



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**YAŞLANMA SÜRECİNDE HÜCRE ÖLÜM
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

ARZU KESKİN AKTAN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

MAYIS 2018



**YAŞLANMA SÜRECİNDE HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI**

Arzu KESKİN AKTAN

**DOKTORA TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

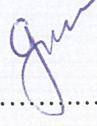
MAYIS 2018

Arzu KESKİN AKTAN tarafından hazırlanan “Yaşlanma Sürecinde Hücre Ölüm Mekanizmalarının Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. K Gonca AKBULUT

Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

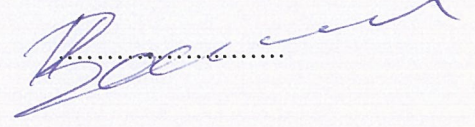
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan : Prof. Dr. Z Dicle BALKANCI

Fizyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

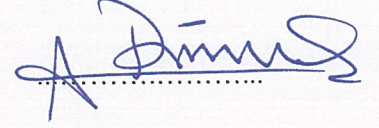
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Sibel DİNÇER

Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

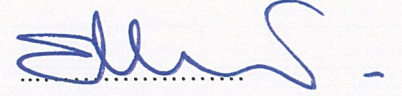
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Ethem GELİR

Fizyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 21 / 05 / 2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Arzu KESK N AKTAN

21/05/2018

YAŞLANMA SÜRECİNDE HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Arzu KESKİN AKTAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2018

ÖZET

Bu çalışma yaşlanma sürecinde izlenen hücre ölüm mekanizmalarının araştırılması ve ayrıca anti-apoptotik ve anti-oksidan etkili melatonin ve curcuminin bu sürece etkilerinin gösterilmesi amacıyla planlandı. Çalışmamızda, melatonin (10 mg/kg/gün, sc), curcumin (30 mg/kg/gün, ip) ve salermide (100µmol/µl/gün, ip) uygulamalarının genç ve yaşlı sıçanların beyinde oksidatif stres, SIRT2, FOXO3a ekspresyonu ve apoptotik aktivite (BCL-2, BAX, BCL-2/BAX oranı ve BIM) üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla, toplam 48 adet (3 aylık genç, n=24; 22 aylık yaşlı n=24) Wistar albino cinsi sıçan kullanılarak 8 grup oluşturuldu. Kontrol ve deney gruplarının enjeksiyonları 21 gün boyunca sürdürüldü. Beyinde serebral korteks ve hipokampus dokuları izole edildi. Total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) ölçümleri yapıldı ve oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı. SIRT2, FOXO3a, BCL-2, BAX ve BIM ekspresyonları Western blotlama ile gösterildi. Ayrıca SIRT2 ve FOXO3a için sandviç ELISA yöntemi ile protein ölçümü yapıldı. İstatistiksel analiz için Two-way ANOVA, Pearson r' si kullanıldı (p<0,05). Bulgularımız yaşlanmanın her iki beyin bölgesinde SIRT2, FOXO3a, TOS, OSI' yi arttırdığını, BCL-2, BCL-2/BAX oranı ve TAS' ı ise azalttığını gösterdi. Ayrıca yaşlanmanın serebral kortekste BIM' i, hipokampusta ise BAX' ı arttırdığı görüldü. Melatonin, curcumin ve salermide uygulamaları, etkileri beyinde bölge spesifik olmak üzere, yaşlanmaya bağlı görülen değişiklikleri tersine çevirmede etkili bulundu (p<0,05). Sonuç olarak, yaşlanmada eksojen melatonin ve curcumin uygulamaları, beyinde oksidatif stres ve apoptotik aktiviteyi baskılayarak nöral kayıpları engelleyebilir.

Bilim Kodu : 1023

Anahtar Kelimeler : Yaşlanma, apoptoz, Bcl-2, sirtuin 2, FOXO3a

Sayfa Adedi : 120

Danışman : Prof. Dr. Kazime Gonca AKBULUT

INVESTIGATION OF CELL DEATH MECHANISMS IN AGING PROCESS

(Ph. D. Thesis)

Arzu KESKİN AKTAN

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

May 2018

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the cell death mechanisms in the aging process and to demonstrate the effects of anti-apoptotic and anti-oxidant melatonin and curcumin in this process. In the current study, we investigated the effects of melatonin (10 mg/kg/day, sc), curcumin (30 mg/kg/day, ip), and salermide (100µmol/µl/day, ip) treatments on oxidative stress parameters, SIRT2, FOXO3a expression levels and apoptotic activity in the young and aged rat brain. In this respect, a total of 48 male Wistar-albino rats (24 young rats, 3 months-old; 24 aged rats, 22 months-old) divided into 8 groups. The injections of the control and treatment groups were maintained for 21 days. Brain tissues were sampled from the cerebral cortex and hippocampus. Total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) were measured. Oxidative stress index (OSI), was also calculated. SIRT2, FOXO3a, BCL-2, BAX and BIM expressions were tested by Western blotting. SIRT2 and FOXO3a protein levels was also measured by a sandwich ELISA method. Two-way ANOVA, Pearson's r were used for statistical analysis ($p<0.05$). Our findings showed that aging increased SIRT2, FOXO3a, TOS, OSI, and decreased BCL-2, BCL-2/BAX ratio and TAS in both brain regions. Aging also increased BIM in the cerebral cortex and BAX in the hippocampus. Melatonin, curcumin and salermide treatments reversed the age-related changes in the brain, while their effects are region specific. In sum, exogenous melatonin and curcumin treatments in aging can inhibit neural losses by suppressing oxidative stress and apoptotic activity in the brain.

Science Code : 1023

Key Words : Aging, apoptosis, Bcl-2, Sirtuin 2, FOXO3a

Page Number : 120

Advisor : Prof. Dr. Kazime Gonca AKBULUT

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim sürecimde engin bilgi ve deneyimlerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, güleryüzü ile sevgi ve hoşgörüsünü hep hissettiren, varlığı ile kendimi daima güvende hissettiğim yol göstericim, akademik danışmanım, çok kıymetli hocam Prof. Dr. K. Gonca Akbulut' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı' ndaki eğitim süreçlerimdeki emekleri, destekleri ve ayrıca sabırları için çok değerli bölüm hocalarım bölüm başkanımız Prof. Dr. Sibel Dinçer, Prof. Dr. Lamia Pınar, Prof. Dr. Deniz Erbaş, Prof. Dr. Çiğdem Özer ve Doç. Dr. Şevin Güney' e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışma sürecimdeki akademik katkılarının yanı sıra laboratuvar imkanları açısından da yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı' nda Prof. Dr. Hakan Abulut' a çok teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamın başlangıcından itibaren çalışma sürecimin şekillenmesinde yol gösterici olan tez izleme komitesi üye hocalarım Prof. Dr. Suna Ömeroğlu' na ve Prof. Dr. Ethem Gelir' e katkı ve görüşlerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Tüm akademik yaşantım boyunca beni her daim cesaretlendiren ve her koşulda yanımda olan sevgili eşim, ailem ve arkadaşlarıma da teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2016-05 proje numarası ile ve TÜBİTAK tarafından 216S258 proje kodu ile desteklenmiştir. Çalışmamızın yürütülebilmesine olanak sağladıkları için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne ve TÜBİTAK' a teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Yaşlanma.....	5
2.1.1. Yaşlanma fizyolojisi ve beyin.....	5
2.1.2. Beyinde nörodejenerasyon ve selektif nöronal hassasiyet.....	7
2.1.3. Yaşlanma teorileri.....	10
2.2. Oksidatif Stres	11
2.2.1. Yaşlanmanın serbest radikal teorisi; oksidatif stres.....	11
2.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve oluşumu	12
2.2.3. ROS' ların hücre sel bileşenler üzerine genel etkileri	14
2.2.4. Antioksidanlar.....	15
2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	18
2.3.1. Apoptozis	21
2.3.2. Apoptozis indüksiyonu ve fazları	22
2.3.3. Apoptozda mitokondrinin rolü ve moleküler süreç	25
2.3.4. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan genler ve Bcl-2 ailesi	28

	Sayfa
2.4. Sirtuinler.....	34
2.4.1. Sirtuinlerin beyindeki rolü	35
2.5. FOXO (ForkHead/Winged Helix Box Class O) Transkripsiyon Faktörleri	37
2.5.1. FOXO' ların regülasyonu ve biyolojik süreçlerdeki rolü	39
2.6. Melatonin	41
2.6.1. Melatonin fizyolojisi.....	41
2.6.2. Oksidatif stres, apoptoz, SIRT2, FOXO3a ve nöronal yaşlanma ilişkisi üzerine melatonin etkileri	43
2.7. Curcumin.....	46
2.7.1. Curcumin ve metabolizması	46
2.7.2. Curcuminin oksidatif stres, apoptoz, SIRT2, FOXO3a ve nöral yaşlanmadaki rolü	47
2.8. Salermide.....	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	51
3.1. Gereç	51
3.1.1. Deney hayvanları	51
3.1.2. Kullanılan laboratuvar aletleri ve cihazlar.....	51
3.1.3. Kullanılan kimyasallar, antikorlar ve kitler	51
3.1.4. Kullanılan çözeltiler.....	54
3.2. Yöntem.....	57
3.2.1. Araştırma planı ve deney süreci.....	57
3.2.2. SDS-PAGE / Western blot yöntemi.....	58
3.2.3. Sandviç ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi	64
3.2.4. Dokuda total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) tayini	67
3.2.5. Kullanılan istatistiksel yöntem.....	70
4. BULGULAR	71

	Sayfa
4.1. SIRT2 ekspresyonlarındaki değişimler	71
4.2. FOXO3a ekspresyonlarındaki değişimler	72
4.3. BIM ekspresyonlarındaki değişimler	74
4.4. BAX ekspresyonlarındaki değişimler	75
4.5. BCL-2 ekspresyonlarındaki değişimler.....	76
4.6. BCL-2/BAX oranındaki değişimler	77
4.7. TOS, TAS ve OSI değişimleri	78
4.8. Bulguların % değişim ifadeleri	82
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
KAYNAKLAR	97
EKLER.....	115
EK-1. Etik Kurul Onayı.....	116
ÖZGEÇMİŞ	117

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Radikal ve non-radikal özellik gösteren bazı reaktif oksijen türleri	13
Çizelge 2.2. Major ROS molekülleri ve metabolizmaları	14
Çizelge 2.3. Edinim yollarına göre antioksidanlar	16
Çizelge 2.4. Bcl-2 aile üyeleri	29
Çizelge 2.5. Memeli sirtuinlerinin genel özellikleri.....	35
Çizelge 2.6. Farklı beyin fonksiyonlarında sirtuinlerin rolü	37
Çizelge 2.7. Memelilerde FOXO ailesi üyeleri	39
Çizelge 2.8. FOXO hedef gen fonksiyonları.....	40
Çizelge 3.1. Laboratuvar donanımları	52
Çizelge 3.2. Çeşitli kimyevi sarflar.....	53
Çizelge 3.3. Kitler.....	53
Çizelge 3.4. Antikorlar.....	54
Çizelge 3.5. Kontrol ve deney grupları	58
Çizelge 4.1. Genç ve yaşlı grupların serebral korteks dokularına ait bulgular	81
Çizelge 4.2. Genç ve yaşlı grupların hipokampus dokularına ait bulgular	81
Çizelge 4.3. Yaşlanmaya bağlı olarak serebral kortekste izlenen (%) değişimler ve eksojen madde uygulamalarının etkileri	82
Çizelge 4.4. Yaşlanmaya bağlı olarak hipokampusta izlenen (%) değişimler ve eksojen madde uygulamalarının etkileri	82
Çizelge 4.5. Eksojen uygulamalara bağlı olarak genç gruplarda izlenen (%) değişimler	83

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Sağlıklı yaşlanmanın ve uzun ömürlülüğün ana belirleyicileri arasındaki önem ve etkileşimler	5
Şekil 2.2. Fizyolojik yaşlanmada beyinde görülen hücrel, histolojik ve fonksiyonel değişiklikler	7
Şekil 2.3. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil oluşum basamakları	14
Şekil 2.4. Enzimatik özelliklerine göre antioksidanlar	16
Şekil 2.5. Katalaz, GPx ve SOD' un enzimatik aktivitesi ile ROS eliminasyonu	17
Şekil 2.6. Glutasyon- redoks döngüsü	17
Şekil 2.7. Üç ana hücre ölüm yolağı; apoptoz, nekroz ve otofaji	20
Şekil 2.8. Üç ana ölüm yolağının subsellüler mekanizması.....	21
Şekil 2.9. Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik sinyal yolakları	28
Şekil 2.10. Bcl-2 aile üyelerinin şematik listesi	30
Şekil 2.11. Bcl-2 aile üyeleri arasındaki etkileşimler.....	31
Şekil 2.12. Sirtuinlerin hedef genleri ve hücrel etkileri	36
Şekil 2.13. Büyüme faktörleri ve stres indüklü kinaz kaskadlarında FOXO'ların kontrolü	40
Şekil 2.14. FOXO' ların geridönüşümlü fosforilasyonu ve asetilasyonu	41
Şekil 2.15. Turmericteki (zerdeçal) curcuminoidlerin kimyasal yapıları.....	47
Şekil 4.1. SIRT2 ekspresyonlarındaki değişimler	72
Şekil 4.2. FOXO3a ekspresyonlarındaki değişimler	74
Şekil 4.3. BIM ekspresyonlarındaki değişimler	75
Şekil 4.4. BAX ekspresyonlarındaki değişimler	76
Şekil 4.5. BCL-2 ekspresyonlarındaki değişimler	77
Şekil 4.6. BCL-2/BAX oranındaki değişimler	78

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. TOS, TAS ve OSI değişimleri.	80
Şekil 4.8. Serebral korteks ve hipokampusta izlenen yaşa bağlı değişimler ve eksojen uygulamaların etkileri	83

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Doku izolasyonu.....	58
Resim 3.2. Jel elektroforezi	62
Resim 3.3. Transfer işlemi (Blotlama).....	62
Resim 3.4. FOXO3a ELISA uygulaması	65
Resim 3.5. SIRT2 ELISA uygulaması	66
Resim 3.6. TOS ve TAS tayini	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
gr	Gram
mg	Miligram
mM	Milimol
ng	Nanogram
nmol	Nanomol
pg	Pikogram

Kısaltmalar

Açıklamalar

•OH	Hidroksil Radikali
AceCS2	Acetyl-CoA-Synthetase 2
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMPK	Adenosine Monophosphate-Activated Kinase
ANT	Adenide Nucleotide Translocator
AP-1	Aktivatör Protein
Apaf-1	Apoptosis Protease-Activating Factor-1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase
ATP	Adenozin Tri Fosfat
Bad	Bcl-2 Antagonist Of Cell Death
Bak	Bcl-2 Antagonistic Killer
Bax	Bcl-2 Associated X Protein
Bcl-2	B Cell Lymphoma-2 Protein
Bcl-xl	Bcl-Extra Long
Bcl-xs	Bcl-Extra Short
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor

Kısaltmalar**Açıklamalar**

Bid	Bcl-2 Interacting Domain Death Agonist
Bik	Bcl-2 Interacting Killer
Bim	Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death
BMAL1	Brain and Muscle ARNT-Like 1;
Bmf	Bcl-2 Modifying Factor
Bok	Bcl-2 Related Ovarian Killer
Boo	Bcl-2 Homolog Of Ovary
BSA	Bovine Serum Albumin
BTG-1	B-Cell Translocation Gene 1
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
CAT	Catalase
CDK	Cyclin Dependent Kinase
COX-2	Siklooksijenaz 2
CPS1	Carbamoyl Phosphate Synthetase 1
CREB	cAMP-Responsive Element-Binding Protein
CTL	Sitotoksik T Lenfositler
Cyt-c	Sitokrom-c
DDB1	Damage-Specific DNA-Binding Protein 1
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinase
FADD	Fas-Associated Death Domain Protein
FasL	Fas Ligand
FOXO	Forkhead Box Subgroup O
G6PD	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
GADD45	Growth Arrest And DNA Damage- İnducible Protein 45
GDH	Glutamate Dehydrogenase
GPx	Glutasyon Peroksid (GSH-Px)
GR	Glucocorticoid Receptor
GRd	Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd)
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside GSH

Kısaltmalar**Açıklamalar**

H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HIF-1α	Hipoksi İndükleyici Faktör -1alfa
HRP	Horse Radish Peroxidase
HtrA	High-Temperature Requirement A
IAPs	Inhibitor Of Apoptosis Protein
ICE	İnterlökin 1b Dönüştürücü Enzim
IDE	Insulin Degrading Enzyme
IDH2	Isocitrate Dehydrogenase 2 (NADP+)
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IKK	I κ B-Kinase
IL	İnterlökin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
İp	İntraperitoneal
JNK	Jun-N-Terminal Kinase
LC3	Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3
LPS	Lipopolysaccharide
MAO-A	Monoamine Oxidase Type A
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDA	Malondialdehyde
MDD	Major Depression Disorder
Mdm2	Murine Double Minute 2
MiR-7	MicroRNA-7
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9
MnSOD	Manganez Süperoksit Dismutaz
MPP	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
MST1	Mammalian STE20-Like Protein Kinase 1
MT1-2	Melatonin Reseptörü 1-2
Na₂HPO₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid- indirgenmiş NAD
NaOH	Sodyum Hidroksit
NDGA	Nordihydroguaiaretic Acid

Kısaltmalar	Açıklamalar
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NK	Natural Killer
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NREM	Non-Rapid Eye Movement
Nrf2	NF-E2 Related Factor-2
NSCs	Neural Stem Cells
O₂	Oksijen
Omi	Mammalian Serine Protease
ONOO	Peroksinitrit
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
OX2R	Orexin Receptor Type 2
PA26	Sestrin 1
PBS	Phosphat Buffered Saline
PEPCK	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
PGC1α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α
PI3K	Phosphoinositide 3 Kinase
PKB	Protein Kinase B (PKB)
Pol I	DNA Polymerase I
PP2A	Protein Fosfataz 2A
rDNA	Recombinant DNA
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROR	Tirozin Kinaz Benzeri Orphan Reseptör
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RZR	Retinoid Z Reseptör
Sc	Subkutan
SCN	Suprakiazmatik Nukleus
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SGK	Serum-and Glucocorticoid-Induced Kinase
Sir2	Silent Information Regulator 2 Proteins
SIRT1-7	Memeli Sirtüinleri 1-7
SMAC	Second Mitochondrial Activator of Caspase

Kısaltmalar**Açıklamalar****SOD**

Süperoksit Dismutaz

SREBP2

Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2

STAT

Signal Transducer And Activator Of Transcription

TAS

Total Antioksidan Seviye

TGF- β

Transforming Growth Factor-Beta

TNF- α

Tümör Nekroz Faktör-Alfa

TNF-R

Tümör Nekroz Faktör Reseptörü

TORC1

Target of Rapamycin Complex 1

TOS

Total Oksidan Seviye

TRADD

TNF-Receptor-1 Associated Death Domain Protein

1. GİRİŞ

Yaşlanma, modern toplumlar için önemli bir sosyoekonomik problemdir ve kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar ve kanser dahil olmak üzere çoğu patoloji için başlıca risk faktörüdür. Günümüzde yaşlanma fizyolojisini ve eşlik eden nörodejenerasyonu açıklamada kabul gören teorilerden biri “Serbest Radikal Teorisi” dir ve bu teori yaşlanmanın radikallerin DNA, protein ve lipid yapısı üzerine yaptığı hasarların birikimi sonucu ortaya çıktığını varsayar. Organizmada normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) antioksidan savunma sistemleri tarafından etkisiz hale getirilirken bu dengenin sağlanamadığı durumlarda “oksidatif stres” tablosu ortaya çıkar (Kazime Gonca Akbulut, Akbulut, Akgun, & Gonul, 2012)(Kazime Gonca Akbulut, Aktas, & Akbulut, 2015).

Artan ya da bozulan metabolik aktivite endojen ROS üretiminde ciddi bir kaynak oluştururken, ilerleyen yaşla beraber oksidan/antioksidan dengenin bozulması, hücrenin yaşamsal ve metabolik süreçlerinde rol oynayan çok sayıda genin ekspresyonunu da değiştirmektedir (Ramis, Esteban, Miralles, Tan, & Reiter, 2015). “Metabolizma - Oksidatif stres - Gen ekspresyon değişimleri” arasında oluşan kısır döngüler, zaman içinde hata birikimlerini artırır ve bu durum o hücre ya da canlıyı artık kaçınılmaz sona götürür; yaşlanma ve ölüm. Programlı hücre ölümü olan apoptoz ile yaşlanan hücrelerin ortadan kaldırılması doku homeostazının sürdürülmesinde önem taşır; ancak yaşlanmayla beraber nöral ve glial hücrelerin sayısında ve sağkalım oranlarında azalma olduğu da bilinmektedir (Savory, Rao, Huang, Letada, & Herman, 1999).

