



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YAĞ DOKUDAN İZOLE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN
DONÖR YAŞINA BAĞLI MTOR AKTİVİTESİNİNİN
BELİRLENMESİ**

Hayriye SARIKAYA

**HAZİRAN 2022
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAĞ DOKUDAN İZOLE EDİLEN KÖK
HÜCRELERİN DONÖR YAŞINA BAĞLI
MTOR AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ**

**KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Hayriye SARIKAYA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Denizli, 2022

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öđrenci Adı Soyadı : Hayriye SARIKAYA

İmza :

ÖZET

YAĞ DOKUDAN İZOLE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN DONÖR YAŞINA BAĞLI MTOR AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Hayriye SARIKAYA
Yüksek Lisans, Kök Hücre AD
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Temmuz 2022, 32 sayfa

Canlı organizmalarda yaşlanma, kaçınılmaz fizyolojik bir sonuçtur. Hücresel yaşlanma sadece farklanmasını tamamlamış hücrelerde değil aynı zamanda kök hücrelerde de gerçekleşir. MTOR (Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli role sahiptir. Hücre çoğalmasında önemli rol oynayan mTOR aynı zamanda hücresel yaşlanmayı düzenler ve biyogerjistik altyapıyı yönlendirir. Yağ dokudan elde edilen mezankimal kök hücrelerin donör yaşına bağlı olarak mTOR ekspresyonunun belirlenmesi bu tezin amacıdır.

Bu çalışmada grup1 (6 haftalık), grup2 (12 haftalık) ve grup3 (17 aylık) dişi sıçanlardan alınan yağ dokusundan primer explant kültür yöntemi ile mezankimal kök hücre (MKH) izolasyonu yapıldı. MKH'ler in vitro kültür ortamında çoğaltıldı. Flow sitometri ile tiplendirmesi yapılan kök hücrelerde mTOR aktivitesi (mTORC1 ve mTORC2) için qPCR yöntemiyle belirlendi. Aynı zamanda apoptotik belirteçlerden kaspaz9,8,3, BAX ve Bcl-2 ekspresyonları da qPCR yöntemiyle değerlendirildi.

Çalışmamızda apoptotik belirteçlerin en yüksek ekspresyonunun grup1'de en düşük ekspresyonunun ise grup2'de olduğu saptandı. MTOR ekspresyonu değerlendirildiğinde ise mTORC1 en yüksek grup2'de en düşük ise grup1'de bulundu. mTORC2 grup 2 ve grup3 te birbirine yakın ekspresyon gösterirken grup1'deki mTORC2 ekspresyonunun diğer gruplara oranla düşük olduğu belirlendi.

Bu çalışmada hem mTORC1'in hem de mTORC2'nin kök hücrelerde donör yaşına bağlı olarak farklı ekspresyona olduğunu bulduk. Bu farklılığın işlevsel sonuçlarının daha iyi anlaşılabilmesi için ileri düzey araştırmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: yaşlanma, yağ doku, mTOR inhibitörleri, mezankimal kök hücreler

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021SABE003)

ABSTRACT**DETERMINATION OF MTOR ACTIVITY DEPENDING ON DONOR AGE OF STEM CELLS ISOLATED FROM FAT TISSUE**

Hayriye SARIKAYA
Master of Science, Stem Cell Division

Supervisor: Prof. Dr. Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

July 2022, 32 pages

Aging in living organisms is an inevitable physiological consequence. Cellular senescence occurs not only in cells that have completed their differentiation, but also in stem cells. MTOR (mammalian target of Rapamycin protein complex) has an important role in cell growth and metabolism. mTOR, which plays an important role in cell proliferation, also regulates cellular aging and directs the bionergetic infrastructure. The aim of this thesis is to determine the mTOR expression of mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue depending on the donor age.

In this study, mesenchymal stem cell (MSC) isolation was performed by primary explant culture method from adipose tissue taken from group1 (6 weeks), group2 (12 weeks) and group3 (17 months) female rats. MSCs were grown in in vitro culture medium. mTOR activity (mTORC1 and mTORC2) in stem cells typified by flow cytometry was determined by qPCR method. At the same time, caspase9,8,3, BAX and Bcl-2 expressions, which are apoptotic markers, were evaluated by qPCR method.

In our study, it was determined that the highest expression of apoptotic markers was in group1 and the lowest expression was in group2. When MTOR expression was evaluated, MTORC1 was found to be highest in group 2 and lowest in group 1. It was determined that mTORC2 expression in group 2 and group 3 was close to each other, while mTORC2 expression in group 1 was lower than in other groups.

In this study, we found that both mTORC1 and mTORC2 are differentially expressed in stem cells depending on donor age. Further studies are needed to better understand the functional consequences of this difference.

Keywords : aging, adipose tissue, mTOR inhibitors, mesenchymal stem cells

This study was carried out by PAU Scientific Research Projects Coordination Unit. supported by (Project number:2021SABE003)

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında öncelikle danışman hocam sayın **Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE**'ye, çalışmalarım boyunca bana engin tecrübeleriyle destek olduğu, ilgisini ve çok önemli zamanını ayırarak yardımlarını esirgemediği için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda benim yanımda olan ve her zaman tezimde beni destekleyen ve her konuda yardım eden sevgili hocam **Doç. Dr. Nazlı ÇİL** 'e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmamın deneysel aşamalarındaki tüm yardım ve destekleri için **Dr. Hatice Şiyzen Çoban** , **Dr. Elif ÖNDER'e**, **Dr. Deniz KALEMCI'ye**, **Dr. Ayşenur DAMAR'a** ve **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı** doktora öğrencisi **Gül NEŞET'e** çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamı bitimemde ellerinden gelen desteği esirgemeyen mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Büyük bir sabır ile her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen ve hiç bir zaman beni yalnız bırakmayan aileme ve kardeşim **Ahmet'e** teşekkür ederim.

En büyük teşekkürlerimi ise çok sevgili **annem** ve her anımda yanımda hissettiğim rahmetli **babama**. Kök hücrelerimi onlardan aldım...

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | v |
| TABLolar DİZİNİ | vi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | vii |
| GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Araştırmanın amacı:..... | 2 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1 Kök Hücre..... | 3 |
| 2.1.1 Embriyonik Kök Hücreler | 4 |
| 2.1.2 Yetişkin Kök Hücreler | 4 |
| 2.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)..... | 5 |
| 2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kaynakları | 7 |
| 2.3. Yağ Dokusu Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler | 7 |
| 2.4 Hipotez | 8 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM | 9 |
| 3.1.Yağ Dokudan İzole Edilen Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü..... | 9 |
| 3.2. MKH Karakterizasyonu | 10 |
| 3.3. Farklılaşma Testleri..... | 10 |
| 3.3.1. Osteojenik farklılaşma | 10 |
| 3.3.2. Adipojenik farklılaşma | 11 |
| 3.3.3. Kondrojenik farklılaşma | 12 |
| 3.4. Trizol ile RNA İzolasyonu | 13 |
| 3.5. cDNA SENTEZİ | 13 |
| 3.5.6. Real- Time PCR..... | 14 |
| 4. BULGULAR | 15 |
| 4.1 Farklılaşma Sonuçları | 16 |
| 4.2 Flowsitometri sonuçları | 18 |
| 4.3 PCR analiz sonuçları..... | 19 |
| 5.TARTIŞMA | 21 |
| 6. SONUÇ | 28 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. Pluripotent özellikteki embriyonik kök hücreler | 4 |
| Şekil 2. Multipotent kök hücreler | 5 |
| Şekil 3. Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri..... | 6 |
| Şekil 4. Mezenşimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri | 6 |
| Şekil 5. Yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşma potansiyeli | 7 |
| Şekil 6. P1'de yağ dokusu kökenli mezenşimal kök hücrelerin fibroblast morfolojisi A) X10 B) X20 | 8 |
| Şekil 7. Grup1.(6 haftalık) pasaj-0 | |
| Şekil 8. Grup2 (12 haftalık). pasaj-0..... | 10 |
| Şekil 9. Grup3 (20 aylık) grup pasaj-0 | |
| Şekil 10. Grup 3 (20 aylık) pasaj-0..... | 10 |
| Şekil 11. 10 hf. Osteojenik Farklılaşma | |
| Şekil 12. 10 hf. Osteojenik Farklılaşma | 16 |
| Şekil 13 Grup2 (12 hf) Osteojenik Farklılaşma | |
| Şekil 14 Grup2 (12 hf) Osteojenik Farklılaşma | 16 |
| Şekil 15. (6 hf.) Adipojenik Farklılaşma | |
| Şekil 16 (6 hf.) Adipojenik Farklılaşma | 17 |
| Şekil 17 Grup2 (12hf) Adipojenik Farklılaşma | |
| Şekil 18 (12 hf) Adipojenik Farklılaşma | 17 |
| Şekil 19 grup1 (6 hf.) Kondrojenik Farklılaşma | |
| Şekil 20 (10 hf.) Kondrojenik Farklılaşma..... | 17 |
| Şekil 21 Grup2(12 hf) Kondrojenik Farklılaşma | |
| Şekil 22 Grup2 (12hf) Kondrojenik Farklılaşma | 18 |
| Şekil 23 Grup-1 flowsitometri sonuçları | 18 |
| Şekil 24 Grup-2 flowsitometri sonuçları | 19 |
| Şekil 25 PCR analiz sonuçları grup 1-2..... | 20 |
| Şekil 26 PCR analiz sonuçları grup 1 | 21 |
| Şekil 27 mTOR yolakları..... | 27 |

TABLolar DİZİNİ

| | |
|---|-----------|
| Tablo 1. Kit içeriği ve protokol | 14 |
| Tablo 2. Termal cycle programı..... | 14 |
| Tablo 3. Real Time PCR' da analiz edilen genlerin primer listesiHata! Yer işareti tanımlanmamış. | |
| Tablo 4 PCR analiz sonuçları | 20 |

SİMGELER VE KISALTMALAR**Simgeler**

%

°C

Yüzde

Santigrat derece

Kısaltmalar μm μg μl

mg

kg

nm

 cm^2

rpm

MKH

CD

FBS

DMEM

DMSO

PBS

Mikrometre

Mikrogram

Mikrolitre

Miligram

Kilogram

Nanometre

Santimetrekare

Revolutions per minute

Mezenkimal Kök Hücreler

Cluster of Differentiation

Fetal Bovine Serum

Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Dimetilsülfoksit

Phosphate Buffered Saline

GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler ilk olarak 1960-70 yıllarda kemik iliği dokusunda tanımlanmıştır (Friedenstein, Chailakhjan , Lalykina vd 1970). Günümüzde diş pulpası, yağ doku, Warton jeli gibi pek çok farklı dokudan izole edilip çoğaltılmıştır. Mezankimal kök hücreler CD73, CD90 ve CD105 için pozitif CD45, CD34 , CD11,CD14 için negatif ekspresyon gösterirler. Pluripotensi belirteçlerinden de Oct4 ve Nanog ve SOX-2 eksprese ederler (Ren , 2019 , Almalki 2016, Matic 2016).

Canlı organizmalarda yaşlanma, kaçınılmaz fizyolojik bir sonuçtur. Memeli yaşlanması, hücresel yaşlanma adı verilen karmaşık hücresel süreçleri içerir. Hücresel yaşlanma sadece farklanmasını tamamlamış hücrelerde değil aynı zamanda kök hücrelerde de gerçekleşir. Elde edilmesi kolay ve etik problemlerin daha az yaşandığı mezenkimal kök hücreler günümüzde kırıldak, kemik ve omurilik yaralanmalarının yanı sıra metabolik hastalıkların tedavisinde de umut veren ve bir yöntem haline gelmiştir. Bununla birlikte doku hasarını tedavi etmek için transplante edilen kök hücrelerin pek çoğunun transplantasyondan sonra öldüğü belirlenmiştir. Bu sorunun kök hücre yaşlanmasıyla da ilgili olabileceği düşünülerek yapılan çalışmalarda moleküler, epigenetik ve metabolik aktiviteyle ilgili değişiklikler ortaya konulmuş olmasına karşın kök hücre yaşlanması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Matic vd 2016).

Çalışmalar Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) yolunun hücresel ve organizma yaşlanmasında merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. MTOR, vücudumuzda anabolik ve de katabolik süreçlerde sensör görevi yapan ; yeterli [besin](#), [enerji](#), oksijen mevcudiyetini ve büyüme faktörlerini koordine eden, hücre çoğalmasında önemli rol oynayan bir proteindir. İki sinyal kompleksi vardır, mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2). Hücre çoğalmasında önemli rol oynayan mTOR aynı zamanda hücresel yaşlanmayı düzenler ve biyonerjistik altyapıyı yönlendirir. MTOR rapamisin ile mTOR sinyalinin zayıflatılması, pek çok hücre tipinde yaşlanmayı geciktirmiştir (Alves H 2010,) . MTORC2, mTORC2 yönelimli mTOR'un Ser2481 ve AKT (fosfor-AKT) fosforilasyonunun önemli bir bileşeni olan Rictor'un bağlanmasıyla ortaya çıkan endotelial yaşlanmada önemli bir rol oynar (Jang YY 2007). Rapamisin (mTOR) 'un memelilerde, besin, hormon ve oksijen seviyelerine bağlı olarak hücre büyümesinin kritik bir düzenleyicisidir. Her iki kompleksin aktivasyonu, hücre büyümesini ve hayatta kalmayı kolaylaştırır. MTORC1, protein ve lipid sentezi ile hücresel büyüme ve çoğalmada, erken hücresel yaşlanmada ve otofajide etkilidir. MTORC2'i ise AKT-

FOXO yolunun uyarılması yoluyla aktin hücre iskeletinin organizasyonu, iyon taşınmasının kontrolü ve anti-apoptotik olaylarda rol oynar. MTOR kompleksi olan rapamisin kanser immünolojik ve genetik hastalıkların tedavisinde, kalp ve beyindeki dejeneratif ve yaşa bağlı patolojilerin engellenmesinde etkilidir. (López-Otín 2013, Lees 2016) Kök hücre yaşlanmasıyla ilgili yapılan araştırmalar genellikle ileri pasaj (45. Pasaj gibi) sonrasındaki hücre aktivitesiyle ilgilidir Bu çalışmada ise yaşlı denekten alınan kök hücrelerde mTOR aktivitesi incelenmiştir. Puberte, olgun ve yaşlı deneklerden alınan yağ dokularından izole edilen kök hücrelerde mTORC-1 ve mTORC-2 sinyal komplekslerinin etkileri incelenmiştir.

1.1 Araştırmanın amacı:

Puberte dönemi, olgun (üreme dönemi) ve yaşlı dönem deneklerden alınan yağ dokularından izole edilen kök hücrelerde mTORC1-mTORC2 ekspresyonunun incelenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

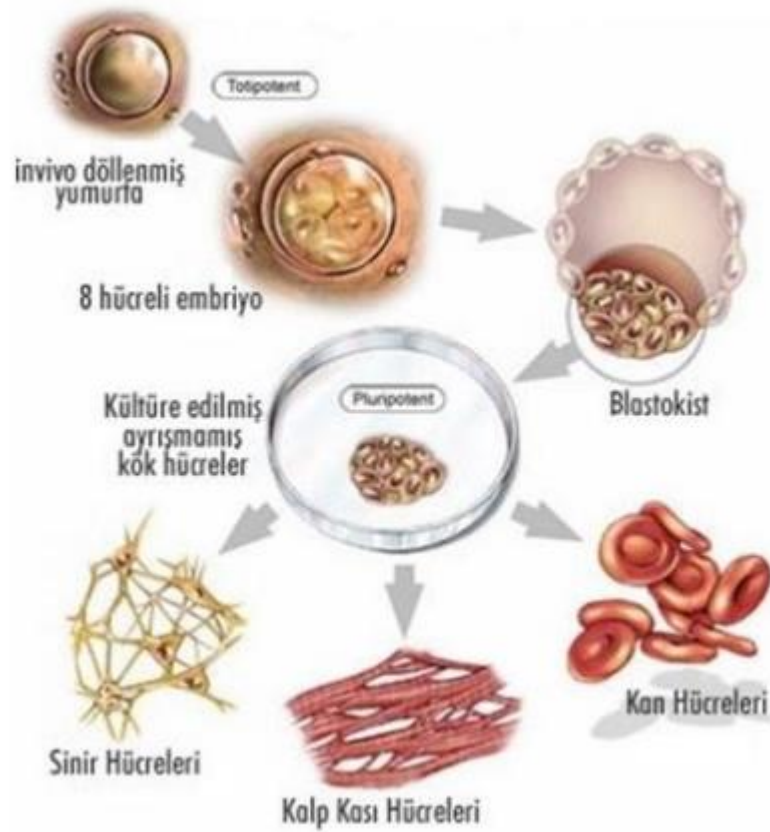
2.1 Kök Hücre

İleri derecede çoğalabilen, farklı hücrelere farklılaşma yetkinliği olan ve klonlaşma yeteneğine sahip hücrelere denir.(Meza-Zepeda, L. A., Noer, vd 2008) Uygun koşullar altında çeşitli doku ve organları oluşturan farklı hücrelere farklılaşma özelliğine sahip olan kök hücreler, bu özellikleri ile günümüzde tıbbın birçok alanında ve doku mühendisliği çalışmalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır. Farklı hücre türlerine potansiyeli olan kök hücrelere olan ilginin nedeni, ileride bu hücrelerin laboratuvar ortamında istenilen hücre türüne dönüştürülebilmesiyle, vücutta hasar görmüş doku veya organların hücresel tedavisinde uygulanabilmesinin ümit verici olmasıdır.(Ong ,Tan vd 2014) Elde edildikleri kaynaklara göre farklı farklılaşma potansiyellerine sahip olan kök hücreler ile yapılan çalışmalar, hücrelerin elde edildiği kaynaklar ve kullanım alanları, birçok tartışmayı da beraberinde getirmiştir.(Pruszek 2012) İnsan vücudunda doku hasarının tamir edilmesinde rol alan kök hücreler, köken aldıkları dokuların dışında farklı dokulara farklılaşarak yüksek yüksek plastisite özelliği taşımaktadır. Örneğin kemik iliği kök hücreleri kas hücrelerine, endotele ve hepatosit hücrelerine farklılaşabilmektedir (Pereira, Cronin vd 2013) Elde edildikleri kaynağa bağlı olarak ve gelişimsel potansiyellerine göre kök hücreler, totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak adlandırılan 4 farklı farklılaşma potansiyeli göstermektedirler. Yumurta ve spermin füzyonundan sonra tam bir bireyi verebilecek olan hücreler **totipotent** hücreler olarak bilinir. Endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarından türevlenmiş, farklı dokulara dönüşebilen hücrelere **pluripotent** denir. **Multipotent** Hücreler pluripotent hücrelerden sonra sınırlı sayıda hücrelere farklılaşabilen yetişkin hücrelere denir. **Totipotent** Kök hücreler ise bütün doku ve hücrelerini oluşturma özelliğine sahip hücrelerdir.

Aynı zamanda kök hücreler gelişim evresine göre ise embriyonik kök hücre ve yetişkin kök hücreler şeklinde de sınıflandırılır bilinir.(Caplan 2001, Traktuev 2008,)

2.1.1 Embriyonik Kök Hücreler

Yumurta ve spermin füzyonundan sonra embriyonun 4-5 günlük iç hücre kitlesinden elde edilen ve tüm vücut hücresine dönüşebilen hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler daha çok tüp bebek ünitelerinde elde edilir. Telomer yapısının uzun olmasından kaynaklı uzun süre ve hızlı çoğalırlar. Bu hücreler dondurulabilir ve araştırmalarda tekrar tekrar kullanılabilir. Ancak bu özellikleri EKH'leri klinik uygulamalar için çok başarılı bir kaynak yapmaz. Çünkü bölünme potansiyelleri nedeniyle uygulandıkları doku bölgesinde tümör oluşumuna olabilir. (Kode 2009)

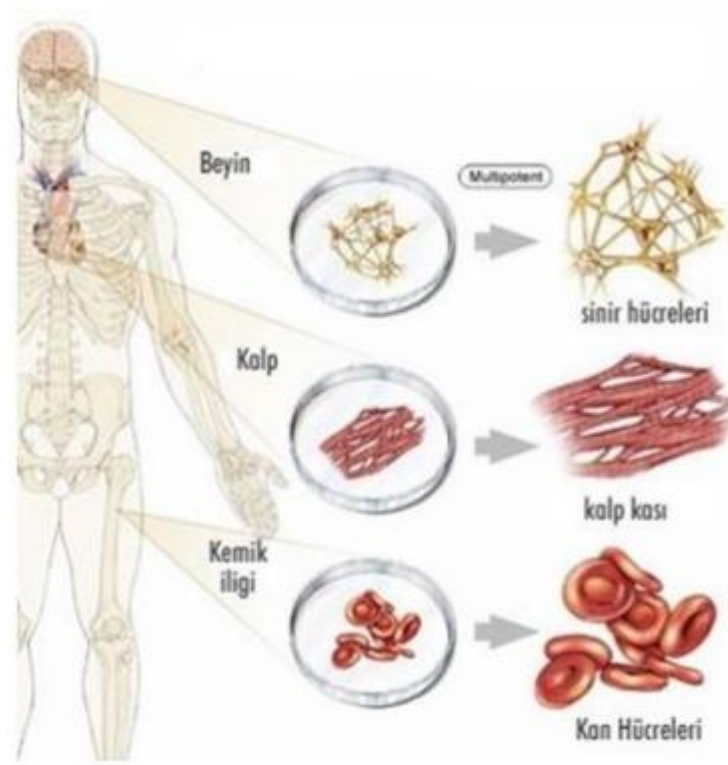


Şekil 1. Pluripotent özellikteki embriyonik kök hücreler

2.1.2 Yetişkin Kök Hücreler

Somatik kök hücreler olarak da adlandırılan bu hücreler, embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmadan bulunan kök hücrelerdir. Yetişkin kök hücreler otolog olarak kullanılabilirler. Bu nedenle klinik uygulamalarda önemli bir avantaja sahiptir.

Yetişkin kök hücreler plasenta da dahil olmak üzere kemik iliği, periferik kan, dış pulpası, yağ doku, sindirim sistemi ve beyin gibi birçok farklı kaynaktan izole edilebilir.(Balaji 2010)

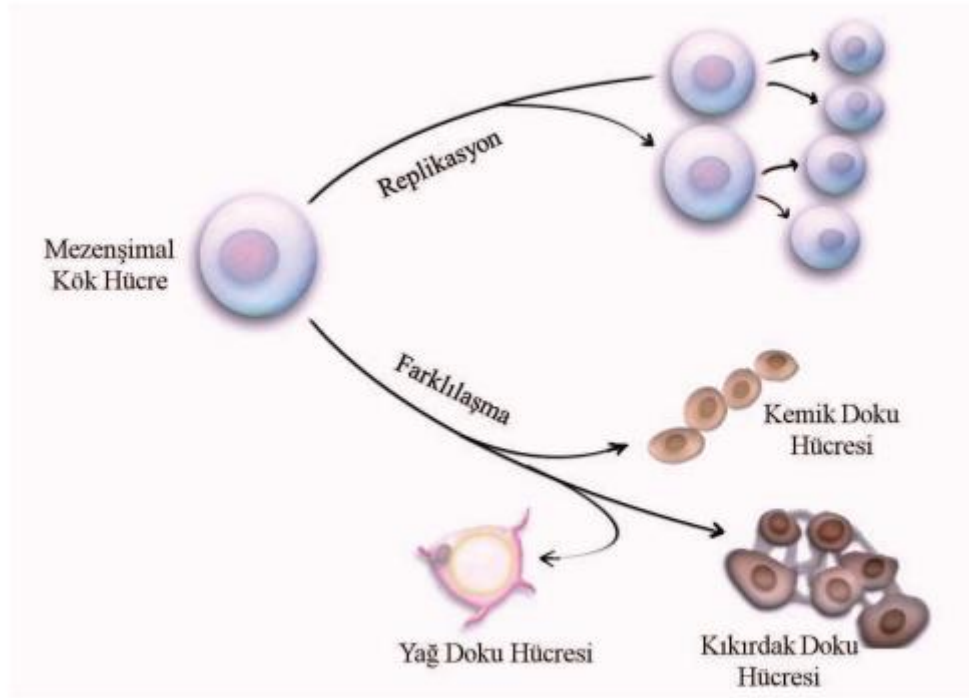


Şekil 2. Multipotent kök hücreler

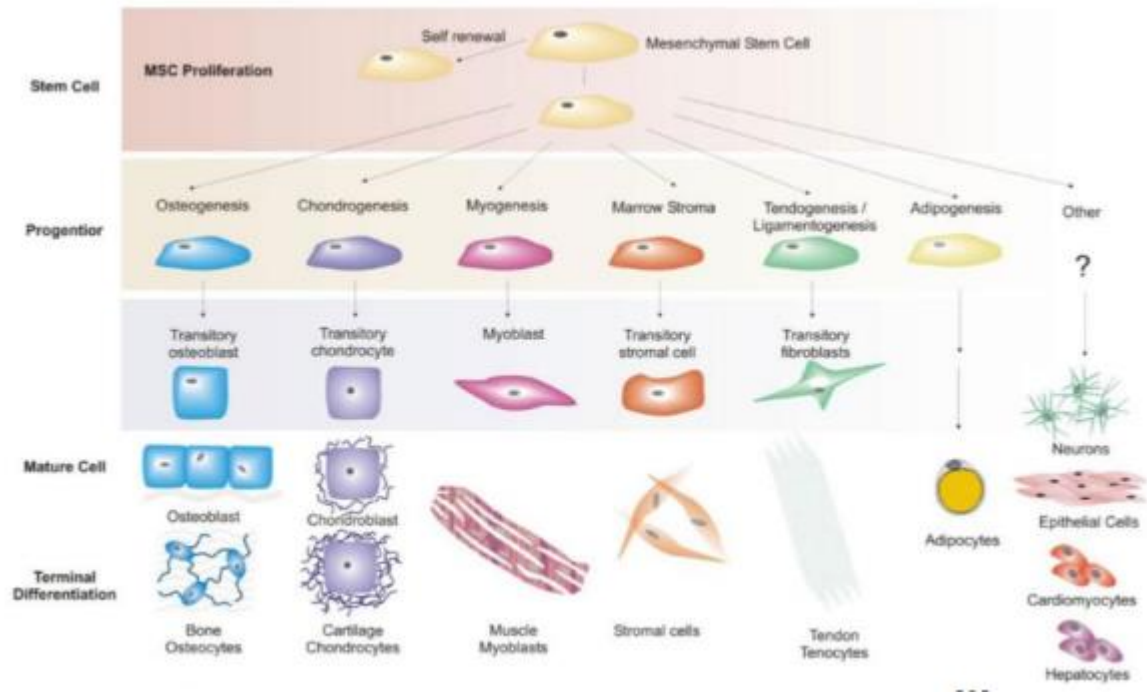
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Kök hücreler, biyolojik özellikleri ve sınırsız kullanım alanları nedeniyle uzun zamandan beri büyük bir ilgi konusu haline gelmiştir. Mezenkimal kök hücreler (MKH), birçok yetişkin stromal fraksiyonunda mevcut olan multipotent öncüllerin bir çeşit alt kümesidir ve birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. MKH'ler işlevsel olarak in vitro olarak çoğalmalarının osteoblastlara, adipositlere ve farklılaşma yetenekleri ile tanımlanmaktadır. Bununla birlikte in vivo'da tanımlanmaları, heterojeniteleri, anatomik yerleşimleri ve yetişkin homeostazileri tam olarak açıklanamamıştır.(Wong , Zhou vd 2012)

MKH'ler göç edebilme özellikleri ve dokuda hasarlı hücre ile füzyon yeteneği ve çoğunlukla non-immunojenik özellikte olmaları ve salgıladıkları çeşitli faktörlersayesinde transplante edildiklerinde uygulama bölgesinde hasarlı dokunun iyileşmesine katkıda bulunurlar.(Nielsen , McNagny 2009)



Şekil 3. Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri



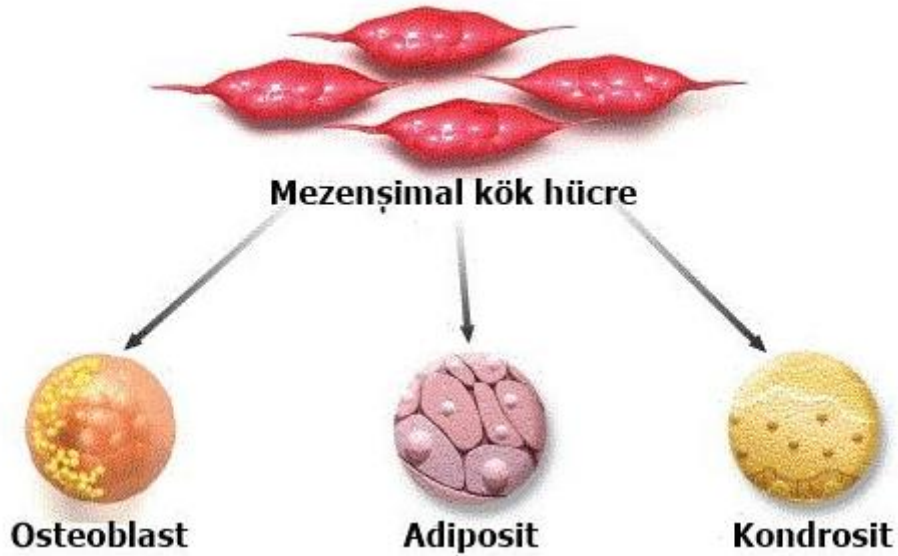
Şekil 4. Mezenşimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri

2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kaynakları

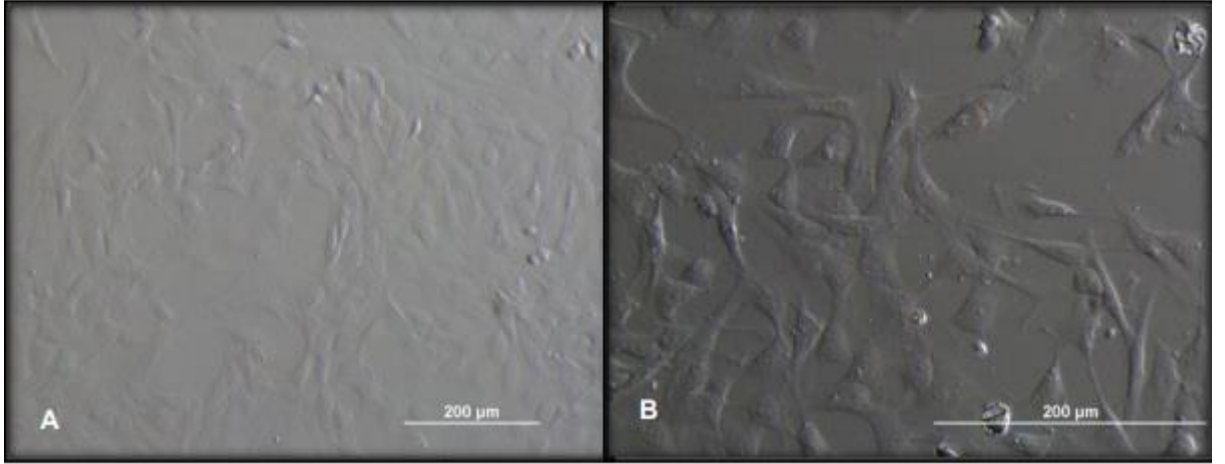
İlk çalışmalarda MKH'ler sadece kemik iliğinden izole edilmiştir. Fakat günümüzde MKH'ler, yağ dokusu, deri, diş, periferik kan, umbikal kord kanı, ve sert dokularda; karaciğer, dalak, akciğer gibi neredeyse tüm erişkin dokulardan temin edilebilir .Bu hücreler aynı zamanda plasenta ve amniotik sıvıdan da izole edilebilir.(Bhagwat , Lahdenranta vd 2001)

2.3. Yağ Dokusu Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

Kemik iliği gibi yağ doku da mezodermden türemiş bir organdır. Yağ doku MKH'leri, elde edilmesi kolay ve bir seferde bol miktarda doku izole edilebileceği için alternatif bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler de adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik farklılaşma yeteneğine sahiptir.(Bengal, Perdiguero vd 2017)



Şekil 5. Yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşma potansiyeli



Şekil 6. P1'de yağ dokusu kökenli mezenşimal kök hücrelerin fibroblast morfolojisi A) X10 B) X20

Yağ dokusu kökenli mezenşimal kök hücreler tüm yüzey belirteç ifadelerini göstermez. Bu hücrelerin fenotipik karakterlerine bakıldığında, CD29, CD90, CD73, CD44, CD105, CD13, CD54, CD146 ve HLA-ABC için pozitif, hematopoetik ve endotel hücrelerin belirteçleri olan CD45, CD34, CD133 ve HLA-DR için ise negatif ifade göstermektedir. Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler aynı zamanda kemik iliği kök hücrelerin ile karşılaştırıldığında, CD36 için pozitif ve CD106 için negatif ifade gösterir (Maslov, Barone vd 2004).

2.4 Hipotez

H0: Hücre çoğalması, farklılaşması gibi birçok yaşamsal olayda rol oynayan mTOR ekspresyonu kök hücrenin alındığı donörün yaşına bağlı olarak azalacaktır.

H1: Hücre çoğalması, farklılaşması gibi birçok yaşamsal olayda rol oynayan mTOR donörün yaşına bağlı olarak artacaktır

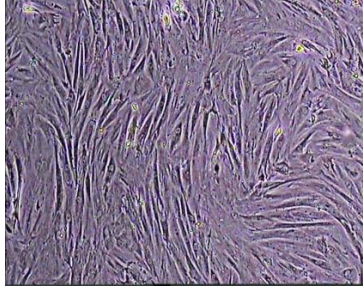
H2: Hücre çoğalması, farklılaşması gibi birçok yaşamsal olayda rol oynayan mTOR donörün yaşına bağlı olarak değişmeyecektir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

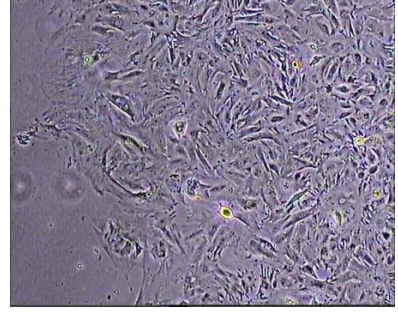
3.1.Yağ Dokudan İzole Edilen Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

Pamukkele Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu 03/02/2020 60758568-020/9351 sayılı kararı ile 18 adet sıçan kullanımına izin verilmiştir. Sıçanlar puberte dönemi Grup-1 (6 haftalık), mature: grup-2 (12 haftalık), yaşlı; grup-3 (17 aylık) olmak üzere üç gruptur. Sıçanların ağırlıkları tartılmış olup Puberte Dönemi sıçanlar; 1. Hayvan 270 mg, 2. Hayvan 200 mg, 3. Hayvan 180 mg, 4.hayvan 207 mg, 5. Hayvan 190 mg, 6. Hayvan 174 mg; Mature sıçanlar; 1. hayvan 295 mg, 2. hayvan 308 mg; yaşlı sıçanlar; 1.hayvan 324 mg, 2.hayvan 330mg, 3. hayvan 308 mg, 4. hayvan 284 mg, 5.hayvan 370 mg, 6. Hayvan 304 mg ölçülmüştür. Sıçanlar 0,6 ml Ketamin + 0,4 ml Anestol karıştırılmış ve sıçanlara kasıktan uygulanarak uyutulmuştur. Laparotomi insizyonu ile sıçanların retroperitoneal bölgesinden perirenal ve inguinal yağ dokusu alınmıştır. Elde edilen yağ dokular, 50 ml fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) içerisinde yıkanmıştır. Falcon tüp içerisinde 450 cc Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 5.5 cc penisilin-streptomisin, 50 cc Fetal Bovine Serum (FBS) konulup, adipoz doku steril koşullarda tüp içerisinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarına taşınmıştır. Adipoz doku steril ince doku makası ile tam besi yeri içeren petri kabında ayrılabilen en küçük parçalara ayrılmıştır. 15'lik falkon tüplere konulan adipoz doku üzerine %0,1 lik konsantrasyonda hazırlanan kollejenaz enzimi konulup çalkalamalı su banyosunda 37 °C de 30-45 dk inkübasyona bırakılmıştır.

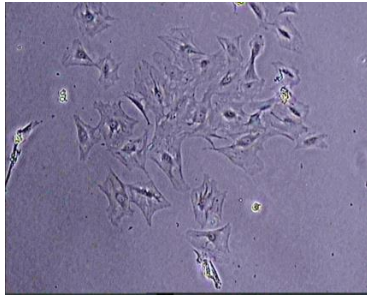
Daha sonra istenilen hücreleri doku parçasından ayırmak için 100 µm lik süzgeçten geçirilmiştir. Elde edilen karışım 1600 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan kısmın (süpernatant) 7 ml'lik kısmı atıldıktan sonra kalan pelletin üstüne 1 ml. L-DMEM eklenmiştir. İlk ekim için hazırlanan T25 filtreli kültür flaskına 5 ml. besi yeri (L-DMEM,%10 FBS, 50 U/ml penisilin, 50 µg/ml streptomisin, 2mM L-glutamin ve 0,1 mM non esansiyel aminoasit) konulmuş, 250 µl hücre süspansiyonundan konularak Petriler etiketlenerek 37 °C'de %5 CO²'e sahip nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır. 3 günde bir petriler kontrol edilmiştir. 5-6 gün içinde hücre oluşumu gözlemlenmiştir.



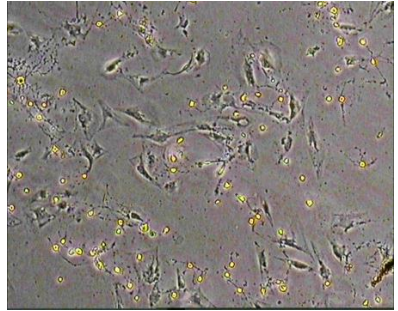
Şekil 7. Grup1.(6 haftalık) pasaj-0



Şekil 8. Grup2 (12 haftalık). pasaj-0



Şekil 9. Grup3 (20 aylık) grup pasaj-0



Şekil 10. Grup 3 (20 aylık) pasaj-0

3.2. MKH Karakterizasyonu

Mezankimal kök hücrelerin karakterizasyonu için; kullanıma hazır ticari kitler adiipojenik, osteojenik ve kondrojenik değişim potansiyelleri analiz edilmiştir.

3.3. Farklılaşma Testleri

3.3.1. Osteojenik farklılaşma

İzole edilen MKH'lerin osteojenik farklılaşmalarını değerlendirmek için, osteojenik kit 50 ml için 45 ml. Osteojenik Bazal Medium, 5 ml stempro osteogenesis supplement, 25 µl penisilin/streptomisin ve Growth Medium için 450 ml L-DMEM, 50 ml. FBS,250 µl PSM hazırlanmıştır. Kültür mediumundan besiyeri aspire edilmiştir. 5-10 ml PBS ekleyip flasklar yıkanarak PBS aspire edilmiştir. 5 ml tripsinle 3-5 dk CO₂ inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrılma durumları mikroskopta incelenmiştir. Ayrılan hücrelerin üzerine 10 ml. besi yerinden koyup 15 ml. Falcon tüplere koyup 1200 rpm de 4 dk santrifüj bırakılmıştır. Santrifüj sonrası pelleti dipte kalacak şekilde üzerindeki besi

yeri atılıştır. Dipteki pelletin üzerine 1 ml besi yeri ekleyip hücre süspansiyonu hazırlanmıştır, akabinde hücre sayımı yapılmıştır. Osteojenik farklılaşma için gerekli ml. Hücre süspansiyonundan alınmıştır. 12'lik well plate kullanılacağı için $2 \times 6 \text{ cm}^2$ hücre süspansiyonundan 12 ml. alınmıştır. 12'lik well'lere 2 kontrol 2 osteojenik farklılaşma için hücre ekimi yapılmıştır. Önce L-DMEM ile hazırlanan besi yerinden kuyucuklara konulmuştur. Üzerine 20 ml.hücre süspansiyonunun ekim yapılmıştır. 4 hafta süresince haftada iki kez besi yeri değiştirilerek kültüre edildi. 4. hafta sonunda 12 well platelerden medium uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. %4'lük formaldehit hazırlanarak hücrelerin fiksasyonu yapılmıştır. Fiksasyondan sonra hücreler 2 kez sitile su ile yıkanmış, öncesinde 0,45 gr Alizarin Red üzerine 20 ml. distile su eklenerek hazırlanan ve hücre filtresinden geçirilerek $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$ de karanlıkta bırakılan Alizarin Red S boyası ile karanlık ortamda 2-3 dk bekletilmiş, sonrasında 3 kez distile su ile yıkanmış ve faz kontrast mikroskobu ile görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

3.3.2. Adipojenik farklılaşma

İzole edilen MKH'lerin osteojenik farklılaşmalarını değerlendirmek için; 50 ml adipojenik Differentiation Medium için 45 ml. bazal medium, 5 ml adiposit suplement, 25 µl penisilin/streptomisin hazırlanarak $+ 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de alimünyum folyoya sarılı bir şekilde bekletilmiştir. Kullanılmadan önce ise $+ 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'den çıkarılıp $37 \text{ }^\circ\text{C}$ su banyosunda ısıtılıp kullanılmıştır. Akabinde 500 ml besi yeri için için 450 ml L-DMEM, 50 ml FBS, 250 µl PSM ile besi yeri hazırlanarak $37 \text{ }^\circ\text{C}$ su banyosunda bekletilmiştir. Kullanılmadan önce ise $+ 4 \text{ }^\circ\text{C}$ ' den çıkarılıp $37 \text{ }^\circ\text{C}$ su banyosunda ısıtılıp kullanılmıştır. Kültür mediumundan besiyeri aspire edilmiştir. 5-10 ml PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. PBS kültür kabından uzaklaştırıldıktan sonra 5 ml tripsin 3-5 dk CO_2 inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrılma durumları mikroskopta incelenmiştir. Ayrılan hücrelerin üzerine 10 ml. besi yerinden koyup 15 ml. Falkon tüplere koyup 1200 rpm de 4 dk santrifüj bırakılmıştır. Santrifüj sonrası pelleti dipte kalacak şekilde üzerindeki besi yeri atılıştır. Dipteki pelletin üzerine 1 ml besi yeri ekleyip hücre süspansiyonu hazırlanmıştır, akabinde hücre sayımı yapılmıştır.12'lik well plate kullanılacağı için 2 kontrol 2 adipojenik farklılaşma için her plate' e $1 \times 10^4 \text{ cm}^2$ hücre olacak şekilde 25 µl hücre ekim yapılmıştır. Üzerine hazırlanan besi yeri, mikropipetle 25 µl eklenmiştir. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de % 5 CO_2 inkübatöründe 4 gün bekletilen hücreler gerekli yoğunluğa ulaştıktan sonra hazırlanan adipojenik farklılaşma kiti mediumundan 2 plate eklendi. İlk 4 gün 4 plate de normal L-DMEM'le hazırlanan medium varken 4. Gün sonunda 2 si kontrol 2 si adipojenik farklılaşma besi yeri

eklenmiştir. Her 3-4 günde bir besi yeri değişimi yapılmıştır. 15. gün 12 well platelerden medium uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. % 10 luk formaldehit eklenerek 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Fiksasyondan sonra hücreler 2 kez sitile su ile yıkanmış 2 ml. %60lık izopropranol her bir kuyucuğa 2 ml. eklenmiş ve 5 dk bekletilmiştir. İzipropranol aspire edilerek 2 ml. öncesinde 50 ml için 0,1 mg Oil Red tozuna 3/2 ml distile su eklenmiş solisyon 10 dk beklendikten sonra kullanıma hazır hale gelen solisyon eklenmiş ve 5 dk bekletilmiştir. Oil Red kalmayınca kadar distile suyla akan suda kibarca yıkama işlemi yapılmış ve faz kontrast mikroskobu ile görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

3.3.3. Kondrojenik farklılaşma

İzole edilen MKH' lerin osteojenik farklılaşmalarını değerlendirmek için; 50 ml Kondrojenik Differentiation Medium için 45 ml. bazal medium, 5 ml kondrojenik suplament, 25 µl penisilin/streptomisin ve 500 ml besi yeri için için 450 ml L-DMEM, 50 ml FBS, 250 µl PSM ile besi yeri hazırlanmıştır. Kültür mediumundan besiyeri aspire edilmiştir. 5-10 ml PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. PBS kültür kabından uzaklaştırıldıktan sonra 5 ml tripsin 3-5 dk CO² inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrılma durumları mikroskopta incelenmiştir. Ayrılan hücrelerin üzerine 10 ml. besi yerinden koyup 15 ml. Falkon tüplere koyup 1200 rpm de 4 dk santrifüj bırakılmıştır. Santrifüj sonrası pelleti dipte kalacak şekilde üzerindeki besi yeri atılmıştır. Dipteki pelletin üzerine 1 ml besi yeri ekleyip hücre süspansiyonu hazırlanmıştır, akabinde hücre sayımı yapılmıştır. 12'lik well plate kullanılacağı için 2 kontrol 2 kondrojenik farklılaşma için her plate' e 1 ml hücre olacak şekilde hücre solisyonu 5 tane 5 µl' lik drop şeklinde wellerin ortasına konularak 2 saat 37 °C % 5 CO² inkübatöründe bekletilmiştir. Daha sonra üzerine kondrojenik Differentiation Medium eklenip inkübatöre konulmuştur. Besi yeri 2-3 günde bir değiştirilmiştir. 14. günün sonunda kültür wellerinden mediumlar uzaklaştırılmış PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. % 4 luk formaldehit eklenerek 30 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir. Fiksasyondan sonra hücreler 2 kez sitile su ile yıkanmış, hazırlanan %1 lik Alcian Blue solisyonuyla her bir kutucuğa 2 ml olacak şekilde eklenmiş 30 dk. bekletilmiştir. Alcian Blue uzaklaştırılmış 3 kez 0,1 NHCL ile yıkanmıştır. Nötrolizasyon

işlemi için distile su eklenmiş ve faz kontrast mikroskobu ile görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

3.4. Trizol ile RNA İzalasyonu

RNA izolasyonu yapılacak hücreler 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 - welle ekilmiştir. Tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra dozun zamanı kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 6 - well'deki hücrelere well başına 500 µl Trizol e alınmış ve scaper yardımıyla kazıma yapılmıştır. Kazılan hücreler Trizolle birlikte 1,7 ml' lik mikrosantrifüj (eppendorf) tüplerine aktarılmıştır. Tüplere 100 µl Kloroform eklenmiş ve tüpler ters - düz edilmiştir. Tüpler 10-15 sn vortekslenmiştir. Tüpler 5 dk aralıklarla ters -düz edilerek 15 dk oda sıcaklığında inkübastona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler 4°C 15.000 rpm de 15 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Tüplerin 3 faza ayrıldığı görülmüştür. (üst faz: RNA, orta kısımdaki faz: DNA, en alt faz: protein) Üst fazda bulunan RNA mikropipet yardımıyla alınarak steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Aktarılan RNA total RNA olduğundan dolayı 250 µl 2-proponal (izotropil alkol) eklenmiş, 15 dk 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Etanolün bulunduğu süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve kalan pellet üzerine 50 µl %70 lik etanol eklenerek 4°C 15.000 rpm de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Etanolün bulunduğu supernatant kısım uzaklaştırılarak, pellet üzerine 50 µl. RNA-free dH₂O eklenmiş pelet çözülmüştür. Elde edilen RNA'nın nanodrop cihazında konsantrasyon ve saflıkların ölçümü yapılmıştır. 10 hf: 260/280- 1.79 1083,8 ng/ul ; 12 aylık: 260/280-1,59 527,1 ng/ul RNA'lar kullanılabilecek şekilde -20°C de saklanmaya bırakılmıştır.

3.5. cDNA SENTEZİ

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi için A.B.T. cDNA kit bileşenlerini bir mikro tüp içinde Reserve Transcriptase 1 µl, 10X Reaction Buffer 2 µl , RNase İnhibitor 0,5 µl, 20X dNTP mix 1 µl, Random Hexamer 2 µl, Rnase Free Water 3,5 ml. ve RNA Template 10 µl karıştırılarak Step 1 25°C 10 dk, Step 2 37°C 120 dk, Step 3 85°C 5 dk, Step 4 44°C 5 dk. santrifüj edilmiştir.

2X RT master mix hazırlanışı: hacim toplamı 10 μ l olmalı;

Tablo 1. Kit içeriği ve protokol

| | |
|--------------------------------|-------------|
| RTase (200U/ μ l) | 1 μ l |
| 10X Reaction Buffer | 2 μ l |
| RNase Inhibitor (40U/ μ l) | 0,5 μ l |
| 20X dNTP mix (2.5mM each) | 1 μ l |
| Random hexamer (50pM) | 2 μ l |
| RNase free water | 3,5 μ l |

Tablo 2. Termal cycle programı

| | |
|-------|----------|
| 25 °C | 10 dk |
| 37°C | 120 dk |
| 85 °C | 5 dk |
| +4 °C | ∞ |

3.5.6. Real- Time PCR

Real Time PCR için mTOR yolağındaki genlerin mRNA düzeyindeki gen ekspresyonlarının değişimini araştırmak için ilk olarak uygun hazır MasterMix kullanılmıştır. A.B.T.™ 2X qPCR SYBR Green MasterMix 10 μ l, ROX Dye (50X) 0.4 μ l, Forward Primer (10 μ M), Reverse Primer (10 μ M), RNase-Free Distilled Water 20 μ l reaktifler hafifçe karıştırılmış ve kullanımdan önce kısaca santrifüjlenmiştir. Sonuçların normalizasyonu için housekeeping gen olan "Beta-aktin" kullanılmıştır. Housekeeping genin primer dizisi Tablo 3'te gösterilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültür kabı içerisine gruplar ayrılarak her kuyucukta ise 10 μ l. karışımlar plakaya aktarılmıştır. Plakaların yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle kapatılmıştır. Daha sonra plaka Real Time PCR cihazına götürülerek 95 °C 10dk, 40 döngü olacak şekilde 95 °C'de 15 sn. ve 60 °C'de 10 dk. olacak şekilde amplifiye edilmiştir.

Tablo 3 Real Time PCR' da analiz edilen genlerin primer listesi

| Genler | Primer Dizisi |
|---------------|--|
| b-actin | F:GCGAGTACAACCTTCTTGCAGCTC R:TGGCATGAGGGAGCGCGTAA |
| CD34 | F:AGCCATGTGCTCACACATCA R:CAAACACTCGGGCCTAACCT |
| CD45 | F:TTGCTCCCCATCCGATAAGAC R:AGCGTGGATGAAAAACCATCG |
| CD73 | F:TGCATCGATATGGCCAGTCC R:AATCCATCCCCACCGTTGAC |
| CD105 | F:ACTGAGTTGCACATCTGGGG R:TTCCGAAGTGGTGGTAAGCC |
| CD106 | F:GGTGGCTGCACAGGTTGGGG R:ACCCACAGGGCTCAGCGTCA |
| mTOR | F:TGAGAGAGGAGATGGAGGAA R:TTCAGAGCGGAGAAAGCA |
| mTORC1 | F:TGACTTACCGAGAGCACACA R:ACATTCACAGACTCAGGCATC |
| mTORC2 | F:GAAGGTGCTAAAACCTGAAGGTG R:CAGAACTCGGAAACAAGGAA |

4. BULGULAR

Çalışmamızda grup3 grubunda hücre çoğalmasının çok yavaş olduğu ve bir ileri pasaja geçemediği tesbit edilmiştir. Bu nedenle karakterizasyon ve farklılaştırma deneyleri için gerekli hücre yoğunluğuna ulaşamadığı için bu analizler bu grupta yapılamamış sadece qPCR analizleri yapılabilmektedir.

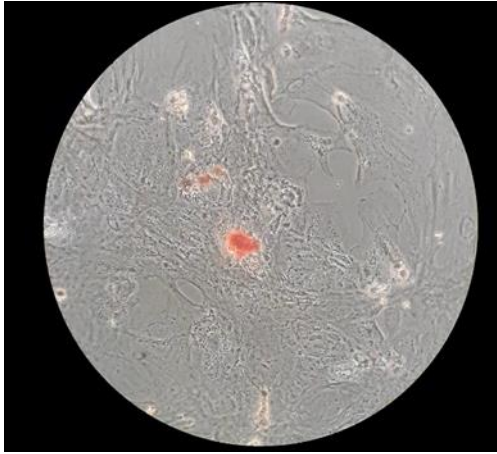
Bu çalışmada non-enzimatik yöntemle grup1, grup2 ve grup3 sıçanların retroperitoneal bölgesinden alınan yağ dokudan izole edilen hücrelerin; ilk 24 saatte plastik yüzeye tutundukları ve fibroblast benzeri görünüme sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 1 A-B). 2. ve 3. pasajda da fibroblast benzeri hücrelerin homejen ve yoğun olduğu izlendi. Grup3 te ise plastik yüzeye tutunma yaklaşık 8. Günde gerçekleşti. İlerleyen günlerde

hücrelerde çoğalmanın olmadığı ve apoptozisin oluşmaya başladığı ve gün gün arttığı gözlemlendi.

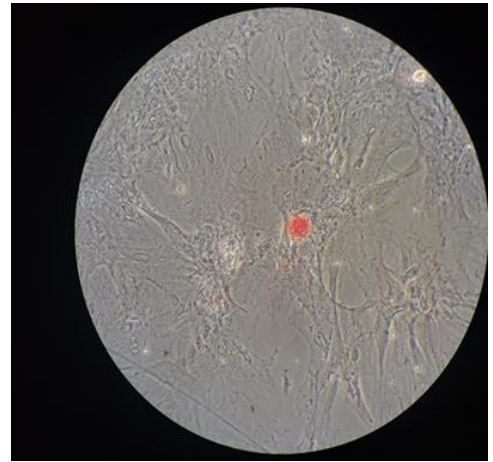
Grup1 ve grup2'nin 3. Pasajından alınan hücrelerden PCR analizi yapıldı. Grup3'ün a ise pasaj yapılmadan elde edilebilen hücrelerden PCR analiz yapıldı.

4.1 Farklılaşma Sonuçları

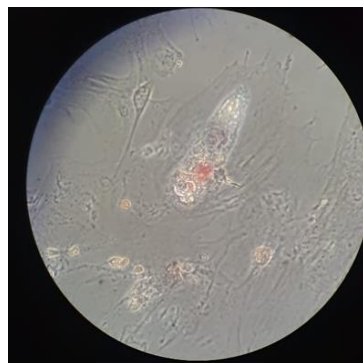
Grup1 ve 2deki kök hücrelerde yapılan farklılaşma deneyleri sonucu osteojenik, adipjenik ve kondrojenik farklılaşmanın olduğu gözlemlendi.(11-21)



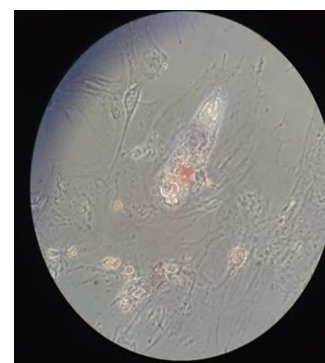
Şekil 11. 10 hf. Osteojenik Farklılaşma



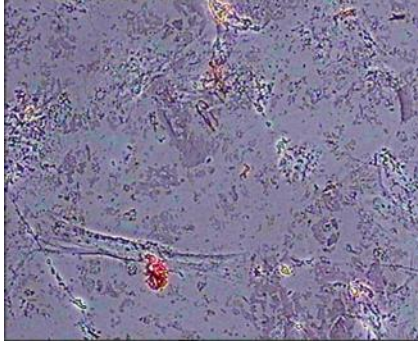
Şekil 12. 10 hf. Osteojenik Farklılaşma



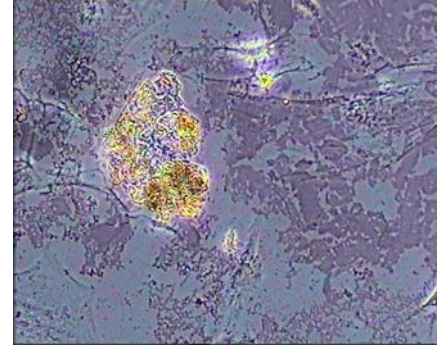
Şekil 13 Grup2 (12 hf) Osteojenik Farklılaşma



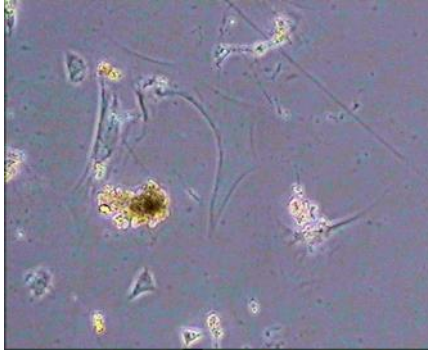
Şekil 14 Grup2 (12 hf) Osteojenik Farklılaşma



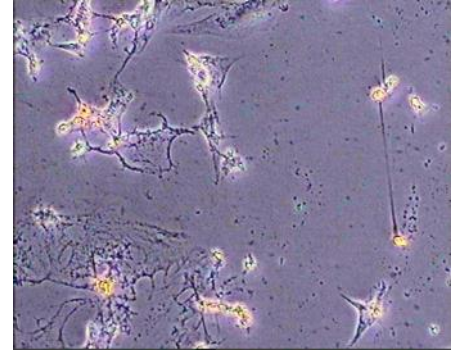
Şekil 15. (6 hf.) Adipojenik Farklılaşma



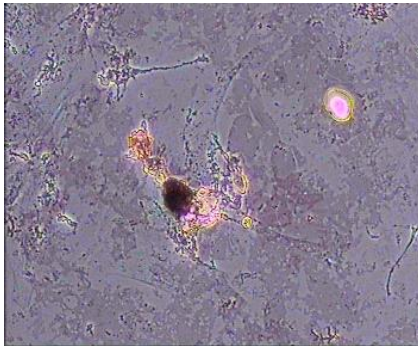
Şekil 16 (6 hf.) Adipojenik Farklılaşma



Şekil 17 Grup2 (12hf) Adipojenik Farklılaşma



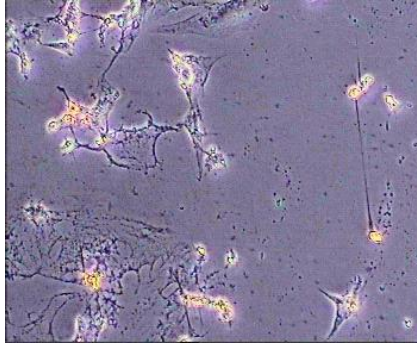
Şekil 18 (12 hf) Adipojenik Farklılaşma



Şekil 19 grup1 (6 hf.) Kondrojenik Farklılaşma



Şekil 20 (10 hf.) Kondrojenik Farklılaşma



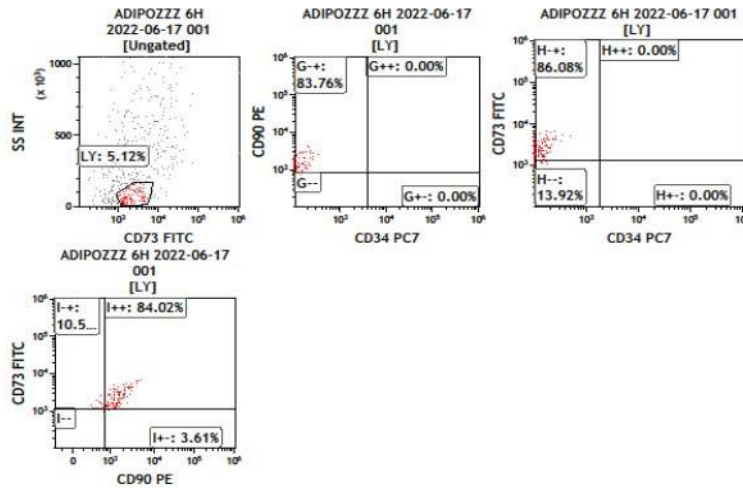
Şekil 21 Grup2(12 hf) Kondrojenik Farklılaşma



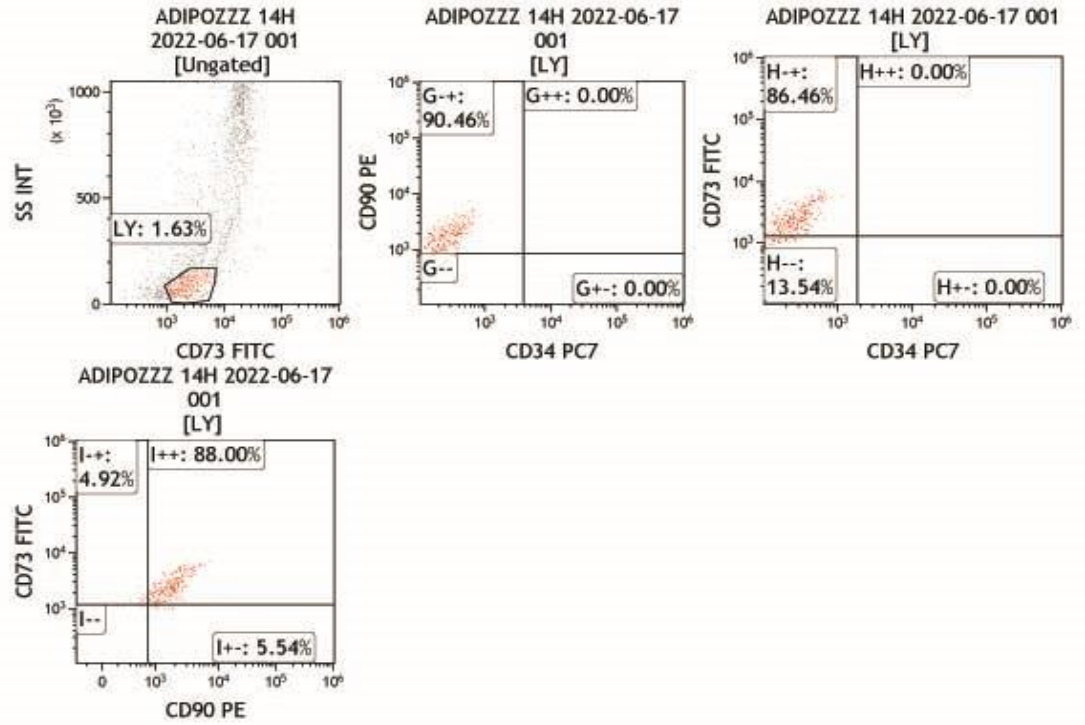
Şekil 22 Grup2 (12hf) Kondrojenik Farklılaşma

4.2 Flowsitometri sonuçları

Kök hücre karakterizasyonu amacıyla yapılan flowsitometrik analizde: Grup1 de mezenkimal kök hücre belirteçlerinden CD73 %86,08 CD90 %83 olarak ölçülmüş grup2'de CD73 %86,46 CD90 %90,46 olarak ölçülmüştür. Hematopoyetik kök hücre belirtecinden CD34 ise her iki grupta negatif olarak ölçülmüştür.



Şekil 23 Grup-1 flowsitometri sonuçları



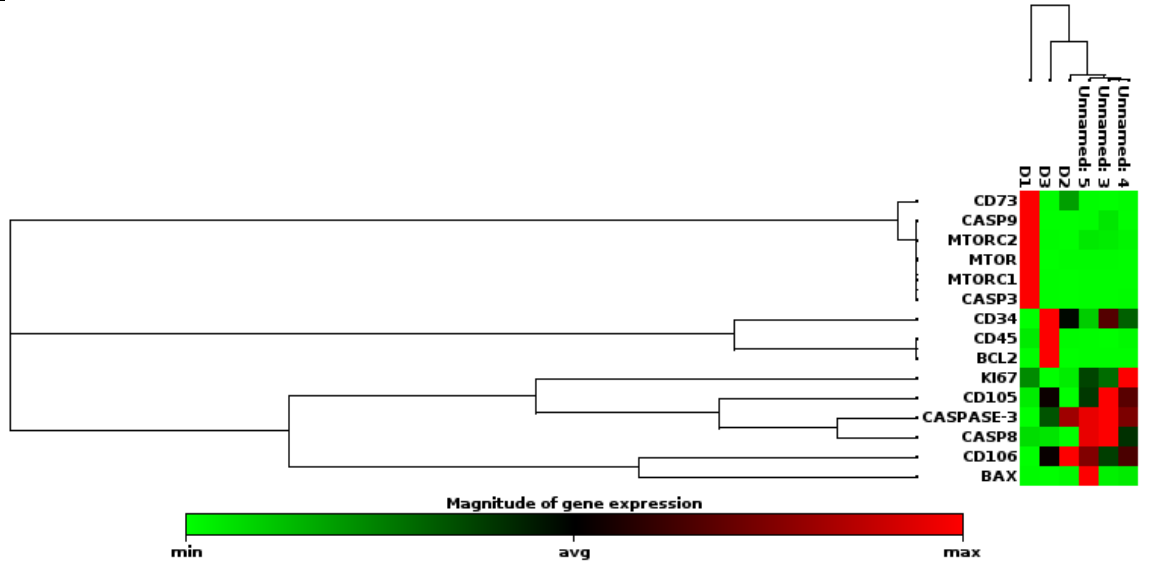
Şekil 24 Grup-2 flowsitometri sonuçları

4.3 PCR analiz sonuçları

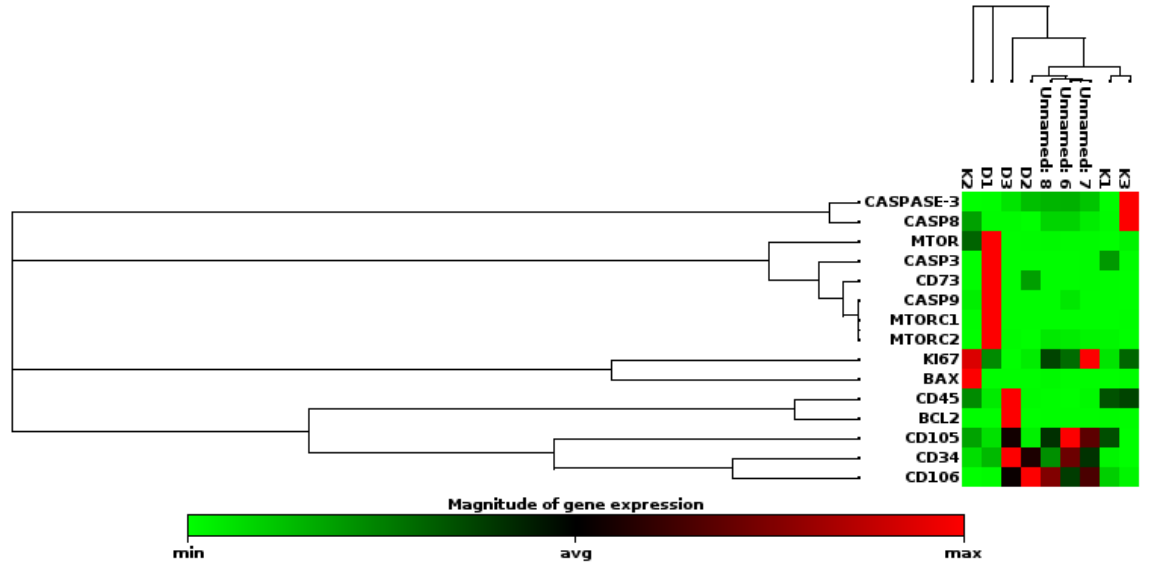
PCR analiz sonuçlarına göre mTORC1'in ve mTORC2'nin en yüksek ekspresyonun grup2'de en düşük ekspresyonunun ise grup1'de olduğu belirlendi. Grup3'teki ekspresyonu grup2'ye göre daha düşük grup1'e göre ise yüksekti. Pro-apoptotik belirteçlerden Bax, kaspaz8 ve kaspaz3 ekspresyonunun grup1'de yüksek olduğu en düşük kaspaz 8 ve Bax değerinin ise grup2'de olduğu izlendi. Kaspaz 9 grup 2 ve 3 te birbirine yakın ve grup1'den yüksekti. Anti- apoptotik belirteçlerden BCL-2 'nin en düşük grup1'de en yüksek grup2'de olduğu izlendi.

Tablo 4 PCR analiz sonuçları

| | 1.GRUP | | | 2.GRUP | | | 3.GRUP | | |
|----------|-----------------|----------|----------|-----------------|----------|----------|-----------------|----------|----------|
| | fold regulation | p valoue | comments | fold regulation | p valoue | comments | fold regulation | P valoue | comments |
| b-actin | 1.00 | nan | | 1.00 | nan | | 1.00 | nan | |
| CD 34 | -1.09 | 0.701622 | B | 3.52 | 0.099874 | B | 3.22 | 0.045107 | |
| CD 45 | -23.59 | 0.349873 | A | -4.37 | 13944 | | -103.01 | 0.002184 | A |
| CD 73 | -48.06 | 0.267103 | A | 118.33 | 0.265525 | A | 2.46 | 0.300196 | B |
| CD 105 | 1.57 | 0.108870 | | 1.02 | 0.84691 | | 1.59 | 0.058870 | |
| CD 106 | 1.90 | 0.793901 | | 4.03 | 0.177414 | | 7.66 | 0.008406 | |
| KI 67 | 1.88 | 0.119115 | | -1.56 | 0.278834 | | 1.21 | 0.736219 | |
| BCL 2 | -2.87 | 0.376285 | | 4.39 | 0.376430 | | 1.53 | 0.953092 | |
| BAX | 8.75 | 0.341625 | | -13.83 | 0.373976 | | -1.58 | 0.379017 | |
| MTOR | -3.72 | 0.377098 | B | 1.29 | 0.547155 | B | -2.89 | 0.358892 | B |
| MTORC 1 | -9.43 | 0.374150 | | 27.10 | 0.373555 | A | 2.87 | 0.039818 | A |
| MTORC 2 | -1.61 | 0.411910 | B | 3.39 | 0.376020 | B | 2.11 | 0.028031 | |
| CASPASE3 | 1.70 | 0.106472 | | -1.50 | 0.454886 | | 1.13 | 0.81195 | |
| CASP 8 | 4.72 | 0.17825 | | -8.82 | 0.268076 | A | -2.09 | 0.341881 | A |
| CASP 9 | 1.01 | 0.397375 | | 3.70 | 0.387447 | | 3.72 | 0.706170 | |



Şekil 25 PCR analiz sonuçları grup 1-2



Şekil 26 PCR analiz sonuçları grup 1

5.TARTIŞMA

Yetişkinlerde, dokuya özgü kök hücreler doku homeostazını korur ve doku hasarından sonra rejenerasyon için progenitör hücreleri oluşturur. Kök hücre havuzunu korumak ve aynı zamanda dokuya özgü hücre farklılaşması için gerekli progenitörleri sağlamak için, kök hücrelerin kendini yenileme sürecinden geçmesi gerekir. Kök hücrelerin korunması ve doku yenilenmesi arasındaki denge, birçok farklı faktör tarafından hassas bir şekilde düzenlenmektedir. Büyüme faktörleri, enflamatuar mediatörler, hücre dışı ortam, hücre-hücre sinyalizasyonu, hücrel metabolizma bu düzenleyici faktörler arasındadır.

Bununla birlikte kök hücreler hastalıkta veya yaşlanma sırasında zararlı etkilere maruz kalmaktadırlar.

Bengal ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada yaşlanmanın kök hücre fonksiyonunda genel bir düşüşe ve kök hücre fenotipinde spesifik değişikliklere

neden olduğunu bununda lokal doku nişleriyle ilgili olduğunu belirtmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda yaşlanma sırasında, iskelet kasında (Rossi, Bryder vd 2005), sinir sisteminin belirli kısımlarında (Morrison, Wandycz vd 1996) ve epitel dokusunun saç foliküllerinde kök hücre döngüsü yavaştır ve bu dokularda kök hücre havuzunda da genel olarak düşüklük olduğu belirtilmektedir. Bizde çalışmamızda da 17 aylık sıçanlardan oluşan grup3'ten elde ettiğimiz yağ doku kökenli kök hücrelerde hücre çoğalmasının çok düşük olduğu ve çoğalmanın ileri pasajlara gidemediğini saptadık. Buna zıt olarak Morrison ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bazı dokularda ki kök hücrelerin örneğin hematopoetik kök hücreler (HSC'ler) de olduğu gibi, popülasyonlarını koruyabildiklerini veya yaşlanmayla birlikte sayıları artırabildikleri gösterilmiştir(Morrison, Wandycz vd 1996). Ancak yaşlanma sırasında HSC'lerin sayılarının artmasına rağmen, hücre fonksiyonunda hala bir düşüş (Sudo, Ema vd 2000) ve hücrelerin yaşam sürelerinde de farklılık olduğu başka çalışmalarda gösterilmiştir (Biteau, Hochmuth 2008). Benzer şekilde, bağırsak kök hücre yaşlanmasında da hücre sayısında artış ve hücre fonksiyonunda azalma görülmektedir (Nakada, Oguro vd 2014). Çalışmalarda yaşlanmaya karşı kök hücre yanıtının ve bunların kök hücre nişiyle ilgisini anlamak için ileri düzeyde moleküler araştırmaların yapılması gerektiği belirtilmektedir.

Son yıllarda, mezenkimal kök hücrelerin organogenez ve immünomodülasyona önemli katkı sağlaması bu hücrelerin prelinik ve klinik uygulamalarının geliştirilmesine ve uygulanmasına yol açmıştır. Özellikle mezenkimal kök hücre transplantasyonu (MSCT), immünomodülasyon ve doku rejenerasyonu elde etmek için güçlü ve umut verici bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir, ancak MSC'lerin terapötik etkilerinin nasıl uyguladığının mekanizmaları açıklığa kavuşturulmamıştır. Artan kanıtlar, nakledilen MSC'lerin alıcılarda yalnızca kısa bir süre canlı kaldıklarını, ardından konakçı dolaşımında veya aşılınmış dokularda apoptoza maruz kaldıklarını göstermektedir. Bizim çalışmamızda yaşa bağlı olarak elde edilen mezenkimal kök hücrelerde apoptotik moleküllerden kaspaz8, kaspaz9 ve bax ve antiapoptotik proteinden BCL-2 qPCR yöntemiyle analiz edildi. Biz pro-apoptotik kaspazlardan kaspaz8, kaspaz9, kaspaz3 ve Bax ekspresyonların grup1 de yüksek olduğunu gördük. Grup2 de kaspaz3, kaspaz8 ve Bax oranı düşük anti-apoptotik belirteç olan BCL-2 oranı çok yüksekti. Grup3 te kaspaz 3 grup1e yakın bir değer gösterdi ancak kaspaz8, 9 ve bax grup1den daha düşük grup2'den daha yüksekti. Kaspaz3'ün grup3 teki yüksekliği yaşa bağlanabilir ancak grup1 deki yükseklik tam olarak açıklanamadı. Önceki çalışmalar östrojen reseptörlerinin embriyonik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler ve kardiyak kök hücreler (CSC'ler) dahil olmak üzere çeşitli kök hücrelerde eksprese edildiğini bildirmektedir (Zhou, Zilberman vd 2001). Östrojenin embriyonik kök hücrelerin farklılaşmasını düzenlediği (Brinckmann, Kaschina 2019), mezenkimal kök hücrelerde hücrelerin apoptozunu inhibe

ettiği bildirilmiştir. Grup3teki sıçanlar (17 aylık) premenopozal dönemde oldukları için grup1'deki sıçanlarda pubertal dönemde oldukları için östrojen seviyeleri düşük olabilir bu da kök hücrelerde apoptozisin diğer gruba karşın daha yüksek olmasına neden olabilir.

Kök hücreler, kendi kendini yenileme ve farklılaşmış progenitör hücreler üretme yetenekleriyle doku homeostazını sürdürür (Gingras, Raught vd 2000), bu da daha sonra belirli işlevlere sahip farklı hücre tiplerine değişir. Kök hücrenin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını yöneten moleküler mekanizmalar bu nedenle çok araştırılmaktadır.

MTOR çok yönlü bir protein molekülüdür ve sırasıyla hem serin / treonin kinaz hem de tirozin kinaz olarak işlev gördüğü bilinen Raptor-mTOR (mTORC1) ve Rictor-mTOR (mTORC2) komplekslerinin katalitik bir çekirdek bileşenidir (Martin K, Kirkwood vd 19998). mTOR'un erken embriyonik gelişimde, özellikle pluripotenside ve T-hücreleri transdiferansiyasyonunda anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (Dorrello, Peschiaroli vd 2006). MTORC1, çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek metabolik homeostaz, protein ve lipid sentezinde, glikoliz, mitokondriyal ve lizozom biyogenezinde merkezi bir rol oynar ve translasyonu doğrudan kontrol eder (Wang, Li vd 2001). Glikoz metabolizmasını ve nükleotid sentezini metabolik yol proteinleri aracılığıyla modüle eder. Ayrıca proteazom düzeneğini ve otofajiyi düzenler (Beretta, Gingras vd 1996). MTORC2 esas olarak hücre proliferasyonunu, sağkalımı, sitoskeletin yeniden düzenlenmesini, hücre göçünü, glikoz metabolizmasını ve apoptozu düzenler (Brand, Buttgerit vd 1995).

Yukarıda bahsedildiği gibi mTOR sinyalizasyonu temel hayati fonksiyonlar üzerinde geniş bir etkiye sahiptir ve düzensiz sinyalizasyonu insanlarda patogenezle sonuçlanan normal fizyolojik fonksiyonları değiştirir. Ayrıca, deregüle mTOR'un nöronal dejenerasyon, obezite, tip 2 diyabet ve kanser dahil olmak üzere metabolik hastalıklarda rol alır(Thompson, Ward vd 2012)

Çok sayıda hücre dışı ve hücre içi sinyal, mTORC1 sinyalinin modülasyonunda rol oynamaktadır. Büyüme faktörlerine yanıt olarak, mTORC1 PI3K/AKT yolu üzerinden aktive edilir AKT, beyinde zenginleştirilmiş küçük GTPaz RAS homologuna (RHEB) doğru GTPaz aktive edici bir protein (GAP) görevi gören tüberküloz skleroz kompleksini (TSC1/2) fosforile eder ve inaktive eder (Regufe da Mota, Wang vd 2014). TSC kompleksinin inhibisyonu mTORC1'in aktivasyonuna yol açan GTPbound RHEB seviyelerini artırır. Ek olarak, amino asitler (özellikle dallanmış zincirleri olanlar), GTPazların RAS ile ilişkili GTP bağlayıcı proteinleri (RAG) ailesi aracılığıyla mTORC1'e sinyal verir (40). RAG GTPazlar, mTORC1'in RHEB tarafından uyarıldığı lizozomlara mTORC1'i işe alır (26,30)ATP / AMP oranındaki bir azalma, TSC kompleksine bağımlı veya bağımlı olmayan bir roldeki mTORC1'i baskılamak için AMP kinazını (AMPK) aktive eder (Mayer, Zhao vd 2004).

Araştırmalarda mTOR sinyalinin bu süreçlerde nasıl bir rol oynadığı anlaşılmaya çalışılmıştır. Erken çalışmalar, farklılaşmada mTORC1'in bir rolünü tanımlanmış ve rapamisin tedavisinin adiposit oluşumunu engellediğini ortaya koymuştur (Oh, Jacinto 2011). Sonraki çalışmalar, memeli gelişiminde embriyonik kök hücre (ESC) işlevi için mTOR aktivitesinin gerekli olduğunu (Manning, Tee vd 2003) ve mTOR aktivitesinin kesin düzenlenmesinin kök hücrenin kendini yenilemesi ve farklılaşmasında önemli olduğunu göstermiştir. (Fitter, Martin vd 2015). Kök hücrelerde mTORC1 ve mTORC2'nin fizyolojik rollerini anlamak önemli olsa da, mTOR'un in vivo çalışmaları, büyüme ve gelişme için mTOR sinyalleme gereksinimi nedeniyle bir zorluk teşkil etmektedir.

Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), çevresel uyaranlara yanıt olarak, adipositler, kondrositler ve osteoblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerini oluşturmak için farklılaşan pluripotent hücrelerdir (Goraksha-Hicks, Kim vd 2008). Daha önce ifade edildiği gibi fare fibroblastlarında ve primer insan pre-adipositlerinde rapamisinin adipojenik farklılaşmayı inhibe ettiğini gösterilmiştir (Phinney, Prockop 2007). Biyokimyasal ve genetik çalışmalar, mTORC1'in insülin aracılı aktivasyonunun, transkripsiyon faktörü peroksizom proliferatif aktive reseptör gama (PPAR γ) yoluyla adipogenez desteklediğine dair açık kanıtlarla mTORC1'in adipogenezdeki rolünü vurgulamıştır (Bell, Grunder 2009). Bununla birlikte, osteoblast farklılaşmasında mTOR sinyallemesinin rolü ile ilgili çelişkili sonuçlar vardır (Bierer, Yeh vd 1995). Genetik çalışmalar mTORC1'in runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 de dahil olmak üzere osteoblastik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu baskılayarak osteoblast farklılaşmasını önlediğini göstermektedir.

Bir başka çalışmada ise mTORC1 ve mTORC2'nin hücre farklılaşmasındaki rolleri Raptor ve *Rictor-nakavt* MSC'leri kullanılarak ortaya çıkarılmıştır (Cho, Park vd 2004). Bu çalışmalarda da Raptor eksikliği olan MSC'lerin adiposit oluşturma kapasitesindeki azalma adiposit farklılaşmasında mTORC1'in rolünü güçlendirmektedir. Ayrıca Raptor-nakavt MSC'lerin kemiğe benzer mineralize bir matris oluşturma kapasitesinde gösterdiği belirtilmektedir (El-Chaâr, Gagnon vd 2004) Rictor-eksikliği olan MSC'ler, *Raptor-nakavt* MSC'lerinin tersi olan bir farklılaşma programı sergilemişlerdir, yani adiposit oluşumunun arttığı, mineralize matris oluşumunun azaldığı bulunmuştur. Yukarıda bahsedilen tüm bu sonuçlar mTORC1 aktivitesinin adiposit farklılaşmasını desteklediğini ve osteoblast farklılaşmasını inhibe ettiğini, mTORC2'nin adiposit farklılaşmasını inhibe ettiğini ve osteoblast farklılaşmasını teşvik ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, bir başka çalışmada, osteoblast farklılaşması için mTORC1'in gerekli olduğu öne sürülmüştür (Huang, Zhang 2009). mTORC1'in, sirtuin 4'ün (Sirt4) transkripsiyonunu bloke ederek, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü için ara ürünler

sağlamak için glutaminin parçalanması olan glutamin anaplerozunu düzenlediği bilinmektedir (Hattori, Isomoto 2007). SIRT4, glutamin anaplerozunda önemli bir enzim olan glutamat dehidrogenazın parçalanmasına aracılık eden mitokondri lokalize bir ADP-ribozil transferazdır. Glutamin anaplerozunda da rol oynayan glutaminaz ekspresyonu, yaşla birlikte azalır ve azalmış osteogenez ile ilişkilidir (Lee, Yook vd 2010). Glutamin anaplerozun restore edilmesi, uzun süreli kültürde MSC'lerde osteoblast farklılaşmasını teşvik ettiği ve bu nedenle, mTORC1'in osteojenik farklılaşmayı teşvik ettiği belirtilmiştir (Fitter, Martin vd 2015). Bu çelişkili sonuçlar nedeniyle osteojenik farklılaşmada mTORC1 ve mTORC2'nin daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bizim qPCR sonuçlarına göre grup2 ve grup3 sıçanlardan elde edilen kök hücrelerin grup1'e oranla daha fazla mTORC1 ve mTORC2 eksprese ettiği görüldü. MTORC1'in adiposit farklılaşmasını uyardığı çalışmalarla gösterilmiştir. Buna göre grup2 ve grup3'teki kök hücrelerde adiposit farklılaşmasının fazla olması beklenebilir bir durum olarak değerlendirildi. MTORC2 osteoblast farklılaşmasını uyararak etki gösterir. Grup3'te mTORC2 nin daha az olması beklenebilen bir durum ancak grup1'deki mTORC2' nin hem grup2 hem de grup3'e nazaran daha az olması osteoblast aktivasyonun çok olduğunu düşündüğümüz grup1 için beklenmeyen bir durumdu ve bu açıklanamadı.

Hücre çoğalmasında, farklanmasında önemli rol oynayan mTOR aynı zamanda hücre yaşlanmayı düzenler ve biyonerjitik altyapıyı yönlendirir. MTOR'un yaşam süresi ile ilişkisini araştıran çalışmalarda mTOR inhibisyonunun ömrü uzattığı kabul edilmektedir, ancak bunun gerçekleştiği mekanizma hala belirsizdir. Bazı çalışmalarda mTORC1 inhibisyonunun yaşlanmanın kendisini geciktirmediği, ancak yaşa bağlı hastalıkları geciktirdiği öne sürülmüştür (Bitto, Ito vd 2016). Bununla birlikte, birçok araştırmacı mTOR inhibitörlerinin uzun ömürlü etkilerini doğrudan yaşlanmadaki azalmaya bağlamaktadır.

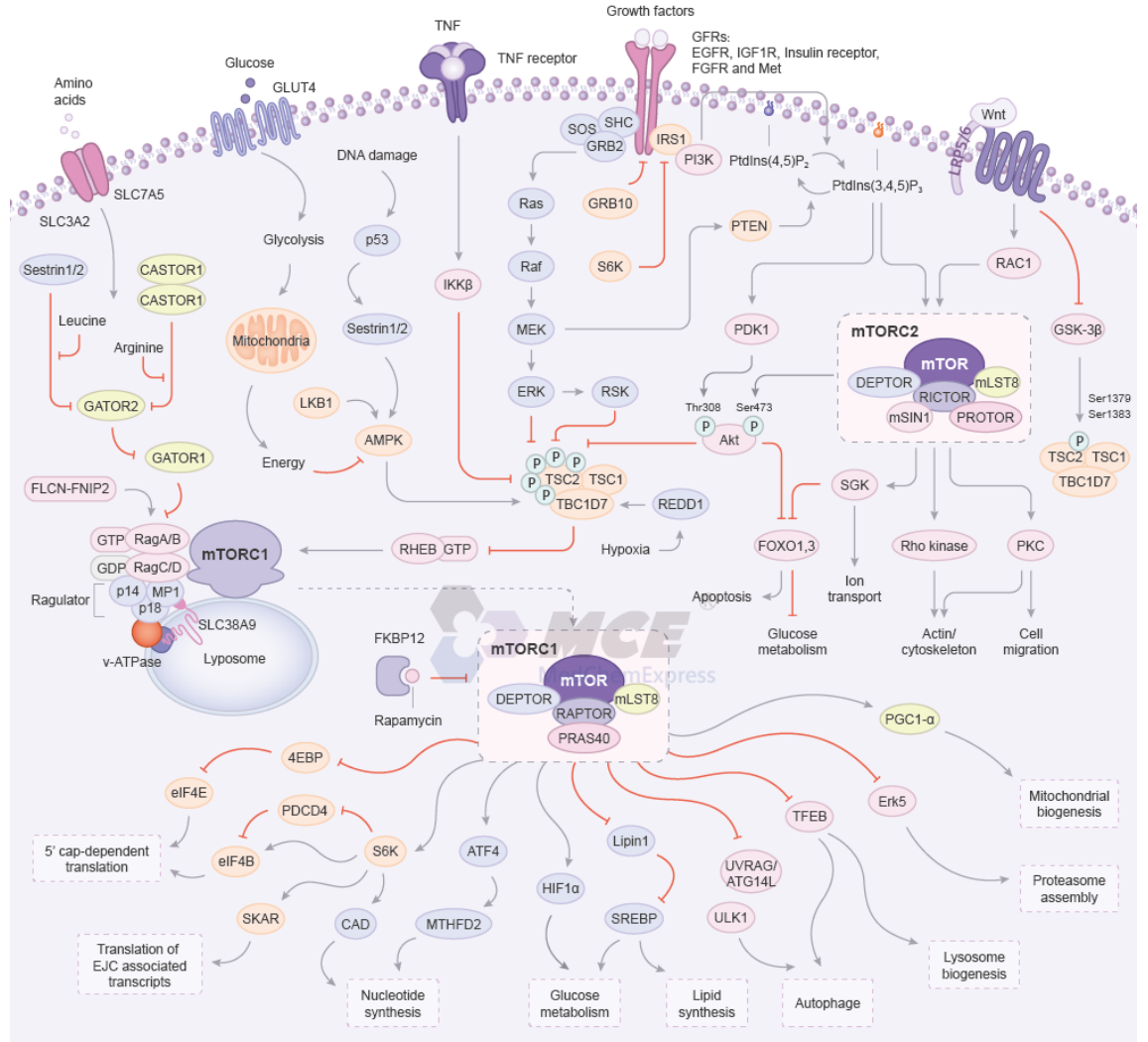
Yaşlanma genellikle fizyolojik bütünlüğün ilerleyici bir kaybı ile karakterizedir, bu da fonksiyonların bozulmasına yol açar ve bu nedenle ölüme karşı savunmasızlığı artırır ve böylece ömrü sınırlar (Blasco, López-Otín 2013). Yaşlanma genel olarak telomer yıpranması, epigenetik değişiklikler, genomik instabilite, proteostaz kaybı, deregüle besin algılaması, mitokondriyal disfonksiyon, hücre yaşlanma, kök hücre tükenmesi ve değişmiş hücreler arası iletişimi içerir (Lees, Walters vd 2016)

MTORC1 inhibisyonunun çeşitli dokulardaki yetişkin kök hücre fonksiyonunun korunmasında rol oynadığı bildirilmektedir (Rabinovitch, Johnson vd 2013) Örneğin, yaşlı farelerin rapamisin ile tedavisi, Paneth hücre nişinde mTORC1 sinyalini azaltarak bağırsak kök hücre fonksiyonunu dolaylı olarak arttırdığı ifade edilmiştir. (Yılmaz

Katajisto vd 2012) Aynı şekilde, kalori kısıtlamasının ömrü uzattığı ve kalori kısıtlaması sırasında mTORC1, bağırsak kök hücrelerinin çoğalmasına izin vermek için indüklendiği belirtilmektedir (Guarente, Igarashi vd 2016).

mTORC1, inflamasyonu veya bağışıklık tepkilerini arttırmak veya sınırlamak için doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sisteminde birçok merkezi ve sıklıkla farklı fonksiyonlara sahiptir (Weichhart 2015, Sukhbaatar 2016,). Önemli olarak, mTORC1 inhibisyonu, T hücre aktivasyonunu sınırlamak ve organ nakli sonrası transplantasyon reddini önlemek için immünsüpresif tedavi olarak ta kullanılmaktadır. Buna karşılık, mTORC1'in inhibisyonu, viral savunma için kritik olan CD8 + T hücre belleği yanıtlarını artırır (Araki, Ellebedy 2011) Bununla birlikte, mTORC1'in yaşlanma sırasında bağışıklık hücrelerindeki rolü ve aktivitesi iyi çalışılmamıştır. Bir çalışmada, anemiye, zayıf aşılama veya artmış tümör oluşumuna katkıda bulunabilecek hematopoetik kök hücre (HSC) fonksiyonunda yaşa bağlı bir düşüşün, yaşlı farelerden HSC'lerde artmış bir mTORC1 aktivitesi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Ogawa, Tokuda vd 1998).

Bizim çalışmamızda mTORC1 en yüksek ekspresyonu grup2'de endüyük ekspresyonu ise grup 1'de izlendi. mTORC1 in uzun ömürle ilişkisi göz önüne alındığında da grup1'in en düşük olması açıklanabilir bir durum ancak grup2'nin grup3'ten yüksek olması oldukça ilginçti. Aslında mTORC1 protein sentezi, transkripiyon, translasyon, DNA sentezi otofaji gibi pek çok hücresel olayda görev almaktadır. Bu grupta yüksek olması bu olayların fazla olmasından ya da şekil27'te gösterildiği gibi mTORC1 ve mTORC2' nin hücresel olaylarda etkilediği son ürünlerin ve yolakların çok farklı ve fazla sayıda olmasından dolayı olabilir. Bununla birlikte mTORC1 inhibisyonu genel ömrü açıkça arttırsa da, kök ve bağışıklık hücreleri üzerinde yaşlanmayı farklı şekilde etkileyebilecek olumlu ve olumsuz işlevler gösterebilir. Her ne kadar kök hücre ile ilgili araştırmaların çoğu mTORC1'in rolü üzerine odaklansada, artan kanıtlar mTORC2'nin kök hücre kendini yenileme ve farklılaşması için de önemli olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalar her iki kompleksin de kök ve progenitör hücrelerde sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerektiğini vurgulamaktadır, çünkü anormal aktiviteleri kök hücre fonksiyonunun bozulmasına ve bazı durumlarda insan hastalığına yol açabilir (Regufe, Wang 2014).



Şekil 27 mTOR yolları

6. SONUÇ

Bu tezde hücrel olaylarda önemli işleve sahip mTORC1 ve mTORC2 nin genç (grup1), olgun (grup2)ve yaşlı(grup3) sıçan yağ dokusundan elde edilen mezenkimal hücrelerdeki ekspresyonları qPCR yöntemiyle incelenmiştir. MTORC1 en yüksek grup2 de en düşük ise grup1'de bulunmuştur. Grup3'teki mTORC1'in grup2'den düşük grup1'den yüksek olduğu saptanmıştır. MTORC2 ekspresyonu en düşük grup1'de iken grup2 ve 3 te birbirine yakın ekspresyon göstermiştir. Sonuçlarımız MTOR'un donor yaşına bağlı olarak kök hücrelerde farklı ekspresyonu gösterdi. Bu farklılığın işlevsel sonuçlarını daha iyi anlayabilmek için ileri düzey araştırmalara gereksinim vardır. MTOR sinyalizasyonu, kök hücrenin kendini yenilemesi, çoğalması ve farklılaşmasının düzenlenmesi için çok önemlidir. Kök hücrelerde moleküler mekanizmaların açıklığa kavuşturulması hem prelinik hem de klinik uygulamalarda kullanımı yaygınlaşan kök hücreler için önemli olacağını düşünmekteyiz.

7 . KAYNAKLAR

Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2016;92:41–51.

Araki K, Ellebedy AH, Ahmed R. TOR in the immune system. *Curr Opin Cell Biol*. 2011 Dec. 23:707–715. [PubMed: 21925855]

Balaji, A. B., Jamil, K., Maruthiram, G., Habibulla, C. M., Isolation of a novel population of multipotent stem cells from epidermal layer of human skin, *Biology and Medicine*, 2, 57–67, 2010.

Bell A., Grunder L. and Sorisky A. (2000). Rapamycin inhibits human adipocyte differentiation in primary culture. *Obesity Res*. 8, 249-254. 10.1038/oby.2000.29

Bengal, E., Perdiguero, E., Serrano, A. L. and Muñoz-Cánoves, P. (2017). Rejuvenating stem cells to restore muscle regeneration in aging. *F1000Res* 6, 76

Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4EBP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 1996; 15:658-64; PMID:8599949

Bhagwat, S. V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., Shapiro, L.H., CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation, *Blood*, 97, 652–659, 2001.

Biteau B., Hochmuth C. E. and Jasper H. (2008). JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. 3, 442-455. 10.1016/j.stem.2008.07.024

Bitto A, Ito TK, Pineda VV, LeTexier NJ, Huang HZ, Sutlief E, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *elife*. 2016 Aug 23. doi: 10.7554/eLife.16351

Brinckmann M, Kaschina E, Altarche-Xifro´ W, Curato C, Timm M, Grzesiak A, et al. Estrogen receptor alpha supports cardiomyocytes indirectly through post-infarct cardiac c-kit+ cells. *J. Mol Cell Cardiol*. 2009; 47: 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.014> PMID: 19341743

Buttgereit F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J* 1995; 312 (Pt 1):163-7; PMID:7492307

Caplan, A. I., Bruder, S. P., Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century, *Trends in Molecular Medicine*, 7, 259–64, 2001.

Cho H. J., Park J., Lee H. W., Lee Y. S. and Kim J. B. (2004). Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 321, 942-948.

Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 2006; 314:467-71; PMID:17053147; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1130276>

EI-Chaâr D., Gagnon A. and Sorisky A. (2004). Inhibition of insulin signaling and adipogenesis by rapamycin: effect on phosphorylation of p70 S6 kinase vs eIF4E-BP1. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 28, 191-198. 10.1038/sj.ijo.0802554 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3:393–403.

Igarashi M, Guarente L. mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction. *Cell*. 2016 Jul 14;166:436–450. [PubMed: 27345368]

Isomoto S., Hattori K., Ohgushi H., Nakajima H., Tanaka Y. and Takakura Y. (2007). Rapamycin as an inhibitor of osteogenic differentiation in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Sci.* 12, 83-88. 10.1007/s00776-006-1079-9 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stemcells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007; 110(8):3056–63.

Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeblerlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*. 2013 Jan 17;493:338–345. [PubMed: 23325216]

Kode, J.A., Mukherjee, S., Joglekar, M. V., Hardikar, A. A., Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration, *Cytotherapy*, 11, 377–91, 2009.

Lee K. W., Yook J. Y., Son M. Y., Kim M. J., Koo D. B., Han Y. M. and Cho Y. S. (2010c). Rapamycin promotes the osteoblastic differentiation of human embryonic stem cells by blocking the mTOR pathway and stimulating the BMP/Smad pathway. *Stem Cells Dev.* 19, 557-568. 10.1089/scd.2009.0147 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

Lees H, Walters H, Cox LS. Animal and human models to understand ageing. *Maturitas*. 2016 Nov. 93:18–27. [PubMed: 27372369]

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153:1194–1217. [PubMed: 23746838]

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153:1194–1217. [PubMed: 23746838]

Martin K., Kirkwood T. B. L. and Potten C. S. (1998). Age changes in stem cells of murine small intestinal crypts. 241, 316-323. 10.1006/excr.1998.4001

Martin S. K., Fitter S., Dutta A. K., Matthews M. P., Walkley C. R., Hall M. N., Ruegg M. A., Gronthos S. and Zannettino A. C. (2015). Brief report: the differential roles of mTORC1 and mTORC2 in mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 33, 1359-1365. 10.1002/stem.1931 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

Matic I, Antunovic M, Brkic S, Josipovic P, Mihalic KC, Karlak I, et al. Expression of OCT-4 and SOX-2 in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation. *Open Access Maced J Med Sci*. 2016;4:9–16.

Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* 2004; 18:423-34; PMID:15004009; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.285504>

Meza-Zepeda, L. A., Noer, A., Dahl, J. A., Micci, F., Myklebost, O., Collas, P., High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells to senescence, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12, 553–63, 2008.

Morrison S. J., Wandycz A. M., Akashi K., Globerson A. and Weissman I. L. (1996). The aging of hematopoietic stem cells. 2, 1011-1016. 10.1038/nm0996-1011

Nakada D, Oguro H, Levi BP, Ryan N, Kitano A, Saitoh Y, et al. Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature*. 2014; 505: 555–558. <https://doi.org/10.1038/nature12932> PMID: 24451543

Nielsen J. S., McNagny, K. M., CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery, *Microcirculation*, 16, 487–96, 2009.

Ogawa T. T., Tokuda M., Tomizawa K., Matsui H., Itano T., Konishi R., Nagahata S. and Hatase O. (1998). Osteoblastic differentiation is enhanced by rapamycin in rat osteoblast-like osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 226-230. 10.1006/bbrc.1998.9118 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

Oh WJ, Jacinto E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle* 2011; 10:2305-16; PMID:21670596; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.14.16586>

Ong, W. K., Tan, C. S., Chan, K. L., Goesantoso, G. G., Chan, X. H. D., Chan E., Yin, J., Yeo, C. R., Khoo, C. M., So, J. B. Y., Shabbir, A., Toh, S.-A., Han, W., Sugii, S., Identification of specific cell-surface markers of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat depots., *Stem Cell Reports*, 2, 171–9, 2014.

Pereira, F. E., Cronin, C., Ghosh, M., Zhou, S.-Y., Agosto, M., Subramani, J., Wang, R., Shen, J.-B., Schacke, W., Liang, B., Yang, T. H., McAulliffe, B., Liang, B. T., Shapiro, L. H., CD13 is essential for inflammatory trafficking and infarct healing following permanent coronary artery occlusion in mice, *Cardiovascular Research*, 100, 74–83, 2013.

Phinney D. G. and Prockop D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25, 2896-2902. 10.1634/stemcells.2007-0637

Pruszek, J., Ludwig, W., Blak, A., Alavian, K., Isacson, O., CD15, CD24, and CD29 Define a Surface Biomarker Code for Neural Lineage Differentiation of Stem Cell, *Stem Cells* ,27, 2928–2940, 2012.

Raught B, Gingras AC, Gygi SP, Imataka H, Morino S, Gradi A, Aebersold R, Sonenberg N. Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *EMBO J* 2000; 19:434-44; PMID:10654941; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.3.434>

Ren H, Sang Y, Zhang F, Liu Z, Qi N, Chen Y. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from umbilical cord, dental pulp, and menstrual blood as sources for cell therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4736971/>. [cited 2019 Mar 31].

Rossi D. J., Bryder D., Zahn J. M., Ahlenius H., Sonu R., Wagers A. J. and Weissman I. L. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *102*, 9194-9199. 10.1073/pnas.0503280102 (Rossi ve ark., 2005).

Sudo K., Ema H., Morita Y. and Nakauchi H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *192*, 1273-1280. 10.1084/jem.192.9.1273

Sukhbaatar N, Hengstschläger M, Weichhart T. mTOR-Mediated Regulation of Dendritic Cell Differentiation and Function. *Trends Immunol.* 2016 Nov.37:778–789. [PubMed: 27614799]

Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 2003; 13:1259-68; PMID:12906785; [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00506-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00506-2)

Traktuev, D. O., Merfeld-Clauss, S., Li, J., Kolonin, M., Arap, W., Pasqualini, R., Johnstone, B. H., March, K. L., A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks, *Circulation Research*. 102, 77–85, 2008.

Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J* 2001; 20:4370-9; PMID:11500364; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.16.4370>

Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 2012; 21:297-308; PMID:22439925;

Weichhart T, Hengstschläger M, Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat Rev Immunol.* 2015 Oct.15:599–614. [PubMed: 26403194]

Wong, A. H. M., Zhou, D., Rini, J. M., The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing, *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 804–813, 2012.

Yeh W.-C., Bierer B. E. and McKnight S. L. (1995). Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11086-11090. 10.1073/pnas.92.24.11086

Yilmaz ÖH, Katajisto P, Lamming DW, Gültekin Y, Bauer-Rowe KE, Sengupta S, et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature*. 2012 Jun 28;486:490–495. [PubMed: 22722868]

Zhang H. H., Huang J., Duvel K., Boback B., Wu S., Squillace R. M., Wu C.-L. and Manning B. D. (2009). Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS ONE* 4, e6189 10.1371/journal.pone.0006189

Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, Bain SD, Sadovsky Y, Gazit D. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem Suppl*. 2001; Suppl 36: 144–155.