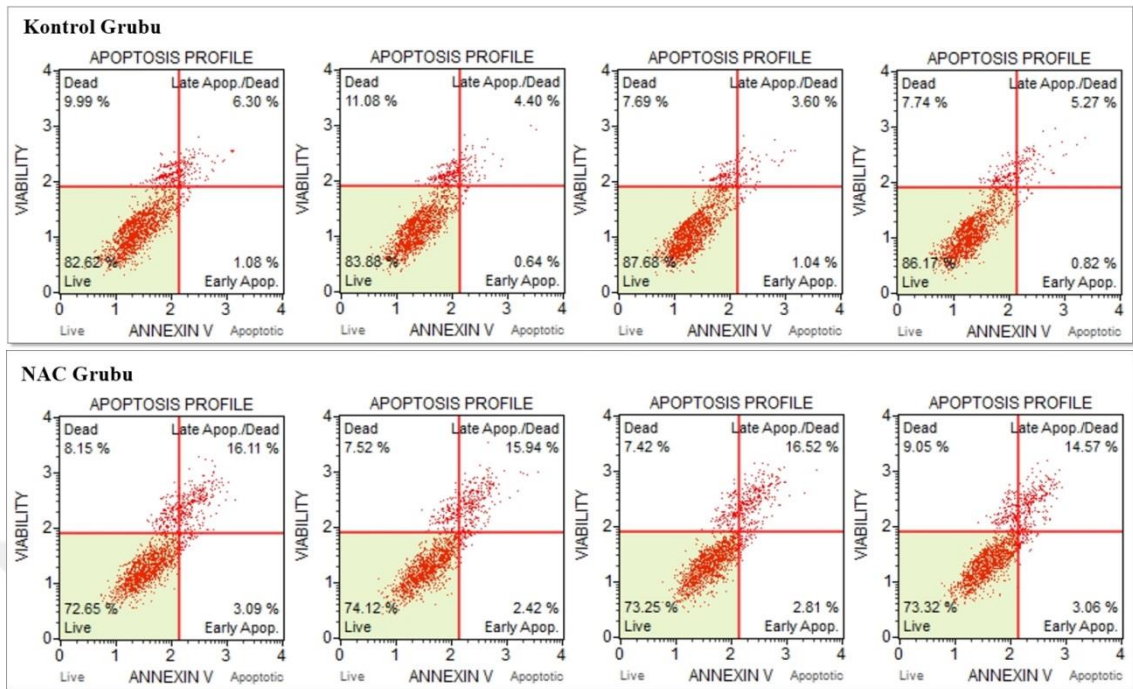
Yapılan ölçümler sonucunda kontrol grubunda Ki-67+ hücre oranı %7.9 NAC grubunda ise Ki-67+ %2.73'tür. Ek olarak Ki-67- hücre oranı kontrol grubunda %92.1 iken bu oran NAC grubunda %97.26'dır. İki grup arasındaki anlamlı farklılıkları belirten grafik Şekil 4.5 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Kontrol ve NAC grubu Ki-67 proliferasyon testi oranlarına ait hücre oranları

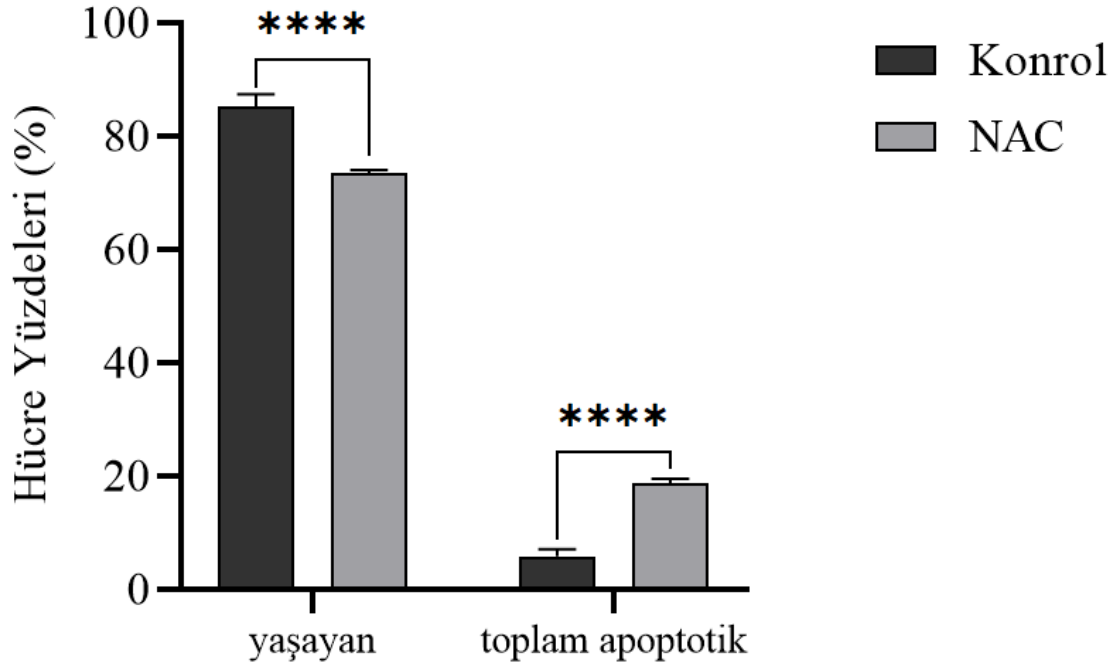
4.6. Annexin V Apoptoz Testi Bulguları

Deney grupları arasındaki apoptoz oranlarının belirlenmesi ve karşılaştırılabilmesi için hücrelere Annexin V boyaması yapılmıştır. Muse Cell analizler cihazı ile yapılan ölçümlere ait cihaz okumalarını gösteren şekil aşağıda verilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Deney grublarına ait Annexin V apoptoz testi bulguları.