Uzun yaşam proteinleri olarak adlandırılan sirtuinler genom stabilitesini ve homeostazisi devam ettirme özelliği ile yaşam süresini arttırabilen, nikotinamid adenin difosfat (NAD+) bağımlı histon/protein deasetilaz ailesinin üyelerindendir (Michan & Sinclair, 2007). Memelilerde sirtuin ailesinin SIRT1 - SIRT7 olmak üzere yedi üyesi bulunur. Sirtuinlerin yaşlanmaya bağlı çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkileri gösterilmiştir (Donmez, 2012)(Neo & Tang, 2017). SIRT2 güçlü bir deasetilazdır ve beyinde bol miktarda eksprese edilir. Yaşlanma ile birlikte beyin dokusunda SIRT2' nin arttığını gösteren iki çalışma bulunmakla birlikte bu artışın yaşlanma sürecinde rol oynayabilecek metabolik değişimler, apoptoz ve benzeri diğer faktörlerle ilişkisi aydınlatılmamıştır (Maxwell et al., 2011) (Braidy et al., 2015). Yaşlanmada sinir sisteminde görülen SIRT2

birikiminin nörodejenerasyonla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nitekim, SIRT2' nin farmakolojik (sirtinol, salermide, AGK-2, AK-7 vb) ya da genetik inhibitörleri Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöroprotektif etkili görünmektedir (Donmez & Outeiro, 2013) (Neo & Tang, 2017). Kendi çalışmamızda farmakolojik SIRT2 inhibitörlerinden salermidin in vivo uygulaması ile erişkin sıçanların hipokampuslarında SIRT2' nin inhibe edilebildiğini ve SIRT2 inhibisyonuna lipid peroksidasyondaki azalmanın ve glutatyon düzeylerindeki artışın eşlik ettiğini göstermiştik (Keskin-Aktan et al., 2018). Yine aynı çalışmamızda SIRT2 inhibisyonunda etkili olduğunu gösterdiğimiz melatonin uygulamasının hipokampusta oksidatif stresi azalttığını, Bcl-2 ve Bcl-2/Bax oranında da anlamlı düzeyde artış sağladığını gösterdik. Dolayısıyla SIRT2 inhibisyonu sağlayan stratejiler oksidatif stresi baskılayıp apoptotik kayıpları azaltarak nörodejenerasyonun önlenmesine aracılık ediyor olabilir.

FOXO (Forkhead Box class O) alt ailesinin üyeleri olan FOXO1, FOXO3a, FOXO4, FOXO6 transkripsiyon faktörleri insulin/IGF (insulin-like growth factor) sinyal yolağında yer alır ve bu yolak üzerinden metabolizma, apoptoz ve yaşlanma süreçlerinin düzenlenmesinde görev alırlar. FOXO' ların hemen hemen tüm organlarda ekspresyonu vardır ve mRNA düzeyleri açısından FOXO1 yağ dokuda, FOXO3 beyinde, FOXO4 kalpte, FOXO6 ise nöral gelişim evresinde yine beyinde bol miktarda eksprese edilmektedir (Greer & Brunet, 2005). FOXO' lar manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını arttırarak hücrede metabolizma ve stres yanıtlarının düzenlenmesinde rol oynarken, diğer taraftan hücre döngüsü inhibitörü p27kip1, p130, ve Bim gibi proapoptotik faktörlerin ekspresyonlarını arttırarak apoptozu da indükleyebilirler (Wang, Nguyen, Qin, & Tong, 2007)(Luo et al., 2013). Hidrojen peroksit tedavisi sonucu artan oksidatif stres düzeyine paralel SIRT2 ekspresyonunun arttığı ve artan SIRT2' nin FOXO3a deasetilasyonu ile Bim aracılı apoptozu indükleyebildiği gösterilmiştir (Wang et al., 2007). Dolayısıyla oksidatif stresle başa çıkmada SIRT2 aracılı FOXO3a deasetilasyonu etkili olabilir; ancak bu durum hücrenin maruz kaldığı stres düzeyiyle ilişkili olarak hücrenin ölümü-apoptozuyla da sonuçlanabilir.

Pineal bezin esas hormonu olan melatonin anti-oksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkilidir ve melatonin reseptörlerinin santral sinir sisteminde çok yaygın bir dağılımı vardır. Ne var ki, melatonin düzeyleri yaşlanma ile azalmaktadır (Karasek, 2007). Yaşlanma sürecinde izlenen nörodejeneratif olgular, hipokampal ve kortikal nöronların

sayısındaki kayıplar yine yaşlanma sürecinde izlenen melatonin salgısındaki azalma ile ilişkilendirilmektir. Nitekim, gençlere kıyasla yaşlı sıçanların hipokampus-dentat gyruslarında Bax, Bak, AIF gibi pro-apoptotik proteinlerin daha yüksek, anti-apoptotik proteinlerin ise daha düşük olduğu, melatonin ile yapılan tedavinin ise bu dengeyi tersine çevirebildiği gösterilmiştir (Kireev, Vara, & Tresguerres, 2013). Melatonin uygulamasının iskemik beyin hasarı modeli oluşturulan sıçanların korteks ve hipokampuslarında, yaşlanma ile giderek artan inflamasyonu ve apoptotik aktiviteyi baskıladığı, dolayısıyla nöronların sağkalım oranlarını arttırdığı da gösterilmiştir (Paredes et al., 2015). Diğer taraftan melatonin kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir, melatonin HepG2 (hepatocellular carcinoma cells) hücrelerinde FOXO3a aracılı pro-apoptotik Bim düzeylerini arttırabilmektedir (Carbajo-Pescador et al., 2013). Biz de daha önceki pek çok çalışmamızda melatoninin apoptoz, oksidatif stres ve immün cevapların regülasyonundaki rolünü ve yaşlanan beyindeki nöroprotektif etkisini gösterdik (K G Akbulut, Gönül, & Akbulut, 2001)(Kazime Gonca Akbulut, Gonul, & Akbulut, 2008)(Kazime Gonca Akbulut et al., 2012)(Kazime Gonca Akbulut, Aktas, et al., 2015)(Keskin-Aktan et al., 2018).

Kuvvetli bir antioksidan olarak bilinen curcuminin, anti-inflamatuar, anti-kanser özellikleri ile nöroprotektif etkinliği bilinmektedir (Mansouri, Sabetkasaei, Moradi, Masoudnia, & Ataie, 2012). Drosophilalarda oluşturulan transgenik Parkinson hastalığı modelinde curcumin uygulamasının oksidatif stresi ve apoptozu azalttığı, dolayısıyla yaşam süresini de uzattığı gösterilmiştir (Siddique, Naz, & Jyoti, 2014). Kemirgenlerde ise curcuminin Alzheimer hastalığında amiloid plak oluşumunu azalttığı ayrıca bellek fonksiyonlarında da iyileşme sağladığı gösterilmiştir (Jayasena et al., 2013). Dolayısıyla curcumin nöroprotektif etkili bir polifenol olarak kabul edilebilir. Kendi çalışmalarımızda curcuminin yaşlanan beyindeki antioksidan etkisini serebral korteks, hipokampus ve serebellum gibi farklı beyin bölgelerinde gösterdik (Kazime Gonca Akbulut, Keskin Aktan, & Yazıcı Mutlu, 2015), ayrıca erişkin sıçan hipokampusunda SIRT2 ekspresyonunun curcumin ile baskılanabildiğini de ilk kez bildirdik (Keskin-Aktan et al., 2018). Ne var ki, curcuminin yaşlanmada, beyinde SIRT2 ekspresyonlarına etkisi ve ayrıca FOXO3a ilişkisi aydınlatılmamıştır.

Salermide, farmakolojik sirtuin inhibitörlerindendir ve in vitro olarak salermidin kanser hücrelerinde apoptotik etkili olduğu gösterilmiştir (Lara et al., 2009). Salermidin genelde in vitro kullanımı görülmektedir, bir çalışmada travmatik beyin hasarı modelinde hasar

öncesi in vivo ve in vitro salermide uygulaması gösterilmiş ve salermidin travmatik beyin hasarı sonrasında nöronların sağ kalım oranlarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Zhao et al., 2012). Daha önceki çalışmamızda intraperitoneal salermid uygulaması ile erişkin sıçanların hipokampuslarında SIRT2 düzeylerinin inhibe edilebildiğini göstermiştik (Keskin-Aktan et al., 2018). Bu çalışmamızda da SIRT2 inhibiyonunun yaşlanma, oksidatif stres ve apoptozdaki rolünü gösterebilmek için yine farmakolojik SIRT2 inhibitörü olarak salermide kullandık.

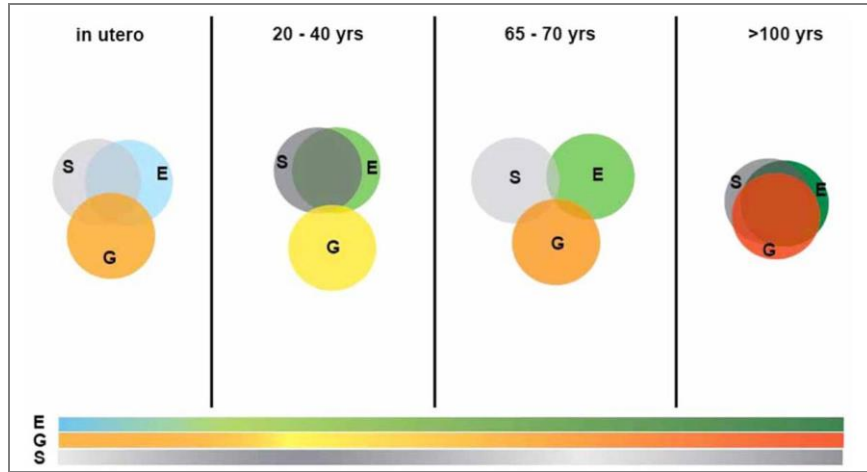
Literatürde yaşlanma ile oksidatif stres ilişkisini gösteren ve melatonin, curcumin gibi antioksidanların da radikal hasarı azaltıcı etkisine değinen çok sayıda çalışma mevcuttur; ancak yaşlanma ile beyinde SIRT2 ve FOXO3a düzeylerinin nasıl değiştiği ve bu değişimlerin yaşlanan nöronlarda apoptotik aktiviteyi nasıl etkilediği henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Bu çalışma yaşam süresinin belirleyicisi olan hücre ölüm mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlamak amacıyla planlandı. Çalışmamızda, genç ve yaşlı sıçanların serebral korteks ve hipokampus dokularında oksidatif stres, apoptoz (Bcl-2, Bax, Bim), SIRT2 ve FOXO3a ekspresyonları ile tüm bu değişkenler arasındaki ilişkiler araştırıldı. Ayrıca melatonin ve curcumin tedavisinin yaşlanma sürecinde bu değişkenler üzerine etkileri gösterildi. Dolayısıyla, bu çalışma ile ortaya konabilecek muhtemel ilişkiler, özellikle beyin yaşlanmasını kontrol eden protein ve yollarının aydınlatılmasına önemli katkı sağlayacaktır. Ayrıca, hem yaşlanmanın geciktirilmesi ve hem de nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi konusunda yeni tedavi hedeflerinin ortaya çıkmasında temel teşkil edebilecektir. Bu bağlamda çalışmamız için belirlediğimiz spesifik hedeflerimiz şöyledir;

- i. Yaşlanmanın serebral korteks ve hipokampus dokularında oksidatif stres, apoptoz (Bcl-2, Bax, Bcl-2/Bax oranı, Bim), SIRT2 ve FOXO3a ekspresyonlarına etkisinin araştırılması.
- ii. Gençlerde ve yaşlılarda melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının oksidatif stres, apoptoz (Bcl-2, Bax, Bcl-2/Bax oranı, Bim), SIRT2 ve FOXO3a ekspresyonlarına etkisinin araştırılması.
- iii. Gençlerde ve yaşlılarda oksidatif stres, apoptoz (Bcl-2, Bax, Bcl-2/Bax oranı, Bim), SIRT2 ve FOXO3a ekspresyonları arasındaki korelasyonların araştırılması.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaşlanma

Yaşlanma, genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşim ile ortaya çıkan kompleks bir süreçtir. Sağlıklı yaşlanmanın ve uzun ömürlülüğün ana belirleyicileri olan bu faktörlerin önemi ve birbirleriyle olan etkileşimleri yaşam sürecimiz boyunca değişkenlik göstermektedir (Cevenini et al., 2010) (Şekil 2.1). Bu süreç her ne kadar bireysel farklılıklar gösterse de hastalık insidansında artış, rejenerasyon kapasitesinde azalma, iç ve dış streslere hassasiyette artış ve bu streslerle başa çıkmada yetersizlik gibi özelliklerin yaşlanmanın genel fenotipini oluşturduğu söylenebilir (Sorrentino, Sanoff, & Sharpless, 2014).



Şekil 2.1. Sağlıklı yaşlanmanın ve uzun ömürlülüğün ana belirleyicileri arasındaki önem ve etkileşimler (Cevenini et al., 2010)

*Kısaltmalar; E:environment (çevresel faktörler), G:genetics (genetik faktörler), S:stochasticity (rastgelelik). Dairelerin çakışması, bu bileşenler arasındaki etkileşimleri göstermektedir. Renk tonları her bileşenin görece önemine işaret eder ve rengin artan yoğunluğu (örneğin sarıdan kırmızıya) artan önemi ifade eder. Çevresel faktörler (E) açısından intrauterin yaşamla postnatal yaşam birinden çok farklı olduğu için renk tonu belirgin farklıdır.

2.1.1. Yaşlanma fizyolojisi ve beyin

Yaşlanma, ilerleyen yaşla beraber hücre ve doku düzeyinde gerçekleşen istenmeyen, zararlı değişimlerin birikimi ile gelişir ve bu durum canlıda hastalık ve ölüm riskini arttırmaktadır. Gelişimsel ve genetik defektler, edinilmiş hastalıklar, çevresel faktörler ve

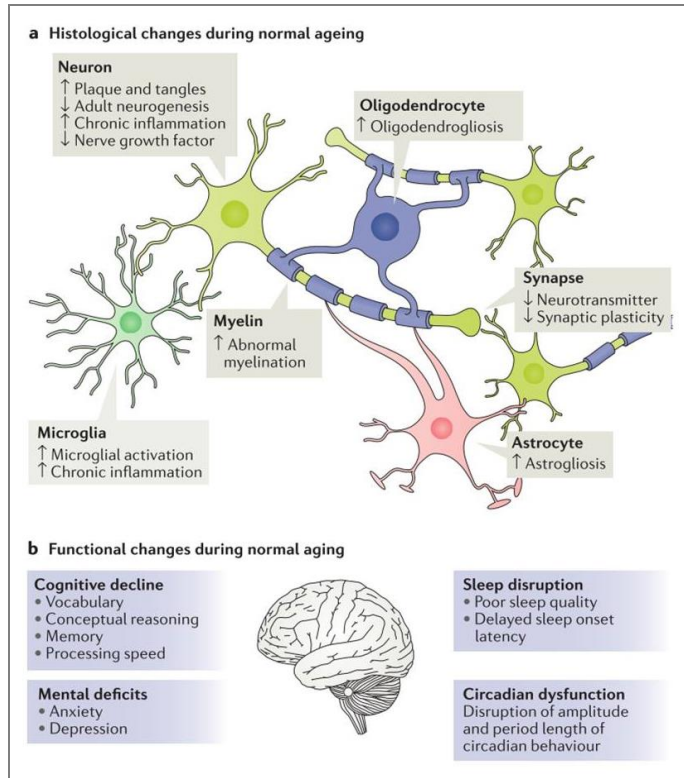
ayrıca canlının doğal fizyolojik süreçleri de yaşlanmada izlenen hasar birikimlerine katkıda bulunabilir (D Harman, 2001).

Yaşlanma, insan vücudunda tüm organ sistemlerini etkileyebilir ve bu etki hem morfolojik hem de fizyolojik fonksiyonlarda izlenen progresif gerileme şeklindedir. Beyin, yaşlanma etkilerinin izlendiği en önemli organlardan birisidir ve bu etkilenim hem nöral hem de glial düzeydedir. Erken dönem çalışmalarda yaşlanma ile korteks, subikulum, dentat gyrusun hilusu ve CA1 gibi kortikal ve hipokampal bölgelerde yoğun hücresel kayıpların olduğu belirtilse de (Brody, 1970)(West, 1993)(Šimić, Kostović, Winblad, & Bogdanović, 1997) yaşlanma ile nöron sayılarının değişmediğini bildiren çalışmalar da vardır (Terry, DeTeresa, & Hansen, 1987)(Leuba & Kraftsik, 1994). Yaşlanmada görülen beyin atrofisi özellikle frontal korteks ve hipokampusta daha belirgindir, ancak bu durum erken dönem çalışmalarda önerildiği gibi yoğun kitlesel nöron kayıpları şeklinde değildir (Peters, 2002). Ne var ki nörodeneratif olgularda hipokampal ve kortikal alanlardaki nöral kayıplar belirginleşmektedir. Yaşlanmaya bağlı neokortekste en belirgin değişiklikler neokorteksin 1. tabakasında izlenir. Yaşlanma ile piramidal hücrelerin apikal uçlarındaki dallanmalar ve sinaptik bağlantılarındaki kayıplar ile kortikal 1. tabakada incelme olur. Neokorteksin daha alt tabakalarındaki dentritlerin ve sinaptik bağlantıların yaşlanmadan nasıl etkilendiği çok net olmasa da reseptör ve nörotransmitter (asetilkolin, NE, serotonin, dopamin vb) düzeyleri azalmaktadır ve tüm beyin boyunca miyelinizasyonda yer yer bozulmalar görülmektedir (Peters, 2002)(Satoh, Imai, & Guarente, 2017). Yaşlanmaya bağlı olarak prefrontal korteksin daha alt katmanlarında (örn. layer II/III) ve diğer kortikal alanlarda da sinaptik yoğunlukta, sinaptik terminal sayısında ve nörotransmitter salınımında azalma gibi sinaptik bölge değişiklikleri izlenmekte ve bu değişikliklere bellek ve kognisyondaki bozukluklar eşlik edebilmektedir (Petrulia, Mattson, & Yao, 2014).

Korteksle benzer şekilde yaşlanmanın hipokampustaki esas etkisi dramatik düzeyde nöron kayıplarından ziyade sinaptik bağlantılar ve nöral transmisyon üzerinedir. Ne var ki, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif olguların erken evrelerinde görülen minimal düzeydeki kademeli nöron kayıpları ileri evrelerde hipokampusu da içine alan ve geniş kortikal alanlara yayılmış global beyin atrofisiyle sonuçlanabilir (Risacher et al., 2017).

Yaşlanan beyinde iki tip glial hücrede anormal bir artış izlenebilir; astrositlerde ve oligodentrositlerde (astrogliazis, oligodentrogliozis). Yaşlanma ile oligodentrositler myelin

formasyon alanlarında yer yer kabartılar şeklinde yoğun inklüzyonlar oluşturur, mikrogliyal hücreler ve astrositler çok miktarda fagositik materyal biriktirmeye başlarlar. Yaşlanmada myelinizasyondaki azalma/bozulma gibi değişikliklerin yanı sıra NGF (nerve growth factor) konsantrasyonunda azalma da izlenir (Peters, 2002). Yaşlanmaya bağlı olarak bahsi geçen yapısal değişikliklere kognitif ve mental defisitler, uyku ve sirkadiyen ritm bozuklukları gibi fonksiyonel değişiklikler de eşlik etmektedir (Satoh et al., 2017)(Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Fizyolojik yaşlanmada beyinde görülen hücresel, histolojik ve fonksiyonel değişiklikler (Satoh et al., 2017)

2.1.2. Beyinde nörodejenerasyon ve selektif nöronal hassasiyet

Yaşlı beyin, kronik-düşük-şiddetteki inflamasyon ve artmış mikrogliyal aktivasyon ile karakterizedir. Proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6 ve TNF α) mikrogliyal salınımı artmıştır, ayrıca yaşlanmaya bağlı olarak kan-beyin bariyerindeki geçirgenliğin artması sonucu periferik immün sistemden kaynaklı proinflamatuvar sitokinler de beyne ulaşır. Yaşlı beynin patojenler üzerindeki fagositik etkinliği de azalmıştır. Özetle yaşlanma ile beyinde nöroinflamasyon artar, IL-10, IL-4 düzeyleri azalır ve nöronların stresle başa çıkma yetileri azalır. Dolayısıyla beyinde sinaptik hasarlar ve sonuçta nöronal kayıplar

gelişir (Satoh et al., 2017). Bazı olgularda nöronların içinde ya da dışında anormal protein plaklarının ya da yumaklarının (tangle) oluşumu/birikimi görülür ki bu durum da nöron kayıpları ile sonuçlanır (Price & Morris, 1999). Yaşlanmaya bağlı izlenen nöroinflamasyon tablosu esasen yaşlanma ilişkili Alzheimer (AD), Parkinson (PD) vb nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır (Q. Wang, Liu, & Zhou, 2015)(Heneka et al., 2015). Yaşlanmaya bağlı gelişen kronik nöroinflamasyon ROS/RNS artışına da neden olur ki beyin dokusu metabolik özellikleri ile oksidan hasarlara zaten duyarlıdır. Yaşlanmayla birlikte nöronların yanı sıra, nöral ve glial hücreler arasındaki metabolik ilişkilerin bozulması GSH vb antioksidan savunma sistemleri açısından zaten görece fakir olan beyin dokusunu daha da savunmasız bırakır (Floyd, 1999)(Floyd & Hensley, 2002)(Schmidt & Dringen, 2012).

Yaşlanma ve nörodejenerasyona bağlı morfolojik ve fonksiyonel değişimler beyinde bölge spesifik özellik göstermektedir. Örneğin Alzheimer hastalığında entorinal korteks, hipokampal CA1 bölgesi, frontal korteks ve amigdaladaki nöron grupları, Parkinson hastalığında substantia nigradaki dopaminerjik nöronlar etkilenir. Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ise esas olarak spinal motor nöronların, ayrıca kortikal ve beyin sapındaki nöronların etkilenimi ile karakterizedir. Beyinde bölgesel farklılıkların ötesinde “selektif nöronal hassasiyet (SNH)” (SNV; selective neuronal vulnerability) fenomeninden söz edilmektedir. SNH, santral sinir sistemindeki belli nöron gruplarının hücresel hasara, nörodejenerasyona ya da hücre ölümüne neden olan stres koşullarına farklı düzeylerdeki duyarlılığını ifade eder (Xinkun Wang & Michaelis, 2010). Prefrontal korteks ve hipokampus stres koşullarından en çok etkilenen bu nedenle de nörodejenerasyona daha çok maruz kalan beyin bölgeleri olarak gösterilir; buna ek olarak SNH fenomeni bölge alt-bölgeleri arasında da stres duyarlılığı açısından farklılıklar olacağını belirtir. Örneğin; hipokampusta CA1 ve CA3 bölgelerinin oksidatif strese duyarlılıkları birbirlerinden farklıdır. Serebellar granüler nöronlar ve CA1 bölgesi; serebral kortikal nöronlar ve CA3 bölgesine kıyasla oksidatif strese daha duyarlı (hasara açık) bulunmuştur (Xinkun Wang et al., 2009). Hipokampusta CA1 bölgesi global serebral iskemi, AD, kronik epileptik nöbetler, yaşlanma, oksidatif stres vb stres koşullarına CA3 bölgesine kıyasla daha duyarlıdır. Ne var ki CA1 ve CA3 benzer piramidal nöronları içerir, hücre morfolojileri benzerlik gösterir ve lokasyon açısından da fiziken birbirine yakın bölgelerdir ancak CA1 nöronları CA3 bölgesine kıyasla daha fazla süperoksit içerir, mitokondriyal ROS salınımı daha fazladır, ayrıca ROS üreten ve antioksidan genlerin ekspresyonu daha fazladır

(Xinkun Wang & Michaelis, 2010). Oksidatif stres için selektif nöronal hassasiyeti belirleyen faktörler arasında şunlar sayılmaktadır;

- Hücrenin sinyal molekülleri olarak ROS/RNS talebinin yüksek olması
- Artmış intrinsik oksidatif stres
- Yüksek enerji ihtiyacına karşılık yetersiz ATP üretimi, mitokondriyal disfonksiyonlar
- Kronik inflamasyon (nöral ve glial cross talk belirleyicidir)
- Yetersiz DNA tamiri
- Kalsiyum disregülasyonu ve glutamat hiperaktivitesi

Yukarıda listenen hücresel, moleküler ve metabolik faktörlerin yanı sıra strese duyarlı nöronların ebat olarak daha büyük ve aksonları çok daha uzak mesafelere projeksiyon yapan nöronlar olduğu belirtilir. Bu duruma ALS’ de üst ve alt motor nöronların, PD’ de substantia nigradaki dopaminerjik nöronların etkilenimi örnek gösterilebilir; bu nöronlar görece daha büyük ve nörodejenerasyona daha duyarlılardır. Büyük nöronlar; nispeten geniş yüzey alanları sebebiyle ekstrasellüler ortamdaki toksik maddelere daha fazla maruz kalırlar, agregat oluşturma eğilimi gösteren nörofilament içerikleri daha yüksektir ve çok daha uzak mesafelere aksonal transport yapmak durumundadırlar. Dolayısıyla büyük nöronların enerji gereksinimleri, metabolik aktiviteleri yüksektir ve tüm bu olası nedenlerle strese duyarlılıklarının daha fazla olması beklenebilir (Xinkun Wang & Michaelis, 2010).

Selektif nöronal hassasiyeti açıklamaya yardımcı olgulardan birisi de astrositlerin yaşlanmaya bağlı durumudur. Kognitif gerilemeye daha hassas olan hipokampus ve striatum bölgelerindeki astrositlerin kortikal astrositlere kıyasla yaşlanmada daha fazla geni up-regüle ettiği gösterilmiştir. Benzer şekilde yaşlanma ile down-regüle edilen gen sayısı kortikal astrositlerde striatal ve hipokampal astrositlere kıyasla daha azdır. En çok up-regüle olan genler bekleneceği üzere inflamasyon ilişkili genlerdir, en çok down regüle olan genler arasında ise mitokondriyal fonksiyon ve enerji üretiminden sorumlu (Ucp2, Cox8b, Atp5g1) genler ile antioksidan savunma sistemleriyle ilişkili genler (Gpx8, Atox1) yer alır. Bu durum bahsi geçen beyin bölgelerinde yaşlanmaya bağlı olarak artan oksidatif ve metabolik stresi açıklamaya yardımcıdır (Clarke et al., 2018).

Selektif nöronal hassasiyeti belirleyen faktörler aynı zamanda selektif nöronal dejenerasyonun ve selektif nöronal ölümün belirleyicileri olarak kabul edilebilir. Bu

nedenle selektif nöronal hassasiyetin beyinde bölge ve alt-bölgeler bazında tanımlanması önemlidir fakat bunun yapılabilmesi için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.3. Yaşlanma teorileri

Günümüzde moleküler biyoloji ve genetik alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da neden yaşlandığımızı, ne zaman yaşlanmaya başladığımızı, yaşlanmanın biyobelirteçlerinin ne/neler olduğunu ya da insan ömrünün nasıl ve ne kadar uzatılabileceğini net bir şekilde açıklayabilmek henüz mümkün görünmemektedir. Yaşlanmayı açıklamaya çalışan çok sayıda teori mevcuttur. Ancak bu teoriler de tek başlarına yaşlanmaya dair soruları bütünüyle cevaplamada yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla yaşlanmayı, bu teoriler üzerinden daha bütüncül bir yaklaşımla irdelemek daha uygun görünmektedir.

İlk kez 1990 yılında Medvedev tarafından 300’ den fazla yaşlanma teorisinin rasyonel bir sınıflaması yapılmasına karşın, (Medvedev, 1990) günümüzde yaşlanmanın modern biyolojik teorileri ‘programlanmış teoriler’ ve ‘hata (hasar) teorileri’ olmak üzere iki ana başlık altında toplanmaktadır (Kunlin, 2010). Programlanmış teorilere göre yaşlanma biyolojik bir takvimi izleyen doğal bir süreçtir ve bu sürecin düzenlenmesi gen ekspresyon değişimlerine bağlıdır. Programlanmış teorilerin 3 alt kategorisi vardır;

- 1) Programlanmış Uzun Ömürlülük Teorisi (Programmed Longevity)
- 2) Endokrin Teori (Endocrine Theory)
- 3) İmmünolojik Teori (Immunological Theory)

Zaman içinde organizmada kümülatif artış gösteren hasar birikimlerini yaşlanmanın esas nedeni olarak gösteren “hata (hasar) teorileri” ise 5 alt kategoride incelenebilir (Kunlin, 2010):

- 1) Aşınma ve Yıpranma Teorisi (Wear And Tear Theory)
- 2) Yaşam Hızı Teorisi (Rate Of Living Theory)
- 3) Çapraz-Bağ Teorisi (Cross-Linking Theory)
- 4) Serbest Radikal Teorisi (Free Radicals Theory)
- 5) Somatik DNA Hasar Teorisi (Somatic DNA Damage Theory)

2.2. Oksidatif Stres

2.2.1. Yaşlanmanın serbest radikal teorisi; oksidatif stres

Serbest radikal teorisi ilk kez 1954' te Dr. Gerschman tarafından tanıtılmış (Gerschman, Gilbert, Nye, Dwyer, & Fenn, 1954) ancak esas olarak Dr. Denham Harman tarafından geliştirilmiştir (Denham Harman, 1956). Serbest radikal teorisi süperoksit ve diğer serbest radikallerin, hücrenin makromoleküler bileşenlerine zarar verdiğini ve biriken hasarların hücrelerin ve sonuçta organların işlevini durdurmasına neden olduğunu önermektedir. Nükleik asitler, lipitler, şekerler ve proteinler gibi makromoleküller serbest radikallere karşı duyarlıdır. Diğer taraftan vücudumuz, serbest radikallerin tehlikeli birikimini önlemeye yardımcı olan enzim formundaki bazı doğal antioksidanlara sahiptir. Yapılan pek çok çalışma reaktif oksijen türlerinin (ROS) sinyalizasyonunun muhtemelen hücre yaşlanmasının ve organizma yaşlanmasının oluşumundan sorumlu olan en önemli enzim/gen yoluğu olduğunu düşündürmektedir (Afanas, 2010)

Peroksitler ve aldehitler gibi “serbest radikal” kategorisine girmeyip esasen “non-radikal” özellik gösteren pek çok “reaktif oksijen türü (ROS)” hücrelerde oksidatif hasarda rol oynayabilir. Bu farkındalık dolayısıyla “yaşlanmanın serbest radikal teorisi”, zaman içinde “yaşlanmanın oksidatif stres teorisi” şekline evrilir (Sohal & Weindruch, 1996). Oksidatif stres, normal fizyolojik koşullar altında bile aerobik hücrelerdeki pro-oksidanlar ile anti-oksidanlar arasındaki dengesizlik halinin kronik bir şekilde devam etmesinden kaynaklanır. Fizyolojik yaşlanma sürecinde izlenen bu dengesizlik hali, makromoleküllerdeki (protein, karbonhidrat, lipid, DNA, RNA) oksidatif hasarların birikimine neden olur ve bu hata/hasar birikimleri ile hücrenin yaşamsal fonksiyonlarında progresif kayıplar izlenebilir. Dolayısıyla, sadece yaşlanmada değil, nörodejenerasyondan kronik hastalıklara hatta kansere kadar pek çok hastalığın patogeneğinde oksidatif stresten söz edilir.

ROS' lar esas olarak hücrede yıkıcı etkileri ile anılsalar da, endojen üretilen ROS intrasellüler sinyalizasyon ve regülasyon gibi fizyolojik süreçlerde yer alır. Ancak antioksidan sistemlerin fizyolojik düzeyde üretilen endojen ROS miktarını bile kompanse edemeyecek düzeyde yetersiz kaldığı ya da ekzojen faktörlerle beraber mitokondriyal ROS üretiminin normalden fazla olduğu durumlarda hücre “oksidatif stres” e maruz kalır. Oksidatif stres düzeyi de hücrede yaşlanma sürecinin başlatılması, yaşlanma hızının

belirlenmesi ya da hücre ölüm programlarının başlatılmasında major rol oynar (Muller, Lustgarten, Jang, Richardson, & Remmen, 2007)(Oliveira, Nogueira-Machado, & Chaves, 2010).

2.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve oluşumu

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren atom/atom-grubu/moleküllerdir. Örneğin hidrojen (H) atomu eşleşmemiş bir elektrona sahiptir ve çoğu geçiş metal iyonları, nitrik oksit (NO), ve oksijen (O_2) ise eşleşmemiş iki elektrona sahiptir. Ortaklanmamış elektrona sahip olan Fe^{3+} , Cu^{2+} ve Mn^{2+} gibi metaller serbest radikal olarak kabul edilmezler fakat serbest radikal oluşumuna aracılık ederler.

Paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahip olduğu için biradikal olarak ta isimlendirilen O_2 , serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerken radikal olmayanlarla daha yavaş reaksiyona girer. O_2 ' nin ortaklanmamış elektronlarından birisinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde başka bir orbitale yer değiştirmesi ile singlet oksijen (1O_2) oluşur. 1O_2 ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal kabul edilmez ancak reaktif haldeki bir oksijen molekülüdür. Oksijenin eşleşmemiş elektronları, ROS grubunda yer alan süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve peroksinitrit ($ONOO-$) de dahil olmak üzere yüksek derecede reaktif türler oluşturmak için tepki verir. (Oliveira et al., 2010)

Özetle, “Reaktif oksijen türleri” kavramı çok geniş bir molekül yelpazesine sahiptir ve serbest radikal özelliği gösterenler (radikaller) ve radikal özellik göstermeyenler (non-radikaller) şeklinde çok sayıda ROS tanımlanmıştır (Çizelge 2.1).

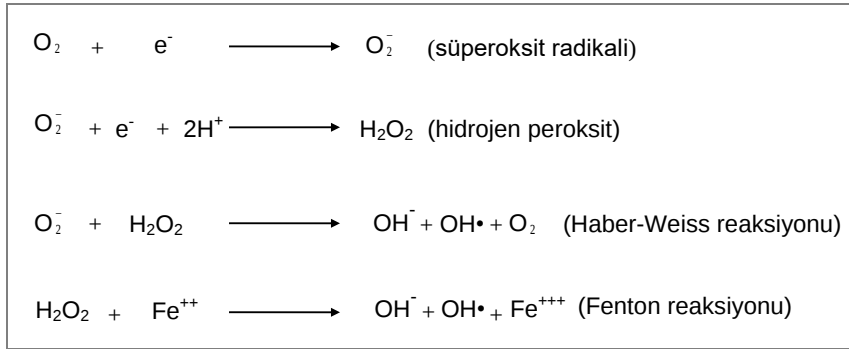
Çizelge 2.1. Radikal ve non-radikal özellik gösteren bazı reaktif oksijen türleri

Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller		Non-Radikaller	
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksi	$OH^{\bullet}$	Hipoklorik asit	$HOCl$
Peroksi	$ROO^{\bullet}$	Hipobromik asit	$HOBr$
Alkoksi	$RO^{\bullet}$	Ozon	O_3
Hidroperoksi	$HOO^{\bullet}$	Singlet oksijen	1O_2

ROS kaynakları

Aerobik canlılarda üretilen ROS' un yarısından fazlası mitokondri kaynaklıdır ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri, sitokrom p450, lipooksijenaz, siklooksijenaz, NADPH oksidaz kompleksi, ksantinoksidaz ve peroksizomlar gibi çeşitli enzim sistemleri ROS üretiminden sorumludur. Radyasyon, UV, çevre kirliliği, organik çözücüler, ilaçlar, pestisitler, sigara vb dış faktörler ROS oluşumunda ekzojen kaynakları otuştururken; fagositik aktivite, peroksimal yağ asit metabolizması, enzimlerin katalitik döngüsü, otooksidasyon ve oksidoredüksiyon reaksiyonları ROS oluşumundan sorumlu endojen kaynakları oluşturur.

ROS' ların oluşumu esnasında gelişen reaksiyon basamakları şu şekilde ilerler: Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali oluşmaktadır. Süperoksit, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olması açısından önemli bir radikaldir. H_2O_2 , non-radikal bir ROS' tur ve Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında "Fenton reaksiyonu" ile, süperoksit radikalinin varlığında ise "Haber-Weiss reaksiyonu" ile çok daha reaktif ve zararlı olan hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikalini oluşturur (Şekil 2.3). Major ROS molekülleri ve metabolizmaları Çizelge 2.2' te özetlenmiştir (Nordberg & Arner, 2001).



Şekil 2.3. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil oluşum basamakları

Çizelge 2.2. Major ROS molekülleri ve metabolizmaları (Nordberg & Arner, 2001)

ROS Molekülü	Ana kaynak	Enzimatik defans sistemi	Ürün(ler)
Süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Elektron transport zincirindeki sızıntılar Aktif fagositler Ksantin oksidaz Flavoenzimler	Superoksit dismutaz (SOD) Superoksit redüktaz (bazı bakterilerde)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ H_2O_2
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Süperoksitten SOD aracılığı ile NADPH-oxidase (nötrofil) Glikoz oksidaz Ksantin oksidaz	Glutasyon peroksidaz (GPx) Katalaz Peroksiredoksin (Prx)	$\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ H_2O
Hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$)	$\text{O}_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 ' ten geçiş metalleri (Fe ya da Cu) ile		
Nitrik oksit (NO)	Nitrik oksit sentaz	Glutasyon/TrxR	GSNO

2.2.3. ROS' ların hücrel bileşenler üzerine genel etkileri

Reaktif oksijen türleri hücrede proteinler, lipidler, şekerler, DNA ve RNA gibi major hücrel bileşenleri hedef alır. Bu yapılar üzerinde oksidatif hasara bağlı gelişebilen durumlar şu şekilde özetlenebilir (Carocho & Ferreira, 2013);

- **Lipidler:** Membran fosfolipitleri doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidatif hasara oldukça duyarlıdır. Süperoksit ve hidroksil radikalleri membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturur. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Lipid peroksidasyon, membran geçirgenliğinde artışa neden olur ve sitoplazma, nükleus, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi membranöz bileşeni olan yapılarda geridönüşümsüz hasar nedenidir. Lipid

peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit (örn. malondialdehit-MDA) ve diğer karbonil bileşiklere (örn. keton, alkol, eter vb) dönüşmesi ile sona erer.

- Proteinler: ROS hasarlarına bağlı olarak amino asitlerin oksidatif modifikasyonları, peptid kırılma/bölünmeleri, hatalı inkorporasyon, hatalı katlanma, agregasyon, lipid peroksidasyon ürünleriyle girilen reaksiyonlar sonucu çapraz bağlı protein oluşumu vb durumlar görülebilir.
- DNA [nükleer (nDNA) ve mitokondriyal (mtDNA)]: Mutasyonlar, epimutasyonlar, baz modifikasyonları, dizilerin kopması ya da yer değiştirmesi, DNA-protein çapraz bağlanımı izlenebilir. Ayrıca nDNA' dan farklı olarak, mtDNA histon içermediği için mitokondriyi oksidatif strese karşı daha savunmasız kılar.
- RNA: Modifikasyonlar, hatalı kodlama, hatalı ekleme vb problemler izlenebilir
- Şekerler: Glikoksidatif hasar sonucu gelişen zincir reaksiyonlar α ve β -dikarbonil mutajenlerini oluşturabilir.

Oksidatif hasar düzeyinin belirlenebilmesi ya da takip edilebilmesi DNA, lipid veya proteinlerin oksidasyon ürünlerinin tayini ile sağlanabilir:

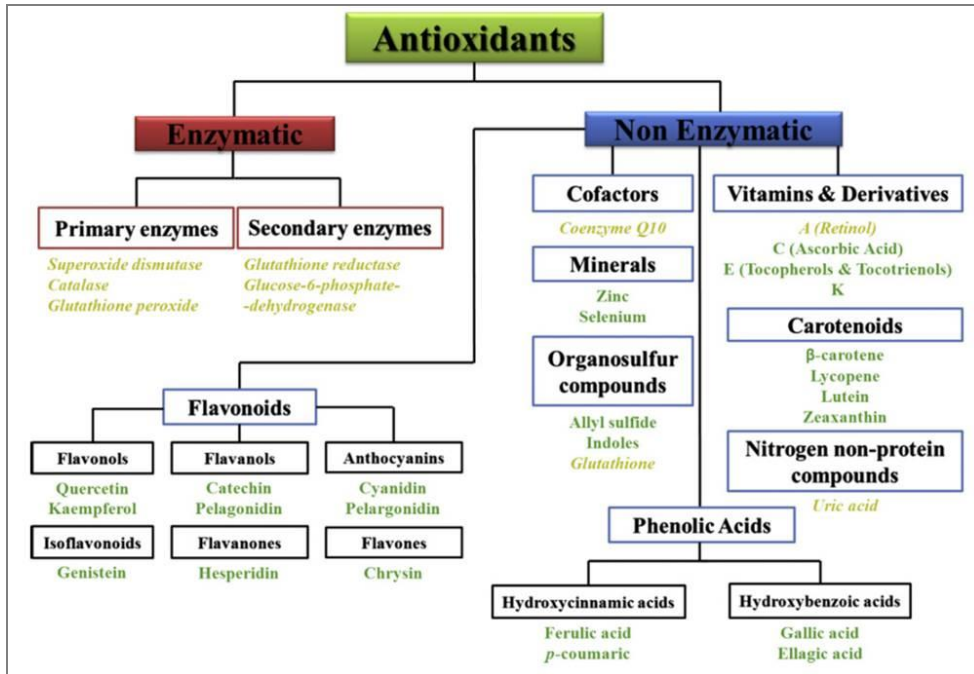
- DNA oksidasyonu için: 8-hidroksideoksiganizin (8-OH-dG)
- Lipitlerin oksidasyonu için: izoprostanlar ve tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler (TBARS)
- Proteinlerin oksidasyonu için: yapıları değişmiş amino asitlerin (protein karbonillerinin) konsantrasyon ölçümleri takip edilebilir

2.2.4. Antioksidanlar

Antioksidan terimi Halliwell & Gutteridge tarafından “oksitlenebilen substratlara kıyasla daha düşük konsantrasyonda bulunan ve substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya inhibe eden herhangi bir madde” şeklinde tanımlanmıştır (Halliwell & Gutteridge, 1989). Antioksidanlar, oksidasyon sürecini başlangıç ve/veya gelişme basamağında önleyebilen maddelerdir. ROS' lara karşı devreye giren birincil savunma hattında yer alan antioksidanlar, oksidasyonun oluşumunu önlemeye yönelik çalışır, yani oksidasyon süreci daha başlamadan önlenir. Oksidasyon reaksiyonları başlamışsa bu süreç yine antioksidanlar tarafından durdurulabilir ya da yavaşlatılabilir. Bunların dışında antioksidanlar, hücre membranı, protein ya da DNA hasarlarından sonra devreye giren

hasar-tamiri süreçlerinde de görev alabilirler. Organizmadaki bu koruyucu özellikleri nedeniyle antioksidanlara, anti-mutajenik, anti-karsinojenik ve anti-aging gibi daha pek çok rol atfedilir (Obrenovich et al., 2011).

Antioksidanlara yönelik tanımlamalar enzimatik özellikte olan antioksidanların yanı sıra enzimatik olmayan (non-enzimatik) antioksidan bileşikler de içermektedir ve oksidan moleküller gibi antioksidanlar da çok çeşitlilik göstermektedir. Antioksidanlar enzimatik özelliklerine göre (Şekil 2.4), etki mekanizmaları ya da edinim yollarına göre (Çizelge 2.3), çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır.

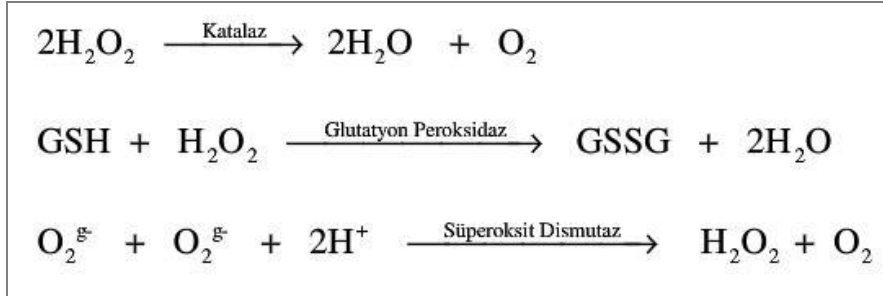


Şekil 2.4. Enzimatik özelliklerine göre antioksidanlar (Carocho & Ferreira, 2013)

Çizelge 2.3. Edinim yollarına göre antioksidanlar

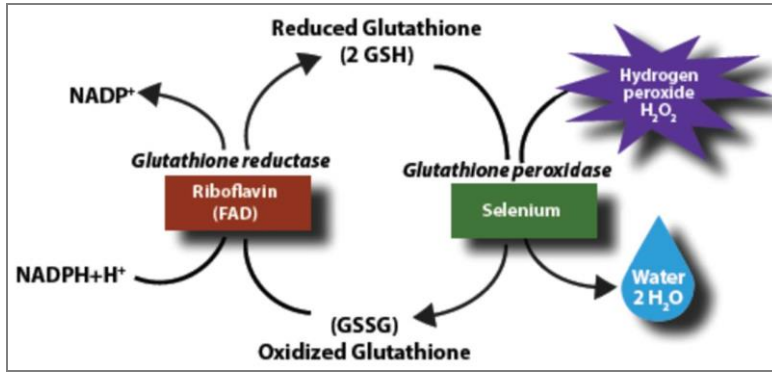
ANTİOKSİDANLAR			
Endojen kaynaklı		Ekzojen kaynaklı	
Enzimler	Küçük moleküller	Doğal	Sentetik
Katalaz	Glutasyon	Tokoferoller	BHA
Peroksidaz	Askorbik asit	Fenoller	BHT
Süperoksit dismutaz	Ürik asit	Karotenler	TBHQ
Glutasyon peroksidaz	Metal bağlayıcılar (Hb, Myg vb.)	Flavonlar	Propilgallat
Glutasyon redüktaz		Katekinler	NDGA

Endojen kaynaklı ve enzimatik özellik gösteren primer antioksidanlarımızdan katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx), H_2O_2 'in uzaklaştırılmasını, süperoksit dismutaz (SOD) ise süperoksidin uzaklaştırılmasını sağlar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Katalaz, GPx ve SOD' un enzimatik aktivitesi ile ROS eliminasyonu

Endojen kaynaklı antioksidan moleküllerden biri de glutatyondur. Glutatyon önemli bir indirgeyici ajandır ve hücrede oksido-redüksiyon dengesini sürdürerek hücreyi endojen/eksojen kaynaklı ROS' lara karşı korumada etkilidir (Schmidt & Dringen, 2012). Redükte formdaki glutatyonun (GSH) intrasellüler konsantrasyonu daha yüksektir ve selenyum içeren glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi ile okside formuna (GSSG); glutatyon redüktaz (GRd) enzime ile de tekrar redükte formuna (GSH) dönüştürülür (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Glutatyon- redoks döngüsü

Eksojen olarak dışardan aldığımız antioksidanlar genelde fenolik ve non-enzimatik yapıdaki bileşiklerdir. Bu bileşikler çeşitli bitkilerin kök, gövde, tohum yada yapraklarından temin edilebilirler. Bunların arasında önemli doğal antioksidanlar olarak fenoller, flavonlar, vitaminler, karotenler sayılabilir. Sentetik antioksidanların kullanımı ise 20 yy. başlarından dayanır ve bunlar arasında özellikle BHA ve BHT söylenebilir. Ancak sentetik antioksidanların kullanım faydalarına ilişkin görüşler tartışmalıdır.

Hem antioksidanlar hem de ROS' lar açısından her canlının sahip olduğu endojen ve eksojen kaynaklar birbirinden farklılık gösterir. Dolayısıyla aynı ortam koşullarında yaşayan canlıların bile stres yanıtları birbirinden farklı olabilir. Ayrıca ortamdaki antioksidan düzeyindeki artış, her zaman oksidasyon düzeyinde azalma ile sonuçlanmayabilir. Nitekim, bazı fenolik antioksidanlar doz bağımlı olarak çok yüksek konsantrasyonlarda antioksidan özelliklerini yitirip, aksine oksidasyonu hızlandırıcı etki gösterebilirler, hatta toksik olabilirler. Yani uygun doz ya da ortam koşulları sağlanamadığında antioksidan karakterli bileşikler de pro-oksidan gibi davranabilir (Carocho & Ferreira, 2013).

2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları

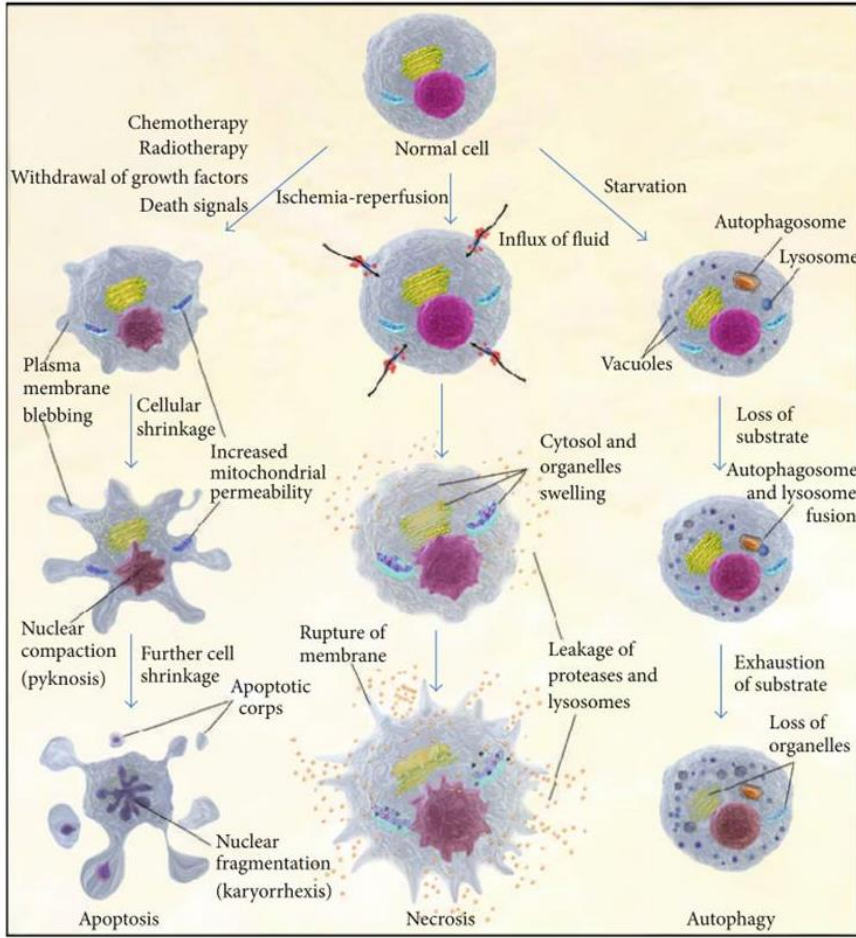
İnsan vücudunda 200' den fazla farklı tip hücre bulunmaktadır ve her bir hücrenin yaşam döngüsü; doğum, farklılaşma, işlev görme ve ölüm evrelerinden oluşur. Ayrıca her bir hücrenin yaşam süresi de birbirinden farklıdır; yaşam süreleri örneğin nötrofiller için dokuda 4 gün, eritrositler için kanda 120 gün, sinir hücreleri için ise yaklaşık 50-100 yıldır. Özellikle embriyonik gelişimde büyük önem arz eden hücre ölümü erişkin organizmada da etkinliğini sürdürür; çünkü dokuda hücresel doğum ve ölümler arasındaki dengenin sürdürülmesi gerekir.

Canlı organizmada genel olarak üç ana hücre ölüm biçiminden söz edilebilir: (i) nekroz (nekrotik ölüm), (ii) apoptozis (apoptotik ölüm), (iii) otofaji (Nunes et al., 2014) (Şekil 2.7). Nekroz, hücresel yaralanmalar sonucu zarar gören hücrenin şişip patlamasıyla sonuçlanan ölüm şeklidir. Nekrozda dağılan hücresel içerik çevre hücrelere de zarar verir ve bu tabloya inflamasyon eşlik eder. Nekrotik süreçte hücre kontrolsüzce ölüme gider; ancak nekrozdan daha farklı bir ölüm şekli olan apoptoziste ise hücre kendi ölümü sırasında aktif rol alır ve bu süreci programlı, kontrollü ve düzenli biçimde sürdürür. Ayrıca apoptotik ölüme inflamasyon eşlik etmez ve çevre hücreler zarar görmeden fagositoz yoluyla hücre apoptotik cisimcikler halinde elimine edilir.

Hücre için alternatif diğer bir ölüm biçimi “otofaji” dir. Otofaji, hücrelerde organel ve hücresel bileşen kalıntılarının otofajik vakuoller (otofagozom) içine alınması ve sonrasında otofagolizozom kompleksi içinde elimine edilmesi şeklinde gerçekleşir. Hücre kendi bileşenlerini kendi içinde sindirmektedir, bu nedenle bu ölüm modeline “kendini içten

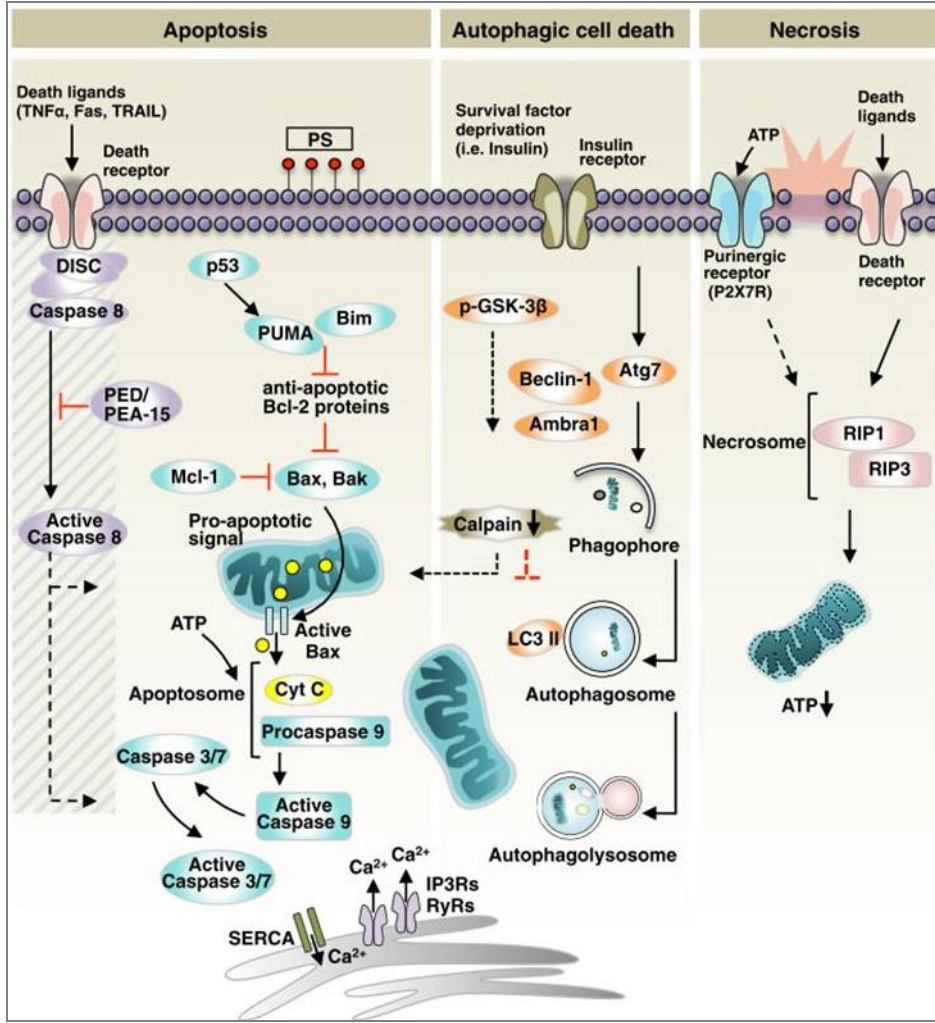
yemek” anlamına gelen otofaji adı verilmiştir. Mayalarda otofajide rol oynayan bir dizi gen tanımlanmıştır; apg (otofaji), aut (otofagositoz) vb. apg-6 geni açlıkta otofajiyi indükleyen genidir ve memelilerde tümör supresör genlerden Beclin homologudur. Otofaji de esasen programlı bir hücre ölüm şeklidir ve uyarının türü, süresi, şiddeti vb değişkenlere bağlı olarak apoptozun mümkün olmadığı durumlarda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Hatta, ılımlı düzeydeki mitokondriyal stresin otofajik, orta şiddetteki stresin apoptotik, çok şiddetli stresin ise nekrotik ölüme neden olduğu belirtilmektedir (Nishida, Yamaguchi, & Otsu, 2008).

Nekroz, apoptoz ve otofaji dışında; diğer bir hücre ölüm yolağı ise “granzim ve kalpain” yolağı/sistemidir. T ve NK (natural killer) hücreleri virüsle enfekte hücreleri elemek amacıyla granülo-ekzositoz yolağında granzimleri (Granzim B) kullanır. Kalpain ise kalsiyum bağımlı sistein proteaz enzim ailesinde yer alır ve kaspazların substratlarına benzer substratları kesebilir, prokaspazları keserek onların aktive olmasını sağlar.



Şekil 2.7. Üç ana hücre ölüm yolağı; apoptoz, nekroz ve otofaji (Nunes et al., 2014)

Hücre ölüm mekanizmaları (yolakları) morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerine göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Günümüze değin “atipik hücre ölüm modelleri” adı altında toplanabilen paraptosis, pyroptosis, pyronecrosis, oncosis vb daha pek çok ölüm şeklinin tanımlaması yapılmıştır. Esasen önerilen tüm ölüm modellerinin (tanımlarının) “nekrotik ve apoptotik” bu iki ana yolağın bileşenleri içinde biçimlendiği belirtilmektedir (Galluzzi et al., 2018). Nitekim, apoptoz, nekroz ve otofaji bu üç ana yolakta görev olan genler ve hücre ölümünün subsellüler mekanizmaları bütünüyle birbirinden bağımsız değildir. Bu yolaklarda ortak çalışan genler mevcuttur ve yolaklar arasında karşılıklı etkileşimler “cross talk” söz konusudur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Üç ana ölüm yolağının subsellüler mekanizması (Ryu et al., 2016)

2.3.1. Apoptozis

Apoptoz, farklı sinyallerle başlatılabilen ancak hücrenin kendisi tarafından yürütülen, planlı, programlı ve kontrollü bir ölüm biçimidir, bu nedenle apoptoz “hücrenin intiharı” olarak bilinir. Apoptozis terimi ilk kez 1972’ de Kerr ve arkadaşları tarafından, nekrozdan farklı ve özel bir morfoloji gösteren hücre ölüm biçimi için kullanılmıştır (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972). Günümüzde de apoptoz kavramı hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlayan, programlı fizyolojik bir ölüm şeklini ifade etmektedir.

Matür bir organizmada apoptozun esas amacı hasar görmüş, enfekte olmuş ya da potansiyel neoplastik özellik taşıyan hücrelerin elimine edilerek doku homeostazının sürdürülmesini sağlamaktır. Bu durum fizyolojik yada patolojik pek çok ölüm sinyalini

entegre etmesi gereken canlılarda çok önemlidir. Çünkü yetersiz apoptozis kanser, otoimmün ve metabolik hastalıklara yol açarken, hızlandırılmış apoptozis akut ve dejeneratif pek çok hastalığa (AD, PD, kasüler atrofiler, organ yetmezlikleri vb) yol açabilir. İnsanlarda apoptozun izlendiği durumlar şu şekilde özetlenebilir;

- İntrauterin dönemde organogenez ve sinaptogenez
- Farklılaşmış dokularda maturasyon
- İmmün reaksiyonlarında defansif amaçlı
- Hücresel hasar durumlarında
- Hormon azalmasına bağlı involusyonlarda
- Tümör supresyonu
- Yaşlanma
- Normalde nekroza neden olan faktörler (ısı, radyasyon, antikanser ilaçlar, hipoksi vb.) düşük oranda da olsa hücreleri apoptoza yönlendirebilir

Hücreleri apoptoza yönelten sebepler fizyolojik yada patolojik kökenli olabilmektedir:

Fizyolojik nedenler:

- Embriyonik gelişim
- Doku modellenmesi
- İmmün hücre seleksiyonu

Patolojik nedenler:

- Kronik viral hastalıklar
- Nörodejeneratif hastalıklar
- Tip I diyabet
- Ateroskleroz
- Miyokard enfarktüsü
- Reperfüzyon hasarı
- AIDS
- Kanser

2.3.2. Apoptozis indüksiyonu ve fazları

Apoptozis süreci genel olarak 4 fazda (aşamada) gerçekleşir;

1. Apoptozun başlatılması (sinyal üretici yollar)
2. Hücre içi protezların (kaspazların) aktivasyonu
3. