



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YAŞLANMA SÜRECİNDE OVERLERDE
KLOTHO GENİNİN
İFADE DÜZEYİNİN İNCELENMESİ**

Ayla KURT

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YAŞLANMA SÜRECİNDE OVERLERDE
KLOTHO GENİNİN
İFADE DÜZEYİNİN İNCELENMESİ**

Ayla KURT

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

**ANKARA
2023**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yaşlanma Sürecinde Overlerde Klotho Geninin İfade Düzeyinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayla KURT

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Ayla KURT tarafından hazırlanan “Yaşlanma Sürecinde Overlerde Klotho Geninin İfade Düzeyinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03.05.2023

İmza
Doç. Dr. Oya Sena AYDOS
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Doç. Dr. Hasibe VERDİ
Başkent Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulutarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Yaşlanma	1
1.2. Hücresel Yaşlanma	2
1.3. Onkogen Kaynaklı Yaşlanma	5
1.4. Yaşlanmanın Moleküler Yolları	5
1.5. Hücre Döngüsünün Durması ve Yaşlanma	5
1.6. Yaşlanmış Hücrelerin Biyobelirteçleri	7
1.7. SASP'nin Hücreler Üzerine Etkisi	8
1.8. SASP'nin Epigenetik Düzenlemesi	10
1.9. SASP'nin Yaşlanmaya ve Hastalıklara Katkısı	11
1.10. DNA Hasar Yanıtı (DDR)	11
1.11. ROS ve Antioksidanlar	12
1.12. Serbest Radikallerin Mekanizması	14
1.13. Antioksidan Savunma Sistemi	14
1.14. Kök Hücrelerin Yaşlanması	19
1.15. Ovaryumta Oositin Gelişimi	19
1.16. Kümülsüs Hücreleri	22
1.17. CC Redoks Biyolojisi	23
1.18. Oosit Hücrelerinde Oksidatif Strese Karşı Kümülsüs Hücre Savunma Mekanizmaları	24
1.19. Mitokondri ve Oosit Yaşlanması	25
1.20. Oositlerde ve üreme süreçlerinde mitokondriyal fonksiyon	26
1.21. Mitokondriyal Metabolizma	27
1.22. ROS'un Ovaryum Üzerindeki Etkisi	28
1.23. Ovaryum Yüzey Epitelinde Bulunan Kök Hücreler ve Yaşlanması	30
1.24. NRF2 Geni ve Yaşlanmadaki Rolü	32
1.24.1. SOD	33
1.24.2. Katalaz (CAT)	34
1.24.3. Peroksiredoksin (Prdx)	35
1.24.4. GST'ler	35
1.24.5. GSH	35
1.24.6. HO-1	36
1.24.7. NQO-1	36
1.24.8. NRF2/EpRE Aktivitesinde Yaşlanmaya Bağlı Değişiklikler	37
1.24.9. NRF2 Fosforilasyonu	37
1.24.10. Yaşlanmada NRF2 negatif düzenleme mekanizması:	38

1.25. Klotho Geni	41
1.25.1. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	42
1.25.2. Salgılanan Klotho Proteini (Çözünür Klotho, sKL)	42
1.25.3. Transmembran Klotho Proteini	44
1.25.4. Hücre İçi Klotho Proteini	46
1.25.5. Klotho Eksikliği Kök Hücre Yaşlanmasına ve Tükenmesine Neden Olur	49
1.26. İNTERLÖKİN-1 β	51
1.26.1. IL-1 β ve Yaşlanma	52
1.27. İNTERLÖKİN-6	53
1.27.1. IL-6 Sinyal Yolu	54
1.27.2. IL-6 Sentezinin Düzenlenmesi	56
1.27.3. Erken Yaşlanmada IL-6'nın Rolü	57
1.28. p53 Geni	57
1.28.1. Hücresel Yaşlanma ve P53 İlişkisi	59
1.28.2. P53 Apoptoz İlişkisi	60
1.29. GSK-3 β Geni	61
1.29.1. GSK-3 β ve İnflamatuar Mekanizması	63
1.29.1.1. PI3K/Akt Sinyali Yolu	63
1.29.1.2. NF- κ B Sinyali	63
1.29.1.3. β -Katenin Sinyali	64
1.29.1.4. mTOR Sinyali	64
1.29.1.5. STAT Sinyali	67
1.29.1.6. TGF β 1 ve IL-10 Sinyali	67
1.29.1.7. Akt Sinyali	67
1.29.1.8. Endoplazmik Retikulum Stresi	68
1.29.1.9. Mitokondriyal disfonksiyon	68
1.29.2. GSK3 ve Hücresel Yaşlanma	69
1.29.3. GSK-3 β 'nın Yukarı Akış Regülatörleri	70
1.29.3.1. SIRT3	71
1.29.4. GSK-3 β 'nın Aşağı Akış Eftörleri	71
1.29.5. β -Katenin	71
1.29.6. NRF2	72
1.30. AKT Geni	72
1.31 Ovaryum Yüzey Epitel Hücreleri	76
2. GEREÇ VE YÖNTEM	78
2.1. IHOEC Hücre Kültürü:	79
2.1.1. IHOEC Hücrelerinin Çözülmesi	79
2.1.2. IHOEC Hücrelerinin Kültürlerinin Devam Ettirilmesi	79
2.2. MTT(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide)	
Hücre Canlılık Testi	80
2.3. Senesens-ilişkili Beta-Galaktosidaz (SABG) Boyaması	80
2.4. Senesens-ilişkili Heterokromatin Odakları (SAHF) Boyaması	81
2.5. RNA İzolasyonu, RNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü ve RNA AgaroZ Jel Elektroferezi	82
2.6. İzole Edilen RNA Örneklerinden cDNA Sentezi	83
2.7. Ters Transkriptaz Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ve Analizi	84

3. BULGULAR	85
3.1. IHOEC Hücrelerinden Senesens Oluşturulması	85
3.2. MTT Hücre Canlılık Testi	85
3.3. Senesens Alakalı Beta Galatozidaz Aktivitesi	87
3.4. Senesens Alakalı Heterokromatin Odakları	89
3.5. RT-qPCR	89
4. TARTIŞMA	104
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	110
ÖZET	112
SUMMARY	113
KAYNAKLAR	114
ÖZGEÇMİŞ	137



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, yaşlanma sürecinde IHOEC hücrelerinde yaşlanmanın Klotho ve NRF2 genlerinin ifade düzeylerine etkisi incelenmiştir. Çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Tezimin oluşturulması ve yürütülmesi sırasında yardımlarıyla beni bilimsel anlamda yönlendiren, zor anımda yanımda duran tezimin gerçekleşmesi için malzeme desteğinde bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU hocama çok çok teşekkür ederim.

Tezin başlamasında büyük emeği geçen, benden yardımlarını esirgemeyen fakat pandemi nedeniyle beraber çalışmaya devam edemediğimiz değerli ilk danışmanım Prof. Dr. Fulya TEKŞEN'e teşekkür ederim.

Tezimin bütün aşamalarında yardımlarıyla beni destekleyen motive eden saygıdeğer Doç. Dr. Tülin ÖZKAN hocama çok teşekkür ederim.

Tezimde istatistik çalışmasında yardımda bulunan Doç.Dr. Derya GÖKMEN Hocama teşekkür ederim.

Tezimin bana destek olan arkadaşım Alper DAĞCAN'a ve tezimi yaparken rahatsızlandığımda tezimde büyük yardımları olan arkadaşım Elif DENER'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardımcı olan bana destek çıkan arkadaşlarım Ar.Gör. Nurbanu GÖNÜLKIRMAZ'a ve Nazila FARHANGZAD' a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda bana yardımcı olan arkadaşım Esra KOÇAK, Sonay ZENGİNER ve Merve Nur AKSAKAL'a çok teşekkür ederim.

Tıbbi Biyoloji ABD'nda görev yapan sevgili Dilek YILMAZ'a manevi destekleri için çok teşekkür ederim

Arkadaşlarım Doğa TEZAL ALTINDAĞ ve Kübra GAYRET'e teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Derece, Santigrat
BM	Kemik İliği
CCF	Sitozolik Kromatin Fragmanları
CT	Eşik Siklus
DDR	DNA Hasar Tepkisini
dH ₂ O	Distile Su
DSB	DNA Çift Zincir Kırılmasına Neden Olabilir
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	Epitelyal Mezenkimal Transisyon
ER	Endoplazmik Retikulum
ERK	Hücre Dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz
EtOH	Etil alkol
EV	Hücre Dışı Vezikül
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
g	Gram
G	Gravite
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
hMSC	Mezenkimal Kök Hücreler
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
KL	Klotho
µg	Mikro gram
µl	Mikro litre
µM	Mikro molar
MAPK	Mitojenle-Etkinleşen Protein Kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinaz)
MLL1	Histon-lizin-N-metiltransferaz 2A
mM	Mili Molar
MMP	Mitokondriyal Zar Potansiyeli
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin

NK	Naturel Killer
NO	Nitrik Oksit
OH	Hidroksil Radikali
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SAHF	Heterokromatin Odakları
SASP	Senesent hücreler, Senesens İle İlişkili Salgı Fenotipi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SIPS	Stres Kaynaklı Erken Yaşlanma
Skl	Salgılanan Klotho
Sn	Saniye
TGF-�	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-beta
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Hücresel yaşlanmanın ayırt edici özellikleri	7
Şekil 1.2. Hücresel yaşlanma mekanizması	10
Şekil 1.3. Foliküler gelişim ve atrezide otofajinin düzenlenmesi	22
Şekil 1.4. Yumurtalığın potansiyel ve hücre soylarını gösteren şema	23
Şekil 1.5. İnsan embriyonik kök hücrelerinde sinyal ağları	32
Şekil 1.6. NRF2 sinyal yolu	33
Şekil 1.7. NRF2 antioksidan mekanizması	37
Şekil 1.8. NRF2 aktivitesini düzenleme yolağı	40
Şekil 1.9. Endotel hücrelerinde anjiyotensin-(1-7)'nin yaşlanma karşıtı mekanizması	51
Şekil 1.10. IL-1 β sinyalizasyon	53
Şekil 1.11. IL-6 reseptör sistemi ve sinyal yolları	56
Şekil 1.12. Yaşlanmanın tetikleyen ana efektör yolağı	60
Şekil 1.13. mTORC1 ve mTORC2 yolakları	66
Şekil 1.14. Keap1 / NRF2 ile oksidatif stres ve yaşlanmada rol oynayan diğer sinyal yolları arasındaki ilişkisi	70
Şekil 1.15. Uzun vadeli güçlendirme sırasında mTORC ve NRF2/ARE sinyal karışması mekanizması	75
Şekil 1.16. Ovaryum yaşlanmasında Oksidatif stres ile ilgili sinyal yolağı	76
Şekil 2.1. İş akış şeması	78
Şekil 3.1. IHOEC hücrelerinin mikroskop görüntüsü A-10X B-10X. IHOEC hücrelerinde farklı derişimlerde uygulanan H ₂ O ₂ 'nin etkisine ait canlılık yüzdesi grafiğı	85
Şekil 3.2. 24. Saat sonunda IHOEC hücrelerinde yüzde canlılık oranları IC ₅₀ =766,5 μ M	86
Şekil 3.3. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC'de SABG Boyamada Beta Galatozidaz aktivitesi	87
Şekil 3.4. IHOEC'de pasaj 5 ve pasaj 13 SABG Boyamada Beta Galatozidaz aktivitesi	87

Şekil 3.5. Beta Galatozidaz aktivitesi (SABG) gösteren ters ışık mikroskopi fotoğrafları	88
Şekil 3.6. Senesens-ilişkili Heterokromatin Odakları (SAHF)	89
Şekil 3.7. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de <i>NRF2</i> Gen ifade seviyesi (p=0,081)	89
Şekil 3.8. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13 <i>NRF2</i> gen ifade seviyesi (p=0,081)	90
Şekil 3.9. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de <i>p53</i> gen ifade seviyesi (p=0,023)	90
Şekil 3.10. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13 <i>p53</i> gen ifade seviyesi	91
Şekil 3.11. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de <i>IL6</i> gen ifade seviyesi (p=0,072)	91
Şekil 3.12. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de <i>IL6</i> gen ifade seviyesi	92
Şekil 3.13. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de <i>IL-1β</i> Gen ifade seviyesi	92
Şekil 3.14. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de <i>IL-1β</i> gen ifadesi istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır (p=0,002)	93
Şekil 3.15. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de <i>mTOR</i> gen ifade seviyesinde artış gözlenmiş, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır	93
Şekil 3.16. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de <i>mTOR</i> gen ifadesi istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim saptanmamıştır	94
Şekil 3.17. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de <i>AKT</i> Gen ifade seviyesi anlamlı bir artış belirlenmiştir (p=0,042)	94
Şekil 3.18. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de <i>AKT</i> Gen ifade seviyesinde anlamlı bir artış belirlenmemiştir	95
Şekil 3.19. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de <i>Oct4</i> gen ifadesi istatistiksel açıdan sınırda anlamlı çıkmıştır (p=0,077)	95
Şekil 3.20. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de <i>Oct4</i> gen ifadesi istatistiksel açıdan sınırda anlamlı çıkmıştır (p=0,077)	96
Şekil 3.21. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de <i>Nanog</i> gen ifadesinde artış gözlenmiş, ancak istatistiksel anlamlı bulunmamıştır	96
Şekil 3.22. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de <i>Nanog</i> gen ifadesinde artış gözlenmiş ancak istatistiksel anlamlı bulunmamıştır	97

Şekil 3.23. H ₂ O ₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de Sox2 gen ifade seviyesinde artış gözlenmiş, ancak istatistiksel anlamlı bulunmamıştır	97
Şekil 3.24. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de Sox2 gen ifadesinde istatistiksel anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,040)	98
Şekil 3.25. Klotho IHOEC hücrelerde bazal seviyede gen ifadesi çok düşük olduğundan aging çalışmaları sırasında bu gen ekspresyonunda istatistik olarak anlamlı fark gözlenmemiştir	98



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. cDNA Sentez Basamakları	83
Çizelge 3.1. MTT yüzde canlılık oranları.	86
Çizelge 3.2. <i>NRF2</i> gen ifadesi analizleri.	99
Çizelge 3.3. <i>p53</i> gen ifadesi analizleri.	99
Çizelge 3.4. <i>IL6</i> gen ifadesi analizleri.	100
Çizelge 3.5. <i>IL1β</i> gen ifadesi analizleri.	100
Çizelge 3.6. <i>mTOR</i> gen ifadesi analizleri.	101
Çizelge 3.7. <i>AKT</i> gen ifadesi analizleri.	101
Çizelge 3.8. <i>OCT4</i> gen ifadesi analizleri.	102
Çizelge 3.9. <i>Nanog</i> gen ifadesi analizleri.	102
Çizelge 3.10. <i>Sox2</i> gen ifadesi analizleri.	103
Çizelge 3.11. <i>Klotho</i> gen ifadesi analizleri.	103

1. GİRİŞ

1.1. Yaşlanma

Yaşlanma, hemen hemen tüm doku ve organların işlev bozukluğuna ve yıkımına neden olan kaçınılmaz, ilerleyici bir biyolojik süreçtir. Bu süreç genetik ve edinilmiş faktörler arasındaki sıkı bir şekilde düzenlenmiştir. Yaşlanmanın nihai sonucu ölümdür (Bian ve ark., 2015). Moleküler düzeyde yaşlanma ise; genomik kararsızlık (özellikle DNA hasarının olması), epigenetik değişiklikler ve protein homeostaz kaybı ile karakterizedir (Melzer ve ark., 2020). Diğer bir hücresel yaşlanma türü, “stres kaynaklı erken yaşlanma” olarak tanımlanır. Erken yaşlanma, çeşitli dış ve iç stres etkeniyle gelişir ve bunlar arasında oksidatif stres veya ışına maruz kalma, mitojenik uyaranlar, onkojenik aktivasyon ve metabolik stres yer alır. p53 veya p16Ink4a sinyal yolları da bu tip hücresel yaşlanmaya aracılık etmektedir. İnsan hücrelerinde telomer fonksiyon bozukluğu ya p53 ya da p16Ink4a sinyalini aktive eder. p53 sinyali öncelikle DNA hasarı ve telomer fonksiyon bozukluğu tarafından tetiklenirken, p16Ink4a sinyali mitojenik stres ve hücresel stres ile bağlantılıdır. Hücresel yaşlanmayı indükleyen stres faktörlerinin büyük çoğunluğunun, p53/p21 veya p16Ink4a/retinoblastoma protein yollarından birini veya her ikisini birden aktive ettiği artık iyi bilinmektedir (Shimizu ve ark., 2019). Senesens, hücre proliferasyonunu sınırlamak için bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak gelişmiştir. Bununla birlikte, zamanla, yaşlanan hücrelerin birikmesi doku işlevini tehlikeye atar bu da yaşlanmanın ayırt edici özelliklerinden biridir (Zhao ve ark., 2022). Hücresel düzeyde yaşlanmada, ek olarak kök hücre tükenmesi, mitokondrilerde fonksiyon bozukluğuna bağlı oksidatif stresin artması ve hücreler arası iletişimin değişmesi gibi durumlar da görülmektedir (Teksen ve ark., 2020). Yaşlanma durumunda hücre çoğalmasının durması, hücre döngüsü inhibitör düzeyinin artması, yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidaz ve lizozomal enzim aktivitesinin artması ve DNA’da Çift İplik Kırılma (DSB) sayısının artması görülmektedir. Ayrıca, hücrelerde Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretiminin artması,

Endoplazmik Retikulum (ER) stresi ve kromatin yapı bozukluğu gibi etkenler de yaşlanmaya neden olmaktadır (Bielak ve ark., 2019).

Hücrel yaşlanmanın bir belirtisi olan yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi (SASP), sitokinlerin, bradikininlerin, prostenoidlerin, miRNA'ların ve diğer pro-enflamatuar araçların, bağışıklık hücrelerini etkinleştiren kemokinlerin, Aktivin A gibi kök hücre işlev bozukluğuna neden olan faktörlerin ve hemostatik faktörlerin salgılanması ile tanımlanabilir (Kirkland ve ark., 2017).

1.2. Hücrel Yaşlanma

Hücrel yaşlanma, strese veya telomer kısalmasına yanıt olarak hücre döngüsünün durması gerçekleşir (Zhao ve ark., 2022). Hücrel yaşlanma, 1961 yılında Leonard Hayflick ve Paul Moorhead tarafından tanımlanmıştır. Somatik hücreler sınırlı bir proliferatif kapasiteye sahiptir ve sonunda "replikatif yaşlanma" olarak adlandırılan geri dönüşümsüz bir sürece girerler. Bu süreçte büyüme tamamen durur (Hayflick ve ark., 1961). Hücrel yaşlanma, normal hücrelerde çeşitli iç ve dış uyaranlara yanıt olarak tetiklenebilen stabil bir hücre döngüsü durmasıdır. Yaşlanan hücreler canlı kalır, metabolik aktivitede değişiklikler olur ve gen ekspresyonunda dramatik değişikliklere uğrar ve karmaşık bir SASP geliştirir. Hücrel yaşlanma, doku onarımını ve yenilenmesini tehlikeye atabilir, böylece yaşlanmaya katkıda bulunur. Yaşlanma, potansiyel olarak kanserli hücrelerin çoğalmasını önleyerek güçlü bir anti-tümör mekanizması görevi de görebilir. p53/p21WAF1/CIP1 ve p16INK4A/pRB tümör baskılayıcı yollarının aktivasyonu, yaşlanmanın düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Yaşlanma, gelişimsel sinyaller veya farklı stres türleri tarafından tetiklenir. Hücrelerde, ilerleyici telomer kısalması, telomerik yapıdaki değişiklikler, mitojenik sinyaller, onkojenik aktivasyon, radyasyon, oksidatif ve genotoksik stres, epigenetik değişiklikler, kromatin düzensizliği, bozulmuş proteostaz, mitokondriyal işlev bozukluğu, iltihaplanma ve / veya doku hasarı sinyalleri veya kemoterapötik ajanlar, besin yoksunluğu, zararlı ışına maruz kalma dahil olmak üzere çeşitli içsel ve dışsal uyaranlara yanıt olarak

senesens oluşmaktadır (Passos ve ark., 2010). Bu farklı sinyal türleri onkojene bağlı yaşlanma (OIS), tamir edilmemiş DNA hasarına bağlı yaşlanma, epigenetik olarak indüklenen yaşlanma ve mitokondriyal disfonksiyona bağlı yaşlanma dahil olmak üzere telomere bağlı replikatif yaşlanma, programlanmış yaşlanma veya telomerik olmayan strese bağlı erken yaşlanma gibi farklı yaşlanma türlerine yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda antikanser ajanları, kemoterapötik ilaçlar veya iyonlaştırıcı radyasyonla ile yapılan tedavinin, tümör hücrelerinde "terapi kaynaklı yaşlanmayı (TIS)" tetiklediği gösterilmiştir (Di Micco ve ark., 2006). Yaşlanan hücreler, metabolik aktivitelerindeki değişikliklerle yaşayabilir ve genellikle apoptoza direnç gösterirler (Hampel ve ark., 2004). Kromatinin yeniden şekillenmesi ve kalıcı bir DNA hasar tepkisinin (DDR) oluşması ile birlikte DNA'da büyük ölçüde gen ekspresyon değişiklikleri görülmektedir (Rodier ve ark., 2009). Yaşlanan hücrelerin karakteristik bir özelliği, artan lizozomal aktivite (Kurz ve ark., 2000), makromoleküler hasar ve SASP görülmesidir (Coppé ve ark., 2008). Yaşlanan hücrelerde, genişlemiş vakuoller ile düzleşmiş, çok çekirdekli bir morfoloji, plazma zarının içeriğinin değişmesi ve dikkate değer bir nükleer genişleme dahil olmak üzere morfolojik ve yapısal değişiklikler görülebilir (Frescas ve ark., 2017). Hücresel yaşlanma, doku onarımını ve rejenerasyonunu engellemektedir. Yaşlanan hücrelerin birikmesi, kök/progenitör hücrelerin tükenmesi ve SASP salgılanması nedeniyle doku ve organizma yaşlanmasına katkıda bulunabileceği için zararlı etkilere sahiptir (Coppé ve ark., 2010a; Campisi ve ark., 2011). Yaşlanan hücrelerde yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidaz (SA- β -gal) aktivitesi artmaktadır. İnsan fibroblastlarında yaşlanmayla ilişkili morfolojik değişiklikler UPR (Unfolded protein response) yanlış katlanmış proteinler tarafından düzenlenir (Druelle ve ark., 2016). Yaşlanma sırasında, geri dönüşü olmayan büyüme durmasına, p16Ink4a / retinoblastoma (Rb) ve p53 / p21 tarafından düzenlenen iki ana tümör baskılayıcı yolağın aktivasyonu aracılık etmektedir. Hücresel yaşlanma, tümör oluşumunun önünde bir engel olarak kabul edilir ve bu tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu, yaşlanan hücreleri kanser hücrelerine dönüştürebilir. Hücresel yaşlanmanın bir diğer önemli özelliğinden olan SASP'de yaşlanan hücreler, hücre hasarı takiben girdikleri yaşlanma sürecinde sitokinler, kemokinler, hücre dışı matriks (ECM) proteinleri ve ECM düzenleyici maddeleri salgılar (Tominaga ve Suzuki, 2019). SASP, otokrin/parakrin tarzda

yaşlanma fenotipini indükleyerek organizmalardan hasarlı veya onkogen ifade eden hücreleri fagosite eden immün hücreleri toplayarak tümörün baskılanmasına katkıda bulunabilir. SASP'nin tümör mikroçevresinde inflamasyonu ve ECM'nin yeniden şekillenmesini teşvik ederek pro-tümörijenik etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. SASP'nin yaşa bağlı patolojik süreçlere katıldığı görülmektedir (Tominaga ve Suzuki, 2019). Sınırlı sayıda bölünmeden sonra normal hücreler, canlı ve metabolik olarak aktif kalırken, yaşlanma aşamasında olan hücrelerde hücre döngüsü durmaktadır (Druelle ve ark., 2016). Telomerler, kromozomun uç kısmında bulunur ve omurgalılarda tekrarlayan AGGGTT nükleotit dizileri içerirler. Telomerler, hücre bölünmesi sırasında kısalırlar ve bu durum telomer aşınmasına neden olmaktadır. Telomerler, kromozomların stabilitesinde ve DNA replikasyonunda kritik role sahiptir. Bu nedenle, telomer kısalması fizyolojik aralığı aştığında, DNA hasarı olarak kabul edilir ve esas olarak p53 veya p16Ink4a sinyal yolları aracılığıyla replikatif hücresel yaşlanmayı tetikler (Shimizu ve ark., 2019). Telomerlerin kaybı, hücreler tarafından bir tür DNA hasarı olarak algılanır ve bu hasar iyonlaştırıcı radyasyon ve kemoterapötik ilaçlar gibi DNA'ya zarar veren harici ajanların ürettiğine benzer bir DNA hasarı tepkisini (DDR) oluşturmaktadır. DDR'nin ana araçları hücre döngüsü proteinini fosforile eden ve aktive eden DNA hasar kinazları olan ATM, ATR, CHK1, CHK2 ve p53'ten oluşmaktadır. Buna karşılık, fosforlanmış p53 proteini, bazı CDK-siklin komplekslerine, özellikle CDK2'yi bulunduran ve bunları inhibe eden p21 ifadesini aktive etmektedir. Replikatif yaşlanma ayrıca iki önemli tümör baskılayıcı, p16 ve ARF genlerini kodlayan CDKN2A (INK4A ve ARF olarak da bilinir) ile ilişkilidir. p16, CDK4 ve CDK6'nın inhibitörüyken, ARF geni, p53 genini degrade eden E3 ubiquitin protein ligaz MDM2'yi inaktive etmesi ile p53 geninin stabilitesini düzenlemektedir. CDKN2A lokusu normalde genç dokularda çok düşük seviyelerde ifade edilir, ancak yaşlanma ile baskılanmaktadır. Mekanik olarak, RAS-RAF-MEK-ERK kaskadı tarafından indüklenen hücre içi ROS seviyelerinin artması, p53 geninin transkripsiyonel aktivitesine artmasına ve p21'in yukarı regülasyonuna yol açan p38 MAPK'yı aktive etmektedir (Muñoz-Espín ve Serrano, 2014).

1.3. Onkogen Kaynaklı Yaşlanma

Onkojen kaynaklı yaşlanmada anormal DNA replikasyonu ve ROS'un neden olduğu DNA hasarı güçlü bir DDR'yi de indükleyebilir. Ayrıca farelerde ARF-p53 yolu, onkogen kaynaklı yaşlanmanın çok önemli bir aktivatörüken, insanlarda DDR-p53 yolunun ARF-p53 yolundan daha önemli bir rolü olduğu görülmektedir. p16, farelerde yaşlanmayı teşvik etmede belirgin rol oynamamakla beraber, insan hücrelerinde önemli bir rolü bulunmaktadır (Muñoz-Espín ve Serrano, 2014).

1.4. Yaşlanmanın Moleküler Yolları

DNA'da hasar oluşturan ajanlar ve kromozomlarda telomer kaybı, doğrudan p53'ü ve p53'ün aşağı yönündeki hedefi p21'i aktive eden DDR oluşturmaktadır. Birçok yaşlanma türü CDKN2A lokusunun epigenetik olarak inaktive edilmesi ile ilişkilidir. ROS, MKK3 (MAPKK3 olarak da bilinir) ve MKK6 (MAPKK6 olarak da bilinir) kinazları ve bunların aşağı akış kinaz efektörü p38 aracılığıyla p16 ve p53'ü etkinleştirir (Muñoz-Espín ve Serrano, 2014).

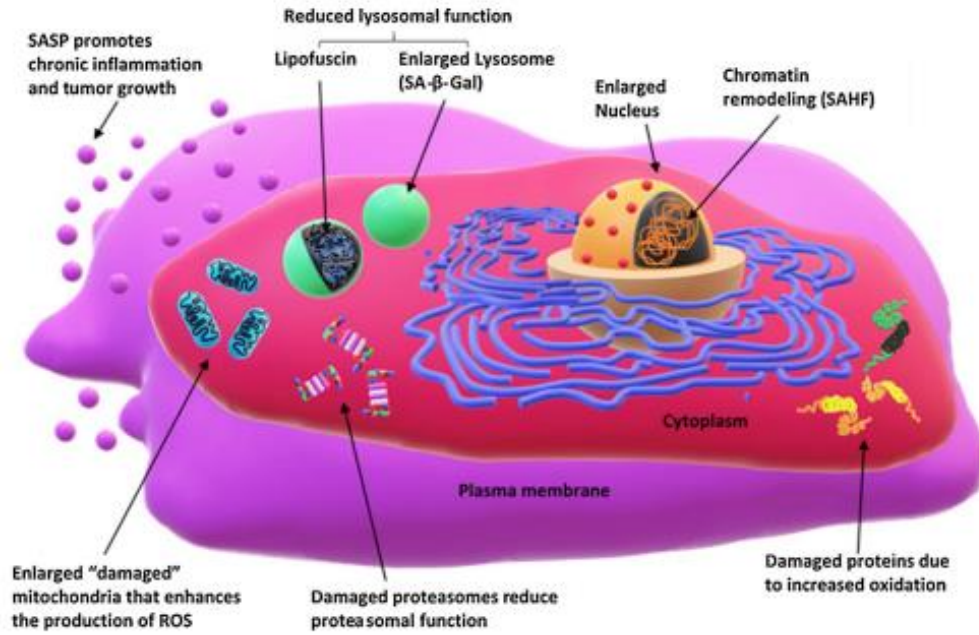
1.5. Hücre Döngüsünün Durması ve Yaşlanma

Hücre döngüsü, çok hücreli organizmaların hem gelişimi hem de yaşayabilirliği için kritik olan hücre bölünmesine yol açan koordineli olaylar dizisidir. Hücrenin bölünmeye devam edememesine işaret eden kararlı bir hücre döngüsü durması, yaşlanan hücrelerin vazgeçilmez ve tanımlayıcı özelliklerinden biridir. Hücre döngüsünün durması, işlevsiz hücrelerin yayılmasını önlemek için anormal proliferasyon veya zararlı stres uyaranları tarafından başlatılan bir alarm tepkisi olabilir. Hücresel yaşlanma, G₀'da meydana gelen durgunluğun aksine, hücre döngüsünün G₁ ve muhtemelen G₂ fazında (Di Leonardo ve diğerleri, 1994) oluşan ve durgunluk olarak bilinen durumdan farklıdır. Bir başka önemli fark büyüme faktörlerinin hücreleri uyarması veya mitojenik sinyaller gibi uygun sinyallere yanıt

olarak hareketsiz hücreler çoğalmaya devam edebilmektedir oysa yaşlanan hücreler bunu başaramaz (Campisi ve D'Adda Di Fagagna, 2007). Örneğin büyümenin durması sırasında, mTOR (Rapamisin'in memeli hedefi) gibi besin algılama yolları aktif kalır, ancak hücre çoğalması ve büyümesinin aksine hücrel yaşlanmayı başlatır. Bu nedenle, yaşlanma ve durgunluk arasındaki seçim, bir dereceye kadar mTOR yolu tarafından yönetilir (Korotchkina ve ark., 2010). Apoptozda apoptotik hücrenin kalıntıları başka bir hücre tarafından fagosite edilerek uzaklaştırılırken, yaşlanmada yaşlanan hücre hemen elimine edilmemekte ve hücreler çoğalamaz durumda olmasına rağmen metabolik olarak aktif kalmaktadır. Hücrel yaşlanmada hücre döngüsü durmasının geri döndürülemez olduğuna inanılmasına rağmen son zamanlardaki çalışmalar yaşlanan hücrelerin belirli koşullar altında tümör hücrelerinde olduğu gibi hücre döngüsüne yeniden girebileceğini göstermiştir (Galanos ve ark., 2016). Yaşlanmadaki hücre döngüsü durmasına, büyük ölçüde p53/p21WAF1/CIP1 ve p16INK4A/pRB tümör baskılayıcı yollarından birinin veya her ikisinin aktivasyonu aracılık etmektedir (Rovillain ve ark., 2011). Bazı yaşlanan hücrelerde, yaşlanma ile ilişkili heterokromatinin pRB'ye bağımlı yeniden düzenlenmesiyle senesens ilişkili heterokromatin odak (SAHF) oluşumu ve E2F hedef genlerinin susturulmasına yol açmaktadır (Narita ve ark., 2003). Çekirdek laminasının önemli bir bileşeni olan Lamin B1'in aşağı yönlü düzenlenmesi, yaşlanan hücrelerin önemli bir özelliğidir ve yaşlanma sırasında gen ifadesini etkileyen ve SAHF oluşumunu teşvik eden kromatin değişikliklerini tetiklediği bilinmektedir (Freund ve ark., 2012). Hücrel yaşlanmayı kontrol eden farklı mekanizmaların yanı sıra, kodlayıcı olmayan RNA'ların, özellikle mikro RNA'ların (miRNA'lar), tek başına veya diğer efektörlerle birlikte hücrel yaşlanmaya aracılık etmede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Çok sayıda çalışma, farklı miRNA'ların p53 gibi yaşlanma efektörlerinin seviyelerini modüle ettiğini göstermiştir (Hu ve ark., 2006).

1.6. Yaşlanmış Hücrelerin Biyobelirteçleri

Hücresel yaşlanmayı karakterize eden dolaylı belirteçler hücreler arasında değişiklik gösterir. Bu belirteçler şu şekilde sıralanabilir: Genişlemiş ve düz bir morfoloji, hücre döngüsünün durması, p53/p21 veya p16Ink4a sinyalleri artması, DNA hasarı ile H2AX odaklarının oluşumu, p38 MAPK sinyallerinin yükselmesi, proliferasyonun geri dönüşümsüz olarak sonlanması, yaşlanma ile ilişkili beta-galaktosidaz (SA-b-gal) aktivitesinin artması, telomer aşınması, telomer fonksiyon bozukluğu, yaşlanma ile ilişkili satellitlerin şişmesi (SAD'ler) ve heterokromatin odakları (SAHF)'nın oluşmasıdır (Shimizu ve ark., 2019). Hücresel yaşlanmanın ayırt edici özellikleri Şekil 1.1'de gösterilmiştir.

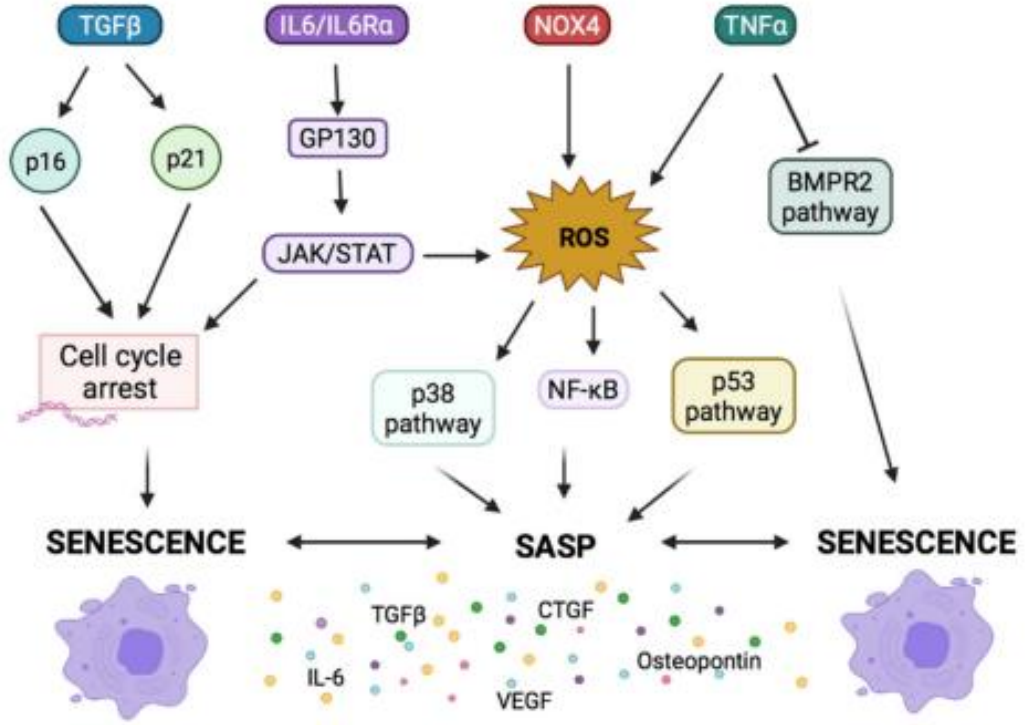


Şekil 1.1. Hücresel yaşlanmanın ayırt edici özellikleri (Kamal ve ark., 2020).

1.7. SASP'nin Hücreler Üzerine Etkisi

Hücrel yaşlanma, kalıcı bir hücre döngüsü durması ve SASP olarak adlandırılan biyoaktif bir sekretomun üretimiyle fenotipik değişiklikleri tetikleyen bir stres tepkisidir. Akut yaşlanma indüksiyonu, kansere karşı koruma sağlar ve fibrozu sınırlar, ancak kalıcı yaşlanan hücreler yaşa bağlı bozuklukları tetikler. Yaşlanma, replikatif tükenme, anormal onkogen aktivasyonu (onkogen kaynaklı yaşlanma) gibi hücrel bir stres tepkisidir. Yaşlanan hücreler, doğrudan hücre-hücre teması (Nelson ve ark., 2012; Hoare ve ark., 2016), hücre füzyonu (Chuprin ve ark., 2013), sitoplazmik köprüler oluşturarak (Biran ve ark., 2017), hücre dışı vezikül (EV) yoluyla ve SASP aracılığıyla iletişim kurabilirler (Takasugi ve ark., 2017). Yaşlanan hücrelerin otonom olmayan etkilerinin çoğu SASP ile ilişkilendirilmiştir. Bu amaçla SASP, yaşlanan hücreleri ortadan kaldıracak bağışıklık hücrelerinin toplanmasına katkıda bulunur. Bununla birlikte, ilkel işlevi ne olursa olsun, SASP'nin hem yararlı hem de zararlı sonuçları olabileceği açıktır. SASP, yaşlanmanın tümör baskılayıcı işlevlerine aracılık etmektedir. TGF- β aile üyeleri, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), CCL2 ve CCL20 gibi kemokinler, parakrin yaşlanma olarak bilinen yaşlanmayı normal komşu hücrelere yayabilirler (Acosta ve ark., 2013). SASP'nin temel bir işlevi, doğal öldürücü (NK) hücreler, makrofajlar ve T hücreleri dahil olmak üzere farklı bağışıklık hücrelerine sinyal göndermektir. Yaşlanan hücrelerin immün aracılı klirensi, tümörün başlamasını baskılar (Kang ve ark., 2011) ve tümörün gerilemesine katkıda bulunur (Xue ve ark., 2007). SASP epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) indükleyebilir ve tümör vaskülarizasyonunu artırabilir, bu da çoğunlukla SASP'nin pro-tumoriyenik özelliklere sahip olduğunu düşündürmektedir (Coppé ve ark., 2010). Yaşlanan hücrelerin ortadan kaldırılması, yaşlı farelerde proinflatuar sitokinlerin ekspresyon seviyelerini azaltmaktadır (Baker ve ark., 2011). SASP inflamasyonu tetikleyebilir. İlginç bir şekilde, az sayıda yaşlanmış hücrenin nakledilmesi, canlıda fiziksel işlev bozukluğu ve sistemik inflamasyonu artırmak için yeterlidir (Xu ve ark., 2018). SASP doku homeostazını bozarak hastalıklara katkıda bulunabilir. SASP, farklılaşmayı baskılayabilir (pre-adipositlerde) veya farklılaşmasını arttırarak (keratinositlerde), yaşlı farelerde yaygın olan lipodistrofi ve deri fenotipleri gibi değişikliklere neden olabilir (Wiley ve ark.,

2016). Sitozolik kromatin fragmanları (CCF'ler) nükleer zarın kabarcıklaşmasından kaynaklanır ve lamin B1'in otofaji aracılığıyla bozulmasıyla oluşmaktadır (Dou ve ark., 2017). İşlevsiz mitokondri (Correia ve ark., 2016) ve kalıcı bir DDR (Rodier ve ark., 2009) her ikisi de kısmen CCF oluşumu aracılığıyla SASP'yi arttırmaktadır (Vizioli ve ark., 2020). NF- κ B'ye bağlı proinflamatuar faktörler, SASP'nin temel bileşenleridir ve IL-6 ve IL-8 en çok korunan ve güçlü bir şekilde ifade edilen sitokinlerdir (Hardy ve ark., 2005). p38 MAPK yoluyla ile SASP 'yi düzenleyen bağımsız bir mekanizmaya işaret eden yeni bir DNA hasar tepkisi tanımlamıştır. p38 MAPK'nin, esas olarak Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B) aktivitesini indükleyerek SASP'yi arttırmaktadır. 5' adenosin monofosfatla aktive olan protein kinazın (AMPK), proinflamatuar SASP proteinlerinin ekspresyonunu arttırmak için NF- κ B aktivitesini indüklemektedir ve p38 MAPK'nin p53 aracılığıyla inhibisyonunu baskılamaktadır (Davalos ve ark., 2013). Mitokondri normal olarak NADH 'yi NAD⁺ 'ya okside eder ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, çoğunlukla sitozolde NAD⁺ / NADH oranını düşürür ve AMPK aktivasyonuna yol açarak p53 aktivasyonu ve mitokondriyal disfonksiyonla ilişkili yaşlanmayı (MIDAS) oluşturmaktadır (Wiley ve ark., 2016). MIDAS'ın temel özelliği genotoksik stresin neden olduğu SASP'tan farklı, belirgin salgı fenotipini oluşturmaktır (Kumari ve Jat, 2021). SASP transkripsiyon faktörlerinden olan NF- κ B ve CCAAT/enhancer bağlayıcı protein- β (CEBP β)'e aracılık eder ve pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-6 ve IL-8), kemokinlerin (monosit kemoatraktan proteinler (MCP'ler) ve makrofaj inflammatuar proteinler (MIP'ler)), büyüme faktörleri, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF β) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörler ve proteazları içermektedir. Bu ve benzeri proteinlerin yaşlanan hücreler tarafından salgılanması iltihaplanmaya neden olur ve bazı durumlarda, yaşlanan hücrelerin fagositoz yoluyla temizlenmesi için çok önemlidir. Bu nedenle SASP otokrin ve parakrin aktivitelere sahiptir, bu da yaşlanmanın yaşlanan hücrelerin ortadan kaldırılmasına yol açabilen inflammatuar bir mikro ortamı oluşturduğunu göstermektedir (Munoz-Espín ve Serrano, 2014). (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Hücresel yaşlanma mekanizması (Roger ve ark., 2021).

1.8. SASP'nin Epigenetik Düzenlemesi

Ek kromatin modifikasyonları, SASP'ye neden olan genlerin promotör bölgelerinde histon H3K9'un demetilasyonunun azalması (Takahashi ve ark., 2012) ve histon varyantı macro-H2A1'in ifadesinin artması gibi SASP düzenlemesinde yer alırlar (Chen ve ark., 2015) yaşlanan hücrelerde biriken histon varyantı H2AJ de SASP indüksiyonuna katılmaktadır (Contrepois ve ark., 2017). Histon-lizin-N-metiltransferaz 2A (MLL1) ve HMGB2 gibi diğer epigenetik değiştiriciler de genetik lokuslarını açık ve aktif durumda tutarak SASP üretimini tetikler (Aird ve ark., 2016; Capell ve ark., 2016).

1.9. SASP'nin Yaşlanmaya ve Hastalıklara Katkısı

Fare modellerinde yaşlanan hücrelerin çıkarılması sağlıklı yaşam süresini uzatmaktadır (Baker ve ark., 2011), ancak yaşlanan hücrelerin yaşlanmaya ve hastalık oluşmasındaki katkısını anlamak zordur. Yaşlanan hücrelerin ilerleyici birikimi, kök ve progenitör hücreler gibi doku onarımı ve yenilenmesi için gerekli fonksiyonel hücreleri tüketebilir. Örneğin, yaşlanmış preadipositlerin enjeksiyonu (hücrelerin < %1'ini temsil eder) genç farelerde yaygın fiziksel işlev bozukluğuna neden olmaktadır (Xu ve ark., 2018). Bu nedenle SASP, yaşlanan hücrelerin zararlı etkilerinin birincil aracısıdır. Dolaşımdaki sitokin seviyelerinin yükselmesi ve iltihaplanma ile ilişkili bağışıklık aktivitesinin artması ile oluşan kronik, düşük dereceli iltihaplanma yaşla birlikte hastalık riskini artırmaktadır (Franceschi ve Campisi, 2014). Yaşlanan hücrelerin temizlenmesi, patolojiye neden olan salgılanan inflamatuvar faktörlerin seviyelerini azaltmıştır (Birch ve Gil 2020).

1.10. DNA Hasar Yanıtı (DDR)

Telomer aşınması, hiperproliferasyon, oksidatif hasar ve γ -ışınlama, ultraviyole radyasyonlar, kemoterapötik ilaçlar kalıcı DDR sinyaline yol açarak onarılamaz DNA hasarı ve hücresel yaşlanmayı tetiklemektedir (Fumagalli ve ark., 2012). İnsan somatik hücrelerinde, tekrarlanan hücre bölünmesinden sonra telomerleri korumaya yetecek düzeyde telomerazın katalitik alt birimi yoktur, bu durum telomerlerin kısalmasına neden olmaktadır (Shay ve Wright, 2019). Onkogen kaynaklı yaşlanma sırasında, onkogen aktivasyonu başlangıçta hücresel yaşlanmayı indükleyen bir hiperproliferatif fazı tetiklemektedir (Bartkova ve ark., 2006). DDR, replikatif yaşlanmada telomer kısalması ile ilişkilidir, oysa OIS'de telomer fonksiyon bozukluğu OIS ile ilişkili olmasına rağmen, telomer kısalmasına bağlı değildir (Fagagna ve ark., 2003). Hem telomerik hem de telomerik olmayan DNA hasarının, yaşlanmayı tetiklemede eşdeğer roller oynadığı gösterilmiştir (Nakamura ve ark., 2008). CHK1 ve CHK2, DNA hasar bölgesinin uzağında hareket eden ve p53 gibi substratları fosforile ederek hasar sinyalini yayan aşağı yöndeki kinazlardır. CHK2

tarafından Serin-20 üzerinde p53'ün fosforilasyonu, E3 ubiquitin ligaz MDM2'nin p53'e bağlanma afinitesinde bir azalmaya yol açarak p53 gen ifade seviyelerini arttırmaktadır. p53 Serin-15'te doğrudan ATM tarafından fosforile edilmektedir (Chehab ve ark., 1999). Fosforile edilmiş p53 hücre döngüsü durmasına yol açan CDKI p21WAF1 / CIP1'in ekspresyonunu düzenlemektedir. DDR'nin yaşlanmayla ilişkili hücre döngüsünün durmasına ek olarak, DDR sinyali ayrıca NFκB aktivasyonunu indükleyerek SASP'ye aracılık etmektedir. Genotoksik stres sensörü ATM ve PARP-1, NF-κB transkripsiyonel etkinliğini uyarılmaktadır (Stilmann ve ark., 2009). Kemoterapötik ilaçlar veya oksidatif stres kaynaklı DNA hasarı, melanom ve melanom olmayan hücrelerde yaşlanmayı indüklemek için PARP-1/ATM/ NF-κB sinyal kaskadını devreye sokar. Bu yaşlanan hücreler, diğer SASP faktörleriyle birlikte kemokin CCL2 içeren bir PARP-1 ve NF-κB ile ilişkili bir sekretom (PNAS) geliştirir, böylece yaşlanmadan kaçmış olabilecek melanom hücrelerinin yayılmasını arttırmaktadır (Ohanna ve ark., 2011). Yaşlanmaya neden olan uyaranların çoğu sonunda doğrudan veya dolaylı olarak DNA'yı etkilediğinden, kalıcı DDR sinyali birçok yaşlanan hücrenin karakteristik bir özelliğidir. Bununla birlikte, DDR'den bağımsız mekanizmalar aynı zamanda p53/p21WAF1/CIP1 yoluyla yaşlanmayı indükleyebildiğinden, DDR belirteçlerinin in vivo olarak yaşlanan hücreleri tanımlama konusunda sınırlı bir potansiyeli vardır (Alimonti ve ark., 2010). DDR, yaşlanmanın oluşmasında rolü olmayan veya DNA'ya zarar veren diğer uyaranlar tarafından da etkinleştirilebilir (Kumari ve Jat, 2021).

1.11. ROS ve Antioksidanlar

ROS, DNA hasarını indükleyebilen ve DDR'yi etkileyebilen kısa ömürlü, oldukça reaktif bir moleküldür. DNA hasarı, hücrelerde genetik bilginin yorumlanmasını ve iletilmesini etkileyebilen DNA'da oluşan fiziksel veya kimyasal değişiklikleri ifade etmektedir. DNA'daki lezyonun doğasına bağlı olarak, hasarlı bölgelerin tanımlanmasını ve onarılmasını kolaylaştırmak için özgül yollar aktive edilir. Özellikle tehlikeli bir lezyon, kromozomal yeniden düzenlemeler veya hatalı DNA onarımı nedeniyle genetik bir bilgi kaybı ile mutajenik olabilen DNA çift

zincir kırılmasına neden olabilir (DSB). DNA hasarına yanıt olarak, DNA hasar yanıtı olarak adlandırılan bir olaylar ağı etkinleştirilir. Bu yanıt, DNA hasarının tanınması, kontrol noktalarının aktivasyonu, hücre döngüsünün durması, hasar onarımı, apoptoz ve bağışıklık cevabını içermektedir (Srinivas ve ark., 2019). Oksidatif stres, serbest radikallerin üretimi ile bunların antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılma sürecindeki dengesizlik durumudur. Bu redoks dengesizliği, artan ROS üretiminin ve azalan antioksidan savunmanın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Normal olarak farklı metabolik süreçlerle üretilen ROS miktarının artması inflamasyonu tetikleyebilir ve lipidler, proteinler, diğer hücresel makromoleküllere zarar vererek oksidatif strese ve hücre ölümüne yol açabilir. Bu nedenle, oksidatif stres, çok çeşitli metabolik bozuklukların ve kronik hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (Hassanein ve ark., 2020). Serbest radikaller, hücre bileşenlerine zarar vererek hücre hasarına neden olmaktadır. Serbest radikaller, lipid peroksidasyonuna yol açan membran lipidlerindeki çift bağlara saldırır. ROS, proteinlerde çapraz bağlanma yapmaktadır. Serbest radikaller, sülfidril aracılı protein çapraz bağlanmasını uyararak enzimatif aktivitenin bozulmasına veya kaybına neden olmaktadır. Tek iplik kopmaları serbest radikallerin etkisiyle DNA'daki timin nükleotidleri üzerinde oluşmaktadır (Kumar ve ark., 2018). Antioksidanlar oksidasyonu engelleyen maddelerdir. Antioksidanlar kökenlerine göre iki türe ayrılırlar: eksojen ve endojen antioksidanlar. Bir Antioksidan, yaşlanma, kanser, diyabet, iltihaplanma, karaciğer hastalığı, kardiyovasküler hastalık, katarakt, nefrotoksisite ve nörodejeneratif bozuklukların oluşumunu azaltabilir. Oksidatif stres serbest radikallerin oluşması ve antioksidan konsantrasyonundaki azalma ile oluşmaktadır. Pro-oksidanlar, serbest radikaller, diğer türlerle reaksiyona girmek için kararsız ve büyük ölçüde reaktif olan birden fazla eşleşmemiş elektron içerirler. Reaktif olmayan dioksijenin kısmen azaltılması da ROS'a neden olmaktadır. Genellikle ROS, DNA'ya zarar vermenin yanı sıra hücre hasarına ve yayılmasına neden olan süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit H_2O_2 , hidroksil radikali ($\bullet OH$), singlet oksijen, nitrik oksit (NO) ve çok daha fazlasını içermektedir. ROS farklı konsantrasyonlarda farklı etkiler göstermektedir, yüksek konsantrasyonda biyolojik sisteme zararlıyken orta düzey konsantrasyonda enfeksiyona karşı koruma sağlamaktadır. Bununla birlikte, ROS'un artması lipidler, proteinler ve DNA gibi

hücrel bileşenlere zarar vermektedir. ROS, tek veya çift sarmallı DNA'da, azotlu bazları parçalayarak, dönüştürerek, translokasyon yaparak ve proteinlerle çapraz bağlanarak DNA'yı dönüştürmektedir. DNA'da oluşan bu değişiklikler yaşlanmaya, karsinogeneze, nörodejeneratif, otoimmün hastalıklara, kardiyovasküler ve diğer hastalıklara yol açmaktadır (Neha ve ark., 2019).

1.12. Serbest Radikallerin Mekanizması

pH 7.4'te Süperoksit ($\bullet\text{O}_2^-$), O_2 'den hidroperoksil radikali üretirken, mitokondriyal solunum yan ürünü olan NADPH oksidaz ve H_2O_2 'i oluşturmaktadır. Süperoksit (O_2^-), Haber-Weiss reaksiyonu ile süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla H_2O_2 'e dönüştürülebilir ve bu ürün daha sonra hidroksil radikalleri ($\bullet\text{OH}$) ve hidroksil anyonları (OH^-) gibi çeşitli ROS'lara veya katalaz ile suya dönüştürülebilir. Hidrojen peroksit Fe^{2+} ile etkileşime girdiğinde (Fenton reaksiyonu) ile $\bullet\text{OH}$ 'ni oluşturmaktadır (Neha ve ark., 2019).

1.13. Antioksidan Savunma Sistemi

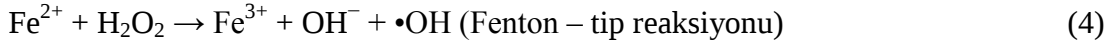
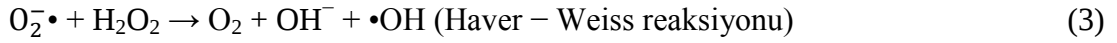
Antioksidanlar, ROS'un bozucu etkisine karşı koyarak oksidatif stresle ilgili hastalıkları önleyerek ortadan kaldırabilir. Endojen antioksidanlar enzimatik veya enzimatik olmayabilir. Endojen enzimatik antioksidanlar glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalazdan oluşurken enzimatik olmayan antioksidanlar ürikasit, lipoik asit, bilirubin, glutatyon ve melatoninden oluşur. Eksojen antioksidanlar karotenoidler, E, A ve C vitamini, doğal flavonoidler veya diğer farklı bileşiklerden oluşmaktadır. C vitamini, lipidleri peroksidasyondan korumak için E vitamini ile birlikte hareket eden suda çözünür bir antioksidandır (Neha ve ark., 2019). DNA hasarının birikmesi hücre ölümünü ve dokularda fonksiyon bozukluğunu indükleyerek yaşlanmaya neden olmaktadır. Bununla birlikte, ortaya çıkan kanıtlar, inflamasyonun DNA hasarının bir başka önemli sonucu olduğunu göstermektedir. İnflamasyon, yaşlanmanın bir özelliği ve yaşa bağlı birçok hastalığın

da etkenidir. Hücre kültürlerinde DNA hasarı, tip I interferonların ve diğer inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu indüklemektedir. DNA hasarı, iki yolla sitoplazmik DNA'nın birikmesine neden olmaktadır: birincisi, mikronükleus oluşumu yoluyla ve ikincisi, DNA'nın sitoplazmaya doğrudan sızması yoluyla gerçekleşmektedir. Mikronükleuslar, mitoz sırasında ve DNA hasarına yanıt olarak kromozomların yanlış ayrılmasından dolayı ortaya çıkarmaktadır. DNA'da çift zincir kırılmaları (DSB)'ler tamir edilmediğinde veya yanlış tamir edildiğinde, bu asentrik kromozomal fragmanların oluşumuna yol açabilir. Bu fragmanlar, sonraki hücre bölünmesi sırasında mikronükleus oluşturmak için nükleer zarfı almaktadır. Mikronükleus, kromozom parçalarını çevreleyen nükleer bir zarftan oluşan çekirdek benzeri yapılardan oluşmaktadır. Mikroçekirdeklerin yaklaşık %60'ı interfaz sırasında nükleer zarflarının yırtılmasına neden olmaktadır. Nükleer zarf yırtılması, lamina kaybı ile ilişkilidir, ancak bununla ilgili mekanizmalar net değildir. Nükleer zarf, ESCRT-III kompleksinde gerekli olan endozomal ayırma kompleksleri tarafından onarılmaktadır. Bu onarımın mikronükleuslarda eksik olması, kromozomal DNA fragmanlarının sitoplazmaya sızmasına neden olabilmektedir. Yaşlanmış hücrelerin bir özelliği, sitoplazmik kromatin fragmanları (CCF)'ler olarak adlandırılan, sitoplazmada gözlemlenen mikronükleus benzeri yapılardır. CCF'ler, çekirdekten sitoplazmaya taşan kromatin fragmanlarını içermektedir. Yaşlanan hücrelerde CCF oluşum mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Nükleer membran bütünlüğünde oluşan hasar yaşlanmanın biyolojik belirtici olan lamin B1'in kaybı ile ilişkilidir. ROS'un neden olduğu yaşlanmada, lamin B1 bozulmaktadır. Lamin B1 ile doğrudan etkileşime giren otofaji ile ilişkili protein LC3 (maya Atg8'in memeli homologu) ve lamin B1'in bozunması için lizozomu hedefleyen kromatin üzerindeki lamin ile ilişkili alanlara aracılık etmektedir (Zhao ve ark., 2022). Stres kaynaklı erken yaşlanma (SIPS), H_2O_2 , hiperoksi veya tert-butylhidroperoksit dahil olmak üzere birçok farklı ölümcül olmayan strese maruz kaldıktan sonra ortaya çıkmaktadır. İnsan Mezenkimal kök hücreler (hMSC'ler), kendilerini yenileyebilen, kemik, kıkırdak, kas, kemik iliği (BM) stromal hücreleri, yağ ve diğer çeşitli bağ dokuları dahil olmak üzere çoklu soylara farklılaşabilen multipotent progenitörlerdir. İnsan mezenkimal kök hücreleri (hMSC'ler), in vitro ortamda Hayflick limiti olarak adlandırılan sınırlı çoğalma potansiyeli sergilemektedir. H_2O_2 , redoks dengesinin

bozulduğu ve hücrelerin oksidatif stres durumuna geçtiği yüksek seviyelerde ROS üretiminden sorumlu olabilir, bu da daha sonra kısalan telomerlerle erken yaşlanmaya yol açabilir. H_2O_2 , SIPS'nin en yaygın kullanılan indükleyicisidir ve yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidaz aktivitesi, hücre döngüsü düzenlemesi vb. dahil olmak üzere replikatif yaşlanmanın (RS) özelliklerini oluşturmaktadır (Studený ve ark., 2004). Birkaç çalışma, yaşlanmanın kısmen, DNA hasarına neden olan dışsal veya içsel ajanların etkisiyle ortaya çıkan kök hücre yaşlanması ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Campisi ve ark., 2007; Sharpless ve DePinho, 2007). H_2O_2 kaynaklı DNA hasarı, DDR ve p53/p21/Rb yolunun aktivasyonuna yol açarak hızlı bir şekilde hücre döngüsünü dudurmaktadır. Oldukça küçük bir molekül olan H_2O_2 , hücre içi zarlardan kolayca geçebilir ve mitokondriyal zar potansiyelinin (MMP) düşüşüne neden olabilir. Bu görüş doğrultusunda H_2O_2 uygulamasından hemen sonra önemli ölçüde MMP azalması görülmüştür (Alla ve ark., 2021). MMP, yaşlanma ilerlemesiyle hMESC'lerde azalmaktadır. Yaşlanmış hücrelerin ayırt edici özelliklerinden biri, MMP'nin azalmasına bağlı olarak oksidatif fosforilasyon bozulması ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun görülmesidir (Shatrova ve ark., 2021). SASP, yaşlanan hücrelerin diğer hücelere sinyal gönderilmesini sağlayarak komşu hücrelerin farklılaşmasını teşvik edebilir. Canlılarda yaşlanma, fazla sayıdaki mitotik bölünme döngülerinin bir sonucudur ve her bir döngü telomerleri aşamalı olarak bozmakta ve ölümcül DNA hasarına neden olmaktadır. SIPS, kimyasallara (örneğin, H_2O_2) veya ultraviyole ışınlarla maruziyet de dahil olmak üzere çeşitli ölümcül olmayan koşullar altında indüklenebilir. SIPS geçiren hücreler, mitoz aşamasında yaşlanma fenotipini RS hücrelerinden daha erken yansıtır (Waters ve ark., 2019). SIPS, insan diploid fibroblastlarının H_2O_2 ile subsitotoksik dozda oksidatif strese maruz kalmasından 3 gün sonra, replikatif yaşlanmanın çeşitli biyobelirteçlerinin göstermektedir. SIPS'de replikatif yaşlanmanın birçok biyobelirteçleri görülür: tipik hücre morfolojisi, geri dönüşümsüz büyümenin durması, DNA sentezinin keskin bir şekilde azalması ve yaşlanmayla ilişkili β -galaktosidaz aktivitesinde (SA- β -Gal) artış görülmesidir. H_2O_2 veya t-BHP tarafından indüklenen SIPS'de sikline bağımlı kinaz inhibitörü p21WAF-1'in uzun süreli aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. p21WAF-1, siklin D/siklin bağımlı kinaz 4 ve 6 komplekslerini inhibe ederek retinoblastoma proteininin (Rb) hipofosforilasyonuna

yol açabilir. H_2O_2 veya t-BHP tarafından indüklenen SIPS durumunda Rb'nin uzun süreli hipofosforilasyonu gözlenmiştir ve hücre döngüsü üzerindeki blok E2F transkripsiyon faktörünü etkisiz duruma getirmiştir (Dumont ve ark., 2000 ve Frippiat ve ark., 2001). Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikler, bir dizi kadın üreme hastalığına yol açmaktadır. Oksijen, aerobik yaşamın gerekli bir unsurudur ve oksidatif metabolizma temel bir enerji kaynağını temsil eder. Hücrelerin aerobik koşullar altında ROS'a karşı bir savunma sistemi vardır ve sağlıklı biyolojide prooksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge vardır. OS, ROS'un aşırı miktarda üretimi ile antioksidanların savunma mekanizmaları zayıfladığında ortaya çıkmaktadır. Biyolojik olarak en önemli ROS türleri; süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), peroksil ($ROO\cdot$), alkoksil ($RO\cdot$) ve hidroperoksildir ($HO_2\cdot$). Serbest radikal türleri kararsızdır ve oldukça reaktiftir, ancak lipitlerden, nükleik asitlerden, proteinlerden, karbonhidratlardan veya yakındaki moleküllerden elektron alarak kararlı hale gelebilirler, zincirleme reaksiyonlara neden olarak hücresel hasara ve hastalıklara yol açabilirler. Normal şartlar altında vücutta enzimatik olan antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki tip antioksidan bulunur. Enzimatik antioksidanlar, H_2O_2 'nin su ve alkole indirgenmesine neden olabilen süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GSR) içermektedir. Enzimatik olmayan antioksidanlar, sentetik antioksidanlar veya C vitamini, E vitamini, β -karoten, selenyum, çinko, taurin, glutatyon ve benzeri diyet takviyeleri olarak bilinmektedir. Çoğu ROS, elektronlar, elektron taşıma zinciri olarak da adlandırılan mitokondriyal solunum zincirinden sızması ile üretilir. Bir tahmine göre, tüketilen %2'ye kadar oksijen, özellikle kompleks I ve III'te mitokondri tarafından ROS oluşumunu tetikleyebilir. Serbest radikal süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), temel haldeki dioksijene bir elektron eklenmesiyle oluşur, ancak H_2O_2 ve moleküler oksijen (O_2) üreterek kendiliğinden reaksiyona girebilmesi nedeniyle sulu çözeltilerde kararsızdır (reaksiyon 1). Fe^{3+} 'yı Fe^{2+} 'ya indirgeyebilir ve O_2 'ye dönüşebilir (reaksiyon 2). H_2O_2 bir serbest radikal olmamasına rağmen biyolojik membranları geçebildiği ve yüksek reaktif hidroksil radikaline ($\cdot OH$) dönüşebildiği için hücreler için çok zararlıdır. Hidroksil radikalının ana kaynağını metal katalizli

Haver-Weiss reaksiyonu (reaksiyon 3), ikincisi Fenton tipi reaksiyon oluşturmaktadır (reaksiyon 4).



Serbest oksijen radikallerine karşı savunma mekanizması SOD, CAT, GPx ve GSR'den oluşan birincil savunma mekanizmasıdır. SOD, fizyolojik pH'ta spontan dismutasyondan 104 kat daha yüksek bir oranda H_2O_2 ve $O^{\cdot-}$ üretmek için $O_2^{\cdot-}$ dismutasyonunu katalize eder. Hücrelerde CAT, yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'yi uzaklaştıran enzimdir (reaksiyon 5). GPx, ortak substrat olarak glutatyon gerektiren H_2O_2 ve organik serbest hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize eden bir enzimdir (reaksiyon 6 ve 7). GSR, GPx'inkine benzer bir doku dağılımına sahip sitozolik bir proteindir ve enzim, çeşitli sistemler tarafından üretilen NADPH'yi kullanarak oksitlenmiş glutatyonu azaltmaktadır (reaksiyon 8).



Tüm hücre zarlarında bulunan başlıca yağda çözünen antioksidan olan E vitamini, lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar. Tokoferil radikali askorbik asit-GSH redoks çifti tarafından doğrudan azaltılabilir. β -karoten ve E vitamini en verimli antioksidandır. β -karoten düşük oksijen basınçlarında hareket edebilir (Lu ve ark., 2018).

1.14. Kök Hücrelerin Yaşlanması

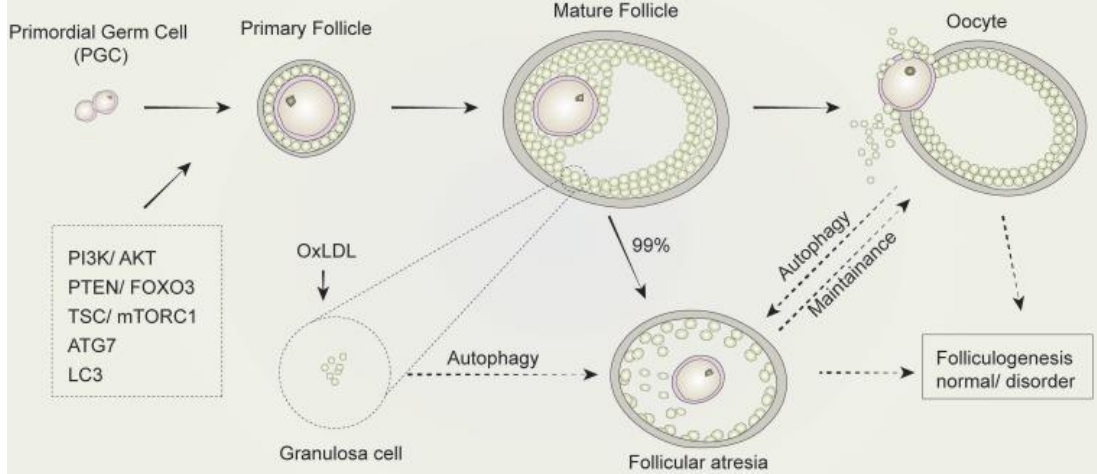
Kök hücreler, doku homeostazını korumak ve doku onarımı veya yenilenmesine katılmak için çoğu memeli organında veya dokusunda bulunur. Yaşlanmayla birlikte kök hücrelerin kendini yenileme ve çoğalma kapasitesi azalmaktadır, bu da kök hücre bölmesinde apoptozun artması, yaşlanma ve fonksiyonel kök hücrelerin tükenmesine neden olmaktadır. Öte yandan, DNA mutasyonlarının birikmesi, kök hücre yaşlanmasının ortak bir özelliğidir. Yaşlanan epidermal kök hücrelerde ve hematopoietik kök hücrelerde yüksek seviyelerde DNA hasarı bildirilmiştir. Yaşlanmayla birlikte bazı durumlarda kök hücre sayısı önemli ölçüde azalmaktadır. DNA replikasyonu sırasında telomer kısalması, kromozom yeniden düzenlemeleri ve tek baz mutasyonları gibi yaşlanma ile ilgili mekanizmalar meydana gelebilir ve sonuçta hücre yaşlanmaya yol açabilir. Kök hücreler hem yüksek oranda proliferatif hücreler hem de uzun ömürlü postmitotik hücrelerle ilgili savunma ve onarım mekanizmalarına sahiptir. Yetişkin kök hücrelerin, özellikle sürekli yenilenen dokularda bulunanların, normal doku homeostazını sürdürmek için birçok hücre bölünmesi maruz kaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca deri, ince bağırsak, kornea, testis ve beyinde gözlemlendiği gibi eski kök hücrelerdeki telomerlerin bu dokulardaki diğer somatik hücrelerdekinden daha uzun olduğu da gözlenmiştir (Bian ve ark., 2015).

1.15. Ovaryumta Oositin Gelişimi

Ovaryum, kadınlarda üreme ve hormonal işlevlerini yerine getiren üreme endokrin organıdır. Burada üretilen oosit, granüloza ve teka hücreleri ile birlikte bulunmaktadır (Xie ve ark., 2020). Yeni doğan dişiler, oogonia olarak bilinen olgunlaşmamış yumurta hücrelerinden farklılaşan sabit sayıda oosite sahiptirler. Oogonia, dişi fetüste, primordiyal germ hücrelerinin mitotik bölünmesi ile üretilmektedir ve gebeliğin 20. haftasında yaklaşık 7 milyona ulaşmaktadır. Oogonia daha sonra mayoz bölünme sonucu, birincil oositleri oluşturur sonra bunlar fizyolojik apoptoz ve foliküler atılmaya maruz kalmaktadırlar. Sonuç olarak

doğumda sadece 1-2 milyon oosit oluşmaktadır (Chiang ve ark., 2020). Yeni doğmuş bir bebeğin yumurtalığında bulunan 1-2 milyon oositten, yetişkin yaşamı boyunca devam eden foliküler atılma ile sadece 300-400 oosit yumurtlama aşamasına ulaşmaktadır (Ahmed ve ark., 2019). Yumurtlamadan önce, memeli oositi, ovaryum folikülü içinde kendisine bir embriyo oluşturma yeteneği kazandıran bir farklılaşma sürecine girmektedir. Farklılaşma aşamasında olan bir oosit, insanlarda 3-4 ay ve farelerde yaklaşık 3 hafta süren büyüme sırasında makromolekülleri biriktirirken hacim olarak 100 katın üstüne çıkmaktadır. Boyuttaki bu artış ile birlikte döllenmeden sonra embriyonik gelişim için gerekli olan metabolitler, mRNA'lar ve proteinlerin yanı sıra mitokondri gibi organellerin birikimi de görülmektedir. Oositin büyümesine folikülün büyümesi ve farklılaşması eşlik etmektedir. Bir oositin büyüme aşaması, bitişğinde bulunan granüloza hücrelerinin spesifik büyüme faktörleri üretmesiyle tetiklenir. Oosit büyüdükçe, zona pellucida adı verilen kalın bir hücre dışı tabaka oluşmaktadır. Bununla birlikte, komşu granüloza hücrelerinin sitoplazmik uzantıları, transzonal projeksiyonlarının oosit ile buluştuğu yerde bulunan sıkı bağlantı bölgeleri aracılığıyla granüloza hücrelerinin zarı, oosite metabolik aktivitesini sürdüren ürünler ve farklılaşmasını düzenleyen sinyaller iletmektedirler. Oosit de granüloza hücrelerine bu hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen büyüme faktörleri salgılamaktadır. Granüloza hücrelerinin oosit ile teması ile oosite geçen ürünler, oositte mayotik olgunlaşmanın erken gelişmesini önlemektedir ve granüloza hücrelerinden oosit hücrelerine salınan hormonal sinyaller ile oositin zamanında olgunlaşmasını sağlamaktadır. Oositin büyümesi, transkripsiyonel aktivitelerini etkileyen spesifik DNA sekanslarının metilasyonu ve embriyogenez için gerekli olan ultrayapısal değişiklikler dahil olmak üzere önemli epigenetik modifikasyonlarla şekillenmektedir. Oosit büyüme aşamasına girdikten sonra, primordial folikülü oluşturan skuamöz granüloza hücreleri, kübik hale gelir ve mitotik olarak çoğalmaya başlar, böylece büyüyen oositin genişleyen yüzeyini tamamen kaplamaya devam ederler ve birincil olarak adlandırılan bu foliküller, granüloza hücrelerinin bazal tarafına eklenen bir bazal membran ile sınırlandırılmıştır. Granüloza hücreleri çoğalmaya devam ettikçe, oosit çevresinde çok sayıda katman oluştururlar; bu tür foliküller sekonder folikül olarak adlandırılmaktadır. Oosit büyümesini tamamladığında, antrum adı verilen içi sıvı

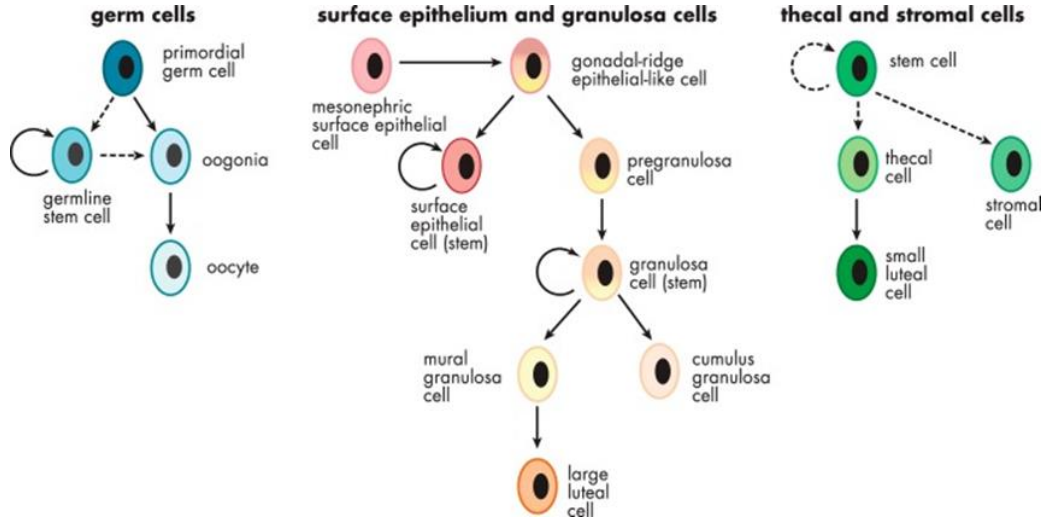
dolu bir boşluk oluşmaktadır. Antrum, granuloza hücrelerini folikülün iç duvarını kaplayan mural granuloza ve oositi çevreleyen kümülüs granuloza olmak üzere iki popülasyona ayırmaktadır Şekil1.2’de gösterilmiştir. Oositten ve özellikle ekstra foliküler kaynaklardan gelen sinyallerin zıt etkileri altında, hipofiz bezi tarafından salgılanan Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) salgılanmaktadır. Büyük bir antrum içeren foliküller, Graafyan olarak adlandırılır ve bunlar tipik olarak Luteinize Edici Hormona (LH) yanıt olarak yumurtlamayı gerçekleştirmektedir (Clarke, 2018). Yumurtlama aşamasında olgunlaşan foliküller belli bir aşamaya kadar gelişir, ovaryum yüzeyinden dışarı çıkar; foliküler sıvının keskin bir şekilde artmasıyla, basınç artar, böylece ovaryum dokusunun belirgin kısmı inceler ve sonunda yırtılır; ikincil oositler, periferik zona pellusida ve radyasyon kronları foliküler sıvı ile birlikte boşalır. Boş folikül de korpus luteumu oluşturmaktadır. Memeli yumurtalığında germ hücreleri, foliküller olarak bilinen temel bir işlevsel birim oluşturmak üzere somatik hücreler tarafından çevrenir. Her östrus döngüsü sırasında, Primordiyal foliküller olarak bilinen bazı erken evre foliküller büyümek için toplanır ve nihayetinde bu gelişmiş foliküller, döllenme için olgun bir yumurtayı serbest bırakmak üzere atrezi veya yumurtlama geçirmektedir (Bajwa ve ark., 2016). (Şekil 1.4). Memeli foliküllerinin gelişimi, ilkel germ hücrelerinden (PGC) oositlere kadar birkaç adımı içerir. Primordial folikül havuzlarının tükenmesi, yumurtalıkların yaşlanmasına neden olurken, baskın foliküllerin gelişimini ve dolayısıyla oositlerin olgunlaşmasını sürdürmek için primordial foliküllerde atrezi meydana gelir. Granuloza hücrelerinde otofajinin uyarılması foliküler atreziye yol açar. Benzer şekilde, oosit ve foliküler atrezi arasındaki denge otofaji ile sağlanabilir. Sonuç olarak, otofaji, foliküler gelişim ve atrezinin tüm gelişim süreci boyunca folikülogenezi etkiler (Zhou ve ark., 2019). (Şekil 1.3). Korpus luteum, ovulasyondan sonra kalan folikül duvarının çökmesiyle foliküler membranın ve kılcal damarların bağ dokusu partikül tabakasına kadar uzanan ve LH'nin etkisiyle, kılcal damarlar ve endokrin fonksiyonu açısından zengin, taze sarı renkli daha büyük hacimli bir hücre kümesi haline gelen yapıdır (Lu ve ark., 2018).



Şekil 1.3. Foliküler gelişim ve atrezide otofajinin düzenlenmesi (Zhou ve ark., 2019).

1.16. Kümülüs Hücreleri

Kümülüs hücreleri (CC), farklılaşmamış granüloza hücrelerinden (GC) oluşan fonksiyonel hücrelerdir. CC'lerin zona pellusida'dan geçen oosit ile sıkı bağlantı bölgeleri oluşturmak için ve kümülüs-oosit kompleksini (COC) çevreleyen oldukça özelleşmiş sitoplazmik uzantıları vardır. COC kompleksi, farklı parakrin sinyal yolları aracılığıyla oosit olgunlaşması için gerekli besinleri sağlamaktadır. Yumurtlamadan sonra, CC'ler ovaryumtan yumurtanın salınma yolculuğunu desteklemek için oositlere gevşek bir şekilde bağlanmaktadır (Zhu ve ark., 2015). CC'ler, oositin büyüme ve olgunlaşma süreçlerinde önemli roller oynamaktadır, örneğin, CC'ler oositi oksidatif stres hasarından korurlar. Folikül içindeki oosit ve CC'ler, birkaç biyolojik süreçte metabolit değişimi yoluyla yoğun çift yönlü iletişim kurarlar. Geçit bağlantıları yoluyla doğrudan iletişimi, iki hücre tipinin (oosit ve CC) küçük molekülleri ve iyonları değiş tokuş etmesine izin vermektedir. Bu çift yönlü iletişim, oositin ve folikülün büyümesini, olgunlaşmasını ve yumurtlama süreçlerini yönetir. ROS, sinyal molekülleri gibi bazı biyolojik süreçler için gerekli olmasına rağmen, lipidler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerle reaksiyona girerek hücre hasarına ve oksidatif strese neden olarak oosite zarar verdiğinden oosit kalitesini düşürmektedir. Oosit, gerekli tüm antioksidan savunma mekanizmalarını harekete geçirme kapasitesine tek başına sahip değildir. Bu koruma çevredeki CC'ler ile sağlanmaktadır (Von Mengden ve ark., 2020).



Şekil 1.4. Yumurtalığın potansiyel ve hücre soylarını gösteren şema (Hummitzsch ve ark., 2015).

1.17. CC Redoks Biyolojisi

COC'nin doğrudan yakınında bulunan foliküler sıvı (FF), in vivo redoks dengesini koruyarak bir antioksidan tampon gibi davranabilir. Granüloza hücrelerinde oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarı, döllenme ve embriyo kalitesi ile ters orantılıdır. CC'ler esas olarak oositin oksidatif stres savunmasından sorumludur. CC'nin antioksidan kapasitesi düşük olduğunda, oosit kalitesi etkilenebilir. CC'ler glikozu metabolize ederken, pentoz fosfat yolağı (PPP) ile biyosentez için indirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH)'ı üreterek oositin redoks dengesine katkıda bulunur. CC'lerde hem glikoliz hem de PPP'lerin mükemmel işleyişinin farelerde oosit sağlığı için gerekli olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2011). CC'ler, çeşitli antioksidan enzimlerin ifadesi yoluyla da oositi korumaktadır. Örneğin CC'lerde katalaz (CAT), oositlerde ifade edilmeyen bir antioksidan enzimdir ve H_2O_2 'yi reaktif olmayan moleküllere (H_2O ve O_2) metabolize etmektedirler. H_2O_2 'ye maruz kalındığında, hala COC içinde bulunan oositler oksidatif stres hasarından korunurken, CC'lerin dışına çıktığında canlılıkta büyük bir azalma göstermektedir. Glutasyon S-transferazlar (GST'ler), hücreleri oksidatif hasardan, ROS kaynaklı hücre membranlarında oluşan lipid peroksidasyonundan ve toksik bileşiklerden koruyan geniş bir enzim ailesini oluşturmaktadır. Reaktif süperoksit anyonunun metabolize edilmesinden sorumlu

enzim olan süperoksit dismutaz (SOD), (O_2^-)'i H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürür. CC'lerde ve oositlerde, mitokondride mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) ve sitoplazmada bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu/ZnSOD) eksprese edilir. Nitrik oksit sentaz enziminin indüklenabilir formu nitrik oksit üretir (NO). Zarlardan serbestçe yayılan polar olmayan bir sinyal molekülü olan NO ovaryumta oosit olgunlaşması ve ovulasyonda rol oynamakla beraber doza bağlı bir oksidatif hasar kaynağı da olabilir (Von Mengden ve ark., 2020).

1.18. Oosit Hücrelerinde Oksidatif Strese Karşı Kümüls Hücresavunma Mekanizmaları

Kümüls hücreleri, oositin hayatta kalması için gerekli olan birkaç molekülün transferine izin veren transzonal projeksiyonlarda bulunan boşluk bağlantıları yoluyla kendileri ve oosit arasında bağlantı kurmaktadır. Kümüls hücreleri folikül mikroçevresinden glikozu yakalar ve glikoliz yoluyla işleyerek oositin trikarboksilik asit/oksidatif fosforilasyon (TCA)/OXPHOS yoluyla metabolize edeceği piruvatı oluşturarak biyomoleküller, Adenozin Trifosfat (ATP) ve ROS üretmektedir. Kümüls hücreleri, reaktif hidrojen peroksidi metabolize eden ve oosit tarafından ifade edilmeyen bir enzim olan CAT üretiminden sorumludur. Kümüls ve oosit ayrıca süperoksit anyonunu daha az reaktif bir formu olan perokside metabolize eden SOD'ye de sahiptir; Glutasyon redüktaz (GR) glutasyon disülfid (GSSG)'nin indirgenmiş biçimi olan GSH'ye geri dönüştürülmesini tetikler ve GPx, Glutasyon (GSH)'yi elektron alıcısı olarak peroksiti H_2O_2 ve O_2 'ye metabolize eder ve lipid hidroperoksitleri azaltmaktadır. Tüm bu enzimler oksidatif stres savunmasında yer alır. SOD, bakır ve çinko varyantı (CuZnSOD) olarak sitoplazmada veya mangan varyantı (MnSOD) olarak mitokondride bulunabilir. Her iki hücre tipi de melatonin sentezleme yeteneğine sahiptir, ancak oositin kendisi, kümülüs hücrelerine bağımlı olduğundan, yeterli düzeyde antioksidan savunma üretemez. polikistik over sendromu (PCOS), ovaryum fonksiyonunda ve yumurtlama sürecinde karmaşık bir dengesizliğe neden olan endokrin ve metabolik bir hastalıktır. PCOS hastalarında, CC'lerin daha yüksek mitokondriyal ROS üretimine ve daha düşük antioksidan

kapasiteye sahip olduğu, daha düşük GSH/ GSSG (oksidize glutatyon), NADH/NAD⁺ ve NADPH/ NADP⁺ (oksidize nikotinamid adenin dinökleotit fosfat) oranları gösterilmiştir, bu da oksidatif artışı düşündürmektedir. Örneğin, yaşa bağılı infertilitesi olan kadın hastalarda CuZnSOD seviyeleri önemli ölçüde azalmaktadır. Bu şekilde, kırk yaşına yaklaşan kadınlardan alınan oositler, daha yüksek mitokondriyal DNA hasarı ve stres seviyeleri ile yaşlı mitokondrileri gösterebilir. Aslında, ileri anne yaşındaki oositler, daha düşük seviyede mRNA depoları ve daha düşük DNA onarımı etkinliği sunmaktadır (von Mengden ve ark., 2020). PI3K/mTOR sinyal yolu hücre proliferasyonu ve hücre büyümesi gibi hücrel süreçlerin ana düzenleyicisidir ve bu sinyal yolunun düzensizleştirilmesi, kanser, diyabet, obezite, kalıtsal hastalıklar ve nörodejeneratif bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların patogeneze katkıda bulunmaktadır. Folikül-içi mTOR sinyali, primordiyal folikül alımı ve büyümesinin ana düzenleyicisidir. Fosfataz ve tensin homoloğu / Tübero skleroz kompleksi / (PTEN) / TSC1 / TSC2'nin genetik ablasyonu ile germ hücrelerinde mTOR'un sürekli aktivasyonu, erken ovaryum yetmezliğine ve kısırılığa yol açan ilkel foliküllerin zamansız toplanmasına neden olmaktadır. Bu, mTOR sinyalinin baskılanmasının primordiyal folikül aktivasyonunu engelleyebileceği ve sonuç olarak menopoza geciktirebileceği olasılığını artırır. Hücre kültüründe hem FSH hem de LH, PI3K/mTOR sinyalini düzenleyerek ovaryum yüzey epiteli (OSE) hücrelerinin büyümesini uyarır ve bu sinyal yolunun baskılanması, OSE hücrelerinin gonadotropin kaynaklı proliferasyonunu inhibe etmektedir (Hilliard ve ark., 2013).

1.19. Mitokondri ve Oosit Yaşlanması

Mitokondri, enerji üretimi, biyosentez ve redoks homeostazı gibi oosit işlevi için gerekli olan süreçleri rol almaktadır. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, memeli oositlerindeki mayoz bölünme sırasında kromozomal anomalilerden sorumlu kilit bir faktördür. Mitokondri, oositlerde sitoplazmanın büyük bir oranını temsil eder ve oositlerde somatik hücrelerden farklıdır, daha yuvarlak ve parçalanmış ağısı görünümündedir. Oosit başına düşen mitokondri sayısı diğer tüm memeli

hücrelerindekiinden daha fazla olmasına rağmen, sayıları ve aktiviteleri ilerleyen yaşla birlikte azalır. Mitokondri, oksidatif stres veya DNA hasarı gibi farklı tipte stresörlere karşı hücrel adaptasyondan sorumludur. Bu stres faktörleri, mitokondrinin homeostazı yeniden sağlama kapasitesini aştığında, mitokondride işlev bozukluğuna yol açmaktadır. Yapılan araştırmalar mitokondri fonksiyonunun çok yönlü olduğunu ve bunun da oosite yansıdığını, mitokondrinin oosit olgunlaşması, fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim sırasında çok sayıda süreci desteklediğini göstermektedir. Mitokondriyal süreçlerin düzensizliği, yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklarda sürekli olarak rapor edilmiştir. Mitokondri, enerji üretimi, biyosentez ve atık giderme ile ilgili metabolik süreçlerin yanı sıra Ca^{2+} sinyali ve ROS homeostazı gibi hücrel işlev için gerekli olan çok sayıda işlemi gerçekleştirir (van der Reest ve ark., 2021). Kadın üreme sistemi, diğer organlara kıyasla yaşlanma belirtileri gösteren ilk organ sistemlerinden biridir. Bununla birlikte, oosit yaşlanmasında yer alan moleküler yollar açıklığa kavuşturulmamıştır (te Velde ve Pearson, 2002). Oositlerin döllenme kapasitesinin yaşa bağlı azalması, memeli yumurtalığında kalan oosit sayısına (ovaryum rezervi olarak adlandırılır) güçlü bir şekilde bağlı olmadığı, ancak daha çok oositin kalitesine ve oositin maruz kaldığı mikro ortama bağlı olduğu genel olarak kabul edilmektedir (Chiang ve ark., 2011). Maternal yaşlanma, kromatid ayrılması, kromozom dekonkonsansasyonu ve kromozomal yanlış dizilimlerine neden olan iğ ipliği ayrılmasındaki kusurlardan kaynaklanmaktadır (Liu ve Keefe, 2002). Down sendromlu doğan çocukların %95'inde 2 adet 21. kromozom anne tarafından kalıtılır ve vakaların %80'inde bunun yumurtlamadan önce ovaryumta gerçekleşen ilk mayotik bölünme sırasında meydana geldiği bildirilmiştir (Gaulden, 1992).

1.20. Oositlerde ve üreme süreçlerinde mitokondriyal fonksiyon

Mitokondri, oosit olgunlaşması, döllenme ve erken embriyonik gelişim sırasında transkripsiyon ve translasyonu desteklemek için enerji ve yapı taşları sağlamaktadır. Mitokondri çok sayıda metabolik, epigenetik, redoks ve kalsiyum sinyalini koordine eder ve hücrel işlev için gerekli olan süreçler ve ortaya çıkan

alışmalar, mitokondriyal işlev bozukluğunun oosit yaşlanmasına önemli bir katkıda bulunduğunu vurgulamaktadır (van der Reest ve ark., 2021).

1.21. Mitokondriyal Metabolizma

Glikoz, sitozolde glikoliz yoluyla katabolize edilir, ardından piruvat, TCA döngüsünde oksidatif fosforilasyona uğramak üzere mitokondriye alınır. TCA döngüsünde üretilen elektronlar, özel elektron taşıyıcıları nikotinamid adenin dinükleotid, flavin adenin dinükleotid (NADH, FADH₂) tarafından iç mitokondriyal zarıa bulunan elektron taşıma zinciri (ETC) komplekslerine verilir. ETC kompleksleri daha sonra OXPHOS adı verilen bir süreçte protonları zarlar arası boşluğa pompalarken mitokondriyal zar boyunca elektronları taşır (Siekevitz ve Watson, 1957). TCA döngüsünde üretilen NADH ve süksinat, sırasıyla kompleks I ve II'de oksitlenir. Elektronlar daha sonra koenzim Q'ya ve ayrıca kompleks III, sitokrom C ve kompleks IV'e geçirilir. Eşzamanlı olarak protonlar, mitokondriyal zar potansiyelini artıran I, III ve IV kompleksleri tarafından zarlar arası boşluğa pompalanır. Elektron taşınmasında proton pompalama işlemi hatasız değildir ve elektron sızıntısı ağırlıklı olarak kompleks I ve III'te meydana gelmektedir. Glikozun yanı sıra hem mitokondride metabolize edilen hem de TCA döngüsü veya diğer moleküllerin biyosentezi için yakıt görevi gören glutamin ve asetat diğer önemli karbon kaynaklarıdır (Yang ve ark., 2014). Hücreler besin stresıyla karşı karşıya kaldığında lipid türevli yağ asitleri önemli bir yakıt kaynağı haline gelebilir (Röhrig ve Schulze, 2016). Oositte bulunan mitokondriyal membran potansiyeli yaşlandıkça kademeli olarak değişmekte (Igarashi ve ark., 2005) ve mitokondrinin etkin olması oosit gelişiminin de etkin olduğunu göstermektedir (Perry ve ark., 2015). ROS, proteinleri dolaylı olarak veya protein oksidasyonu yoluyla aktive ederek hücresel sinyal kaskadlarını tetikler ve çeşitli enzimatik reaksiyonların bir yan ürünü olarak veya doğrudan NADPH oksidaz tarafından üretilmektedir (Lambeth ve Neish, 2014). Benzer şekilde, nitrik oksit (NO), proteinleri nitrosile ederek sinyal molekülleri olarak da işlev görebilen çeşitli reaktif nitrojen türlerine (RN'ler) yol açabilir. Mitokondriyal OXPHOS'da, yan ürün olarak ROS üreten biyokimyasal indirgeme ve

oksitleme (redoks) eylemleri gerçekleşmektedir. ROS'u nötralize etmek önemlidir, çünkü fazlası hücrel DNA'ya, lipidlere ve proteinlere zarar verebilir. Hücrel hidrojen peroksit, katalaz, glutatyon peroksidazlar (GPx) ve peroksiredoksinler tarafından suya indirgenebilir. Bununla birlikte, mitokondride katalaz yoktur ve mitokondride GPx4'ün yalnızca tek bir ek varyantının mevcut olduğu bildirilmiştir (Lubos ve ark., 2011). Mitokondri, yerel olarak üretilen hidrojen peroksidi ayrıştırmak ve oksitlenmiş proteinleri azaltmak için peroksiredoksin 3 ve 5 (PRDx3, PRDx5), tioredoksin 2 (TXN2) ve tioredoksin redüktaz 2'nin (TRXR2) birleşik aktivitelerine kullanmaktadır (Ismail ve ark., 2019). Ca^{2+} iyonlarının mitokondriye alınımı, mitokondriyal kalsiyum uniporter kompleksi yoluyla gerçekleşir. Uniporter, yalnızca Ca^{2+} seviyeleri belirli bir eşiği aştığında aktif hale gelebilir (Mallilankaraman ve ark., 2012). Mitokondriye Ca^{2+} girişi, mitokondrinin aktivitesi üzerine uyarılır. Bundan dolayı aşırı Ca^{2+} akışı mitokondriyal oksidatif stresi yükseltebilir ve apoptoza yol açabilir (Peng ve Jou, 2010), bu da mitokondriyal kalsiyum homeostazının mitokondriyal metabolik işlevi sürdürmek için gerekli olduğunu ve düzensizliğinin patolojiye katkıda bulunabileceğini göstermektedir (van der Reest ve ark., 2021).

1.22. ROS'un Ovaryum Üzerindeki Etkisi

ROS, memeli ovaryumları üzerinde hem olumsuz hem de olumlu etkiler göstermektedir. ROS, ovaryumlarda oosit olgunlaşmasından döllenmeye kadar birçok fizyolojik ve patolojik aktiviteyi etkileyebilir. Foliküler sıvıda oluşan ROS, foliküler büyüme, oosit olgunlaşması ve ovaryumta steroid biyosentezine katılmaktadır ve aynı zamanda ovaryumta folikül oluşumu, dominant folikül seçimi, korpus luteum (CL) oluşumu ve embriyo oluşumu için kritik bir süreç olan anjiyogenezi düzenlemektedir. Buna göre, ROS kısmen anjiyogenezi düzenleyerek foliküler büyüme aşamasına katılabilir. Ovulasyon için uygun miktarda ROS gereklidir. Ovulasyon öncesi folikül tarafından üretilen ROS, yumurtlamanın kritik indükleyicileri olarak kabul edilir ve ROS'un inhibisyonunun ovulasyonu etkisiz hale getirdiği doğrulanmıştır (Shkolnik ve ark., 2011). Oksijen azlığı, ovaryumta bulunan

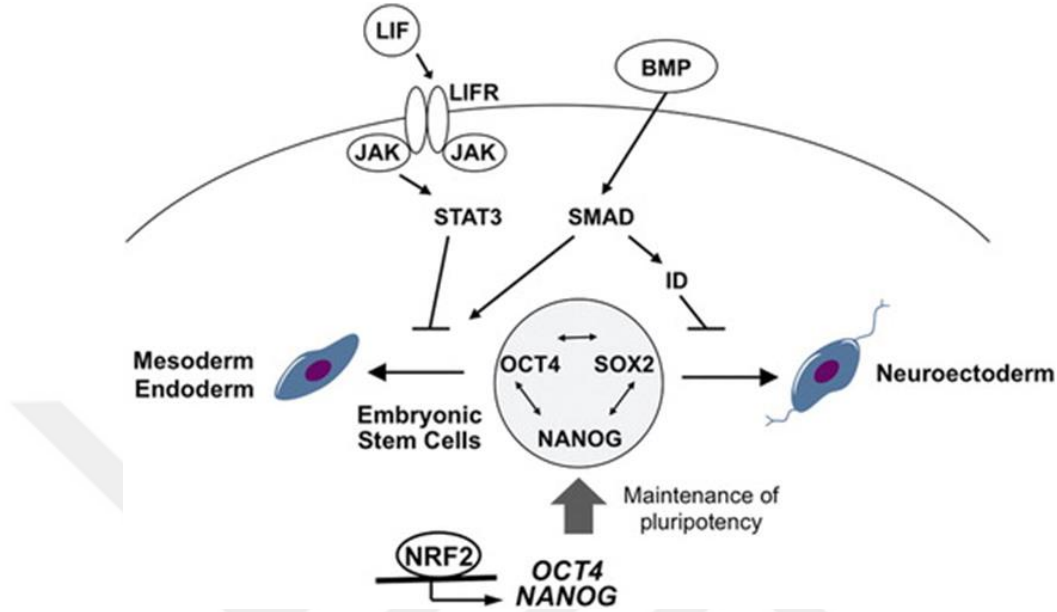
foliküllerin çok büyümesi ve gelişmesi için önemli olan foliküler anjiyogenezi uyarır. Foliküllerin ilkel aşamadan antral foliküllere gelişimine, granüloza hücrelerinin metabolik fonksiyonunda belirgin bir artış, özellikle steroid biyosentezi ile sitokrom P450 aktivitesinde büyük bir artış eşlik etmektedir. Büyük miktarlarda ROS, elektron taşınması sırasında üretilirler, bu da fonksiyonel granüloza hücrelerinin foliküllerdeki prooksidan durumla ilgili olduğunu göstermektedir. Döllenme için salınan dominant foliküller haricinde, diğer büyüyen foliküllerin tümü apoptoza uğramaktadır ve bu süreç ROS tarafından desteklenmektedir. Buna paralel olarak, folikül uyarıcı hormon (FSH) kaynaklı östrojen sentezi ve büyüyen foliküllerde CAT ve GSH'ın yukarı regülasyonu, normal ovaryum fonksiyonu sırasında dengeyi korumak için apoptoz oluşumuna direnmektedir. Ovaryumta FF kan akışının azalması, ROS üretmesi ile doku hasarına neden olabilir. OS, üreme çağındaki kadınların en yaygın endokrin anormalliği olan ve yaklaşık %18 prevalansı olan PCOS dahil olmak üzere farklı kadın hastalıklarında rol oynamaktadır. Artan ROS üretimi ile birlikte mitokondriyal O₂ tüketimi ve GSH seviyelerindeki azalma, PCOS hastalarında mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu açıklamaktadır. Hipoksi ve iltihaplanma, hücrelerdeki mitokondriden büyük miktarlarda ROS salınmasına neden olan TNF- α üretimine yol açabilir. Aşırı ROS, oksidasyon ve antioksidan arasında bir dengesizliğe neden olarak OS'ye neden olabilir (Lu ve ark., 2018). Foliküler büyüme sırasında artan steroid üretimi, sitokrom P450'nin ifade edilmesine ve ROS'u oluşturabilir. Bu arada, büyüyen foliküllerde artan estradiol (E2) salgılanması, peroksidaz CAT'in ekspresyonunu tetikleyerek, ROS ve antioksidanlar arasında dinamik bir denge sağlamaktadır. ROS uyarımı mayoz I'in ilerlemesini düzenler; aksine, mayoz II'nin ilerlemesi esas olarak ovaryumdaki antioksidanlar tarafından kontrol edilir. Artan ROS, granüloza hücrelerinde apoptozu indükler, bu da foliküler duvar yırtılmasına ve yumurtlamaya yol açmaktadır; bu nedenle ROS önemli bir ovulasyon sinyali olarak kabul edilir. OS'nin eksojen yollar, endojen yollar ve endoplazmik retikulum stresi dahil olmak üzere çeşitli süreçlerle ovaryum hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Jalouli ve ark., 2022).

1.23. Ovaryum Yüzey Epitelinde Bulunan Kök Hücreler ve Yaşlanması

OSE hücrelerin ovaryum kök hücreleri (OSC'ler) içerdiği bulunmuştur. OSC'lerin epitelyal ovaryum karsinomunun patogenezindeki rolü iyi bilinmektedir. Olgun kadında OSE göze çarpmayan, tek tabakalı yassı ila kübik bir epitelidir. Çoğu memelide, ovulasyonun bozulduğu bölgeler dışındaki over yüzeyinin tamamı epitel hücreleri ile kaplıdır. Embriyonik gelişim sırasında ve daha sonraki yaşamda rejenerasyon sırasında meydana gelen fizyolojik bir hücre süreci olan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), patolojik bir durum içeren hücreler de üretebilir. Ovaryum yüzey epitel kök hücreleri ve neo-oogenez kök hücreler, memelilerde hemen hemen tüm doku ve organlarda bulunan, kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Epitelyal ovaryum germ hattı kök hücreleri, yetişkinlerde yumurta üretiminin önemli bir kaynağıdır. OSE hücre tabakası "germinal epitel" olarak kabul edilir ve embriyonik kök hücre özelliklerine sahiptir (Xu ve ark., 2018). Yapılan bu çalışmada, VSEL'ler ve OSC'ler dahil olmak üzere kök/progenitör hücrelerin yaşlı farelerin ovaryumlarında varlığı ve işlevselliği gösterilmiştir. Ovaryumlarda folikül olmamasına rağmen, OSE belirgin kalmıştır ve OSE hücre yaymalarında hem OCT4 hem de MVH ekspresyonu kaydedilmiştir. OCT4, kök hücrelerin kendini yenilemesini düzenleyen sinyal yolundaki ilk moleküldür. OCT4, hücre farklılaşmasından sonra aşağı yönde düzenlenir, insan ve fare embriyonik kök hücrelerinde (ESC'ler) besleyici hücrelerin yokluğunda hücrenin kendini yenilemesini sağlamaktadır. OCT4 geninin ESC hücrelerinden silinmesi, hücre farklılaşmasına yol açar. OCT4, Sox2 ve NANOG, kök hücrelerini ve pluripotensiyi yöneten çekirdek düzenleyici ağın iyi bilinen kilit bileşenleridir. NANOG ifadesi doğrudan OCT4 ve Sox2 tarafından düzenlenir. Sox2 geninin delesyonu ile oluşan hücrelerdeki patolojik fenotipler, OCT4'ün ektopik ekspresyonu ile düzeltilebilir. OCT4, pluripotensinin oluşturulması ve sürdürülmesinde en önemli transkripsiyon faktörlerindendir (TF). OCT4'ün ifadesi ile yaşlanma arasında güçlü bir ters orantı vardır. OCT4 G1 fazındaki hücre döngüsü ilerlemesindeki blokajı ortadan kaldıran ve S fazına girişi uyaran bir hücre döngüsü promotörüdür. Pluripotensi geni OCT4, kendini yenileme ve yaşlanmayı düzenleyerek kök hücre özelliklerinin korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Lu ve ark., 2019). Menopoz sonrası kadınların

ovaryumlarında küçük boyutlu kök hücreler bildirilmiştir. Kök hücrelere özgü transkriptler ve mayozun erken faz I aşamasında tespit edilmiştir. Böylece germ hücre yuvalarının yaşlanan ovaryumda varlığını sürdürdüğü, ancak foliküller olarak bir araya gelemediği gösterilmiştir (Sharma ve Bhartiya, 2022). Pluripotensi ve uzun süreli kendini yenilemedeki rolleri göz önüne alındığında, embriyonik transkripsiyon faktörleri Sox2, OCT4 ve NANOG, kök hücrelerin diğer hücrelerden ayırt edilmesinde temel olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, en sık kullanılan ovaryum kanseri hücre dizilerinde Sox2, OCT4 ve NANOG'u karakterize eden veya bunların ekspresyonunun spesifik yüzey belirteçleri ve tümör başlatan hücreler (TIC)'lerin diğer özellikleri ile ilişkili olup olmadığını belirleyen kapsamlı bir çalışma yoktur (Robinson ve ark., 2021). SOX-2, NANOG ve OCT4 gibi pluripotensi belirteçleri dahil olmak üzere birçok yeni çalışma bu ilgili genlere odaklanmıştır. SOX-2, hedef DNA'nın küçük oluşuna bağlanarak farklı gelişimsel süreçleri düzenler ve spesifik hücrelerin çoğalmasında, farklılaşmasında hayati bir rol oynaktadır. SOX-2, OCT-4 ile bir heterodimer oluşturabilir ve primordiyal germ hücrelerinin yanı sıra embriyonik kök hücrelerin kendisini yenilemesini ve pluripotensini düzenleyebilir. Ayrıca homeobox genlerinin bir üyesi olan NANOG, pluripotent kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşmamış koşullarda muhafaza edilmesinde önemli role sahiptir. OCT-4, SOX-2 ve NANOG birbirlerinin ekspresyonunu indükleyebilir ve blastosist iç hücre kütlesi ve embriyonik kök hücrelerin kendisini yenileyen ve farklılaşmamış durumunu koruması için gereklidir. Ayrıca kanser hücrelerinin göçü ve invazyonuna da neden olurlar. OCT-4 ve SOX-2 ise belirli promotörlere bağlanmadan önce bir heterodimer oluştururlar ve fonksiyonel olarak birbirlerini olgunlaştırırlar. Ayrıca NANOG da heterodimer oluşturur ve diğer pluripotens genlerinin ekspresyonunu düzenlemek için geri besleme döngüsü oluşturmaktadır (Shariati ve ark., 2018). NRF2, nöroektoderm türevini baskılamak için doğrudan pluripotens genleri OCT4 ve NANOG'un ekspresyonlarını teşvik etmek bu genlerin promotor bölgelerine bağlanmaktadır (Dai ve ark., 2020). Şekil 1.5.'te gösterildiği gibi embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması, SMAD ve JAK/STAT3 sinyal yollarını ve pluripotens faktörlerini içeren karmaşık sinyal ağları tarafından tam olarak düzenlenir. NRF2, insan pluripotent kök hücrelerinde çekirdek pluripotens faktörleri OCT4 ve

NANOG'u transkripsiyonel olarak düzenler ve böylece bunların korunmasına katkıda bulunur. (Yagishita ve ark., 2023).

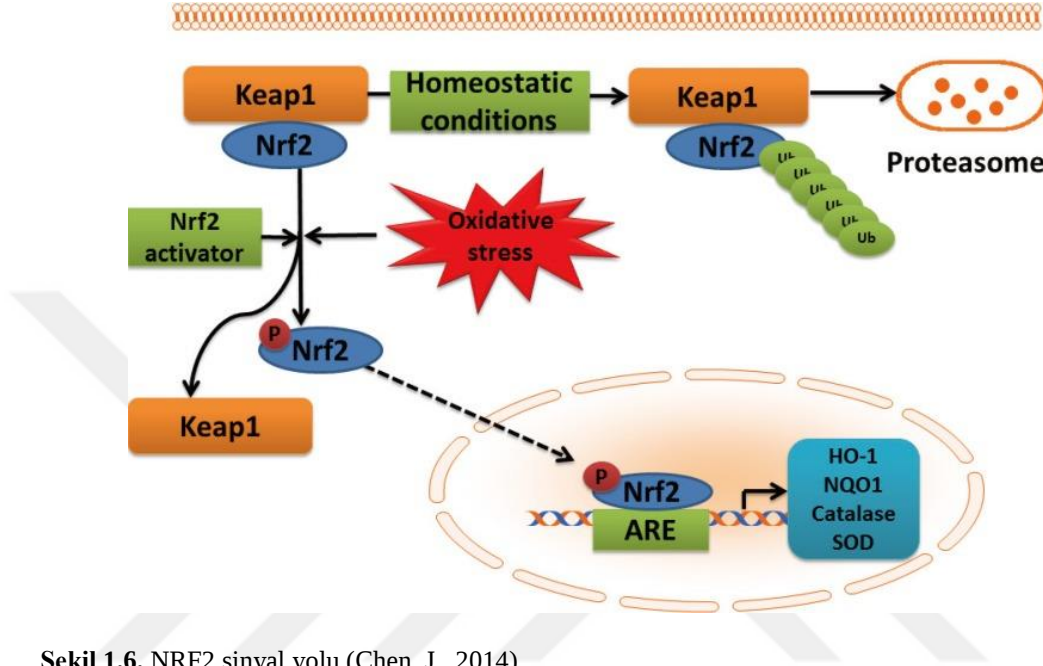


Şekil 1.5. İnsan embriyonik kök hücrelerinde sinyal ağları. (Yagishita ve ark., 2023).

1.24. NRF2 Geni ve Yaşlanmadaki Rolü

NRF2, antioksidan glutasyon yolu da dahil olmak üzere hücre koruyucu genleri düzenleyerek hücreleri oksidatif strese koruyan birincil transkripsiyon faktörüdür (Chen ve ark., 2021). (Şekil 1.6). Elektrofollere maruz kalmadan önce, NRF2 sitozolde Keap1 adı verilen bir protein ile etkileşime girer. Keap1, NRF2'ye bağlanır ve onu aktin veya miyozin hücre iskeletine ayırmaktadır. Keap1, NRF2'nin proteazomal bozunmasına neden olan Cullin 3-bazlı ubiquitin ligaz E3 kompleksi için bir adaptör görevi görebilir ve sistein açısından zengin araya girebilen bazı sistein amino asitleri, özellikle cys 151, 273 ve cys 288, NRF2 bağlanması için gereklidir. Bu sistein amino asitleri modifiye edildiğinde, Keap1, NRF2 genine bağlanma yeteneğini kaybeder ve böylece NRF2 geni serbest kalır ve stoplazmadan hücre çekirdeğine girer. Çekirdekte EpRE, birçok genin promotör bölgelerinde bulunan NRF2 bağlayıcı cis elementidir. NRF2 bağlanması için bir çekirdek TGANNNGC dizisine sahip olması gerekir. EpRE dizisi birçok gende bulunabilir,

ancak sadece bazıları NRF2 geninin bağlanması yoluyla transkripsiyonel aktivasyon açısından işlevseldir. NRF2, küçük Maf proteinleri MafG/F/K veya c-Jun, Jun-B, JunD, Fra1 ve ATF4 dahil olmak üzere diğer proteinler ile bir heterodimer oluşturduktan sonra EpRE'ye bağlanır (Zhang ve ark., 2015).



Şekil 1.6. NRF2 sinyal yolu (Chen, J., 2014).

1.24.1. SOD

SOD, süperoksit anyon radikalini (artı iki proton) H_2O_2 ve O_2 'ne dönüştürür ve bunlar daha sonra katalaz, GPxs ve Prdxs tarafından uzaklaştırılmaktadır. Hücrelerde iki tip SOD bulunur, sitozolde Cu, Zn-SOD (SOD1) ve mitokondride Mn-SOD (SOD2). Cu ve Zn (SOD3) içeren üçüncü bir form da hücre dışında bulunur. Hayvan çalışmaları, karaciğerde ve yaşlı sıçanların beyinde SOD1 aktivitesinde yaşa bağlı bir azalma olduğunu göstermiştir (Vanella ve ark., 1982). Bazı çalışmalarda fare iskelet kasları, sıçan beyni ve insan plazması gibi bazı dokularda yaşlanma ile SOD1 aktivitesinin arttığını bile gösterilmiştir (Rodriguez ve ark., 1998). Lu ve ark. 60 yaşın altındaki insanlardan alınan cilt fibroblastlarında SOD2 aktivitesinin yaşlanma ile artmasına rağmen, aslında daha sonraki yıllarda azaldığını bulmuşlardır (Lu ve ark., 1999). Buna karşılık, insan ve sıçanların iskelet kaslarında SOD2 aktivitesinin

arttığı veya yaşlanma ile değişmediği bildirilmiştir (Pansarasa ve ark., 1999). Sıçanların prostat loblarında yaşlanmayla birlikte artan SOD3 gen aktivitesi gözlenmiştir (Pechenino ve ark., 2006). Buna karşılık genç donörlerle karşılaştırıldığında, yaşlı donörlerden (>60 yaş) retina pigment epitel hücrelerinde SOD3 gen ekspresyonu azalmıştır (He ve ark., 2010).

1.24.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye dönüştürürken, GPx'ler GSH kullanarak H_2O_2 'yi H_2O 'ya indirger (Şekil1.6). GPx4, lipid hidroperoksitlerine karşılık gelen alkollere indirgeyebilirler. Katalaz ve GPx'in yaşa bağlı gen ekspresyonundaki değişiklikler hakkındaki raporlar çelişkilidir. Yaşlanma ile birlikte, insan deri fibroblastlarında (Lu ve ark., 1999) eritrositlerde (Mendoza ve ark., 2007), lenfositlerde (Gautam ve ark., 2010) ve iskelet kaslarında katalaz aktivitesi azalmıştır (Fano ve ark., 2001). Katalaz aktivitesindeki yaşa bağlı değişiklikler dokuya bağlı görünmektedir. Örneğin CAT, hipokampal ve çizgili kaslarda artmış, ancak yaşlı sıçanların beyindeki korteks ve septal bölgede azalmıştır (Rodriguez ve ark., 1998) ve başka bir çalışmada, vestibüler dokuda katalaz aktivitesi artmış, ancak yaşlı sıçanların kulaklarındaki vasküler veya duyuşal koklear dokularda değişmemiştir (Coling ve ark., 2009). GPx ailesi, memelilerde 8 üyeden oluşur, GPx1-4 ve GPx6 selenyum içerirken GPx5, GPx7 ve GPx8 selenyum olmayan proteinlerdir. Her GPx'in fizyolojik lokalizasyonu ve substrat spesifikliğı farklılaşır ve toplu olarak geniş bir oksidan yelpazesine karşı koruma sağlar, ancak GPx6, GPx7 ve GPx8'in işlevi açıklanmayı beklemektedir. GPx4, membranların oksidatif hasardan korunmasında kritik bir rol oynamaktadır (Linard ve ark., 2001). Buna karşılık, yaşlı sıçanların sperminde GPx4 aktivitesi ve çekirdekteki protein seviyesi azalmıştır (Weir ve ark., 2007).

1.24.3. Peroksiredoksin (Prdx)

Prdx, H_2O_2 ve lipid hidroperoksitleri H_2O ve alkollere indirgeyen bir peroksidaz ailesidir. Bugüne kadar altı memeli Prdx izoenzimi (Prdx1-6) tanımlanmıştır. Prdxs 1 ile 5, tioredoksin kullanarak H_2O_2 'yi H_2O 'ya indirgerken, Prdx6 GSH kullanarak lipid hidroperoksitleri alkollere indirgeyebilir. Oksitlenmiş Prdx formları, yaşlanma ile hücre veya dokularda birikir (Zhang ve ark., 2015). Mitokondride okside edilmiş Prdx3 yaşlı sıçan karaciğerinde genç yetişkinlere kıyasla (28 ay-12 ay) artmış, indirgenmiş formu ise değişmeden kalmıştır (Musicco ve ark., 2009). Sıçanların ovaryumlarında (Lim ve ark., 2011) ve karaciğerlerinde yaşlanmayla birlikte Prdx3'te bir azalma bulunmuştur (Picca ve ark., 2013).

1.24.4. GST'ler

GST süper ailesi, sitozolde, membran ve mitokondride farklı şekilde yerleşen çoklu izoenzimlerden oluşur. GST'ler, GSH'yi elektrofille aktarır ve böylece oksidatif savunma ve detoksifikasyonda kritik rol oynamaktadır (Zhang ve ark., 2015).

1.24.5. GSH

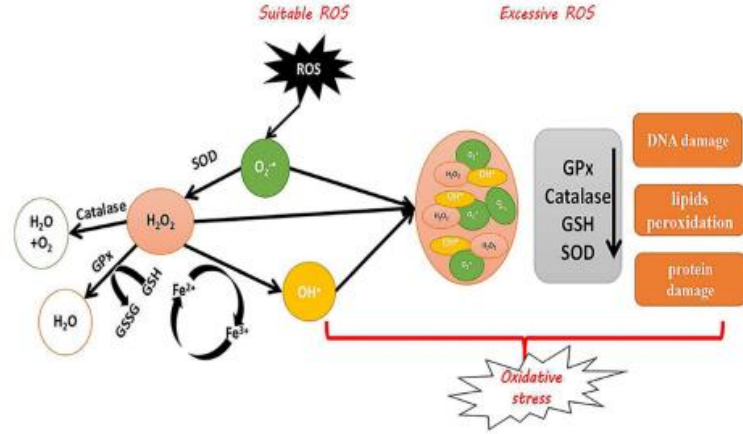
GSH, hücrelerde ve dokularda en bol bulunan antioksidandır ve oksidatif strese karşı korunmada birincil rol oynamaktadır. Yaşlanmayla birlikte daha fazla oksidatif durumun, oluşması nedeniyle GSH, H_2O_2 , lipid hidroperoksitler, elektrofiller ile reaksiyona girmesi ve karışık disülfidler oluşturmak için proteine bağlanması GSH tüketimini artırabilir (Rebrin ve ark., 2008). Oksidatif stresin veya GSH homeostazının bozulması genellikle GSH üretimini artıran adaptif bir yanıtın indüklenmesine neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2015). (Şekil 1.7).

1.24.6. HO-1

HO-1 hem molekülünü biliverdin, serbest demir ve karbon monoksit oksidasyonunu kataliz eden bir enzimdir. Çok sayıda çalışma, HO-1'in antioksidan savunmada ve yaşa bağlı patofizyolojik değişiklikler de dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik süreçlerde kritik rol oynadığı gösterilmiştir. Hirose ve arkadaşları, 3 ila 84 yaş arası 31 kişinin otopsi çalışmasında kadavraların beyinlerinde HO-1 protein seviyesini incelemişler ve bu inceleme sonucunda hipokampus ve beyincikte yaşlanma ile HO-1'in arttığını bulmuşlardır (Hirose ve ark., 2003). HO-1 gen ekspresyon düzeyi karaciğerde yükselir ancak yaşlı farelerin dalağında değişmez (24 aya karşı 6 aya) (Barnes ve ark., 1998).

1.24.7. NQO-1

NAD (P) H: kinon oksidoredüktaz (NQO-1), NAD (P) H'yi elektron verici olarak kullanarak çeşitli kinonların ve aromatik bileşiklerin iki elektronlu olarak indirgenmesini katalize eden bir flavoenzimdir. Hücrel redoks durumunun korunmasında önemli bir antioksidan enzimdir. Hücrel savunma mekanizmasının kritik bir parçası olarak, kimyasallara veya endojen kinonlara maruz kalmaya bağlı elektrofilik ve/veya oksidatif strese yanıt olarak NQO1 ekspresyon seviyesi indüklenir. Yaşlanma ile birlikte stresörlere yanıt olarak NQO-1 indüksiyonunun değişimi, yaşlılarda antioksidan savunma kapasitesinde önemli bir rol oynayabilir. Yakın zamanda NQO1 mRNA düzeyinin orta yaşlı farelerin akciğer, karaciğer ve beyinciklerinde (21 ay) genç yetişkinlere (6 ay) kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark., 2012).



Şekil 1.7. NRF2 Antioksidan mekanizması (Jiayin Lu ve Ark., 2018).

1.24.8. NRF2/EpRE Aktivitesinde Yaşlanmaya Bağlı Değişiklikler

Bir çalışmada, yaşlı sıçanlarda nükleer NRF2'nin ekspresyon seviyelerinin azaldığı bulunmuştur (Ungvari ve ark., 2011). Buna karşılık Kim ve ark. yaşlı farelerden alınan dalak lenfositlerinde NRF2 ve hedef genlerinin ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır (Kim ve ark., 2005). Başka bir çalışmada NRF2'nin hedef genlerinin ekspresyonunun artmasıyla eş zamanlı olarak 6 aylık farelere kıyasla 21 aylık farelerin karaciğerinde, akciğerinde ve serebellumunda arttığını göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2012). Mevcut verilere göre, bazal NRF2/EpRE sinyallemeinin yaşa bağlı değişimi, doku veya hücreye özgü bir tarz sergilemektedir (Landis ve ark., 2012).

1.24.9. NRF2 Fosforilasyonu

P38 MAPK, NRF2/EpRE tarafından düzenlenen genlerin indüklenmesinde rol oynamaktadır ancak NRF2 aktivasyonundaki rolü belirsizdir (Zhang ve ark., 2015). Hafif oksidatif stres ve NRF2 aktivatörleri, NRF2/Keap1 kompleksinin ayrışmasına, NRF2'nin fosforilasyonuna ve nükleer translokasyona neden olmaktadır. NRF2, çekirdekte HO-1, NAD(P)H, NQO1, Katalaz ve SOD antioksidant hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu için bu genlerin promotöründeki ARE bölgesine

bağlanarak detoksifiye edici bu enzimleri arttırır. Küçük Maf proteinleri (MafG, MafK, MafF) ile NRF2 heterodimerizasyonu, NAD(P) H: kinon-oksidoredüktaz-1(NQO1), γ -glutamil sisteinil sentetaz (γ -GCS), HO-1 ve diğerleri gibi NRF2 tarafından düzenlenen genlerin transkripsiyonuna aracılık eden ARE/EpRE'ye (antioksidan yanıt elemanı/elektrofilik yanıt elemanı) verimli bir şekilde bağlanması için gereklidir (Zhang ve ark., 2015).

1.24.10. Yaşlanmada NRF2 negatif düzenleme mekanizması:

a. Keap1: NRF2'nin proteozomal bozunma için Keap1 tarafından tutulur.

b. GSK-3 β : Akt, Fyn kinazı aktive eden ve nükleer birikimine neden olan GSK-3 β 'yi fosforile etmektedir. Bu aşamada Fyn, NRF2'yi fosforile eder ve yolağın aşağı yönde bulunan HO-1 ve NQO1'in transkripsiyonunu inhibe ederek NRF2'nin sitozole geçişini arttırmaktadır.

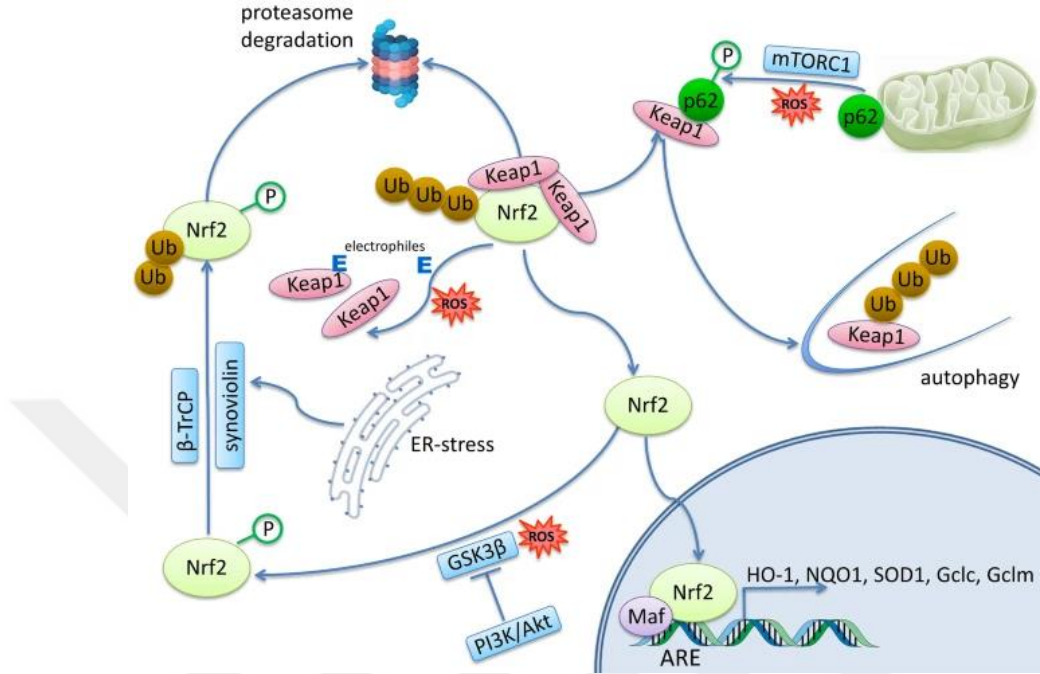
c. Bach1: Bach1, Maf proteinlerine (Bach1/Maf/ARE) bağlanmak için NRF2 ile yarışarak antioksidan enzimlerin ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır.

d. p53: Oksidatif stres, p53'ü aktive ederek NRF2'nin CREB binding protein (CBP)'ye bağlanma kuvvetini azaltır ve sonuç olarak antioksidan enzimlerin ekspresyonunu azaltmaktadır.

GSK-3, glikojen metabolizması, hücre çoğalması, kök hücre yenilenmesi, gelişme ve apoptoza katılan iki izoformu ile (alfa ve beta) bir serin/treonin (Ser/Thr) protein kinazdır. GSK-3 β 'nin NRF2'nin sitozole yer değiştirmesini düzenlediği bildirildiği için NRF2 yolunda olası bir rolü göz ardı edilemez (Salazar ve ark., 2006). Kemoprotektif genler aktive edildikten hemen sonra, NRF2'nin çekirdekten sitoplazmaya translokasyonunu başlatır (Jain ve Jaiswal, 2007). PI3K/Akt (protein kinaz B) /GSK-3 β sinyal yolağının aktivasyonunun, yaşlandırılmış farelerin (SAMP8) karaciğerlerinde NRF2'nin nükleer translokasyonunun daha düşük olması

ve antioksidan ve detoksifiye edici enzimlerin ekspresyonunun azalması ile uyumlu olduğu gösterilmiştir (Silva ve ark., 2018). NRF2'nin aşırı ekspresyonunun apoptozu önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. NRF2'nin ifadesinin artmasıyla kaspaz 3'ün ifadesi ve apoptoz oranı azalmıştır, buna Bcl-2/Bax'ın yukarı doğru düzenlenmiş ifadesi eşlik etmektedir bu durum NRF2'nin, Bcl2 ile ilişkili yolda apoptozu düzenlediğini göstermektedir (Heasman ve ark., 2011). Notch yolu, hücre farklılaşması sürecini kontrol eden genetik düzenleyici mekanizmaları içeren hücre-hücre iletişimi için önemlidir. ROS artması hücrelerin farklılaşmasını indükleyebilir. Otofaji, organizmaları çeşitli patolojik koşullara karşı korumada rol oynamaktadır. NRF2/Keap1 kompleksinden ayrıldıktan sonra, NRF2, MAPK ekspresyonunu artırır ve NRF2 aşağı yönündeki HO-1 ile birlikte p53'ü inhibe ederek Glioblastoma kök hücrelerinin (GSC) kendisini yenilemesini sağlamaktadır. Endoplazmik Retikulum (ER) stresi katlanmamış protein yanıtının (UPR) birikmesine yanıt olarak aktive olan hücresel bir stres yanıtıdır. NRF2 gen ekspresyonunun yükselmesi ER stresini artırarak ve ER ile ilişkili bozulmayı artırarak otofajiyi indükleyebilir. NRF2 aşağı akış bileşiği HO-1, kök hücrelerin yüksek proliferasyonunu sürdürmede önemlidir. NRF2, birçok sitokin tipinin salgılanmasını düzenlemektedir. NRF2 ayrıca bağışıklık hücrelerinin işlevini de düzenleyebilir (Zhu ve ark., 2014). Aşırı miktarda ROS, MAPK ve PKC gibi fosforilasyon yollarını aktive etmekte ve bunlar da NRF2/ARE'nin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna katılmaktadır (Bo ve ark., 2015). NRF2 düzenlemesinin üçüncü yoluna ait iki E3 ubiquitin ligaz aracılık eder: β -TrCP ve sinoviolin (Hrd1 olarak da bilinir). Synoviolin, endoplazmik retikulum stresi (ER-stresi) sırasında aktive olur ve NRF2 protein miktarını azaltmaktadır. GSK3 β kinaz, NRF2 proteinini doğrudan fosforile edebilir, bu da onun β -TrCP ubiquitin ligaz tarafından tanınmasına ve müteakip bozunmasına yol açar. GSK3 β oksidatif stres sırasında aktive olan PI3K/Akt kinazlar tarafından inhibe edilir. Böylece, NRF2'nin β -TrCP'ye bağlı bozunması oksidatif stres altında inhibe edilir. GSK3 β kinaz, Src kinaz ailesinden Fyn tirozin kinazı fosforile edebilir. Fyn çekirdeğe translokasyonuna yol açar ve burada NRF2'yi fosforile ederek çekirdekten NRF2 çıkışına neden olur (Şekil 1.8). Mevcut kanıtlar, GSK-3 β 'nin, Skp1-Cull-Rbx1/Roc1 ubiquitin ligaz kompleksi için bir iskele proteini görevi gören β -Trcp'nin düzenlenmesi yoluyla

NRF2'nin nükleer dışlanması ve bozulmasını manipüle ettiğini göstermiştir (Chowdhryve ark., 2013).



Şekil 1.8. NRF2 aktivitesini düzenleme yolağı (Zinovkin ve ark., 2022).

NRF2, yaygın olarak hücre yaşlanma (CS) işlemlerini engelleyen bir faktör olarak bilinir. NRF2, antioksidan sistem, otofaji, p53 ile genom bütünlüğünü koruma, AMP ile aktive protein kinaz (AMPK), nükleer faktör-kB (NF-kB) vb. dahil olmak üzere çok sayıda sinyal yolunu etkiler. İnsan fibroblastlarının yaşlanması sırasında NRF2 aktivitesi azalır ve genin susturulması erken yaşlanmaya neden olmaktadır. NRF2'nin farmakolojik aktivasyonu hücre ömrünü uzatmaktadır. NRF2'nin negatif düzenleyici olan caveolin-1 de fibroblastların erken yaşlanmasına neden olmaktadır. NRF2, endojen inhibitörü caveolin-1 ile kompleks halinde, plazma zarının invaginasyonları olan caveola'da kısmen yerleşmiştir. Oksidatif stres altında, caveolin-1, NRF2'nin çekirdeğe göçünü kısıtlayarak NRF2 hedef genlerinin aktivasyonunu önlemektedir. Oksidatif stres altında caveolin-1'in aşırı ekspresyonu, NRF2 sinyalinin inhibisyonuna ve erken hücre yaşlanmasına yol açmaktadır. Keap1'e bağlanmaktan sorumlu NRF2 bölgesinin silinmesi olan farelerde, kalıcı NRF2 aktivasyonu fibroblastların erken yaşlanmasına yol açabilir ve kanser gelişme olasılığını artırabilmektedir. Bununla birlikte, aşırı NRF2 aktivasyonu, CS'ye katkıda

bulunabilecek NADPH oksidaz NOX4 aktivitesini artırarak oksidatif stresi indükleyebilir. Bu nedenle, NRF2 aktivasyonunun süresi ve genliği, ROS ve CS seviyelerinin düzenlenmesi için son derece önemlidir. Rapamisin, model hayvanlarda yaşamı uzatma kabiliyeti birçok bağımsız çalışmada doğrulanmış olan birkaç bileşikten biridir. Rapamisinin ana hedefi mTOR olsa da rapamisin aynı zamanda NRF2'yi aktive etme yeteneğine de sahiptir (Zinovkin ve ark., 2022).

1.25. Klotho Geni

İnsan Klotho, 1012 amino asitlik tek geçişli bir transmembran proteinidir, böbreğin distal kıvrımlı renal tübüllerinde ve beyindeki koroid pleksusta bol miktarda eksprese edilir ve ayrıca meme, pankreas ve ovaryumlar dahil olmak üzere çeşitli ekzokrin ve endokrin dokularda da bulunur (Lojkin ve ark., 2015). Klotho geni, birden fazla pleiotropik etkiye sahip tek geçişli bir transmembran proteini kodlayan yaşlanma baskılayıcı bir gendir (Sopjani ve ark., 2015). Farelerde ve insanlarda, Klotho geni, 13q12 kromozomda bulunur. İnsanlarda bulunan Klotho geni 5 ekzon ve 4 introndan oluşmaktadır. Klotho geninin transkripti yaklaşık olarak 5.2 kb'dir. Klotho geninin promotör bölgesi, bir TATA kutusundan yoksundur ve dört potansiyel Sp1 bağlanma bölgesi içerir (Xie ve ark., 2021). Klotho geni, ilk olarak Kuro-o, M. ve arkadaşları tarafından 1997 yılında tanımlanmıştır (Kim ve ark., 2020). Kuro-o, M. ve ark., 1997 yılında Klotho geninde mutasyon olan fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, farenin Klotho genindeki mutasyonun farenin yaşam süresinde aşırı bir azalmaya neden olduğu keşfedilmiştir. Bu çalışmada mutasyonlu fareler 3 haftaya kadar normal gelişme göstermekte daha sonra gelişmeleri yavaşlamakta ve yaşlanma belirtilerindeki artışla birlikte 8-9 hafta içerisinde fareler ölmektedir. Bu çalışma da gösteriyor ki memelilerde Klotho gen ifadesinin artması, yaşam süresini uzatabilirken, Klotho gen ifadesinin azalması yaşlanma sürecini hızlandırabilmektedir (Kuro-o ve ark., 1997). İnsanlarda Klotho gen ifadesi 40 yaşından sonra azalmaktadır. Klotho proteini türler arasında homoloji göstermektedir ve insanlar ile fareler arasındaki protein dizilerinin %98'i aynıdır (Xu ve ark., 2020). Klotho ailesinin bugüne kadar bilinen üç üyesi vardır (α , β , γ). β -Klotho ve γ -Klotho,

α -Klotho ile aynı homolojiye sahiptir. Her ikisi de α -Klotho transmembran protein yapısı ile homologtur. Klotho üyeleri, glikosidaz-1 ailesi ile dizi benzerliği göstermektedir, ancak katalitik olarak önemli glutamik asitten yoksundur (Kuro-o ve Moe, 2017).

1.25.1. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Endokrin FGF ailesi üç üyeden oluşmaktadır. Bunlar: FGF15 (Fare fibroblast büyüme faktörü, insanda FGF19'un homologudur), FGF21 ve FGF23 'tür. Dört farklı Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü (FGFR) vardır, FGFR1-4; bunlar tirozin kinaz reseptörleridir ve FGF'ler için yüksek veya düşük bağlanma kuvvetine sahiptir. Üç farklı Klotho gen tipi, fibroblast büyüme faktörü reseptörleri ile yapısal zorunlu reseptör kompleksi oluşturur ve böylece FGFR'lerin endokrin FGF'lere seçici bağlanma afinitesini sağlamaktadır (Xu ve Sun, 2015). Klotho geni tarafından sentez edilen mRNA'ların translasyonu ile üç tür Klotho proteini oluşur bunlar: Salgılanan (Çözünür), Transmembran ve Hücre içi protein formlarıdır (Torbus ve ark., 2018).

1.25.2. Salgılanan Klotho Proteini (Çözünür Klotho, sKL)

Çözünür KL, transmembran proteinin hücre dışı alana salınması ile üretilirken, sKL, alternatif RNA splayzing yoluyla oluşturulabilir (Liu ve ark., 2019). KL'nin ADAM10 ve ADAM17 tarafından β -cut olarak adlandırılan parçalanma mekanizması ile iki adet 65-kDa fragmanlı tam uzunluktaki KL'nin proteolitik bölünmesi ile KL1, KL2 veya her ikisini içeren sKL üretilir (Ewendt ve ark., 2021). Çözünür Klotho proteininin sialidaz aktivitesine sahip olduğu ve çeşitli hücre yüzeyi glikoproteinlerinin glikanlarından terminal sialik asidin çıkarılması sürecine katıldığı, böylece aktivitesini ve hücre yüzeyi bolluğunu değiştirdiği daha önce bulunmuştur (Cha ve ark., 2008). Kanıtlar, humoral bir faktör olarak salgılanan Klotho'nun oksidatif stresi engelleyebildiğini, iyon kanallarının ve taşıyıcıların aktivitesini düzenleyebildiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2015). Klotho'nun

salgılanan (veya çözünür) formu, FGFR'lerden bağımsız olarak birden fazla doku ve organı hedef alan bir hümorale faktör olarak işlev görmektedir. Klotho, FGF23 için bir yardımcı reseptör olarak işlev görmesine rağmen, sKL, FGF23 için bir reseptör olarak işlev görmeyebilir. sKL proteini biyolojik etkisini FGF23'ten bağımsız olarak göstermektedir. sKL büyüme faktörlerinin ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktör-1 (IGF-1), Dönüştürücü Büyüme Faktör β (TGF- β) ve İnterferon Gama (IFN- γ) gibi sitokinlerin sinyalleşmesini aşağı yönde düzenleyebilir. Klotho geninin ifadesinin artması, insülin ve IGF-1 sinyalizasyonu tarafından uyarılan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltarak yaşam süresini uzatmaktadır. Klotho eksikliği olan farelerde Wnt, Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF α) ve IFN γ sinyalleri artmaktadır. Artırılmış Wnt sinyali, kök ve progenitör hücrelerde işlev bozukluğuna ve hücre yaşlanmasına yol açan kök hücrelerde tükenmeye neden olmaktadır. Klotho, çeşitli Wnt proteinlerine bağlanır ve endojen, eksojen Wnt'nin aktivitesini baskılamaktadır. Klotho eksikliği erken yaşlanma ve iyon dengesizliği ile kolite yol açmaktadır. Klotho'nun, TGF- β ile indüklenen epiteliyal mezenkimal geçiş (EMT) yanıtlarını inhibe ederek böbrekte fibrozu ve kanser metastazını iyileştirdiği gösterilmiştir. Hem salgılanır hem de zara bağlı Klotho hem renal (NaPi-IIa) hem de intestinal (NaPi-IIb) fosfat taşıyıcılarını doğrudan inhibe ederek plazma fosfat konsantrasyonunu azaltabilirler. sKL proteini hücre zarı yüzeyindeki tip II TGF- β reseptörlerine (TGF β R2) doğrudan bağlanabilir, bu şekilde TGF- β 1'in kendi reseptörüne bağlanmasını inhibe etmektedir (Haussler ve ark., 2021). sKL proteini kana, idrara veya beyin omurilik sıvısına döküldükten sonra sadece KL1 veya KL2 olarak ya da hem KL1 hem de KL2 olarak girer ve diğer doku ve organlarda fonksiyonlarını yerine getirirler (Akimoto ve ark., 2012). sKL insülin büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF1R), fosfoinositid 3 kinaz/ serin/treonin kinaz (AKT) (PI3K)/AKT sinyalini inhibe edebilirken ve FOXO'yu aktive edebilirler (Kurosu ve ark., 2005). sKL geçici reseptör potansiyel iyon kanalı TRPV5 (Chang ve ark., 2005) veya renal dış medüller potasyum kanalı 1 (ROMK1) (Cha ve ark., 2009) dahil olmak üzere iyon kanallarının ve taşıyıcıların uyarılmasında yer alır (Ewendt ve ark 2021). Açlık koşullarında karaciğer açlık hormonu FGF21'i salgılar. FGF21 sırasıyla adipositlerde ve suprakiazmatik çekirdekte β -Klotho-FGFR1c kompleksine bağlanmayı takiben hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen ve sempatik sinir sisteminin aktivasyonu yoluyla

açlık ve stres tepkilerini indükler. FGF-23, fosfat alımına yanıt olarak kemik hücreleri tarafından salgılanır ve mineral metabolizmasını düzenlemek için renal tübüllerdeki Klotho-FGFR kompleksinin en çok eksprese olduğu yere bağlanır (Xie ve ark., 2021).

1.25.3. Transmembran Klotho Proteini

Klotho transkriptinin membran formu tarafından kodlanan membran Klotho proteini, tek geçişli bir transmembran proteindir. Dolaşımda iki tür Klotho proteini vardır. Biri, iyi bilinen bir aktif form olan çözünür Klotho adı verilen membran Klotho'nun hücre dışı alanının bölünmesinden üretilir diğeri ise doğrudan Klotho transkriptinden alternatif splayzing ile üretilen salgılanan zar proteinidir, ancak işlevi büyük ölçüde bilinmemektedir. Membran proteini, hücre dışı iki dahili tekrarların (KL1 ve KL2 alanları olarak adlandırılır), her biri yaklaşık 450 amino asit uzunluğundadır ve β -glukosidazlara %20-40 benzer homolojiye sahiptir (Bian ve ark., 2015). Üç Klotho üyesi, fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR'ler) ile yapısal bir zorunlu reseptör kompleksi oluştururlar, böylece FGFR'lerin endokrin FGF'lere seçici bağlanma afinitesini sağlayabilirler. Klasik FGF'ler biyolojik aktivitelerini otokrin ve / veya parakrin bir şekilde ortaya çıkarır. Klotho, çeşitli FGFR'ler (FGFR1c, FGFR3c ve FGFR4) ile kompleksler oluşturur ve kemikten türetilen bir fosfatürik hormon olan FGF23'ün seçici olarak afinitelerini arttırabilirler. FGF23, NaPi-IIa'yı inhibe ederek renal proksimal tübüllerde sadece inorganik fosfat (Pi) geri alımını inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda 1α -hidroksilaz (CYP27B1) ekspresyonunu da azaltabilirler. 1α -hidroksilaz, bağırsakta inorganik fosfat (Pi) emilimini uyaran biyolojik olarak aktif 1,25-dihidroksivitamin D3'ün (kalsitriol) sentezi için anahtar bir enzimdir. Bazolateral tarafta Klotho-FGFR kompleksi üzerinde hareket eden FGF23, distal kıvrımlı tübülün apikal membranında eksprese edilen TRPV5 kanalı yoluyla renal Ca^{2+} yeniden emilimini uyarır. Klotho-FGFR kompleksi, TRPV5 aracılı Ca^{2+} yeniden absorpsiyonu için Extrasellüler-sinyal-regülasyon kinaz 1/2 (Erk1/2), serum ve glukokortikoid ile indüklenebilir kinaz-1 (SGK-1)'i içeren sinyal kaskadlarını aktive edebilir. β -Klotho FGF15 ve FGF21 için

zorunlu bir yardımcı reseptör olarak enerji metabolizmasının düzenlenmesine katkıda bulunur. FGF15/19'un bağırsakta ekspresyonu safra asidi tarafından düzenlenir. γ Klotho, FGFR1b, FGFR1c, FGFR2c ve FGFR4 ile FGF19 aktivitesini artıran kompleksler oluşturur. γ Klotho, kahverengi yağ dokusunda ve gözde yüksek oranda eksprese edilir ve kültürlenmiş hücrelerde FGF19 için ek bir yardımcı reseptör olarak işlev görebilir. Bununla birlikte, γ -Klotho'nun biyolojik işlevi büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır (Kim ve ark., 2015). FGF23 formlarının COOH-terminal alanı α -Klotho ve FGFR 1, 3 ve 4'ün "c" izoformları ile üçüncül bir kompleks, FGF23-FGFR1c- α -Klotho cis kompleksi oluşturulduğunda maksimum hücresel sinyalleşmeye ulaşır. FGF23 esas olarak vücuttaki FGF23'ün ana kaynakları olan kemikteki osteositler ve osteoblastlar tarafından eksprese edilir. Sırayla FGF23/Klotho sinyali, ya D vitamini aktif form sentezine katılan 1- α -hidroksilaz enziminin ekspresyon seviyelerini inhibe ederek ya da vitamin D'nin inaktif kalsitroik aside kataliz eden başka bir enzim olan 24-hidroksilazı indükleyerek dolaşımdaki D vitamini seviyelerini azaltmaktadır. FGF23 ve Klotho sinyali, hücre proliferasyonunu uyararak ve apoptoz yoluyla vitamin D'nin neden olduğu hücre ölümünü önleyerek doku atrofisini önlemektedir. Bu sinyal, hem 1- α -hidroksilaz gen ekspresyonunun aşağı regülasyonuna hem de kaspaz aktivitesinin fosfoinositid-3 kinaz aracılı baskılanması yoluyla D vitamininin apoptotik etkilerinin azaltılmasında ikili rol oynamaktadır (Haussler ve ark., 2021). Esas olarak kemik hücreleri tarafından salgılanan FGF23, böbrekte bir hormon olarak görev yapmakta, fosfat atılımını uyarmakta ve 1,25(OH)2D3, aktif D vitamini oluşumunu baskılamaktadır. Bu etkiler, FGF23'ün FGF reseptörlerine (FGFR) bağlanma afinitesini artıran transmembran protein α -Klotho'ya bağımlıdır. Biriken kanıtlar, en azından kısmen IGF-1 ve Wnt/ β -katenin sinyalini inhibe ederek, bir tümör baskılayıcı olarak α -Klotho proteininin önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Paratiroid bezlerinde, FGF23, paratiroid hormonunun (PTH) üretimini ve salgılanmasını azaltmaktadır (Ben-Dov ve ark., 2007). FGF23, PTH ve 1,25(OH)2D3'ü içeren ve fosfat ve D vitamini metabolizmasını düzenleyen ve ayrıca Ca^{2+} üzerinde etkili olan bir hormondur (Blau ve Collins, 2015). Fonksiyonel D vitamini reseptöründen yoksun farelerde 1,25(OH)2D3 sinyalinin ablasyonunun $Kl^{-/-}$ farelerde erken yaşlanma fenotipini önlediği gösterilmiştir (Anour ve ark., 2012).

1.25.4. Hücre İçi Klotho Proteini

Plazma zarında bulunmayan Klotho hücre içi organellerde $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ile fiziksel olarak etkileşime girmektedir. Yaşlanmanın, retinoik asitle indüklenebilir gen-I' (RIG-I)'in aracılık ettiği IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin artan ekspresyonu ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Son zamanlarda, Hücre içi Klotho'nun, ancak salgılanmayan Klotho'nun, RIG-I'i bağladığı ve onun multimerizasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir. Klotho, RIG-I aracılı yaşlanma ile ilişkili iltihabı baskılamakta, bu da Klotho'nun hücre içi bir anti-inflamatuvar ve yaşlanma karşıtı faktör olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Klotho immünoreaktivitesinin çoğu sitoplazmada çeşitli dokularda saptanabilir olmasına rağmen, hücre içi Klotho'nun fizyolojik rolleri büyük ölçüde bilinmemektedir (Kim ve ark., 2015). Hipotalamus beynin tabanında ve optik sinir kiazmasının üzerinde bulunmaktadır. Gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) ve büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) dahil olmak üzere hipotalamik nöroendokrin hücreler tarafından salgılanan çeşitli hormonlar aracılığıyla hipofiz fonksiyonunu düzenlemektedir. GnRH salınımı, GnRH nöronları tarafından düzenlenmektedir (Xie ve ark., 2021). Klotho protein eksikliği olan fareler, esas olarak FSH ve LH'nin azalması, foliküler arrest, gonadal atrofi ve infertilite ile kendini gösteren hipotalamik-hipofiz-over ekseninde fonksiyon bozukluğu sergilemiştir (Toyama ve ark., 2006). β -Klotho geninin düşük ekspresyonu FGF21/ β -Klotho/FGFR1 kompleksini inhibe ederek hipotalamus-hipofiz-over ekseninde işlev bozukluğuna yol açmaktadır (Bookout ve ark., 2013). IGF-1, Growth hormon (GH) sekresyonunun negatif düzenleyicisidir. Adenohipofizde Klotho'nun IGF-1 sinyal yolunu inhibe ederek GH sentezini ve salgılanmasını arttırabilir. Çok sayıda çalışma, GH'nin yumurtalığın FSH'ye duyarlılığını artırabileceğini, mitokondriyal aktiviteyi ve hücre içi kalsiyum homeostazını düzenleyebileceğini ve foliküler gelişim sırasında çeşitli faktörlerdeki ilişkiyi koordine edebileceğini göstermiştir. Dolayısıyla bu, Klotho'nun adenohipofizde GH salgılanmasını teşvik ederek ovaryum tepkisini ve oosit kalitesini düzenlemede dolaylı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Açlık durumunda FGF21 ifadesi gözlenmiştir ve bu gen, Kisspeptin-GnRH-LH'nin nöroendokrin eksenini inhibe ederek anovülasyon ve infertiliteye yol açmaktadır.

Klotho gen ifadesi olmayan dişi farelerde, FGF21 geninin aşırı ekspresyonunda FGF21/ β -Klotho/FGFR1 kompleksi yıkılmaktadır. Klotho gen ifadesi azalmış olan farelerin, FSH ve LH'ları azalmaktadır. Bu farelerde foliküler arrest, gonadal atrofi, infertilite ve hipotalamik-hipofiz-ovaryum ekseninde fonksiyon bozukluğu görülmektedir. Klotho, FGF21/ β -Klotho/FGFR1 kompleksi yoluyla GnRH sekresyonunun düzenlenmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Siklofosamid ile indüklenen POF fare modellerinde, granüloza hücrelerinde Klotho ekspresyonu, yabanıl tip farelerdekinden önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, ROS'un fazlalığı foliküler atrezi, oosit kalitesinde azalma ve over yaşlanmasına yol açmaktadır. PI3K/Akt sinyal yolu, oosit büyümesi ve foliküler gelişiminde rol oynamaktadır (Xie ve ark., 2021). Liu, T. ve ark., 2019'da yaptıkları bir çalışmada, siklofosfaminin farelerin ovaryum granüloza hücrelerinde α -Klotho geninin ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Daha sonra normal yabanıl tip farelerde α -Klotho geninin susturulmasının POF'a yol açıp açmadığı incelenmiştir. Homozigot Klotho gen nakavtı olan dişi farelerin üreme sistemi üzerinde ayrıntılı araştırmalar yapmışlardır. Bu araştırma sonucunda, ovaryumdaki atretik folikül sayısı önemli ölçüde artarken, normal folikül sayısı azalmıştır. Bu çalışmada, Klotho mutant olan farelerin önemli ölçüde foliküler atrezi ve ovaryum yetmezliği sergilediği ve fenotiplerinin POF'a oldukça benzer olduğu gösterilmiştir. Klotho gen ekspresyonunun azalması ile oluşan ovaryum yetmezliği ve POF gelişimi, büyük ölçüde fare ovaryum granüloza hücrelerinde otofaji fonksiyon bozukluğunun olması ve yumurtalığın azaltılmış kapasitesinden kaynaklandığı bir dizi deneyle gösterilmiştir (Liu ve ark., 2019). Kim, E. H. ve ark., 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada yaşlanma karşıtı ajan olan Klotho proteininin, Wnt sinyali ile yakından ilişkili olması nedeniyle ve antioksidan aktivitesi ile üreme sistemini de etkilediğini göstermişlerdir (Kim ve ark., 2020). Wnt / β -katenin sinyal yolağı, foliküler gelişim, granüloza hücre büyümesi ve oosit olgunlaşmasında çok önemli bir rol oynayan evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş, karmaşık ve kritik bir hücresel sinyal yolağıdır (Xu ve ark., 2020). Klotho geni İnsülin/IGF-1, FGF ve Wnt sinyal yollarını inhibe etmektedir (Mao ve ark., 2018). Kim, E. H. ve ark., 2020 yılında yaptıkları çalışmada Klotho proteini tarafından Wnt sinyal yolunun inhibisyonunun domuz oositleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmektedir. Yapılan bu

çalışmanın sonucunda Wnt sinyal yolağının Klotho proteinini tarafından baskılandığı ve aktivatör olan lityum klorür (LiCl) tarafından etkinleştirildiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2020). Forkhead Transkripsiyon Faktör Ailesi-3 (FOXO3), hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve oksidatif stresi düzenleyebilen AKT (Protein Kinase B)'in aşağı akış hedefini oluşturmaktadır (Xie ve ark., 2021). Yamamoto, M. ve ark., 2005 ve Jin, J. ve ark., 2016 yıllarında yaptıkları çalışmalarda, PI3K /AKT sinyal yolağının Klotho proteini tarafından inhibisyonunun FOXO'yu aktive edebileceği ve aktif olan FOXO'nun Manganezyum Süperoksit Dismutaz (MnSOD) seviyesini arttırdığı ve oksidasyon antioksidan dengesini korumak için ROS seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Klotho gen ifadesinin olmaması, Fosfatidilinositol-3-Kinaz/Protein Kinaz B (PI3K/Akt) sinyal yoluyla FOXO3'ün zayıflamasına neden olmaktadır ve sonunda Erken Ovaryum Yetmezliği (POF-Premature Ovarian Failure-)'ne katkıda bulunan oksidasyon ve antioksidan sistemin dengesini bozmaktadır. Otofaji hücrel bir katabolizma yoludur ve lizozomların bozulması, proteinlerin ve organellerin geri dönüşümü yoluyla yaşlanma karşıtı süreçlerde anahtar bir rol oynamaktadır. Liu T. ve ark., 2019 yılında yaptıkları çalışmalarda Dönüştürücü Büyüme Faktörü β (TGF- β) / Smad sinyal yolunun, POF'daki otofajik bozukluğun potansiyel bir mekanizması olduğunu göstermişlerdir. TGF- β /Smad sinyal yolu, granüloza hücrelerinin farklılaşmasını ve apoptozunu düzenlemektedir. Buna ek olarak TGF- β / Smad sinyal yolu, folikül ve ovulasyon gelişimini engelleyebilmektedir. Yapılan bu çalışmada POF fare modelinde Klotho geninin ifadesinin azalması, TGF- β /Smad sinyal yolunu aktive ederek granüloza hücrelerinde Lc3 ve Beclin1 gibi otofaji ile ilgili faktörleri aşağı doğru düzenlemektedir. Ovaryumdaki Klotho gen ifadesinin azalması POF için bir risk faktörü olabilmektedir (Liu ve ark., 2019). Lojkin, I. ve ark., 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada insan ovaryum epitel hücrelerinde Klotho geninin, tümör baskılayıcı rolü olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada kontrol grubu olan normal over hücre hattında Klotho geni, yüksek oranda eksprese edilirken müllerian kanserlerinin %40'ında Klotho geninin ekspresyonu azalmaktadır (Lojkin ve ark., 2015). Bookout ve ark., 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, Klotho geninin dişi Hipotalamus-Hipofiz-Ovaryum ekseninde ifade edildiğini göstermişlerdir. Kuro-o, M. ve ark., 1997 yılında yaptığı bir çalışmada hayvan modellerinde, Klotho gen ifadesinin

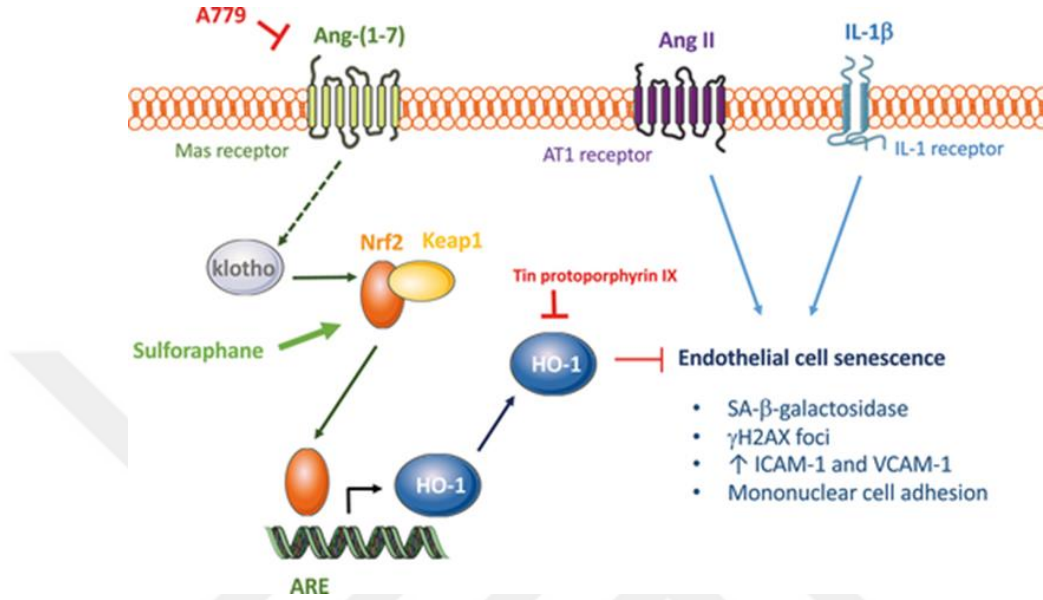
yetersiz olduğu farelerin üreme organlarında atrofik değişiklikler görülmüştür (Kuro-o ve ark., 1997). Bu çalışmalar ışığında Klotho geninin gonadal eksenin normal işlevini sürdürmede çok önemli bir rol oynadığını ve anormal ekspresyonunun üreme işlevini etkileyebileceğini göstermektedir. IGF-1, büyüme hormonu (GH)'ın salgılanmasının negatif düzenleyicisidir (Xie ve ark., 2021). Shahmoon ve ark., 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, Klotho geninin IGF-1 sinyal yolağının etkili bir inhibitörü olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle adenohipofizde Klotho geninin IGF-1 sinyal yolunu inhibe ederek GH'nın sentezini ve salgılanmasını teşvik edebileceği düşünülebilir (Xie ve ark., 2021). Weall ve ark., 2015'te yaptıkları bir çalışmada, GH'nin ovaryumun FSH'ye duyarlılığını arttırabileceğini, mitokondriyal aktiviteyi ve hücre içi kalsiyum homeostazını düzenleyebileceğini ve foliküler gelişim sırasında çeşitli faktörler arasındaki ilişkiyi koordine edebileceğini göstermişlerdir. Bundan dolayı Klotho geninin adenohipofizde GH salgılanmasını teşvik ederek ovaryum tepkisini ve oosit kalitesini düzenlemede dolaylı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Weall ve ark., 2015).

1.25.5. Klotho Eksikliği Kök Hücre Yaşlanmasına ve Tükenmesine Neden Olur

Bir Wnt sinyal antagonisti olarak Klotho proteini, miyojenik kök hücreleri koruyabilir, kas onarımını iyileştirebilir ve fibrozu baskılayabilir. Bu nedenle Klotho, kas rejenerasyonu ve kas distrofileri için umut verici bir terapötik hedef olabilir. Klotho eksikliği, kök hücrelerin yaşlanmasına ve tükenmesine katkıda bulunan Wnt ekspresyonunu ve aktivitesini tetikler ve sonuç olarak doku atrofisi ve fibrozis oluşur. Buna karşılık, Klotho proteininin Wnt sinyal iletimini baskıladığı ve hücre yaşlanmasını engellediği ve kök hücreleri koruduğu gösterilmiştir. Yetişkin dokulardaki kök hücreler çevresel değişikliklere uyum sağlama, komşu hücrelerin çoğalmasını etkileme ve sonuç olarak doku bakımı ve yenilenmesine sağlamaktadır. Yaşlanma, kök hücre yenilenmesini ve çoğalmasını engellemektedir. Kök hücrelerin yetişkin dokularında kendini yenileme, çoğalma, farklılaşma ve yer değiştirme kapasitesine müdahale eden herhangi bir faktör

yaşlanmayı hızlandırabilir. Bu nedenle kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin işlevsizliği ve tükenmesi yaşlanmaya katkıda bulunmaktadır. Klotho eksikliği olan farelerde yaşlanma ile ilgili bazı özellikler, kök hücrelerin yaşlanması, tükenmesi, fibrozu oluşturması ve kök hücrelerin farklılaşmasından kaynaklanabileceği gösterilmiştir (Bian ve ark., 2015). Klotho ayrıca inflamasyonun regülasyonunda da rol oynamaktadır. Yamamoto ve arkadaşları, hücre yüzeyine bağlı Klotho'nun FOXO3a fosforilasyonunu inhibe ettiğini ve nükleer translokasyonunu arttırdığını belirlemişlerdir. (Donate ve ark., 2015). Beclin 1 / Bcl-2 kompleks bağımlı otofaji aktivitesi, iskemi-reperfüzyon hasarına karşı böbrek duyarlılığını düzenleyebilir. Becn1 geni tarafından kodlanan Beclin 1 proteini, memeli hücrelerinde otofajinin merkezi düzenleyicisidir. Beclin 1, otofagozomlar oluşturmak üzere sitoplazmik materyali içine alan çift membranlı bir yapı olan izolasyon zarının oluşumunu uyaran bir lipid kinaz kompleksinin parçası olarak otofajinin başlangıç aşamasında etki edebilir. Klotho'nun renoprotektif etkisi, kısmen beclin 1/Bcl-2 kompleksinin ayrılmasını tetiklemesi ve otofajinin aktivasyonu ile gerçekleşir. Otofaji, hücrel bileşenleri parçalayarak ve geri dönüştürerek hücrel homeostazın korunması için gereklidir. Antiapoptotik protein Bcl-2, beclin 1 ile etkileşime girerek otofajiyi inhibe etmektedir. Beclin1'in, besin açlığı ve oksidatif stres gibi hücrel zorluklara karşısında aktivasyonu üzerine, beclin1, otofagozomların indüklenmesine ve toplanmasına için beclin 1/Bcl-2 kompleksinden ayrılır. Beclin1 gen ekspresyon seviyesinin azalması veya beclin1/Bcl-2 kompleksinin stabilizasyonu, otofaji aktivitesini engelleyen ve çeşitli hastalıklarla ilişkili olan beclin 1 aktivitesini azaltmaktadır. Bu çalışma sadece çözünür Klotho'nun böbrek hasarına karşı yeniden korunmasını doğrulamakla kalmamış, aynı zamanda Klotho'nun negatif düzenleyici beclin 1 / Bcl-2 kompleksini bozarak ve daha fazla beclin 1 proteini salgılayarak otofaji aktivitesini yukarı regüle ettiği gösterilmiştir. Klotho tarafından beclin 1/Bcl-2 kompleks ayrışmasının moleküler mekanizmaları hala çözümlenmeyi beklemektedir (Li ve ark., 2020). Bugüne kadar diğer sistemik hastalıklarda Klotho geni üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, kadın üreme sistemindeki Klotho geninin ekspresyonu ve düzenlenmesi ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. NRF2 inhibitörü ile birlikte uygulanması, Klotho geninin antioksidan ve anti-apoptozis etkilerini önemli ölçüde ortadan kaldırmıştır. Bu sonuçlar NRF2'nin

Klotho tarafından sağlanan korumanın aşağı akış efektörü olduğunu ve Klotho-NRF2 yolunun oksidatif strese karşı savaşmak için ortak bir mekanizma olabileceğini göstermektedir (Xing ve ark., 2021). (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Endotel hücrelerinde anjiyotensin-(1-7)'nin yaşlanma karşıtı mekanizması (Romero ve ark., 2019).

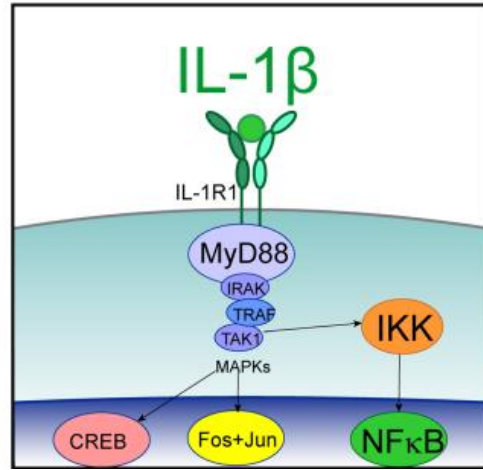
1.26. İNTERLÖKİN-1β

IL-1β proinflamatuvar aktivitelere sahip oldukları ve çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin salgılanmasını arttırabildikleri için en önemli proinflamatuvar sitokindir. IL-1β, iltihapla ilişkili hastalıklarda rol alması nedeniyle büyük ilgi gören IL-1 ailesinin önemli bir üyesidir. IL-1β, sitokinler ve kemokinler gibi çeşitli proinflamatuvar aracılara indükleyen güçlü proinflamatuvar aktiviteye sahiptir. IL-1β sinyali akut faz yanıtı, hipotansiyon, vazodilatasyon ve ateşe yol açmaktadır. Anormal IL-1β sinyal iletiminin, Ailesel Akdeniz Ateşi gibi kalıtsal otoinflamatuvar bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tip 2 diyabet, gut ve kardiyovasküler hastalıklar gibi yaygın hastalıklarla da ilişkilidir (Wakita ve ark., 2016). IL-6 ve çözünür reseptörünün bağlanması, sırayla, IL-1β kaynaklı proteoglikan katabolizmasını teşvik edebilir. IL-1β'nin insan AFC (anulus fibrosus hücreleri)'lerinde kritik bir kemokin çeken monosit olan CCL2'nin üretimini

indüklediği bulunmuştur (Gruber ve ark., 2015). Mukopolisakkaridoz IIIA, beyinde biriken heparan sülfat ve diğer substratlarla karakterize edilen nöronopatik bir lizozomal depo hastalığıdır. Hastalarda nöroinflamasyon ve anormal substrat birikiminin olası bir sonucu olarak davranış bozuklukları ve bilişsel gerileme görülmektedir. IL-1 β bağışıklık hücreleri tarafından üretilen ancak beyindeki glia ve nöronlar tarafından da sentezlenebilen önemli bir proinflamatuvar sitokindir. TLR4'ün HS (heparan sulphate) gibi substratlar tarafından bağışıklık hücreleri üzerindeki aktivasyonu, hücre içinde depolanan olgunlaşmamış pro-IL1 β 'nin ifadesine yol açabilir. Bununla birlikte, olgun, aktif IL-1 β 'nin bölünmesini ve salınmasını sağlamak için NLRP3 ve proteaz kaspaz-1 gibi inflamasyon ile ilgili kompleksleri aktive eden ikincil bir inflamasyonu uyaran faktör gereklidir (Parker ve ark., 2020).

1.26.1. IL-1 β ve Yaşlanma

Yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidaz (SA- β -Gal), hücre yaşlanmasının güvenilir bir belirteçidir. Hücresel yaşlanma iki farklı türe ayrılabilir: stres kaynaklı erken yaşlanma ve replikatif yaşlanma. IL-1 stres kaynaklı erken yaşlanmada rol oynamaktadır. Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, IL-1 β ile uyarılan nucleus pulposus hücrelerinde β -galaktozidazın önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır (Yang ve ark., 2019). IL-1 β ile uyarılan kondrosit hücrelerinde artan SA- β -Gal aktivitesi, değişmiş hücresel morfoloji, hücre büyümesinin durması ve telomer erozyonu gibi yaşlanan hücrelerin fenotiplerini sergilediği bildirilmiştir (Dai ve ark., 2006). Yaşlanma sürecinde İnsan fibroblastlarında IL-1 ekspresyonu artmaktadır ancak yaşlanma tepkisindeki fonksiyonel rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. IL-1 α , IL-1R sinyal yoluyla yaşlanmayla ilişkili IL-6/IL-8 salgısını uyarmaktadır. İnterlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz 1 (IRAK1), IL-1/IL-1R sinyal yolunun önemli bir bileşenidir. IL-1, IL-1R'yi bağladığında, IRAK1, IRAK4 tarafından uyarılır. IRAK4 daha sonra ek faktörleri toplayan veya aktive eden IRAK1'i fosforile eder ve sonuçta NF- κ B'nin nükleer translokasyonuna neden olur (Şekil 1.10). NF- κ B, IL-6 ve IL-8 dahil olmak üzere çeşitli genleri aktive eder (Orjalo ve ark., 2009).



Şekil 1.10. IL-1 β sinyalizasyon (Mesquida ve ark., 2019).

1.27. İNTERLÖKİN-6

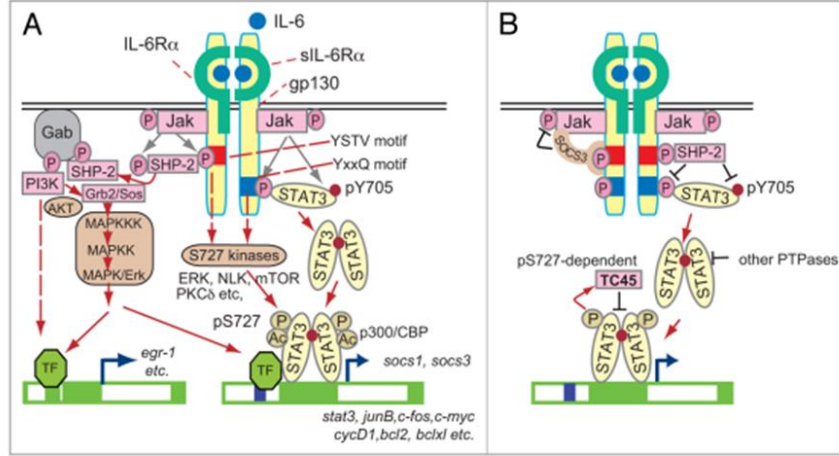
IL-6 geni, iki potansiyel N-glikosilasyon bölgesi ve dört sistein tortusu ile 184 amino asitten oluşur; çekirdek proteini, yaklaşık 20 kDa'dır ve glikozilasyon, IL-6'nın 21- ila 26-kDa boyutundan sorumludur. Sitokinler immün yanıtlarda hücreden hücreye iletişime yardımcı olan çözünür araçlardır ve interlökin-6 (IL-6), pleiotropik aktiviteye sahip prototipik bir sitokindir. IL-6 aracılı sinyal transdüksiyon sisteminin tam olarak aydınlatılması, sitokinlerin karakteristik özellikleri için moleküler bir temel sağlamıştır. Enfeksiyonlar veya yaralanmalara bağlı doku hasarı veya iltihaplanma meydana geldiğinde, IL-6 sentezi anında indüklenir ve akut faz immün reaksiyonlarının ve hematopoezin uyarılması yoluyla konak savunmasına katkıda bulunur. Sitokinler, bağışıklık yanıtlarında hücreden hücreye iletişime yardımcı olan çözünür araçlardır. Bunlar arasında IFN'ler, kemokinler, lenfokinler, interlökinler, TGF- β , koloni uyarıcı faktörler (CSF) ve TNF bulunur. İnterlökinler, öncelikle lökositler üzerinde etkili olan sitokinlerdir. Bugüne kadar yaklaşık 40 interlökin tanımlanmıştır. IL-6'nın geçici ifadesi, akut faz immün tepkisini ve hematopoezi uyarak enfeksiyonlara ve doku yaralanmalarına karşı konak savunmasına katkıda bulunmaktadır. IL-6 üretimi, doku homeostazı tekrar oluştuğunda sonlanır. Bununla birlikte, farklı hücre popülasyonları tarafından düzensiz aralıksız IL-6 üretimi, çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. IL-6'nın sentezi, transkripsiyonel olarak ve transkripsiyon sonrası olarak sıkı bir şekilde düzenlenir. Bununla birlikte, IL-6'nın

düzensiz sürekli sentezi, otoimmün ve kronik enflamatuvar hastalıklar ve kanserler dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişiminde rol oynamaktadır. Yanıklar ve travmaların neden olduğu enfeksiyonlara veya doku yaralanmalarına yanıt olarak, IL-6 anında sentezlenerek akut bir bağışıklık tepkisini aktive eder. IL-6, aktive edilmiş B hücrelerinin immünoglobulin üreten plazma hücrelerine farklılaşmasını indükler ve hibridoma ve miyelom hücreleri için bir büyüme faktörü görevi görür. IL-6, B hücrelerine ek olarak, CD4 + T hücrelerinin efektör T hücresi alt kümelerine spesifik farklılaşmasını indükleyerek T hücrelerini de etkiler (Tanaka ve Kishimoto, 2014).

1.27.1. IL-6 Sinyal Yolu

Sitokinler, bağışıklık yanıtlarında hücreler arası iletişime aracılık etmektedir (Tanaka ve Kishimoto, 2014). IL-6, iki IL-6R α , zincirinden (IL-6R α veya CD126 olarak da bilinir) ve gp130 (IL-6R β veya CD130 olarak da bilinir) iki farklı sinyal üreten β zincir alt biriminden oluşan spesifik bir IL-6 reseptörü (IL6R) kompleksine bağlanarak dimer oluşturmaktadır. gp130 reseptör molekülü IL-6, onkostatın M, lösemi inhibe edici faktör, siliyer nörotrofik faktör ve IL-11 gibi IL-6 sitokin ailesi için çoklu reseptörlerin ortak bir bileşenidir. IL-6 ile etkileşime giren IL-6R α , başlıca hepatositlerde ve bazı T hücresi türleri, monositler/makrofajlar, aktive edilmiş B hücreleri ve nötrofiller gibi hematopoetik hücrelerde eksprese edilir. IL-6R α zincirlerinin çözünür izoformları, alternatif splayzing veya IL-6R α zincirinin dış bölgeye atılması ile üretilir (Tanaka ve Kishimoto, 2014). Çözünür IL-6R α (s IL-6R α), IL-6'ya bağlanarak ve IL-6 sinyali için gp130 ile bir kompleks oluşturarak IL-6R kompleksinin bir bileşeni olarak çalışabilir. IL-6'nın IL-6R α kompleksi ile etkileşimi üzerine, gp130 molekülleri dimerize olur ve gp130 ile ilişkili JAK familyası tirozin kinazlar (JAK1, JAK2 ve Tyk2), iki JAK'ı birbirini fosforile edecek kadar yaklaştırarak konformasyonel bir değişime uğrarlar ve aktif hale gelirler. Daha sonra aktive edilmiş JAK kinazları, aşağı akış sinyal iletim yollarının aktivasyonu için gerekli olan spesifik tirozin kalıntıları gp130'un sitoplazmik alanını fosforile eder. Src-homoloji 2 alan içeren protein tirozin fosfataz 2 (SHP2) gp130'da fosforile

edilmiş YSTV (pYSTV) motifine alınır ve JAK kinazları tarafından fosforile edilir ve aktive edilir bu da GRB2 ile ilişkili bağlayıcı protein (Gab) ailesi aracılığıyla hem Ras-Raf-ERK1/2 yolunu hem de PI3K-AKT yolunu aktive etmektedir. Transkripsiyon 3 (STAT3) ve STAT1'in sinyal dönüştürücü ve aktivatörü gp130'da fosforile edilmiş YXXQ motiflerine alınırlar ve STAT3 için Y705 ve STAT1 için Y701 gibi kritik tirozin kalıntılarında JAK kinazlar tarafından fosforile edilirler. Aktive edilmiş STAT3 ve STAT1 birbirleriyle dimerleşerek STAT3 veya STAT1 homodimerleri ve STAT3/STAT1 heterodimerleri oluşturur. Bu aktive edilmiş STAT dimerleri çekirdeğe girer ve hedef genlerinin düzenleyici bölgelerindeki spesifik DNA dizilerine bağlanır. Kritik tirozin kalıntılarının fosforilasyonuna ek olarak hem STAT3 hem de STAT1 kullanılan uyarıcıya ve hücre tipine bağlı olarak çeşitli serin/treonin kinazlar tarafından karboksil-terminal alanında Ser727 üzerinde fosforile edilir (Kojima ve ark., 2013). Yang ve ark. STAT3'ün Lys140'ta dimetilasyonuna neden olan ve fosfo-Tyr705 seviyesini baskılayarak STAT3 aktivitesinin inhibisyonuna yol açan histon lizin metiltransferaz SET9'un alınması için çekirdekteki STAT3 Ser727 fosforilasyonunun gerekli olduğunu gösterdi (Yang ve ark., 2010). Bir inhibitör döngüye, gp130'un pYSTV motifine katılan ve JAK kinazları tarafından tirozin kalıntıları üzerinde fosforile edilen SHP2 aracılık eder. SHP2'nin STAT3'e yönelik tirozin fosfataz aktivitesi, tirozin fosforilasyonundan sonra artar ve ardından STAT3 aktivitesini sınırlar. Başka bir inhibe edici döngüye SOCS3 aracılık eder. SOCS3 mRNA hem STAT3 hem de STAT1 tarafından hızla indüklenir ve SOCS3 proteini, SH2 alanı yoluyla gp130 pYSTV motifi ile etkileşime girer ve kinaz inhibe edici bölgesi (KIR) yoluyla JAK aktivitesini inhibe eder, böylece daha fazla STAT3 aktivasyonunu kısıtlar (Kojima ve ark., 2013). (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. IL-6 reseptör sistemi ve sinyal yolları (Kojima ve ark., 2013).

1.27.2. IL-6 Sentezinin Düzenlenmesi

IL-6, hücre çoğalmasını, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen çok işlevli bir sitokindir. IL-6, genellikle inflamasyon, kronik bağışıklık hastalıkları, dokuya sızan tümörler, nörolojik hastalıklar ve doku yaşlanması ile ilişkili çeşitli hastalıkların patogenezinde yer almaktadır. Çünkü IL-6 ve IL-6Rα zincirinin çözünür bir formu inflamasyon, yaşlanma ve tümör infiltrasyonu olan dokularda bol miktarda salgılanmaktadır (Kojima ve ark., 2013). IL-6, enfeksiyonlar veya doku yaralanmaları oluştuğunda anında sentezlenir ve konakçıya uyarı sinyali verir. Patojen ilişkili moleküler modeller olarak bilinen ekzojen patojenler, monositler ve makrofajlar gibi doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin patojen tanıma reseptörleri tarafından enfekte lezyonda tanınırken, hasarlı veya ölmekte olan hücreler, bulaşıcı olmayan bir bağlamda bağışıklık tepkisini başlatabilir ve sürdürebilir. Bağışıklık hücrelerine ek olarak, diğer IL-6 kaynakları arasında mezenkimal hücreler, endotelial hücreler, fibroblastlar ve tümör hücreleri de dahil olmak üzere birçok başka hücrelerde bulunabilir. IL-6 sentezi hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel olarak sıkı bir şekilde düzenlenir ve bir dizi transkripsiyon faktörü, IL-6 ekspresyonunu düzenleyebilir (Masuda ve ark., 2013).

1.27.3. Erken Yaşlanmada IL-6'nın Rolü

IL-6, diğer sitokinler gibi ön hipofiz bezinin işlevinde, büyümesinde ve nöroendokrin yanıtlarında önemli rol oynar. Sitokinler, enfeksiyon, kanser ve iltihaplanma sırasında hücresel proliferasyonu, farklılaşmayı ve hayatta kalma veya ölümü düzenlemektedir (Sapochnik ve ark., 2017). Hem IL-6 hem de çözünür IL-6R α zincirlerinin enfeksiyon, iltihaplanma ve yaşlanma sırasında çeşitli dokularda yeterli konsantrasyonlarda üretilmektedir. IL-6R kompleksinin bir sinyal ileten reseptörü gp130'un çoğu hücrede ifade edilmektedir. sIL-6R α , IL-6'ya bağlanarak gp130 ile bir kompleks oluşturarak IL-6R kompleksinin bir bileşeni olarak çalışabilir. IL-6'nın IL-6R α kompleksi ile etkileşimi üzerine, gp130 molekülleri dimerize olur ve gp130 ile ilişkili JAK familyası tirozin kinazlar (JAK1, JAK2 ve Tyk2), iki JAK'ı birbirini fosforile edecek kadar yaklaştırarak konformasyonel bir değişime uğrar ve aktifleşir. Daha sonra aktive edilmiş JAK kinazları, aşağı akış sinyal iletim yollarının aktivasyonu için gerekli olan spesifik tirozin kalıntılarında gp130'un sitoplazmik alanını fosforile etmektedir (Kojima ve ark., 2013). IL-6 ve diğer SASP faktörlerinin rolü, tümörijenizi ve hücre proliferasyonunu destekleyebilir, ancak aynı zamanda tümör baskılayıcı fonksiyonlar uygulayabilir ve bir bağışıklık tepkisini tetikleyerek tümör hücresi temizlenmesini ve kanser gerilemesini destekleyebilir (Sapochnik ve ark., 2017). Parakrin mitojenik etkisinin yanı sıra, IL-6'nın bir otokrin geri besleme döngüsünde hücre döngüsü durmasını tetikleyerek yaşlanma sürecine aktif olarak katkıda bulunmaktadır (Kuilman ve ark., 2008). IL-6 gen ifadesinin azalması, enflamatuvar ağın çökmesi ile yaşlanma oluşumunu ortadan kaldırır (Sapochnik ve ark., 2017).

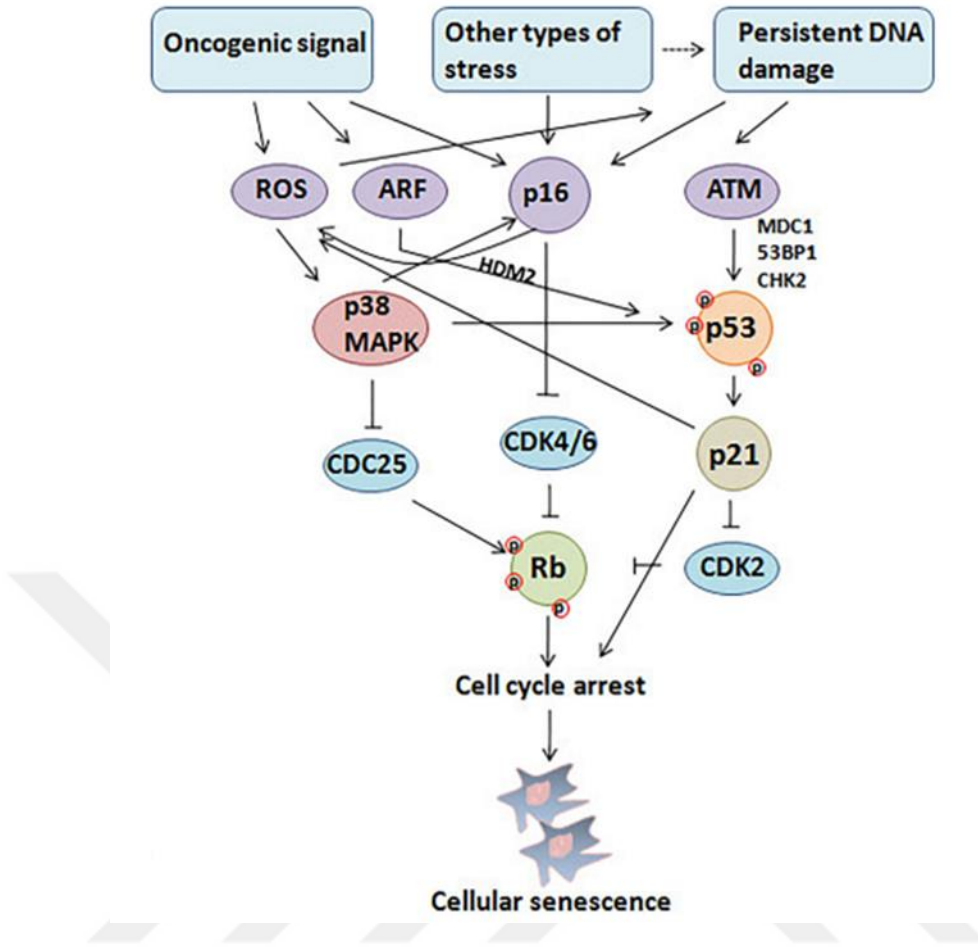
1.28. p53 Geni

P53 proteini, insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı gen olan TP53 geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür. P53, hücre döngüsü sürecini ve programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) kontrol eden bu gen DNA hasarı, besin eksikliği ve hipoksi gibi çeşitli hücresel strese hücrenin tepkisini

belirlemede çok önemli bir rol oynamaktadır. Genel olarak, bir hücrede P53, Fare çift dakika 2 homolog proteini (MDM2) tarafından sürekli olarak bozulduğu için hücre içinde yetersiz miktarlarda bulunan kararsız bir proteindir. TP53, diğer üyeleri TP63 ve TP73'ü içeren geniş bir gen ailesine aittir. TP53, embriyogenezde rol oynayan homologları TP63 ve TP73 tarafından gösterilmeyen benzersiz bir özellik olan tümör baskılayıcı aktiviteler sergilemek üzere evrimleşmiştir. P53, DNA hasarı yanıtında merkezi bir rol oynamakta ve "Genomun Koruyucusu" olarak kabul edilmektedir. DNA hasar yanıtı, stres sinyalinin doğasına, hücre tipine, zamanlamasına ve stres sinyalinin yoğunluğuna bağlıdır. DNA hasarına yanıt olarak, P53 hücre döngüsünün durmasını aktive edebilir, hasarlı DNA'yı onarabilir, spesifik hücre ölüm yollarını ve hücredeki metabolik değişiklikleri aktive edebilir. ATM serin/treonin kinaz (ATM) veya ATR serin/treonin kinaz (ATR) gibi DNA hasar kinazları, çeşitli proteinleri fosforile etmektedir. Bir hücre döngüsünde G1'den S fazına ilerlemek için, aktif G1 siklin / CDK kompleksleri (Sikline bağımlı kinaz) gereklidir. Aktive edilmiş P21, siklin D / CDK4 ve siklin E / CDK2 kompleksini inhibe ederek S fazının başlangıcı için gerekli olan protein substratlarının fosforilasyonunu bloke etmektedir. Siklin/CDK kompleksleri, tümör baskılayıcı RB transkripsiyonel ortak baskılayıcı 1'in (RB1) fosforilasyonu ile E2F'nin transkripsiyon faktörlerinden ayrışmasına ve DNA sentezinin ilerlemesine neden olmaktadır. P53 tarafından indüklenen P21, RB proteininin fosforilasyonunu inhibe ederek hücre döngüsünü bloke edebilir. 14-3-3 fosfoserin/fosfotreonin bağlayıcı proteinlerin (14-3-3 σ) ekspresyonunun P53 aracılı transkripsiyonel yukarı regülasyonu da hücre döngüsünün durmasında rol oynamaktadır. DNA'da hasarında, fosforile edilmiş P53 geni 14-3-3 σ transkripsiyon başlangıç bölgesinin 1.8 kb yukarısındaki promotör bölgesine bağlanır ve bu da 14-3-3 σ ekspresyonunun artmasına yol açarak CDK1/Siklin B'nin ayrılmasına neden olmaktadır ve hücre bölünmesi kontrol proteini 2 homologu (CDC2) CDK1 ile etkileşimi ve hücrenin mitozaya girişini bloke ederek DNA onarımında zaman kazandırmaktadır (Feroz ve Sheikh, 2020). p53 tümörün baskılanmasında önemli bir rol oynayan yaşlanmanın ana düzenleyicisidir, ancak aynı zamanda bir enflamatuar yanıtı indükleyerek kanser gelişiminde de rol oynayabilir (Vigneron ve Vousden 2010).

1.28.1. Hücresel Yaşlanma ve P53 İlişkisi

p53 bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmekte ve promotör bölgelerini ve intronik bölgeleri bağlayarak alternatif transkripsiyonu teşvik ederek veya TATA kutusu bağlayıcı protein gibi koaktivatörlerle etkileşime girerek spesifik hedef genlerin ekspresyonunu yukarı veya aşağı regüle etmektedir (Mijit ve ark., 2020). P53 geni tarafından indüklenen hücresel yaşlanma ve onkojen aktivasyonu oksidatif hasarı olan hücrelerde olduğu kadar telomer kısalmasının görüldüğü hücrelerde de meydana gelmektedir. Hücresel yaşlanmada, sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri P21 CIP1 (CDKN1A) ve P16 INK4A'nın (CDKN2A) P53 geninin transkripsiyonel aktivasyonuna aracılık edebilir, ancak tek başına yeterli değildir. Stres dinamikleri yaşlanmayı etkileyebilir. Yaşlanmayı başlatan stres geçiciyse, P53 indüksiyonu sakin bir durumda kalabilir ve DNA onarım sürecini etkinleştirebilir ve stres çözüldükten sonra hücresel döngü başlayabilir. Kalıcı stres veya uzun süreli P21 aracılı hücre döngüsü durması, bir CDK4 ve CDK6 inhibitörü olan P16INK4A'yı ve ardından retinoblastoma (RB1) transkripsiyonel düzenleyiciyi aktive ederek uzun süreli hücre döngüsü durmasına neden olabilir. (Feroz ve Sheikh, 2020). (Şekil1.12). Düşük düzeyde hücresel stres koşullarında ve DNA hasarı onarım sürecinde P53 geçici olarak hücresel döngünün durmasını tetikler ve DNA onarım sürecini başlatır böylece onkojenik mutasyona uğramış hücrelerin çoğalmasını sınırlar (Feroz ve Sheikh, 2020).



Şekil 1.12. Yaşlanmanın tetikleyen ana efektör yolağı (Yang ve ark., 2021).

1.28.2. P53 Apoptoz İlişkisi

Apoptoz, hücre ölüm türüdür ve doku homeostazının sürdürülmesi, kanserin önlenmesi ve uygun embriyonik gelişim için gerekli olan birçok işleve sahip evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir. Apoptoz, Sistein aspartik proteazların (Kaspazlar) aktivasyonuna yol açar, bu da hücre içi bileşenlerin proteolitik olarak bozulmasının takiben hücre ve dokuların en az stresle fagositik olarak temizlenmesine neden olmaktadır. P53, sitoplazmada ve mitokondri zarında bulunan proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerle doğrudan etkileşime girebilir. Apoptoz ve hücre sağkalımı arasındaki karar hem transkripsiyona bağımlı hem de bağımsız bir şekilde P53 tarafından düzenlenen BCL-2 ailesinin üyelerine bağlıdır. Otofajide P53 hücrel stres altında tetiklenmektedir. P53'ün otofaji üzerindeki etkisi hücre içi lokalizasyonuna bağlı olabilir. Hücrel stres altında P53 çekirdeğe yer değiştirerek

otofajiyi aktive ederken, normal fizyolojik durumda sitoplazmik P53 otofajiyi inhibe etmektedir. Nükleer P53'ün aksine, sitoplazmik P53 proteini, AMP'ye bağlı kinazı (pozitif bir otofaji düzenleyicisi) inhibe eder ve mTOR'u aktive etmektedir (Feroz ve Sheikh, 2020). mTOR ROS tarafından aktive edilebilir bu nedenle p53'ün antioksidan aktiviteleri mTOR'un ve yaşlanmanın sönümlenmesini güçlendirebilir. mTOR inhibisyonuna verilen ana yanıtlardan biri besin yoksunluğunda hayatta kalmayı sağlayan otofajinin indüklenmesidir. Otofaji ve yaşlanma arasında birkaç olası bağlantı vardır. Otofajinin inhibisyonu, yaşlanmayı artırabilen protein agregatlarının, ER stresinin ve mitokondriyal disfonksiyonun birikmesine neden olmaktadır. p53'ün otofajiyi hem artırma hem de inhibe etme yeteneği yaşlanmanın modülasyonu için farklı bir mekanizma sağlamaktadır (Vigneron ve Vousden, 2010). Yaşlanma sırasında NQO1 ekspresyonunun yukarı regülasyonunun altında yatan mekanizma, NQO1'in hücresel yaşlanma fenotipini güçlendiren MDM2 ve ubiquitin bağımsız bir şekilde p53 birikimini arttırdığı belirlenmiştir. Spesifik olarak, NRF2/KEAP1 sinyalinin OIS sırasında NQO1 ifadesini düzenlediğini gösterilmiştir. Daha da önemlisi, NQO1'in tükenmesinin hücre transformasyonunu ve tümör oluşumunu kolaylaştırmaktadır bu da NQO1'in yaşlanma bariyerinde yer aldığını ve hücre transformasyonunda anti-onkojenik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Liu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada OIS durumunda, MDM2'nin aktivitesi DNA hasarı veya oksidatif stres tarafından inhibe edilerek p53 birikimine yol açmaktadır. NQO1'in erken yaşlanmada spesifik olarak p53 ile bağlandığı gösterilmiştir. NQO1'in OIS'nin oluşması sırasında p53 protein seviyesinin düzenlemesinde belirgin bir rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada sağlam bir yaşlanma bariyeri için MDM2 ubiquitin proteazom bozunma yolu ve ubiquitinden bağımsız p53 proteazomal bozunma yolunun gerekli olduğunu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2015).

1.29. GSK-3 β Geni

GSK-3 α ve GSK-3 β , memelilerde gözlemlenen GSK-3'ün iki izoformudur. Farklı genler tarafından kodlanan bu iki yakından ilişkili serin/treonin (ser/thr) kinaz

izoformu, protein kinaz B (Akt) aracılı fosforilasyon için substratları oluşturmaktadır (Li ve ark., 2013). Memeli hücrelerindeki iki izoform, % 85 yapısal benzerliğe olan GSK3 α (51 kDa) ve GSK3 β (47 kDa) kinaz alanları % 97 benzerlik göstermektedir (Martin ve ark., 2005). Kinaz alanlarında oldukça homolog olan ve diğer bölgelerde farklı olan bu proteinler, aktivitelerini, sırasıyla Ser21 ve Ser9 kalıntılarının, GSK-3 α (pGSK-3 α (Ser21)) ve GSK-3 β (pGSK-3 β (Ser9)) Akt aracılı fosforilasyonu ile negatif olarak düzenlenen yapısal olarak aktif kinazlardır (Li ve ark., 2013). Genel olarak GSK3'ün işlevleri tirozin kalıntılarının fosforilasyonuna (GSK3 α için Tyr279 ve GSK3 β için Tyr216) bağlıdır. GSK3 β , MAPK, ERK veya Akt gibi farklı kinazlar tarafından Ser9 üzerinden fosforilasyon yoluyla negatif olarak düzenlenebilir (Martin ve ark., 2005). GSK3 glikojen metabolizmasından sorumludur ve insülin sinyalinin aşağı akışında yer almaktadır. Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolağının GSK3 aktivasyonu ile hızla fosforile edilir ve inhibe edilir, glikojen birikimine katkıda bulunur. GSK3 α ve β yüksek düzeyde yapısal benzerliği paylaşır, GSK3 β null fareler geç embriyogenez sırasında kardiyak anormalliklerinden dolayı ölmektedir, ancak GSK3 α null fareler yüksek insülin duyarlılığı ile hayatta kalırlar. GSK3 aktivitesi için periferik kan mononükleer hücrelerinde IL-6, IL-1 β ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi birkaç proinflamatuvar sitokin üretiminin tam olarak uyarılması için gereklidir. GSK3 ve NF- κ B inhibisyonu proinflamatuvar sitokin seviyeleri azalmaktadır (Martin ve ark., 2005). Çalışmalar GSK3'ün NF- κ B'nin tam transkripsiyonel aktivitesi için gerekli olduğunu gösterse bile (Hoeflich K. P. 2000) GSK3, NF- κ B transkripsiyonel aktivitesini promotöre özgü bir şekilde arttırabilir, bu da GSK3'ün NF- κ B aracılı genlerin alt kümesini seçici olarak modüle ettiğini göstermektedir. TLR sinyali, PI3K/Akt sinyal yolu aracılığıyla GSK3 β 'nin fosforilasyonunu indükleyebilir. LPS ile uyarılan makrofajlarda IL-10 üretiminin artırılması sayesinde, NF- κ B, JNK, ERK ve P38 MAPK fosforilasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Liu ve ark., 2020). GSK-3'ün fosforilasyon aracılı inhibisyonu, Akt ile sınırlı değildir ve protein kinaz A (PKA) ve protein kinaz C (PKC) gibi diğer protein kinazlar da GSK-3'ü fosforile edebilir. Ayrıca, mTOR, Wnt ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağı gibi diğer GSK-3 düzenleyicileri de GSK-3 β düzenlemesinde rol oynamaktadır Bu inhibe edici fosforilasyona rağmen, GSK-3'ün protein fosfataz 2A (PP2A) ve protein fosfataz 1

(PP1) gibi protein fosfatazlar tarafından fosforilasyonunun yanı sıra GSK-3'ün tirozin kalıntılarındaki fosforilasyonu (Tyr279'da GSK3 α ve Tyr216'da GSK-3 β), nöronal dejenerasyon sırasında belirgin bir süreç olan GSK-3 aktivitesini artırabilir (Li ve ark., 2013).

1.29.1. GSK-3 β ve İnflamatuar Mekanizması

1.29.1.1. PI3K/Akt Sinyali Yolu

Fosfatidilinositid 3-kinaz (PI3K), insülinin glikojen metabolizması üzerindeki önemli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan bir lipid kinazdır. Bu kinaz yukarı akış aktivatörü Akt'dir (PKB) ve bu da ser9'un fosforilasyonu yoluyla GSK-3 β aktivitesini inhibe ederek glikojen sentazın fosforile edilmesine ve glikojen sentezinin başlatılmasına izin vermektedir. GSK-3 β 'nın PI3K / Akt sinyal yolağı ile inaktivasyonu, GSK-3 β 'nın Akt kaynaklı inhibisyonunun NF- κ B yolunu negatif olarak modüle ettiği gösterildiğinden, inflammatuar yolların düzenlenmesine de katılmaktadır (Martin ve ark., 2005).

1.29.1.2. NF- κ B Sinyali

GSK-3 β tarafından NF- κ B aktivasyonunun, çok önemli bir proinflammatuar yolak olduğu iyi gösterilmiştir (Beurel, 2011). GSK-3 β , NF- κ B'nin promotöre özgü alımını düzenler ve bu sayede gen transkripsiyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Steinbrecher ve ark., 2005). GSK-3 β inhibitörlerinin, NF- κ B'nin transkripsiyonel aktivasyonunu inhibe ederek TLR yolundaki inflammatuar sitokin üretimini azaltmaktadır (Choi ve ark., 2013).

1.29.1.3. β -Katenin Sinyali

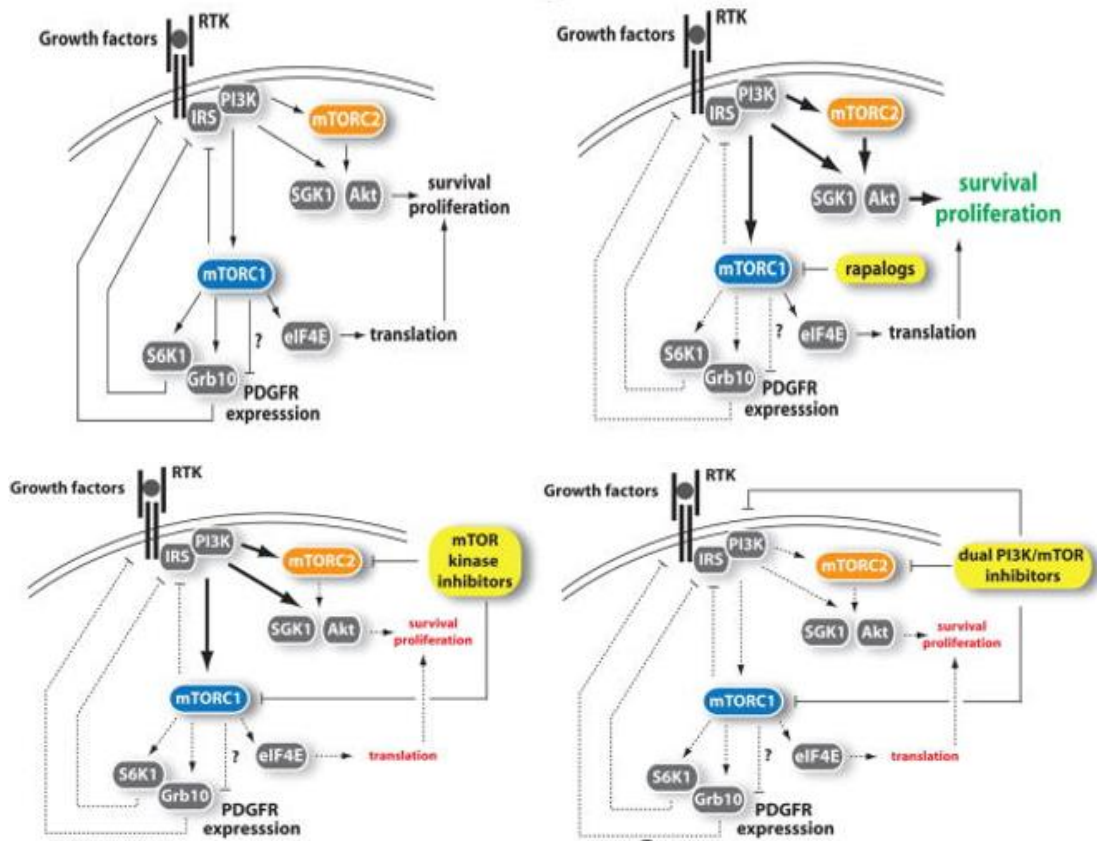
Beta-katenin, inflamatuvar süreçlere katılan ve GSK-3 β için substrat olan başka bir sinyal molekülüdür. Beta-katenin proteininin ikili bir işlevi vardır, bir yandan hücre-hücre adezyonu ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesine katılırken, diğer yandan inflamatuvar süreçlerde yer alır. (Deng ve ark., 2002). β -katenin indüksiyonu pro- ve anti-inflamatuvar yanıtlara katılır, örneğin inflamasyonun β -katenin sinyalini arttırdığı bildirilmiştir (Prasad ve Katiyar, 2014). Öte yandan, diğer çalışmalar, β -katenin aktivitesinin artmasının, TLR ligandı ile indüklenen proinflamatuvar yanıtları iyileştirebileceğini göstermiştir (Li ve ark., 2014). Antiinflamatuvar durumda, β -katenin'in fiziksel olarak NF- κ B'ye bağlanır ve aktivasyonunu önler, böylece inflamasyonu negatif olarak düzenlemektedir. (Li ve ark., 2011). Tutarlı bir şekilde, β -katenin'in GSK-3 β tarafından fosforilasyonunun β -katenin ve NF- κ B arasındaki etkileşimi bozduğu ve inflamasyonu teşvik ettiği gösterilmiştir (Duan ve ark., 2007).

1.29.1.4. mTOR Sinyali

Rapamisin'in memeli hedefi (mTOR), insanlarda mTOR geni tarafından kodlanan bir serin/treonin kinazdır; bu kinaz, fosfatidilinositol-3 kinaz ilişkili kinazların (PIKK) bir üyesidir (Wang ve ark., 2011). mTOR PI3K ile ilişkili kinaz ailesine ait olan ve mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve 2 (mTORC2) olarak adlandırılan iki farklı kompleks oluşturmak için birkaç proteinle etkileşime giren atipik bir serin/treonin protein kinazdır. Her iki mTOR kompleksi de ortak ve benzersiz bileşenlere sahiptir, ancak rapamisine ve ayrıca yukarı akış girdilerine ve aşağı akış çıkışlarına karşı farklı hassasiyetlere sahiptir (Laplane ve Sabatini, 2012). mTORC1 kompleksi, G β L, mTOR'un düzenleyici ilişkili proteini (RAPTOR) ve DEP alanı içeren mTOR etkileşimli protein (DEPTOR) genlerinden oluşur. mTORC1 aktivitesi, büyüme faktörleri, amino asitler, enerji seviyeleri, glikoz mevcudiyeti ve stres faktörlerinden etkilenmektedir (Zoungana ve ark., 2022). mTORC1 iki mTOR kompleksinin daha iyi karakterize edilenidir. Tuberokleroz 1 (TSC1; hamartin olarak da bilinir) ve TSC2'den (tuberin olarak da bilinir) oluşan heterodimer

mTORC1'in önemli bir yukarı akış regülatörüdür ve beyin (Rheb) GTPaz açısından zenginleştirilmiş Ras homologu için bir GTPaz aktive edici protein (GAP) olarak işlev görür. GTP'ye bağlı Rheb formu, mTORC1 ile doğrudan etkileşime girer ve kinaz aktivitesini güçlü bir şekilde uyarır. TSC1/2, Rheb'i etkin olmayan GDP'ye bağlı durumuna dönüştürerek mTORC1'i negatif olarak düzenlemektedir. TSC1 / 2, PI3K ve Ras yolağını uyan insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF 1) olarak mTORC1'i etkileyen yukarı akış sinyallerinin çoğunu iletmektedir. Bu yolların efektör kinazları, hem inaktive olan TSC1/TSC2 kompleksini hem de aktive olan mTORC1'i fosforile edebilir. Akt ayrıca, bir mTORC1 inhibitörü olan fosforlanmış PRAS40'ın RAPTOR'dan ayrışmasına neden olarak TSC1/2'den bağımsız bir şekilde mTORC1'e sinyal verir. Birçok stres (düşük enerji ve oksijen seviyeleri, DNA hasarı), hipoksiye veya düşük enerjili bir duruma yanıt olarak en azından kısmen TSC1 / 2 yoluyla da etki eder. Adenozin monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK) fosforilatları TSC2 ve GAP aktivitesini Rheb'e doğru artırır. DNA hasarı, tümü p53'e bağlı transkripsiyon gerektiren çoklu mekanizmalar yoluyla mTORC1'e de sinyal verir. DNA hasarı, tüm PI3K-mTORC1 ekseninin aşağı regülasyonuna neden olarak TSC2 ve PTEN'in ekspresyonunu indüklemektedir veya Sestrin1/2'nin indüksiyonuna bağlı bir mekanizma yoluyla AMPK'yi aktive eder. mTORC1 amino aside bağımlı aktivasyonu için Rag GTPazları ihtiyaç duyar ve bu etkileşimler, mTORC1 'in zayıf karakterize edilmiş bir sitoplazmik konumdan lizozomal yüzeye translokasyonuna neden olmaktadır burada Rag GTPazlar onu düzenleyici adı verilen multi alt birimli bir kompleks üzerine yerleştirir. Protein sentezi, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E'yi (eIF4E) bağlayıcı protein 1'i (4E-BP1) ve S6 kinaz 1'i (S6K1) doğrudan fosforile eden, mTORC1 tarafından kontrol edilen en iyi karakterize edilmiş bir süreçtir. mTORC1 sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1/2 (SREBP1/2) transkripsiyon faktörleri aracılığıyla hareket ederek, çoğalan hücrelerin zar oluşturma için gereken lipidlerin sentezini de kontrol etmektedir (Laplane ve Sabatini, 2012). mTORC1 hücresel metabolizmayı ve ATP üretimini pozitif olarak düzenlemektedir. mTORC1 ile karşılaştırıldığında, mTORC2 yolağı hakkında çok daha az şey bilinmektedir (Laplane ve Sabatini, 2012). mTORC2 kompleksi mTOR, SIN1, Rictor, PRR5, GβL ve DEPTOR genlerinden oluşmaktadır. mTOR, 5' adenozin monofosfat ile aktive edilmiş protein

kinaz (AMPK), fosfoinositid-3-kinaz (PI3K)/AKT, tüberoskleroz kompleksi alt birimi 1 ve 2 (TSC1 ve TSC2) (TSC1 ve TSC2), Rag Gtpaz, Rheb, vb. gibi çoklu hücrel sinyal yollarında rol oynamaktadır (Zoungrana ve ark., 2022). mTORC2 sinyali besinlere karşı duyarsızdır. İnsülin gibi büyüme faktörlerine mTORC2 PI3K'ya bağlı bir şekilde ribozomlara bağlanmaktadır. mTORC2 Akt, serum ve glukokortikoid kaynaklı protein kinaz 1 (SGK1) ve protein kinaz Ca (PKCa) dahil olmak üzere AGC kinaz alt ailesinin birkaç üyesini kontrol edebilir. Akt mTORC2'nin hidrofobik motifini (Ser473) doğrudan fosforile ederek aktive edebilmektedir (Laplane ve Sabatini, 2012). SGK1, Akt tarafından fosforile edilen kalıntılar üzerindeki FOXO1/3a fosforilasyonunu regüle ettiğinden, SGK1 aktivitesinin kaybı, mTORC2 proteini tükenmiş hücrelerde FOXO geninin aktivitesindeki azalmadan sorumludur. PKCa, mTORC2 tarafından aktive edilen üçüncü AGC kinazdır (Laplane ve Sabatini, 2012). mTORC2 Akt'nin neden olduğu GSK-3β inhibisyonunda rol oynamaktadır (Golpich ve ark., 2015). (Şekil1.13).



Şekil 1.13. mTORC1 ve mTORC2 yolları (Laplane ve Sabatini, 2012).

1.29.1.5. STAT Sinyali

Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteini, inflamasyonun yanı sıra hücrelerde büyümeyi, hayatta kalmayı ve farklılaşmayı düzenler. GSK-3 β , farklı STAT'lerin aktivasyonunun düzenlenmesinde yer alır; ancak GSK-3 β , STAT6 gibi bazı STAT alt tiplerinin aktivasyonunu etkileyemez (Golpich ve ark., 2015).

1.29.1.6. TGF β 1 ve IL-10 Sinyali

Transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF β 1), hücresel proliferasyon ve farklılaşma gibi farklı hücresel fonksiyonları kontrol eden TGF- β büyüme faktörleri ailesinin bir üyesidir. GSK-3 β 'nin inhibisyonu, TGF β 1'in bir dizi proinflamatuvar sitokin üretimini antagonize etmesine neden olan β -katenin sinyalini teşvik ettiğinden, TGF- β 'nin düzenlenmesinde yer alır. IL-10, NF- κ B aktivasyonunu bloke edebilir, B hücrelerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını, antikor üretimini artırır ve ayrıca JAK-STAT sinyal yolunu düzenleyebilir. GSK-3 β , antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttığından, GSK-3 β inhibitörleri, IL-10'da bir artışa neden olacaktır (Golpich ve ark., 2015).

1.29.1.7. Akt Sinyali

Akt/GSK-3, apoptoz, transkripsiyon, hücre proliferasyonu ve endoplazmik retikulum stres tepkisini içeren çoklu hücresel süreçleri düzenleyen bir dizi sinyal iletim yolunun odak noktası olarak ortaya çıkmıştır. Yukarı akış sinyal molekülleri PI3K / Akt, GSK-3 β 'yi negatif olarak düzenlediğinden, PI3K / Akt yolağının aktivasyonu nöroproteksiyon ile ilişkili olabilir (Golpich ve ark., 2015).

1.29.1.8. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum, yeni sentezlenen salgılayıcı ve membranöz proteinlerin katlanması ve translayon sonrası modifikasyonların yanı sıra hücre içi Ca^{2+} homeostazı gibi farklı hücresel işlemlere katkıda bulunan tübüller ve düzleştirilmiş keselerden oluşan bir hücre içi bölmedir. ER fonksiyonlarını bozan, salgı proteinlerinin translayonu artmasında, açılmamış ve yanlış katlanmış proteinler ER'de birikir, öyle ki ER'nin bunları düzeltme kapasitesini aşar ve hücreler ER stresi olarak adlandırılan bir durumla karşılaşır. ER stresinde hücre ölümüne yol açan inflamatuvar yollar, Ca^{2+} bozuklukları, oksidatif stres ve otofaji görülmektedir. Kalıcı olarak, ER stresi, farklı nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde yer alır. ER stresine bağlı apoptozda (Song ve ark., 2002) GSK-3 β aktivitesinin görülür ve GSK-3 β inhibitörlerinin ER stresine bağlı hücre hasarlarını ortadan kaldırdığını gösteren birikmiş kanıtlar da mevcuttur (Kim ve ark., 2005). ER stresi oksidatif stres ile yakından ilişkilidir ve GSK-3 β 'nin nörodejeneratif hastalıklarda belirgin olan oksidatif stres kaynaklı nöronal hücre ölümünde rol aldığını gösteren çeşitli kanıtlar mevcuttur (Lee ve ark., 2007).

1.29.1.9. Mitokondriyal disfonksiyon

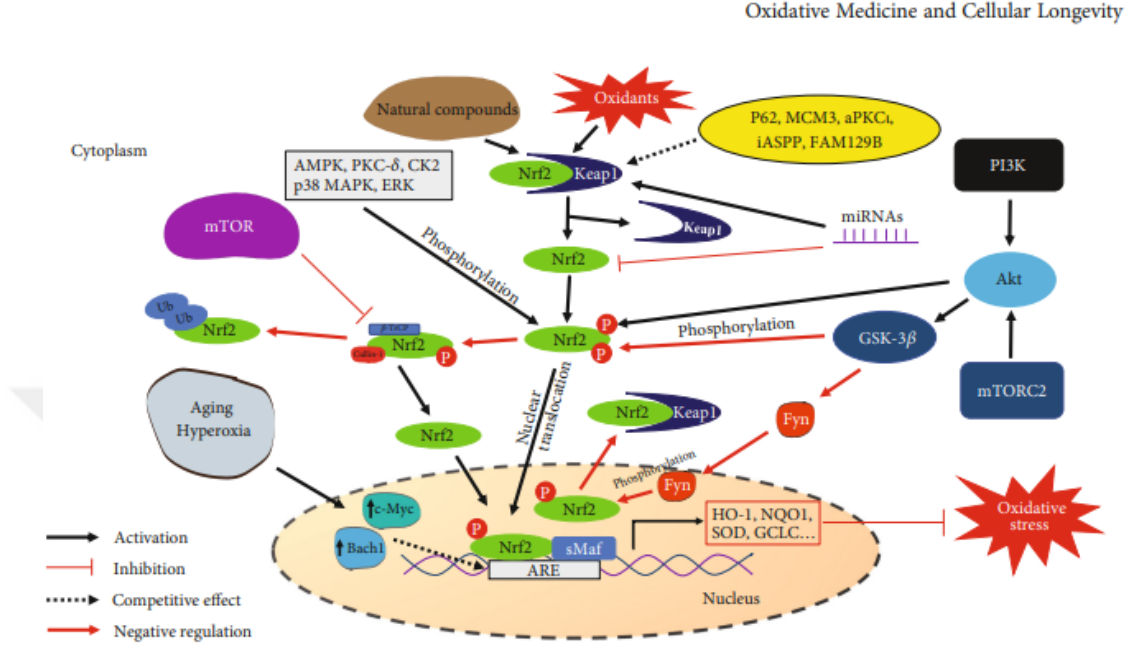
Bununla birlikte, GSK-3 β , yapısal olarak aktif bir sitosolik protein olarak kabul edilir, ancak bu proteinin daha az miktarları, mitokondri ve çekirdek gibi hücresel bölmelerde de tespit edilmiştir; İlginç bir şekilde, GSK-3 β 'de bulunan bu organel, apoptotik uyaranlar tarafından aktive edilmeye çok daha duyarlıdır (Bijur ve Jope, 2003). Mitokondride GSK-3 β varlığı, içsel apoptoz yolunun bazı elementleri gibi mitokondriyal sinyal moleküllerinin, mitokondride bulunan aktif GSK-3 β tarafından erişilebilir olduğunu ima etmektedir. Ayrıca Watcharasit ve ark. GSK-3 β 'nin hem mitokondride hem de çekirdekte tümör baskılayıcı P53'e bağlandığını ve mitokondriyal sitokrom-c salınımı ve kaspaz 3 aktivasyonu gibi P53 aracılı apoptotik etkileri desteklediği gösterilmiştir (Watcharasit ve ark., 2003). GSK-3 β 'nin hedefleri arasında PI3K, mTOR kompleksi 1 (mTORC1), AMP kinaz (AMPK) ve peroksizom

proliferatörü ile aktive edilen reseptör gama ko-aktivatörü 1alfa (PGC-1a) yer almaktadır (Souder ve Anderson, 2019). GSK3b aktivitesi, insülin/IGF1 ve WNT sinyal yolları tarafından bastırılır. Dinlenme durumunda, GSK-3 β yapısal olarak aktiftir ve çoklu hedefleri fosforile ederek büyüme sinyalini, translasyonu ve glikojenezi baskılar. Akt'ın insülin sinyal yolu ile aktivasyonu, fosforilasyona ve GSK-3 β aktivitesinin baskılanmasına yol açar. GSK-3 β , mTORC1'in ve hücre büyümesinin inhibisyonuna yol açan WNT sinyali yokluğunda da aktiftir. Tersine, aktif mTORC1, S6K aracılığıyla negatif bir geri besleme döngüsünde GSK-3 β aktivitesini inhibe etmektedir (Souder ve Anderson 2019). Başka yerlerde GSK3b, fare artrit ve peritonit modellerinde proinflamatuvar bir rol oynar (Hu ve ark. 2006).

1.29.2. GSK3 ve Hücresel Yaşlanma

Her iki GSK3 izoformunun N-terminal fosforilasyonunun hepatosit yaşlanmasına eşlik ettiği ve lityum ile tedavinin, protein sentezi ve glikojenez dahil olmak üzere artırılmış anabolizma ile çakışan yaşlanan bir fenotipi indüklemek için yeterli olduğu bildirilmiştir (Seo ve ark., 2008). GSK-3 β 'nin, p53 ile kararlı bir kompleks oluşturduğu replikatif yaşlanmaya maruz kalmış insan fibroblastlarının çekirdeğinde biriktiği gösterilmiştir (Zmijewski ve Jope 2004). Bu hücrelere lityum ile uygulanması, GSK3b'nin p53 ile etkileşimini bloke etmiştir ve hücrelerin geri dönüşümlü sakin bir duruma girmesine neden olmuştur. Bu nedenle, GSK3'ün farklı koşullar altında hücresel yaşlanmayı hem destekleyebileceği hem de buna karşı çıkabileceği görülmektedir. GSK3, hücre ölümü, yenilenmesi ve farklılaşmasını düzenlemektedir. Aktif GSK-3 β , mitokondriyal dış zar üzerindeki proteinleri fosforile ederek mitokondriyal geçirgenliği artırır. Daha sonra sitokrom c salınımı, apoptoza yol açan içsel yolu tetikler. GSK-3 β ayrıca p53 ile etkileşime girer ve hücre döngüsü durmasını ve apoptozu arttırmaktadır (Şekil1.14). İnsülin sinyaline yanıt olarak GSK-3 β 'nin inhibe edici fosforilasyonu, bu yolları bloke ederek hücrenin hayatta kalmasını destekler. Kök hücre fonksiyonu, kısmen WNT sinyal yolağının aktivitesi yoluyla düzenlenir. GSK-3 β WNT sinyalinin yokluğunda bozunma için

betakatenini hedeflerek fosforile eder ve kök hücre yenilenmesini bloke edebilir (Souder ve Anderson 2019).



Şekil 1.14. Keap1 / NRF2 ile oksidatif stres ve yaşlanmada rol oynayan diğer sinyal yolları arasındaki ilişkisi (Yu, C ve Xiao, J. H. 2021).

1.29.3. GSK-3β'nın Yukarı Akış Regülatörleri

Çoklu yukarı akış moleküllerine yanıt olarak GSK-3β, oksidatif stres, metabolizma hücre proliferasyonu, inflamasyon ve apoptoz dahil olmak üzere birkaç merkezi hücre içi sinyal yollarına katılmaktadır. Örneğin, Sirtuin 3 (SIRT3), mitokondride GSK-3β 'yi deasetile edebilir, bu da SMAD3 ve c-Jun gibi substratların kararsızlığına neden olmaktadır ve bunların çekirdeğe ithalatını azaltır. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) /Protein kinaz B (AKT) sinyal yolu ile Ser9 bölgesinde GSK-3β'nin fosforilasyonu, inaktivasyonuna yol açmaktadır. Serum ve glukokortikoid kaynaklı protein kinaz 1 (SGK1) ayrıca fosforilasyon yoluyla GSK-3β 'yi inaktive edebilir, böylece fibroz gelişimine katkıda bulunabilir. GSK-3β ekspresyonu, protein fosfataz 2A (PP2A) tarafından indüklenebilir, böylece kolajenin çoğalmasını sınırlamaktadır (Zheng ve ark., 2020).

1.29.3.1. SIRT3

NAD + bağımlı sınıf III deasetilaz sirtuin ailesinin bir üyesi olan SIRT3, esas olarak mitokondriye lokalizedir ve ekspresyon seviyeleri, kalori kısıtlaması ile düzenlenir. Birçok çalışma, SIRT3'ün, hücrel metabolizma, yaşlanma, farklılaşma ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücrel süreçlerde GSK-3 β 'nın yukarı akış geni olarak çok önemli bir düzenleyici rol oynadığını göstermiştir (Finley ve ark., 2011).

1.29.4. GSK-3 β 'nın Aşağı Akış Efektörleri

Fibrotik ağda yeri doldurulamaz bir merkezi molekül olan GSK-3 β , SNAIL, B hücreli lenfoma 2 (BCL2), β -Katenin, SMAD3, c-Jun, NRF2 ve Nükleer faktör-kappa B (NF-kB) dahil olmak üzere substratların fosforilasyonuna aracılık edebilir bu da neredeyse bu aşağı akış efektörlerinin inhibisyonuna yol açmaktadır (Zheng ve ark., 2020).

1.29.5. β -Katenin

Çok işlevli bir protein olarak β -Katenin, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Sitoplazmada biriktikten sonra β -Katenin çekirdeğe transferi fibrozisin oluşmasında önemli bir adımdır. Wnt / β -Katenin yolu aktive edilmediğinde, aktive edilmiş GSK-3 β , β -Katenin Thr41, Ser37 ve Ser33 kalıntılarını fosforile eder ve onunla bir kompleks oluşturur, bu daha sonra proteazom tarafından parçalanır. Tersine, Wnt/ β -Katenin yolu aktive edildiğinde, kompleksin ayrışmasına neden olabilir ve daha sonra β -Katenin kompleksten salınır ve sitoplazmada birikir ve sonunda çekirdeğe yer değiştirir (Zheng ve ark., 2020).

1.29.6. NRF2

NRF2, NQO1 ve HO1 dahil olmak üzere anti-oksidatif genlerin ekspresyonunu indükleyerek oksidatif strese karşı koruyan ana transkripsiyon faktörüdür (Cui ve ark., 2018). Keap1-NRF2 sinyali, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) / protein kinaz B (Akt), protein kinaz C ve mitojenle aktive olan protein kinaz dahil olmak üzere daha karmaşık bir düzenleyici ağ tarafından da düzenlenmektedir. PI3K/Akt/NRF2 yolağı, hücrelerin oksidatif strese direnmesinde rol oynamaktadır. Bu nedenle, PI3K/Akt/NRF2 yolu, yaşlanma ve oksidatif stresle ilgili diğer durumlar için terapötik bir hedef olabilir. GSK-3 β , NRF2'nin sitozole taşınmasını düzenlemektedir. PI3K/Akt yolağı başlatıldığında, Akt önce GSK-3 β 'yı etkinleştirir daha sonra Fyn'i treonin amino asitlerinde fosforile ederek Fyn'nin nükleer birikimine yol açmaktadır. Son olarak Fyn, NRF2'yi Tyr568 amino asitlerinde fosforile ederek, NRF2'nin Keap1'den bağımsız bir şekilde bozunmasına neden olmaktadır (Yu ve Xiao, 2021).

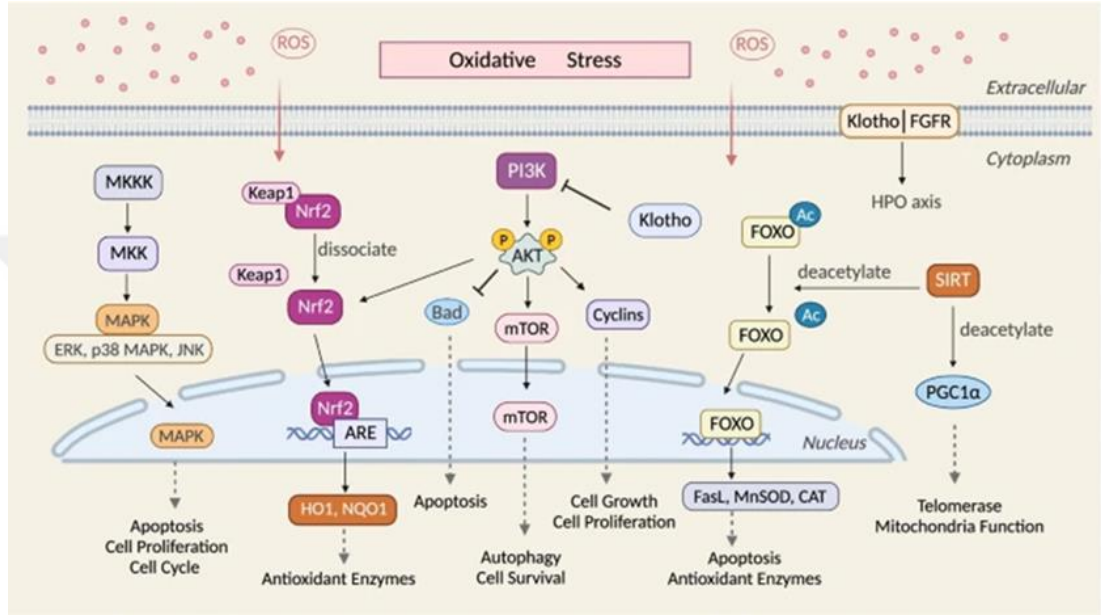
1.30. AKT Geni

AKT, hücresel sinyal yollarında yer alan bir Ser/Thr kinazdır. PI3K / AKT sinyal yolu hücrelerde yaygın olarak bulunur ve hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve apoptozda rol oynamaktadır. Akt kinaz ailesi, üç yüksek derecede homolog izoformdan oluşur, Akt1 (PKBa), Akt2 (PKBb) ve Akt3 (PKBg) bir N-terminal pleckstrin homoloji (PH) alanı, bir kinaz alanı ve bir hidrofobik motif içeren bir C-terminal düzenleyici kuyruk tarafından oluşturulan yüksek oranda korunmuş bir alan yapısına sahiptir. Akt, PH alanı sayesinde PI3K tarafından üretilen 3-fosfoinositide bağlanır ve daha sonra plazma zarına alınır. Akt, iki bölgede fosforile edilir: katalitik alanın T halkası içindeki Thr308 tortusunda, fosfoinositide bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından fosforile edilir; rapamisin kompleksi 2'nin (mTORC2) memeli hedefi tarafından karboksil terminal hidrofobik alan içindeki Ser473 tortusunda fosforile edilmektedir. İntegrin bağlantılı kinaz (ILK) ve mitojenle aktive olan protein kinazla aktive olan protein kinaz-2 (MAPKAPK2) dahil olmak üzere

diğer proteinlerin bu kalıntıyı fosforile ettiği bildirilmiştir. Akt, PI3K'dan bağımsız bir şekilde de etkinleştirilebilir. Örneğin, cAMP yükseltici ajanların Akt'ı PKA yoluyla aktive ettiği, Ca²⁺/kalmodulin-bağımlı kinazın (CaMK) ise Akt'ı in vitro olarak doğrudan fosforile edip aktive edebildiği gösterilmiştir. Akt1, Akt2 ve Akt3 izoformları, yaklaşık %80 amino asit özdeşliğini paylaşır ve benzer birincil substrat özgüllüğüne sahip oldukları düşünülür. Akt çeşitli dokularda yaygın olarak ifade edilirler: Akt1 en çok beyin, kalp ve akciğerde bulunur; Akt2 ağırlıklı olarak iskelet kası ve embriyonik kahverengi yağda ifade edilir; Akt3 esas olarak böbrek, beyin ve embriyonik kalpte ifade edilir. Akt izoformuna özgü nakavt farelerden elde edilen bulgular, Akt ailesi kinazlarının in vivo olarak farklı biyolojik fonksiyonlara sahip olma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Akt1 nakavt fareler, yavru kontrollerden daha küçüktürler ve bazı dokularda apoptoz oranları artmıştır, bu da Akt1'in hücre sağkalımındaki rolünü yansıtmaktadır. Buna karşılık, Akt2 nakavt fareler tip 2 diyabet geliştirir ve glikoz kullanımı bozulmuştur, bu da Akt2 fonksiyonunun insülin reseptörü sinyal yolu için daha spesifik olduğunu göstermektedir. Akt3'ün kesin rolü net değildir. Çeşitli büyüme faktörlerine ve sitokinlere yanıt olarak Akt, çok adımlı bir mekanizmayı izleyerek PI3-kinazın aşağısında aktive edilir. Aktive edilmiş PI3K, PIP2'yi PIP3'e dönüştürür ve Akt ve PDK1 kinazlar da dahil olmak üzere PH alanlarını içeren proteinlerin plazma zarında toplanma bölgeleri sağlamaktadır. Ardından Akt, PDK1 ve mTORC2 tarafından fosforile edilir ve aktive edilir. Aktive edilmiş Akt, çok sayıda alt hedefin fosforilasyonu yoluyla çok çeşitli hücresel fonksiyonları düzenlemektedir. Bir proto-onkoprotein ve PI3K'nın birincil hedefi olan Akt, ilk olarak hücre sağkalımını ve çoğalmasını düzenleme kapasitesiyle karakterize edilmektedir. Akt'ın kurucu aktivasyonu, kontrolsüz hücre proliferasyonuna, apoptotik yolların inhibisyonuna ve birçok insan kanserinin tipik özellikleri olan hücre döngüsü düzensizliğine yol açmaktadır. Akt'ın en iyi korunmuş işlevlerinden biri, hücre büyümesini destekleme kapasitesidir. Aslında, Akt aktivasyonu, siklin D'nin ekspresyonunu indükleyerek ve p21/Cip1, p27/Kip1 ve p15/INK4b gibi çoklu negatif regülatörlerin ekspresyonunu baskılayarak hücre döngüsü ilerlemesinin güçlü bir promotörü olan c-Myc'nin transkripsiyonunu artırır. Bununla birlikte, c-Myc ve siklin D1'in stabilitesi dolaylı olarak glikojen sentaz kinaz (GSK3) aracılığıyla kontrol edilir. Wnt sinyalinin,

GSK3'ü bloke ederek b-katenin'i aktive etmesi dikkat çekicidir. Akt, siklin D1'in GSK3b aracılı fosforilasyonunu ve bozulmasını önleyerek ve siklin bağımlı kinaz (Cdk) inhibitörleri p27 / Kip1'i negatif olarak düzenleyerek hücre döngüsünü düzenler. Akt ayrıca Cdk inhibitörü p21 / Cip1 ve p27 / Kip1'i inaktive ederek G1 / S ilerlemesini uyarır ve bunun sonucunda siklin E-Cdk2'nin aktivasyonu sağlanır. Hem Cdk1 aktivatörlerinin hem de inhibitörlerinin doğrudan fosforilasyonu yoluyla hücre döngüsünün G2 / M fazında Akt aktivitesinin yüksek olduğu daha önce bildirilmiştir. Aslında, G2 / M geçişi sırasında, Cdc25B fosfataz çekirdek ve sitoplazma arasında mekik dokur. Akt aracılı Ser353 fosforilasyonundan sonra, Cdc25B sitoplazmada ihraç edilir ve mitotik girişe katkıda bulunur. Denizyıldızı *Asterina pectinifera*'dan toplanan oositlerde Akt, Cdk1 inhibitörü Myt1'i Ser75'te fosforile eder, böylece siklin B-Cdk1 aktivitesini indükler. Son zamanlarda yapılan bir araştırma, Akt'ın ayrıca Cdk2'nin fosforilasyonu ve sitoplazmik translokasyonu yoluyla S'den G2 fazına ilerlemesini düzenlemektedir. Hücre büyümesini arttırmak için baskın mekanizmaya hem besinler hem de büyüme faktörü sinyalleme tarafından düzenlenen rapamisin kompleksi 1'in (mTORC1) memeli hedefinin aktivasyonu aracılık ediyor gibi görünmektedir. Akt'ın Ser2448'de mTOR'u doğrudan fosforile ettiği öne sürülmüştür, ancak bu fosforilasyonun rolü hala belirsizliğini korumaktadır. mTORC1 aktivasyonu tümör baskılayıcı tüberoskleroz kompleksi 2'nin (tüberin olarak da bilinen TSC2) inhibe edici fosforilasyonundan kaynaklanıyor gibi görünmektedir. Bu kompleks, beyinde zenginleştirilmiş küçük G proteini Ras homologu (RHEB) için bir GTPaz aktive edici protein (GAP) olarak işlev görür. Kompleksin azalan GAP aktivitesi, RHEB-GTP birikmesine ve mTORC1'in aktivasyonuna yol açar. Bununla birlikte, Akt tarafından TSC2 fosforilasyonunun GAP aktivitesinin azalmasına nasıl yol açtığı tam olarak anlaşılmamıştır. Ayrıca, mTORC1 düzenlemesinde ikinci bir Akt substratının, yani 40 kDa'lık prolin açısından zengin Akt substratının (PRAS40) yer aldığı bulunmuştur (Şekil 1.15). Akt, PRAS40'ı Thr246 üzerinde doğrudan fosforile eder ve bu fosforilasyon, 14-3-3 bağlanması için gereklidir ve böylece mTORC1 aktivitesini artırır. Akt, insülin reseptörünün akış aşağısında glikoz taşınmasında kilit bir role sahiptir ve protein tirozin fosfataz PTP1B'nin Ser50 üzerinde fosforilasyonu yoluyla bu yol üzerinde pozitif bir geri bildirim uygulayabilir. Ayrıca Akt, spesifik serin

mTOR, Cyclins ve NRF2) düzenleyebilir. FoxO, hücrel OS durumunu algılar ve hücre apoptozunu ve antioksidan enzimlerin ekspresyonunu düzenlemek için bir transkripsiyon faktörü görevi görür. Klotho, PI3K/AKT yolu aracılığıyla hücrel oksidatif homeostazı ve FGF-Klotho endokrin sistemi aracılığıyla HPO eksenini düzenler (Yan ve ark., 2022). (Şekil 1.16).



Şekil 1.16. Ovaryum yaşlanmasında Oksidatif stres ile ilgili sinyal yolağı (Yan ve ark., 2022).

1.31 Ovaryum Yüzey Epitel Hücreleri

Ovaryum, intraembriyonik embriyo'nun gelişimi sırasında oluşan vücut boşluğunu (sölm) kaplayan ve basit skuamöz, kübik ila düşük psödostratifiye silindirik epitel hücreleri içeren beyazımsı bir mezodermden türetilmiş ovaryum yüzey epiteli (OSE) tabakası ile çevrilidir. Bütünlüğü basit dezmozomlar, tamamlanmamış sıkı bağlantılar, birkaç integrin ve kaderinler tarafından korunur. Sağlıklı OSE'lerin işlevi, üreme döngüsü sırasında yumurtlamadan sonra hücrelerin yenilenmesinde ve tekrarlanan çoğalmasında rol alır. Erişkin kadınlarda OSE göze çarpmayan, tek tabakalı yassı ila kübik bir epitelidir. OSE'nin hücreler arası teması ve epitel bütünlüğü basit dezmozomlar, tamamlanmamış sıkı bağlantılar, birkaç integrin ve kaderin tarafından korunur. Çoğu memelide, Ovulasyonun bozulduğu bölgeler

dışındaki over yüzeyinin tamamı epitel hücreleri ile kaplıdır. Embriyonik gelişim sırasında ve daha sonraki yaşamda rejenerasyon sırasında meydana gelen fizyolojik bir hücre süreci olan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), patolojik bir durum içeren hücreler de üretebilir.

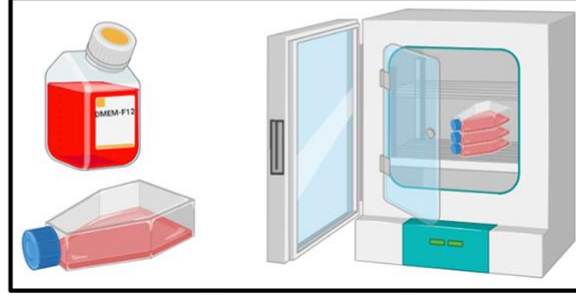
Bu tez kapsamında sağlıklı over yüzey epitel hücrelerinde:

1-İki senesens türü (a-stres kaynaklı senesens, b-ileri pasaj ile oluşan senesens) için iki ayrı senesens hücre modelinin oluşturulması ve bu iki senesens modelinin SABG ve SAHF denemeleri ile doğrulanması,

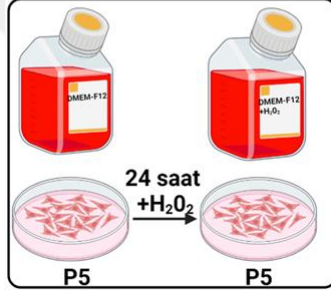
2-Oluşturulan iki farklı senesens modelinde; Antioksidan yolak (alfa-Klotho, NRF2), SASP belirteçleri (p53, IL6, IL1-beta), Kök hücre (Oct4, Nanog, Sox2) ve sağkalım (mTOR, AKT)-ilişkili genlerin ifadelerinin RT-qPCR yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

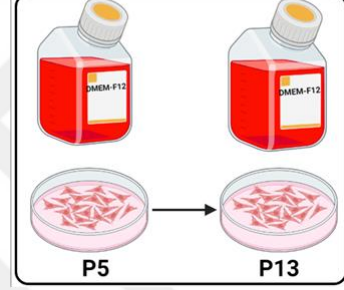
Hücre Kültürü



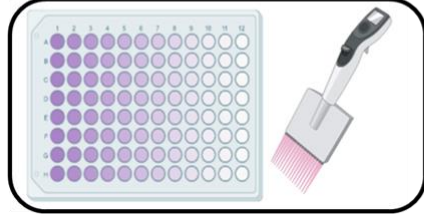
H₂O₂ uygulaması



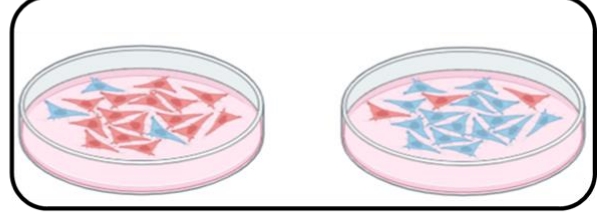
Pasajlama



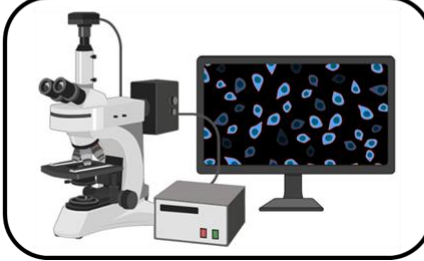
MTT



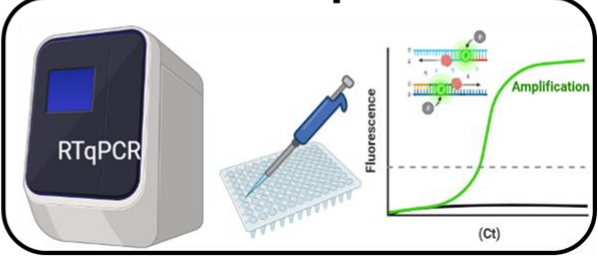
SABG



SAHF



RT-qPCR



Şekil 2.1. İş akış şeması

2.1. IHOEC Hücre Kültürü:

2.1.1. IHOEC Hücrelerinin Çözülmesi

Dondurulmuş sıvı azot stoğunda bulunan ölümsüz insan ovaryum epitel hücre (IHOEC) hattını çoğaltmak için, hücrelerin içerisinde saklandığı kriyovialler hızlı bir şekilde çözülmüştür. Çözülen hücre süspansiyonu, 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisinde %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin ile takviye edilmiş 3 ml DMEM-F12 besiyeri içine alınmıştır. Santrifüj tüpü 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve tüpün tabanındaki hücre peleti üzerine 3 ml besiyeri eklenerek pipetaj ile hücrelerin süspanse hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra tüp üzerine 3 ml daha besiyeri ilave edilmiştir ve toplam 6 ml'lik hücre süspansiyonu 25cm² 'lik hücre kültürü kapları içerisine alınarak 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır.

2.1.2. IHOEC Hücrelerinin Kültürlerinin Devam Ettirilmesi

IHOEC hücreleri, %10 fetal sıgır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM-F12 besiyerinde, 37 °C'deki %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli kültür ortamında çoğaltılmıştır. Kültür flaskının içindeki hücreler %70-80 konfluent duruma ulaştığında flaskın içindeki besiyeri steril pastör pipet ile çekilerek atılmıştır. Flask içine 1 ml tripsin ilave edilerek 37°C'deki etüvde 3 dakika bekletilmiş ve bu süre sonunda flaskın içine 3 ml besiyeri koyularak tripsinin inaktive edilmesi sağlanmıştır. Hücreler 15 ml santrifüj tüpüne alınarak 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve tüpün tabanındaki hücre peleti üzerine 3 ml besiyeri ilave edilerek pipetaj ile hücrelerin süspanse hale gelmesi sağlanmıştır. Hücre süspanسیونundan 1/3 oranında hücre kültür flaskına alınmıştır ve alt kültürle ayrılarak hücrelerin devam ettirilmesi sağlanmıştır. Kalan 2/3 lük kısım -80 °C'de dondurularak çalışmanın sonraki deneyleri için saklanmıştır.

2.2. MTT(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide) Hücre Canlılık Testi

H₂O₂'in hücreler üzerindeki sitotoksikite düzeylerini (IC₅₀=Yüzde 50 inhibitör derişim) saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla aşağıdaki protokol izlenmiştir.

Hücre kültüründe elde edilen IHOEC hücreleri 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 20.000 hücre olacak biçimde 90 µl DMEM-F12 hücre besiyeri şeklinde ekim yapılmış ve kuyucuklara hücrelerin homojen bir biçimde yayılması sağlanmıştır. Daha sonra bu hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde bir gece bekletilerek yapışmaları sağlanmıştır. Ertesi gün hücrelerin büyümesi için aynı koşullarda bekletilmiştir. Ertesi gün yapışan hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak yerine taze besiyerinden 90 µl her kuyucuğa koyulmuştur. Belirlenen kuyucuklara ilave edilmeleri sonucunda oluşacak son derişimler sırasıyla 0µM (Negatif Kontrol), 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM, 500 µM, 600 µM, 700 µM, 800 µM, 900 µM olacak şekilde 10 µl ilave edilmiş, negatif kontrol grubuna ise 10 µl besiyeri koyulmuştur. Hücreler daha sonra 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde 24 saat bekletilmiş ve sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri-MTT solüsyon karışımı (90 µl besiyeri + 10 µl 5mg/ml MTT solüsyonu) eklenmiş ve plaka 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde 2 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda plaka etüvden alınıp kuyucukların üzerine her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde %10 SDS-HCl eklenmiştir. Plakadaki her bir kuyucuğun soğurum ölçümü spektrofotometre cihazında 570 nm ve 690 nm'de yapılmıştır. Sonuçlar Gen5 bilgisayar programında elde edilerek bir MS Excel tablosuna aktarılmıştır.

2.3. Senesens-ilişkili Beta-Galaktosidaz (SABG) Boyaması

Birinci gün 96 kuyucuklu hücre kültürü plakasının her bir kuyucuğuna 20 x 10³ IHOEC hücresi ekilmiş ve hücreler ikinci gün kuyucuk zeminine yapışmaları için %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de bekletilmiştir. Üçüncü gün hücrelere farklı

derişimlerde hidrojen peroksit uygulanmış ve 24 saat bekletilmiştir. Dördüncü gün SABG boyaması için hücreler önce kuyucuk başına 100 µL 1 x PBS ile bir kez yıkanmıştır. PBS kuyulardan çekildikten sonra üzerlerine fiksasyon için 1 x PBS içerisinde hazırlanmış %4 formaldehid çözeltisi kuyucuk başına 75 µL olmak üzere eklenmiş ve 10 dakika bekletilmiştir. Hücreler daha sonra kuyucuk başına 100 µL 1 x PBS ile yıkanmış ve son olarak her bir kuyucuk üzerine 60 µL boyama çözeltisi (son derişimleri 36,85 mM Sitrik asit, 126,30 mM Sodyum Fosfat, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM potasyum ferrosiyanat, 5 mM potasyum ferrisiyanat ve 1 mg/mL X-gal olmak üzere) eklenmiş ve plate 37°C'de 12-16 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler iki kez 100 uL 1 x PBS ile yıkanmış ve inverted mikroskopi ile görüntülenmiş ve her bir kuyucuğa ait olarak kuyucuğun üst, alt, sağ ve sol bölümlerinden birer veya tercihen ikişer -kuyucukta yeterli hücre sayısı sağlandığı durumda- fotoğraf çekilmiştir. SABG(+) hücrelerin sayımı ve toplam hücre sayısının belirlenmesi, elde edilen bu fotoğraf görüntüleri kullanılarak yapılmıştır.

2.4. Senesens-ilişkili Heterokromatin Odakları (SAHF) Boyaması

Birinci gün önce 24 kuyucuklu hücre kültürü plakasının her bir kuyucuğuna 15mm çapında yuvarlak lameller steril koşullarda konulmuş ve daha sonra üzerlerine 150×10^3 IHOEC hücresi ekilmiştir. Hücreler ikinci gün kuyucuk zeminine yapışmaları için %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de bekletilmiştir. Üçüncü gün hücrelerin üzerine farklı derişimlerde hidrojen peroksit uygulanmış ve 24 saat bekletilmiştir. Dördüncü gün SAHF boyaması için hücreler önce kuyucuk başına 500 µL 1 x PBS ile yıkanmış ve daha sonra hücreler fiksasyonları için kuyucuk başına 300 µL'de hazırlanan %4 formaldehid içeren 1 x PBS çözeltisi içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Sonraki adımda hücreler kuyucuk başına 500 µL 1 x PBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuk üzerine 1 x PBS içerisinde hazırlanmış 300 µL % 0.02 Triton X-100 çözeltisi eklenmiştir. Hücreler tekrar 1 x PBS ile yıkanmış ve son derişim 2µg/mL olacak şekilde 200µL DAPI boyama çözeltisi ile bekletilmiş ve sonrasında yine 500 µL 1 x PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Lameller daha sonra cımbız ile kuyucuklardan çıkarılarak lamalar üzerine konulmuş ve 3µL gömme çözeltisi

(hacimsel olarak %90 gliserol ve %10 10x PBS çözeltisi) üzerine yerleştirilmiş, sabitlenmiş ve sonrasında hücreler konfokal mikroskopi ile görüntülenmiştir.

2.5. RNA İzolasyonu, RNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü ve RNA Agaroz Jel Elektroferezi

IHOEC hücrelerinin üzerine 1 ml Trizol eklendikten sonra 1,5 ml steril plastik tüpe aktarılıp 5 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra üzerlerine 200 µl kloroform eklenmiş ve 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. 10 dakika sonra hücrelerin olduğu tüpler +4 °C sıcaklıkta 12.000 rcf'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpler içerisinde oluşan 3 katmandan en üstteki beyaz RNA fazı pipet yardımıyla çekilerek yeni tüpe aktarılmıştır. Tüplerin üzerine 500 µl izopropanol eklenmiştir ve tüpler oda ısısında 10 dakika bekletilmiştir daha sonra +4 °C sıcaklıkta 12.000 rcf'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerin dibinde RNA peleti oluşmuştur. Pelete dikkat edilerek üstteki izopropanol uzaklaştırılmıştır ve tüplere 1 ml % 75'lik etil alkol eklenerek pelet kaldırılmıştır. Tüpler +4 °C sıcaklıkta 7500 rcf'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Dipte oluşan RNA peletine dikkat edilerek etil alkol uzaklaştırılmıştır. Tüpler kapağı açık bir şekilde oda ısısında bırakılarak alkolün buharlaşması sağlanmıştır. Daha sonra her tüpe 40 µl Dnaz RNAz içermeyen steril saf su eklenerek RNA'lar çözülmüştür.

Farklı uygulamalara tabi tutulmuş bulunan IHOEC hücre hatlarından elde edilen RNA örneklerinin saflıklarını ve derişimlerini belirlemek için spektrofotometrik ölçüm yöntemi kullanılmıştır. RNA saflık ve derişim değerleri BioTek Epoch cihazında 260nm ve 280nm'de soğurum ölçümleri ile otomatik olarak yapılmış, A260/A280 ve RNA derişim değerleri belirlenmiştir. Ayrıca özellikle olası genomik DNA kontaminasyonu ve RNA bozunumunun test edilmesi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. %1'lik agaroz jelin hazırlanışı şu şekilde yapılmıştır: 100 ml 1X TBE tampon bir beher içerisine alınarak üzerine 1 gr toz agaroz tartılıp eklenmiştir. Beher mikrodalga fırında yüksek sıcaklıkta yaklaşık 2-3 dk ısıtılmış, böylece agarozun erimesi ve tampon içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.

Beherin dış yüzeyi musluk suyunun altına tutularak jel çözeltisinin soğuması sağlanmıştır. Behere 2 µl SYBER-Safe floresan boya eklenerek karıştırılmış ve jel tankına dökülerek donmaya bırakılmıştır. Donan jel, içerisinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına aktarılmıştır. Nükleaz içermeyen sudan 8 ul, RNA örneklerinden 2 µl, DNA yükleme tamponundan 2 µl karıştırılmış ve bunun 10 µL'si jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Örnekler 80 voltta 25 dk yürütülmüş ve daha sonra jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

2.6. İzole Edilen RNA Örneklerinden cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezleme işlemleri için, BioRad iScript cDNA Sentez Kiti kullanılmıştır. Toplam tepkime hacmi 20 µL olarak hesaplanmıştır. Her kuyu için 5x iScript karışımından 4 µL, iScript Reverse Transkriptaz enziminden, RNA örneğinden ve ddH₂O'dan aşağıda belirtilen miktarlarda eklenmiştir.

cDNA sentez basamakları şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

Çizelge 2.1. cDNA Sentez Basamakları

<u>Basamak</u>	<u>Süre</u>	<u>Sıcaklık</u>
Priming	5 dakika	25°C
Ters Transkripsiyon	20 dakika	46°C
Ters Transkripsiyon İnaktivasyon	1 dakika	95°C

cDNA sentezi gerçekleştirilen örnekler üzerlerine 80 µl DNaz/RNaz içermeyen saf su eklenerek 1:5 oranında seyreltilmiş ve kantitatif PCR tepkimesine kadar -20°C sıcaklıkta saklanmıştır.

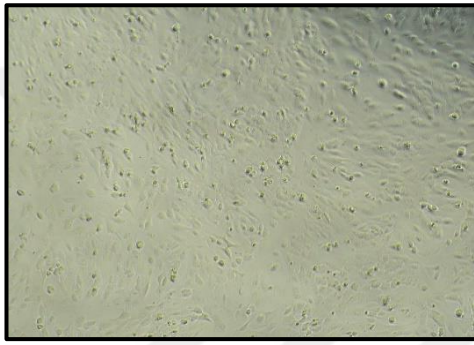
2.7. Ters Transkriptaz Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ve Analizi

PCR tepkimesinde kullanılacak her gene ait primer çiftleri, GC içerikleri (%GC), erime sıcaklıkları (T_m) ve dimer oluşturup oluşturmadıkları (dG) dikkate alınarak PerlPrimer programı kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen primer sekanslarının özgünlükleri NCBI/Primer Blast ağ sayfasından faydalanılarak denetlenmiştir. RT-qPCR aşamasında polimerizasyon tepkimesi için gerekli olan ve SYBR Green floresan boyası, dNTP'ler ve DNA Polimeraz içeren 2X ticari tampon çözeltisi (BioRad SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix) DNaz/RNaz içermeyen saf su ve ifade oranı hesaplanacak olan gen transkriptine ait ilgili primerler ile tüm örnekler ve tüm tekrarlar adedince karıştırılmıştır. Her bir primer çifti için bir adet karışım oluşturulmuştur. Bu karışımlar 96-kuyucuklu PCR plakasının ilgili gene ait ifade ölçümünün alınacağı bölgelerdeki her bir kuyucuğa, kuyucuk başına 8 µl olacak şekilde dağıtılmış ve daha önceki aşamalarda elde edilmiş olan her bir farklı örneğe ait cDNA'lar, bu SYBR Green karışımları üzerine her bir kuyucuğa 2 µl olmak üzere dağıtılmıştır. Böylece toplam PCR tepkime hacmi 10 µl olmuştur. Normalizasyon için GAPDH referans geni kullanılarak bağıl (rölatif) gen ekspresyon analizi yapılmıştır. RT-qPCR tepkimeleri Biorad CFX Connect cihazı kullanılarak qRT-PCR yapılmıştır. Bütün genlerin ifade seviyeleri kontrol örnek grubuna göre kat değişimi cinsinden hesaplanmıştır. **Tüm uygulamalar en az üç teknik tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR sonuçları MS Excel programı kullanılarak Livak KJ.'e uygun olarak 2(Delta C(T)) yöntemi ile analiz edilmiştir.**

3. BULGULAR

3.1. IHOEC Hücrelerinden Senesens Oluşturulması

9,8 M H_2O_2 'den 20,00 mM derişimde IHOEC hücre kültüründe uygulanması ile hücrelerin senesens sürecine uğratılması aşamasında H_2O_2 uygulamadan öncesi ve sonraki hücrelerin mikroskop görüntüsü Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



A (H_2O_2 uygulanmamış IHOEC hücreler)



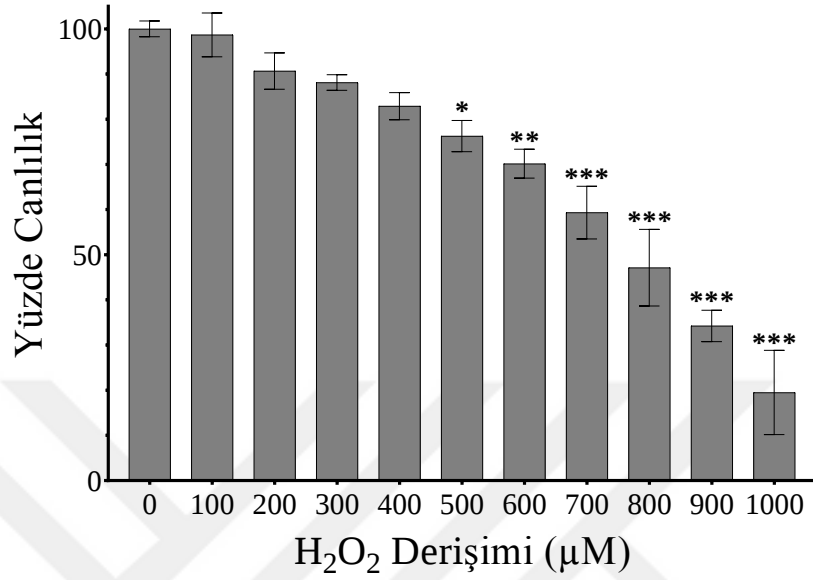
B (H_2O_2 uygulanmış IHOEC hücreler)

Şekil 3.1. IHOEC hücrelerinin mikroskop görüntüsü A-10X B-10X. IHOEC hücrelerinde farklı derişimlerde uygulanan H_2O_2 'nin etkisine ait canlılık yüzdesi grafiğı (MTT denemesi ile elde edilmiştir).

3.2. MTT Hücre Canlılık Testi

Farklı derişimlerde H_2O_2 ve 24 saat maruz bırakılan IHOEC (Ölümsüz İnsan Over Epitel Hücreleri) Hücrelerinde bu süre sonunda MTT Kiti yardımıyla Hücrede Canlılık analiz edilmiştir.

IHOEC Hücrelerinin Farklı H₂O₂
Derişimlerdeki
Yüzde Canlılık Grafiğı (MTT)

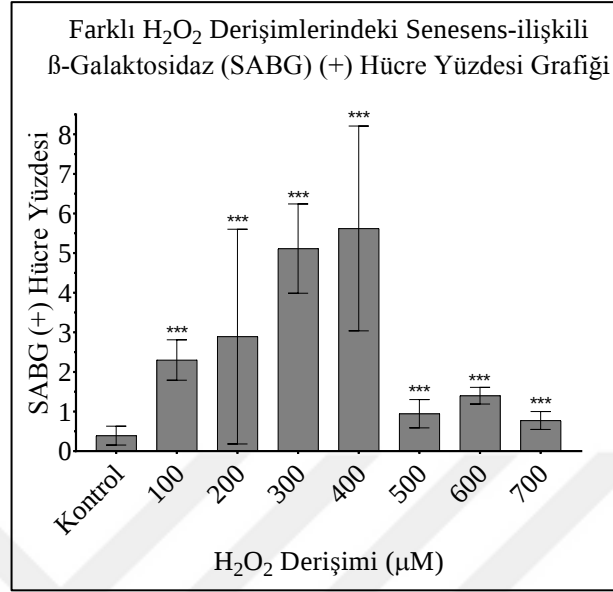


Şekil 3.2. 24. Saat sonunda IHOEC hücrelerinde yüzde canlılık oranları IC₅₀=766,5 µM.

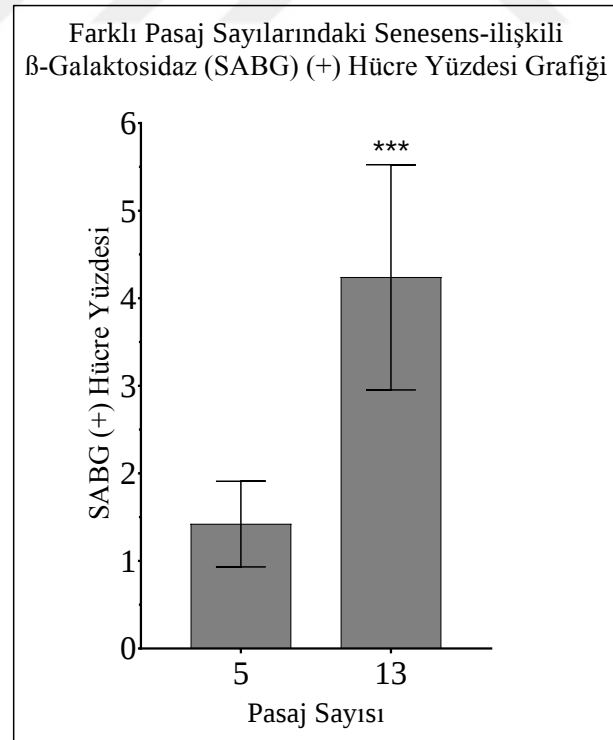
Çizelge 3.1. MTT yüzde canlılık oranları.

Gruplar	Yüzde canlılık
Kontrol Hücre	100
100µM H ₂ O ₂	96,92843248
200µM H ₂ O ₂	88,17446504
300µM H ₂ O ₂	87,74444558
400µM H ₂ O ₂	81,14057541
500µM H ₂ O ₂	74,10668578
600µM H ₂ O ₂	68,36285451
700µM H ₂ O ₂	61,66683731
800µM H ₂ O ₂	46,12470564
900µM H ₂ O ₂	33,59271015
1000µM H ₂ O ₂	19,50

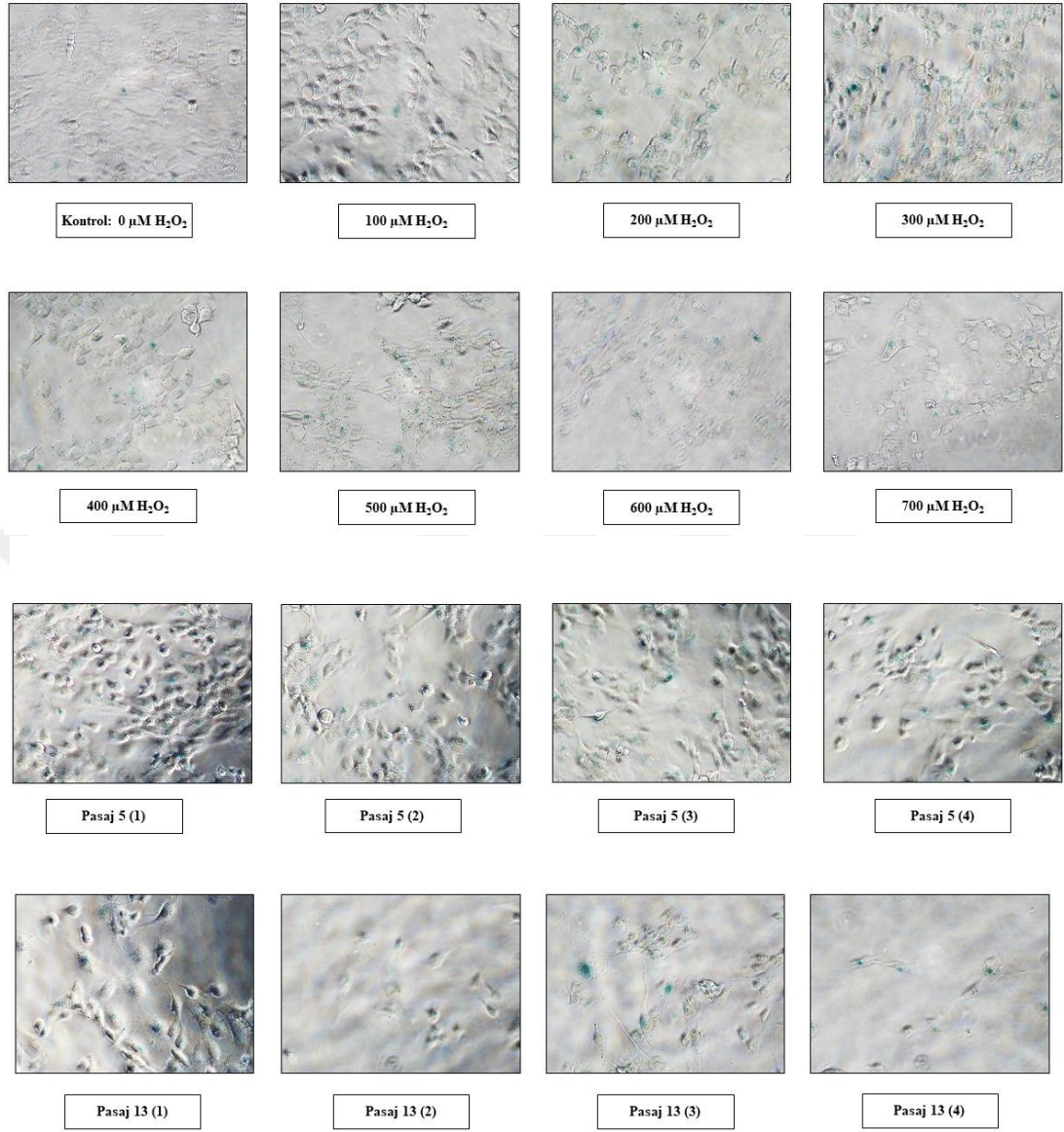
3.3. Senesens Alakalı Beta Galatozidaz Aktivitesi



Şekil 3.3. H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de SABG Boyamada Beta Galatozidaz aktivitesi.

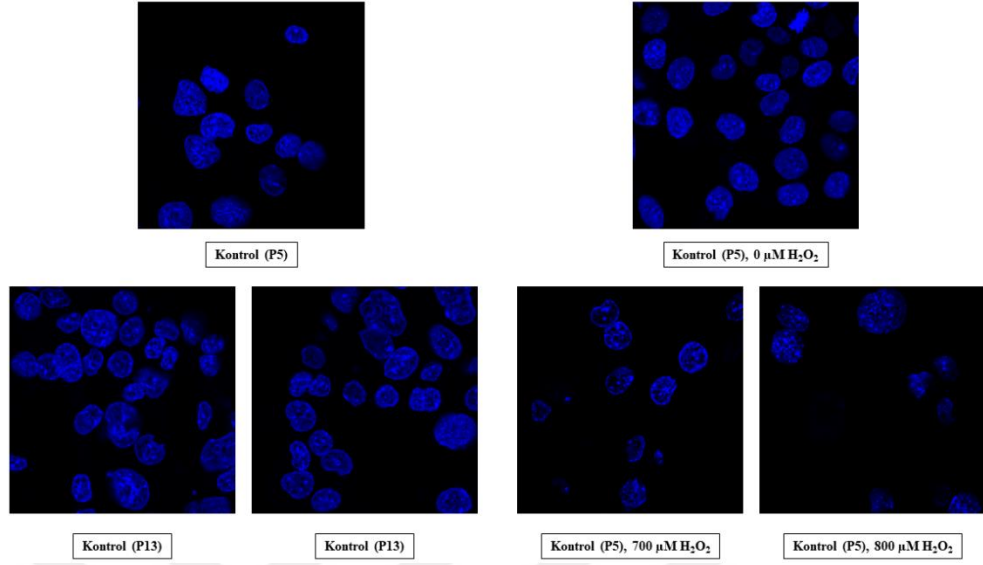


Şekil 3.4. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13 SABG Boyamada Beta Galatozidaz aktivitesi.



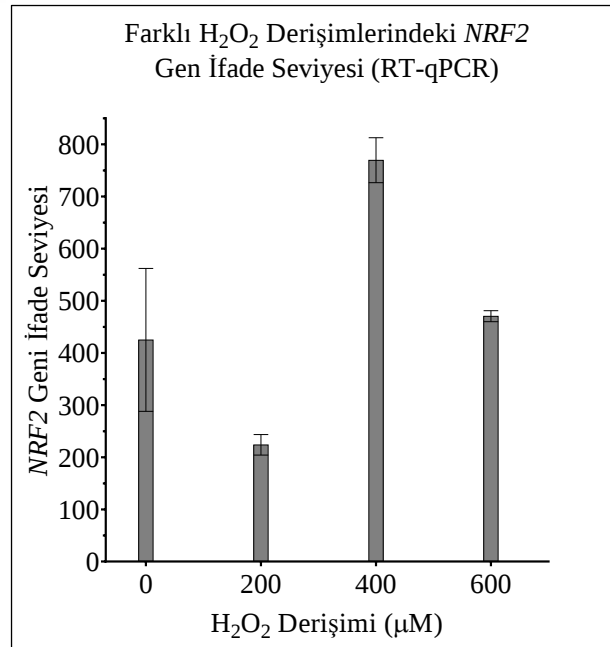
Şekil 3.5. Beta Galatozidaz aktivitesi (SABG) gösteren ters ışık mikroskopi fotoğrafları.

3.4. Senesens Alakalı Heterokromatin Odakları

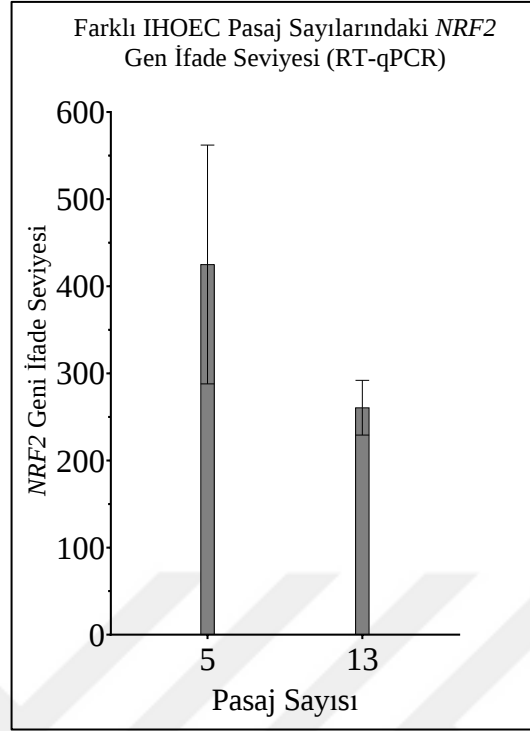


Şekil 3.6. Senesens-ilişkili Heterokromatin Odakları (SAHF).

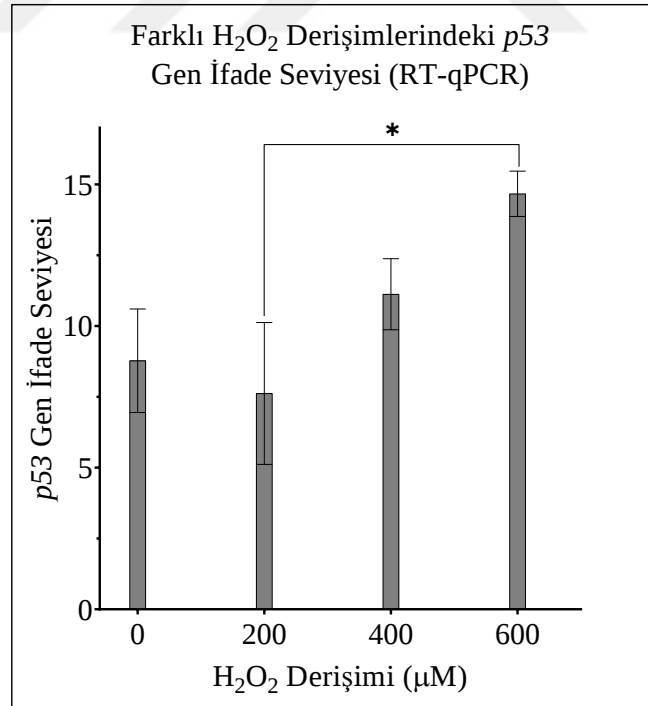
3.5. RT-qPCR



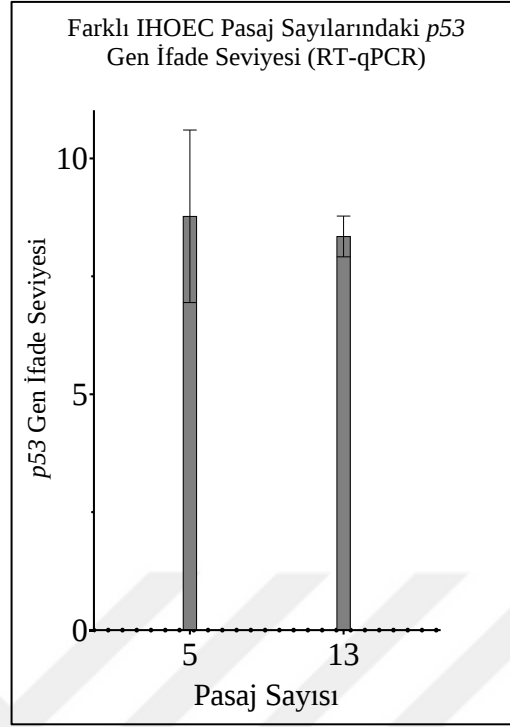
Şekil 3.7. H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *NRF2* Gen ifade seviyesi ($p=0,081$).



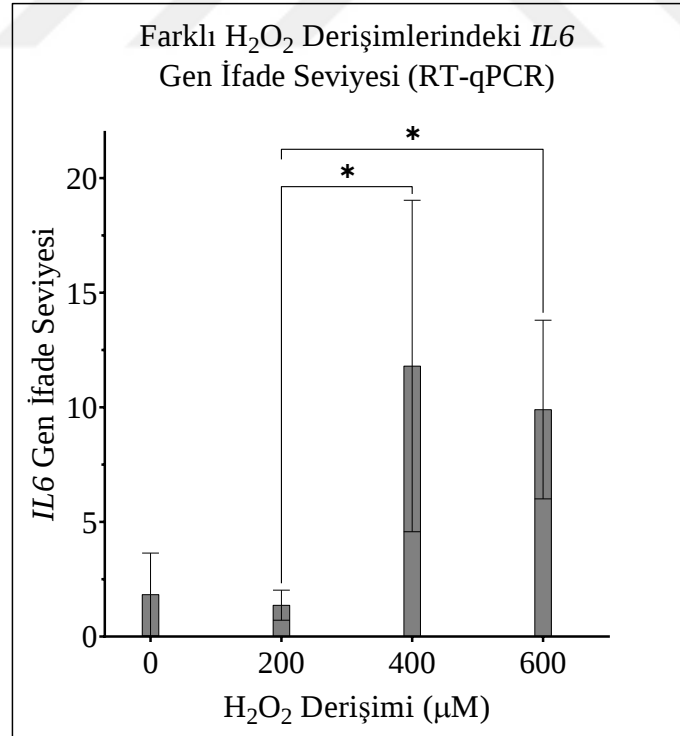
Şekil 3.8. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13 *NRF2* gen ifade seviyesi ($p=0,081$).



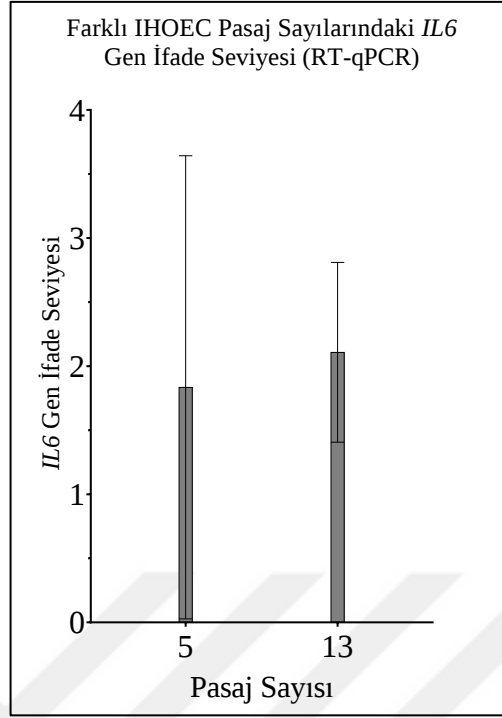
Şekil 3.9. H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *p53* gen ifade seviyesi ($p=0,023$).



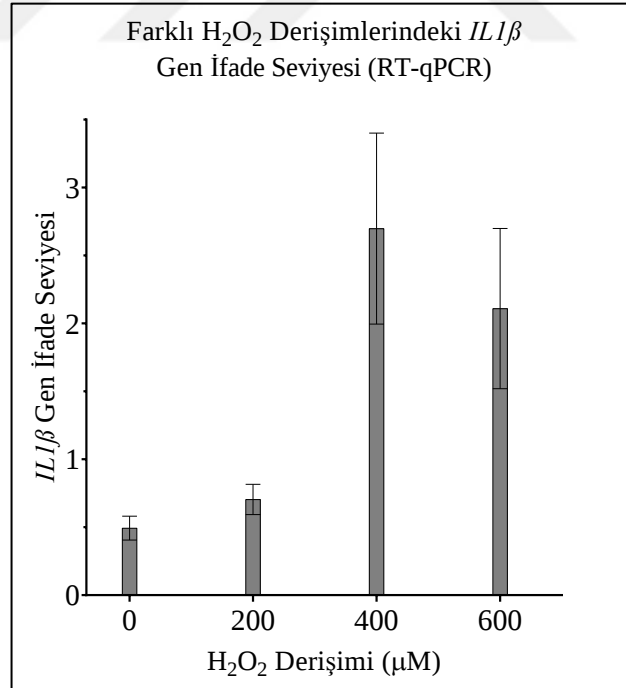
Şekil 3.10. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13 *p53* gen ifade seviyesi.



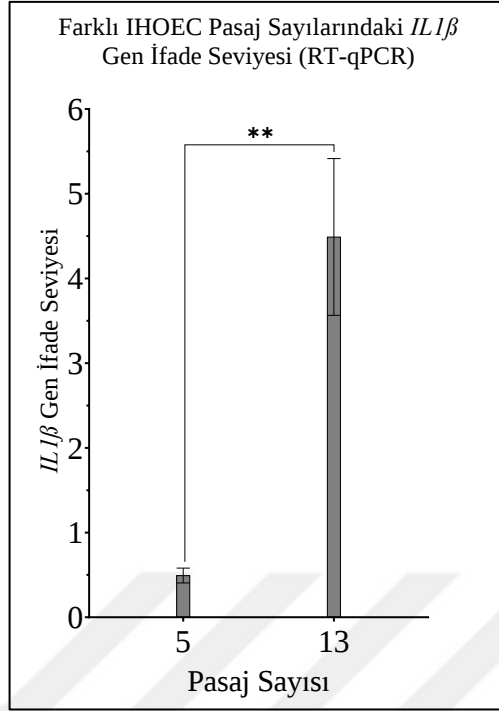
Şekil 3.11. H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *IL6* gen ifade seviyesi ($p=0,072$).



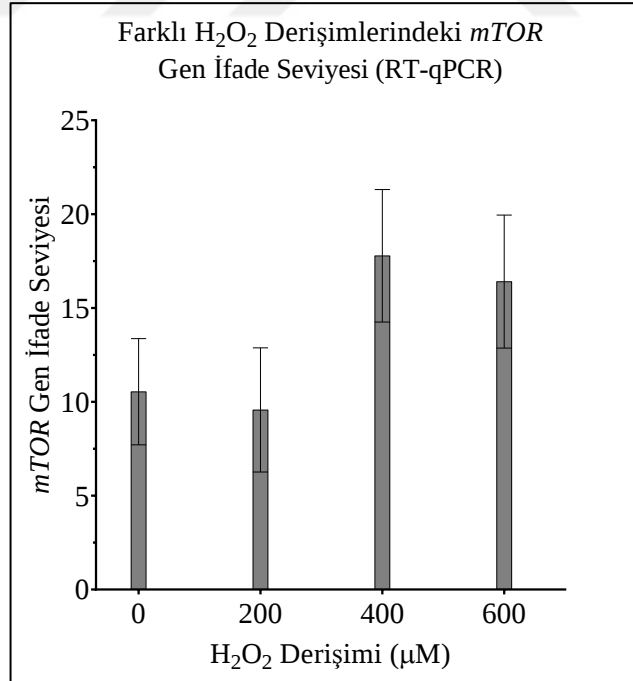
Şekil 3.12. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de *IL6* gen ifade seviyesi.



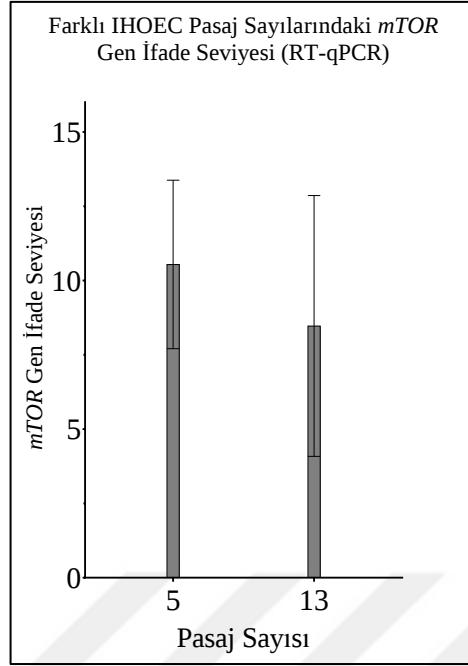
Şekil 3.13. H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *IL-1\beta* Gen ifade seviyesi.



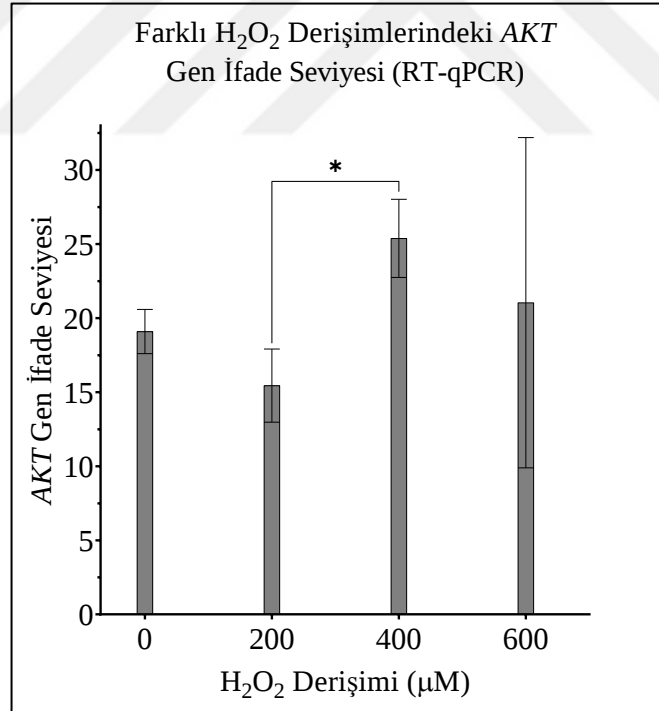
Şekil 3.14. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de *IL-1β* gen ifadesi istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır ($p=0,002$).



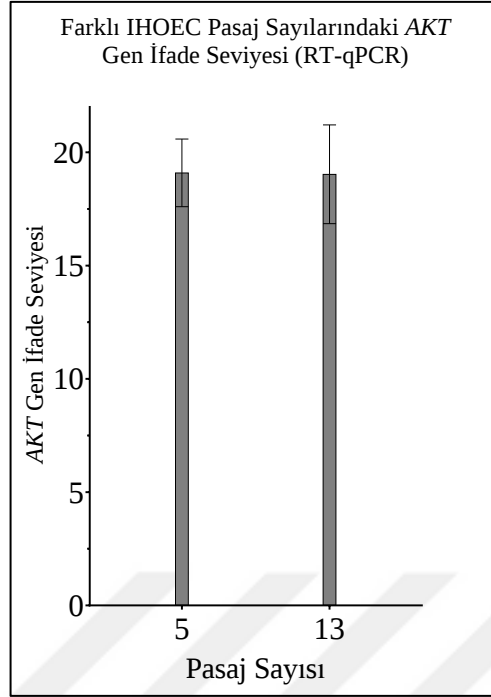
Şekil 3.15. H₂O₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *mTOR* gen ifade seviyesinde artış gözlenmiş, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



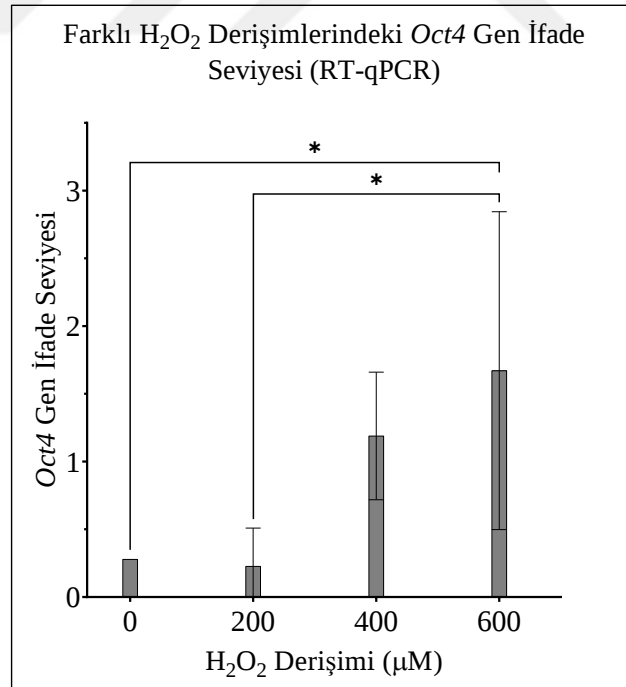
Şekil 3.16. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de *mTOR* gen ifadesi istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim saptanmamıştır.



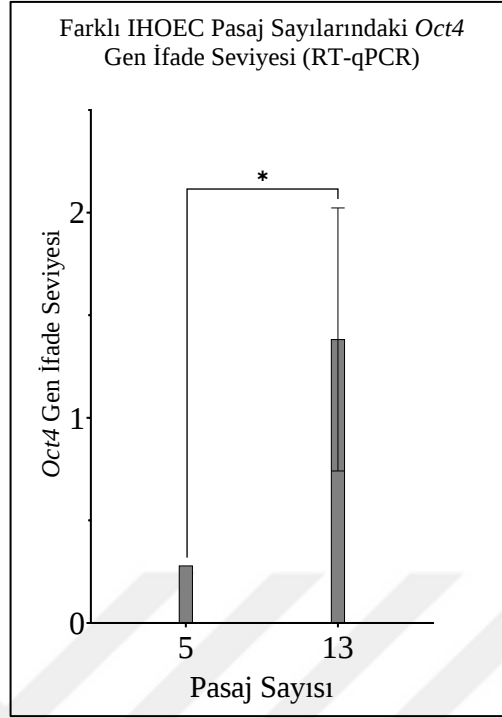
Şekil 3.17. H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *AKT* Gen ifade seviyesi anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p=0,042$).



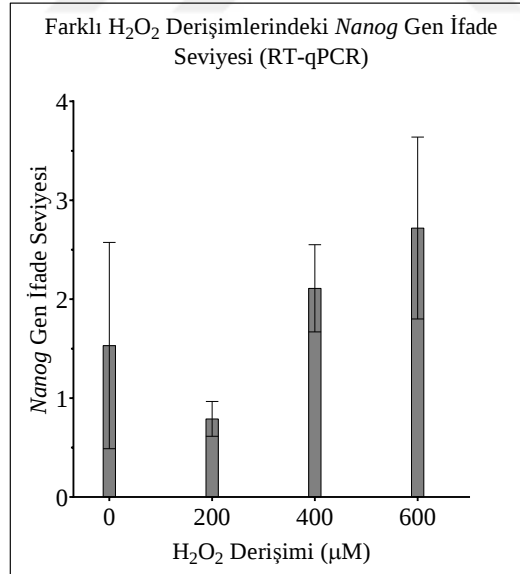
Şekil 3.18. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de *AKT* Gen ifade seviyesinde anlamlı bir artış belirlenmemiştir.



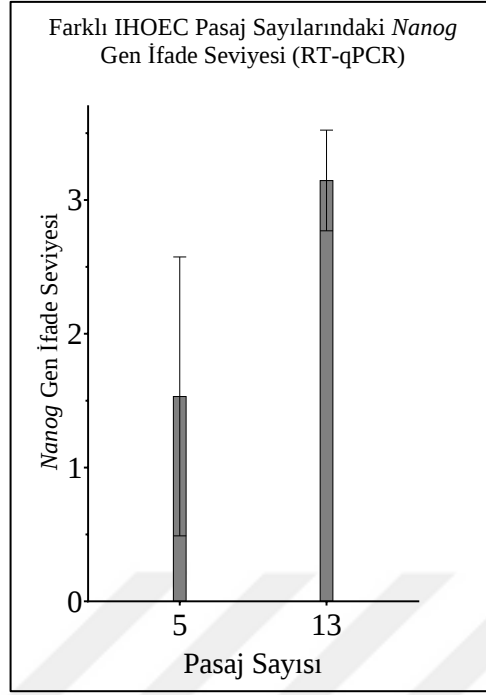
Şekil 3.19. H₂O₂ uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *Oct4* gen ifadesi istatistiksel açıdan sınırda anlamlı çıkmıştır (p=0,077).



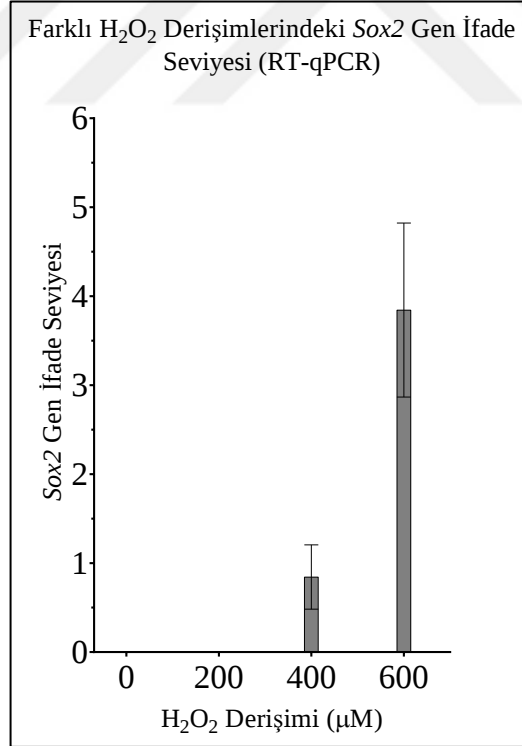
Şekil 3.20. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de *Oct4* gen ifadesi istatistiksel açıdan sınırda anlamlı çıkmıştır ($p=0,077$).



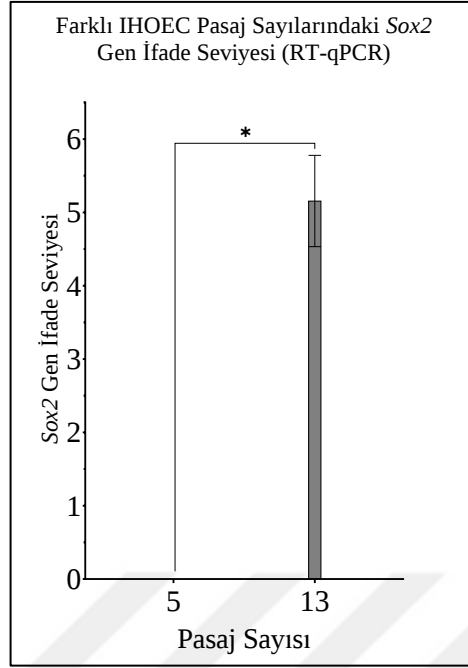
Şekil 3.21. H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *Nanog* gen ifadesinde artış gözlenmiş, ancak istatistiksel anlamlı bulunmamıştır.



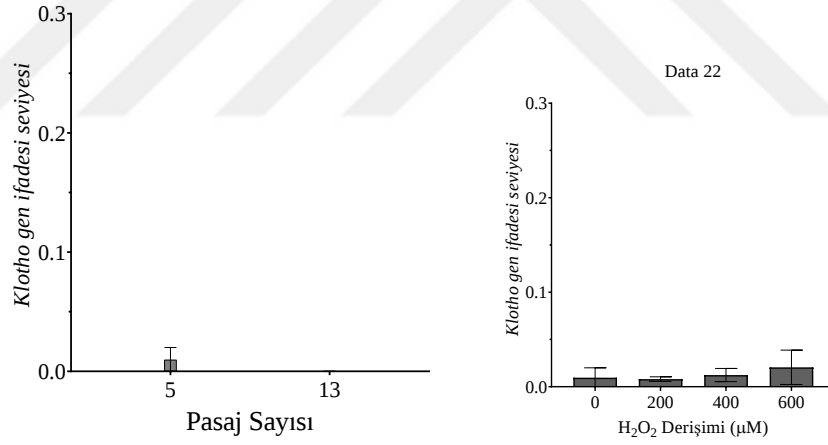
Şekil 3.22. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de *Nanog* gen ifadesinde artış gözlenmiş ancak istatistiksel anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.23. H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *Sox2* gen ifade seviyesinde artış gözlenmiş, ancak istatistiksel anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.24. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de Sox2 gen ifadesinde istatistiksel anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,040).



Şekil 3.25. Klotho IHOEC hücrelerde bazal seviyede gen ifadesi çok düşük olduğundan aging çalışmaları sırasında bu gen ekspresyonunda istatistik olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

Çalışmamızda IHOEC hücreleri iki şekilde yaşlandırılmış olup; birincisinde bu hücreler kültürde pasajlanarak pasaj sayısı artırılmış ve bu hücrelerde yaşlanma modeli gerçekleşmiştir. İkincisinde ise IHOEC’lere 24 saat boyunca 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000µM H₂O₂ dozları uygulanmıştır. MTT sonuçlarına göre 200, 400, 600µM H₂O₂ dozları uygun bulunmuş ve bu dozlarda H₂O₂ uygulanan hücrelerin RT-qPCR’ı yapılmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda Şekil 3.26 ve Şekil 3.8’de gösterildiği gibi NRF2 gen ifadesi açısından istatistik olarak anlamlı fark bulunmamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen bu sonuçlarda NRF2 geninin 400 μM ’da kontrol ve 200 μM ’ H_2O_2 uygulanalara göre arttığı tespit edilmiş olup 600 μM ’da kontrole göre artış gözlenmemiştir (Şekil 3.7-8, Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. NRF2 gen ifadesi analizleri.

Grup NRF2	ortalama	N	Standart sapma	ortanca
Pasaj No: 5, 0 μM H_2O_2	425,0522865	2	137,1315834	425,0522865
Pasaj No: 5, 200 μM H_2O_2	223,9023771	2	19,69910666	223,9023771
Pasaj No: 5, 400 μM H_2O_2	769,5710289	2	43,05696517	769,5710289
Pasaj No: 5, 600 μM H_2O_2	470,5353721	2	10,69027289	470,5353721
Pasaj No: 13	260,5502678	2	31,45462254	260,5502678
Total	429,9222665	10	210,4180196	395,5309108

H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de p53 gen ifadesi 200 μM ve 600 μM H_2O_2 uygulanan IHOEC hücreleri kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır ($p=0,023$) (Şekil 3.27-10, Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. p53 gen ifadesi analizleri.

Grup p53	ortalama	N	Standart sapma	ortanca
Pasaj No: 5, 0 μM H_2O_2	8,773427673	4	1,830250213	8,554816983
Pasaj No: 5, 200 μM H_2O_2	7,620580911	4	2,503260313	7,800504897
Pasaj No: 5, 400 μM H_2O_2	11,12114529	4	1,254263623	10,70896474
Pasaj No: 5, 600 μM H_2O_2	14,66616217	4	,8022545776	14,99666971
Pasaj No: 13	8,345893571	4	,4331910109	8,432975270
Total	10,10544192	20	2,969744210	9,884015541

H₂O₂ Uygulanmasından 24. saat sonrası IHOEC’de *IL6* gen ifadesi 200 µM ve 400 µM H₂O₂ uygulanan IHOEC hücreleri kıyaslandığında istatistiksel açıdan sınırda anlamlı çıkmıştır (p=0,072) ve 200 µM ve 600 µM H₂O₂ uygulanan IHOEC hücreleri kıyaslandığında istatistiksel açıdan sınırda anlamlı çıkmıştır (p=0,072) (Şekil 3.28-12, Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. *IL6* gen ifadesi analizleri.

Grup <i>IL6</i>	ortalama	N	Standart sapma	ortanca
Pasaj No: 5, 0 µM H ₂ O ₂	1,835017309	4	1,807587232	1,822644810
Pasaj No: 5, 200 µM H ₂ O ₂	1,369245469	4	,6548866612	1,284546258
Pasaj No: 5, 400 µM H ₂ O ₂	11,80318447	4	7,228689288	11,90633547
Pasaj No: 5, 600 µM H ₂ O ₂	9,901883358	4	3,898312521	9,500348904
Pasaj No: 13	2,108522209	4	,7022730786	2,071017436
Total	5,403570563	20	5,708493023	3,045838595

IL-1β gen ifadesi ise H₂O₂ uygulanmasından sonra gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark çıkmamıştır. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de *IL-1β* Gen ifadesi istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır (p=0,002) (Şekil 3.29-14, Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. *IL1β* gen ifadesi analizleri.

Grup <i>IL1β</i>	ortalama	N	Standart sapma	ortanca
Pasaj No: 5, 0 µM H ₂ O ₂	,4931764310	4	,0883277220	,4810594550
Pasaj No: 5, 200 µM H ₂ O ₂	,7045183290	4	,1113179133	,7438392020
Pasaj No: 5, 400 µM H ₂ O ₂	2,697733642	4	,7029077488	2,564687596
Pasaj No: 5, 600 µM H ₂ O ₂	2,109071890	4	,5898769681	2,195983306
Pasaj No: 13	4,489863008	4	,9261219868	4,476792765
Total	2,098872660	20	1,582004383	2,125050803

mTOR gen ifadesi ise H₂O₂ uygulanmasından sonra gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark çıkmamıştır. IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de mTOR gen ifadesi istatistiksel açıdan anlamsız çıkmıştır (Şekil 3.30-16, Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. mTOR gen ifadesi analizleri.

Grup mTOR	ortalama	N	Standart sapma	ortanca
Pasaj No: 5, 0 µM H ₂ O ₂	10,54180656	4	2,833754903	11,57386817
Pasaj No: 5, 200 µM H ₂ O ₂	9,567518160	4	3,311852813	10,27448595
Pasaj No: 5, 400 µM H ₂ O ₂	17,78021895	4	3,530617465	17,25379419
Pasaj No: 5, 600 µM H ₂ O ₂	16,40947573	4	3,543469208	16,24283979
Pasaj No: 13	8,472724835	4	4,388243311	10,25648988
Total	12,55434884	20	5,010732626	12,38992413

IHOEC’de pasaj 5 ve pasaj 13’de AKT gen ifadesi istatistiksel açıdan anlamlı çıkmazken, 200 µM ve 400 µM H₂O₂ uygulanan IHOEC hücreleri kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır (p=0,041) (Şekil 3.31-18, Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. AKT gen ifadesi analizleri.

Grup AKT	ortalama	N	Standart sapma	ortanca
Pasaj No: 5, 0 µM H ₂ O ₂	19,09449372	4	1,494508477	19,10919707
Pasaj No: 5, 200 µM H ₂ O ₂	15,44306086	4	2,469425911	15,43656934
Pasaj No: 5, 400 µM H ₂ O ₂	25,38687414	4	2,644355038	26,50281305
Pasaj No: 5, 600 µM H ₂ O ₂	21,04343799	4	11,14905514	24,89477829
Pasaj No: 13	19,03195845	4	2,178459596	19,92237017
Total	19,99996503	20	5,820262772	20,15710562

OCT4 Gen ifadesi kontrol ve 600 µM H₂O₂ uygulanan IHOEC hücreleri kıyaslandığında, pasaj 5 ve p13 kıyaslandığında, 200 µM ve 600 µM H₂O₂

uygulanen IHOEC hücreleri kıyaslandığında istatistiksel açıdan sınırda anlamlı çıkmıştır ($p=0,077$) (Şekil 3.32-20, Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. *OCT4* gen ifadesi analizleri.

Grup <i>OCT4</i>	ortalama	N	Standart sapma	ortanca
Pasaj No: 5, 0 μM H_2O_2	,0930033817	3	,1610865823	0E-11
Pasaj No: 5, 200 μM H_2O_2	,2267551093	3	,2821757878	,0688280520
Pasaj No: 5, 400 μM H_2O_2	,7925800937	3	,7631116394	,8554005460
Pasaj No: 5, 600 μM H_2O_2	1,671042264	3	1,173180024	1,291540276
Pasaj No: 13	1,382144191	3	,6408430254	1,655643398
Total	,8331050078	15	,8747159718	,6499297090

Nanog gen ifadesinde ise H_2O_2 uygulanmasından sonra gruplar arasında ve pasajlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark çıkmamıştır (Şekil 3.33-22, Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. *Nanog* gen ifadesi analizleri.

Grup <i>Nanog</i>	ortalama	N	Standart sapma	ortanca
Pasaj No: 5, 0 μM H_2O_2	1,531661481	3	1,042639826	1,030030733
Pasaj No: 5, 200 μM H_2O_2	,7896708323	3	,1770310300	,8660181690
Pasaj No: 5, 400 μM H_2O_2	2,110568792	3	,4405854401	2,204224111
Pasaj No: 5, 600 μM H_2O_2	2,719963061	3	,9198513242	2,880255546
Pasaj No: 13	3,146018372	3	,3761840572	2,997408021
Total	2,059576508	15	1,039630847	2,204224111

Sox2 gen ifadesi IHOEC’de H_2O_2 uygulanmasından 24. saat sonrası gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklı çıkmazken pasaj 5 ve pasaj 13’de *Sox2* gen ifadesi istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır ($p=0,040$) (Şekil 3.34-24, Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Sox2 gen ifadesi analizleri.

Grup Sox2	ortalama	N	Standart sapma	ortanca
Pasaj No: 5, 0 μ M H ₂ O ₂	0E-11	3	0E-12	0E-11
Pasaj No: 5, 200 μ M H ₂ O ₂	0E-11	3	0E-12	0E-11
Pasaj No: 5, 400 μ M H ₂ O ₂	,8435321077	3	,3611129242	,9479949840
Pasaj No: 5, 600 μ M H ₂ O ₂	3,844961212	3	,9784418003	3,576774372
Pasaj No: 13	5,156001105	3	,6222181004	5,084301416
Total	1,968898885	15	2,252621201	,9479949840

Klotho IHOEC hücrelerde bazal seviyede gen ifadesi çok düşük olduğundan aging çalışmaları sırasında bu gen ekspresyonunda istatistik olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.(Şekil 3.35, Çizelge 3.11).

Çizelge 3.12. Klotho gen ifadesi analizleri.

Grup Klotho	Ortalama	N	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maximum
Kontrol	,0096034150	5	,0104124977	,0066185190	,001320204	,026962173
200	,0080514607	3	,0023965645	,0071836250	,006209710	,010761047
400	,0123586818	5	,0070086876	,0097587820	,006882638	,024115069
600	,0205310280	2	,0181490524	,0205310280	,007697710	,033364346
p13	0E-11	5	0E-12	0E-11	0E-9	0E-9
Total	,0087513461	20	,0094636659	,0070331315	0E-9	,033364346

4. TARTIŞMA

Yaşlanma, hemen hemen tüm doku ve organların işlev bozukluğuna ve yıkımına neden olan kaçınılmaz, ilerleyici bir biyolojik süreçtir. Bu süreç genetik ve edinilmiş faktörler arasında bir şekilde düzenlenmiştir. Yaşlanmanın nihai sonucu ölümdür (Bian ve ark., 2015). Hücresel yaşlanma, strese veya telomer kısalmasına yanıt olarak hücre döngüsünün kalıcı olarak durmasıdır (Zhao ve ark., 2022). Hücresel yaşlanma, 1961 yılında Leonard Hayflick ve Paul Moorhead tarafından tanımlanmıştır. Somatik hücreler sınırlı bir proliferatif kapasiteye sahiptir ve sonunda büyümede "replikatif yaşlanma" olarak adlandırılan geri dönüşü olmayan bir durma gerçekleşir (Hayflick ve Moorhead, 1961). Reaktif oksijen türleri (ROS), DNA hasarını indükleyebilen ve DNA hasar tepkisini (DDR) etkileyebilen kısa ömürlü ve oldukça reaktif bir moleküldür. (Srinivas ve ark., 2019). Oksidatif stres, serbest radikallerin üretimi ile bunların antioksidanlar tarafından bozunması arasındaki dengesizlik durumudur. Bu redoks dengesizliği, artan ROS üretiminin ve azalan antioksidan savunmanın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Normal olarak farklı metabolik süreçlerde üretilen ROS miktarının artması inflamasyonu tetikleyebilir ve lipidler, proteinler, diğer hücresel makromoleküllere zarar vererek oksidatif strese ve hücre ölümüne yol açabilir. Bu nedenle, oksidatif stres çok çeşitli metabolik bozuklukların ve kronik hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (Hassanein ve ark., 2020). Ovaryum, kadınlarda üreme ve hormonal işlevleri yerine getiren organdır. Burada üretilen oosit, granüloza ve teka hücreleri ile birlikte bulunmaktadır (Xie ve ark., 2020). ROS'un fazlalığı foliküler atrezi, oosit kalitesinde azalma ve over yaşlanmasına yol açmaktadır (Xie ve ark., 2021). Modern yaşlanma anlayışı, yaşlanma sırasında hücresel hasarın birikmesine dayanmaktadır. Stres, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerin sürekli etkisine yanıt olarak rejeneratif mekanizmaların kademeli olarak bozulması artan morbidite ve ölüme yol açmaktadır. Ovaryan yaşlanmasının altında yatan mekanizmayı açıklamak için serbest radikal teorisi, apoptoz, telomer kısalması, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamasyon teorisi dahil olmak üzere çeşitli teoriler önerilmiştir (Shi ve diğerleri, 2016; Regan ve diğerleri, 2018a; Huang Y ve diğerleri., 2019; Kasapoğlu ve Seli, 2020; Wang ve diğerleri, 2020). Klasik bir

yaşlanma teorisi olan serbest radikal teorisi, yüksek hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinin neden olduğu oksidatif stresin, memelilerde hücresel yaşlanmaya ve yaşlanmaya en önemli katkıyı sağladığını öne sürer (Liochev, 2013; Zhang H ve diğerleri, 2015). Ayrıca, çok sayıda çalışma, oksidatif stresin ovaryum yaşlanma sürecinin önde gelen itici gücü olduğunu ve telomer kısalması, mitokondriyal işlev bozukluğu, apoptoz ve iltihaplanma gibi ovaryum yaşlanmasıyla ilgili diğer etiyolojilerin gelişimini desteklediğini belgelemiştir (Lim ve Luderer, 2011; Arulselvan ve diğerleri, 2016; Bauer ve diğerleri, 2017; Prasad ve diğerleri, 2017; Takeo ve diğerleri, 2017; Huang ML ve diğerleri, 2019; Sasaki ve diğerleri, 2019; Pineda-Pampliega ve diğerleri, 2020). Oksidatif stresin rolü ayrıca Alzheimer hastalığı, kardiyometabolik hastalıklar, kanser, diyabetes mellitus ve retina distrofileri dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumların patogenezinde giderek daha belirgin hale gelmektedir.

Sağlıklı OSE'lerin işlevi, üreme döngüsü sırasında yumurtlamadan sonra hücrelerin yenilenmesi ve tekrarlanan çoğalmasdır. Önemli fonksiyonların azlığından dolayı OSE, ovaryum dokusunun diğer bileşenlerine kıyasla daha az dikkat çekmiştir. Bununla birlikte, geçtiğimiz birkaç on yılda, üreme biyolojisi alanı, OSE'nin ovaryan kök hücreleri (OSC'ler) içerdiğinin bulunması nedeniyle önemli ölçüde ilerlemiştir. OSC'lerin epitelyal ovaryan karsinomunun patogenezindeki rolü iyi bilinmektedir; bununla birlikte, insan oogenezindeki rolleri tartışmalı olmaya devam etmektedir.

Bu tez projesinde, in vitro IHOEC hücre serilerinde akut oksidan stres bağımlı ve pasaj sayısı bağımlı olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilen yaşlanma sürecinin senesens ilişkili fenotip, kök hücre transkripsiyon faktörleri ve antioksidan sinyal yolları üzerinden araştırılması planlanmıştır.

Son zamanlarda özellikle ovaryum rejenerasyonuna katkısı ve içerdiği kök hücre profili nedeniyle ovarian yüzey epitel hücre serilerinin farklı akut antioksidan uyarım ve pasaj sayısına bağlı yaşlanma süreçlerinde ne tür değişimler geçirdiği analiz edilmeye çalışılmıştır.

Hücre kültürü modelleri, hücresel indüklemeye yoluyla yaşlanma mekanizmalarını araştırmak için değerli araçlardır. Stres kaynaklı erken yaşlanma (SIPS) modellerinde yaşlanma ile ilgili özgün bir araştırmada, dermal fibroblast hücre hatları kullanılarak fibroblastların, replikatif yaşlanmaya sahip hücrelerle benzer yaşlanma özellikleri geliştirdiği belirlenmiştir. En göze çarpan yaşlanma biyobelirteçleri arasında artan β -Gal ifadesi, yüksek seviyelerde p21 proteini, değiştirilmiş hücre döngüsü düzenleyici seviyeleri, farklı hücre dışı matris (ECM) bileşimi, azalmış hücresel canlılık ve gecikmiş yara iyileşmesi tanımlanmıştır.

NRF2, antioksidan glutatyon yolu da dahil olmak üzere sitoprotektif genleri düzenleyerek hücreleri oksidatif strese koruyan birincil transkripsiyon faktörüdür (Chen ve ark., 1997). Klotho, aort düz kas hücreleri, kardiyomiyositler ve epitel hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipinde bir NRF2 indükleyicisidir. NRF2 inhibitörü ile birlikte uygulanması, Klotho geninin aşırı ekspresyonunun sağladığı antioksidan ve anti-apoptozis etkilerini önemli ölçüde ortadan kaldırmıştır. Bu sonuçlar NRF2'nin Klotho tarafından sağlanan korumanın aşağı yönlü bir efektörü olduğunu ve Klotho-NRF2 yolağının oksidatif strese karşı savaşmak için ortak bir mekanizma olabileceğini göstermektedir (Xing ve ark., 2021).

Klotho, antioksidan özelliklere sahip yaşlanma karşıtı bir proteindir. Klotho'nun hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynaklı retina pigment epitel hücrelerinde oluşturduğu hasar ve bununla ilişkili patomekanizmalar üzerindeki koruyucu özelliklerinin araştırıldığı çalışmada Klotho'nun 24 saat ön muamele edilmesinin Bcl-2 seviyelerini yukarı regüle edebildiği, kesilmiş kaspaz-3 ve Bax seviyelerini azaltabildiği, H_2O_2 ile uyarılan ARPE-19 hücre apoptozunu inhibe edebildiği ve hücre proliferasyonunu destekleyebildiği bulunmuştur. Klotho varlığında ARPE-19 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) H_2O_2 aracılı yükselişi engellenmiş, hücrelerin antioksidan aktivitelerini arttırmış ve glutatyon peroksidaz (GPX), süperoksit dismutaz (SOD2), katalaz (CAT) ve ayrıca malondialdehit (MDA) seviyelerini normal seviyeye yaklaştırmıştır. Ayrıca, Klotho uygulanan hücrelerde, Akt fosforilasyonu ve ekspresyonunda artış ve NRF2'nin nükleusa translokasyonunun uyarıldığı belirlenmiştir. Klotho'nun fosfatidilinositol 3 kinaz

(PI3K) /protein kinaz B (Akt)-nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2)/heme oksijenaz 1 (HO-1) sinyal yolunu aktive ettiği ve hücreleri oksidatif streten koruduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında Klotho gen ifadeleneesinin H2O2 ile uyarılan akut okidan stres ve pasaj sayısının artmasına bağlı yaşlanma süreçlerinde anlamlı bir ekspresyon değişikliği gözlenmemiştir. Yaşlanma  ncesi IHOEC hücrelerinde Klotho bazal gen ekspresyonu çok düşük düzeyde bulunmuş ve her iki yaşlanma sürecinde bu gen ifadesinde değişime rastlanmamıştır.

p53 proteini, insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı gen olan TP53 geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsü sürecini ve programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) kontrol eden p53 geni; DNA hasarı, besin eksikliği ve hipoksi gibi çeşitli hücresel strese hücrenin tepkisini belirlemede çok önemli bir rol oynamaktadır (Feroz ve Sheikh, 2020). p53 transkripsiyon faktörüdür ve strese verilen hücresel tepkilerde kritik bir rol oynamaktadır. DNA hasarına yanıt olarak p53 geninin aktivasyonu, hücre büyümesinin durmasına yol açarak DNA onarımına izin verir veya hücresel yaşlanmayı ya da apoptozu tetikleyerek genom bütünlüğünü korur (Mijit ve ark., 2020).

Hücre yaşlanması sırasında, p53' n NRF2 ekspresyonunu ve fonksiyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (Ma ve ark., 2019). Artan p53 ekspresyonu, NRF2 tarafından düzenlenen antioksidan genlerin ekspresyonunu inhibe eder ve hücre içi ROS üretimini teşvik eder, böylece Mdm2 seviyesini düşürür ve P53' n proteazomal degradasyonunu inhibe eder.

Bu çalışmada, pasaja bağlı yaşlanmada NRF2 gen ifadesi yaklaşık iki kat azalırken (bu azalış istatistiksel anlamlı değildir) p53 gen ifadesinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Akut oksidan strese bağlı senesenste (H₂O₂ hücreleri senesense uğratmak amacıyla kullanılmıştır) ise, p53 gen ifadesi artmıştır ve aynı zamanda NRF2 H₂O₂ antioksidan yolağı aktif hale getirdiğinden NRF2 gen ifadesi

artmıştır. H_2O_2 genlerin transkripsiyonlarını yukarı doğru düzenleyerek mRNA stabilitesini ve translasyonu arttırarak transkripsiyon faktörünün (TF) sentezini, çeşitli seviyelerde düzenlenmektedir. H_2O_2 , TP53 ve HIF-1 α 'nın transkripsiyon ve NRF2 translasyon oranını arttırır ve TP53 mRNA stabilitesini düzenleyebilir. mRNA stabilitesi RNA bağlayıcı proteinler ve H_2O_2 tarafından modüle edilen spesifik miRNA tarafından düzenlenmektedir. c-FOS transkripsiyonu, H_2O_2 tarafından aktive edilen mitogen-activated protein kinase (MAP kinaz)' ları tarafından fosforile edilen ETS Like-1 protein (ELK1) tarafından düzenlenir. PI3K/AKT yolunun bir aktivatörü olan H_2O_2 , KEAP1'den bağımsız bir şekilde NRF2'yi aktive eden GSK-3 β 'ü inhibe etmektedir. GSK-3 β 'yi inaktive eden diğer kinazlar ERK, p38 MAPK ve PKC'dir ve bu kinazların GSK-3 β 'yi inhibe ederek dolaylı olarak NRF2'yi düzenleyebileceği öne sürülmüştür. Tüm bu kinazların H_2O_2 tarafından aktive edildiği bilinmektedir ve dolayısıyla NRF2'nin H_2O_2 tarafından düzenlenmesine de aracılık edebilirler. H_2O_2 'in yüksek konsantrasyonlarına uzun süre maruz kalma, bir NRF2 sonlandırma sinyali olabilecek şekilde GSK-3 β 'yi aktive etmiştir. Öte yandan, H_2O_2 ile kısa süreli inkübasyon GSK-3 β 'yi inhibe ederek NRF2'yi aktive edebilmektedir (Marinho ve ark., 2014). Oksidatif stres, Akt ve PI3K'yı (fosfatidilinositol-3-kinaz) aktive eder, böylece GSK3 β 'yi ve buna bağlı olarak NRF2'nin proteazomal yıkımını inhibe eder. NRF2, antioksidan sistem, otofaji, p53 ile genom bütünlüğünün korunması, AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), nükleer faktör- κ B (NF- κ B) dahil olmak üzere çok sayıda sinyal yolunu etkilemektedir (Zinovkin ve ark., 2022). Akt/GSK-3, apoptoz, transkripsiyon, hücre proliferasyonu ve endoplazmik retikulum stres tepkisini içeren çoklu hücresel süreçleri düzenleyen bir dizi sinyal iletim yolunun odak noktası olarak ortaya çıkmıştır. Yukarı yöndeki sinyal molekülleri PI3K / Akt, GSK-3 β 'yi negatif olarak düzenlediğinden, PI3K / Akt yollarının aktivasyonu nöroproteksiyon ile ilişkili olabilir (Golpich ve ark., 2015). Yaptığımız çalışmada NRF2 ve AKT gen ekspresyon seviyeleri uyumlu çıkmıştır. NRF2 mTOR üzerinden AKT gen ekspresyon seviyelerini (sağkalım yolağı) düzenleyerek kök hücre aktivitesini arttırmaktadır. mTOR, insanlarda mTOR geni tarafından kodlanan bir serin/treonin kinazdır; bu kinaz, fosfatidilinositol-3 kinaz ilişkili kinazların (PIKK) bir üyesidir (Wang ve ark., 2011). NRF2 seviyelerinin yaşlanma ile azaldığı ve NRF2 geninin susturulmasının erken yaşlanmaya neden olduğu gösterilmiştir.

Uzun süreli kronik inflamasyon vücutta yaşlanmayı hızlandırır. Çok sayıda kanıt, kronik enflamasyonun ovaryum yaşlanması ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Klinik çalışmalar, IL-6'nın serum düzeylerinin, erken ovaryum yetmezliği (POI) hastalarında, aynı yaştaki sağlıklı kadınlara göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuştur (Sanverdi ve ark., 2018). NLRP3, NLR ailesindendir ve inflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır. NLRP3 azalmasından sonra proinflamatuvar sitokinlerin seviyeleri aşağı doğru düzenlenirken, AMH seviyeleri ve primordial foliküllerin sayısı artar (Navarro-Pando ve ark., 2021). Daha önceki bir çalışma, OS hasarı ürünlerinin (karbonillenmiş ve nitratlanmış proteinler) ve inflamatuvar belirteçlerin (TNF α , IL-1 β) seviyelerinin, yaşlı farelerin ovaryumlarında genç farelere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir (Timóteo-Ferreira ve ark., 2019). Bu çalışmada ise SASP ile uyumlu olarak IL-6 ve IL-1 β gen ekspresyon düzeyi yaşlanmada 4,5 kat artmıştır, ve Sanverdi ve ark.'nın 2018'de ve Timóteo-Ferreira ve ark.'nın 2019'da yaptıkları çalışmalar ile uyumludur.

β -galaktosidaz (SA- β -Gal) analizi hücre yaşlanmasının güvenilir bir belirteçidir. IL-1 stres kaynaklı erken yaşlanmada rol oynamaktadır. Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, IL-1 β ile uyarılan nucleus pulposus hücrelerinde SA- β -Gal'in önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (Yang ve ark., 2019). Yaptığımız β -galaktosidaz (SA- β -Gal) analizinde 400 μ M'nin üzerindeki dozlarda H₂O₂ uygulanan hücrelerde IL-6 ve IL-1 β gen ifadesi ve β -galaktosidaz oranı azalmıştır H₂O₂ daha iyi bir yaşlanma fenotipini yansıttığı belirlenmiş ve senesensi en iyi yansıtan konsantrasyon 400 μ M olarak belirlenmiştir.

NRF2, nöroektoderm türevini baskılamak için doğrudan pluripotens genleri *OCT4* ve *Nanog*'un ekspresyonlarını teşvik etmek bu genlerin yukarı yöndeki bölgelerine bağlanmaktadır (Dai ve ark., 2020). NRF2'nin bazal seviyede ekspresyon seviyesi fazla olduğundan OCT4, NANOG ve Sox2 ekspresyon seviyeleri de yüksek çıkmıştır. NRF2 kök hücre özelliğinin devam ettirilmesinde görev almaktadır. Bu çalışmada Dai ve ark.'nın 2020'de yaptıkları çalışmaya benzer bir sonuç bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan bu tez projesi kapsamında sağlıklı over yüzey epitel hücre (IHOEC) serilerinde in vitro iki senesens modeli başarıyla oluşturulmuştur.

1. Oksidan stres (OS) kaynaklı akut senesens ve ileri pasaj ile oluşan senesens SA- β -Gal ve DAPI boyama yöntemi ve SASP belirteçleri ile takip edilmiştir.

2. SASP ürünleri *IL-1 β* ve *IL6* gen ifade düzeylerinde artış gözlenmiştir.

3. *Klotho* geninin IHOEC hücrelerinde düşük düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir. *Klotho* gen ifadesi H₂O₂ ile uyarılan akut OS durumunda bir miktar artış gözlenirken ileri pasaj hücrelerinde miktarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

4. *NRF2* gen ifadesinin H₂O₂ ile uyarılan OS senesens de artış gözlenmiştir.

5. *Klotho*'nun antioksidan enzimlerin ifadesini HO üzerinden stimüle eden *NRF2* geninin ifadesini uyardığı bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında IHOEC hücrelerinde sadece H₂O₂ ile uyarılan OS senesensde *Klotho* ifade artışı ile uyumlu *NRF2* gen ifadesinin arttığı belirlenmiştir.

6. *mTOR/AKT* yolağı akut oksidan stres ile oluşturulan modelde uyarıldığı belirlenmiş ancak ileri pasajda ise bu gen ifadelerinde değişim gözlenmemiştir.

7. *p53* sadece akut OS ile indüklenen senesens hücrelerinde anlamlı bir artış göstermiştir.

7. OSE (Ovaryum Yüzey Epitel) hücrelerinin hem folikül gelişiminden, rejenerasyondan hem de sağ kalımdan sorumlu olduğu ve ayrıca kanser için niş oluşturduğu bildirilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında iki farklı senesens modelinde kök hücre belirteçlerinin ifade değişimi de araştırılmıştır.

Sağlıklı over insan epitel hücrelerinde in vitro yaşlanma için geliştirilen her iki senesens modelinde; kök hücre belirteçlerinin özellikle ovaryum folikül rejenerasyonundan sorumlu en önemli gen olarak bilinen *OCT4* ve *Sox2* ekspresyonlarının arttığı ilk kez bu tez çalışmasında belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında OSE hücrelerinde yaşlanma çalışmalarında kullanılmak üzere senolitiklerin uygulanabileceği veya kanser gelişimi konusunda kullanılabilecek iki farklı senesens modeli kurgulanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda yaşlanma karşıtı ilaç, vb. uygulamaları planlanmıştır.

ÖZET

Yaşlanma Sürecinde Klotho Geninin İfade Düzeyinin İncelenmesi

Yaşlanma zamana bağlı olarak canlı organizmada görülen anatomik ve fizyolojik değişikliklerdir. Moleküler düzeyde yaşlanmada genomik kararsızlık (özellikle DNA hasarının olması), telomer kısalması ve epigenetik değişiklikler görülürken hücresel yaşlanmada kök hücrelerin tükenmesi mitokondrilerin fonksiyonunun bozulması ile oluşan oksidatif stresin artması, hücreler arası iletişimin bozulması, hücrelerde lizozomal enzim aktivitesinin artması ve hücre çoğalmasının durması görülmektedir. Ovaryum, kadınlarda üreme ve hormonal işlevlerini yerine getiren üreme endokrin organıdır. Yaşlanma ile birlikte kadın doğurganlığında doğal bir düşüş görülmektedir. ROS, ovaryumda oosit olgunlaşmasından döllenmeye kadar birçok fizyolojik ve patolojik aktivitede rol oynamaktadır. ROS'un aşırı miktarda artması OS'ye yol açarak ovaryum yaşlanmasına neden olmaktadır.

NRF2, antioksidan ve sitoprotektif genleri düzenleyerek hücreleri oksidatif stresten koruyan bir transkripsiyon faktörüdür. Ovaryum hücrelerinde NRF2 gen ifadesinin artmasının antioksidan genleri tetiklediği ve ovaryum fonksiyonunu koruduğu gösterilmiştir.

Klotho yaşlanma baskılayıcı bir gendir. Yapılan çalışmalarda Klotho gen ifadesinin artmasının yaşam süresini uzattığı, Klotho gen ifadesinin azalmasının ise yaşlanma sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir. Ancak sağlıklı insan over yüzey epitel hücrelerinde (IHOEC) *in vitro* çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez kapsamında sağlıklı insan over yüzey epitel hücrelerinde; oksidan stres kaynaklı senesens ve ileri pasaj ile oluşan senesens olmak üzere iki ayrı senesens hücre modelinin oluşturulması amaçlanmıştır. Öncelikle bu iki senesens modelinin SA-β-Gal ve SAHF analizleri ile doğrulanmıştır.

Başarıyla oluşturulan iki farklı senesens modelinde; antioksidan yolak (alfa-KLOTHO, NRF2), SASP belirteçleri (p53, IL6, IL1-beta), kök hücre belirteçleri (Oct4, Nanog, Sox2) ve sağ kalım ile ilişkili olarak (mTOR, AKT) genlerinin ifadeleri QRT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

İleri pasaj IHOEC hücrelerinde hem Klotho hem de NRF2 gen ifadesi azalmıştır. H₂O₂ ile oluşturulan akut OS senesens modelinde ise artan Klotho ifadesinin NRF2 gen ifadenmesine benzer şekilde arttığı belirlenmiştir.

Over yüzey epitel (OSE) hücreleri kök hücre özelliklerine sahiptir. OSE hücreleri epitel hücrelerin çoğalmasında, folikül, granüloza ve teka hücrelerinin üretiminde ve yenilenmesinde rol oynamaktadır. Sox2, OCT4 ve NANOG farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesi veya pluripotensi için gerekli olan transkripsiyon faktörleridir. Her iki senesens modelinde OCT-4 ve SOX-2 gen ifadenmelerinde artış gözlenmiştir.

Bu tez, IHOEC hücrelerinde oluşturulan *in-vitro* senesensde Klotho ve NRF2 gen ifadesinin ve kök hücre belirteçlerindeki değişimin gözlendiği ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Hücresel Yaşlanma, KLOTHO, NRF2, Over Yüzey Epitel Hücreleri, ROS, Senesens.

SUMMARY

Investigation of Expression Level of Klotho Gene in the Aging Process

Aging is the anatomical and physiological changes observed in a living organism depending on time. At the molecular level, genomic instability (especially DNA damage), telomere shortening and while epigenetic changes are observed, depletion of stem cells in cellular aging, increase in oxidative stress caused by deterioration of the function of mitochondria, deterioration of intercellular communication, increase in lysosomal enzyme activity in cells and cessation of cell proliferation are observed. The ovary is the reproductive endocrine organ that performs reproductive and hormonal functions in women. There is a natural decline in female fertility with aging. ROS play a role in many physiological and pathological activities in the ovary, from oocyte maturation to fertilization. Excessive increase in ROS leads to OS and causes ovarian aging.

NRF2 is a transcription factor that protects cells from oxidative stress by regulating antioxidant and cytoprotective genes. It has been shown that increased NRF2 gene expression in ovarian cells triggers antioxidant genes and protects ovarian function. Klotho is an aging suppressor gene.

Studies have shown that an increase in Klotho gene expression prolongs lifespan, and a decrease in Klotho gene expression accelerates the aging process. However, no *in vitro* study was found in healthy human ovarian surface epithelial cells (IHOEC).

Within the scope of this thesis, in healthy human ovarian surface epithelial cells; In this study, it is aimed to create two different senescence cell models, namely oxidant stress-induced senescence and advanced passage-induced senescence.

Firstly, these two senescence models were validated by SA- β -Gal and SAHF analyzes. Expressions of antioxidant pathway (α -KLOTHO, NRF2), SASP markers (p53, IL6, IL1- β), stem cell markers (OCT4, NANOG, Sox2) and survival-related (mTOR, AKT) genes were investigated by QRT-PCR method in two successfully created senescence models.

Both Klotho and NRF2 gene expression were decreased in forward passage IHOEC cells. In the acute OS senescence model created with H₂O₂, it was determined that increased Klotho expression increased similarly to NRF2 gene expression.

Ovarian surface epithelial (OSE) cells have stem cell properties. OSE cells play a role in the proliferation of epithelial cells, the production and regeneration of follicle, granulosa and theca cells. Sox2, OCT4 and NANOG are transcription factors necessary for the self-renewal or pluripotency of undifferentiated embryonic stem cells. An increase in OCT-4 and SOX-2 gene expression was observed in both senescence models.

This thesis is the first study in which the expression of Klotho and NRF2 genes and the change in stem cell markers were observed in *in-vitro* senescence generated in IHOEC cells.

Keywords: Cellular Aging, KLOTHO, NRF2, Ovarian Surface Epithelial Cells, ROS, Senescence.

KAYNAKLAR

- ACOSTA JC, BANITO A, WUESTEFELD T, GEORGILIS A, JANICH P, MORTON JP, ... GIL J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology*, **15**(8): 978-990.
- ACOSTA JC, O'LOGHLEN A, BANITO A, GUIJARRO MV, AUGERT A, RAGUZ S, ... GIL J. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, **133**(6): 1006-1018.
- AHMED TA, AHMED SM, EL-GAMMAL Z, SHOUMAN S, AHMED A, MANSOUR R, EL-BADRI N. (2019). Oocyte Aging: The Role of Cellular and Environmental Factors and Impact on Female Fertility. *Cell Biology and Translational Medicine*, **8**: 109-123.
- AIRD KM, IWASAKI O, KOSSENKOV AV, TANIZAWA H, FATKHUTDINOV N, BITLER BG, ... ZHANG R. (2016). HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci. *Journal of Cell Biology*, **215**(3): 325-334.
- AKIMOTO T, YOSHIZAWA H, WATANABE Y, NUMATA A, YAMAZAKI T, TAKESHIMA E, ... KUSANO E. (2012). Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. *BMC nephrology*, **13**(1): 1-9.
- ALIMONTI A, NARDELLA C, CHEN Z, CLOHESSY JG, CARRACEDO A, TROTMAN LC, ... PANDOLFI PP. (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.
- ANOUR R, ANDRUKHOVA O, RITTER E, ZEITZ U, AND ERBEN RG. (2012). Klotho lacks a vitamin D independent physiological role in glucose homeostasis, bone turnover, and steady-state PTH secretion in vivo. *PLoS One* **7**: e31376.
- ARUMUGAM T, PILLAY Y, GHAZI T, NAGIAH S, ABDUL NS, CHUTURGOON AA. (2019). Fumonisin B1-induced oxidative stress triggers NRF2-mediated antioxidant response in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Mycotoxin research*, **35**(1): 99-109.

- BAKER DJ, CHILDS BG, DURIK M, WIJERS ME, SIEBEN CJ, ZHONG J, ... VAN DEURSEN JM. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, **530**(7589): 184-189.
- BAKER DJ, WIJSHAKE T, TCHKONIA T, LEBRASSEUR NK, CHILDS BG, VAN DE SLUIS B, KIRKLAND JL, VAN DEURSEN JM. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**: 232–236.
- BARTKOVA J, REZAEI N, LIONTOS M, KARAKAIDOS P, KLETSAS D, ISSAEVA N, ... GORGOLIS VG. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, **444**(7119): 633-637.
- BARNES CJ, CAMERON IL, PULEO-SCHEPPKE B, LEE M. (1998). Age alters expression and inducibility of heme oxygenase isozymes in mice. *Age (Omaha)*, **21**(3): 123–128.
- BASISTY N, KALE A, JEON OH, KUEHNEMANN C, PAYNE T, RAO C, ... SCHILLING B. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS biology*, **18**(1): e3000599.
- BEN-DOV IZ, GALITZER H, LAVI-MOSHAYOFF V, GOETZ R, KURO-O M, MOHAMMADI M, ... SILVER J. (2007). The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *The Journal of clinical investigation*, **117**(12): 4003-4008.
- BEUREL E. (2011). Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases. *Frontiers in molecular neuroscience*, **4**: 18.
- BIAN A, NEYRA JA, ZHAN M, HU MC. (2015). Klotho, stem cells, and aging. *Clinical interventions in aging*, **10**: 1233.
- BIELAK-ZMIJEWSKA A, GRABOWSKA W, CIOLKO A, BOJKO A, MOSIENIAK G, BIJOCH L, SIKORA E. (2019). The role of curcumin in the modulation of ageing. *International journal of molecular sciences*, **20** (5): 1239.
- BIJUR GN, JOPE RS. (2003). Glycogen synthase kinase-3 β is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*, **14**(18): 2415-2419.
- BIRAN A, ZADA L, ABOU KARAM P, VADAI E, ROITMAN L, OVADYA Y, PORAT Z, KRIZHANOVSKY V. (2017). Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell* **16**: 661-671.
- BIRCH J, GIL J. (2020). Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes & development*, **34**(23-24): 1565-1576.

- BLAU JE, COLLINS MT. (2015). The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **16**(2): 165-174.
- BOOKOUT AL, DE GROOT MH, OWEN BM, LEE S, GAUTRON L, LAWRENCE HL, ... KLIEWER SA. (2013). FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nature medicine*, **19**(9): 1147-1152.
- CAMPISI J, D'ADDA DI FAGAGNA F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 729–740.
- CECCONI S, MAURO A, CELLINI V, PATACCHIOLA F. (2013). The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *International Journal of Developmental Biology*, **56**(10-11-12): 809-817.
- CHA SK, ORTEGA B, KUROSU H, ROSENBLATT KP, KURO-O M, HUANG CL. (2008). Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105**: 9805–10.
- CHA SK, HU MC, KUROSU H, KURO-O M, MOE O, AND HUANG CL. (2009). Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K (+) excretion by Klotho. *Mol. Pharmacol.* **76**: 38–46.
- CHANG Q, HOEFS S, VAN DER KEMP AW, TOPALA CN, BINDELS RJ, and HOENDEROP JG. (2005). The beta-glucuronidase Klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science*, **310**: 490–493.
- CHEHAB NH, MALIKZAY A, STAVRIDIS ES, HALAZONETIS TD. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(24): 13777-13782.
- CHEN H, RUIZ PD, MCKIMPSON WM, NOVIKOV L, KITSIS RN, GAMBLE MJ. (2015). MacroH2a1 and ATM play opposing roles in paracrine senescence and the senescence-associated secretory phenotype. *Mol Cell* **59**: 719-731.
- CHEN J, ZHANG Z, CAI L. (2014). Diabetic cardiomyopathy and its prevention by NRF2: current status. *Diabetes metabolism journal*, **38**(5): 337-345.
- CHEN B, LU Y, CHEN Y, CHENG J. (2015). The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J Endocrinol*, **225**(3): 83-99.

- CHEN K, WANG S, SUN QW, ZHANG B, ULLAH M, SUN Z. (2021). Klotho deficiency causes heart aging via impairing the NRF2-GR pathway. *Circulation research*, **128**(4): 492-507.
- CHIANG JL, SHUKLA P, PAGIDAS K, AHMED NS, KARRI S, GUNN DD, ... SINGH KK. (2020). Mitochondria in ovarian aging and reproductive longevity. *Ageing Research Reviews*, **63**: 101168.
- CHIANG T, SCHULTZ RM, LAMPSON MA. (2011). Age-dependent susceptibility of chromosome cohesion to premature separase activation in mouse oocytes. *Biology of reproduction*, **85**(6): 1279-1283.
- CHOWDHRY S, ZHANG Y, MCMAHON M, SUTHERLAND C, CUADRADO A, HAYES JD. (2013). NRF2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene*, **32**(32): 3765-3781.
- CHOI JY, PARK HJ, LEE YJ, BYUN J, YOUN YS, CHOI JH, ... KANG JL. (2013). Upregulation of Mer receptor tyrosine kinase signaling attenuated lipopolysaccharide induced lung inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **344**(2): 447-458.
- CHUPRIN A, GAL H, BIRON-SHENTAL T, BIRAN A, AMIEL A, ROZENBLATT S, KRIZHANOVSKY V. (2013). Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev* **27**: 2356–2366.
- CLARKE HJ. (2018). Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, **7** (1): e294.
- COLING D, CHEN S, CHI LH, JAMESDANIEL S, HENDERSON D. (2009). Age-related changes in antioxidant enzymes related to hydrogen peroxide metabolism in rat inner ear. *Neuroscience letters*, **464** (1): 22-25.
- CONTREPOIS K, COUDEREAU C, BENAYOUN BA, SCHULER N, ROUX PF, BISCHOF O, ... MANN C. (2017). Histone variant H2A. J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nature communications*, **8**(1): 1-18.
- COPPE JP, DESPREZ PY, KRTOLICA A, CAMPISI J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, **5**: 99-118.

- COPPE JP, PATIL CK, RODIER F, SUN YU, MUNOZ DP, GOLDSTEIN J, ... CAMPISI J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, **6**(12): e301.
- CORREIA-MELO C, MARQUES FD, ANDERSON R, HEWITT G, HEWITT R, COLE J, ... PASSOS JF. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO journal*, **35**(7): 724-742.
- CUI W, ZHANG Z, ZHANG P, QU J, ZHENG C, MO X, ... GAO J. (2018). NRF2 attenuates inflammatory response in COPD/emphysema: crosstalk with Wnt3a/ β -catenin and AMPK pathways. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **22**(7): 3514-3525.
- DAI SM, SHAN ZZ, NAKAMURA H, MASUKO-HONGO K, KATO T, NISHIOKA K, YUDOH K. (2006). Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: Possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, **54**(3): 818-831.
- DAI X, YAN X, WINTERGERST KA, CAI L, KELLER BB, TAN Y. (2020). NRF2: redox and metabolic regulator of stem cell state and function. *Trends in Molecular Medicine*, **26**(2): 185-200.
- DAVALOS AR, KAWAHARA M, MALHOTRA GK, SCHAU N, HUANG J, VED U, ... CAMPISI J. (2013). p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *Journal of Cell Biology*, **201**(4): 613-629.
- DENG J, MILLER SA, WANG HY, XIA W, WEN Y, ZHOU BP, ... HUNG MC. (2002). β -catenin interacts with and inhibits NF- κ B in human colon and breast cancer. *Cancer cell*, **2**(4): 323-334.
- DEMARCHI F, BERTOLI C, SANDY P, SCHNEIDER C. (2003). Glycogen synthase kinase-3 β regulates NF- κ B1/p105 stability. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(41): 39583-39590.
- DI MICCO R, FUMAGALLI M, CICALESSE A, PICCININ S, GASPARINI P, LUISE C, ... D'ADDA DI FAGAGNA F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, **444**(7119): 638-642.
- DONATE-CORREA J, MARTIN-NUNEZ E, MORA-FERNANDEZ C, MUROS-DE-FUENTES M, PEREZ-DELGADO N, NAVARRO-GONZALEZ JF.

- (2015). Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. *World journal of biological chemistry*, **6**(4): 351.
- DOU Z, GHOSH K, VIZIOLI MG, ZHU J, SEN P, WANGENSTEEN KJ, ... BERGER SL. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature*, **550**(7676): 402-406.
- DUMONT P, BURTON M, CHEN QM, GONOS ES, FRIPPIAT C, MAZARATI JB, ELIAERS F, REMACLE J, AND TOUSSAINT O. (2000). *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 361-373.
- DRUELLE C, DRULLION C, DESLE J, MARTIN N, SAAS L, CORMENIER J, ... PLUQUET O. (2016). ATF6 α regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget*, **7**(42): 67699.
- DUAN Y, LIAO AP, KUPPIREDDI S, YE Z, CIANCIO MJ, SUN J. (2007). β -Catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation. *Laboratory investigation*, **87**(6): 613-624.
- EWENDT F, FEGER M, FOLLER M. (2021). Role of fibroblast growth factor 23 (FGF23) and α Klotho in cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**: 601006.
- FAN J, SUN Z. (2016). The antiaging gene klotho regulates proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Stem Cells*, **34**(6), 1615-1625.
- FANG Y, CHEN B, LIU Z, GONG AY, GUNNING WT, GE Y, ... GONG R. (2022). Age-related GSK3 β overexpression drives podocyte senescence and glomerular aging. *Journal of Clinical Investigation*, **132**(4): e141848.
- FANO G, MECOCCI P, VECCHIET J, BELIA S, FULLE S, POLIDORI MC, ... BEAL MF. (2001). Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, **22**(4): 345-351.
- FAGAGNA FDAD, REAPER PM, CLAY-FARRACE L, FIEGLER H, CARR P, VON ZGLINICKI T, ... JACKSON SP. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, **426**(6963): 194-198.
- FEROZ W, SHEIKH AMA. (2020). Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, **21**(1): 1-23.
- FINLEY LW, CARRACEDO A, LEE J, SOUZA A, EGIA A, ZHANG J, ... HAIGIS MC. (2011). SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 α destabilization. *Cancer cell*, **19**(3): 416-428.

- FRANCESCHI C, CAMPISI J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **69**: 4-9.
- FREUND A, LABERGE RM, DEMARIA M, CAMPISI J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular biology of the cell*, **23**(11): 2066-2075.
- FRIPPIAT C, CHEN QM, ZDANOV S, MAGALHAES JP, REMACLE J, TOUSSAINT O. (2001). Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor- β 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(4): 2531-2537.
- FUMAGALLI M, ROSSIELLO F, CLERICI M, BAROZZI S, CITTARO D, KAPLUNOV JM, ... D'ADDA DI FAGAGNA F. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature cell biology*, **14**(4): 355-365.
- GALANOS P, VOUGAS K, WALTER D, POLYZOS A, MAYA-MENDOZA A, HAAGENSEN EJ, ... GORGOLIS VG. (2016). Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nature cell biology*, **18**(7): 777-789.
- GARCIA OSORIO F, BARCENA FERNANDEZ C, SORIA VALLES C, RAMSAY AJ, CARLOS VILLAFRANCA FAD, COBO PLANA JM, ... LOPEZ OTIN C. (2012). Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- κ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes and Development*, **26**(20): 2311-2324.
- GAULDEN ME. (1992). Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. *Mutat. Res.* **296**: 69-88.
- GAUTAM N, DAS S, MAHAPATRA SK, CHAKRABORTY SP, KUNDU PK, ROY S. (2010). Age associated oxidative damage in lymphocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **3**(4): 275-282.
- GOLPICH M, AMINI E, HEMMATI F, IBRAHIM NM, RAHMANI B, MOHAMED Z, ... AHMADIANI A. (2015). Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) signaling: implications for Parkinson's disease. *Pharmacological Research*, **97**: 16-26.
- GUREEV AP, POPOV VN, STARKOV AA. (2020). Crosstalk between the mTOR and NRF2/ARE signaling pathways as a target in the improvement of long-term potentiation. *Experimental neurology*, **328**: 113285.

- GRUBER HE, HOELSCHER GL, INGRAM JA, BETHEA S, COX M, HANLEY JR, EN. (2015). Proinflammatory cytokines modulate the chemokine CCL2 (MCP-1) in human annulus cells in vitro: CCL2 expression and production. *Experimental and Molecular Pathology*, **98**(1): 102-105.
- HAMPEL B, MALISAN F, NIEDEREGGER H, TESTI R, JANSEN-DURR P. (2004). Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Experimental gerontology*, **39**(11-12): 1713-1721.
- HARDY K, MANSFIELD L, MACKAY A, BENVENUTI S, ISMAIL S, ARORA P, ... JAT PS. (2005). Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts. *Molecular biology of the cell*, **16**(2): 943-953.
- HASSANEIN EH, SAYED AM, HUSSEIN OE, MAHMOUD AM. (2020). Coumarins as modulators of the Keap1/NRF2/ARE signaling pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2020**: 1675957.
- HAUSSLER MR, LIVINGSTON S, SABIR ZL, HAUSSLER CA, JURUTKA PW (2021). Vitamin D receptor mediates a myriad of biological actions dependent on its 1, 25-dihydroxyvitamin D ligand: distinct regulatory themes revealed by induction of Klotho and fibroblast growth Factor-23. *JBMR plus*, **5**(1): e10432.
- HAYFLICK L, MOORHEAD PS. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, **25**(3): 585-621.
- HE Y, TOMBRAN-TINK J. (2010). Mitochondrial decay and impairment of antioxidant defenses in aging RPE cells. In *Retinal Degenerative Diseases*. Springer, New York, NY. 165-183.
- HE Z, DENG Y, LI W, CHEN Y, XING S, ZHAO X, ... WANG X. (2014). Overexpression of PTEN suppresses lipopolysaccharide-induced lung fibroblast proliferation, differentiation and collagen secretion through inhibition of the PI3-K-Akt-GSK3beta pathway. *Cell & bioscience*, **4**(1): 1-12.
- HEASMAN SA, ZAITSEVA L, BOWLES KM, RUSHWORTH SA, MACEWAN DJ. (2011). Protection of acute myeloid leukaemia cells from apoptosis induced by front-line chemotherapeutics is mediated by haem oxygenase-1. *Oncotarget*, **2**(9): 658.
- HIROSE W, IKEMATSU K, TSUDA R. (2003). Age-associated increases in heme oxygenase-1 and ferritin immunoreactivity in the autopsied brain. *Legal medicine*, **5**: 360-366.

- HOARE M, ITO Y, KANG TW, WEEKES MP, MATHESON NJ, PATTEN DA, ...NARITA M. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature cell biology*, **18**(9): 979-992.
- HOEFLICH KP, LUO J, RUBIE EA, TSAO MS, JIN OU, WOODGETT JR. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature*, **406**(6791): 86-90.
- HUMMITZSCH K, ANDERSON RA, WILHELM D, WU J, TELFER EE, RUSSELL DL, ... RODGERS RJ. (2015). Stem cells, progenitor cells, and lineage decisions in the ovary. *Endocrine Reviews*, **36**(1): 65-91.
- HU X, PAIK PK, CHEN J, YARILINA A, KOCKERITZ L, LU TT, ... IVASHKIV LB. (2006). IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity*, **24**(5): 563-574.
- HWANG HS, KIM HA. (2015). Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*, **16**(11): 26035-26054.
- IGARASHI H, TAKAHASHI T, TAKAHASHI E, TEZUKA N, NAKAHARA K, TAKAHASHI K, KURACHI H, (2005). Aged mouse oocytes fail to readjust intracellular adenosine triphosphates at fertilization. *Biol. Reprod.* **72**: 1256–1261.
- LAPLANTE M, SABATINI DM. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. **149**(2): 274-293.
- LIDA RH, KANKO S, SUGA T, MORITO M, YAMANE A. (2011). Autophagic-lysosomal pathway functions in the masseter and tongue muscles in the Klotho mouse, a mouse model for aging. *Molecular and cellular biochemistry*, **348**(1): 89-98.
- ISMAIL T, KIM Y, LEE H, LEE DS, LEE HS. (2019). Interplay between mitochondrial peroxiredoxins and ROS in cancer development and progression. *International journal of molecular sciences*, **20**(18): 4407.
- JAIN AK, JAISWAL AK. (2007). GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(22): 16502-16510.
- JIN J, JIN L, LIM SW, YANG CW. (2016). Klotho deficiency aggravates tacrolimus-induced renal injury via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-forkhead box protein O pathway. *American journal of nephrology*, **43**(5): 357-365.

- KAMAL NSM, SAFUAN S, SHAMSUDDIN S, FOROOZANDEH P. (2020). Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *European journal of cell biology*, **99**(6): 151108.
- KANG TW, YEVSAT T, WOLLER N, HOENICKE L, WUESTEFELD T, DAUCH D, HOHMEYER A, GEREKE M, RUDALSKA R, POTAPOVA A, et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**: 547–551.
- KIM HJ, NEL AE. (2005). The role of phase II antioxidant enzymes in protecting memory T cells from spontaneous apoptosis in young and old mice. *The journal of immunology*, **175**(5): 2948-2959.
- KIM J, HWANG K, PARK K, KONG ID, CHA S (2015). Biological role of antiaging protein Klotho. *J Lifestyle Med*. **5**: 1-6.
- KIM EH, TAWEECHAIPASANKUL A, RIDLO MR, KIM GA, LEE BC. (2020). Effect of Klotho protein during porcine oocyte maturation via Wnt signaling. *Aging (Albany NY)*, **12** (23): 23808.
- KIM JH, HWANG KH, PARK KS, KONG ID, CHA SK. (2015). Biological role of anti-aging protein Klotho. *Journal of lifestyle medicine*, **5**(1): 1.
- KIM JS, KIM EJ, KIM HJ, YANG JY, HWANG GS, KIM CW. (2011). Proteomic and metabolomic analysis of H₂O₂-induced premature senescent human mesenchymal stem cells. *Experimental Gerontology*, **46**(6): 500-510.
- KIRKLAND JL, TCHKONIA T. (2017). Cellular senescence: a translational perspective. *EBioMedicine*, **21**: 21-28.
- KOROTCHKINA LG, LEONTIEVA OV, BUKREEVA EI, DEMIDENKO ZN, GUDKOV AV, BLAGOSKLONNY MV. (2010). The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging (Albany NY)*, **2**(6): 344.
- KOJIMA H, INOUE T, KUNIMOTO H, NAKAJIMA K. (2013). IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *Jak-stat*, **2**(4): e25763.
- KULMAN T, MICHALOGLOU C, VREDEVELD LC, DOUMA S, VAN DOORN R, DESMET CJ, ... PEEPER DS. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, **133**(6): 1019-1031.

- KUJOTH GC, HIONA A, PUGH TD, SOMEYA S, PANZER K, WOHLGEMUTH SE, ... PROLLA TA. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, **309**(5733): 481-484.
- KUMAR V, ABBAS AK, ASTER JC (2017). Robbins basic pathology e-book. Elsevier Health Sciences.
- KUMARI R, JAT P. (2021). Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Frontiers in cell and developmental biology*, **9**: 645593.
- KURO-O M, MOE OW. (2017). FGF23- α Klotho as a paradigm for a kidney-bone network. *Bone*, **100**: 4-18.
- KURO-O M, MATSUMURA Y, AIZAWA H, KAWAGUCHI H, SUGA T, UTSUGI T, ... NABESHIMA YI. (1997). Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, **390**(6655): 45-51.
- KUROSU H, YAMAMOTO M, CLARK JD, PASTOR JV, NANDI A, GURNANI P, ... KURO-O M (2005). Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*, **309**(5742): 1829-1833.
- KURZ DJ, DECARY S, HONG Y, ERUSALIMSKY JD. (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.
- LAMBETH JD, NEISH AS. (2014). Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu. Rev. Pathol.* **9**: 119–145.
- LANDIS G, SHEN J, TOWER J. (2012). Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)*, **4**(11): 768.
- LAPASSET L, MILHAVET O, PRIEUR A, BESNARD E, BABLED A, AIT-HAMOU N, ... LEMATRE JM. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes & development*, **25**(21): 2248-2253.
- LAPLANTE M, SABATINI DM. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**(2): 274-293.
- LEE KY, KOH SH, NOH MY, PARK KW, LEE YJ, KIM SH. (2007). Glycogen synthase kinase-3 β activity plays very important roles in determining the fate of oxidative stress-inflicted neuronal cells. *Brain research*, **1129**: 89-99.

- LIANG Y, JING Z, DENG H, LI Z, ZHUANG Z, WANG S, WANG Y. (2015). Soluble epoxide hydrolase inhibition ameliorates proteinuria-induced epithelial-mesenchymal transition by regulating the PI3K-Akt-GSK-3 β signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, **463**(1-2): 70-75.
- LI Q, MIAO DQ, ZHOU P, WU YG, GAO D, WEI DL, ... TAN JH. (2011). Glucose metabolism in mouse cumulus cells prevents oocyte aging by maintaining both energy supply and the intracellular redox potential. *Biology of reproduction*, **84**(6): 1111-1118.
- LI P, SHI M, MAIQUE J, SHAFFER J, YAN S, MOE OW, HU MC. (2020). Beclin 1/Bcl-2 complex-dependent autophagy activity modulates renal susceptibility to ischemia-reperfusion injury and mediates renoprotection by Klotho. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **318**(3): F772-F792.
- LI Y, SHI J, YANG J, MA Y, CHENG L, ZENG J, ... LIU X. (2014). A Wnt/ β -catenin negative feedback loop represses TLR-triggered inflammatory responses in alveolar epithelial cells. *Molecular immunology*, **59**(2): 128-135.
- LI Q, MICHAUD M, CANOSA S, KUO A, MADRI JA. (2011). GSK-3 β : a signaling pathway node modulating neural stem cell and endothelial cell interactions. *Angiogenesis*, **14**(2): 173-185.
- LI SY, CHEN X, CHEN YL, TAN L, ZHAO YL, WANG JT, ... LUO AL. (2013). Role of GSK-3 β in isoflurane-induced neuroinflammation and cognitive dysfunction in aged rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, **33**(4): 530-535.
- LIM J, LUDERER U. (2011). Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biology of reproduction*, **84**(4): 775-782.
- LINARD A, MACAIRE JP, CHRISTON R. (2001). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity and vitamin E level in the liver microsomal membrane: effects of age and dietary α -linolenic acid deficiency. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **12**(8): 481-491.
- LIU K, JIN B, WU C, YANG J, ZHAN X, WANG L, ... MAO Z. (2015). NQO1 stabilizes p53 in response to oncogene-induced senescence. *International journal of biological sciences*, **11**(7): 762.
- LIU L, KEEFE DL. (2002). Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum. Reprod.* **17**(10): 2678-2685.

- LIU T, LIU Y, HUANG Y, CHEN J, YU Z, CHEN C, LAI L. (2019). miR-15b induces premature ovarian failure in mice via inhibition of α -Klotho expression in ovarian granulosa cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **141**: 383-392.
- LIU WL, CHIANG FT, KAO JTW, CHIOU SH, LIN HL. (2020). GSK3 modulation in acute lung injury, myocarditis and polycystic kidney disease-related aneurysm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1867**(11): 118798.
- LI-ZHEN L, CHEN ZC, WANG SS, LIU WB, ZHUANG XD. (2021). Klotho deficiency causes cardiac ageing by impairing autophagic and activating apoptotic activity. *European Journal of Pharmacology*, **911**: 174559.
- LOJKIN I, RUBINEK T, ORSULIC S, SCHWARZMANN O, KARLAN BY, BOSE S, WOLF I. (2015). Reduced expression and growth inhibitory activity of the aging suppressor Klotho in epithelial ovarian cancer. *Cancer letters*, **362**(2): 149-157.
- LU CY, LEE HC, FAHN HJ, WEI YH. (1999). Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **423**(1-2): 11-21.
- LU J, WANG Z, CAO J, CHEN Y, DONG Y. (2018). A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **16**(1): 1-18.
- LUBOS E, LOSCALZO J, HANDY DE. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal*. **15**(7): 1957–1997.
- MA F, WU J, JIANG Z, HUANG W, JIA Y, SUN W, WU H. (2019). P53/NRF2 mediates SIRT1's protective effect on diabetic nephropathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1866**(8): 1272-1281.
- MALLILANKARAMAN K, DOONAN P, CARDENAS C, CHANDRAMOORTHY HC, MULLER M, MILLER R, ... MADESH M. (2012). MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cell survival. *Cell*, **151**(3): 630-644.
- MALTESE G, PSEFTALI PM, RIZZO B, SRIVASTAVA S, GNUDI L, MANN GE, SIOUW RC. (2017). The anti-ageing hormone Klotho induces NRF2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, **21**(3): 621-627.

- MAMMUCARI C, RAFFAELLO A, VECCELLIO REANE D, GHERARDI G, DE MARIO A, RIZZUTO R. (2018). Mitochondrial calcium uptake in organ physiology: from molecular mechanism to animal models. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **470**(8): 1165-1179.
- MAO Z, FAN L, YU Q, LUO S, WU X, TANG J, ... TANG L. (2018). Abnormality of Klotho signaling is involved in polycystic ovary syndrome. *Reproductive Sciences*, **25**(3): 372-383.
- MARINHO HS, REAL C, CYRNE L, SOARES H, ANTUNES F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox biology*, **2**: 535-562.
- MASUDA K, RIPLEY B, NISHIMURA R, MINO T, TAKEUCHI O, SHIOI G, ... KISHIMOTO T. (2013). Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(23): 9409-9414.
- MELZER D, PILLING LC, FERRUCCI L. (2020). The genetics of human ageing. *Nature Reviews Genetics*, **21**(2): 88-101.
- MENDOZA-NUNEZ VM, RUIZ-RAMOS M, SANCHEZ-RODRIGUEZ MA, RETANA-UGALDE R, MUNOZ-SANCHEZ JL. (2007). Aging-related oxidative stress in healthy humans. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **213**(3): 261-268.
- MESQUIDA M, DRAWNEL F, FAUSER S. (2019). The role of inflammation in diabetic eye disease. In *Seminars in Immunopathology*. Volume 41. Springer Berlin Heidelberg. 427-445.
- MIJIT M, CARACCIOLO V, MELILLO A, AMICARELLI F, GIORDANO A. (2020). Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*, **10**(3): 420.
- MUNOZ-ESPIN D, SERRANO M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**: 482–496.
- MUSICCO C, CAPELLI V, PESCE V, TIMPERIO AM, CALVANI M, MOSCONI L, ... GADALETA MN. (2009). Accumulation of overoxidized Peroxiredoxin III in aged rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1787**(7): 890-896.
- NAKAMURA AJ, CHIANG YJ, HATHCOCK KS, HORIKAWA I, SEDELNIKOVA OA, HODES RJ, BONNER WM. (2008). Both telomeric

and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics & chromatin*, **1**(1): 1-12.

NEHA K, HAIDER MR, PATHAK A, YAR MS. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European journal of medicinal chemistry*, **178**: 687-704.

NELSON G, WORDSWORTH J, WANG C, JURK D, LAWLESS C, MARTINRUIZ C, VON ZGLINICKI T. (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell*, **11**: 345–349.

NO MH, HEO JW, YOO SZ, KIM CJ, PARK DH, KANG JH, ... KWAK HB. (2020). Effects of aging and exercise training on mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **472**(2): 179-193.

OHANNA M, GIULIANO S, BONET C, IMBERT V, HOFMAN V, ZANGARI J, ... BERTOLOTTO C. (2011). Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes & development*, **25**(12): 1245-1261.

ORJALO AV, BHAUMIK D, GENGLER BK, SCOTT GK, CAMPISI J. (2009). Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(40): 17031-17036.

PANSARASA O, BERTORELLI L, VECCHIET J, FELZANI G, MARZATICO F. (1999). Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**(5-6): 617-622.

PARKER H, ELLISON SM, HOLLEY RJ, OLEARY C, LIAO A, ASADI J, ... BIGGER BW. (2020). Haematopoietic stem cell gene therapy with IL-1Ra rescues cognitive loss in mucopolysaccharidosis IIIA. *EMBO Molecular Medicine*, **12**(3): e11185.

PASSOS JF, NELSON G, WANG C, RICHTER T, SIMILLION C, PROCTOR CJ, ... VON ZGLINICKI T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular systems biology*, **6**(1): 347.

PECHENINO AS, BROWN TR. (2006). Superoxide dismutase in the prostate lobes of aging Brown Norway rats. *The Prostate*, **66**(5): 522-535.

- PERRY JR, MURRAY A, DAY FR, ONG KK. (2015). Molecular insights into the aetiology of female reproductive ageing. *Nature Reviews Endocrinology*, **11**(12): 725-734.
- PICCA A, PESCE V, FRACASSO F, JOSEPH AM, LEEUWENBURGH C, LEZZA AM. (2013). Aging and calorie restriction oppositely affect mitochondrial biogenesis through TFAM binding at both origins of mitochondrial DNA replication in rat liver. *PloS one*, **8**(9): e74644.
- PRASAD R, KATIIYAR SK. (2014). Ultraviolet radiation-induced inflammation activates β -catenin signaling in mouse skin and skin tumors. *International journal of oncology*, **44**(4): 1199-1206.
- PENG TI, JOU MJ. (2010). Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1201**(1): 183-188.
- RODIER F, COPPE JP, PATIL CK, HOEIJMAKERS WA, MUNOZ DP, RAZA SR, FREUND A, CAMPEAU E, DAVALOS AR, CAMPISI J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**: 973-979.
- ROBINSON M, GILBERT SF, WATERS JA, LUJANO-OLAZABA O, LARA J, ALEXANDER LJ, ... HOUSE CD. (2021). Characterization of SOX2, OCT4 and NANOG in ovarian cancer tumor-initiating cells. *Cancers*, **13**(2): 262.
- REDDY P, ADHIKARI D, ZHENG W, LIANG S, HAMALAINEN T, TOHONEN V, ... LIU K. (2009). PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human molecular genetics*, **18**(15): 2813-2824.
- RODRIGUEZ-CAPOTE K, CESPEDES E, ARENCIBIA R, GONZALEZ-HOYUELA M. (1998). Indicators of oxidative stress in aging rat brain. The effect of nerve growth factor. *Revista de Neurologia*, **27**(157): 494-500.
- ROGER I, MILARA J, BELHADJ N, CORTIJO J. (2021). Senescence alterations in pulmonary hypertension. *Cells*, **10**(12): 3456.
- ROHRIG F, SCHULZE A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nature Reviews Cancer*, **16**(11): 732-749.
- ROMERO A, DONGIL P, VALENCIA I, VALLEJO S, SAN HIPOLITO-LUENGO A, DIAZ-ARAYA G, ... PEIRO C. (2022). Pharmacological blockade of NLRP3 inflammasome/IL-1 β -positive loop mitigates endothelial cell senescence and dysfunction. *Aging and disease*, **13**(1): 284.

- ROVILLAIN E, MANSFIELD L, LORD CJ, ASHWORTH A, JAT PS. (2011). An RNA interference screen for identifying downstream effectors of the p53 and pRB tumour suppressor pathways involved in senescence. *BMC genomics*, **12**: 1-12.
- ROMERO A, SAN HIPOLITO-LUENGO A, VILLALOBOS LA, VALLEJO S, VALENCIA I, MICHALSKA P, ... PEIRO C. (2019). The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation. *Aging Cell*, **18**(3): e12913.
- SALAZAR M, ROJO AI, VELASCO D, DE SAGARRA RM, CUADRADO A. (2006). Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor NRF2. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(21): 14841-14851.
- SAPOCHNIK M, FUERTES M, ARZT E. (2017). Programmed cell senescence: role of IL-6 in the pituitary. *Journal of molecular endocrinology*, **58**(4): 241-253.
- SEO YH, JUNG HJ, SHIN HT, KIM YM, YIM H, CHUNG HY, ... YOON G. (2008). Enhanced glycogenesis is involved in cellular senescence via GSK3/GS modulation. *Aging cell*, **7**(6): 894-907.
- SHAHMOON S, RUBINFELD H, WOLF I, COHEN ZR, HADANI M, SHIMON I, RUBINEK T. (2014). The aging suppressor Klotho: a potential regulator of growth hormone secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **307**(3): 326-334.
- SHATROVA AN, BUROVA EB, KHARCHENKO MV, SMIRNOVA IS, LYUBLINSKAYA OG, NIKOLSKY NN, BORODKINA AV. (2021). Outcomes of deferoxamine action on H₂O₂-induced growth inhibition and senescence progression of human endometrial stem cells. *International journal of molecular sciences*, **22**(11): 6035.
- SHAY JW, WRIGHT WE. (2019). Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature Reviews Genetics*, **20**(5): 299-309.
- SHARIATI F, FAVAEDI R, RAMAZANALI F, GHORAEIAN P, AFSHARIAN P, AFLATOONIAN B, ... SHAHHOSEINI M. (2018). Increased expression of stemness genes REX-1, OCT-4, NANOG, and SOX-2 in women with ovarian endometriosis versus normal endometrium: A case-control study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, **16**(12): 3684.
- SHIMIZU I, MINAMINO T. (2019). Cellular senescence in cardiac diseases. *Journal of cardiology*, **74**(4): 313-319.

- SHIRAKABE A, IKEDA Y, SCIARRETTA S, ZABLOCKI DK, SADOSHIMA J. (2016). Aging and autophagy in the heart. *Circulation research*, **118**(10): 1563-1576.
- SHKOLNIK K, TADMOR A, BEN-DOR S, NEVO N, GALIANI D, DEKEL N. (2011). Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(4): 1462-1467.
- SHARMA D, BHARTYA D. (2022). Aged mice ovaries harbor stem cells and germ cell nests but fail to form follicles. *Journal of Ovarian Research*, **15**(1): 1-13.
- SIEKEVITZ P, WATSON ML. (1957). Some cytochemical characteristics of a phosphorylating digitonin preparation of mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, **25**: 274-279.
- SILVA-PALACIOS A, OSTOLGA-CHAVARRIA M, ZAZUETA C, KONIGSBERG M. (2018). NRF2: Molecular and epigenetic regulation during aging. *Ageing research reviews*, **47**: 31-40.
- SONG L, DE SARNO P, JOPE RS. (2002). Central role of glycogen synthase kinase-3 β in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(47): 44701-44708.
- SOUDER DC, ANDERSON RM. (2019). An expanding GSK3 network: implications for aging research. *Geroscience*, **41**(4): 369-382.
- SOPJANI M, RINNERTHALER M, KRUIJA J, DERMAKU-SOPJANI M. (2015). Intracellular signaling of the aging suppressor protein Klotho. *Current molecular medicine*, **15**(1): 27-37.
- SRINIVAS US, TAN BW, VELLAYAPPAN BA, JEYASEKHARAN AD. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology*, **25**: 101084.
- STILMANN M, HINZ M, ARSLAN SÇ, ZIMMER A, SCHREIBER V, SCHEIDEREIT C. (2009). A nuclear poly (ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced I κ B kinase activation. *Molecular cell*, **36**(3): 365-378.
- STEINBRECHER KA, WILSON III W, COGSWELL PC, BALDWIN AS. (2005). Glycogen synthase kinase 3 β functions to specify gene-specific, NF- κ B-dependent transcription. *Molecular and cellular biology*, **25**(19): 8444-8455.
- STUDENY M, MARINI FC, DEMBINSKI JL, ZOMPETTA C, CABREIRA-HANSEN M, BEKELE BN, CHAMPLIN RE, ANDREEFF M. (2004).

Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J. Natl Cancer Inst.* **96**: 1593-1603.

TAKAHASHI A, IMAI Y, YAMAKOSHI K, KUNINAKA S, OHTANI N, YOSHIMOTO S, ... HARA E. (2012). DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/CCdh1 in senescent cells. *Molecular cell*, **45**(1): 123-131.

TAKASUGI M, OKADA R, TAKAHASHI A, VIRYA CHEN D, WATANABE S, HARA E (2017). Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat Commun* **8**: 15729.

TANAKA T, KISHIMOTO T (2014). The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer immunology research*, **2**(4): 288-294.

TANEIKE M, YAMAGUCHI O, NAKAI A, HIKOSO S, TAKEDA T, MIZOTE I, ... OTSU K (2010). Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy*, **6**(5): 600-606.

TE VELDE ER, PEARSON PL (2002). The variability of female reproductive ageing. *Human reproduction update*, **8**(2): 141-154.

TEKSEN F, OZKAN T, HEKMATSHOAR Y, TURAN B (2020). The Expression Levels of Klotho, Endothelial Nitrite Oxide Synthetase and Catalase Genes of the Heart Tissues of Young and Old Rats/Genc ve Yasli Ratların Kalp Dokularında Klotho, Endotelial Nitrit Oksit Sentetaz ve Katalaz Genlerinin İfade Düzeyleri. *Journal of Ankara University Faculty of Medicine*, **73**(3): 197-203.

TOMINAGA K, SUZUKI HI. (2019). TGF- β signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *International journal of molecular sciences*, **20**(20): 5002.

TORBUS-PALUSZCZAK M, BARTMAN W, ADAMCZYK-SOWA M. (2018). Klotho protein in neurodegenerative disorders. *Neurological Sciences*, **39**(10): 1677-1682.

TOWER J (2015). Programmed cell death in aging. *Ageing research reviews*, **23**: 90-100.

TOYAMA R, FUJIMORI T, NABESHIMA Y, ITOH Y, TSUJI Y, OSAMURA RY, NABESHIMA YI. (2006). Impaired regulation of gonadotropins leads to the atrophy of the female reproductive system in Klotho-deficient mice. *Endocrinology*, **147**(1): 120-129.

- UNGVARI Z, BAILEY-DOWNS L, SOSNOWSKA D, GAUTAM T, KONCZ P, LOSONCZY G, ... CSISZAR A. (2011). Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **301**(2): 363-372.
- VAN DER REEST J, CECCHINO GN, HAIGIS MC, KORDOWITZKI P. (2021). Mitochondria: Their relevance during oocyte ageing. *Ageing Research Reviews*, **70**: 101378.
- VANELLA A, GEREMIA E, D'URSO G, TIRIOLO P, DI SILVESTRO I, GRIMALDI R, PINTURO R. (1982). Superoxide dismutase activities in aging rat brain. *Gerontology*, **28**(2): 108-113.
- VIGNERON A, VOUSDEN KH. (2010). p53, ROS and senescence in the control of aging. *Aging (Albany NY)*, **2**(8): 471.
- VIZIOLI MG, LIU T, MILLER KN, ROBERTSON NA, GILROY K, LAGNADO A B, ... ADAMS PD. (2020). Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. *Genes & development*, **34**(5-6): 428-445.
- VON MENGDEN L, KLAMT F, SMITZ J. (2020). Redox biology of human cumulus cells: basic concepts, impact on oocyte quality, and potential clinical use. *Antioxidants redox signaling*, **32**(8): 522-535.
- WATCHARASIT P, BIJUR GN, SONG L, ZHU J, CHEN X, JOPE RS. (2003). Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) binds to and promotes the actions of p53. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(49): 48872-48879.
- WAKITA D, KURASHIMA Y, CROTHER TR, NOVAL RIVAS M, LEE Y, CHEN S, ... ARDITI M (2016). Role of interleukin-1 signaling in a mouse model of kawasaki disease-associated abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **36**(5): 886-897.
- WATERS DW, BLOKLAND KE, PATHINAYAKE PS, WEI L, SCHULIGA M, JAFFAR J, ... KNIGHT DA. (2019). STAT3 regulates the onset of oxidant-induced senescence in lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **61**(1): 61-73.
- WANG H, BROWN J, GU Z, GARCIA CA, LIANG R, ALARD P, ... MARTIN M. (2011). Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1-and glycogen synthase kinase 3- β -signaling pathways regulates the innate inflammatory response. *The Journal of Immunology*, **186**(9): 5217-5226.

- WANG Y, CHE M, XIN J, ZHENG Z, LI J, ZHANG S. (2020). The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration. *Biomedicine Pharmacotherapy*, **131**: 110660.
- WATCHARASIT P, BIJUR GN, SONG L, ZHU J, CHEN X, JOPE RS. (2003). Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) binds to and promotes the actions of p53. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(49): 48872-48879.
- WEALL BM, AL-SAMERRIA S, CONCEICAO J, YOVICH JL, ALMAHBOBI G. (2015). A direct action for GH in improvement of oocyte quality in poor-responder patients. *Reproduction*, **149**(2): 147-154.
- WEIR CP, ROBAIRE B. (2007). Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. *Journal of andrology*, **28**(2): 229-240.
- WILEY CD, VELARDE MC, LECOT P, LIU SU, SARNOSKI EA, FREUND A, ...CAMPISI J. (2016). Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell metabolism*, **23**(2): 303-314.
- XIE T, YE W, LIU J, ZHOU L, SONG Y (2021). The Emerging Key Role of Klotho in the Hypothalamus–Pituitary–Ovarian Axis. *Reproductive Sciences*, **28**(2): 322-331.
- XING L, GUO H, MENG S, ZHU B, FANG J, HUANG J, ... WANG H. (2021). Klotho ameliorates diabetic nephropathy by activating NRF2 signaling pathway in podocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **534**: 450-456.
- XU J, ZHENG T, HONG W, YE H, HU C, ZHENG Y (2018). Mechanism for the decision of ovarian surface epithelial stem cells to undergo neo-oogenesis or ovarian tumorigenesis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **50**(1): 214-232.
- XU M, PIRTSKHALAVA T, FARR JN, WEIGAND BM, PALMER AK, WEIVODA MM, ... KIRKLAND JL. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature medicine*, **24**(8): 1246-1256.
- XU X, HAO Y, ZHONG Q, HANG J, ZHAO Y, QIAO J. (2020). Low KLOTHO level related to aging is associated with diminished ovarian reserve. *Fertility and Sterility*, **114**(6): 1250-1255.
- XU Y, SUN Z. (2015). Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocrine reviews*, **36**(2): 174-193.

- XUE W, ZENDER L, MIETHING C, DICKINS RA, HERNANDO E, KRIZHANOVSKY V, CORDON-CARDO C, LOWE SW. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**: 656–660.
- YAMAMOTO M, CLARK JD, PASTOR JV, GURNANI P, NANDI A, KUROSU H, ... KURO-O M. (2005). Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone Klotho. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(45): 38029-38034.
- YAGISHITA Y, CHARTOUMPEKIS DV, KENSLER TW, WAKABAYASHI N. (2023). NRF2 and the Moirai: Life and Death Decisions on Cell Fates. *Antioxidants & Redox Signaling*, **38**(7-9): 684-708.
- YU C, XIAO JH. (2021). The Keap1-NRF2 system: a mediator between oxidative stress and aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-16.
- YANG C, KO B, HENSLEY CT, JIANG L, WASTI AT, KIM J, ... DEBERARDINIS RJ. (2014). Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Molecular cell*, **56**(3): 414-424.
- YAN F, ZHAO Q, LI Y, ZHENG Z, KONG X, SHU C, ...SHI Y. (2022). The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. *Journal of Ovarian Research*, **15**(1): 100.
- YANG J, LIU M, HONG D, ZENG M, ZHANG X. (2021). The paradoxical role of cellular senescence in cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, **9**: 722205.
- YANG M, PENG Y, LIU W, ZHOU M, MENG Q, YUAN C. (2019). Sirtuin 2 expression suppresses oxidative stress and senescence of nucleus pulposus cells through inhibition of the p53/p21 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, **513**(3): 616-622.
- YANG J, HUANG J, DASGUPTA M, SEARS N, MIYAGI M, WANG B, ... STARK GR. (2010). Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(50): 21499-21504.
- YU C, XIAO JH. (2021). The Keap1-NRF2 system: a mediator between oxidative stress and aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-16.
- ZMIJEWSKI JW, JOPE RS. (2004). Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts. *Aging Cell*, **3**(5): 309-317.

- ZHANG H, LIU H, DAVIES KJ, SIOUTAS C, FINCH CE, MORGAN TE, FORMAN HJ. (2012). NRF2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radical Biology and Medicine*, **52**(9): 2038-2046.
- ZHANG H, DAVIES KJ, FORMAN HJ (2015). Oxidative stress response and NRF2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **88**: 314-336.
- ZHAO Y, SIMON M, SELUANOV A, GORBUNOVA V (2022). DNA damage and repair in age-related inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 1-15.
- ZHENG H, YANG Z, XIN Z, YANG Y, YU Y, CUI J, ... CHEN F. (2020). Glycogen synthase kinase-3 β : A promising candidate in the fight against fibrosis. *Theranostics*, **10**(25): 11737.
- ZHOU S, WANG P, QIAO Y, GE Y, WANG Y, QUAN S, ... GONG R. (2016). Genetic and pharmacologic targeting of glycogen synthase kinase 3 β reinforces the NRF2 antioxidant defense against podocytopathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, **27**(8): 2289-2308.
- ZHU J, WANG H, FAN Y, LIN Y, ZHANG L, JI X, ZHOU M (2014). Targeting the NF-E2-related factor 2 pathway: a novel strategy for glioblastoma. *Oncology Reports*, **32**(2): 443-450.
- ZHU J, ZHANG J, LI H, WANG TY, ZHANG CX, LUO MJ, TAN JH. (2015). Cumulus cells accelerate oocyte aging by releasing soluble Fas ligand in mice. *Scientific reports*, **5**(1): 1-8.
- ZOUNGRANA LI, KRAUSE-HAUCH M, WANG H, FATMI MK, BATES L, LI Z, ... LI J. (2022). The interaction of mTOR and NRF2 in neurogenesis and its implication in neurodegenerative diseases. *Cells*, **11**(13): 2048.
- ZINOVKIN RA, KONDRATENKO ND, ZINOVKINA LA. (2022). Does NRF2 Play a Role of a Master Regulator of Mammalian Aging? *Biochemistry (Moscow)*, **87**(12-13): 1465-1476.
- ZHOU J, PENG X, MEI S. (2019). Autophagy in ovarian follicular development and atresia. *International journal of biological sciences*, **15**(4): 726.