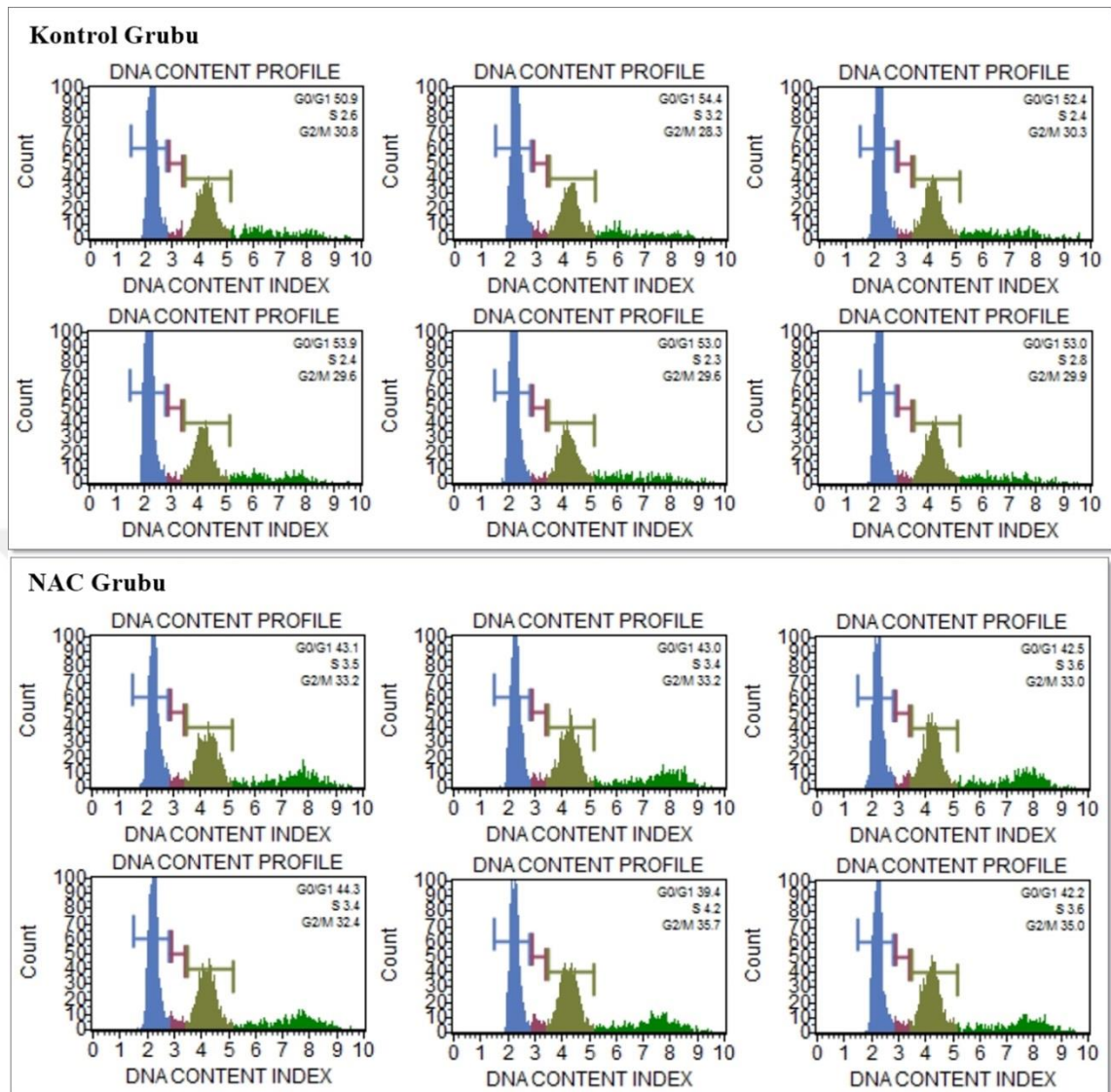
Deney gruplarında yaşayan hücre oranı, kontrol grubunda %85.09 iken bu oran deney grubunda %73.33 olarak belirlenmiş ve yaşayan hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir. Bu duruma paralel olarak iki deney grubu arasında total apoptoz oranları kontrol grubunda %5.78 deney grubunda ise %18.63 olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen anlamlı fark Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Annexin V apoptoz testi sonuçlarına göre deney gruplarındaki canlı ve apoptotik hücre oranları

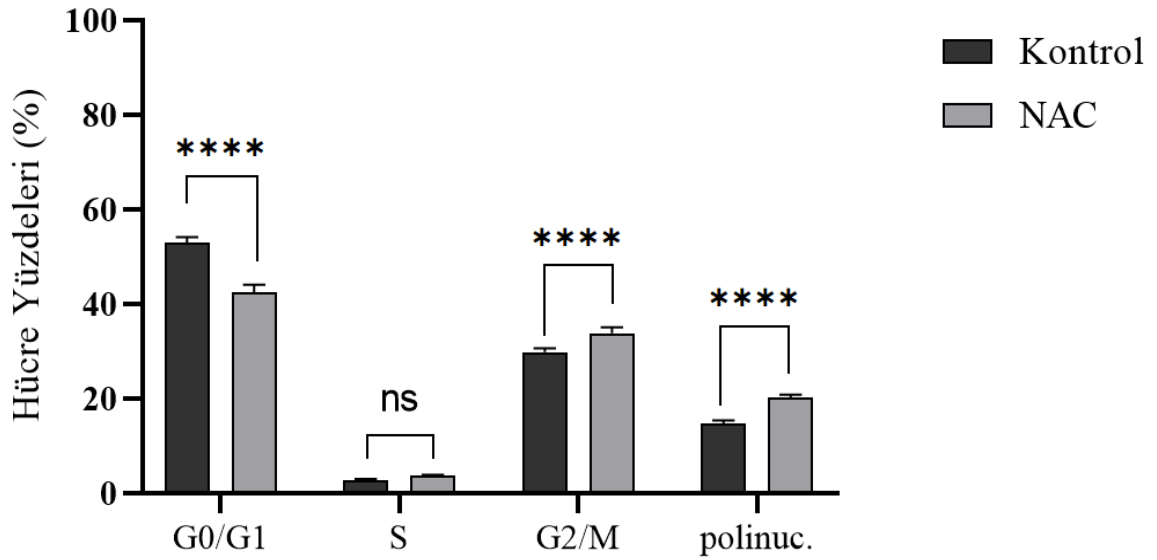
4.7. Cell Cycle Hücre Döngüsü Testi Bulguları

Deney gruplarına ait hücrelerin hücre döngüsü testleri kantitatif ölçüm yapan Muse cell analizer cihazı ile yapılmıştır. Hücre döngüsünün G0/G1, S, G2/M fazları ve polinükleer hücre varlığına ilişkin sonuçların cihaz görüntüleri Şekil 4.8’de mevcuttur.



Şekil 4.8. Kontrol ve NAC gruplarına ait Cell Cycle hücre döngüsü testi bulguları

Hücre döngüsü testlerinde G0/G1 fazı kontrol grubu için %52.93'tür. NAC grubunda ise bu oran %42.41'dir. S fazı yüzdeleri kontrol grubunda %2.61 iken NAC grubunda % 3.61'dir. S fazı ölçümlerinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. G2/M fazlarında ise kontrol grubunda %29.75 iken NAC grubunda ise % 33.75'dir. Her iki grubun polinükleer hücre oranları karşılaştırıldığında NAC grubunda %20.21, kontrol grubunda ise %14.7 oranında polinükleer hücre kaydedilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda S fazı dışındaki fazlar ve polinükleer hücre oranları arasındaki oranlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Değerlendirme ait grafik Tablo 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Kontrol ve NAC grubu Cell Cycle hücre döngüsü testi sonuçlarına göre hücre oranları

4.8. Parafin Bloktan RNA İzolasyonu

Tez çalışmasından elde edilen hücre stoğunun yetersiz kalmasından ötürü gen ifadesi değerlendirmeleri için parafine gömülü dokular kullanılmıştır. Parafine gömülü haldeki dokular tez çalışmasında kullanılan hayvanlardan yedek olarak saklanan dokulardır.

İzolasyon sonrasında nano drop ile yapılan RNA konsantrasyon ölçümlerinde kontrol grubunun konsantrasyonu 70.9 ng RNA, NAC grubunun RNA konsantrasyonu ise 15.8 ng olarak ölçülmüştür.

4.9. Gen İfadelerinin RT-PCR Yöntemi ile Tayini

Tez çalışmasında iki deney grubu arasındaki gen ifadelerinin karşılaştırılabilmesi için RNA izolasyonu sonrasında deney gruplarının cDNA'ları elde edilmiş RT-PCR analizi yapılmıştır. RT-PCR analizleri ile özellikle hücrelerin hücre döngüsü, senesens ve apoptoz yolları ile ilişkili 8 genin ifadelerine bakılmıştır. Analiz sonucunda elde ettiğimiz bulgulara göre *P53* geninin ekspresyonu %227 oranında artış göstermiştir. *BCL2* geni NAC grubunda kontrole göre %294 oranında artış göstermiştir. Artış gösteren bir diğer gen olan *CDK4* ifadesi NAC grubunda kontrole göre %325 oranında artmıştır. İfadesi artan son gen ise kontrol grubuna göre NAC grubunda %985 oranında artan *SIKLIN B* genidir. *P21* gen ifadesi kontrol grubuna göre NAC grubunda %4 azalmıştır. *RBI* gen ifadesi ise yine kontrol grubuna göre NAC grubunda %52 olarak

azalmıştır. İfadesi azalan bir diğer gen ise %20 oranıyla *BAX* genidir. Son olarak *ATM* geni ifadesinin de kontrol grubuna göre NAC grunda %89 olarak azaldığı gözlenmiştir. Gen ifadelerine ait elde edilen sonuçlar Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan genlere ait RT-PCR analiz sonuçları

GEN	HÜCRE	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Değişen/No Değişmeyen (0.9-1.1)
<i>P53</i>	NAC ADOMKH	-3.43	-1.71	3.27	%227 Artış
	KONTROL ADOMKH	-1.72	0	1	
<i>P21</i>	NAC ADOMKH	-1.19	-0.06	1.04	%4 Azalış
	KONTROL ADOMKH	-1.13	0	1	
<i>RB1</i>	NAC ADOMKH	-0.06	0.61	0.65	%52 Azalış
	KONTROL ADOMKH	-0.67	0	1	
<i>ATM</i>	NAC ADOMKH	-0.04	0.92	1.20	%89 Azalış
	KONTROL ADOMKH	-0.96	0	1	
<i>BAX</i>	NAC ADOMKH	-0.46	-0.27	3.94	%20 Azalış
	KONTROL ADOMKH	-0.19	0	1	
<i>BCL-2</i>	NAC ADOMKH	-0.21	-1.98	0.52	%294 Artış
	KONTROL ADOMKH	1.77	0	1	
<i>CDK4</i>	NAC ADOMKH	-2.17	-2.09	4.25	%325 Artış
	KONTROL ADOMKH	-0.08	0	1	
<i>SİKLİN B</i>	NAC ADOMKH	-2.7	-3,44	0.09	%985 Artış
	KONTROL ADOMKH	-6.14	0	1	

5.TARTIŞMA- SONUÇ ve ÖNERİLER

Mezenkimal kök hücreler pek çok farklı kaynaktan elde edilebilen stromal hücrelerdir. Kemik iliği, diş pulpası, umbilikal kord ya da adipoz doku MKH eldesinde tercih edilen kaynaklardan bazılarıdır. Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler kök hücre içeriği bakımından zengin olması sebebiyle sıkça MKH kaynağı olarak kullanılır. ADOMKH'lar uygun koşullar sağlandığında *in vitro* ortamda adipojenik, kondrojenik, miyojenik ya da osteojenik dokulara farklılaşabilirler (Zuk ve ark., 2001). Bu nedenle adipoz doku kaynaklı kök hücreler alternatif bir multipotent kök hücre kaynağıdır.

Hüresel yaşlanma , yoğun onkojenik sinyalleşme, DNA hasarı ve telomer kaybı gibi çoklu hasar türlerine yanıt olarak ortaya çıkan kararlı bir hücre döngüsü durması olarak tanımlanır (Campisi ve d'Adda di Fagagna, 2007 ; Collado ve ark., 2010). Yaşlanmış hücreler, özellikle tümör içinde ve bazı yaşlı dokularda olmak üzere patolojik durumlarla ilintilidir (Campisi ve d'Adda di Fagagna, 2007; Collado ve ark., 2007).

Yaşlanma ile birlikte apoptoz, oluşan hasara verilen diğer ana hüresel yanıttır ve her iki süreç de DNA hasarı veya onkojenik stres gibi ortak tetikleyicileri ve en önemlisi p53 olmak üzere ortak araçları paylaşabilir (Campisi ve d'Adda di Fagagna, 2007; Collado ve ark., 2007; Vousden ve Prives, 2009).

Hüresel stresin neden olduğu kalıcı hücre döngüsü durması olarak tanımlanan hüresel senesens, son zamanlarda kanser, ateroskleroz ve osteoartrit gibi ileri yaş hastalıklarına da katkıda bulunan temel bir yaşlanma mekanizması olarak ortaya çıkmıştır. Terapötik stratejiler, yaşlanan hücrelerin (SNC'ler) seçici olarak ortadan kaldırılması veya SNC sekretomunun bozulması gibi hüresel yaşlanmanın zararlı etkilerine güvenli bir şekilde müdahale edebilmektedir. Bu stratejiler, insan klinik çalışmalarına yaklaşan birkaç programla birlikte önemli ölçüde dikkat çekmektedir (Childs ve ark., 2017).

MKH'ler, çeşitli dokulardan kolaylıkla ekstrakte edilebilir ve MKH'lerin multilineage farklılaşması ve immün düzenleyici özellikleri, onları ideal bir hücre terapötik aday

yapar. Anti-inflamatuar, immün düzenleyici ve immünosupresif kapasiteleri dahil olmak üzere immünolojik özellikleri, immün toleranslı ajanlar olarak potansiyel rollerine katkıda bulunur (Gao ve ark., 2016; Aggarwal ve Pittenger, 2005).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin (ISCT) minimum kriterlerine göre, MKH'ler plastik yüzeye tutunabilme yeteneğine sahip olmalı ve CD44, CD90, CD105 gibi hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmelidir. Ayrıca mezenkimal kök hücreler CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 yüzey moleküllerinin ekspresyonundan yoksun olmalıdır (Dominici ve ark., 2006). Tez çalışmasında adipoz dokudan primer kültür sonrasında elde edilen hücre popülasyonunun karakterizasyonu flow sitometri cihazı ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar hücrelerin CD44 pozitif yüzey belirtici bakımından kontrol ve NAC grubunda yaklaşık %90 oranında pozitif olduğunu gösterdi. Yine bir diğer MKH yüzey belirteci olan CD90 kontrol grubunda %77.1 oranında, NAC grubunda ise %73.5 oranında pozitif olarak belirlenmiştir. Karakterizasyon için kullanılan diğer pozitif yüzey belirteci CD105'di. Bu yüzey belirteci kontrol grubunda %74.9 oranında ve NAC grubunda %73 oranında pozitif olarak içerdiği gösterildi. Deney gruplarında negatif yüzey belirteci olarak seçilen CD45 belirteci kontrol grubunda %2 ve NAC grubunda yalnızca %4.7 oranında içermektedir. Yapılan karakterizasyon çalışması ile deneylerde kullanılan hücrelerin çoğunluğunun MKH popülasyonu olduğunu doğruladık. Fakat deney çalışmasından bağımsız olarak halihazırda senesent fenotipe sahip hücrelerin MKH belirteçleri karakterize etme bakımından stemness özelliklerini kaybetmeye başladıklarını gözlemlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar senesent hücrelerin genç hücrelere oranla CD44, CD90 ve CD105 gibi MKH yüzey belirteçlerini daha düşük oranda ifade ettiğini göstermiştir (Stolzing ve ark., 2008).

Mezenkimal kök hücrelerin seçilimi sonrası, senesens hücre profilini belirleyebilmek adına sık kullanılan bir yöntem olan Beta-galaktosidaz boyaması yapıldı. Debaqck-Chainiaux ve arkadaşları *in vivo* kültür ortamında beta-galaktosidaz boyamasının yaşlanan memeli hücrelerinin tanınmasına izin verdiğini göstermişlerdir (Debaqck-Chainiaux ve ark., 2009). Yapılan boyama sonrasında hücrelerin halihazırda (yaşlı farelerden eldesi dolayısıyla) sahip oldukları senesent hücre profili göz önünde bulundurulmuş (geniş sitoplazma, artan lizom sayısı, fazla çekirdek ve iğsi yapılar) ve boyalı hücre sayısı kontrol grubunda %6 oranında, NAC grubunda ise %11.33 oranında

tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular istatistiksel olarak düşük anlamlı olmasına rağmen NAC uygulamasının senesensi arttırdığını göstermektedir. Çeşitli çalışmalar antioksidan olarak uygulanan NAC'ın senesensi negatif yönde indüklediğini gösterse de (Breau ve ark., 2019). Alessio ve arkadaşları senesensi belirleyebilmek adına yapılan senesens ilişkili Beta-galaktosidaz boyamasının sınırlı etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir (Alessio ve ark., 2021). Elde edilen boyama sonuçları uzun süreli NAC uygulamasının yaşlı hayvanlardan elde edilmiş MKH'lerde hücre senesensi düşük istatistiksel anlamlılıkla arttırdığını gösterdi.

Yapılan beta-galaktosidaz boyamasına ek olarak hücre proliferasyonunu değerlendirmek için deney gruplarımıza Ki-67 proliferasyon testi yapıldı. Test sonuçlarımıza göre Ki-67 ifade eden hücre sayısı kontrol grubunda %7.9, NAC grubunda ise %2.73 oranındaydı. Bu sonuçlar NAC grubunda proliferasyonun istatistiksel olarak anlamlı bir oranda azaldığını göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalar artan hücre senesensinin negatif hücre proliferasyonu ile paralel olduğunu göstermiştir (Lawless ve ark., 2010).

Yaşlanan hücreleri hedefleyen bazı stratejiler teröpatiklerin mezenkimal kök hücreleri seçici olarak apoptoza yönlendirdiğini göstermiştir (Ge, M., ark 2021). Böylece heterojen popülasyon içerisindeki yaşlı hücre oranı azalmaktadır. Yapılan Annexin V apoptoz testleri sonrasında kontrol grubu hücrelerinde toplam apoptoz oranının %5.78 deney grubu hücrelerinde ise %18.63 oranında apoptotik hücre olduğu tespit edildi. Deney grubundaki %12.85'lik apoptoz artışı heterojen bir popülasyon olan mezenkimal kök hücrelerde yaşlanan hücrelerin apoptoza giderek popülasyondan ayrıldığını göstermiştir.

Hücre döngüsü bulguları değerlendirildiğinde G0/G1 fazının kontrol grubunda % 52.93, NAC grubunda ise % 42.41 olduğunu gözlemlenmiştir. G0/G1 fazı için kontrol ve deney grubu arasındaki % 10.53'lük fark NAC grubuna göre kontrol grubunda telomer erozyonu olduğunu ve NAC'ın telomer erozyonunu kısmen engelleyerek senesensi baskılamaya çalıştığına işaret etti. Öte yandan G2/M fazı kontrol grubunda % 29.75 ve NAC grubunda ise % 33.75 oranında bulundu. Bu durum zamanla NAC grubundaki % 4'lük farkın DNA hasarının deney grubu hücrelerinde daha fazla meydana geldiğine işaret etmektedir. Hücre döngüsü aşamalarının dışında ölçümler sırasında kontrol grubunda %14.7 NAC grubunda ise %20.21 oranında polinükleer hücre olduğu

gözlenmiştir. Bazı hücrelerin replikasyon sonrası mitoz bölünme gerçekleştiremediği için çekirdek sayısının artması polinükleer hücrelerin varlığına işaretir.

Biyolojik testlerin yanı sıra yapılan RT-PCR çalışmaları sonrasında p21, p53, RB1, BAX, BCL2, ATM, CDK4 ve SIKLIN B genlerinin ifade düzeyleri housekeeping genlerden biri olan *Gapdh* geni referans alınarak incelenmiştir. İfadesi artan genlerden SIKLIN B %985, CDK4 %325, BCL 2 %294 ve p53 gen ifadesi %227 oranında artmıştır. Aynı zamanda p21 %4, BAX %20, RB 1 %52 ve ATM gen ifadesi %89 oranında azalmıştır.

p53, hücre döngüsünü çeşitli şekillerde etkileyebilir. G1 ve G2'de büyüme durmasına veya apoptoza neden olabilir. p53 proteini, diğer proteinlerle kompleksler oluşturarak veya bir transkripsiyon faktörü olarak hareket ederek hücre büyüme regülasyonu ve apoptoz indüksiyonunda rol oynar. p53 için her ikisi de transkripsiyonel aktivatör ve baskılayıcı olarak işlev görür. Genel olarak, protein ürünleri hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi uyaran genlerin p53 tarafından aşağı regüle edilmesi beklenir. Yine de hücre döngüsü durması veya apoptoz indükleyicilerinin gen ekspresyonu, bu tümör baskılayıcı protein tarafından arttırılmalıdır (Levine, A.J., 1997), (Ko, L.J. ve Prives, C. 1996) CDK4 ve SIKLIN B hücre döngüsü kontrol noktalarında görevli ve düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir. Genel olarak CDK4 G1'den S fazına geçişte SIKLIN B ise S fazından G2 fazına geçişte görev alır (Lee, Y., ve ark, 2014). BCL 2 geni hücre ölümünü düzenleyen proapoptotik ya da antiapoptotik rollere sahiptir anormal artışı tümör oluşumunun artması ile ilişkilendirilmiştir (Burlacu, 2003; Brunelle ve Letai, 2009).

p21 geninin transkripsiyonu, p53'e bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla aktive edilir. p21 eksikliği olan fare embriyonik fibroblastları radyasyona maruz kaldıktan sonra p53 aracılı G1 durması için p21 fonksiyonunun gerekli olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, p21 eksikliği olan fareler belirgin bir fenotip göstermemektedir (Gartel, A. L., ve ark, 1996). P21 geni senesens ve apoptozda aktif olarak görev alan anahtar bir genidir. RB1 geni hücre döngüsünün temel düzenleyici genlerindedir ve tümör baskılanmasında görev yapar. RB1 geni CDK3/siklin C iş birliği ile hücre döngüsünün G0-G1 geçişini destekler (Gonzalo ve ark., 2005). ATM DNA hasar kontrol noktasının aktivasyonunun başlaması ve hücre döngüsü durmasına, DNA onarımına veya apoptoza yol açan birkaç anahtar proteinin fosforilasyonunda görevlidir (Lee, J. H., ve Paull, T.T., 2007). BAX

p53 antitümör proteininin kofaktörü olarak rol oynar. Bax geni, BCL 2 gen ailesinin bir üyesidir. Bu gen, p53 tarafından indüklenir ve bulunduğu hücrenin apoptoza gitmesini sağlar (Toshiyuki, M., ve Reed, J. C. 1995).

Yapılan bu çalışmada uzun süreli N-asetilsistein uygulamasının mezenkimal kök hücre senesensi üzerine biyolojik etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, NAC uygulamasından bağımsız olarak her iki grupta da yaşlanan hücrelerin stemness özelliklerini kaybetme eğilimi gösterdiği yapılan karakterizasyon analizi ile gösterilmiştir. NAC uygulaması yapılan grupta senesent hücre sayısı apoptotik hücre sayısı ve polinükleer hücre sayısı kontrol grubuna oranla daha fazla bulunmuştur. Proliferasyon oranının da kontrol grubuna göre NAC grubunda daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu durumda yaşlı hayvanlardan elde edilen mezenkimal kök hücrelere uygulanan NAC'ın popülasyondaki bir kısım hücreyi apoptoza götürürken bir kısım hücreyi de senesense götürdüğü gözlenmiştir. Yapmış olduğumuz RT-PCR çalışmaları sonrasında NAC'ın hücre döngüsünün G0/G1 ve G2//M kontrol noktası proteinleri üzerine etki ederek polinükleer hücreleri arttırdığı gözlenmiştir. 14 ay boyunca kronik NAC uygulaması yapılmış hayvanlardan elde edilen hücreler bu kontrol noktalarının tamamında görev alan p21 geninin ifadesini arttırmaya çalışmamıştır. Aynı şekilde RB-1, BAX ve ATM gen ifadeleri de azalmıştır. NAC uygulaması yapılan hücreler yaşlı ve heterojen bir MKH popülasyonudur. Bu durumda hücrelerin bir kısmı senesense giderken bir kısmı p53 gibi apoptotik ve proapoptotik genlerin ifadesini arttırarak apoptozu indüklediği sonucuna ulaşılabilir. Karakterizasyon sonuçlarında CD90 ve CD105 belirteçlerinin ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın sebebini bulabilmek adına yaşlı MKH'lara farklılaşma testleri yapılması önerilmektedir. RT-PCR ile ekspresyon seviyeleri incelenen genlerin ayrıca protein düzeyinde meydana gelen değişikliklerle karşılaştırılması ve anlaşılması adına proteomiks analizlerin yapılması önerilmektedir. Ayrıca NAC'ın kronik kullanımının etkileri daha kapsamlı çalışmalarla incelenmeli senotrapideki rolü detaylı olarak aydınlatılmalıdır. Son olarak özellikle NAC'ın kronik kullanımının etkilerinin değerlendirilmesi ön görülen çalışmalarda NAC uygulamasının aspartam içermeyen NAC formları ile yapılması önerilmektedir.

6.KAYNAKÇA

- Acosta JC. Banito A. Wuestefeld T. Georgilis A. Janich P. et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology*, 2013; 15.8: 978-990.
- Aggawal S. Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005; 105.4: 1815-1822.
- Akyürekli C. Le Y. Richardson RB. Fergusson D. Tay J. et al. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2015; 11.1: 150-160.
- Alesio N. Cappabianca S. Peluso G. Di Bernardo G. et al. 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.
- Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem cells*, 2019; 37.7: 855-864.
- Assis R. IF. Wiench M. Silvero KG. da Silva RA. Feltran GS. et al. RG108 increases NANOG and OCT4 in bone marrow-derived mesenchymal cells through global changes in DNA modifications and epigenetic activation. *Plos one*, 2018;13.12: e0207873.
- Beck, JA. Hafezparest M. Pierce ML. Eppig JT. et al. Genealogies of mouse inbred strains. *Nature genetics*, 2000; 24.1: 23-25.
- Borgström, L. Kagedal B. Paulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *European journal of clinical pharmacology*, 1986; 31.2: 217-222.
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2003; 7.3: 249-257.
- Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*, 2013; 75: 685-705.

- Campisi J, D'adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007; 8.9: 729-740.
- Childs BG, Glusevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature reviews Drug discovery*, 2017; 16.10: 718-735.
- Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*, 2010; 10.1: 51-57.
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 2007; 130.2: 223-233.
- Dai Z, Jin Y, Zheng J, Liu K, Zhao J, et al. MiR-217 promotes cell proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs by targeting DKK1 in steroid-associated osteonecrosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019; 109: 1112-1119.
- Debacq-Chainiaux F, Campisi J, Toussaint O, et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 2009; 4.12: 1798-1806.
- Demirkol O, Adams C, Ercal N. Biologically important thiols in various vegetables and fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004; 52.26: 8151-8154.
- Dominici MLB, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini Fc, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; 8.4: 315-317.
- Dröge W. Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005; 360.1464: 2355-2372.
- Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli K, Thompson CB, et al. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Molecular and cellular biology*, 1998; 18.1: 608-615.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 2007; 35.4: 495-516.
- Fan J, An X, Yang Y, Xu H, Fan L, et al. MiR-1292 targets FZD4 to regulate senescence and osteogenic differentiation of stem cells in TE/SJ/mesenchymal tissue system via the Wnt/ β -catenin pathway. *Ageing and disease*, 2018; 9.6: 1103.

- Fernandez-Rebollo E, Franzen J, Goetzke R, Hollmann J, Ostrawzka A, et al. Senescence-associated metabolomic phenotype in primary and iPSC-derived mesenchymal stromal cells. *Stem cell reports*, 2020; 14.2: 201-209.
- Franzen J, Zirkel A, Blake J, Rath B, Benes V, et al. Senescence-associated DNA methylation is stochastically acquired in subpopulations of mesenchymal stem cells. *Aging cell*, 2017, 16.1: 183-191.
- Freud A, Orjalo AV, Despres PY, Campisi J, et al. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in molecular medicine*, 2010; 16.5: 238-246.
- Galluzzi L, Mauri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation*, 2007; 14.7: 1237.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 2012, 19.1: 107-120.
- Gao B, Lin X, Jing H, Fan J, Ji C, et al. Local delivery of tetramethylpyrazine eliminates the senescent phenotype of bone marrow mesenchymal stromal cells and creates an anti-inflammatory and angiogenic environment in aging mice. *Aging Cell*, 2018; 17.3: e12741.
- Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease*, 2016; 7.1: e2062-e2062.
- Gartel AL, SERFAS, Michael S, TYNER, Angela L. p21—negative regulator of the cell cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1996; 213.2: 138-149.
- Ge M, Ge M, Hu L, Ao H, Zi M, Kong Q, et al. Senolytic targets and new strategies for clearing senescent cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2021; 195: 111468.
- Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of medical genetics*, 2009; 46.8: 497-510.
- Ghobrial IM, WITZIG, Thomas E, ADJEI, Alex A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2005; 55.3: 178-194.

- Glick D. Barth S. Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 2010; 221.1: 3-12.
- Goldar S. Khaniani MS. Derekhshan SM. Baradaren B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 2015; 16.6: 2129-2144.
- Gonzalo S. Garcia-Cao M. Fraga MF. Schotta G. Peters AHFM. et al. Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nature cell biology*, 2005, 7.4: 420-428.
- Gorgoulis VG. HALAZONETIS, Thanos D. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Current opinion in cell biology*, 2010; 22.6: 816-827.
- Gorski S. Marra M. Programmed cell death takes flight: genetic and genomic approaches to gene discovery in *Drosophila*. *Physiological Genomics*, 2002; 9.2: 59-69.
- Gracey M. Burke V. Anderson CM. Treatment of abdominal pain in cystic fibrosis by oral administration of n-acetyl cysteine. *Archives of Disease in Childhood*, 1969; 44.235: 404.
- Green DR. EVAN, Gerard I. A matter of life and death. *Cancer cell*, 2002; 1.1: 19-30.
- Guicciardi ME. GORES, Gregory J. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 2009; 23.6: 1625-1637.
- Hayflick L. Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 1961; 25.3: 585-621.
- Herbig U. Ferreira M. Candel L. Carey D. Sedivy JM. et al. Cellular senescence in aging primates. *Science*, 2006; 311.5765: 1257-1257.
- Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clinical pharmacokinetics*, 1991; 20.2: 123-134.
- Hudayah T. Saba G. Taib M. Ismail N. Muhammad TST. et al. Methanol extracts of four selected marine sponges induce apoptosis in human breast cancer cell line, MCF-7. 2017
- Hynes K. Menicanin D. Han J. Mrozik K. et al. Mesenchymal stem cells from iPS cells facilitate periodontal regeneration. *Journal of dental research*, 2013; 92.9: 833-839.

- Ito T. Teo YV. Evans SA. Neretti N. Sedivy J. et al. Regulation of cellular senescence by polycomb chromatin modifiers through distinct DNA damage-and histone methylation-dependent pathways. *Cell reports*, 2018; 22.13: 3480-3492.
- Jan, Rehmat, Chaudhry GS. et al. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2019; 9.2: 205.
- Jin Z. El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, 2005; 4.2: 147-171.
- Justice JN. Nambiar AM. Tchkonja T. Le Brasseur NK. Pascual R. et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*, 2019; 40: 554-563.
- Kaczanowski S. Sajid M. Reece SE. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites & vectors*, 2011; 4.1: 1-8.
- Kerr John FR. Wyllie AH. Currie Alastair R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 1972; 26.4: 239-257.
- Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2005; 103.8: 1551-1560.
- Kirkland James L., Tchkonja T. Zhu Y. Niendernhofer LJ. Robbins PD. et al. The clinical potential of senolytic drugs. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2017; 65.10: 2297-2301.
- Ko Linda J. Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes & development*, 1996; 10.9: 1054-1072.
- Kornicka K. Marycz K. Maredziak M. Tomaszewsk KA. Nicpon J. et al. The effects of the DNA methyltransferases inhibitor 5-Azacytidine on ageing, oxidative stress and DNA methylation of adipose derived stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017; 21.2: 387-401.
- Kornienko Ju S. Smirnova IS. Pugovkira NA. Ivanova JS. Shilina MA. et al. High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. *Scientific reports*, 2019; 9.1: 1-13.
- Kuilman T. Peeper Daniel S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews cancer*, 2009; 9.2: 81-94.

- Lawness C. Wang C. Jurk D. Merz A. Zglinicki T. et al. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Experimental gerontology*, 2010; 45.10: 772-778.
- LeBlanc Andréa C. Natural cellular inhibitors of caspases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2003; 27.2: 215-229.
- Lee J. H. Paull T. T. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 2007; 26.56: 7741-7748.
- Lee, JH. Jung KH. Han YS: Yoon YM. Yun CW. et al. Antioxidant effects of *Cirsium setidens* extract on oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 2016; 14.4: 3777-3784.
- Lee JH. Yoon YM. Song KH. Noh H. Lee SH. Melatonin suppresses senescence-derived mitochondrial dysfunction in mesenchymal stem cells via the HSPA1L–mitophagy pathway. *Aging Cell*, 2020; 19.3: e13111.
- Lee Y. Dominy JE. Choi JY. Jurczak M. Tolliday N. et al. Cyclin D1–Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature*, 2014; 510.7506: 547-551.
- Levine A J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *cell*, 1997; 88.3: 323-331.
- Li H. Fan J. Fan L. Li T. Yang Y. et al. MiRNA-10b reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis partly through the TGF- β /SMAD2 signaling pathway. *Aging and disease*, 2018; 9.6: 1058.
- Lillibridge Clinton B. Docter JM. Eidelman S. Oral administration of n-acetyl cysteine in the prophylaxis of “meconium ileus equivalent”. *The Journal of Pediatrics*, 1967; 71.6: 887-889.
- Lin Tsai-Ming. Tsai JL. Lin SD. Lai CS. Chang CC. et al. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem cells and development*, 2005; 14.1: 92-102.
- Liu Y. Chen Q. Senescent Mesenchymal Stem Cells: Disease Mechanism and Treatment Strategy. *Current molecular biology reports*, 2020; 6.4: 173-182.
- Los M. Craen MV. Penning LC. Schenk H. Wastendorp M. et al. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature*, 1995; 375.6526: 81-83.

- Mchugh D. Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, 2018; 217.1: 65-77.
- Medema J. Scaffidi C. Kischked FC. Shevchenko A. Mann M. et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO journal*, 1997; 16.10: 2794-2804.
- Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & development*, 2007; 21.22: 2861-2873.
- Mosterio L. Pantoja C. Alcazar N. MArion RM. Chondronasiou D. et al. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science*, 2016; 354.6315: aaf4445.
- Najafov A. Chen H. Yuan J. Necroptosis and cancer. *Trends in cancer*, 2017; 3.4: 294-301.
- Neri S. Borzi RM. Molecular mechanisms contributing to mesenchymal stromal cell aging. *Biomolecules*, 2020; 10.2: 340.
- Neuman MG. Katz GG. Malkiewicz IM. Mathurin P. Tsukamoto H. et al. Alcoholic liver injury and apoptosis-synopsis of the symposium held at ESBRA 2001: 8th Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Paris, September 16, 2001. *Alcohol*, 2002; 28.2: 117-128.
- Nikoletopoulou V. Markaki M. Palikaras K. Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2013; 1833.12: 3448-3459.
- Olsson B. Johanson M. Gabrielsson J. Bolme P. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *European journal of clinical pharmacology*, 1988; 34.1: 77-82.
- Park SY. Kim GY. Lee JE. Yoon JH. Ye SK. et al. Lactoferrin protects human mesenchymal stem cells from oxidative stress-induced senescence and apoptosis. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2017; 27.10: 1877-1884.
- Potter M. History of the BALB/c family. In: *The BALB/c Mouse*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1985: p. 1-5.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 2000; 157.5: 1415-1430.

- Reitinger S. Schimke M. Klepsch S. Sneeuw S. Yani SL et al. Systemic impact molds mesenchymal stromal/stem cell aging. *Transfusion and Apheresis Science*, 2015; 52.3: 285-289.
- Ritschk B. Storer M. Mas A. Heinzmann F. Ortels MC. et al. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes & development*, 2017; 31.2: 172-183.
- Rizzuto R., et al. Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Current molecular medicine*, 2008; 8.2: 119-130.
- Rodier F. Campisi J. Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 2011; 192.4: 547-556.
- Rossignol DA. The use of N-acetylcysteine as a chelator for metal toxicity. In: *The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine*. Adis, Singapore, 2019; p. 169-179.
- Sankari SL. Masthan KMK. Babu NA. Bhattacharjee T. Elumalai et al. Apoptosis in cancer-an update. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 2012; 13.10: 4873-4878.
- Spitzhorn LS. Megges M. Wrick W. Rahman MdS. Otte J. et al. Human iPSC-derived MSCs (iMSCs) from aged individuals acquire a rejuvenation signature. *Stem cell research & therapy*, 2019; 10.1: 1-18.
- Stergiou L. Hengartner M. O. Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*. *Cell Death & Differentiation*, 2004; 11.1: 21-28.
- Stolzing A. Jones E. McGonagle D. Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of ageing and development*, 2008; 129.3: 163-173.
- Schwalfenberg, Gerry K. N-acetylcysteine: a review of clinical usefulness (an old drug with new tricks). *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2021.
- Toshiyuki M. Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 1995; 80.2: 293-299.
- Trump BE. Berezsky IK. Chang SH. Phelps PC.. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic pathology*, 1997; 25.1: 82-88.
- Vasdev S. Singal P. Gill V. The antihypertensive effect of cysteine. *International Journal of Angiology*, 2009; 18.01: 07-21.
- Vaux DL. Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*, 1999; 96.2: 245-254.

- Venderova K. Park DS. Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012; 2.8: a009365.
- Weissman A. *Essays upon heredity and kindred biological problems*. Clarendon press, 1891:
- Wyllie, A. H., Kerr, J. R., & Currie, A. R., Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*, 1980; 68, 251-306.
- Xie H. Wang Z. Zhang L. Lei Q. Zhao A. et al. Development of an angiogenesis-promoting microvesicle-alginate-polycaprolactone composite graft for bone tissue engineering applications. *PeerJ*, 2016; 4: e2040.
- Yang M.Teng S. Ma C. Yu Y. Wang P. et al. Ascorbic acid inhibits senescence in mesenchymal stem cells through ROS and AKT/mTOR signaling. *Cytotechnology*, 2018; 70.5: 1301-1313.
- Yuan S. Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*, 2013; 21.4: 501-515.
- Zhou S. Greenberger JS. Epperly MW. Goff JP. Adler C. et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging cell*, 2008; 7.3: 335-343.
- Zhu Y. I. Tchkonina T. Stroissnigg HF. Dai HM. Ling YY. et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging cell*, 2016; 15.3: 428-435.
- Zhu Y. I. Tchkonina T. Pirtskhalava T. Gower AC. Ding H. et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging cell*, 2015; 14.4: 644-658.
- Zuk PA. Zhu M. Mizuno H. Huang J. Futrel JW. Katz AJ. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 2001; 7.2: 211-228.

Sayı : 68742022- 604.01.02-006
Konu: Değerlendirme ve Onay

16/01/2020

Sayın; Prof.Dr.Servet ÖZCAN;

“NAC (N-asetil sistein) Kullanan ve Kullanmayan Fare Modelinde Adipoz Doku Orjinli Mezenkimal Kök Hücrelerin Senesense Olan Yatkınlıklarının Belirlenmesi” başlıklı projenizin Merkezimiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama, Proteomiks ve Deney Hayvanları Barınağı birimlerinde gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Not: Bu projeden çıkan bütün yayınlarınızda projenin Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezinde yapıldığına dair ibarenin kullanılması zorunludur.

Kullanım şekli: “Erciyes University Genome and Stem Cell Center (GENKÖK)



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



Tarih: 09.10.2019

Toplantı Sayısı: 10

Karar No:19/189

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 09.10.2019 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
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Ayşe EKEN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Dr.Öğr.Üyesi	Veteriner Fakültesi
Özge AL	Arş. Gör. Dr.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Eray AKTUĞ	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTA
Gencay EKİNCİ	Arş. Gör.	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 Bilimleri Fakültesi Biyoloji A.D.'dan Prof. Dr. Servet OZCAN tarafından sunulan "NAC (N-asetil sistein) Kullanan ve Kullanmayan Fare Modelinde Adipoz Doku Orjinli Mezenkimal Kök Hücrelerin Senesense Olan Yatkınlıklarının Belirlenmesi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

NAC (N-asetilsistein) KULLANAN VE KULLANMAYAN FARE MODELİNDE ADİPOZ DOKU ORJİNİLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN SENESENSE OLAN YATKINLIKLARININ BELİRLENMESİ

ORJİNİLLİK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.iku.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
3	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	tez.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	İNÇİ, Abdullah, YILDIRIM, Alparıslan, YAVUZ, Ahmet and DÜZLÜ, Önder. "Bazı protozoon enfeksiyonlarda apoptozis", Erciyes Üniversitesi, 2009. Yayın	<% 1
7	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Zeynep GÜNAYDIN

Uyruğu: T.C

EĞİTİM

<u>DERECE</u>	<u>KURUM</u>	<u>MEZUNİYET</u>
Lisans	Ankara Üniversitesi	2018
Lisans	Hasselt University (Erasmus+ değişim öğrencisi)	2015-2016
Lise	Mustafa Azmi Doğan Anadolu Lisesi	2013

YABANCI DİL

İngilizce

Almanca

YAYINLAR

Acar, M. B., Ayaz-Güner, Ş., **Gunaydin, Z.**, Karakukcu, M., Peluso, G., Di Bernardo, G., ... & Galderisi, U. (2021). Proteomic and Biological Analysis of the Effect of Metformin Senomorphics on the Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 888.

BURS VE DESTEKLERİ

TÜBİTAK 1001 117S216, Metformin Uygulanmış Senesent Mezenkimal Kök Hücre Sekretom Profilinin Proteomik Analizi, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 14.09.2018 - 01.06.2020, Proje Başlangıç/Bitiş tarihleri: 01.12.2017 - 01.06.2020.

TÜBİTAK 1001 119S457, B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (B-All) Yüzey Proteomunun İncelenerek Yeni Kimerik Antijen Reseptörü (Car) Hedeflerinin Belirlenmesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 06.07.2020 – Devam ediyor, Proje Başlangıç/Bitiş tarihleri: 01.03.2020 - 01.09.2022.