TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KİMYASAL OLARAK İNDÜKLENMİŞ ENDOMETRİAL YAŞLANMA MODELİ ÜZERİNE ETKİSİ

MUHAMMED YUSUF PEKMEZCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

DANIŞMAN

PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

MANİSA/2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KİMYASAL OLARAK İNDÜKLENMİŞ ENDOMETRİAL YAŞLANMA MODELİ ÜZERİNE ETKİSİ

MUHAMMED YUSUF PEKMEZCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

DANIŞMAN

PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ ÜYELERİ

PROF. DR. M. KEMAL ÖZLBİLGİN

PROF. DR. AYŞEGÜL UYSAL

MANİSA/2019

YÜKSEK LİSANS TEZ SINAVI TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Muhammed Yusuf Pekmezci'nin Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı "Mezenkimal Kök Hücrelerin Kimyasal Olarak İndüklenmiş Endometrial Yaşlanma Modeli Üzerine Etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek " **KABUL**" kararı verilmiştir. 19/06/2019

Jüri Üyesi:	İmza
Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER (Tez Danışmanı)	.....
Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN (M.C.B.Ü. Öğretim Üyesi)	.....
Prof. Dr. Ayşegül UYSAL (Ege Üniversitesi Öğretim Üyesi)	.....

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28/06/2019 **tarih ve** 19/25 **... sayılı kararı ile onaylanmıştır.**

Prof. Dr. Bilal-i HABEŞ GÜMÜŞ
Enstitü Müdürü V.

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10259611
Yazar Adı / Soyadı	MUHAMMED YUSUF PEKMEZCİ
T.C.Kimlik No	20203959752
Telefon	5462049717
E-Posta	myusufpekmezci@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KİMYASAL OLARAK İNDÜKLENMİŞ ENDOMETRİAL YAŞLANMA MODELİ ÜZERİNE ETKİSİ
Tezin Tercümesi	Effect of Mesenchymal Stem Cells on Chemically-Induced Endometrial Senescent Model
Konu	Histoloji ve Embriyoloji = Histology and Embryology
Üniversite	Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	101
Tez Danışmanları	PROF. DR. HAFİZE SEDA VATANSEVER
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	Endometrium, Hücresel Yaşlanma, Kök Hücre

28.06.2019

İmza:.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim

Muhammed Yusuf PEKMEZCİ

İmza

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim

Muhammed Yusuf PEKMEZCİ

İmza

TEŞEKKÜR/ÖNSÖZ

Tüm lisansüstü eğitim ve deneyleri süresince benden hiçbir desteğini esirgemeyen, tecrübelerini daima paylaşan, yol gösterici olarak sonuca kendim ulaşmamı sağlayan ve en önemlisi disiplinli ve planlı çalışmasıyla daima bana örnek bir şahsiyet olacak değerli danışman hocam Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktaran ve her konuda yardımcı olan Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU ve Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER hocalarıma,

Sabır, destek, hayat enerjisi ve bilimsel düşüncesiyle daima yanımda olan değerli eşim Aslı KURDEN PEKMEZCİ'ye,

Çalışma ortamını daha keyifli hale getiren ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Muhammed Yusuf PEKMEZCİ

Manisa/2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR/ÖNSÖZ i
KISALTMALAR ve SİMGELER iv
ŞEKİLLER DİZİNİ v
RESİMLER DİZİNİ vi
TABLOLAR DİZİNİ vii
1.ÖZET 1
2. SUMMARY 2
3. GİRİŞ ve AMAÇ 3
4. GENEL BİLGİLER 4
4.1. İNFERTİLİTE 4
4.2. DİŞİ ÜREME SİSTEMİ 7
4.2.1. Uterus Histolojisi 7
4.2.2. Uterus Embriyolojisi 14
4.3. İMPLANTASYON 16
4.4. HÜCRESEL YAŞLANMA 21
4.5. DENEYSEL HÜCRESEL YAŞLANMA MODELİ 28
4.6. UTERUS YAŞLANMASI VE İNFERTİLİTE 30
4.7. KÖK HÜCRELER 32
5. GEREÇ VE YÖNTEM 36
5.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ 36
5.1.1. RL95-2 Kültürü (CRL-1671) 36

5.1.2. İnsan Mezenkimal Kök Hücre (iMKH) Kültürü 36
5.1.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması 37
5.1.4. Deneysel Yaşlanma Modeli İçin Hidroksiüre Uygulaması 37
5.1.5. Çalışma Grupları 38
5.2. X-GAL BOYAMASI 38
5.3. İMMÜNOSİTOKİMYA BOYAMASI 39
5.4. ELISA ANALİZİ 40
5.5. RNA İZOLASYONU, CDNA SENTEZİ VE QPCR 41
5.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 41
6.BULGULAR 43
6.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI 43
6.2. X-GAL BOYAMASI BULGULARI 49
6.3. İMMÜNOSİTOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI 52
6.3.1. Ki-67 İmmünositokimyasal Dağılımı 52
6.3.2. $P16^{INK4a}$ İmmünositokimyasal Dağılımı 54
6.3.3. Lamin-B1 İmmünositokimyasal Bulguları 56
6.4. Q-RT PCR BULGULARI 59
6.5. ELISA BULGULARI 61
6.5.1. IL-1α ELISA Bulguları 61
6.5.2. IL-6 ELISA Bulguları 63
7. TARTIŞMA 65
8. KAYNAKLAR 71
9. EKLER 87
EK- 1 87
EK-2 88
10. ÖZGEÇMİŞ 89

KISALTMALAR ve SİMGELER

COX : Siklooksijenaz

DAB : Diaminobenzidin

DMEM-F12 : Dulbecco's Modification of Eagles Medium Nutrient Mixture-F12

ELISA : Enzim-bağlı immuno sorbent tahlili

FBS : Sığır serum albümin

FSH : Folikül stimüle edici faktör

HU : Hiroksiüre

IL : İnterlökin

iMKH : İnsan Mezenkimal Kök Hücresi

LH : Luteinizan hormon

LIF : Lökosit inhibitör faktör

MAPK : Mitojen-aktive protein kinaz

q-RT-PCR : Kantitatif reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu

PBS : Fosfatlı tampon solüsyonu

PKOS : Polikistik over sendromu

PG : Prostoglandin

PI3K : Fosfotidil-inositol-3 kinaz

ROS : Reaktif oksijen türleri

SASP : Yaşlanma ilişkili sekretuvar fenotip

SA-ß-Gal : Yaşlanma ilişkili ß-galaktosidaz aktivitesi

TGF-β : Transforming büyüme faktörü-β

TNF-α : Tümör nekroz faktör α

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

X-gal : 5-Bromo-4-kloro-3-indolil β-D-galaktopiranozid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Endometriumun arteriyal kan desteğini gösteren şema. 10
Şekil 2. Paramezonefrik (Müllerian) kanalın farklılaşma aşamaları. 15
Şekil 3. Embriyonun implantasyonunda önemli aşamalar. 19
Şekil 4. Birçok uyaran hücresel yaşlanmayı ve yaşlanma ilişkili sekretuvar fenotipi (SASP) tetikleyebilir. 26
Şekil 5. SASP ve hücresel yaşlanmanın regülasyonu. 28
Şekil 6. Örnek gruplarındaki X-gal pozitif hücre yüzdeleri. 51
Şekil 7. Çalışma gruplarının $p16^{INK4a}$ immunoreaktivitesinin HSCORE değerleri ... 58
Şekil 9. $p16^{INK4a}$ geni ifadesinin q-RT PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi (RPL-41'e göre $2^{-\Delta cT}$ değerleri) 59
Şekil 10. IL-6 geni ifadesinin q-RT PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi 60
Şekil 11. IL-1α proteinin standart eğrisi grafiği. 62
Şekil 12. IL-1α proteinin deney gruplarındaki ifadesi. 62
Şekil 13. IL-6 proteininin Standart eğrisi grafiği. 63
Şekil 14. IL-6 proteinin deney gruplarındaki ifadesi. 64

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: İnsan uterusunun sagital kesiti 9
Resim 2. Uterusun proliferatif, sekretuvar ve menstrüal fazlardaki döngüsüne ait değişiklikler..... 13
Resim 3. RL95-2 hücreleri kültürün 3. (A), 5. (B), 7. (C) ve 10. (D) günlerdeki faz kontrast görüntüleri. Ölçek: 100 µm. 43
Resim 4. RL95-2 hücrelerine uygulanan 200 µM Hidroksiüre uygulamasının 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) günlerdeki faz kontrast görüntüleri. Ölçek: 100 µm..... 44
Resim 5. RL95-2 hücrelerine uygulanan 400 µM Hidroksiüre uygulamasının 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) günlerdeki faz kontrast görüntüleri..... 45
Resim 6. RL95-2 hücrelerine uygulanan 800 µM Hidroksiüre uygulamasının 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) günlerdeki faz kontrast görüntüleri..... 45
Resim 7. İnsan mezenkimal kök hücreleri (iMKH) kültürünün 3. (A), 5. (B), 7. (C), 10. (D) ve 14. (E) günlerdeki faz kontrast görüntüleri..... 46
Resim 8. RL95-2 hücrelerine 7 gün 400 µM Hidroksiüre uygulaması sonrası iMKH ile ko-kültürünün (Grup 3) 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) gün faz kontrast görüntüleri 47
Resim 9. RL95-2 hücrelerine Hidroksiüre uygulanmadan yapılan iMKH ile ko-kültürünün (Grup 4) 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) gün faz kontrast görüntüleri..... 48
Resim 10. Çalışma gruplarında X-gal boyaması. 50
Resim 11. RL95-2 hücrelerinde HU uygulanmayan (A, B), 200 µM (C, D), 400 µM (E, F) ve 800 µM (G, H) uygulanan gruplarda ki-67 immünositokimyasal boyamaları. 52
Resim 12. Grup 1 (A-C), Grup 2 (D-F), Grup 3 (G-H) ve Grup 4 (J-L) RL95-2 hücrelerinde p16INK4a immünositokimyasal dağılımları..... 55
Resim 13. Grup 1 (A-C), Grup 2 (D-F), Grup 3 (G-H) ve Grup 4 (J-L) RL95-2 hücrelerinde Lamin-B1 immünositokimyasal dağılımları. 57

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Örnek gruplarındaki X-gal pozitif hücrelerin yüzdeleri. 51
Tablo 2. Çalışma gruplarında $p16^{Ink4a}$ ve Lamin-B1 immünositokimyasal dağılımlarının HSCORE Analizi sonrası değerleri. 58
Tablo 3. IL-1α proteinin pozitif kontrol olarak kullanılan farklı konsantrasyonlarındaki standartlarının absorbans değerleri. 61
Tablo 4: Deney gruplarının okumalarında IL-1α absorbans değerleri 62
Tablo 5. IL-6 proteinin pozitif kontrol olarak kullanılan farklı konsantrasyonlarındaki standartlarının absorbans değerleri 63
Tablo 6. Deney gruplarının okumalarında IL-6 absorbans değerleri 64

Tezin Başlığı: Mezenkimal Kök Hücrelerin Kimyasal Olarak İndüklenmiş Endometrial Yaşlanma Modeli Üzerine Etkisi

Öğrencinin Adı: Muhammed Yusuf PEKMEZCİ

Danışmanı: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

1.ÖZET

Amaç: Bu çalışmada insan endometrial epitelyal hücre hattında (RL95-2) hidroksiüre (HU) kullanılarak oluşturulmuş kimyasal yaşlanma modeli ile insan mezenkimal kök hücrelerinin (iMKH) ko-kültürü sonrasında, endometrial hücreler üzerindeki yaşlanma belirteçlerindeki değişimin analizi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma dört grupta yapılmıştır. (i)Kontrol grubu RL95-2, (ii)HU uygulaması ile yaşlandırılan RL95-2, (iii) HU ile yaşlandırılan ve sonrasında iMKH ile ko-kültür edilen RL95-2, (iv)yaşlandırma olmaksızın iMKH ile ko-kültür edilen RL95-2 hücreleri. Kültür süreleri sonunda hücreler X-gal boyaması, $p16^{Ink4a}$ ve Lamin-B1 antikorlarıyla immünositokimya boyaması yapılmıştır. qRT-PCR analiziyle $p16^{Ink4a}$ ve IL-6 mRNA ifade seviyeleri, hücre kültür vasatlarında IL-1α ve IL-6 ELISA analizi ile protein seviyeleri belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışma sonuçlarına göre; HU ile yaşlandırılan RL95-2 hücrelerinde kontrole kıyasla $p16^{Ink4a}$ ve IL1α ve IL-6 seviyeleri artmış, Lamin-B1 seviyesi azalmış ve X-gal pozitif hücre oranı yükselmiştir. HU sonrası iMKH ile ko-kültür yapılan grupta yaşlandırma grubuna kıyasla ise $p16^{Ink4a}$, IL1α ve IL-6 seviyeleri azalmış, Lamin-B1 seviyesi artmış ve X-gal pozitif hücre oranı azalmıştır.

Sonuç ve Yorum: Bu bulgular doğrultusunda mezenkimal kök hücrelerin endometrial yaşlanma modeli üzerinde, yaşlanma belirteçlerinde azalmaya sebep olurken, aynı zamanda yaşlanmaya bağlı sekretuvar fenotipi de baskılayarak inflamasyonu da engelleyici etkiler gösterdiği söylenebilir. Daha ileri çalışmalar sonrasında ileri yaş infertilite sebeplerinden birisi olan uterus yaşlanması ve buna bağlı olarak gelişen implantasyon problemlerinde yeni hücresel tedavi yaklaşımları geliştirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Endometrium, Hücresel Yaşlanma, Kök Hücre

Title: Effect of Mesenchymal Stem Cells on Chemically-Induced Endometrial Senescent Model

Student's Name: Muhammed Yusuf PEKMEZCİ

Supervisor: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Department: Histology and Embryology

2. SUMMARY

Aim: In this study, it was aimed to evaluate the change of the senescence markers of chemically induced senescent model of human endometrial epithelial cell line (RL95-2) after co-culture with human mesenchymal stem cells (hMSC).

Material and Methods: The study was performed at four groups. (i) Control group RL95-2, (ii) HU-induced senesced group RL95-2, (iii) HU-induced senesced before co-cultured with hMSC group RL95-2 and RL95-2 cells that were not senesced but co-cultured with hMSC. After culture period, the cells were stained with X-gal stain for senescence associated ß-galactosidase activity and immunocytochemistry stain were assayed with $p16^{Ink4a}$ and Lamin-B1 antibodies. qRT-PCR was conducted for IL1α and IL-6 -6 expressions. Finally, IL-1α and IL-6 levels on the cell culture media were evaluated by using ELISA.

Results: According to findings of the study, levels of $p16^{Ink4a}$, IL1α and IL-6 were upregulated while Lamin-B1 was downregulated and X-gal positive cell ratio was increased in comparison to control group. However, in the group that were co-cultured with hMSC after HU treatment, levels of $p16^{Ink4a}$, IL1α and IL-6 were downregulated while Lamin-B1 was upregulated and X-gal positive cell ratio was decreased in comparison to senescent group

Conclusion: It can be stated with these findings that mesenchymal stem cells caused decrease of senescence markers on endometrial senescence model. Moreover, they suppressed senescence associated secretory phenotype and showed anti-inflammatory effects. With further studies, new cellular therapies might be developed for the implantation problems which generally is the result of uterine senescence.

Keywords: Endometrium, Senescence, Stem Cell

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Hücresel yaşlanma, hücre döngüsünün kalıcı olarak arreste alınarak hücrenin proliferasyonu durdurmasıdır (Campisi ve di Fagagna 2007). Ayrıca yaşlanmaya bağlı olarak gelişen sekretuvar fenotip (SASP), doğrudan veya dolaylı olarak inflamasyonu teşvik etmektedir (Coppé ve ark. 2010, Campisi ve ark. 2011) İlerleyen yaşa bağlı artan implantasyon başarısızlıklarının sebeplerinden birisi de endometrial yaşlanma olabileceğinden dolayı endometrial hücrelerdeki hücre yaşlanmasını önleyici tedaviler önem arz etmektedir.

$p16^{Ink4a}$, siklin-bağımlı kinaz 4/6 (CDK4/6) inhibitörüdür hücrenin G1 fazından S fazına geçişini baskılayarak proliferasyonu engeller. Yaşlanan hücrelerde bu aşamanın baskılanmasından dolayı $p16^{Ink4a}$ ifade seviyeleri yükselirken alt yolakta bulunan Lamin-B1 seviyesi azalır (Collins ve Sedivy 2003, Ohtani ve ark. 2004). Hidroksiüre ribonükleotid redüktaz enzimi inhibisyonu aracılığıyla DNA hasarı aracılı hücresel yaşlanmayı tetikler (Krakoff ve ark. 1968).

Çalışmanın amacı; yaşlanmış endometrial hücreler ile kök hücreleri ko-kültür edildiğinde, endometrial hücrelerdeki yaşlanma etkilerinin azalıp azalmayacağını histolojik ve moleküler teknikler ile tespit etmektir. Bunun için hidroksiüre ile kimyasal olarak yaşlanma modeli oluşturulmuş endometrial hücre hatları, mezenkimal kök hücreler ile birlikte kültür edilmiştir. Daha sonra hücrelerin yaşlanma belirteçleri immünositokimya, ELISA ve q-PCR yöntemleri ile tayin edilerek ko-kültür yapılan ve yapılmayan hücreler arasında kıyaslanmıştır. Bu çalışma kapsamında endometrial yaşlanma ile mezenkimal kök hücre ilişkisinin değerlendirilmesi sonucu çıktıların klinikle ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Bununla beraber in vitro elde edilen sonuçların in vivo değerlendirilebilmesi amacıyla yeni proje geliştirilebilmesi için olanak sağlayabilir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İNFERTİLİTE

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tanımlamalarına göre; infertilite 12 ay veya daha fazla süreli, herhangi bir korunma yöntemi kullanılmayan ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen klinik gebelikle sonuçlanmamasıyla karakterize bir üreme sistemi hastalığıdır ve çiftlerin %15'inde görülür (Kolettis 2003, Zegers-Hochschild ve ark. 2009). İnfertilitenin değerlendirilmesi genellikle 1 yıllık normal sürecin tamamlanmasından sonra başlanmasına rağmen, bu süreç bir çok klinikte 35 yaş üstü kadınlarda 6 ay olarak kısaltılmaktadır (Medicine 2006). WHO'nun geliştirdiği protokollere dayanan bir çalışmanın sonuçlarına göre; gelişmiş ülkelerde infertilite vakalarının %37'sinin kadın, %8'inin erkek kaynaklı olduğunu ve çiftlerden %35'inin hem erkek hem de kadın kaynaklı olduğunu tespit edilmiştir (Barbieri ve Strauss 2014).

Erkek infertilitesinin sebepleri hormonal problemler, sperm anomalilikleri, testise ait problemler, erkek boşaltım kanallarına ait problemler, sebebi açıklanamayan problemler olarak sıralanabilir. Sperme ait problemler; sperm azlığı, yokluğu veya motilitesindeki anormallliklerden kaynaklıdır. Sperm üretimi ve fonksiyonundaki bozuklukların etiyolojisi farklı konjenital veya kazanılmış faktörlerden kaynaklanıp pre-testiküler, post-testiküler veya doğrudan testiküler seviyede olabilir (Krausz 2011). Konjenital faktörlerden bazıları anorşiya, kriptorşidizm (inmemiş testis), vas deferensin konjenital yokluğu, Kleinfelter sendromu, Kallman sendromu gibi genetik anomalilerdir. Sonradan edinilmiş faktörlerden bazıları ise testis travması, testiküler torsiyon, post-inflamatuvar formlar, sitotoksik ilaçlar veya radyasyon gibi eksojen faktörler, varikosel, erektil disfonksiyonlar veya bazı endokrin faktörlerdir (Krausz 2011). Semen analizi erkek faktörünün teşhisi ve tanımlaması için önemlidir. WHO tanımlamalarına göre patolojik semen kalitesi sınıflandırılması şu şekildedir. 1-

Oligozoospermi; sperm konsantrasyonunun $15x10^6$/ml den az, toplam sperm sayısının $39x10^6$'den az olması. 2-Astenozoospermi; ileriye yönelik motil spermatozoanın %32'den az olması. 3- Teratozoospermi; morfolojik olarak normal spermin oranının %4'ten az olması. 4-Oligo-asteno-teratozoospermi; her üç parametrenin birlikte bulunması. 5- Azoospermi; ejakülattan hiç sperm olmaması. 6- Kriptozoospermi; preparatta sperm olmayıp santrifüj pelletinde sperm bulunması. 7- Aspermi; ejakülat olmaması. 8-Lökospermi; ejakülatta $1x10^6$/ml'den fazla lökosit bulunması (Organization 2010).

Kadın infertilitesinin sebepleri hormonal hastalıklar, ovulatuvar hastalıklar, kromozom anomalileri, tübal hastalıklar, oosit faktörü, endometrial problemler veya açıklanamayan faktörler olarak sıralanabilir.

Hormonal sebepler hipotalamus-hipofiz bezlerinden, ovaryan faktörlerden salgılanan hormonal değişiklikler sonucunda oosit üretimini veya endometrial hazırlık sürecini etkileyen nedenle oluşabilir (Unuane ve ark. 2011). Cinsiyet kromozomu anomalileri Turner sendromu gibi gonadal gelişim bozukluklarını içerir.

Prematüre ovaryan yetmezlikte, ovaryumda primordiyal foliküller mevcuttur ancak folikül uyarıcı hormon (FSH) duyarsızlığından olgunlaşmayı tamamlayamazlar. Anovulatuvar infertilite hastalıklarından en yaygını polikistik over sendromudur (PKOS) (Healy ve ark. 1994). PKOS hastalarında artan miktarlarda androjenik hormonlar salgılanır ve ovaryan siklusu bozarak ovulasyon engellenir (Group 2004).

İnfertilitenin tübal sebepleri çoğunlukla pelvik inflamatuvar hastalıkları geçmişi olan kadınlarda görülür. Gonokok, klamidya gibi cinsel yolla bulaşan mikroorganizmalar tübal infertiliteye sebep olabilir. Tübal ve peritoneal faktörler, oosit gelişimi normal olsa bile oositin sperm ile fertilizasyonunda veya uterusa iletilmesinde sorun çıkarabilir (Mårdh 2004).

Kadın infertilisinde endometrium kaynaklı problemlerde en sık rastlanan hastalıklardan birisi endometriyozistir. Menstrüasyonun retrograd olarak gerçekleştiği endometriyoziste, ileri seviye vakalar infertilite ile sonuçlanabilir. Sebebi tam olarak belli olmayan bu hastalıkta, ters yöne ilerleyen endometrium dokusu ovaryumlara ulaşarak ovulasyonu veya oositin tuba uterinaya geçişini engelleyebilir.

Kadın infertilitesinin önemli sebeplerinden birisi de yaştır. Fekundite 35 yaş üzerinde önemli derecede azalır, 40 yaş üzerinde bu oran çok düşüktür. Belirtilen yaş grubundaki kadınlardaki gebelik ihtimalini azaltan başlıca nedenler, oositlerdeki anöploidi oranının artması, over rezervinin azalması, yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen oosit ve embriyo kalitesinin düşmesi ve uterin reseptivitenin azalmasıdır (Menken ve ark. 1986, CMagarelli ve ark. 1996).

Semen analizi, postkoital test, ovulasyon değerlendirmesi ve histerosilpingogram gibi standart infertilite değerlendirmeleri sonuçları normal çıkan çiftlere açıklanamayan infertilite tanısı konur (Guzick ve ark. 1998).

İnfertil kadınlardaki implantasyon problemleri endometrium kaynaklı olabileceği gibi, embriyo reseptivitesi için gerekli uyarılarının sağlanamaması ile gerçekleşebilir. Başarılı bir implantasyon blastokistten gelen sinyallere cevap veren reseptif bir endometrium gerektirir. İmplantasyon süreci 3 aşamada incelenebilir; apozisyon, adhezyon, invazyon. İmplantasyonun ilk aşaması olan apozisyon blastokistin endometrium yüzey epiteline tutunmadan önce aldığı pozisyondur. Blastokistin yönü iç hücre kitlesi lüminel epitele bakacak şekilde döner ve yüzeydeki trofoblastlar aracılığıyla ikinci aşama olan adhezyon gerçekleşir. Endometrium yüzey epiteli ve trofoblastlar arasındaki başlangıç teması, yüzey epitel hücrelerinin apikal plazma membranları ile trofoblastların plazma membranlarının yakınlaşması ile olur. Membran altındaki özgün filamentöz ağ, bu hücreler arasındaki hücre-hücre bağlantıları ile durağan halde desteklenir. En son aşama olan invazyon aşaması yüzey epitel hücreleri ile sinsityotrofoblastların uzantıları arasındaki penetrasyonu içerir. Bu durum, komşu epitel hücreleri arasındaki bağlantıların kaybına ve trofoblastlar ile epitel hücreleri arasında bağlantıların oluşmasına yol açar. Böylece, trofoblastlar kendilerini epitel hücreleri arasına sokmuş olur ve daha sonra yüzey epiteli altında yer alan bazal membrana doğru penetre olurlar (Enders ve Schlafke 1969).

Daha sonra blastokist stromayı işgal edecek ve plasentayı oluşturarak gelişimini sürdürecektir. Süreçte rol oynayan sitokinler, hormonlar, büyüme faktörleri, ekstra-selüler matriks proteinleri, adhezyon molekülleri gibi birçok yardımcı oyuncunun görevlerindeki bir aksaklık, miktarlarında anormal azalma veya artma ve mutasyonlar sonucu implantasyon başarısız olabilir (Paria ve ark. 2002, Sharkey ve Smith 2003, Fatemi ve Popovic-Todorovic 2013).

İnfertilitenin değerlendirilmesinde semen analizi, histerosalpingogram, ovulasyon analizi, ovaryan rezerv testi ve laparoskobi gibi teknikler kullanılır (Medicine 2006, Agarwal ve ark. 2015). Standart infertilite testlerinin değerlendirmesinde sonuçlar normal çıkmasına rağmen gebelik gerçekleşmemesi durumuna açıklanamayan infertilite denir (Taylor ve Collins 1992).

4.2. DİŞİ ÜREME SİSTEMİ

Dişi üreme sistemi iç genital organlar ve dış genital yapılar olmak üzere anatomik olarak 2 bölümde incelenir. İç genital organlar pelviste bulunur ve dış genital yapılar vulva olarak bilinen perineumun ön kısmında bulunur. İç genital organlar ovaryumlar, tuba uterinalar, uterus ve vajinadan oluşur. Pelvik boşlukta ve perineumda bulunurlar. Dış genital yapılar mons pubis, labia majora, labia minora, klitoris, vestibül ve vajinanın ağzı ile hymen ve dış üretral orifisten oluşur (Pawlina ve Ross 2018).

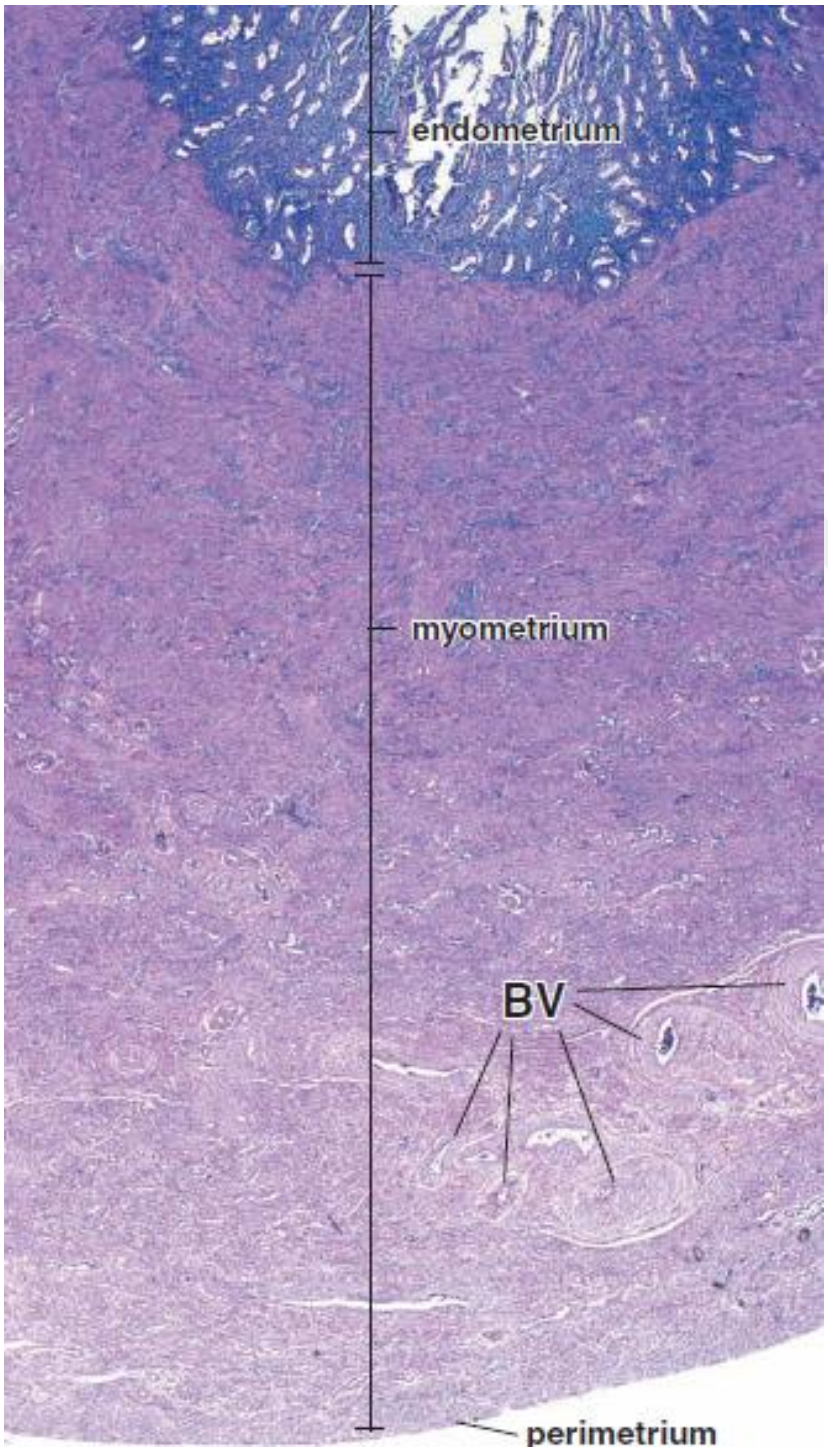
4.2.1. Uterus Histolojisi

Menstrual siklusun gerçekleştiği, fertilizasyon sonrasında blastokisitin yerleşme yeri ve devam eden tüm embriyonik ve fetal gelişimin gerçekleştiği yerdir. İnsan uterusu içi boş, armut benzeri bir organdır. Pelviste idrar kesesi ve rektumun arasında yer alır. Hiç doğum yapmamış bir kadında 30-40 gram ağırlığında, 7,5 cm boyunda ve üst kısmında 5 cm, alt kısmında 2,5 cm kalınlığındadır. Düzleşmiş olan lümeni tuba uterina ile birleşiktir ve aksi yönde vajina ile devam eder (Pawlina ve Ross 2018).

Anatomik olarak uterus iki bölgeden oluşur. Gövde geniş üst kısmıdır. Ön kısmı neredeyse düz iken arka kısımda içbükeydir. Uterusun üst kısmında tuba uterinaya devam eden yuvarlak kısmı fundus adını alır. İstmus ile uterus gövdesinden ayrılan, alt kısımdaki yapı servikstir. Serviksin lümeninde –servikal kanal- her bir uçta daralmış bir girişi vardır. İç orifis uterin boşluk ile, dış orifis vajina ile iletişim halindedir (Pawlina ve Ross 2018).

Histolojik olarak uterus duvarı üç tabakan oluşur (Resim 1). Endometrium uterusun mukozasıdır. Miyometrium en kalın, ortadaki müsküler tabakadır. Düz kas

lifleri uterusa bağlı ligamentlere uzanır. Perimetrium, uterusun dış seröz veya visseral peritonel kılıfıdır. Pelvik ve abdominal periton ile devam eder ve ince bir tabaka gevşek bağ doku ve mezotelden oluşur. Mezotelin altında genellikle bir kat elastik doku mevcuttur. Perimetrium uterusun posterior yüzeyinin tamamını ancak anteriorda bir kısmını kapatır. Anteriorun kalan kısmı bağ doku ve adventisyadır (Pawlina ve Ross 2018).



Resim 1: İnsan uterusunun sagital kesiti

Uterin boşluğun en iç tabakası olan endometrium, ortada bulunan düz kas tabakası miyometrium ve uterusun en dışında kalan ve organın çevresini saran ince tabaka perimetriyumdur. Miyometriumun derin tabakaları daha çok kan damarına (BV) sahiptir. (Hematoksilen & Eosin boyaması) (Pawlina ve Ross 2018).

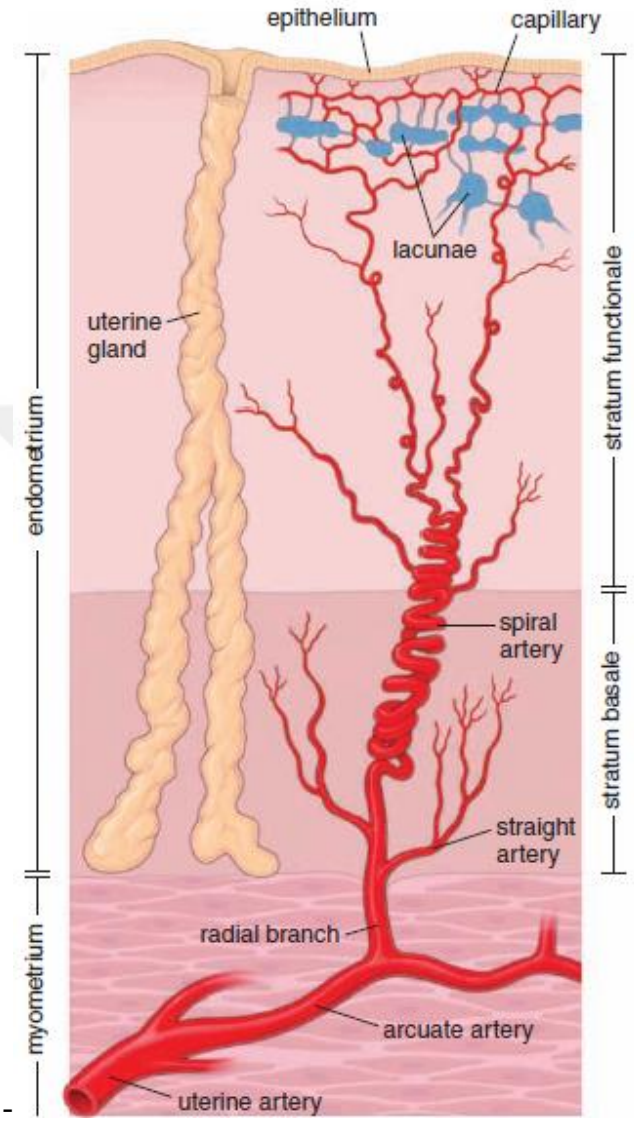
Reproduktif yaşamı boyunca endometrium yapı ve işlev bakımından farklılık gösteren iki tabakadan oluşur: Stratum fonksiyonale ve stratum bazalis (Şekil 1). Stratum fonksiyonale menstrüal döngü boyunca prolifere olan ve sonrasında dejenere olan tabakadır. Siklusun fazları süresince stratum bazale 1 ile 6 mm arası kalınlıkta değişiklik gösterir. En yüzeydeki tabakası, tek katlı prizmatik epitel ile örtülüdür ve ince bir bazal membran üzerindedir. Epitel kinosilyalı ve sekretuvar hücrelerin karışımından oluşur. Kinosilyalı hücreler merkezi yuvarlak bir çekirdeğe sahiptir ve apikal yüzlerindeki kinosilyalar servikse doğru itme hareketi sergiler. Sekretuvar hücrelerin çekirdekleri bazaldedir ve sitoplazmaları sekretuvar granüller barındırır (Zhang 1999).

Uterin bezler dar bir lümene sahip düz, tübüler bezlerdir. Yüzey epiteline benzerlik gösteren tek katlı prizmatik epitel ile döşenmişlerdir, yalnızca kinosilyalı hücreler daha azdır (Zhang 1999).

Stratum fonksiyonalenin stroması düzensiz, yıldızsı şekilli ve yuvarlak çekirdeğe sahip çok sayıda stromal hücre içerir. Rutin boyamalarda görülmeyen retiküler ve kollajen lifler ve amorf temel maddeden zengin bir yapı oluştururlar. Stromal hücreler mezenkimal hücrelere benzerler ve gebelikte desidual hücrelere farklanırlar. Stratum bazale stroması aynı zamanda venüller, kapiller ve spiral arterler içerir (Zhang 1999).

Endometriumun stratum bazale tabakasında dallanma gösteren birçok uterin bez vardır. Tek katlı prizmatik epitel ile örtülü bu bezlerin hücrelerinin çekirdekleri bazalde ve yuvarlaktır. Stratum bazale; uterin bezleri ve kan damarlarını saran sıkı bir halka yapısında düzenlenmiş çok sayıda stromal hücre ve spiral arterleri içermesiyle karakterizedir (Şekil 1). Menstrüal siklus süresince stratum bazale dökülmez, menstrüal fazdan sonra geriye kalan stromal hücreler stratum fonksiyonaleyi yeniden oluşturmak için hızla prolifere olurlar. Çok sayıda mitoz bölünmeden sonra, uterin bezlerin epitel hücreleri yeni bez yapısıyla endometriumun yüzeyini yeniden oluştururlar (Zhang 1999).

Endometrium her ay uterusu embriyonun impantasyonu için hazırlayacak siklik döngüye sahiptir. Bu döngüye menstruasyon siklusu adı verilir (Pawlina ve Ross 2018).



Şekil 1. Endometriumun arteriyal kan desteğini gösteren şema. Endometriumun stratum bazale ve stratum fonksiyonale tabakaları unterin arterin dalları tarafından beslenirler. Bu iki tabakanın kesişiminde yer alan spiral arterler menstrüal döngüyle birlikte östrojen ve progesteron etkisi altında dejenere ve rejenere olurlar (Pawlina ve Ross 2018).

Endometriumun menstrüal siklusta geçirdiği evreler proliferatif evre, sekretuvar evre ve menstrüal evre olmak üzere 3 kısımda incelenir (Resim 2). Menstrüal siklus endometriumum stratum fonksiyonale tabakasında devam eden gelişimsel aşamalardır. Hipofiz bezinin pars distalis kısmından sentezlenen gonadotropinlerin regüle ettiği ovaryumdan sentezlenen steroidlerin kontrolü altındadır. Endometriumun

fonksiyonel ve morfolojik değişimlerden geçtiği bu döngü normalde 28 gün sürer (Pawlina ve Ross 2018).

Proliferatif evre foliküler matürasyon ile eş zamanlı olur ve östrojenin kontrolü altındadır (Resim 2a). Sekretuvar evre korpus lüteumun fonksiyonel aktivitesiyle aynı zamana denk gelir ve birincil olarak sentezlenen progesteronun etkisindedir. Menstrüal faz ise ovaryumdaki hormon üretiminin azaldığı ve korpus lüteumun dejenere olduğu zamanda gerçekleşir. Evreler devam eden süreçler halindedir, bir evreden diğerine keskin bir geçiş yoktur (Pawlina ve Ross 2018).

Endometriumun proliferatif evresi östrojen ile regüle edilir. Menstrüal fazın sonunda endometrium ince bir bant halinde bağ doku ve spiral arterlerin alt kısımları ve uterin bezleri içeren 1 mm kalınlığında stratum bazaleden ibarettir. Atılan tabaka ise buranın üzerinde yer alan stratum fonksiyonaledir. Östrojenlerin etkisi altında proliferatif faz bu koşullar altında başlar. Stratum bazaledeki stromal, endotelyal ve epitelyal hücreler hızla çoğalır ve kendi içlerinde değişikliğe giderler. Bazal kısımdaki bezlerin epitelyal hücreleri yeniden bezleri oluşturur ve stratum fonksiyonale tabakasını yeniden oluşturmak üzere göç ederler. Bu süreçte epitel, stroma ve bez yapıları rejenerasyonu sağlanarak tamamlanır. (Pawlina ve Ross 2018).

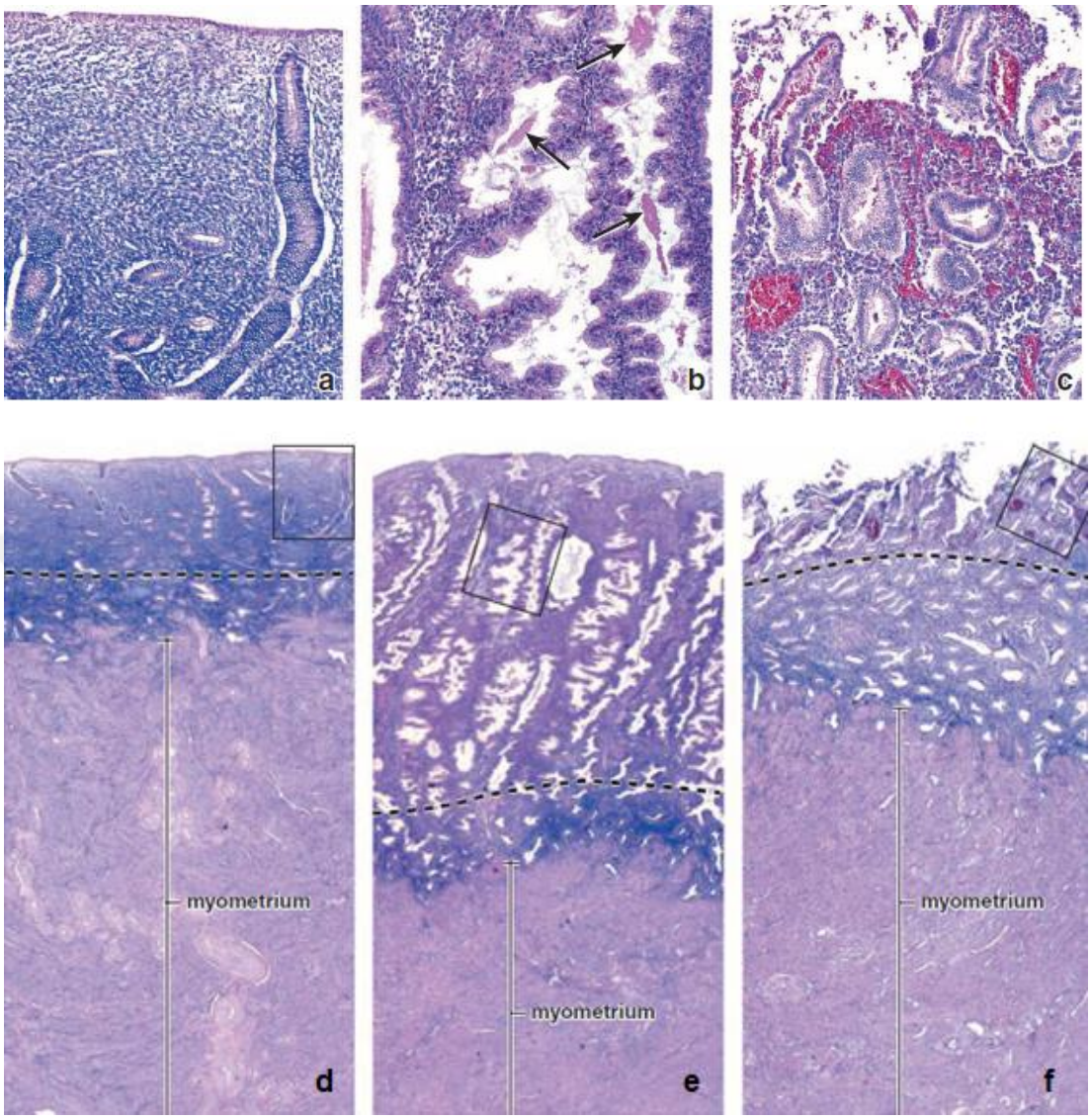
Proliferatif evre 28 günlük döngünün yaklaşık 14'üncü gününe denk gelen ovülasyondan 1 gün sonrasına kadar devam eder. Bu evrenin sonunda endometrium yaklaşık 3 mm kalınlığa ulaşmış olur. Bezlerin dar lümenleri vardır ve hafif dalgalı bir görünüme sahiptirler. Epitelyal hücrelerin bazallerinde glikojen birikimi gözlenir (Pawlina ve Ross 2018).

Sekretuvar evre progesteron hormonunun etkisindedir. Ovülasyondan 1 ya da 2 gün sonra başlayan bu evrede stratum fonksiyonale tabakasında önemli değişiklikler meydana gelir (Resim 2b). Endometrium ödematoz bir yapı alır ve 5-6 mm kalınlığa ulaşır. Bezler genişler ve burgulu bir yapı alır, biriken salgılardan ötürü lümenleri kesecikli görünüme kavuşur. Bez epitel tarafından salgılanan mukoid sıvı, implantasyon gerçekleşirse gerekeceği için besince – özellikle glikojence- zengindir. Bu aşamada mitoz nadirdir. Görülen büyüme epitelyal hücrelerin hipertrofisinden, damarlanmadaki artıştan ve endometriumun ödemlenmesinden kaynaklıdır. Spiral arterler uzar ve daha sarmallı hal alırlar. Neredeyse endometriumun yüzeyine kadar uzanırlar (Pawlina ve Ross 2018).

Östrojen ve progesteronun etkileri stromal hücrelerin desidual hücrelere dönüşümüne olanak sağlar ancak dönüşüm için uyarı embriyonun implantasyonudur. Bu dönüşüm sonucunda geniş, soluk ve glikojence zengin hücreler oluşur. Bu hücrelerin görevi tam olarak açıklanmamış olsa da embriyonun beslenmesi için uygun bir ortam sağladıkları ve gebeliğin sonunda plasentanın uterin duvarından ayrılması için özelleşmiş bir tabaka oluşturdukları açıktır (Pawlina ve Ross 2018).

Menstrüal evre ovaryan östrojen ve progesteronun sekresyonun azalmasıyla başlar. Korpus lüteum fertilizasyon olmazsa yaklaşık 10 gün boyunca aktif olarak hormon sentezler. Hormon seviyeleri hızlı bir şekilde düşünce stratum fonksiyonaledeki kan desteğinde değişiklikler olur. Başlangıçta, birkaç saat süren spiral arter duvarlarının periyodik kasılmaları stratum fonksiyonalenin iskemik olmasına sebep olur. Endometrial bezlerde salgılama azalır ve stroma ödematoz özelliği azalır ve böylelikle endometriumun kalınlığı azalır (Resim 2c). Yaklaşık 2 gün sonra arteriyal kasılmaların artan periyotlarıyla birlikte, yalnızca kısa sürelerde kan akışına izin verilir ve epitel yüzeyin aşınmasına ve kan damarlarının kopmasına sebep olur. Spiral arterler kapandığında kan stratum bazaleye akar ancak stratum fonksiyonaleye ulaşmaz. Kan, üterin sıvı ve stratum fonksiyonalenin stromal ve epitelyal hücreleri vajinadan atılır (Pawlina ve Ross 2018).

Endometriumda bulunan kan damarları da menstrüal siklus boyunca prolifere ve dejenere olurlar (Şekil 1). Endometriumun kendine özgü bir damar sistemi vardır. Uterin arter miyometriumda anastomozlaşan 6-10 arası arkuat artere dallanır. Bu arterlerin dalları, radyal arterler endometriumun bazaline girerler ve burada endometriumun bu bölgesini destekleyecek olan küçük düz arterleri oluştururlar. Radyal arterin ana dalı yukarı doğru devam eder ve yoğun bir sarmal oluşturarak spiral arter ismini alır. Spiral arterler zengin bir kapiller yatağı beslemek için anastomozlaşan çok sayıda arteriyole dallanır. Düz arterler ve spiral arterlerin proksimal kısımları menstrüal siklus boyunca değişmezler. Spiral arterlerin distal kısımları östrojen ve progresteron etkisiyle her menstrüasyon döngüsünde prolifere ve dejenere olurlar (Pawlina ve Ross 2018).



Resim 2. Uterusun proliferatif, sekretuvar ve menstrüal fazlardaki döngüsüne ait değişiklikler.
a, Endometriumun proliferatif fazında st. fonksiyonale fazlaca kalınlaşır. b. Endometriumun sekretuvar fazında bezler spiral şekilli olup endometrium daha da kalınlaşmıştır. St. bazalede morfolojik olarak daha az değişim vardır. Mukus sekresyonunu işaretlenmiştir (oklar) c. Menstrüal fazdaki endometriumda ise st. fonksiyonalenin dejenere olup atıldığı görüntüdür ve kanama odakları ile st. fonksiyonalenin nekroza gittiği görülmektedir. Hematoksilen & Eosin boyaması. a, b, c resimleri sırasıyla d, e, f (kesik çizgiler st. bazale sınırını gösterir.) resimlerindeki kutucukların daha yüksek büyütmedeki fotoğrafıdır. (a, b, c: 15X, d, e, f: 60X) (Pawlina ve Ross 2018).

Miyometrium uterus duvarının en kalın tabakasıdır (Resim 1). Stratum subvaskülare, stratum vaskülare, stratum supravaskülare ve stratum subseroza olmak üzere 4 tabakadan oluşur. Endometriumun hemen dışında submukozal tabaka bulunur. Ortadaki en kalın tabaka iç içe geçmiş ve dairesel veya spiral olarak döşeli düz kas

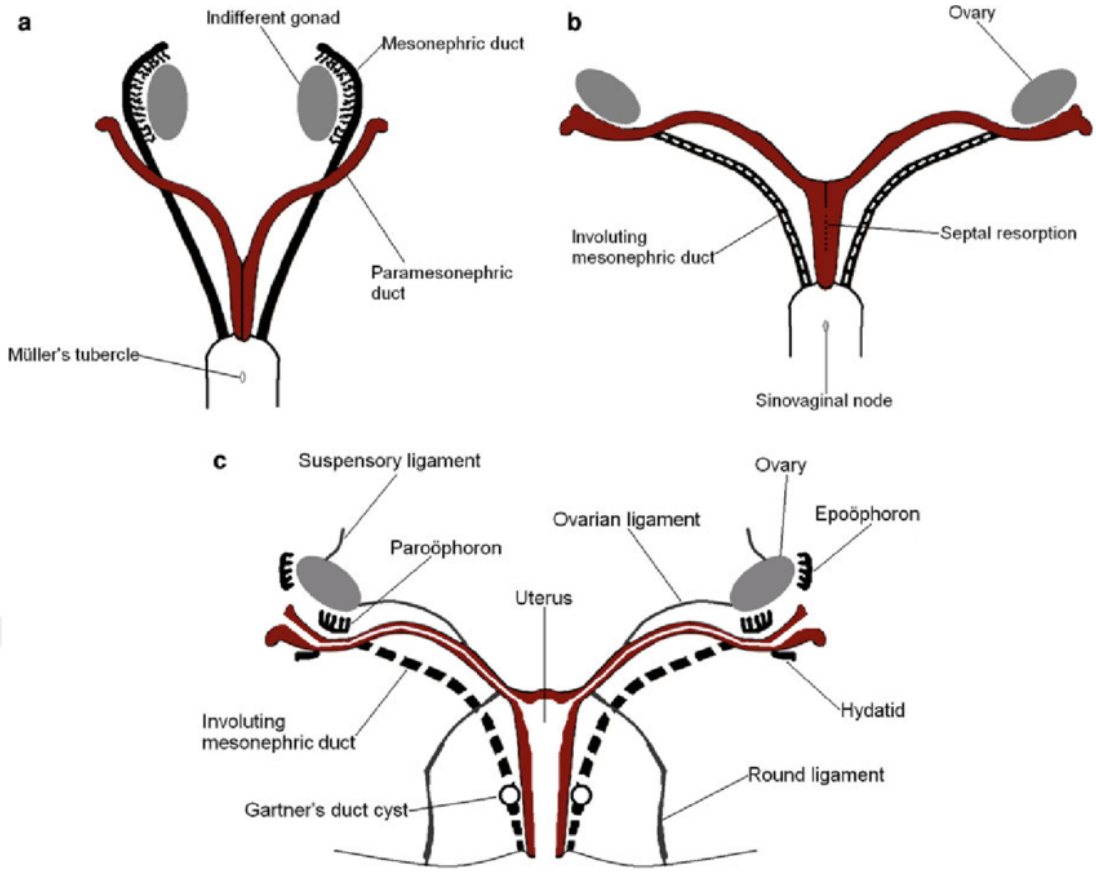
liflerinden oluşan vasküler tabakadır ve bol miktarda venöz pleksuslar ve lenfatik damarlar içerir. Vasküler tabakanın dışında supravasküler tabaka bulunur ve ince düz kas lifinden oluşur. Miyometriumun subvaskülare ve supravaskülare tabakalarında düz kaslar büyük oranda uterus lümen eksenin paralel seyrederler. Perimetriyuma bitişik olan tabaka ise subserozal tabakadır (Kühnel 2003).

Perimetriyum uterusun en dış seröz tabakasıdır (Resim 1). Süperfisiyal mezotel ve altındaki ince bir tabaka gevşek bağ dokudan oluşur. Uterusun posteriyor kısmı tamamen perimetriyum ile kaplıyken anteriyor kısmının bir kısmı perimetriyum tarafından sarılır, gerisi adventisyadan oluşur (Kühnel 2003).

4.2.2. Uterus Embriyolojisi

Embriyonik süreçte gonadlar dişi yönünde gelişmiş ise özellikle testis tarafından sentezlenen testesteron ve Müllerian inhibitör madde yokluğu ile mezonefrik kanal geriler, paramezonefrik (müllerian) kanal gelişimine devam eder ve bu yapılar dişi genital sisteminin ana yapılarını oluşturur. Dişi cinsiyet gelişimi overlerin veya hormonların varlığına bağlı değildir. Daha sonra maternal overler ve plasenta tarafından üretilen östrojenler tuba uterinaların, uterusun ve vajinanın üst kısmının gelişimini uyarır (Carlson 2012).

Paramezonefrik kanalın kraniyal kısımları tuba uterinaları oluşturur, kölemik boşluktaki kraniyal açıklılıklar fimbriayı oluşturmak üzere kalırlar (Şekil 2). Kaudal sonlarına doğru pramezonefrik kanal orta hatta doğru yakınlaşmaya başlar ve mezonefrik kanalları ventralden keser. Bu kesişme ve orta hattaki nihai birleşme tüm ürogenital yükseltinin medial değişimiyle gerçekleşir. Paramezonefrik kanalların kaudal, birleşmiş kısımlarından uterovajinal primordiyum farklılaşır. Bu yapı uterusu ve vajinanın süperiyor kısmını oluşturacak olan öncül yapıdır. Paramezonefrik kanalın orta hatta birleştiği bölge son olarak uterusu oluşturur ve yükselti dokusu paramezonefrik kanal boyu devam ederek uterusun kalın ligamentini oluşturur. Endometrial stroma ve miyometrium komşu splanik mezenkimden gelişmektedir. Uterusun uzunluğu boyunca yanlardan, kalın ligamentin tabakaları arasında mezenkim prolifere olur ve diferensiye olarak gevşek bağ dokusu ve düz kastan oluşan, hücresel bir doku olan parametriyumu oluşturur (Carlson 2012).



Şekil 2. Paramezonefrik (Müllerian) kanalın farklılaşma aşamaları. **a**. Mezonefrik ve paramezonefrik kanalların birlikte olduğu aşama. SRY proteini yokluğunda dişi iç genital gelişimi devam etmekte. **b**. 7. haftada paramezonefrik kanal farklılaşırken mezonefrik kanal içe kıvrılır. Paramezonefrik kanalın medial kısımları birleşerek uterusu ve vajinanın üst kısımlarını oluştururken, lateral kısımlartuba uterinaları oluştururlar. Müllerian organogenez 5. ayda uterin septal formasyonuyla tamamlanır. **c**. 5. ayda dişi iç genitaller (Al Qaisi 2010).

Paramezonefrik kanalın oluşumunun erken safhaları Wnt sinyaline bağlıdır. Wnt-4 yokluğunda, paramezonefrik kanal oluşumu başarısızlığa uğrar. Gelişmekte olan ekstremitelerin dorsoventral ekseninin oluşunda da rol oynayan Wnt-7a, paramezonefrik kanalın tamamının epitelinden sentezlenir ve normal gelişim için gereklidir. Gelişimin ilerleyen kısımlarında Wnt-7a sinyalinin sadece uterin epitelinde olduğu görülür. Wnt-7a, dişi üreme sistemine yayılmış bir dizi Hox geninin ifadesinin devamlılığını sağladığı düşünülmektedir (Carlson 2012). Hoxa-9 tuba uterinadan, Hoxa-10 uterustan, Hoxa-11 uterus ve serviksten, Hoxa-12 vajinanın üst kısımlarından eksprese edilir (Carlson 2012).

Paramezonefrik kanal gelişimde görevli bir diğer transkripsiyon faktörü Pax2 ve Pax8 genleridir. Bu iki gen birlikte etki göstererek paramezonefrik kanalın gelişimini

ve devam etmesini destekler. Buna ilaveten Lim-1 geni de genital kanalların gelişiminin başlangıcında görevlidir. Lim-1 paramezonefrik kanal epiteli, uterus ve vajinanın üst kısmının gelişimi için gereklidir (Kobayashi ve Behringer 2003). Ara mezodermin epitelyal bileşeninden sentezlenen ve paramezonefrik kanal gelişiminde rol oynayan diğer bir gen ise Emx2 genidir. Emx2 ifadesi, paramezonefrik kanal gelişiminin yalnızca erken aşamalarında tespit edilmiştir (Yin ve Ma 2005).

4.3. İMPLANTASYON

İmplantasyon embriyonun hayatının erken döneminde başlayan ve anne ile embriyo arasında gerçekleşen birçok mekanizmanın tetiklendiği ve/veya inhibe edildiği bir süreçtir (Emiliani ve ark. 2005). Fertilizasyondan yaklaşık 6-7 gün sonra, embriyo endometriumun epitel örtüsüne kuvvetli bir tutunma gösterir. Bundan kısa bir süre sonra endometrial stromaya giriş yapar. Penetrasyonun gerçekleştiği ilk bölge edometriyum epiteli tarafından gibi kapatılır (Carlson 2012).

İmplantasyon üç aşamada gerçekleşir. İlk aşama olan apozisyonda blastokist endometriumun implantasyon bölgesine temas eder. Sonraki aşama olan adezyonda blastokistin trofoblast hücreleri reseptif endometrial epitele bağlanırlar. Son aşama olan invazyon aşamasında invaziv trofoblast hücreleri endometrial epitelinin bazal membranını geçerek stromayı işgal ederler (Red-Horse ve ark. 2004).

Başarılı bir implantasyon süreci metabolik olarak aktif bir embriyo, hormonlarla uyarılmış reseptif bir uterus ve embriyoya özel olarak gelişmiş maternal immünolojik tolerans varlığını gerektirir. Bir önceki menstrüal periyodun bitişinde başlayan endometriumun kompleks hormonal hazırlıkları, embriyo için uygun hücresel ve besinsel çevrenin hazırlanmasını hedefler. Embriyo ve endometrium arasındaki asıl temasın gerçekleşmesinden önce bile uterus epiteli implantasyon sürecini kolaylaştıracak bazı sitokin ve kemokinleri salgılar. Aynı zamanda, trofoblast hücrelerinin yüzeylerinde sitokin reseptörleri belirir. Zona pellusidanın yırtılması ile embriyo implantasyona hazır hale gelir (Carlson 2012).

İmplantasyonda ilk aşama blastokistin iç hücre kitlesinin bulunduğu embriyonik kutup bölgesinin endometriuma bağlanmak üzere pozisyon alması işlemi olan apozisyondur. In vitro ve in vivo çalışmalar göstermektedir ki, blastokistin bağlanması iç hücre kitlesinin (embriyonik kutup) bulunduğu alanın üstünden geçekleşmektedir. Bu bulgu, trofoblastların yüzeylerinin her yerde aynı olmadığını göstermektedir

Sonraki aşama olan adezyonda blastokist endometrial epiteline bağlanır. Hormonlarla şartlandırılmış endometrium epitelinin apikal yüzeyleri, normal bir menstrüal siklusun 20-24'üncü gülerine denk gelecek şekilde implantasyonun gerçekleşmesine izin veren dar bir pencerede çeşitli adezyon moleküllerin salgılanması ile gerçekleşir. Eş zamanlı olarak, preimplantasyon blastokistindeki trofoblastik hücreler de yüzeylerinde adezyon molekülleri ifade eder (Carlson 2012).

İmplantasyonun bir sonraki aşaması ise uterin epiteline penetrasyonu ve stromayı işgal etme aşaması olan invazyondur. Primatlarda hücresel trofoblast endometrium ile bağlantı kurmadan önce bir aşama daha farklılaşır. İç hücre kitlesinin bulunduğu alanda, hücreler hücresel trofoblastlar (sitotrofoblast) birleşerek çok çekirdekli yapı olan sinsityotrofoblasta farklılaşırlar. İmplantasyonun başında sinsityotrofoblastların sadece küçük bir kısmı (sitrofoblast) mevcut iken bu yapı kısa sürede embriyonun etrafını sarar. Sinsityotrofoblastların küçük uzantıları kendilerini uterin epitel hücreleri arasından sokarlar. Endometrial epitelin altındaki bazal laminaya kadar yayılırlar ve trofoblastik plak isminde yassı bir yapı oluştururlar. Yaklaşık bir gün içinde trofoblastik plak üzerindeki sinsityotrofoblastik uzantılar bazal laminaya penetre olmaya başlarlar. Erken sinsityotrofoblast oldukça invaziv bir dokudur ve hızla ilerleyerek endometrial stromada kendine yola açar. Sinsityotrofoblastın endometriumda ilerleyişi enzim aktivitesi ile yönlendiriliyor olmasına rağmen biyokimyasal temeli tam olarak bilinmemektedir. Fertilizasyondan sonra 10-12'nci günlerde embriyo endometriuma tamamen gömülmüştür. İlk penetrasyonun olduğu bölge hücresel olmayan bir tıkaç ile işaretlidir ve devam eden süreçte epitelyal hücrelerin göçüyle kapatılır (Carlson 2012).

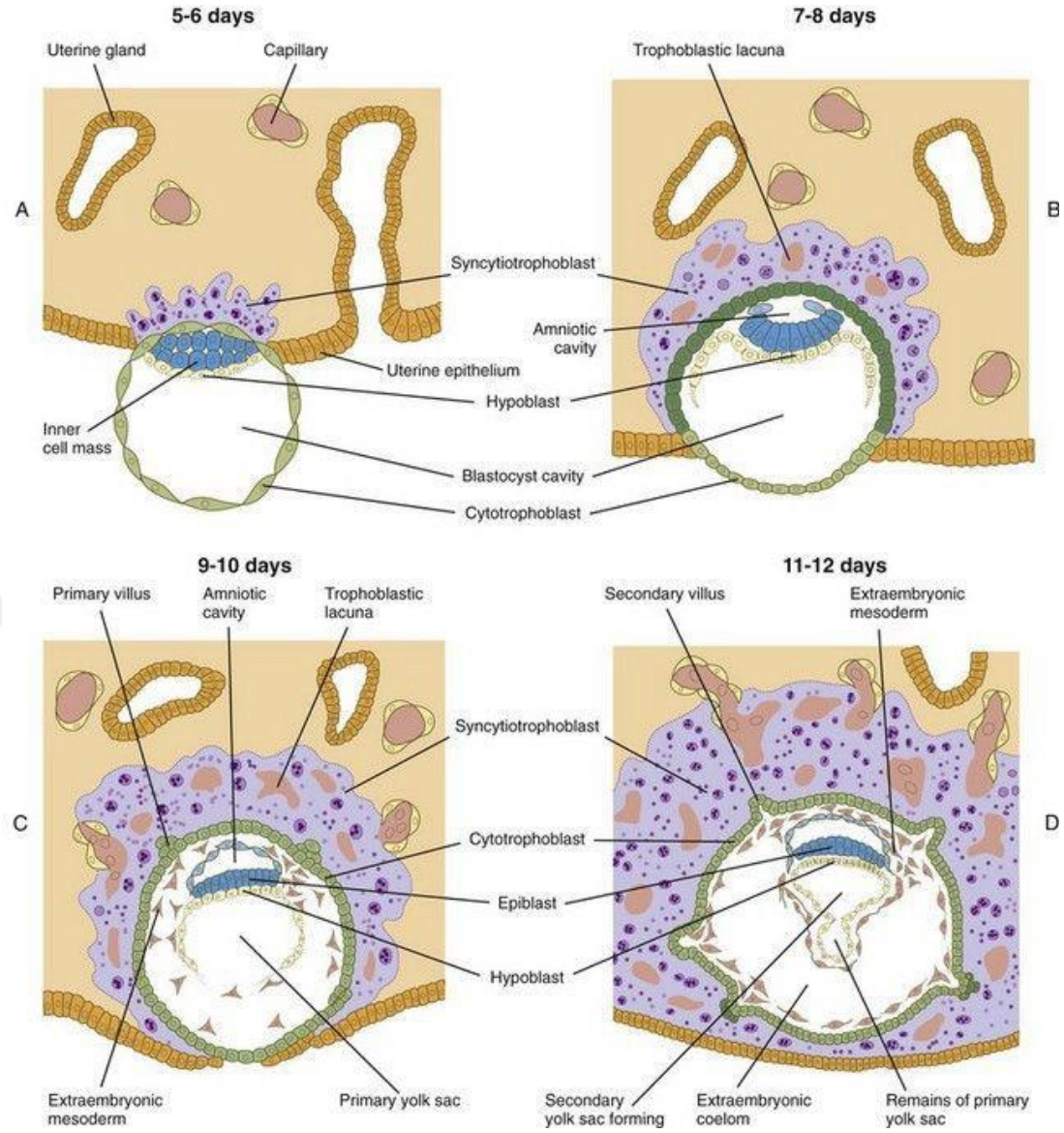
Erken implantasyon devam ederken işgalci sinsityotrofoblasttan çıkan uzantılar maternal endometrial kan damarlarının etrafını sarar. Damar duvarlarına penetre olarak lakünaların içerisine kanın dolması ile ilk uteroplasental dolaşım başlar. Bu aşamadan sonra trofoblast hücreleri karakter değiştirir; implantasyonun ilk

günlerindeki kadar invaziv değildir. Bu süreçteki uterustaki kan sızıntısı lekelenme oluşturabilir ve anormal menstrüal periyod olarak yanlış yorumlanabilir (Carlson 2012).

Embriyo endometriuma gömülmeye devam ederken ve bazı sitotrofoblastik hücreler sinsityotrofoblast olmak üzere birleşirken, ödematoz endometriumdaki fibroblast-benzeri hücreler şişerler, glikojen ve yağ damlacıkları birikimi gösterirler. Desidual hücre adı verilen bu hücreler büyük bir hücresel matriks oluştururlar ve önce implante olan embriyoyu sararlar, sonrasında endometriumun tamamına yakınını kaplarlar. Desidual reaksiyonla eş zamanlı olarak, geç progestasyonel evrede endometrial stromaya giren lökositler implantasyonun erken evrelerinde embriyonun yabancı cisim olarak tanınmasını engelleyecek interlökin-2 sentezlerler (Carlson 2012).

Blastokist endometriuma bağlanmakta her zaman başarılı olmayabilir ve implantasyon gerçekleşmeyebilir. İmplantasyon başarısızlığı embriyo ve/veya endometrial sebeplere bağlı olabilir. Embriyonun başarılı implantasyon oranı %25-30'lardadır (Carlson 2012).

İmplantasyonda hem embriyodan hem de anneden salgılana faktörlerin başarılı implantasyon için gereklidir. Desidual hücreler tarafından ifade edilen integrin molekülleri blastokistin endometriuma bağlanmasında önemli bir role sahiptirler ve östrojenin progresterondan daha fazla sentezlenmesi sayesinde regüle oldukları gösterilmiştir (Dhar ve ark. 2002). Aynı zamanda prostoglandinlerin (PG) implantasyondaki anahtar moleküllerden birisi olduğu yönünde çalışmalar vardır (Kodaman ve Taylor 2004). İmplantasyon sırasında PGler damar geçirgenliğini artırmaktadır (Kennedy 1979). Siklooksijenazlar (COX-1 ve COX-2) çeşitli PGlerin sentezi için vazgeçilmez enzimlerdir ve bu enzimlerin metabolizmasındaki bozuklukların implantasyon anomalilerine sebep olduğu gösterilmiştir (Lim ve ark. 2002).



Şekil 3. Embriyonun implantasyonunda önemli aşamalar. A, Sinsityotrofoblast endometrial stromayı işgal etmeye başlar. B, Embriyonun büyük bir kısmı endometriuma gömülmüştür; trofoblastik lakünanın erken formu mevcuttur. Amniyotik kavite ve yolk kesesi oluşmaya başlar. C, İmplantasyon neredeyse tamamlanmıştır. Primer villuslar oluşmakta ve extraembriyonik mezoderm gözükmeye başlamaktadır. D, implantasyon tamamlanmıştır, sekonder villuslar oluşmaktadır (Carlson 2012).

Sitokinler küçük, biyolojik aktiviteleri özel hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen çok fonksiyonlu glikoproteinlerdir ve endometrial hücreler ile embriyo iletişiminde görev almaktadırlar [27]. Lösemi inhibitör faktör (LIF), interlökin 6 (IL6) ailesine mensup bir sitokindir ve endometrium tarafından sentezlenir. LIF birçok hücre türünde Jak/STAT, Mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) ve PI3K gibi yolakları aktive eder ve implantasyon için oldukça önemli bir sitokindir (Stewart ve ark. 1992). LIF reseptörlerinin implante olan blastokiste komşu olan desidualize olmuş stromal

hücrelerde ifade edilmekte olduğu gösterilmiş olup, trofoblastların tutunma etkisini artırdığından dolayı LIF'in hem adheziv hem de invaziv aşamalarda etkili olduğuna kanaat getirilmiştir (Dimitriadis ve ark. 2000).

IL-6 hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar bir sitokindir. İmplantasyonda IL-6'nın rolü, yokluğunda implantasyonun azalmasıyla gösterilmekle birlikte aldığı görev tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak hem endometrial hem de embriyonik hücrelerin yüzeylerindeki reseptörlerin varlığı, parakrin-otokrin rolü olduğuna işaret etmektedir (Robertson ve ark. 2000). IL-6 menstrüasyonun en çok orta ve sonlarına yakın evrelerinde östrojen ve progesteronun en çok salındığı zamanlarda ifade edilmektedir ve bu yüzden steroid hormonların kontrolünde sentezlendiği tahmin edilmektedir (Robertson ve ark. 2000).

Sitokinlere ilaveten, endometriumdan sentezlenen büyüme faktörleri de implantasyon sürecinde etkilidirler. TGF-ß ekstraselüler matriks ve degrede edici enzimlerin üretimi üzerinde etkili olan büyüme faktörüdür. TGF-ß ailesinin birçok üyesi endometrium tarafından sentezlenerek desidualizasyon ve proliferasyon gibi implantasyondaki hücresel olaylarda rol almaktadır (Jones ve ark. 2000). Aynı zamanda TGF-ß izoformları implantasyonun invazyon aşamasında trofoblast hücrelerinin proliferasyonlarını engelleyerek Smad ve p38 MAPK yolaklarını aktive eder ve bu hücrelerin invaziv özelliklerini artırır. TGF-ß1, endometrial hücrelerde ekstraselüler matriks onkofötal fibronektin (onfFN) proteininin ifadesini artırarak trofoblastın implantasyon anında ekstraselüler matrikse tutunmasını uyarır (Feinberg ve ark. 1994).

İnsülin-benzeri büyüme faktörü (IGF), insülin ile homoloji gösteren ancak farklı reseptörler aracılığıyla biyolojik etki gösteren bir büyüme faktörüdür. IGF-1 ve IGF-2'nin mitojenik etki ve hücresel proliferasyonu tetikleme potansiyelleri oldukça yüksektir. İmplantasyon öncesi uterusta IGF-1 ifadesinin stromal hücrelerde arttığı gözlenmiş olup IGF-1 ve IGF-2'nin blastokistte ve trofoektroderm hücreleri üzerinde proliferasyonu uyarıcı etkisi olduğuna yönelik kanıtlar da vardır (Lighten ve ark. 1998).

4.4. HÜCRESEL YAŞLANMA

Terminolojide hücresel yaşlanmayı ifade eden senesens kelimesi latince *senex* kökünden türev almaktadır. Sistem biyolojisinde gelişim ve matürasyonu takip eden bozulma sürecini ifade eder ve genellikle "yaşlanma" kelimesiyle aynı anlamda kullanılmaktadır. İlk kez 60'lı yıllarda Hayflick ve arkadaşları tarafından kültürdeki hücrelerin kısıtlı sayıda bölünme kapasitesine sahip olduğu açıklanmıştır (Hayflick 1965). Bu klasik deney süresince, fibroblast hücreleri ilk önce hızla bölünmüş, ancak yavaş yavaş- birçok bölünme sonrası- hücre çoğalması azalmış ve nihayetinde hücreler bölünme yeteneğini kaybetmiştir. Replikatif yaşamları boyunca hücrelerin bölünecekleri toplam sayı Hayflick limiti olarak isimlendirilmiştir. Bölünmeyen hücreler haftalarca hayatta kalmasına, büyüme faktörü, besin ve alan fazlalığı olmasına rağmen bu yeteneği tekrar kazanmamışlardır (Hayflick 1965).

Senesens terimi, organizmal yaşlanmayı özetleyeceği öne sürülerek; kültürdeki bölünmesi durmuş hücrelerde kullanılmış ve böylece hücresel senesens, hücresel yaşlanma ve replikatif senesens terimleri aynı anlamda kullanılmaya başlanmıştır (Campisi ve di Fagagna 2007).

Hücresel yaşlanmanın keşfinden sonra nasıl geliştiğini açıklayıcı hipotezler öne sürülmüştür. Bu hipotezlerden ilki hücresel yaşlanmanın olumlu etkileri olduğunu, kanserden korunmak üzere geliştirilmiş bir hücresel mekanizma olduğunu öne sürülmüştür (Sager 1991).Diğer bir hipotez ise doku yenilenmesi ve onarımının ilerleyen yaşla birlikte azalmasını temel alır. Bu kapsamda hücresel yaşlanmanın in vivo rejeneratif kapasiteyi azaltarak organizmanın yaşlanmasına model oluşturmakta olduğu düşünülebilir (Campisi ve di Fagagna 2007).

Kalıcı büyüme arresti yaşlı hücrenin en önemli özelliğidir. Ancak büyüme arresti dışında, hiçbir karakteristik hücresel yaşlanmanın varlığını tek başına kanıtlamaz Yaşlı hücreler genellikle şişkin, hacimce yaklaşık 2 kat büyük ve adherent bir hücreyse yassılaşmış morfoloji sergilerler. Morfolojisine ilaveten, yaşlı hücrenin bir dizi özelliği ve moleküler belirteçleri vardır. Aynı şekilde, bütün yaşlı hücreler, bilinen bütün belirteçleri sergilemeyebilir. Bu yüzden yaşlı hücreler birden fazla parametre göz önüne alınarak değerlendirilir (Campisi ve di Fagagna 2007).

Yaşlanmanın en öne çıkan özelliği, moleküler, hücresel, doku ve tüm organizma bünyesinde gerçekleşen fonksiyon kaybıdır (Campisi 2013). Yaşlanma ilişkili dejenerasyonlar; sarkopeni, ateroskleroz, böbrek yetmezliği, osteoporoz, maküler dejenerasyon, nörodejenerasyon (Alzheimer ve Parkinson hastalığı başta olmak üzere) gibi birçok hastalığın mekanizmasından sorumludur (Campisi 2013).

Hücresel yaşlanma; potansiyel bir onkojenik stres karşısında, hücre proliferasyonunun geri dönüşsüz olarak askıya alınmasını ifade eder (Campisi ve di Fagagna 2007). Bu cevabın kalıcı olması durumu, en azından kısmen kanserin gelişimini engellemek üzere evrimleştiği fikrini güçlendirir (Sager 1991). Hücresel yaşlanma arrestinin geri dönüşsüz olarak addedilmesinin sebebi, bilinen hiçbir fizyolojik uyaranın yaşlanmış hücreyi tekrar hücre siklusuna girmesini sağlayamamasındandır. Ancak, bazı tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi moleküler biyolojik manipülasyonlar ile hücrenin tekrar bölünmesini sağlanabilir (Beauséjour ve ark. 2003). Ancak yaşlı hücrenin geri dönüşü için açıklanmamış mekanizmalar olabilir. Her durumda hücresel yaşlanma oldukça iyi korunan bir mekanizmadır. İki ana tümör baskılayıcı yolak ile başlatılır ve sürdürülür: p53/p21 ve $p16^{INK4a}$/pRB yolakları. Bu iki yolağın malign tümörogenezde kuvvetli bariyerler olduğu bilinmektedir (Levine ve ark. 1991, Liggett Jr ve Sidransky 1998). Bu görüşle uyumlu olarak, potansiyel bir onkojenik stres karşısında hücreler yaşlanma yolağına giderler.

Bölünmenin durmasına ilaveten, hücreler kromatin organizasyonunda ve gen ekspresyonunda büyük çapta değişiklik gösterirler. Bu değişikliklerden bazıları bir çok proinflamatuvar sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve proteaz salgısıdır ve hücrenin bu fazına hücresel yaşlanma ilişkili sekretuar fenotip (Senescence-associated secretuary phenotype, SASP) ismi verilmiştir (Rodier ve Campisi 2011). SASP'ın güçlü bir parakrin aktivitesi vardır ve bu mekanizmanın doğası hücresel yaşlanmanın yalnızca kanserden korunmaya karşı olmadığını gösterir. Bunun yerine, hücresel yaşlanma ve SASP hem kanseri baskılamak hem de hasar sonrası doku onarımı ve rejenerasyonu sağlamak üzere gelişmiştir. Bu etkiler fizyolojik durumlara göre faydalı veya zararlı olabilir (Campisi ve ark. 2011).

Kısıtlı bölünme sayısının ana sebepleri arasında telomer kısalması yatmaktadır. Her bölünme esnasında doğrusal DNA molekülleri tam olarak kopyalanamamaktadır;

çünkü DNA taslağını kopyalayan polimerazlar 3’ yönünden 5’ yönüne tek yönlü çalışmaktadır. Bu tek yönlülük kromozomun sonundaki RNA primeri ayrıldıktan sonra, 5’ ucuna hidroksil grubu bağlanamaması ve her replikasyonda bir zincirin sonundaki tekrar eden dizi olan telomerden bir miktar kısalmasıyla sonuçlanmaktadır (Levy ve ark. 1992). Telomer kısalması telomeraz aktivitesi olan hücrelerde gerçekleşmez. Telomeraz enzimi kromozom sonundaki tekrar eden telomerik dizilere de novo yeni DNA dizisi ekleyerek telomerleri uzatabilir (Collins 2000, McEachern ve ark. 2000). Telomeraz enzimi aktif olan hücreler insanlarda nadir olarak bulunur. Bir çok kanser türünde, embriyonik kök hücrelerde, bazı yetişkin kök hücrelerde ve aktif T hücreleri gibi bazı somatik hücrelerde telomeraz aktivitesi gözlenmiştir (Kim ve ark. 1994, Wright ve ark. 1996). İşlevsel telomerler DNA onarım mekanizmalarını DNA sonlarını çift zincir kırık olarak görmesini engelleyerek korur. Hücre bölünmesi sonunda DNA onarımı devreye girerse, kromozom birleşmesi ve kırılması aracılığıyla, hızlı bir şekilde genomik bozulmaya gidecektir ve kansere giden yolda büyük bir risk faktörüdür (Blackburn 1991, Rodier ve ark. 2005). Yani telomeraz yokluğunda tekrar eden bölünmeler, bir veya daha fazla telomerin kısa ve işlevsiz hale gelmesine sebep olacaktır. İşlevini kaybeden telomerler DNA hasar onarımını devreye sokar ancak DNA onarımı girişimini baskılar (di Fagagna ve ark. 2003, Takai ve ark. 2003, Carneiro ve ark. 2010, Fumagalli ve ark. 2012). DNA hasar onarım mekanizması ise, ağırlıklı olarak p53 tümör baskılayıcı aracılığıyla hücre bölünmesini askıya alır ve genomik düzensizliği önler. İşlevsiz telomerler onarılamaz, sonuç olarak böyle telomerleri olan hücreler devamlı olarak DNA hasar onarımı sinyali altında kalırlar ve p53’ü aktif tutarlar (di Fagagna ve ark. 2003, Takai ve ark. 2003, Von Zglinicki ve ark. 2005).

Telomer bozukluğu, hücresel yaşlanma cevabını oluşturabilecek birçok mekanizmadan yalnızca birisidir. Bir çok hücre genomik konumundan bağımsız olarak ciddi DNA hasarında yaşlanma cevabı verirler (Nakamura ve ark. 2008). İyonize radyasyon, topoizomeraz inhibitörleri gibi DNA çift zincir kırığına sebep olabilecek ajanlar hücresel yaşlanmaya sebep olur (Robles ve Adami 1998, Sedelnikova ve ark. 2004, Wang ve ark. 2009). Bir çok sitotoksik kemoterapi ajanları DNA-hasarı aracılığıyla hem tümörü hem de çevresindeki normal dokuyu hücresel yaşlanmaya sokar (Chang ve ark. 2002, Novakova ve ark. 2010). Oksidatif stres kaynaklı DNA lezyonları da hücreyi yaşlanmaya sürükleyebilir (Chen ve ark. 2001,

Parrinello ve ark. 2003). Oksidatif stres, telomerlerdeki G-zengin bölgelerin oksidatif hasara karşı daha hassas olmasından dolayı telomer kısalmasını da hızlandırabilir (von Zglinicki 2002). Yani doğrudan veya dolaylı DNA çift zincir kırıkları potansiyel yaşlılık tetikleyicileridir; doz cevap deneyleri göstermiştir ki tamir edilmeyen tek bir DNA çift zincir kırığı hücresel yaşlanmayı başlatabilmektedir (Di Leonardo ve ark. 1994). Ne tip bir genomik lezyonun hücresel yaşlanmayı başlatacağı kesin olarak bilinmezken, hücresel yaşlanmaya sebep olan lezyonların DNA hasar onarımı sinyalini sürekli uyardığı bilinmektedir. Kronik DNA hasar cevabı, geçici büyüme durdurulmasından farklı bir cevap oluşturur ve dolayısıyla p53 gibi DNA hasar cevabı proteinlerinin de uzun vadeli varlığı söz konusudur (Sedelnikova ve ark. 2004, Rodier ve ark. 2011, Fumagalli ve ark. 2012).

Hücresel yaşlanma güçlü, kronik veya dengesiz mitojenik sinyal ile de tetiklenebilir (Blagosklonny 2003). H-RAS geninin onkojenik formunun MAPK sinyal yolağını kronik olarak aktive ederek hücresel yaşlanmayı tetiklediği bildirilmiştir (Serrano ve ark. 1997). MAPK yolağının başka bileşenleri de aşırı ifade edildiğinde veya onkojenik formlarda bulunduklarında hücresel yaşlanmayı başlattıkları bildirilmiştir (Braig ve Schmitt 2006, Prieur ve Peeper 2008). Benzer şekilde, ERB2 gibi büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ifadesi (Trost ve ark. 2005), interferon-ß gibi sitokinlerin kronik uyarılması (Moiseeva ve ark. 2006), PTEN gibi büyüme faktörü sinyalini baskılayan proteinlerin kaybı (Alimonti ve ark. 2010) gibi yüksek yoğunluklu mitojenik uyarılar da hücresel yaşlanmaya sebep olmaktadır (Deng ve ark. 2004). Başlatan sebep ne olursa olsun, neticede mitojenik sinyaller p53/p21 ve $p16^{INK4a}$/pRB yolaklarını aktifleştireceklerdir.

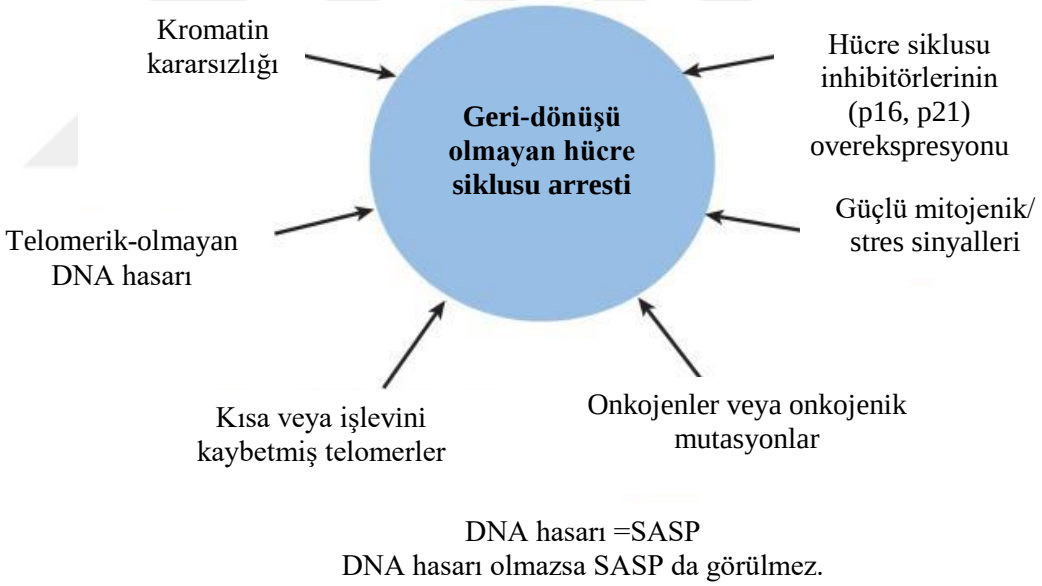
Hücresel yaşlanmanın başlangıcında bir diğer sebep de epigenomik hasardır, proliferatif genleri kodlayan lokuslarda heterokromatin oluşumu (Narita ve ark. 2003) gibi kromatin organizasyonunda büyük çaplı değişikliğe sebep olur. Geniş çaplı etkiye sahip histon deasetilaz inhibitörleri aracılığıyla global kromatin açılması gibi etkiler, genellikle hücresel yaşlanma ilişkili kromatin yapısına katkı sağlayacak olan $P16^{INK4a}$ tümör baskılayıcı proteini serbest bırakarak yaşlanmaya sebep olurlar (Munro ve ark. 2004). $P16^{INK4a}$ proteini yalnızca tümör baskılayıcı değil, aynı zamanda hücresel yaşlanmanın biyobelirtecidir (Ohtani ve ark. 2004).

Hücresel yaşlanma sürecini başlatan ve devam ettiren uyaranlar bu kontrolü büyük oranda p53/p21 ve $P16^{INK4a}$/pRB tümör baskılayıcı yolaklarının birisi veya ikisiyle birden yaparlar. Her iki yolak da üst yolaklarında bir çok farklı regülatörler, alt yolaklarında efektörleri ve yan dallanmalarıyla oldukça karmaşık yolaklardır (Collins ve Sedivy 2003, Adams 2009). Dahası bu iki yolak da çapraz olarak birbirlerini regüle ederler (Takeuchi ve ark. 2010). Her iki yolak da hücresel yaşlanma cevabını gen ifadesinde büyük değişikliklere sebep olarak kontrol ederler. P53 ve retinoblastoma (RB) ana transkripsiyonel düzenleyicilerdir. P21; p53'ün alt basamak efektörüdür ve $P16^{INK4a}$ ise RB'nin üst basamak regülatörüdür. Her ikisi de siklin-bağımlı kinaz inhibitörüdür ve hücre siklusu ilerleyişinin negatif regülatörleridir. p53/p21 ve $P16^{INK4a}$/pRB yolaklarının kronik aktivasyonu veya aşırı ifadesi büyük çoğunlukla hücresel yaşlanma için yeterlidir (McConnell ve ark. 1998). p53/p21 ve $P16^{INK4a}$/pRB yolakları aynı zamanda yaşlı hücrenin bir çok karakteristik özelliğini regüle eder (Beauséjour ve ark. 2003).

Histokimyasal boyama tekniklerinden hücresel yaşlanma ilişkili ß-Galaktosidaz (SA-ß-Gal) aktivitesi yaygın olarak kullanılan yaşlanma belirtecidir. Bu aktivite asidik lizozomal ß-galaktosidazdan köken alır, yaşlı hücrelerde yüksek seviyede ifade olduklarından nötre yakın pH değerlerinde tespit edilebilir. (Kurz ve ark. 2000). Hem kültür koşullarında hem de birçok omurgalı deney hayvan modelinde geniş çapta hücresel yaşlanma belirteci olarak kullanılmaktadır.

Kültürde ve dokuda yaşlı hücreleri belirlemek için düzenli olarak kullanılan diğer bir belirteç ise $p16^{INK4a}$ tümör baskılayıcı proteinidir. Siklin-bağımlı kinaz 4 inhibitörü (CDKN4) olan bu protein hücre siklusunda etkili bir rol oynamaktadır. Hücrenin G1 fazından S fazına geçişini engelleyerek hücrenin bölünmesine mâni olur. $p16^{INK4a}$ ifadesinin azalmasında veya yokluğunda siklin-bağımlı kinaz 4 proteini siklin D'ye bağlanarak birlikte E2F1 transkripsiyon faktörüne bağlı bulunan RB proteinini fosforiller. Fosforillenen pRB, E2F1 proteininden ayrılır. E2F1 serbest kalarak nükleusa girer ve G1'den S fazına geçiş için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu başlatır (Rayess ve ark. 2012). Yaşlanma sürecine girmiş hücrelerde, G1 fazından çıkışı engelleyerek hücre bölünmesini durdurma kapasitesinden dolayı, bu hücrelerde $p16^{INK4a}$ proteini ifadesi artmış olarak gözlemlenir (Collins ve Sedivy 2003, Ohtani ve ark. 2004).

Nükleer lamina, nükleer zarfın iç membranına bitişik bulunur ve nükleusun mekaniğinin ve boyutlarının stabilitesine katkıda bulunur. Laminanın ana yapısal proteinleri Lamin A ve Lamin B protein aileleridir (Shimi ve ark. 2008). Özellikle Lamin-B1 proteini her hücrede gelişim süresince ifade edilir. Aynı zamanda Lamin-B1'in periferal elemanların kromatine bağlanmasında, kromozom bölgelerinin organizasyonunda ve gen ifadesinde rol oynadığına yönelik bulgular mevcuttur (Kosak ve ark. 2002, Dechat ve ark. 2008). Bunlara ilaveten, Lamin-B1'in DNA replikasyon ve onarımında, RNA polimeraz II transkripsiyonunda ve kromatin düzenlenmesinin epigenetik kontrollerinde rol oynamaktadır (Shimi ve ark. 2008, Shumaker ve ark. 2008). Lamin-B1, E2F1 hedef genidir ve ifadesindeki azalma pRb aracılığıyla gerçekleşmektedir. Yaşlanan hücrelerde artan $p16^{INK4a}$ ifadesiyle ters orantılı olarak Lamin-B1 proteini ifadesinde azalma görülür (Shimi ve ark. 2011, Freund ve ark. 2012).



Şekil 4. Birçok uyaran hücresel yaşlanmayı ve yaşlanma ilişkili sekretuvar fenotipi (SASP) tetikleyebilir. Ciddi DNA hasarı aracılı (onkojenik stres veya işlevsiz telomer gibi) geri dönüşü olmayan hücre siklusu arresti uyarıldığı zaman yaşlanmış hücrelerde SASP gözlenir. Ancak, p16 ve p21 gibi hücre siklusu inhibitörlerinin overekspresyonu ile yaşlanma-benzeri fenotip tetiklendiği zaman hücresel yaşlanmanın birçok karakteri gözlenir, ancak SASP oluşmaz (Coppé ve ark. 2010).

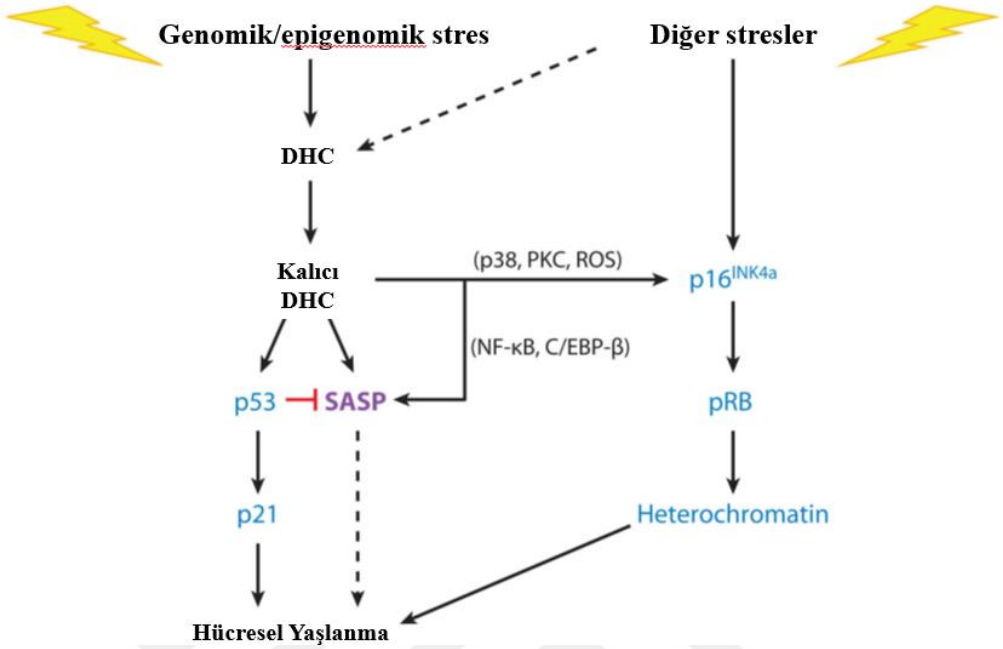
Yaşlı hücrelerin son önemli karakteristiği SASP'tir. SASP özelliği, yaşlı hücrelerin organizmal yaşlanma ile yaşa bağlı patolojiler arasındaki ilişkiyi

açıklayabildiği için oldukça önemlidir (Coppé ve ark. 2010, Campisi ve ark. 2011). SASP; çok sayıda sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve proteazı kapsayan geniş profilli bir fenotiptir (Freund ve ark. 2010). Bu faktörlerden kimisi hücresel yaşlanmanın zararlı etkilerini açıklarken, diğer faktörler –hatta bazı aynı faktörler- faydalı etkilerini ortaya çıkarır (Şekil 4).

SASP, büyüme regüle-edici onkojen proteinler (GROlar) (Yang ve ark. 2006) ve amfiregülin (Bavik ve ark. 2006) aracılığıyla hücre proliferasyonunu tetikleyebilir. Ayrıca vasküler-endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi proteinlerle yeni damar oluşumunu uyarabilir (Coppé ve ark. 2006). Ancak SASP'ın WNT ifadesi artırabilen ve azaltabilen bifazik WNT regülatörü SFRP1 (Elzi ve ark. 2012) ve hücre proliferasyonunu hem destekleyen hem de inhibe edebilen IL-6 ve IL-8 kemokinleri ifadesi gibi bazı etkileri çok daha komplekstir. (Acosta ve ark. 2008, Kuilman ve ark. 2008). Kronik WNT sinyali hem farklılaşmış hücreleri hem de kök hücreleri yaşlanmaya sürükleyebilir (Liu ve ark. 2007). Ayrıca bazı SASP faktörleri bazı duyarlı hücrelerde epitelyal-mezenkimal geçişi tetikleyebilirken (Laberge ve ark. 2012), SFRP1,GROα ve IL-6 gibi diğer faktörler hücre proliferasyonunu veya dönüşümünü bozabilir veya kök hücre nişini değiştirebilir (Pricola ve ark. 2009, Krtolica ve ark. 2011, Zhang ve ark. 2011). Hücresel yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklar arasındaki ilişkide SASP'ın rolü doğrudan veya dolaylı olarak inflamasyonu teşvik etmesidir (Coppé ve ark. 2010, Davalos ve ark. 2010, Tchkonia ve ark. 2010). Bu faktörlerden bazıları IL-6, IL-8, monosit kemoatraktan protein (MCP), makrofaj inflamatuvar protein (MIP), ve inflamasyonun birçok yönünü kontrol eden Granulosit/makrofaj koloni-uyarıcı faktör (GM-CSF) proteinleridir. Bu ve benzeri proteinlerin salgılarının kronik inflamasyona sebep olduğu düşünülmektedir; en azından lokal ancak büyük olasılıkla sistemik olarak (Coppé ve ark. 2010, Davalos ve ark. 2010, Campisi ve ark. 2011). Kronik inflamasyonun -hem dejeneratif hem de hiperplastik- neredeyse tüm yaşa bağlı hastalıkların patolojisinde sebep veya önemli bir katılımcı olduğu bilinmektedir (Chung ve ark. 2009).

SASP kategorisinde yer alan proteinler hücre tipine ve bir dereceye kadar hücresel yaşlanma cevabını oluşturan uyarıya göre çeşitlilik gösterir. Buna rağmen; birçok hücre tipi ve hücresel yaşlanma tetikleyici uyaranı kapsayan SASP'ın en iyi korunan özelliği, proinflamatuvar sitokinlerdir (Kang ve ark. 2003, Hampel ve ark. 2006, Acosta ve ark. 2008, Rodier ve ark. 2009). SASP'ın bir fonksiyonu, hasarlı hücrenin

çevresindeki komşu hücrelerle iletişime geçerek doku tamiri için hazırlanmak iken, diğer fonksiyonu bu hasarlı hücrelerin immün sistem tarafından temizlenmesinden emin olmak olabilir (Chung ve ark. 2009, Coppé ve ark. 2010, Novakova ve ark. 2010).



Şekil 5. SASP ve hücresel yaşlanmanın regülasyonu. Hücresel yaşlanma genomik/epigenomik hasar ile başlar ve DNA hasar cevabını (DHC) tetikler. DHC zamanla kronikleşerek p38-MAPK ve Protein kinaz C (PKC) aktivasyonuna ve reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa sebep olur ve $p16^{INK4a}$ tümör baskılayıcı proteini ifadesini uyarır. Bazı diğer stresler dolaylı olarak (kesik çizgi) DHC'nı tetikleyebilirken bazı stres kaynakları doğrudan $p16^{INK4a}$ ifadesini tetikleyebilir. $p16^{INK4a}$ pRB tümör baskılayıcı proteinini aktifleştirerek heterokromatizasyon ile belirli genlerin ifadesini baskılar. Kalıcı DHC aynı zamanda SASP'a sebep olur ve SASP'ı kontrol altında tutmak için p53'ü aktive eder. P53 aynı zamanda p21 hücre siklusu inhibitörü p21'i uyararak proliferasyonu inhibe eder (Campisi 2013).

4.5. DENEYSEL HÜCRESEL YAŞLANMA MODELİ

Telomer kısalmasının yol açtığı fizyolojik hücresel yaşlanma olmadan, hücrelerin in vitro ortamda prematüre yaşlanmaları sağlanabilir. Bunun için kullanılan yöntemlerden bazıları kimyasal ajanlarla (hidroksiüre vb.) veya mor ötesi ışın kullanımı ile DNA sentezini inhibe edilerek sağlanır. Ayrıca serbest radikallerin salınımı artırılarak DNA hasarı oluşturularak veya moleküler tekniklerle belirli genlerin transkripsiyonel aktivasyonu ile deneysel yaşlanma modeli elde edilebilir (Campisi 2013).

Hidroksiüre ($CH_4N_2O_2$) iyi bilinen bir ribonükleotid redüktaz enzimi inhibitörüdür (Krakoff ve ark. 1968), öngörülen mekanizması; enzim aktivitesi için gerekli olan tirozin radikalini parçalama şeklindedir. İnhibitör reaksiyonu için hidroksiürenin oluşturduğu nitrik oksitten kopan bir elektronun ribonükleotid redüktaz enziminin R2 altbiriminin tirozin radikaline bağlanmasıyla gerçekleşir (Lassmann ve ark. 1992). Hidroksiürenin hidrojen peroksit bağımlı peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan nitrik oksit de (NO) DNA sentezi için gerekli nükleik asitlerin azalması aracılığıyla ribonükleotid redüktaz enzim aktivitesini baskılar ve neticede DNA tek zincir kırıkları oluşur (Mata ve ark. 1989). DNA sentezi üzerindeki inhibitör etkisi yüzünden hidroksiüre antikanser ilacı olarak kullanılmıştır (Canute ve ark. 1998). Hidroksiürenin in vitro uygulandığı hücrelerde geniş ve yassılaşmış morfoloji gözlemlenerek yaşlı hücrelerin benzerliği moleküler olarak da karakterize edilmiştir (Yeo ve ark. 2000). Yapılan çalışmalar hücrelere in vitro hidroksiüre muamelesi sonucu hücresel yaşlanma kriterlerine uygun olarak p16Ink4a, p21 ifadelerinde ve hücresel yaşlanma ilişkili ß-galaktosidaz aktivtesinde artış, Lamin B-1 ifadesinde azalış olduğunu göstermektedir (Park ve ark. 2000, Pawelec ve ark. 2000, Yeo ve ark. 2000).

Hücresel yaşlanma fizyolojisinde p53 tümör supresör yolağı oldukça önemlidir. Aynı zamanda birçok tümör tarafından p53-ilişkili hücresel enerji metabolizmasında proliferasyonu artırmak amacıyla saptırmalar yapılmaktadır (Bensaad ve ark. 2006). Mitokondriyel fonksiyonundaki azalmayla birlikte insan fibroblast hücrelerinde yaşlanmanın geciktiği doğrulanmıştır (Hutter ve ark. 2004). Unterluggauer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada glutaminaz eniziminin inhibisyonu aracılığıyla hücre içi enerji metabolizması bozularak yaşlılık benzeri fenotipler oluşturulmuştur (Unterluggauer ve ark. 2008).

Hücresel yaşlanmanın temelinde yatan sebeplerden birisi de oksidatif stresteki artıştır. Bu bakış açısından bakıldığında in vitro kontrollü olarak uygulanan oksidatif stres ajanları da hücresel yaşlanmayı tetikleyebilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda hidrojen peroksit uygulaması ile stres-tetikli prematür yaşlanma elde edilmektedir (Chen ve Ames 1994, Kiyoshima ve ark. 2012).

Deneysel in vitro hücresel yaşlanma elde etmek için bir diğer teknik ise mor ötesi (UV) ışınlar kullanmaktır. UV-tetikli hasarın %50'sinin serbest radikallerin salınımı

ile gerçekleştiği tahmin edilirken UV ışınlarının diğer farklı etkileri de vardır (Bernstein ve ark. 2004). En çok 245-290 nm arası UV radyasyonu (UV-B 320-290 nm dalga boyundadır.) DNA tarafından absorbe edilir (Tornaletti ve Pfeifer 1996). UV-B ışımasının DNA üzerindeki mutasyonları siklobütan pirimidin dimerleri ve komşu pirimidin bazları arasında ışıma ürünlerinin oluşmasıyla karakterizedir (Ichihashi ve ark. 2003). UV-A ışıması (400-320 nm) ise doğrudan DNA tarafından absorbe edilmeyip dolaylı olarak serbest radikal türevlerinin (süperoksit anyonu, peroksit, singlet oksijen) oluşumu ile DNA hasarına sebep olur (Fisher ve ark. 2002). UV-A aracılıklı mutagenez trans-urosanik asit ve tek nükleotid DNA kopukları veya 8-hidroksi guanin üretimi ile sonuçlanabilir (Kochevar 1995). UV ışıma aracılıklı in vitro ve in vivo yaşlanma modeli üzerinde yapılmış birçok çalışma mevcuttur (de Gruijl ve ark. 2001, Borlon ve ark. 2007, Min ve ark. 2014, Zhang ve ark. 2017).

Hücresel yaşlanmanın in vitro ortamlarda taklit edilmesinin bir diğer yolu da moleküler yaklaşımlardır. Bilindiği üzere hücresel yaşlanmada p16Ink4a, p21 ve p53 proteinleri yolakları anahtar konumundadır (Campisi ve di Fagagna 2007). Bu yolakların transkripsiyonel aktivasyonu ile hücresel yaşlanma elde edilebilir. Örneğin hücre içine gönderilen vektör aracılığıyla p53 proteinin aşırı aktivasyonu ile hücre döngüsü değiştirilerek hücre yaşlandırılabilmiştir (Bond ve ark. 1996). Benzer bir bakış açısıyla, hücreyi yaşlanmadan koruyan mekanizmalardan birisi olan telomeraz enzimini kodlayan genin (hEST2/hTRT) baskılanmasıyla da hücresel yaşlanma süreci hızlandırılabilir (Horikawa ve ark. 1998).

4.6. UTERUS YAŞLANMASI VE İNFERTİLİTE

Kadının doğal feküntidesi 30 yaşından sonra azalmaya başlayıp, 35-40 yaşları arasında giderek azalır ve 45 yaşından sonra en aza iner (Menken ve ark. 1986, Brock ve Holloway 1990). Yardımcı üreme teknolojilerinde, hem in vitro fertilizasyonda (IVF), hem de intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda (ICSI) kadının yaşı tek değişkenler arasındaki en önemlisidir (Navot ve ark. 1994, Templeton ve ark. 1996). Artan yaşla birlikte azalan doğurganlığın sebebi, artan ovulatuvar defektler, daha düşük kaliteli oositler, oositlerdeki kromozomal anomalilerdeki artış, azalan

endometrial reseptivite, jinekolojik hastalıklardaki artış olabilir (Szamatowicz ve Grochowski 1998).

Azalan fekündüsitenin temelinde yatan fizyolojik mekanizmalar oosit ve/veya uterusa ait olabilir. Oositin kalitesinin yaşla birlikte azaldığına dair pek çok bilgi mevcuttur, özellikle ileri yaşlı bireylerin oositlerinde anöploidi, kopya sayısı varyasyonları, mikrodelesyonlar, mitokondriyel fonksiyon bozuklukları, telomer kısalmaları, iğ ipliği kararsızlıkları gibi bir çok genomik ve proteomik risk faktöründe artış gözlenmektedir (Cimadomo ve ark. 2018). Uterusa ait yaşlanma verilerine bakıldığında, Chetkowski ve arkadaşlarının matematiksel modelleme kullanarak yaptıkları çalışmada, hem uterusun reseptivitesinde hem de embriyonun kalitesinde yaşla birlikte anlamlı bir düşüş olduğunu göstermişlerdir (Check ve ark. 1994). Uterusun yaşlanmadan ne derece etkilendiğini öğrenmek için yapılan çalışmalarda oosit bağışı kabul eden hastalar seçilerek farklı yaş grupları üzerindeki doğum oranları incelenmiştir. Özellikle 40 yaş üstü (Abdalla ve ark. 1990, Flamigni ve ark. 1993, Check ve ark. 1994), hatta 50 yaş üstü kadınların (Antinori ve ark. 1993) reprodüktif performansı analiz edildiğinde 40 yaş üstü kadınlarla daha genç hastalar arasında gebelik oranı farkı bulunmuş olsa da (Flamigni ve ark. 1993), diğer çalışmada böyle bir farkın olmadığı vurgulanmıştır (Check ve ark. 1994) . Yani model geçerli olsa da uterusun da ovaryumla birlikte yaşlandığı yönündeki veriler net değildir. Ama elde edilen veriler ile oosite ait nedenler ile birlikte endometrial nedenlerin de yaşla birlikte infertilite problemi olarak ortaya çıktığıdır.

İleri yaşlı kadınlardan elde edilen uterus örneklerinde yaşlanmış (X-gal pozitif) hücrelerin sayısında artış gözlenmiştir (Laser ve ark. 2010). Buna bağlı olarak azalan hücre proliferasyonu ile birlikte endometrium yüzeyinde immün ve inflamatuvar cevapta artış gözlenmiştir (Elmes ve ark. 2015). Embriyo uterusa implante olduğunda gerçekleşen çeşitli immün cevapların kontrolünde T_{reg} hücreleri önemli rol oynamaktadır (Sakaguchi 2004). Yaşla birlikte azalan endometrial reseptivitenin sebeplerinden birisinin, azalan T_{reg} hücre sayısına bağlı olarak bozulan immün düzenlemeler ve inflamasyon olduğu öne sürülmüştür (Jagger ve ark. 2014).

Hücresel yaşlanmanın karakteristik özelliklerden birisi olan SASP'ın da artan inflamasyon aracılığıyla implantasyon sorunlarına sebep olduğu düşünülmektedir (Lim ve ark. 2014). Artan miktarlardaki yaşlanmış immün hücrelerine ve bu hücrelerin

gösterdiği SASP ile ilişkili olarak artan miktarlarda IL-1ß, IL-6, IL-8 gibi sitokinleri ifade etmeleri endometriumda blastokiste karşı oluşturulan immün toleransı bozarak implantasyon başarısızlıklarına sebep olabileceği bilinmektedir (Shirasuna ve Iwata 2017).

İmplantasyon sırasında trofektoderm ve endometrium arasındaki iletişim ile endometrium epiteli ve stromal hücrelerde implantasyona uyumlu değişikliklerin olduğu süreci başlatır (Lejeune ve ark. 1981). Yaşlanan endometrial epitel hücrelerinde ve stromaya mesajların iletimde başarısızlık sonrası implantasyon ve desidualizasyon problemleri olabilir (Finch ve Holinka 1982). Buna ilaveten yaşlanan endometriumda özellikle kollajen gibi ekstra-selüler matriks proteinlerinin düzenlenmesi bozulabilir, hücreler arası bağlantı komplekslerinin oluşumunda aksaklıklara sebep olabilir ve stromal-desidual dönüşümünü engelleyerek implantasyonda başarısızlık riskini artırabilir (Mulholland ve Jones 1993). Bu nedenle endometrial problemler implantasyonu doğrudan etkilenebilmektedir.

4.7. KÖK HÜCRELER

Kök hücreler özelleşmemiş, kendini devamlı yenileyebilen ve aynı zamanda daha somatik hücrelere farklılaşabilme özelliğine sahip hücrelerdir. İnsanlarda kök hücreler erken embriyonun iç hücre kitlesinde, fetüsün bazı dokularında, göbek kordonunda ve plasentada ve yetişkin bazı organlarda tanımlanmıştır. Yetişkin organların bazılarında kök hücreler birden fazla tip özelleşmiş hücreye farklılaşabilir. Örneğin beyindeki nöral kök hücreler nöronlara, glial hücrelere ve astrositlere dönüşebilir. Kök hücrenin temel özelliklerinden birisi olan “potent” özelliği, kök hücrenin ne kadar fazla hücre tipine farklılaşma potansiyeli olduğunu belirtir. Kök hücreler sırasıyla totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak sınıflandırılır (Marshak ve ark. 2001).

Bir hücrenin kök hücre olarak tanımlanabilmesi için asimetrik bölünme yeteneğine sahip olması gerekmektedir (Weissman ve ark. 2001). Bölünme sonrası oluşan iki hücreden birisi kök hücrenin tıpatıp kopyası iken ikincisi daha özelleşmiş bir hücre olarak devam eder (Weissman 2000).

Totipotensi, tek bir kök hücrenin organizmadaki tüm hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip olduğunu gösterir. Totipotent bir kök hücre hem embriyonik hem de ekstra-embriyonik dokulara farklılaşabilir (Lodish ve ark. 1995). Zigot ve sonrasında 8 hücreli aşamaya kadar olan embriyonik süreçteki hücreler totipotensiye sahip kök hücrelerdir. Pluripotensi bir kök hücrenin üç germ yaprağından (endoderm, mezoderm, ektoderm) köken alan tüm yapıları oluşturacak hücrelere dönüşebilecek potansiyelde olduğunu belirtir (Binder ve ark. 2009). Kök hücre kaynaklarından birisi erken aşamadaki embriyodan elde edilen embriyonik kök hücrelerdir (EKH). Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler pluripotent kök hücrelerdir ve erişkin vücuttaki tüm hücreleri oluşturabilecek potansiyele sahiptirler (Wobus ve ark. 2002). Multipotent kök hücreler birden çok hücre tipine farklılaşma potansiyeli olup erişkin mezenkimal kök hücrelerin büyük bir kısmını oluştururlar. Örneğin multipotent kan kök hücreleri farklılaşarak lenfosit, monosit ve nötrofilleri oluşturur. Oligopotent kök hücreler ancak birkaç farklı hücre tipine dönüşebilmektedir. Örneğin lenfoid peogenitör kök hücre yalnızca T, B lenfositi ve NK hücresine farklılaşabilir. Unipotensi ise bir kök hücrenin yanlızca tek bir tip özelleşmiş hücreyi oluşturabileceğini belirtir (Hans 2007). Kök hücre kaynaklarından birisi erken aşamadaki embriyodan elde edilen embriyonik kök hücrelerdir (EKH). Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök pluripotent kök hücrelerdir ve erişkin vücuttaki tüm hücreleri oluşturabilecek potansiyele sahiptirler (Wobus ve ark. 2002).

Friedenstein ve arkadaşları kemik iliğinden elde ettikleri, plastik kültür kabına yapışan fibroblast-benzeri hücreleri ilk kez tanımladıkladıklarında bu hücrelerin osteojenik kökende olduklarını rapor etmişlerdir (Prockop 1997, Bianco ve ark. 2001). Devam eden süreçte bir çok farklı laboratuvarda yapılan çalışmalar bu osteojenik hücrelerin aslında klonal seviyede bir çok farklı bağ doku hücrelerine farklılaşabildiklerini bulmuşlardır (Pittenger ve ark. 1999, Bianco ve ark. 2001). Böylelikle ilk kez Caplan (Caplan 1994)tarafından öne sürülen mezenkimal kök hücre (MKH) kavramının doğrulanması sağlanmıştır. Sonrasında MKH'ler osteoblast, adiposit, kondrosit hücrelerine in vitro farklılaşabilen adherent, fibroblast-benzeri hücreler olarak tanımlanmıştır (Dominici ve ark. 2006).

Kemik iliğine ilaveten, erişkin dokuda MKH veya MKH-benzeri hücreler, kemik iliği stromasından, adipoz dokudan (Zuk ve ark. 2001), dolaşım sisteminden (Prockop

1997), dental pulpadan (Gronthos ve ark. 2000), göbek kordonundan (Erices ve ark. 2000) ve amniyotik sıvı gibi çeşitli kaynaklardan da elde edilmiştir.

Mezenkimal kök hücreler sahip oldukları immünomodülatör etkileriyle hasarlı bölge üzerindeki pro-inflamtuvar yönelimi değiştirebilir ve onarımı hızlandırabilirler (Reinders ve ark. 2009). Bir çalışmada tip 1 diyabet hastası fareye MKH uygulanması sonucu insülin üretici pankreatik adalar ve ß-hücreleri üzerindeki hasarın onarımı ve kan şekeri seviyesinde azalma tespit edilmiştir (Lee ve ark. 2006). Bu tip tedavilerde MKHlerin diğer immün hücreler üzerindeki immünmodülatör etkisine ilaveten salgıladıkları çeşitli büyüme faktörlerinin etkisi olduğuna yönelik bulgular da vardır (García-Gómez ve ark. 2010). MKH'ler geniş bir yelpazede sitokin ve büyüme faktörü salgılayarak diğer hücreler üzerinde parakrin etki yaparlar (Caplan ve Dennis 2006). MKHlerin sekretomlarının topikal olarak uygulanması sonucu, dermal fibroblast hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonu artırılarak kollajen sentezi üretimi artırılmış ve dolayısıyla UV-B maruziyetiyle oluşan ışığa bağlı yaşlanma etkileri tersine çevrilmiştir (Kim ve ark. 2009). Deneysel olarak UV-B uygulamasıyla yaşlandırılmış insan dermal fibroblast hücrelerinin, kök hücrelerle ko-kültürü sonrasın yaşlanma belirteçlerindeki azalma başka bir çalışmada da gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2017).

Tüm bu bilgiler ışığında kök hücrelerin parakrin yol ile çevresindeki yaşlanmış hücreleri uyararak yalnızca proliferasyonlarını değil hücre içi metabolik aktivitelerini de tetikleyerek, immünomodülatör etkileriyle inflamatuvar yolakları baskılayarak sağlamış olabileceği düşünülebilir. O nedenle MKH'lerin bulunduğu mikro çevrede diğer hücreler ile iletişimi, hücreye nasıl yönde desteklik sağlayacağı tam olarak bilinmemekle birlikte, hücrenin sağ kalımı için bir modülatör olabileceği gibi, hücrenin farklılaşması, proliferasyonu gibi hücresel aktiviteleri tetikleyici etkileri olabileceği de göz önünde bulundurmalıdır.

İnfertilitenin önemli sebeplerinden birisi yaşla birlikte artan endometrial problemlerdir. Endometrium stromasında ve epitelinde bulunan veya farklı kaynaklardan göç etmiş mezenkimal kök hücrelerin yaşlanmış endometrium epitel hücreleri üzerinde etkisine yönelik literatürde mevcut çalışma yoktur. Bu çalışmada endometrium epitelyal hücre hattı (RL95-2) HU ile muamele edilerek kimyasal in vitro yaşlanma modeli oluşturulmuş ve mezenkimal kök hücreler ile ko-kültür edilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin kimyasal olarak yaşlandırılmış hücreler üzerinde yaşlanmadan koruyucu etkileri gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

Literatürde kök hücrelerin yaşlanmadan koruyucu etkileri üzerinde yapılan bu ve benzeri çalışmalara rağmen yaşlanmış endometrium hücreleri üzerinde kök hücrelerin ne tür etkileri olduğu konusunda henüz bir çalışma mevcut değildir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Proje Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafında 2018-090 numaralı proje ile desteklenmiştir. Çalışmaların tamamı Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleşmiştir.

5.1.1. RL95-2 Kültürü (CRL-1671)

Çalışmamızda CBUBAP-2016-140 nolu proje kapsamında alınan ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD stoklarında bulunan endometrium epitelyal hücre hattı RL95-2 (CRL-1671, ATCC-58027481) kullanılmıştır. Hücreler -80°C'den çıkarıldıktan sonra 37°C sıcak su banyosunda çözülmesi sağlanmış ve 5 ml RL-95-2 kültür vasatı [DMEM:F12 (Sigma, D6421), %10 FBS (Gibco, 10270), %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B), %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B)] içisine alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet üzerine 5 ml kültür vasatı ilavesi sonrasında 25 cm^2 flasklarda 37^{0}C'de, %5 CO_2'lik inkübatörde (Nuaire Nu5510E) kültüre edildi. RL95-2 hücreleri inverted mikroskop (Olympus, IX71) ile incelendi ve kültür vasatları iki günde bir değiştirilerek %80 konfluent olana kadar kültüre edildi.

5.1.2. İnsan Mezenkimal Kök Hücre (iMKH) Kültürü

Çalışmamızda CBUBAP-2015-171 nolu proje kapsamında alınan ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD stoklarında bulunan insan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (iMKH, PCS-500-012) kullanılmıştır. Hücreler -80°C'den çıkarıldıktan sonra 37^{0}C sıcak su banyosunda çözülmesi sağlandı ve 5 ml iMKH kültür vasatı [DMEM:F12 (Sigma, D6421), %10 FBS (Gibco, 10270), %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B), %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B)] içerisinde 1000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası 5 ml külür vasatı ilavesi sonrasında 25 cm^2 flasklarda 37 ^{0}C'de, %5 CO_2'lik inkübatörde (Nuaire Nu5510E) kültüre edildi. iMKH'leri hücreleri inverted mikroskop (Olympus, IX71) ile incelendi ve ve kültür vasatları iki günde bir değiştirilerek %80 konfluent olana kadar kültüre edildi.

5.1.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

RL95-2 hücreleri kültürün 10. gününde, iMKHleri ise kültürün 14. gününde %80 konfluent oldukları gözlendi. Her iki hücre üzerindeki vasat alındıktan sonra 2,5 ml %0,25 tripsin-EDTA (Gibco, 1797206) ile 5-10 dk 37^{0}C'de inkübasyondan sonra toplandı ve 5 ml kültür vasatı içeren pasaj ve dondurma için ayrı tüplere alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatantlar atıldı ve pasaj yapılacak RL95-2 ve iMKH hücreleri içeren tüplere 3'er ml kültür vasatları, dondurulacak RL95-2 ve iMKH hücreleri içeren tüplere ise %90 FBS, %10 dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma, D-2650) hazırlanarak oluşturulmuş dondurma vasatından 1'er ml konularak -80°C de saklandı.

RL95-2 ve iMKH hücreleri aşağıda verilen çalışma gruplarına uygun şekilde pasajlandı.

5.1.4. Deneysel Yaşlanma Modeli İçin Hidroksiüre Uygulaması

Granül halindeki hidroksiüre (HU, Sigma, H8627) ile RL95-2 endometrial epitelyal hücrelerinde yaşlanma modeli oluşturmak için kültür besiyerinde 200-400-800 µM konsantrasyonlarda çözülerek doz belirlemek amacıyla 7 gün boyunca uygulandı.

Çalışma grupları için RL95-2 hücrelerinin pasajı sonrası hücreler tutunduktan sonra ilgili deney gruplarına 400 µM konsantrasyonda HU 7 gün süreyle uygulandı ve uygulama süresince kültür ortamı iki günde bir değiştirildi.

5.1.5. Çalışma Grupları

Çalışmada 4 grup bulunmaktadır

Grup 1: Herhangi bir uygulamaya yapılmayan RL95-2 hücreleri (Kontrol grubu)

Grup 2: HU uygulanan RL95-2 hücreleri

Grup 3: HU uygulanan RL95-2 hücrelerinin iMKH ile ko-kültürü

Grup 4: Herhangi bir uygulamaya yapılmayan RL95-2 hücrelerinin iMKH ile ko-kültürü

Immünositokimya ve X-gal boyaması çalışmaları için kullanılacak RL95-2 hücreleri 24 gözlü kültür kabına her bir gözde $1x10^4$ hücre olacak şekilde üzeri FBS ile kaplanmış 12 mm lik steril yuvarlak lameller üzerine ekimi yapıldı. PCR çalışması için kullanılacak RL95-2 hücreleri 6 gözlü kültür kabına her bir gözde $5x10^4$ hücre olacak şekilde ekildi. Grup 3 ve 4 çalışma grupları için iMKH 4 µm por çapına sahip olan Transwell membranlar (Corning Inc.,3491) üzerine her bir membranda $5x10^4$ hücre olacak şekilde ekimi gerçekleşti ve 2 gün hücrelerin yapışması beklendikten sonra iMKH bulunan transweller grup 3 için RL95-2 hücreleri üzerine HU uygulaması sonrası, grup 4 için ise RL95-2 hücreleri üzerine ise HU uygulanmadan transfer edildi ve tüm gruplar hücre ekiminden sonra 7 gün boyunca kültüre edildiler.

5.2. X-GAL BOYAMASI

Yaşlanma modelinin kontrolü için yaşlanma ilişkili ß-galaktosidaz aktivitesi ölçümü X-gal boyaması ile yapıldı. Tüm gruplara ait örnekler kültür süreleri sonunda RL95-2 hücreleri; 2mM $MgCl_2$ (Fluka,63063) içeren fosfat tampon solüsyonu (PBS,Bioshop,PBS404) içerisinde %4 oranında hazırlanan paraformaldehit (Merck,1.04004) ile 30 dk oda sıcaklığında fikse edildi ve 2mM $MgCl_2$ içeren PBS

ile 3 kez yıkanarak 37^0C'deki 200 µl X-gal boyama tampon solüsyonu [40 mM sitrik asit ((Likit kimya., 77-92-9), 150 mM NaCl (Surechem, S0102/R6), 5 mM potasyum ferrosiyanür ($K_4Fe(CN)_6$, Labshop41, 13746-66-2), 5 mM potasyum ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$, Zag Chem., 14459-95-1), 2 mM $MgCl_2$ (ph:6,0) monobazik sodyum fosfat (NaH_2PO_4 (Merck, 10634), 1 mg/ml X-gal ($C_{14}H_{15}BrClNO_6$, NZYtech, MB020501)] eklendi ve gece boyunca 37^0C'de nemli ortamda inkübe edildi. Daha sonra hücreler 2mM $MgCl_2$ içeren PBS ile 3'er kez, distile su ile bir kez yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksilen (Bio Optica, 1213) ile yapıldı ve sonrasında 3 kez distile su ile yıkanan örnekler 20 µl su bazlı kapatma mediumu (Spring bioscience-90226) bulunan lam üzerine alınarak ışık mikroskobu (Olympus BX40) altında incelendi.

X-gal boyaması sonrası boyanan hücreler 400X büyütmede her bir grupta 20 farklı alan sayılarak yüzdeleri belirlendi.

5.3. İMMÜNOSİTOKİMYA BOYAMASI

Kültür süreleri sonunda immünositokimya boyaması yapılmak üzere ekilen RL95-2 hücreleri %4 paraformaldehit (Merck-1.04004) içeren PBS solüsyonu ile 30 dk oda sıcaklığında fikse edildi ve daha sonra PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. Hücre permeabilizasyonu için tüm örnekler %0,1 Triton-X100 (Applichem, 4L003808) ile 15 dk buz üzerinde inkübe edildi. Örnekler 3 defa 5 dk PBS ile yıkandı ve hücre içi peroksidaz enzim aktivitesini inhibe etmek için %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck, K31355100303) içerisinde 10 dk tutuldu. Hücreler 3 defa 5 dk PBS ile yıkandıktan sonra bloklama solüsyonu (Novex Histostain Plus, 1838146A) eklenerek 1 saat süreyle oda sıcaklığında beklendi. Süre sonunda bloklama solüsyonu çekildi ve yıkama yapılmadan, 1/100 oranında seyreltilmiş primer antikorlar (anti-Lamin B1: Proteintech,12987-1-AP, anti-$P16^{Ink4a}$: Proteintech-10883-1-AP, anti-ki-67: Santa Cruz Biotech, sc-23900) ilave edildi ve $+4^O$C'de bir gece bekletildi. Ertesi sabah 3 defa 5 dk PBS ile yıkanan hücreler biotinlenmiş sekonder antikor (Novex Histostain Plus, 1838146A) eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi ve tekrar 3 defa 5 dk PBS ile yıkama işleminden sonra peroksidaz içeren Streptavidin (Novex Histostain Plus, 1838146A) solüsyonu eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra

örnekler 3 defa 5 dk PBS ile yıkandı ve immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak amacı için diaminobenzidin (DAB) (Scytek DAB-Kromojen Kit,36038) ile 4 dk boyandı. Tüm örnekler distile su ile 3'er kez yıkandı ve artalan boyaması için Mayer's hematoksilen (Bio Optica,1213) ile 4 dk boyandı ve distile su ile 3'er kez yıkandı. Tüm gruplardaki örneklerde yuvarlak lameller pens yardımıyla kuyucuklardan çıkartıldı ve lam üzerine 10-15 µl damlatılan immunohistokimya kapatma mediumu (Spring bioscience-90226) üzerine alındı ve ışık mikroskobu (Olympus IX40) altında görüntülendi.

İmmünositokimya boyaması sonrası hücreler 400X büyütmede her bir grupta en az 20 alanda sayılarak HSCORE analizi yapıldı.

5.4. ELISA ANALİZİ

ELISA analizi üretici firmanın belirlediği protokole uygun olarak yapıldı (Abbkine- Elikine Human IL-1α, KET6012, Elikine Human IL-6, KET6017). Tüm gruplara ait kültür vasatları inkübasyon sonunda toplandı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar yeni temiz tüplere aktarıldı, 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğunda 100'er µl olacak şekilde konuldu ve üzerlerine 100'er µl standart solüsyon konularak 2 saat karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki karışım çekilerek 3 kez yıkama tamponuyla yıkandı. Son yıkamanın ardından plak ters çevrilerek peçete üzerinde kurutuldu ve örnekler üzerine 100'er µl IL-6 veya IL-1α antikorları her kuyucuğa eklendi ve 1 saat karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama tamponuyla 3 kez tekrar yıkanan kuyucuklara 100'er µl streptavidin-peroksidaz solüsyonu eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüm kuyucuklar için 3 kez yıkama ve kurutma işlemi tekrarlandıktan sonra 100'er µl peroksidaz substratı her kuyucuğa ekledi ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek sarı renk oluşumu gözlendikten sonra spektrofotometre (Biotek, ELX800UV) cihazında 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak absorbans değerleri kaydedildi. Her bir örnek 3 tekrar olacak şekilde yapıldı ve analiz sonuçları 3 örneğin ortalaması alınarak elde edildi.

5.5. RNA IZOLASYONU, CDNA SENTEZI VE QPCR

RNA izolasyonu üretici firmanın belirttiği protokole göre yapıldı (Jena Biosciences- Total RNA Pürifikasyon Kiti, PP-210S). Her bir gruptaki hücreler steril hücre kazıyıcı ile toplandıktan sonra 300 µl lizis tamponu eklenerek karıştırıldı. Toplama tüpüne yerleştirilen spin kolonu üzerine 100 µl aktivasyon tampon solüsyonu eklenerek, 30 saniye 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı ve her bir örneğe 300 µl isopropanol (cat no, firma) eklendi ve vortekslenerek karışım kolona koyuldu. Örnekler 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve tüp içindeki fazla sıvı atıldı. Spin kolonuna 700 µl ethanol ve yıkama tampon solüsyonu eklenerek ve 10.000 rpm'de 30 saniye tekrar santifüj edilerek bağlanmayan maddeler kolondan temizlendi. Tüp içindeki fazla sıvı atılarak tekrar santrifüj yapıldı. Spin kolon DNAz/RNAz-free mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 50 µl elüsyon tampon solüsyonu ilave edilerek 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüm örnekler 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve RNA'lar -20^{0}C'de saklandı.

cDNA sentezi üreticinin belirttiği protokole uygun olarak yapıldı (Jena Biosciences, SCRIPT cDNA sentez kiti, PCR-511S). Elde edilen RNA'lar nükleaz-free mikrotüplere alınarak primerler, oligo-dT ve su eklenerek buz üzerinde karıştırıldı. Karışım üzerine 0.5 µl revers transkriptaz enzimi eklendi ve pipetleme işlemi gerçekleştirildi. Karışım termal ısıtma cihazına (Applied Biosystems, Stepone Plus) alınarak 10 dk 42^{0}C'de, 45 dk 50^{0}C'de inkübe edildi ve 10 dk 70^{0}C'de bekletilerek enzim inhibe edildi.

qPCR çalışması için IL-6 ve p16^{Ink4a} mRNA dizileri için uygun primerler web tabanlı yazılım programı primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) ile tasarlandı (IL-6-F: AACCTGAACCTTCCAAAGATGG, IL-6-R: TCTGGCTTGTTCCTCACTACT, p16-F: CCCCTTGCCTGGAAAGATAC, p16-R: AGGAAGAA AGAGGAGGGGCT). Housekeeping gen olarak Ribozomal RNA L41 geni seçildi (RPL41-F:GAAACCTCTGCGCCATGA, RPL41-R: TCTTTCTTCTTTTGCGCTTCA) (Popovici ve ark. 2009).

qPCR çalışmaları üreticinin belirttiği protokolü takip ederek yapıldı (Jena biosciences, PCR Sybrmaster, PCR-372). SYBR green içeren qPCR master mix, 50 ng cDNA ve ileri ve geri primerler 96 kuyucuklu PCR plağındaki kuyucuklara

koyularak PCR grade-su ile seyreltildi. Reaksiyon 1x50^{0}C-2dk, 1x95^{0}C-1dk, 40x (95^{0}C-15sn, 56^{0}C-20sn,72^{0}C-30sn) ve 98°C-5dk olacak şekilde ayarlandı. Veriler bilgisayardan alınarak, her bir örnek housekeeping genin ifadesine göre normalize edilerek, örnekler arasındaki ifade farkları $2^{\Delta Ct}$ hesaplamasına göre yapıldı.

5.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

X-gal boyamasının hesaplanması X-gal pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranlanmasıyla yapıldı. Işık mikroskobu altında 400X büyütmede her grupta en az 10 alanda sayılan hücrelerin yüzdesi belirlendi. Gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesi için non-parametrik varyans analizi yapıldı ve p değeri Kruskal-Wallis testi ile belirlendi. P değeri 0,05'ten küçük çıkan kıyaslamalar anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

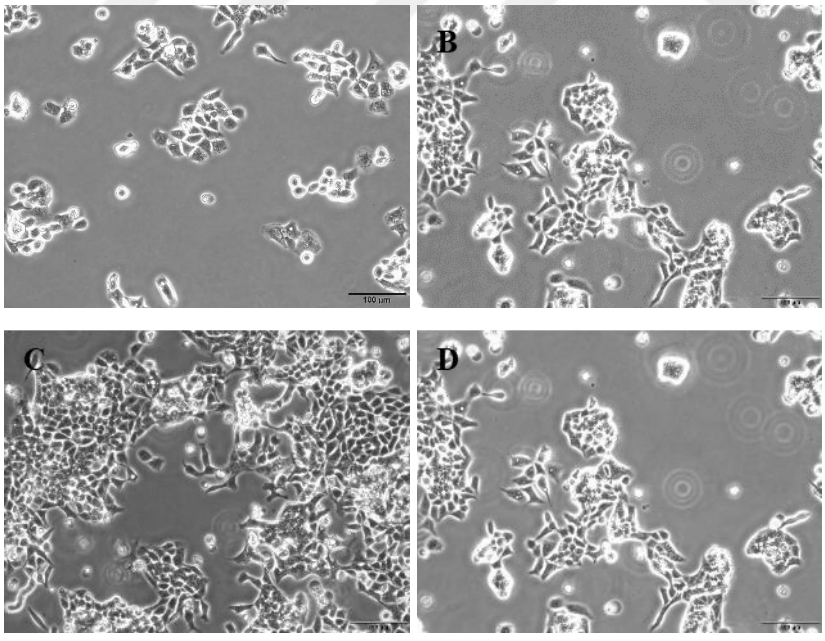
İmmünositokimya boyamalarının analizi HSCORE değerlendirme yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu kapsamda hücreler boyanma şiddetlerine göre negatif (-,0), zayıf (+,1), orta (++,2), ve şiddetli (+++,3) olarak boyanmalar değerlendirildi ve her derecedeki boyanan hücreler ışık mikroskobu altında 400X büyütmede sayıldı. H-skor hesaplama formülüne uygun şekilde yapılan hesaplamalar sonrasında gruplar arası farklılık non-parametrik varyans analizi ile yapıldı ve p değeri Kruskal-Wallis testi ile belirlendi. P değeri 0,05'ten küçük çıkan kıyaslamalar anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

Çalışmadaki istatistiki analizler GraphPad Prism versiyon 7 (GraphPad yazılımı, La Jolla California, ABD) aracılığıyla yapıldı.

6.BULGULAR

6.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI

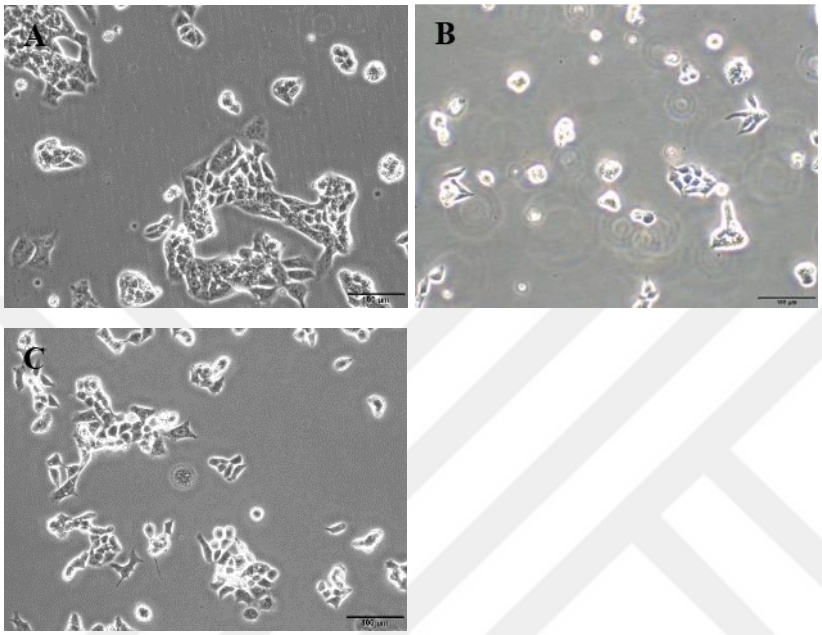
RL95-2 endometrial epitelyal hücreleri epiteloid benzeri karakterde, yer yer yuvarlak olarak gözlendi (Resim 3A). Hücreler iki günde bir vasat değişimi sonrası (Resim 3B) 7. Günde %70-80 konfluent oldukları gözlenmesi sonrasında (Resim 3C) pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama sonrası devam eden hücrelerin özelliklerini korudukları gözlendi (Resim 3D).



Resim 3. RL95-2 hücreleri kültürün 3. (A), 5. (B), 7. (C) ve 10. (D) günlerdeki faz kontrast görüntüleri. Ölçek: 100 µm.

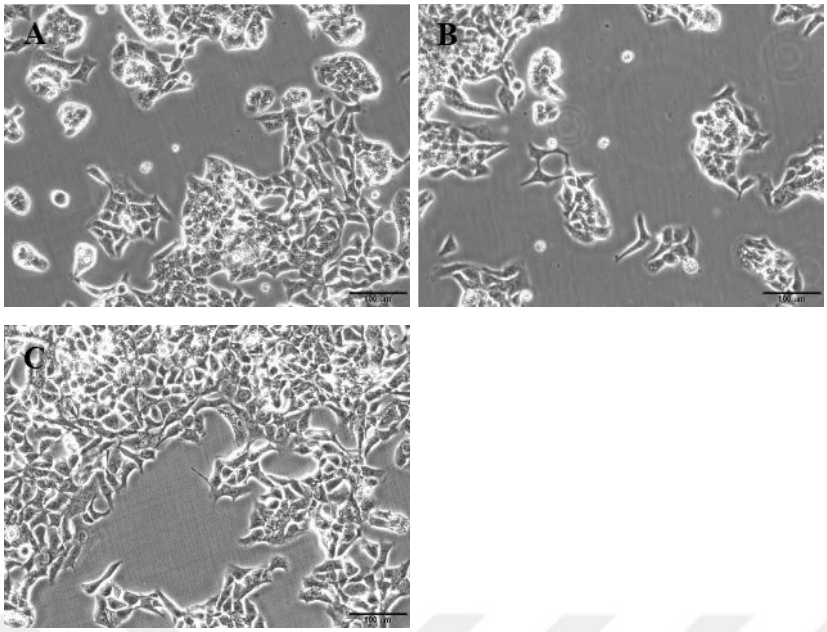
Deneysel yaşlanma modeli için HU ile doz belirleme çalışması sırasında RL95-2 hücrelerine 200 µM HU uygulanması sonrasında hücrelerde kültürün 3. gününde kısmı yassılaşma ve epiteloid yapının azaldığı gözlemlendi (Resim 4A). Kültüre devam

edildiğinde 5. Günde hücre sayısının azaldığı, hücrelerin ovalleştiği ve yer yer hücrelerin kültür kabından ayrıldığı gözlendi (Resim 4B). Kültürün 7. Gününde hücrelerin sayıca arttığı ve epiteloid yapının yer yer olduğu gözlense de HU uygulanmayan gruba benzerlik olduğu saptandı (Resim 4C).



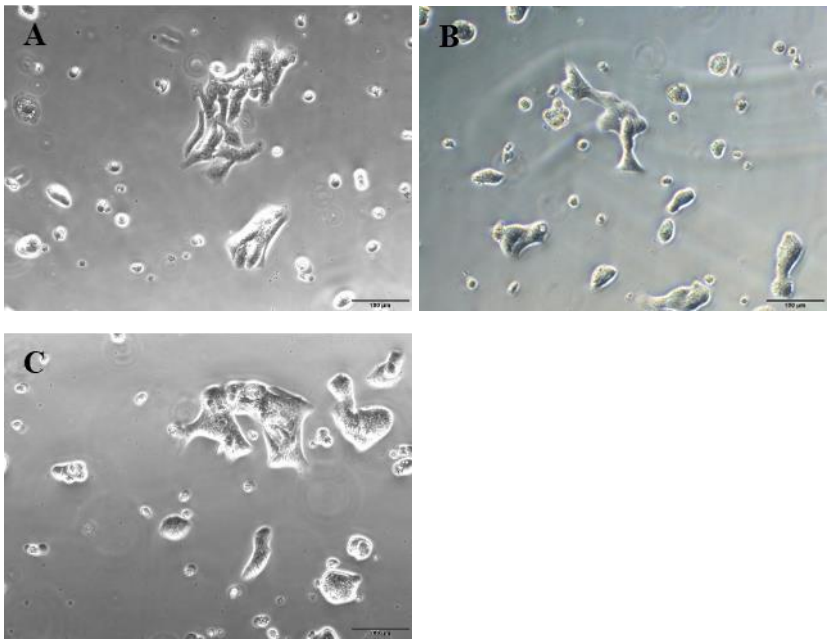
Resim 4. RL95-2 hücrelerine uygulanan 200 µM Hidroksiüre uygulamasının 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) günlerdeki faz kontrast görüntüleri. Ölçek: 100 µm

Deneysel yaşlanma modeli için 400 µM HU uygulaması sonrasında RL95-2 hücrelerinde kültürün 3. gününde hücrelerin boyutlarının büyüdüğü, yassılaştığı (Resim 5A), kültüre devam edildiğinde epiteloid yapının bozulduğu ve hücre içinde yer yer vakoulizasyonun oluştuğu gözlemlendi (Resim 5B, C).



Resim 5. RL95-2 hücrelerine uygulanan 400 µM Hidroksiüre uygulamasının 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) günlerdeki faz kontrast görüntüleri. Ölçek: 100 µm

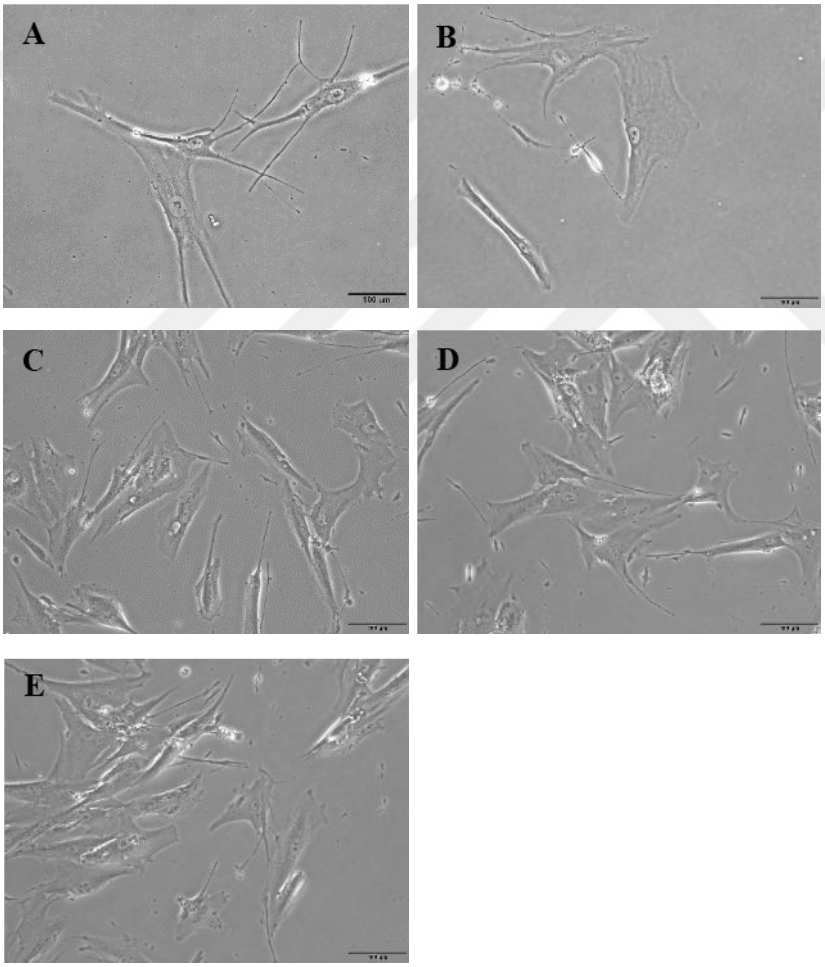
RL95-2 hücrelerine 800 µM HU uygulanması sonrasında kültürün 3. Gününden itibaren hücre sayısının azaldığı, hücre yapısının ovalleştiği (Resim 6A), kültüre devam edildiğinde hücre proliferasyonun beklenenin altında olduğu ve oval yüzen hücrelerin fazla olduğu saptandı (Resim 6B, C).



Resim 6. RL95-2 hücrelerine uygulanan 800 µM Hidroksiüre uygulamasının 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) günlerdeki faz kontrast görüntüleri. Ölçek: 100 µm

HU uygulaması sonrasında deneysel yaşlanma modeli için 400 µM HU kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.

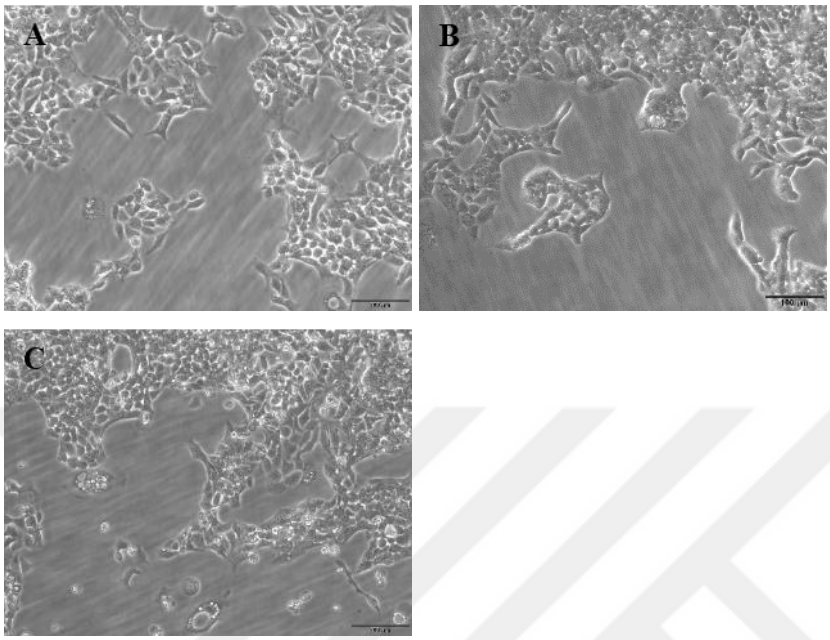
iMKH'leri çözdürüldükten sonra uygun kültür ortamında kültürü sonrasında kültürün 1. Gününde hücrelerin kültür kabına yapıştığı, kültüre devam edildiğinde fibroblast benzeri yapılarını koruduğu (Resim 7A), her iki günde bir vasatı değiştirilerek kültüre devam edildiğinde çoğaldığı (Resim 7B-D) ve kültürün 14. gününde %70 konfluent oldukları gözlendi (Resim 7E).



Resim 7. İnsan mezenkimal kök hücreleri (iMKH) kültürünün 3. (A), 5. (B), 7. (C), 10. (D) ve 14. (E) günlerdeki faz kontrast görüntüleri. Ölçek: 100 µm.

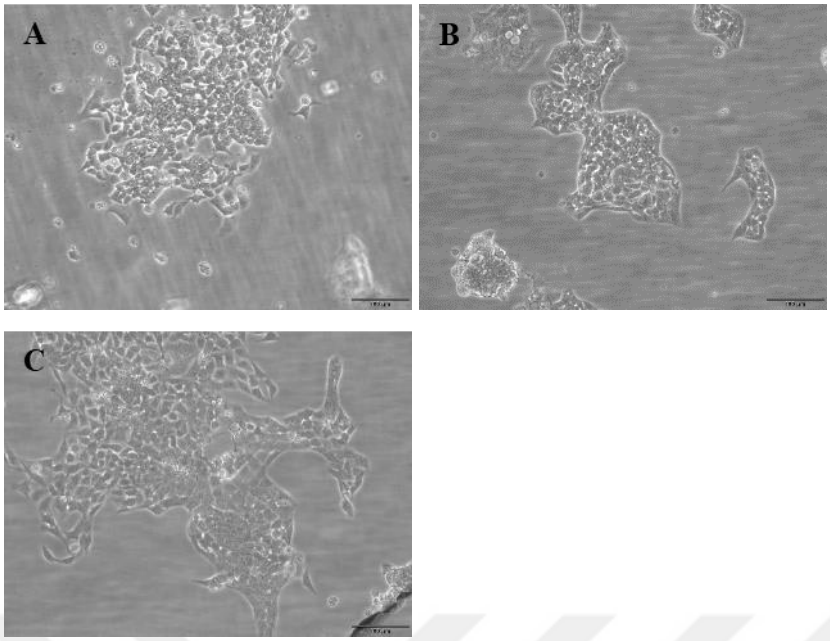
Eş zamanlı olarak yapılan RL95-2 ve iMKH'lerinin grup 3 ve grup 4 çalışma gruplarına uygun Şekilde ko-kültürü sonrasında, grup 3 RL95-2 hücrelerinde

vakoulizasyonun azaldığı ve epiteloid yapıda hücrelerin kültüre hâkim olduğu saptandı (Resim 8A-C).



Resim 8. RL95-2 hücrelerine 7 gün 400 µM Hidroksiüre uygulaması sonrası iMKH ile ko-kültürünün (Grup 3) 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) gün faz kontrast görüntüleri. Ölçek: 100 µm

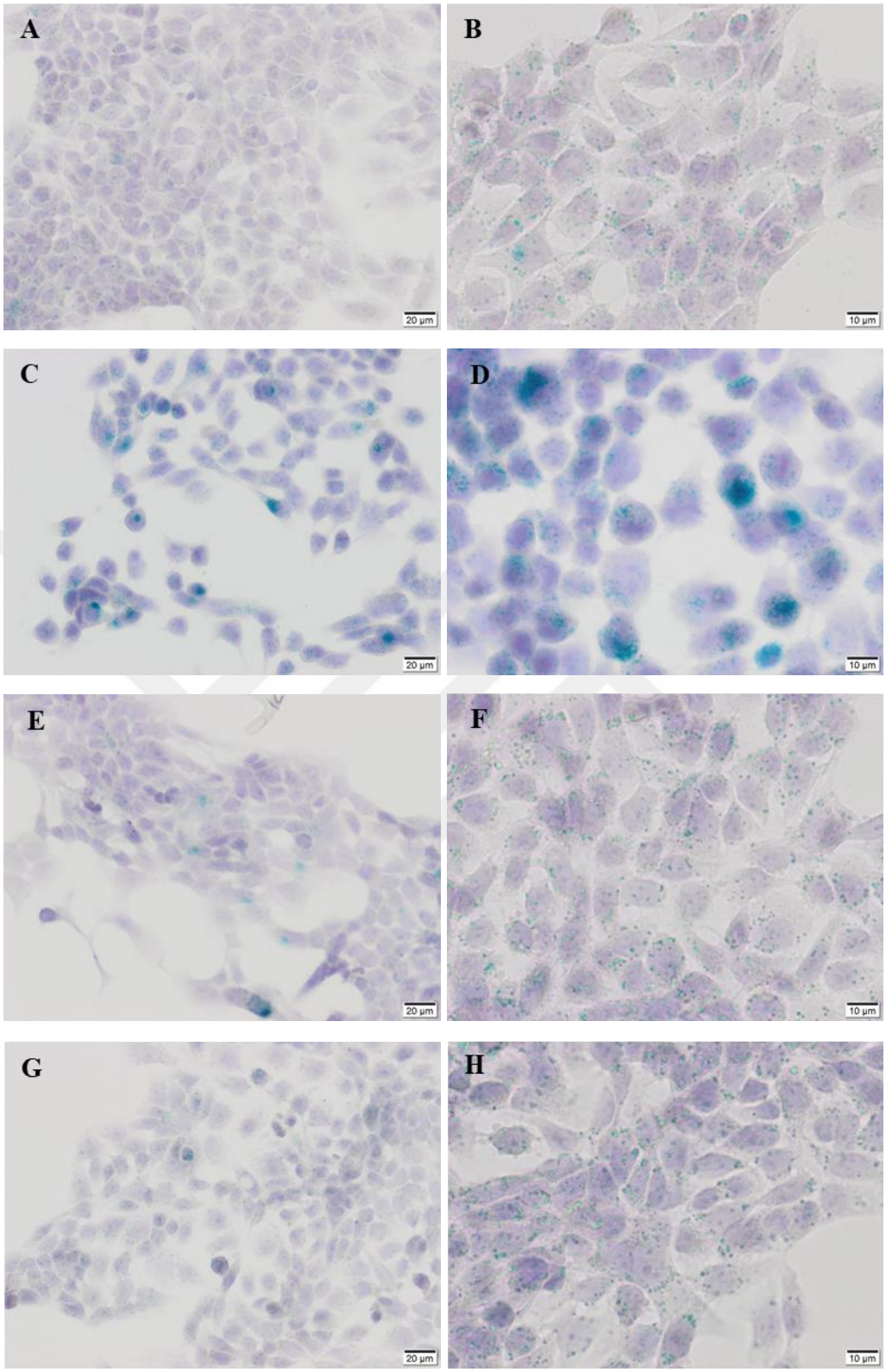
Grup 4 RL95-2 hücrelerinin ise grup 1 (kontrol) ile benzer Şekilde epiteloid yapısını koruduğu ve hücrelerin kültürüne devam edildiğinde benzer Şekilde olduğu saptandı (Resim 9A-C).



Resim 9. RL95-2 hücrelerine Hidroksiüre uygulanmadan yapılan iMKH ile ko-kültürünün (Grup 4) 3. (A), 5. (B) ve 7. (C) gün faz kontrast görüntüleri. Ölçek: 100 µm.

6.2. X-GAL BOYAMASI BULGULARI

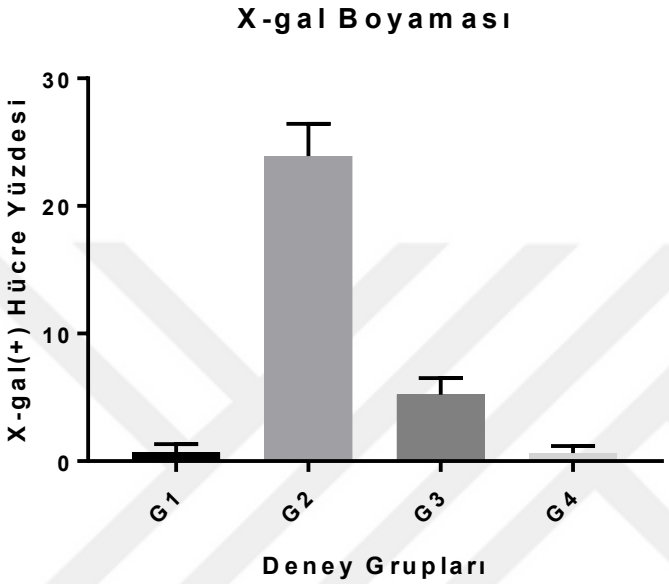
Yaşlanma ilişkili ß-galaktosidaz aktivitesinin ölçümü için yapılan X-gal boyaması sonrasında uygulama yapılmayan Grup 1 örneklerinde X-gal pozitif hücre oranı %1'den az iken (Resim 10 A, B, Tablo 1), HU uygulanan Grup 2 örneklerinde X-gal pozitif hücrelerinin sitoplazmalarının yeşil boyanmaları ile kolaylıkla ayırt edildiği ve X-gal pozitif hücre oranının yaklaşık %24 olduğu görüldü (Resim 10 C, D, Tablo 1). Grup 1 ve Grup 2 arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,01$). HU uygulamasına takiben iMKH ile ko-kültür yapılan Grup 3 örneklerinde X-gal boyanması sonrası yaklaşık %5 oranında boyanmış hücreler olmasına rağmen (Resim 10 E, F, Tablo 1), Grup 2 ile karşılaştırılması sonrasında X-gal pozitif hücre sayısının anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0,01$, Tablo 1, Şekil 6). HU uygulanma yapılmayan fakat iMKH'leri ile ko-kültür yapılan Grup 4 örneklerinde de X-gal pozitif hücre gözlenmedi (Resim 10 G, H, Tablo 1) ve kontrol grubu olan Grup 1 ile benzer olduğu, istatistiksel olarak da anlamlı farklılık olmadığı saptandı ($p>0,05$, Tablo 1, Şekil 6).



Resim 10. Çalışma gruplarında X-gal boyaması. A, B. Grup 1, C, D. Grup 2, E, F. Grup 3, G, H. Grup 4 Ölçek: 20 µm (A, C, E, G)-10 µm (B, D, F, H)

Tablo 1. Örnek gruplarındaki X-gal pozitif hücrelerin yüzdeleri.

Deney Grupları	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
X-gal+ %	0,68 ± 0,64	23,91 ± 2,48	5,22 ± 1,27	0,64 ± 0,53

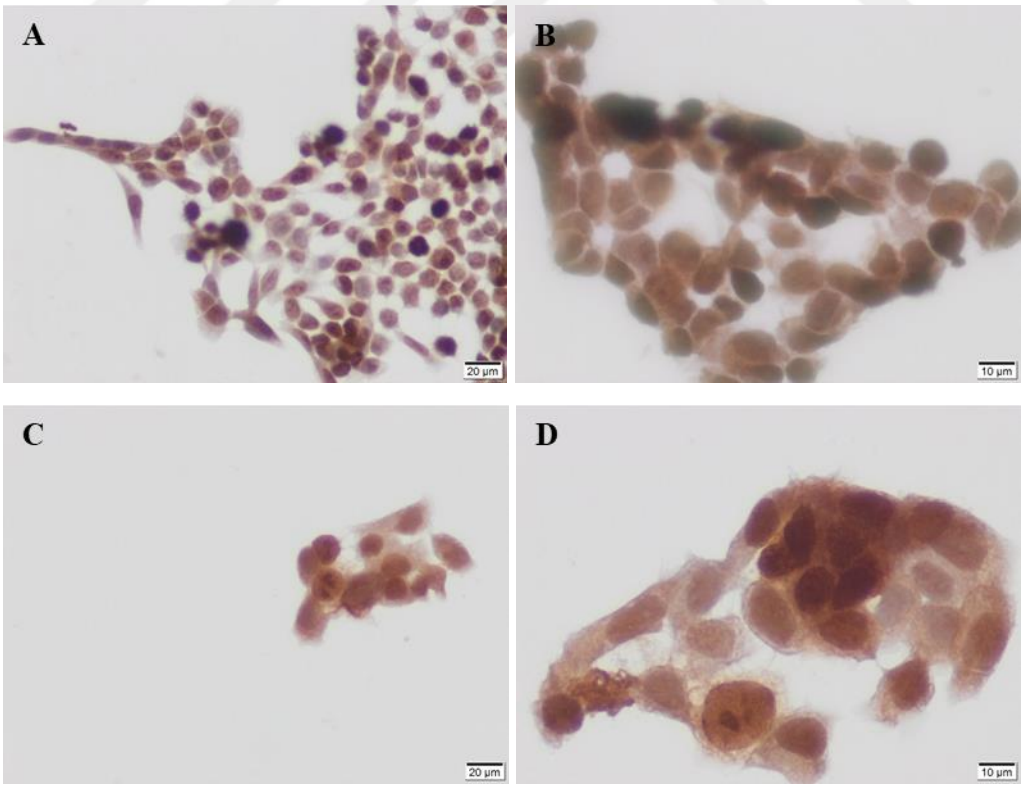


Şekil 6. Örnek gruplarındaki X-gal pozitif hücre yüzdeleri.

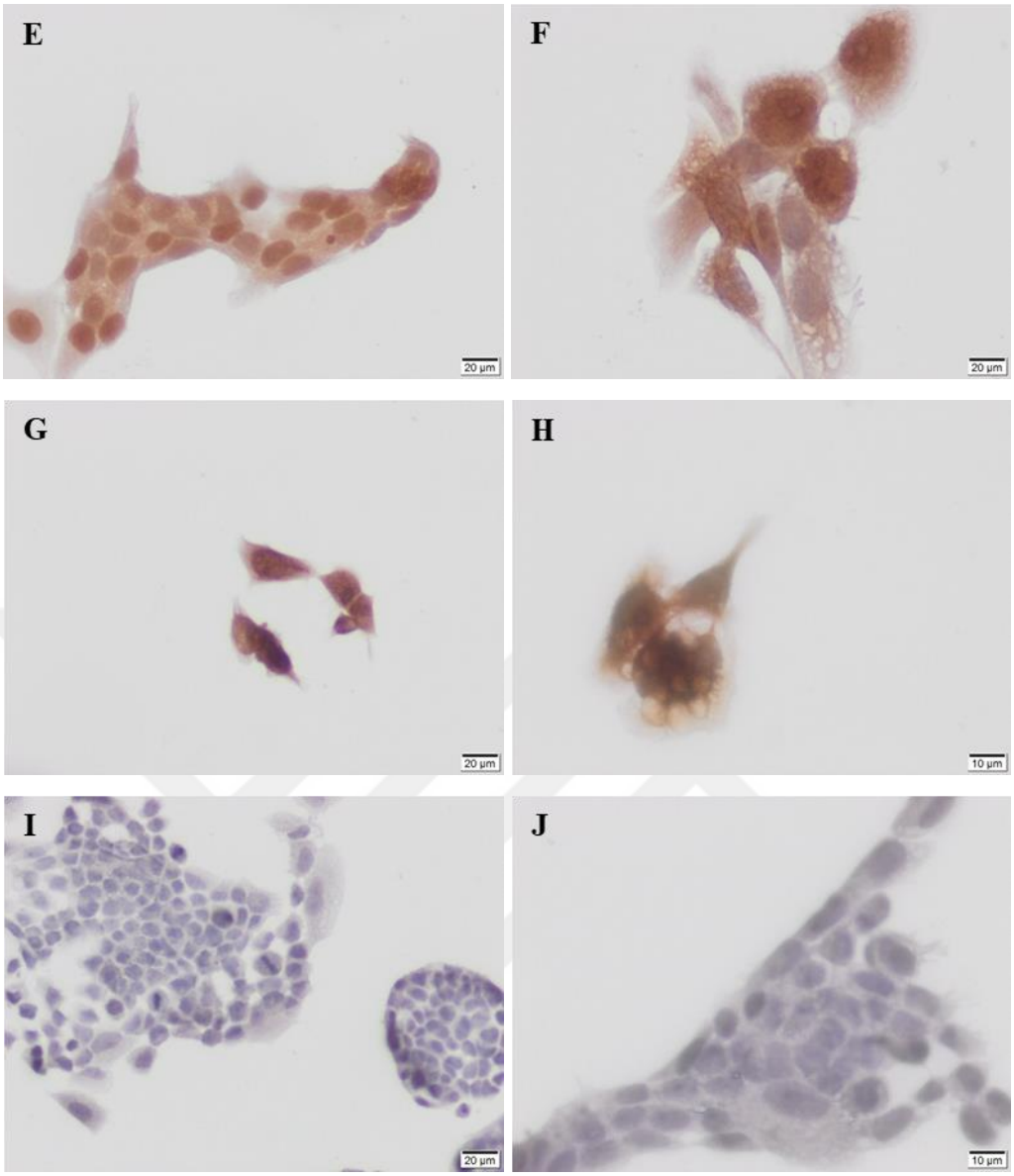
6.3. İMMÜNOSİTOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI

6.3.1. Ki-67 İmmünositokimyasal Dağılımı

HU uygulamasının farklı dozlarının hücre proliferasyonu üzerine etkileri Ki-67 immunoreaktivitesi ile değerlendirilmiştir. HU uygulanmayan RL-95 hücrelerinde ki-67 immunoreaktivitesi orta (++), yer yer şiddetli (+++) ve nadiren zayıf (-/+) pozitif boyanma gözlenir iken (Resim 11 A, B), 200 µM HU uygulanan hücrelerde ki-67 immunoreaktivitesinin zayıf (+), yer yer orta şiddette (++) pozitif olduğu görüldü (Resim 11 C, D) HU uygulamasının 400 (Resim 11 E, F) ve 800 µM (Resim 11 G, H) yapıldığı RL-95 hücrelerinde boyanmanın zayıf şiddette (+) pozitif olduğu saptandı.



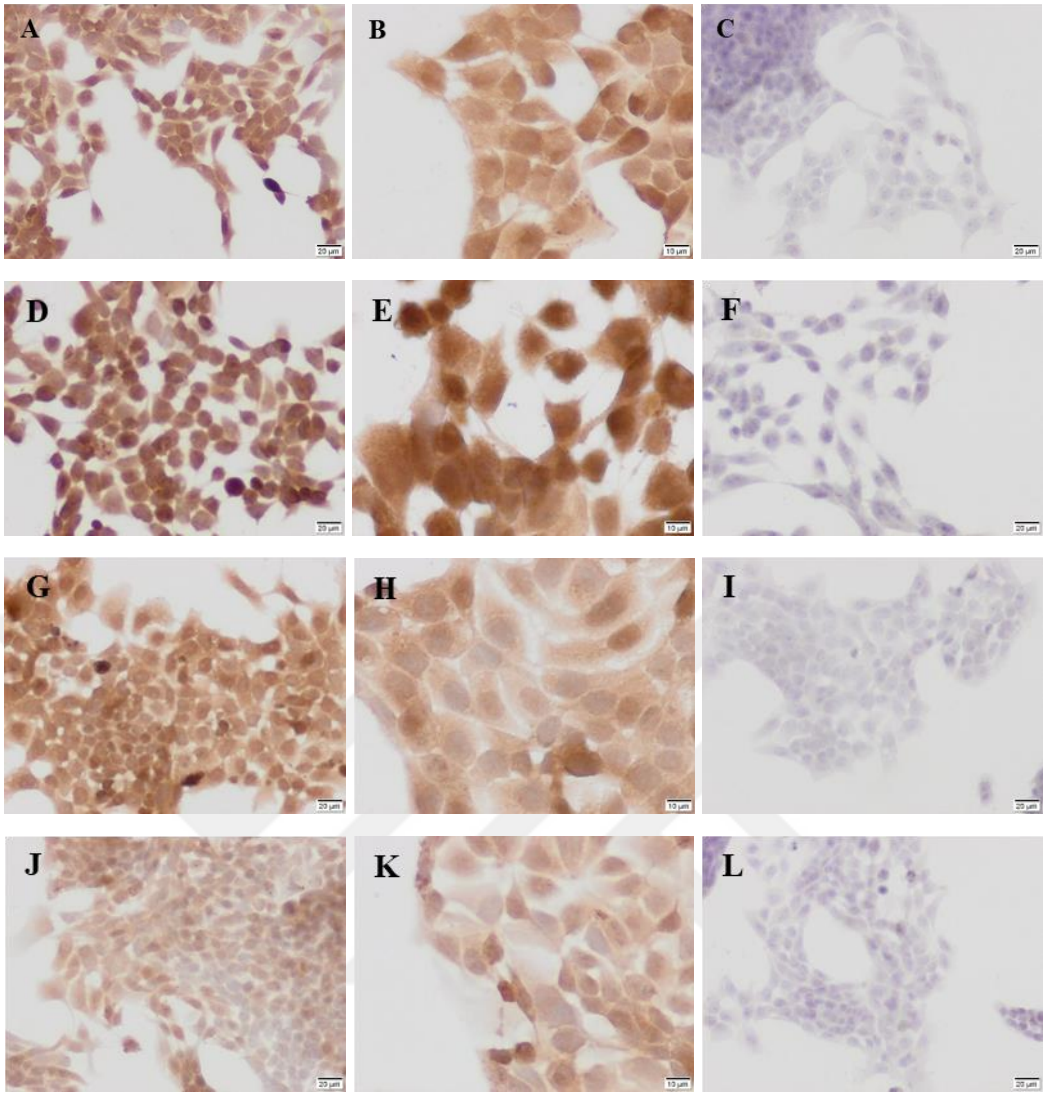
Resim 11. RL95-2 hücrelerinde HU uygulanmayan (A, B), 200 µM (C, D), 400 µM (E, F) ve 800 µM (G, H) uygulanan gruplarda ki-67 immünositokimyasal boyamaları. İmmünositokimya kontrol boyaması (I, J). Ölçek: 20 µm (A, C, E, G, I) 10 µm (B, D, F, H, J).



Resim 11. (devam) RL95-2 hücrelerinde HU uygulanmayan (A, B), 200 µM (C, D), 400 µM (E, F) ve 800 µM (G, H) uygulanan gruplarda ki-67 immünositokimyasal boyamaları. İmmünositokimya kontrol boyaması (I, J). Ölçek: 20 µm (A, C, E, G, I) 10 µm (B, D, F, H, J).

6.3.2. P16^{INK4a} İmmünositokimyasal Dağılımı

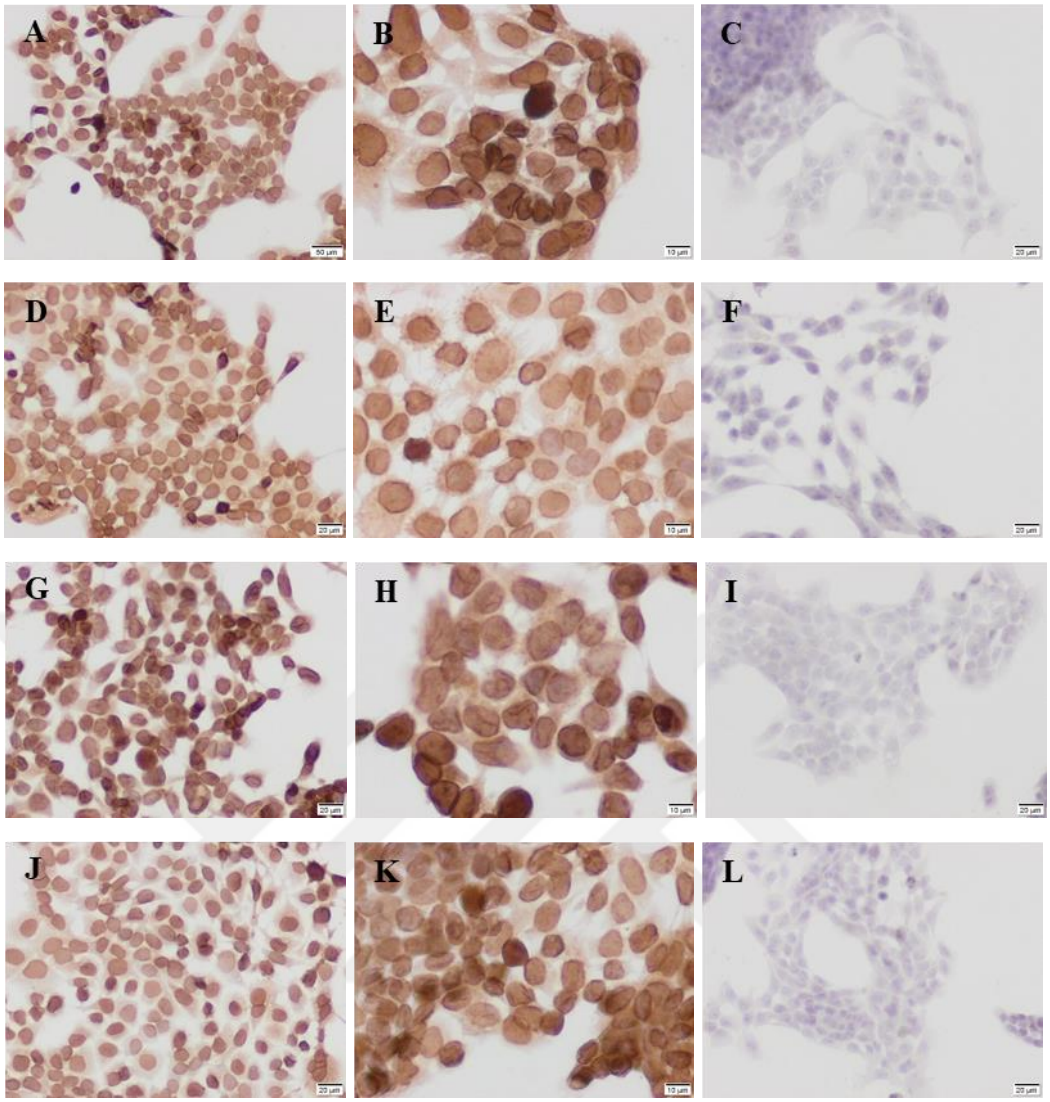
HU uygulanmayan RL95-2 hücrelerinde (Grup 1) p16^{INK4a} immunoreaktivitesi kuvvetli (+++) ve orta (++) yer yer bazı hücrelerin zayıf (+) şiddette pozitif olduğu izlendi (Resim 12 A, B) HSCORE analizi sonrasında immunoreaktivitenin 318,73 ± 2,70 olduğu görüldü (Tablo 2). HU uygulanan Grup 2 RL95-2 hücrelerinde p16^{INK4a} immunoreaktivitesinin kuvvetli (+++) ve orta (++) şiddette pozitif olduğu (Resim 12 D, E) ve HSCORE'un 339,67 ± 2,80 olduğu (Tablo 2) ve Grup 1 ile karşılaştırılması sonrası Grup 2 p16^{INK4a} immunoreaktivitesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,01$, Tablo 2, Şekil 7). HU uygulamasını takiben iMKH ile ko-kültür yapılan Grup 3 RL95-2 hücrelerinde p16^{INK4a} immunoreaktivitesinin orta (++) /zayıf (+), yer yer kuvvetli (+++) pozitif olduğu izlendi (Resim 12 G, H) ve HSCORE'un 278,14 ± 4,19 olduğu hesaplandı (Tablo 2). Hem Grup 1 hem de Grup 2 hücrelerinin immunoreaktivitesi ile kıyaslandığında Grup 3 hücrelerinin p16^{INK4a} immunoreaktivitesinin anlamlı bir Şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0,01$, Şekil 7). HU uygulama yapılmamış iMKH ile ko-kültür yapılan Grup 4 RL95-2 hücrelerinde p16^{INK4a} immunoreaktivitesinin zayıf (+), yer yer orta (++) /kuvvetli (+++) pozitif olduğu görüldü (Resim 12 J, K). Grup 4 örneklerinde p16^{INK4a} immunoreaktivitesinin HSCORE değerinin (271,14 ± 4,53) Grup 3 hücrelerine benzer seviyede ve Grup 1'den anlamlı derece azalmış olduğu hesaplandı (Tablo 2, Şekil 7).



Resim 12. Grup 1 (A-C), Grup 2 (D-F), Grup 3 (G-H) ve Grup 4 (J-L) RL95-2 hücrelerinde p16INK4a immünositokimyasal dağılımları. C, F, I, L: Kontrol immünositokimya. Ölçek: 20 µm (A, C, D, F, G, I, J, L), 10 µm (B, E, H, K).

6.3.3. Lamin-B1 İmmünositokimyasal Bulguları

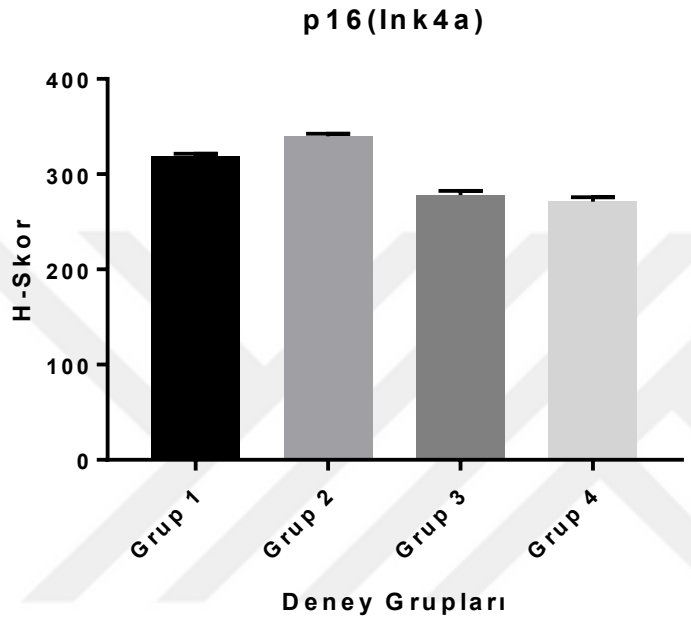
HU uygulanmayan Grup 1 örneklerinde Lamin-B1 immunoreaktivitesi orta (++) ve yer yer kuvvetli (+++) şiddette pozitif olarak gözlendi (Resim 13 A, B). HSCORE analizini sonrasında 338,76 ± 3,86 (Tablo 2) olarak hesaplandı. HU uygulanan Grup 2 örneklerinde Lamin-B1 immunoreaktivitesinin zayıf (+) ve yer yer orta (++) /kuvvetli (+++) şiddette pozitif ve (Resim 13 D, E) HSCORE değerinin 310,94 ± 3,74 olduğu hesaplandı (Tablo 2). Grup 1 ile kıyaslandığında Grup 2 RL95-2 hücrelerinin immunoreaktivitesinin anlamlı derece azaldığı görüldü ($p<0,01$, Tablo 2, Şekil 8). HU uygulamasına takiben iMKH ile ko-kültür yapılan Grup 3 örneklerinde Lamin-B1 immunoreaktivitesinin orta (++) / zayıf (+), yer yer kuvvetli (+++) şiddette pozitif olduğu, (Resim 13 G, H) HSCORE analizi sonucu immunoreaktivite yoğunluğunun 323,18 ± 4,90 olduğu hesaplandı (Tablo 2). Grup 3 örneklerinde Lamin-B1 immunoreaktivitesinde Grup 2'ye oranla artma olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,01$), Grup 1 ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$, Şekil 8). HU uygulanmadan iMKH ile ko-kültür yapılan Grup 4'te ise Lamin-B1 immunoreaktivitesinin zayıf (+) / orta (++), yer yer kuvvetli (+++) şiddette pozitif olduğu gözlendi (Resim 13 J, K). Lamin-B1 immunoreaktivite HSCORE'un 335,19 ± 3,96 olduğu (Tablo 2) ve diğer gruplarla kıyaslandığında Grup 4 hücrelerindeki Lamin-B1 immunoreaktivitesinin Grup 1'e benzer seviyede olduğu, Grup 2 ve 3'ten anlamlı bir şekilde fazla immunoreaktivite gösterdiği hesaplandı ($p<0,01$, Tablo 2, Şekil 8).



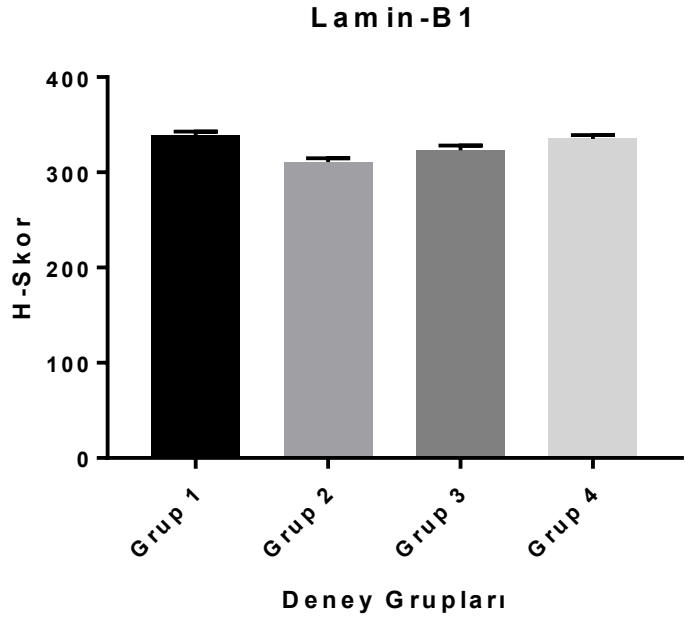
Resim 13. Grup 1 (A-C), Grup 2 (D-F), Grup 3 (G-H) ve Grup 4 (J-L) RL95-2 hücrelerinde Lamin-B1 immünositokimyasal dağılımları. C, F, I, L: Kontrol immünositokimya. Ölçek: 20 µm (A, C, D, F, G, I, J, L), 10 µm (B, E, H, K).

Tablo 2. Çalışma gruplarında $p16^{Ink4a}$ ve Lamin-B1 immünositokimyasal dağılımlarının HSCORE Analizi sonrası değerleri.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
$p16^{Ink4a}$	318,73 ± 2,70	339,67 ± 2,80	278,14 ± 4,19	271,14 ± 4,53
Lamin-B1	338,76 ± 3,86	310,94 ± 3,74	323,18 ± 4,90	335,19 ± 3,96



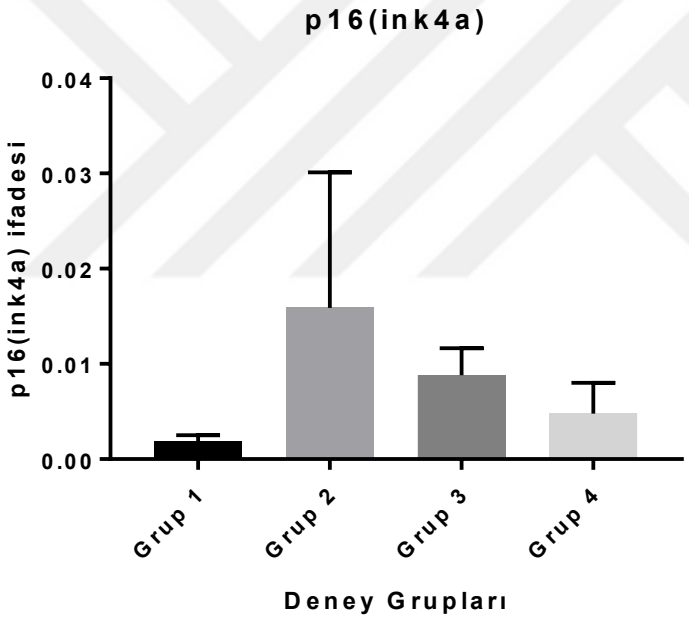
Şekil 7. Çalışma gruplarının $p16^{INK4a}$ immunoreaktivitesinin HSCORE değerleri



Şekil 8. Çalışma gruplarının Lamin-B1 immunoreaktivitesinin HSCORE değerleri.

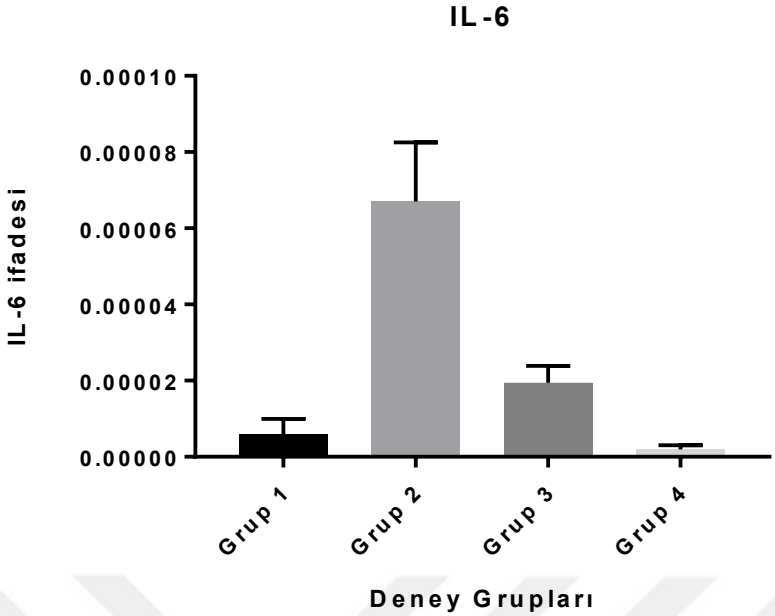
6.4. Q-RT PCR BULGULARI

HU uygulanan Grup 2 hücrelerinde, uygulama yapılmayan Grup 1'e kıyasla $p16^{INK4a}$ geninin ifadesinde ortalama sekiz kat bir artış gözlendi (Şekil 9). HU uygulamasını takiben iMKH ile ko-kültür yapılan Grup 3'ün $p16^{INK4a}$ ifadesi Grup 2'ye kıyasla azalmış iken Grup 1'den daha fazla ifade edildiği tespit edildi. Grup 4 hücrelerinin $p16^{INK4a}$ ifadesi Grup 1 hücrelerine benzer seviyede hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 9. $p16^{INK4a}$ geni ifadesinin q-RT PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi (RPL-41'e göre $2^{-\Delta cT}$ değerleri)

HU uygulanan Grup 2 hücrelerinde IL-6 ifadesinin en fazla olduğu, uygulama yapılmayan Grup 1'e kıyasla IL6 geninin ifadesinde ortalama 11 kat bir artış olduğu gözlendi (Şekil 10). HU uygulamasını takiben iMKH ile ko-kültür yapılan Grup 3'de ise IL-6 ifadesinin Grup 1'e oranla üç kat artmış, grup 2'ye oranla ise yaklaşık dört kat azalmış olduğu saptandı (Şekil 10). Grup 4 hücrelerinde IL-6 ifadesi ise diğer gruplara nazaran en az olduğu görüldü (Şekil 10).



Şekil 10. IL-6 geni ifadesinin q-RT PCR sonuçlarının gruplara göre değişimi (RPL-41'e göre $2^{-\Delta cT}$ değerleri)

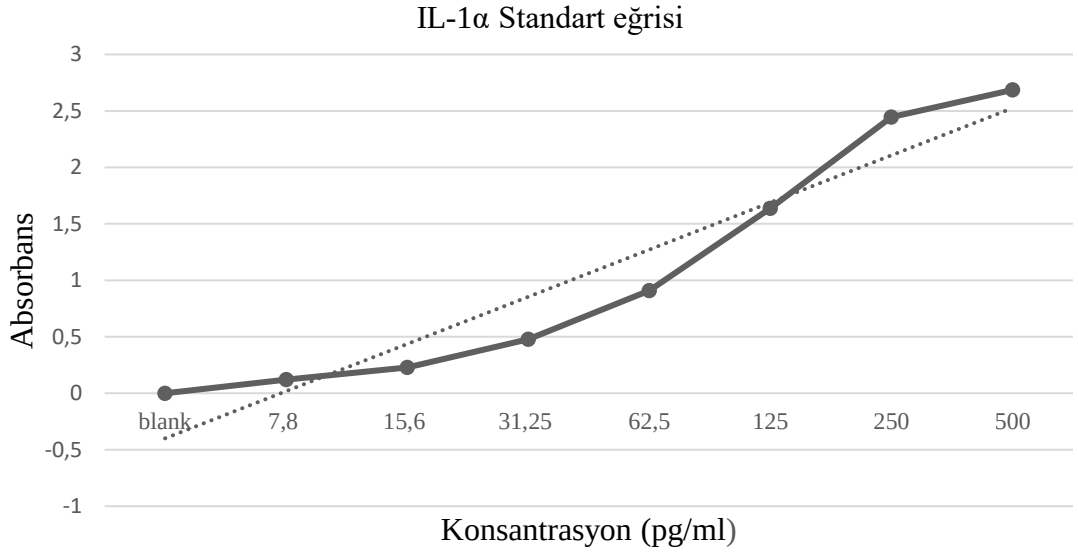
6.5. ELISA BULGULARI

6.5.1. IL-1α ELISA Bulguları

HU uygulaması yapılan RL95-2 hücrelerinde (Grup 2) IL-1α proteini ifadesinde uygulama yapılmayan hücrelere (Grup 1) kıyasla 2 kat artış tespit edilmiş olup (Tablo 4, Şekil 12) bu artış istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0,05$). HU uygulamasına takiben iMKH'leri ile ko-kültür yapılan Grup 3 RL95-2 hücrelerinde Grup 2'ye kıyasla IL-1α proteini ifadesinin azaldığı, Grup 1 seviyesi ile benzer olduğu gözlendi (Tablo 4, Şekil 12). HU uygulaması yapılmayan fakat iMKH ko-kültürü yapılan RL95-2 hücrelerinde (Grup 4) IL-1α seviyesinin Grup 1 RL95-2 hücreleri ile benzer olduğu (Tablo 4) ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$, Şekil 12, Tablo 4)

Tablo 3. IL-1α proteinin pozitif kontrol olarak kullanılan farklı konsantrasyonlarındaki standartlarının absorbans değerleri.

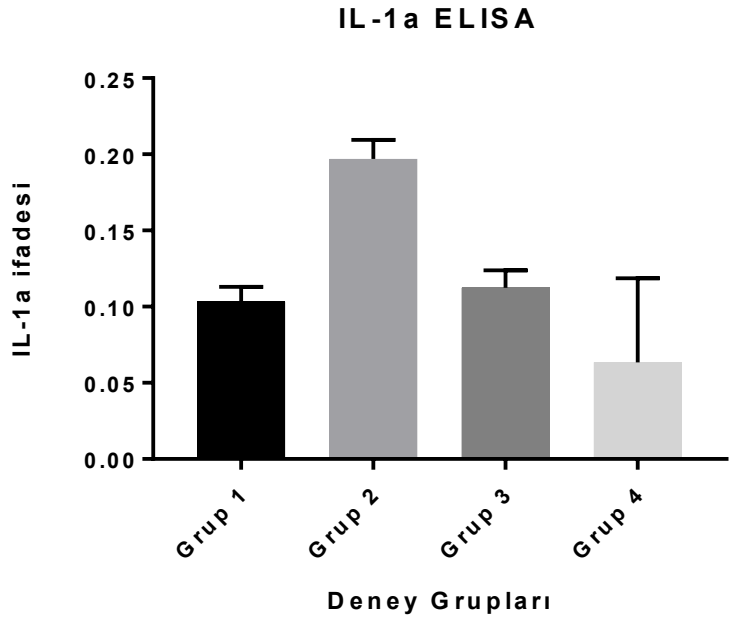
Konsantrasyon (pg/ml)	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	Blank
Absorbans	2,956 ± 0,055	2,715± 0,030	1,907± 0,074	1,179± 0,043	0,747± 0,064	0,500± 0,005	0,390± 0,013	0,270± 0,018



Şekil 11. IL-1α proteinin standart eğrisi grafiği. Spektrofotometre cihazında 450 nm' de okunan absorbans değerlerinden blank okuma değerlerinin çıkarılmasıyla elde edilen normalize veriler ile yukarıdaki standart eğri grafiği çıkarılarak okumaların güvenirliği doğrulanmıştır

Tablo 4: Deney gruplarının okumalarında IL-1α absorbans değerleri

Deney Grupları	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Absorbans	0,103 ± 0,007	0,197 ± 0,010	0,112 ± 0,009	0,063 ± 0,045



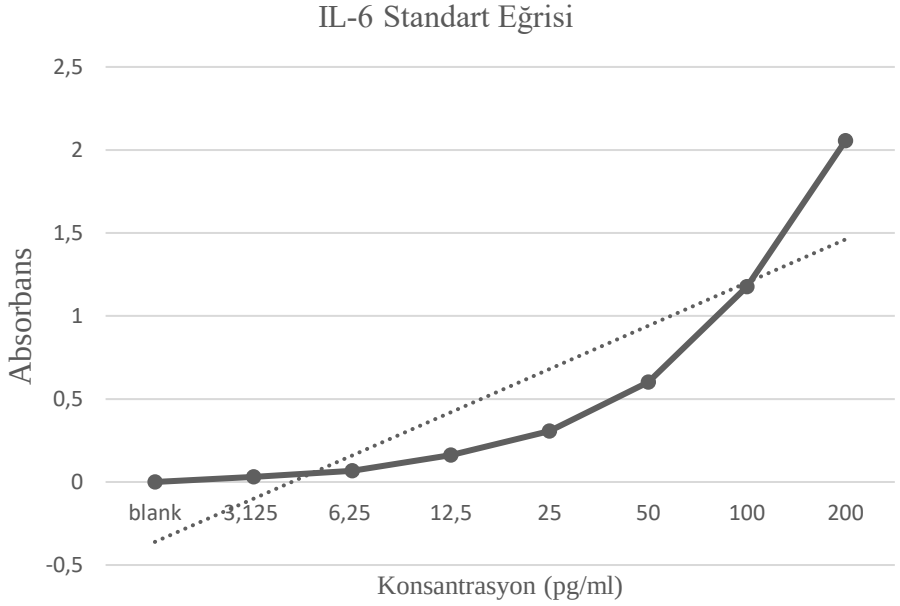
Şekil 12. IL-1α proteinin deney gruplarındaki ifadesi.

6.5.2. IL-6 ELISA Bulguları

HU uygulaması yapılan Grup 2 RL95-2 hücrelerinde kontrol grubu olan Grup 1 ile kıyaslandığında IL-6 proteini ifadesinde 4 kata yakın artış tespit edilmiş olup (Tablo 6, Şekil 14) bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). HU uygulamasına takiben iMKH'leri ile ko-kültür yapılan Grup 3 örneklerinde IL6 proteinin ifadesi Grup 2 'ye kıyasla anlamlı bir azalma ($p<0,01$) gözlenirken ($p<0,05$), Grup 1'e nazaran IL-6 seviyesinin hala yüksek olduğu ve istatistiksel olaraktan anlamlı olduğu ($p<0,01$) görüldü (Tablo 6, Şekil 14). HU uygulaması yapılmayan fakat iMKH ile ko-kültür yapılan Grup 4 RL95-2 hücreleri ile Grup 1 örneklerinin arasında IL-6 ifadesi seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$, Tablo 6, Şekil 14).

Tablo 5. IL-6 proteinin pozitif kontrol olarak kullanılan farklı konsantrasyonlarındaki standartlarının absorbans değerleri.

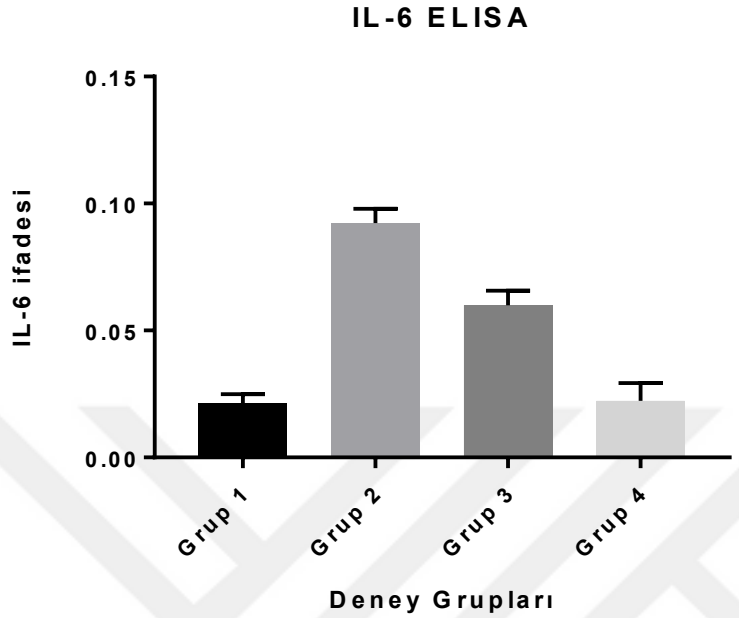
Konsantrasyon (pg/ml)	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	Blank
Absorbans	2,126± 0,093	1,247± 0,006	0,673± 0,024	0,377± 0,004	0,231± 0,000	0,138± 0,011	0,102± 0,002	0,070± 0,008



Şekil 13. IL-6 proteininin Standart eğrisi grafiği. Spektrofotometre cihazında 450 nm' de okunan absorbans değerlerinden blank okuma değerlerinin çıkarılmasıyla elde edilen normalize veriler ile yukarıdaki standart eğri grafiği çıkarılarak okumaların güvenirliği doğrulanmıştır.

Tablo 6. Deney gruplarının okumalarında IL-6 absorbans değerleri

Deney Grupları	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Absorbans	0,021 ± 0,002	0,092 ± 0,004	0,06 ± 0,004	0,022 ± 0,005



Şekil 14. IL-6 proteinin deney gruplarındaki ifadesi.

7. TARTIŞMA

Hücresel yaşlanma, hücre döngüsünün kalıcı olarak arreste alınarak hücrenin proliferasyonu durdurmasıdır (Campisi ve di Fagagna 2007). Fizyolojik olarak hücresel yaşlanma; reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi (Chen ve Ames 1994, Kiyoshima ve ark. 2012) veya belirli bir hücre bölünme sayısından sonra telomerlerin yeterli uzunlukta olmamasından kaynaklanan DNA hasarına cevaben gelişebilir (di Fagagna ve ark. 2003, Takai ve ark. 2003, Von Zglinicki ve ark. 2005). Evrimsel açıdan hücresel yaşlanma, hücrenin onkojenik stres altındayken kansere dönüşmesini engelleyecek bir mekanizma olarak gelişmiştir (Sager 1991). Ancak yaşlanmaya bağlı olarak gelişen sekretuvar fenotip (SASP), doğrudan veya dolaylı olarak inflamasyonu teşvik etmektedir (Coppé ve ark. 2010, Campisi ve ark. 2011) ve yaşa bağlı gelişen hem dejeneratif hem de hiperplastik hastalıkların temelinde bu fenotipin olduğu tahmin edilmektedir (Coppé ve ark. 2010, Davalos ve ark. 2010, Campisi ve ark. 2011).

Fizyolojik yaşlanma olmaksızın, hücrelerin in vitro deneysel yaşlandırılması için bir dizi kimyasal, moleküler ve fiziksel teknikler geliştirilmiştir. Bunun için mor ötesi ışınlar ile DNA çift zincir kırıkları oluşturarak, reaktif oksijen türleri aracılığıyla oksidatif stresi artırarak, p53, $p16^{Ink4a}$ gibi hücresel yaşlanmada önemli yolakları moleküler tekniklerle aktive ederek hücresel yaşlanma modeli geliştirilebilir. Bunlara ilaveten hidroksiüre (HU), cisplatin, doxorubicin gibi antikanser ajanlar da DNA üzerinde hasara sebep olarak hücresel yaşlanmaya sebep olmaktadırlar.

HU; tirozin radikalini parçalayarak ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe eder. Ribonükleotid redüktaz enzimi ribonükleotidlerdeki riboz halkasından 2'hidroksil grubunu koparark deoksiribonükleotidlerin sentezini katalize eden enzimdir. HU ile inhibisyonu sonucunda DNA sentezi için gerekli deoksiribonükleik asitler ortamda azalır ve DNA replikasyonu sırasında kırıklar oluşur.

Çalışmamızda deneysel yaşlanma modeli oluşturmak için uygun dozu belirlemek amacıyla ilk önce RL95-2 hücreleri 200 µM, 400 µM ve 800 µM olacak dozlarda HU ile 7 gün muamele edilmişler ve sonrasında X-gal ve anti-ki67 antikoruyla boyanarak incelenmişlerdir. Bu boyamalar neticesinde 200 µM doz HU uygulanması sonucu hücrelerin yapısında önemli bir değişim gözlenmemiş (Resim 4), X-gal boyaması sonucu boyanan hücrelerin sayısında da anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Ki67 immünoreaktivitesinde kontrole kıyasla kısmi bir azalma tespit edilmiştir (Resim 11 C, D). Bununla beraber 400 µM HU uygulaması sonrası hücreler daha büyük ve yassı bir morfoloji ve sitoplazmalarında vakoul gözlenirken (Resim 5) X-gal pozitif hücre sayısı artmış idi (Resim 10 C, D, Şekil 6). Ki67 immünoreaktivitesi hem kontrole hem de 200 µM HU uygulamasına göre daha zayıftı (Resim 11 E, F). HU'nun 800 µM uygulaması sonrasında hücrelerin epiteloid yapılarının bozularak ovalleştiği (Resim 6) ve hücre sayılarının azaldığı tespit edilirken bu dozun toksik etki gösterdiği düşünüldü. Ki67 immünoreaktivitesi de zayıf şiddetteydi (Resim 11 G, H). Çalışmanın bu kısmında 400 µM HU uygulaması hem toksisitesi az olduğu için hem de yaşlanmanın temel belirteçlerinden olan X-gal pozitivitesi ve hücrelerin morfolojilerinin uygunluğundan dolayı deneysel modelde bu dozun kullanılmasına karar verilmiştir.

$p16^{Ink4a}$, siklin-bağımlı kinaz 4/6 (CDK4/6) inhibitörüdür ve hücre siklusu düzenlenmesinde anahtar bir role sahiptir. Hücrenin G1 fazından S fazına geçişini baskılayarak proliferasyonu engeller. $p16^{Ink4a}$ yokluğunda CDK4/6 siklin D'ye bağlanarak aktif kompleks oluşturur ve pRB'yi fosforile ederler. pRB fosforile olunca bağlı bulunduğu E2F1 transkripsiyon faktöründen ayrılır. Ayrılan E2F1 proteini sitoplazmadan nükleusa geçer ve G1'den S fazına geçiş için gerekli hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır. Yaşlanan hücrelerde bu aşamanın baskılanmasından dolayı $p16^{Ink4a}$ ifade seviyeleri yükselir (Collins ve Sedivy 2003, Ohtani ve ark. 2004). E2F1'in hedeflediği genlerden birisi nükleer laminanın yapısal proteinlerinden birisi olup birçok epigenetik düzenlemede rol alan LaminB-1 proteinidir. Yaşlanan hücrelerde artan $p16^{Ink4a}$ ifadesindeki artışa bağlı olarak azalan pRB ve E2F1 aracılığıyla Lamin-B1 ifadesinde azalma görülür.

RL95-2 hücrelerine 7 gün boyunca 400 µM HU geliştirilen Grup 2 endometrial yaşlanma modelinde hem qRT-PCR ile hem de immünositokimya boyaması ile tespit edilen siklin-bağımlı kinaz inhibitörü $p16^{Ink4a}$ seviyelerinin kontrol grubu olan Grup

1'e kıyasla artması (Resim 12 D-F, Şekil 9) ve Lamin-B1'in ise azalması (Resim 13 D-F) uygulama sonrası hücre siklusunun askıya alındığını ve yaşlanma modelinin oluşturulabildiğini göstermektedir.

İmplantasyon sırasında blastokistin uterusa alınması için endometrium epiteli ile trofektoderm arasındaki moleküler düzenlenim önemlidir (Lejeune ve ark. 1981, Finch ve Holinka 1982). Yaşlanan endometriumda özellikle kollajen gibi ekstra-selüler matriks proteinlerinin anormal düzenlenmesi, bağlantı komplekslerinin oluşumunda aksaklıklara sebep olarak stromal-desidual dönüşümünü engelleyerek implantasyonda başarısızlıklara veya implantasyon gerçekleşse dahi devam eden süreçte plasenta oluşumunda aksaklıklara sebep olarak düşük riskini artırabilir (Mulholland ve Jones 1993). O nedenle endometrial problemlerde implantasyon direkt etkilenebilmektedir. Yaşla birlikte endometrial değişikliklerin gözlenmesi implantasyon başarısızlıkları ile sonuçlandığından, endometrial hücrelerdeki hücre yaşlanmasını önleyici ya da endometrial kabul edilebilirliği arttırıcı uygulamalar önemli olacaktır.

Erişkin kök hücreler embriyonik gelişim sonrasında tüm vücutta bulunur (Maruyama ve ark. 2010). Kendini yenileme ve hasar görmüş dokunun onarımında kritik rol oynama potansiyelleri vardır ve böylelikle organ ve dokuların fonksiyonel devamlılığına katkıda bulunurlar. Benzer olaylar endometrium için de geçerlidir. Her menstrüal döngüde büyük miktarlarda doku ve kan damarı gelişimi gerçekleşir (Patel ve ark. 2008). Yani menstrüasyonu takiben proliferasyon aşaması başlar ve gebelik gerçekleşmezse stratum fonksiyonalis tabakası tekrar atılır. Bu tabakanın rejenerasyonundan erişkin kök hücreler ve progenitör hücrelerin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Gargett ve Masuda 2010). Endometriumdaki kök hücrelerin bir kısmı glandular epiteli ve stromayı oluşturan ve fetal dönemden kalan kök hücreler iken kemik iliğinden endometriuma gelen kök hücreler de vardır (Sasson ve Taylor 2008). Kemik iliği kaynaklı kök hücreler; hematopoetik kök hücre ve mezenşimal kök hücre olmak üzere iki gruptur. Mezenkimal kök hücrelerin endometriuma göç ettiği ve anjiyogenez ve transdiferasyon ile buradaki yeni hücre popülasyonu oluşturduğuna yönelik bulgular mevcuttur (Taylor 2004). Doku yenilenmesine katkıları dışında mezenkimal kök hücreler çok çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler salgılayarak parakrin etkiyle yakınlarındaki diğer hücreleri uyarırlar (Caplan ve Dennis 2006). Biyoaktif moleküllerin bu tür fonksiyonel sekresyonları çevredeki hücrelerin

dinamiklerinde önemli etkilere neden olabilir. Örneğin mezenkimal kök hücrelerin oluşturduğu kemik iliği stroması sadece hücrelerin tutunması için bağ doku yüzeyi oluşturmakla kalmaz, ayrıca vasküler ve hematopoetik hücreler için oldukça yönlendiricidir (Williams ve ark. 1990). Kemik iliğindeki stroma-kısıtlı nişlerde hematopoetik yolakların farklı kollarına dallanması, büyük oranda mezenkimal kök hücrelerin büyüme faktörü/sitokin kontrolü ve desteği ile yönlendirilir (Majumdar ve ark. 1998).

Çalışmamızda HU uygulaması ile yaşlandırılan ve sonrasında iMKH'leri ile ko-kültür yapılarak yaşlanma belirtileri tekrar kontrol edilen Grup 3 endometrial hücrelerinde X-gal pozitif hücre oranı, Grup 2'ye kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır (Resim 10 E, F). Buna ilaveten Grup 3'te $p16^{Ink4a}$ ifade seviyeleri hem qRT-PCR hem de immünositokimya boyaması sonuçlarında Grup 2'ye göre azalırken (Resim 12 G, H, Şekil 9), Lamin-B1 ifadesinin arttığı gözlenmiştir (Resim 13 G, H). Bu bulgular doğrultusunda deneysel hücresel yaşlanma modeli geliştirilen RL95-2 endometrial epitelyal hücreleri, iMKH'leri ile ko-kültür yapıldığında, kök hücrelerin sentezlediği faktörlere cevaben hücresel yaşlanmanın gerileyebildiği, tekrar proliferasyonun gerçekleşebildiği söylenebilir.

Hücresel yaşlanmanın önemli fenotiplerinden birisi olan sekreteuvar fenotipin öne çıkan sitokinlerinden IL-1α ve IL-6'nın değerlendirmesi, hücrelerin toplanan kültür vasatlarında ELISA analizi ile yapılmıştır. Grup 2 hücrelerinin vasatlarında Grup 1'e kıyasla yükselmiş seviyede IL-1α ve IL-6 seviyelerinin tespit edilmesi (Şekil 12, Şekil 14), hücresel yaşlanmanın bir başka doğrulayıcısıdır. Diğer deneylerde olduğu gibi iMKH'leri ile ko-kültürü sonrasında Grup 3'te Grup 2'ye kıyasla bu sitokinlerin kültür vasatındaki ifadelerinin azalması (Şekil 12, Şekil 14), kök hücreler aracılığıyla hücresel yaşlanmanın ve sekretuvar fenotipin baskılandığının bir diğer göstergesidir. IL-6'ya ait ELISA bulguları, aynı zamanda qRT-PCR ile de doğrulanmıştır (Şekil 10).

Kronik inflamasyon bir çok dejeneratif hastalığa ve kansere sebep olabilir (Grivennikov ve ark. 2010, Nathan ve Ding 2010). Ayrıca yaşlanan dokuların ortak özelliği sekretuvar fenotiptir ve bu sekresyonlar kronik inflamasyona sebep olur (Franceschi ve ark. 2007). Yaşlanmaya bağlı inflamasyonun kaynağı belirsizdir. Yaşa bağlı olarak bozulan immün homeostazisten kaynaklı olabileceği gibi (McElhaney ve

Effros 2009), dokudaki sayıları artan yaşlı hücrelerin sekresyonlarına verilen fizyolojik immün cevap aracılığıyla da olabilir (Coppé ve ark. 2010). IL-1α iyi karakterize olmuş proinflamatuvar bir sitokindir ve bir çok dejeneratif hastalık sürecinde önemli rollere sahiptir (Eastgate ve ark. 1988, Libby ve ark. 2002). IL-6 inflamatuvar ve ateroskleroz (Gadó ve ark. 2000), multipl myelom (Dubiński ve Zdrojewicz 2007), Behçet hastalığı (Hirohata ve Kikuchi 2012) gibi birçok oto-immün hastalık sürecini tetikleyen bir sitokindir. Mezenkimal kök hücrelerin anti-inflamatuvar etkileriyle bu hastalıklar üzerinde olumlu etkiler göstermesi gibi, hücresel yaşlanma üzerinde de yaşlanmanın zararlarını azaltıcı etkileri olduğu düşünülmektedir (Kim ve ark. 2009, Zhang ve ark. 2017). Mezenkimal kök hücreleri; vasküler-endotelyal büyüme faktörü (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF)-ß1, TGF-ß2, hepatosit büyüme faktörü (HGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), platelet-türetilmiş büyüme faktörü (PDGF), plasental büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri salgılamaktadır (PARK ve ark. 2008, Madrigal ve ark. 2014, Naaldijk ve ark. 2015). Endometrial yaşlanma modeli üzerine mezenkimal kök hücrelerin proliferatif etkisinin hangi büyüme faktörü aracılı yolak üzerinden gerçekleştiğini tespit etmek için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Sonuç olarak deneysel yaşlanma modelinde endometrial özellikler iMKH ‘den salgılanan faktörler ile geriletilebilmiş, hücresel döngü yeniden tetiklenmiş olmasından dolayı, endometrial yaşlanma modeline benzer endometrial hücrelerde problemleri olan in vivo modellerde veya klinikte mezenkimal kök hücre ürünlerinin kullanılması uygun olabilecektir. Özellikle kök hücre uygulamaları sonrasında görülebilecek hücre farklılaşması, hücrelerin ortamda devamlılığının sağlanamaması, farklılaşmada istenilen hücrenin elde edilememesi, hücre-hücre iletişimdeki problemler gibi birçok olayın gerçekleşebileceği öngörüsü ile, hücrelerin hücresel mekanizmalarının tetiklenmesine ihtiyaç olan durumlarda kök hücre uygulamalarından ziyade kök hücre salgı ürünlerinin uygulanmasının toksisitenin azaltılması, istenmeyen hücrelerin eliminasyonu, immün cevabın tetiklenmemesi vb. açısından uygun olabileceği sonucuna varıldı.

In vitro yapılan bu çalışma sonuçlarının deneysel in vivo hayvan modellerinde denenmesi, uygulama sonrasında endometriumun implantasyon başarısının da analiz

edilmesi gereklidir. Özellikle bu çalışma verileri doğrultusunda insan çalışmalarına ön çalışma olacak ileri çalışmaların planlanması uygun olacaktır.

8. KAYNAKLAR

Abdalla, H. I., et al. (1990). "A report on 100 cycles of oocyte donation; factors affecting the outcome." Human Reproduction **5** (8): 1018-1022.

Acosta, J. C., et al. (2008). "Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence." Cell **133** (6): 1006-1018.

Adams, P. D. (2009). "Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence." Molecular cell **36** (1): 2-14.

Agarwal, A., et al. (2015). "A unique view on male infertility around the globe." Reproductive Biology and Endocrinology **13** (1): 37.

Al Qaisi, T. (2010). Embryology of the Female Reproductive Tract.

Alimonti, A., et al. (2010). "A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis." The Journal of clinical investigation **120** (3): 681-693.

Antinori, S., et al. (1993). "Pregnancy: Oocyte donation in menopausal women." Human Reproduction **8** (9): 1487-1490.

Barbieri, R. L. and J. F. Strauss (2014). Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management, Elsevier Saunders.

Bavik, C., et al. (2006). "The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms." Cancer research **66** (2): 794-802.

Beauséjour, C. M., et al. (2003). "Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways." The EMBO journal **22** (16): 4212-4222.

Bensaad, K., et al. (2006). "TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis." Cell **126** (1): 107-120.

Bernstein, E. F., et al. (2004). "The polyhydroxy acid gluconolactone protects against ultraviolet radiation in an in vitro model of cutaneous photoaging." Dermatologic surgery **30** (2): 189-196.

Bianco, P., et al. (2001). "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications." Stem cells **19** (3): 180-192.

Binder, M. D., et al. (2009). "Encyclopedia of neuroscience."

Blackburn, E. H. (1991). "Structure and function of telomeres." nature **350** (6319): 569.

Blagosklonny, M. V. (2003). "Cell senescence and hypermitogenic arrest." EMBO reports **4** (4): 358-362.

Bond, J., et al. (1996). "Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence." Oncogene **13** (10): 2097-2104.

Borlon, C., et al. (2007). "The gene expression profile of psoralen plus UVA-induced premature senescence in skin fibroblasts resembles a combined DNA-damage and stress-induced cellular senescence response phenotype." Experimental gerontology **42** (9): 911-923.

Braig, M. and C. A. Schmitt (2006). "Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development." Cancer research **66** (6): 2881-2884.

Brock, D. and S. Holloway (1990). "Fertility of older women." Lancet **335** (8703): 1470.

Campisi, J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." Annual review of physiology **75**: 685-705.

Campisi, J., et al. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? Seminars in cancer biology, Elsevier.

Campisi, J. and F. d. A. di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nature reviews Molecular cell biology **8** (9): 729.

Canute, G. W., et al. (1998). "The hydroxyurea-induced loss of double-minute chromosomes containing amplified epidermal growth factor receptor genes reduces

the tumorigenicity and growth of human glioblastoma multiforme." Neurosurgery **42** (3): 609-616.

Caplan, A. I. (1994). "The mesengenic process." Clinics in plastic surgery **21** (3): 429-435.

Caplan, A. I. and J. E. Dennis (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." Journal of cellular biochemistry **98** (5): 1076-1084.

Carlson, B. M. (2012). Human Embryology and Developmental Biology E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access, Elsevier Health Sciences.

Carneiro, T., et al. (2010). "Telomeres avoid end detection by severing the checkpoint signal transduction pathway." nature **467** (7312): 228.

Chang, B.-D., et al. (2002). "Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent." Proceedings of the National Academy of Sciences **99** (1): 389-394.

Check, J. H., et al. (1994). "The use of a shared donor oocyte program to evaluate the effect of uterine senescence." Fertility and sterility **61** (2): 252-256.

Chen, Q. and B. N. Ames (1994). "Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **91** (10): 4130-4134.

Chen, Q. M., et al. (2001). "Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts." Experimental cell research **265** (2): 294-303.

Chung, H. Y., et al. (2009). "Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases." Ageing research reviews **8** (1): 18-30.

Cimadomo, D., et al. (2018). "Impact of maternal age on oocyte and embryo competence." Frontiers in endocrinology **9**.

CMagarelli, P., et al. (1996). "Discrimination between chronological and ovarian age in infertile women aged 35 years and older: predicting pregnancy using basal follicle stimulating hormone, age and number of ovulation induction/intra-uterine insemination cycles." Human reproduction **11** (6): 1214-1219.

Collins, C. J. and J. M. Sedivy (2003). "Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence." Aging cell **2** (3): 145-150.

Collins, K. (2000). "Mammalian telomeres and telomerase." Current opinion in cell biology **12** (3): 378-383.

Coppé, J.-P., et al. (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annual Review of Pathological Mechanical Disease **5**: 99-118.

Coppé, J.-P., et al. (2006). "Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence." Journal of Biological Chemistry.

Davalos, A. R., et al. (2010). "Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression." Cancer and Metastasis Reviews **29** (2): 273-283.

de Gruijl, F. R., et al. (2001). "UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **63** (1-3): 19-27.

Dechat, T., et al. (2008). "Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin." Genes & development **22** (7): 832-853.

Deng, Q., et al. (2004). "High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts." Journal of Biological Chemistry **279** (2): 1050-1059.

Dhar, R., et al. (2002). "Steroids Modulate the Expression of α4 Integrin in Mouse Blastocysts and Uterus During Implantation1." Biology of Reproduction **66** (6): 1784-1789.

di Fagagna, F. d. A., et al. (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." nature **426** (6963): 194.

Di Leonardo, A., et al. (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." Genes & development **8** (21): 2540-2551.

Dimitriadis, E., et al. (2000). "Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukaemia inhibitory factor and prolactin." MHR: Basic science of reproductive medicine **6** (10): 907-914.

Dominici, M., et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8** (4): 315-317.

Dubiński, A. and Z. Zdrojewicz (2007). "The role of interleukin-6 in development and progression of atherosclerosis." Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego **22** (130): 291-294.

Eastgate, J., et al. (1988). "Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis." The Lancet **332** (8613): 706-709.

Elmes, M., et al. (2015). "Maternal age effects on myometrial expression of contractile proteins, uterine gene expression, and contractile activity during labor in the rat." Physiological reports **3** (4).

Elzi, D. J., et al. (2012). "Wnt antagonist SFRP1 functions as secreted mediator of senescence." Molecular and cellular biology: MCB. 06023-06011.

Emiliani, S., et al. (2005). "Embryo–maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive treatment." Reproductive biomedicine online **10** (4): 527-540.

Enders, A. C. and S. Schlafke (1969). "Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation." American Journal of Anatomy **125** (1): 1-29.

Erices, A., et al. (2000). "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." British journal of haematology **109** (1): 235-242.

Fatemi, H. and B. Popovic-Todorovic (2013). "Implantation in assisted reproduction: a look at endometrial receptivity." Reproductive biomedicine online **27** (5): 530-538.

Feinberg, R. F., et al. (1994). "Transforming growth factor-beta stimulates trophoblast oncofetal fibronectin synthesis in vitro: implications for trophoblast implantation in vivo." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **78** (5): 1241-1248.

Finch, C. and C. Holinka (1982). "Aging and uterine growth during implantation in C57BL/6J mice." Experimental gerontology **17** (3): 235-241.

Fisher, G. J., et al. (2002). "Mechanisms of photoaging and chronological skin aging." Archives of dermatology **138** (11): 1462-1470.

Flamigni, C., et al. (1993). "Infertility: Oocyte donation: comparison between recipients from different age groups." Human Reproduction **8** (12): 2088-2092.

Franceschi, C., et al. (2007). "Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans." Mechanisms of ageing and development **128** (1): 92-105.

Freund, A., et al. (2012). "Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker." Molecular biology of the cell **23** (11): 2066-2075.

Freund, A., et al. (2010). "Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences." Trends in molecular medicine **16** (5): 238-246.

Fumagalli, M., et al. (2012). "Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation." Nature cell biology **14** (4): 355.

Gadó, K., et al. (2000). "Role of interleukin-6 in the pathogenesis of multiple myeloma." Cell biology international **24** (4): 195-209.

García-Gómez, I., et al. (2010). "Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications." Expert opinion on biological therapy **10** (10): 1453-1468.

Gargett, C. E. and H. Masuda (2010). "Adult stem cells in the endometrium." Molecular human reproduction **16** (11): 818-834.

Grivennikov, S. I., et al. (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." Cell **140** (6): 883-899.

Gronthos, S., et al. (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences **97** (25): 13625-13630.

Group, R. E. A. S. P. C. W. (2004). "Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)." Human reproduction **19** (1): 41-47.

Guzick, D., et al. (1998). "Efficacy of treatment for unexplained infertility." Fertility and sterility **70** (2): 207-213.

Hampel, B., et al. (2006). "Increased expression of extracellular proteins as a hallmark of human endothelial cell in vitro senescence." Experimental gerontology **41** (5): 474-481.

Hans, R. (2007). "The potential of stem cells: An inventory." Human biotechnology as Social Challenge, England, Ashgate Publishing, Ltd **28**.

Hayflick, L. (1965). "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains." Experimental cell research **37** (3): 614-636.

Healy, D. L., et al. (1994). "Female infertility: causes and treatment." The Lancet **343** (8912): 1539-1544.

Hirohata, S. and H. Kikuchi (2012). "Changes in biomarkers focused on differences in disease course or treatment in patients with neuro-Behçet's disease." Internal Medicine **51** (24): 3359-3365.

Horikawa, I., et al. (1998). "Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence." Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center **22** (2): 65-72.

Hutter, E., et al. (2004). "Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts." Biochemical Journal **380** (3): 919-928.

Ichihashi, M., et al. (2003). "UV-induced skin damage." Toxicology **189** (1-2): 21-39.

Jagger, A., et al. (2014). "Regulatory T cells and the immune aging process: a mini-review." Gerontology **60** (2): 130-137.

Jones, R. L., et al. (2000). "Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy and in women using progestin-only contraception." MHR: Basic science of reproductive medicine **6** (12): 1107-1117.

Kang, M. K., et al. (2003). "Senescence-associated genes in normal human oral keratinocytes." Experimental cell research **287** (2): 272-281.

Kennedy, T. G. (1979). "Prostaglandins and Increased Endometrial Vascular Permeability Resulting from the Application of an Artificial Stimulus to the Uterus of the Rat Sensitized for the Decidual Cell Reaction1." Biology of Reproduction **20** (3): 560-566.

Kim, N. W., et al. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." Science **266** (5193): 2011-2015.

Kim, W.-S., et al. (2009). "Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors." Journal of dermatological science **53** (2): 96-102.

Kiyoshima, T., et al. (2012). "Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts." International journal of molecular medicine **30** (5): 1007-1012.

Kobayashi, A. and R. R. Behringer (2003). "Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals." Nature Reviews Genetics **4** (12): 969.

Kochevar, I. (1995). "Molecular and cellular effects of UV radiation relevant to chronic photodamage." Photodamage: 51-67.

Kodaman, P. H. and H. S. Taylor (2004). "Hormonal regulation of implantation." Obstetrics and Gynecology Clinics **31** (4): 745-766.

Kolettis, P. N. (2003). "Evaluation of the subfertile man." American family physician **67** (10): 2165-2172.

Kosak, S. T., et al. (2002). "Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development." Science **296** (5565): 158-162.

Krakoff, I. H., et al. (1968). "Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea." Cancer research **28** (8): 1559-1565.

Krausz, C. (2011). "Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis." Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism **25** (2): 271-285.

Krtolica, A., et al. (2011). "GROα regulates human embryonic stem cell self-renewal or adoption of a neuronal fate." Differentiation **81** (4): 222-232.

Kuilman, T., et al. (2008). "Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network." Cell **133** (6): 1019-1031.

Kurz, D. J., et al. (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." Journal of cell science **113** (20): 3613-3622.

Kühnel, W. (2003). Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy, Georg Thieme Verlag.

Laberge, R.-M., et al. (2012). "Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts." Cancer Microenvironment **5** (1): 39-44.

Laser, J., et al. (2010). "Cellular senescence in usual type uterine leiomyoma." Fertility and sterility **93** (6): 2020-2026.

Lassmann, G., et al. (1992). "EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea." Biochemical and biophysical research communications **188** (2): 879-887.

Lee, R. H., et al. (2006). "Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice." Proceedings of the National Academy of Sciences **103** (46): 17438-17443.

Lejeune, B., et al. (1981). "Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of decidualization in rats." Reproduction **61** (1): 235-240.

Levine, A. J., et al. (1991). "The p53 tumour suppressor gene." nature **351** (6326): 453.

Levy, M. Z., et al. (1992). "Telomere end-replication problem and cell aging." Journal of molecular biology **225** (4): 951-960.

Libby, P., et al. (2002). "Inflammation and atherosclerosis." Circulation **105** (9): 1135-1143.

Liggett Jr, W. H. and D. Sidransky (1998). "Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer." Journal of clinical oncology **16** (3): 1197-1206.

Lighten, A. D., et al. (1998). "Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture." Human reproduction **13** (11): 3144-3150.

Lim, H., et al. (2002). "Molecules in blastocyst implantation: uterine and embryonic perspectives."

Lim, M.-A., et al. (2014). "Increased Th17 differentiation in aged mice is significantly associated with high IL-1β level and low IL-2 expression." Experimental gerontology **49**: 55-62.

Liu, H., et al. (2007). "Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging." Science **317** (5839): 803-806.

Lodish, H., et al. (1995). Molecular cell biology, WH Freeman New York.

Madrigal, M., et al. (2014). "A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods." Journal of Translational Medicine **12** (1): 260.

Majumdar, M. K., et al. (1998). "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells." Journal of cellular physiology **176** (1): 57-66.

Mårdh, P.-A. (2004). "Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis." Current opinion in infectious diseases **17** (1): 49-52.

Marshak, D. R., et al. (2001). "Stem Cell Biology (Cold Spring Harbor Monograph Series, 40)."

Maruyama, T., et al. (2010). "Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology." Reproduction **140** (1): 11-22.

Mata, F., et al. (1989). "S-phase inhibitors induce vimentin expression in human promonocytic U-937 cells." FEBS letters **259** (1): 171-174.

McConnell, B. B., et al. (1998). "Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts." Current biology **8** (6): 351-354.

McEachern, M. J., et al. (2000). "Telomeres and their control." Annual review of genetics **34** (1): 331-358.

McElhaney, J. E. and R. B. Effros (2009). "Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults?" Current opinion in immunology **21** (4): 418-424.

Medicine, P. C. o. t. A. S. f. R. (2006). "Optimal evaluation of the infertile female." Fertility and sterility **86** (5 Suppl 1): S264.

Menken, J., et al. (1986). "Age and infertility." Science **233** (4771): 1389-1394.

Min, W., et al. (2014). "The effects of baicalin against UVA-induced photoaging in skin fibroblasts." The American journal of Chinese medicine **42** (03): 709-727.

Moiseeva, O., et al. (2006). "DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged β-interferon stimulation." Molecular biology of the cell **17** (4): 1583-1592.

Mulholland, J. and C. J. Jones (1993). "Characteristics of uterine aging." Microscopy research and technique **25** (2): 148-168.

Munro, J., et al. (2004). "Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock." Experimental cell research **295** (2): 525-538.

Naaldijk, Y., et al. (2015). "Migrational changes of mesenchymal stem cells in response to cytokines, growth factors, hypoxia, and aging." Experimental cell research **338** (1): 97-104.

Nakamura, A. J., et al. (2008). "Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence." Epigenetics & chromatin **1** (1): 6.

Narita, M., et al. (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." Cell **113** (6): 703-716.

Nathan, C. and A. Ding (2010). "Nonresolving inflammation." Cell **140** (6): 871-882.

Navot, D., et al. (1994). "Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation." Fertility and sterility **61** (1): 97-101.

Novakova, Z., et al. (2010). "Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence." Oncogene **29** (2): 273.

Ohtani, N., et al. (2004). "The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression." The Journal of Medical Investigation **51** (3, 4): 146-153.

Organization, W. H. (2010). "WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen."

Paria, B., et al. (2002). "Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges." Science **296** (5576): 2185-2188.

PARK, B. S., et al. (2008). "Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging." Dermatologic Surgery **34** (10): 1323-1326.

Park, J.-I., et al. (2000). "Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell." Journal of cancer research and clinical oncology **126** (8): 455-460.

Parrinello, S., et al. (2003). "Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts." Nature cell biology **5** (8): 741.

Patel, A. N., et al. (2008). "Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation." Cell transplantation **17** (3): 303-311.

Pawelec, G., et al. (2000). "In vitro senescence models for human T lymphocytes." Vaccine **18** (16): 1666-1674.

Pawlina, W. and M. H. Ross (2018). Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology, Lippincott Williams & Wilkins.

Pittenger, M. F., et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284** (5411): 143-147.

Popovici, V., et al. (2009). "Selecting control genes for RT-QPCR using public microarray data." BMC bioinformatics **10** (1): 42.

Pricola, K. L., et al. (2009). "Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism." Journal of cellular biochemistry **108** (3): 577-588.

Prieur, A. and D. S. Peeper (2008). "Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis." Current opinion in cell biology **20** (2): 150-155.

Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276** (5309): 71-74.

Rayess, H., et al. (2012). "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16." International journal of cancer **130** (8): 1715-1725.

Red-Horse, K., et al. (2004). "Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface." The Journal of clinical investigation **114** (6): 744-754.

Reinders, M. E., et al. (2009). Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation, Oxford University Press.

Robertson, S., et al. (2000). The effect of interleukin-6 deficiency on implantation, fetal development and parturition in mice. Proc Aust Soc Reprod Biol.

Robles, S. J. and G. R. Adami (1998). "Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16 INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts." Oncogene **16** (9): 1113.

Rodier, F. and J. Campisi (2011). "Four faces of cellular senescence." The Journal of cell biology: jcb. 201009094.

Rodier, F., et al. (2009). "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion." Nature cell biology **11** (8): 973.

Rodier, F., et al. (2005). "Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance." The international journal of biochemistry & cell biology **37** (5): 977-990.

Rodier, F., et al. (2011). "DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion." J Cell Sci **124** (1): 68-81.

Sager, R. (1991). "Senescence as a mode of tumor suppression." Environmental health perspectives **93**: 59-62.

Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu. Rev. Immunol. **22**: 531-562.

Sasson, I. E. and H. S. Taylor (2008). "Stem cells and the pathogenesis of endometriosis." Annals of the New York Academy of Sciences **1127** (1): 106-115.

Sedelnikova, O. A., et al. (2004). "Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks." Nature cell biology **6** (2): 168.

Serrano, M., et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88** (5): 593-602.

Sharkey, A. M. and S. K. Smith (2003). "The endometrium as a cause of implantation failure." Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology **17** (2): 289-307.

Shimi, T., et al. (2011). "The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence." Genes & development.

Shimi, T., et al. (2008). "The A-and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription." Genes & development **22** (24): 3409-3421.

Shirasuna, K. and H. Iwata (2017). "Effect of aging on the female reproductive function." Contraception and reproductive medicine **2** (1): 23.

Shumaker, D. K., et al. (2008). "The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: its role in DNA replication." The Journal of cell biology **181** (2): 269-280.

Stewart, C. L., et al. (1992). "Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor." Nature **359** (6390): 76.

Szamatowicz, M. and D. Grochowski (1998). "Fertility and infertility in aging women." Gynecological Endocrinology **12** (6): 407-413.

Takai, H., et al. (2003). "DNA damage foci at dysfunctional telomeres." Current biology **13** (17): 1549-1556.

Takeuchi, S., et al. (2010). "Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo." Cancer research: 0008-5472. CAN-0010-0801.

Taylor, H. S. (2004). "Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients." Jama **292** (1): 81-85.

Taylor, P. J. and J. A. Collins (1992). Unexplained infertility, Oxford University Press, USA.

Tchkonia, T., et al. (2010). "Fat tissue, aging, and cellular senescence." Aging cell **9** (5): 667-684.

Templeton, A., et al. (1996). "Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment." The Lancet **348** (9039): 1402-1406.

Tornaletti, S. and G. P. Pfeifer (1996). "UV damage and repair mechanisms in mammalian cells." Bioessays **18** (3): 221-228.

Trost, T. M., et al. (2005). "Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells." Cancer research **65** (3): 840-849.

Unterluggauer, H., et al. (2008). "Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase." Biogerontology **9** (4): 247-259.

Unuane, D., et al. (2011). "Endocrine disorders & female infertility." Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism **25** (6): 861-873.

von Zglinicki, T. (2002). "Oxidative stress shortens telomeres." Trends in biochemical sciences **27** (7): 339-344.

Von Zglinicki, T., et al. (2005). "Human cell senescence as a DNA damage response." Mechanisms of ageing and development **126** (1): 111-117.

Wang, C., et al. (2009). "DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice." Aging cell **8** (3): 311-323.

Weissman, I. L. (2000). "Stem cells." Cell **100** (1): 157-168.

Weissman, I. L., et al. (2001). "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations." Annual review of cell and developmental biology **17** (1): 387-403.

Williams, G. T., et al. (1990). "Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis." Nature **343** (6253): 76.

Wobus, A. M., et al. (2002). Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. Embryonic Stem Cells, Springer**:** 127-156.

Wright, W. E., et al. (1996). "Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells." Developmental genetics **18** (2): 173-179.

Yang, G., et al. (2006). "The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **103** (44): 16472-16477.

Yeo, E., et al. (2000). "Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts." Experimental gerontology **35** (5): 553-571.

Yin, Y. and L. Ma (2005). "Development of the mammalian female reproductive tract." Journal of biochemistry **137** (6): 677-683.

Zegers-Hochschild, F., et al. (2009). "The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009." Human Reproduction **24** (11): 2683-2687.

Zhang, C., et al. (2017). "Human amnion-derived mesenchymal stem cells protect against UVA irradiation-induced human dermal fibroblast senescence, in vitro." Molecular medicine reports **16** (2): 2016-2022.

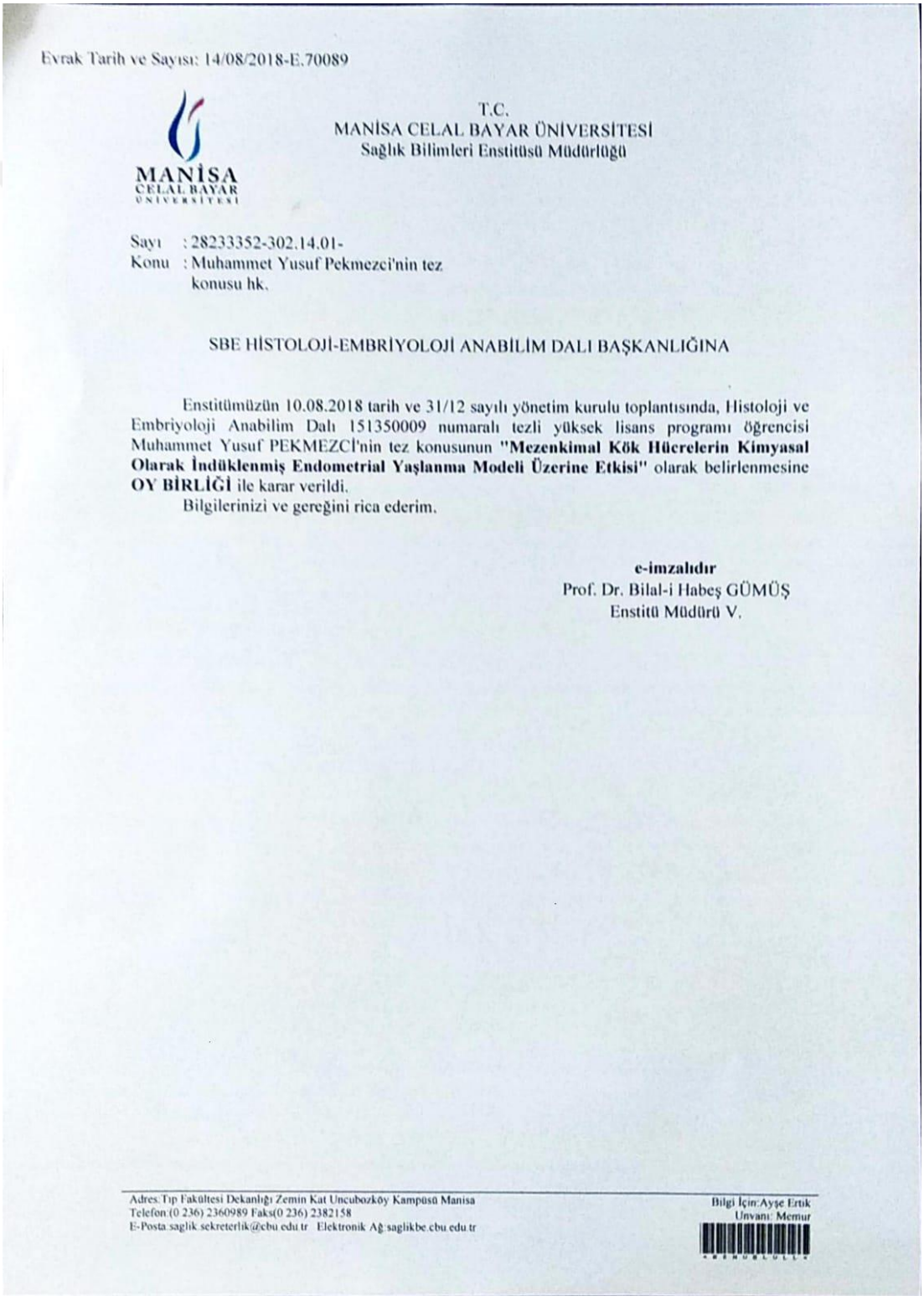
Zhang, D.-y., et al. (2011). "Wnt/β-catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through the DNA damage response and the p53/p21 pathway." PloS one **6** (6): e21397.

Zhang, S.-x. (1999). An atlas of histology, Springer Science & Business Media.

Zuk, P. A., et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue engineering **7** (2): 211-228.

9. EKLER

EK- 1



Evrak Tarih ve Sayısı: 14/08/2018-E.70089

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Muhammet Yusuf Pekmezci'nin tez konusu hk.

SBE HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüzün 10.08.2018 tarih ve 31/12 sayılı yönetim kurulu toplantısında, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 151350009 numaralı tezli yüksek lisans programı öğrencisi Muhammet Yusuf PEKMEZCİ'nin tez konusunun **"Mezenkimal Kök Hücrelerin Kimyasal Olarak İndüklenmiş Endometrial Yaşlanma Modeli Üzerine Etkisi"** olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Bilal-i Habeş GÜMÜŞ
Enstitü Müdürü V.

Adres:Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Uncubozköy Kampüsü Manisa
Telefon:(0 236) 2360989 Faks(0 236) 2382158
E-Posta:saglik.sekreterlik@cbu.edu.tr Elektronik Ağ:saglikbe.cbu.edu.tr

Bilgi İçin:Ayşe Ertik
Unvanı: Memur

EK-2

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı
"Mezenkimal Kök Hücrelerin Kimyasal Olarak İndüklenmiş Endometrial Yaşlanma Modeli Üzerine Etkisi"

Tezime ilişkin 15/05/2019 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %6'dır.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
15/05/2019

Adı Soyadı : **Muhammed Yusuf PEKMEZCİ**
Öğrenci No : **151350009**
Anabilim Dalı : **Histoloji ve Embriyoloji**
Programı : **Tezli Yüksek Lisans**

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER)

Açıklamalar

1-Tez Çalışması Orjinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.

2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır (400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.).

3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.

Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.

4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)

5-***İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir;*** aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.

6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu" formuna işlenir.

7- ***Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.***

8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu'nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.

9-Turnitin Hakkında Bilgiler: http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Muhammed Yusuf PEKMEZCİ

Doğum Yeri, Tarihi : Osmangazi / BURSA, 24 / 02 / 1990

Yabancı Dili : İngilizce

Adres Adres : Muradiye Mah. 38.Sok. Nu.7/8 Yunusemre MANİSA

Tel : 0090 546 204 9717

E-posta : myusufpekmezci@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans	: Fatih Üniversitesi İngilizce Biyoloji (Burslu)	2008-2012
Yüksek Lisans	: Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji AD	2013-2015
Yüksek Lisans	: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji AD	2015-2019

Yayınları (SCI ve diğer)

- Eren, H., Pekmezci, M., Okay, S., Turktas, M., Inal, B., Ilhan, E., Atak, M., Erayman, M., and Unver, T. (2015). Hexaploid wheat (Triticum aestivum) root miRNome analysis in response to salt stress. Annals of Applied Biology

Ulusal Kongrelerde Sözlü Sunum

- 4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos 2015, Afyon, Türkiye
- 24. Ulusal Elektron Mikroskobi Kongresi, 24-27 Nisan 2019, Edirne, Türkiye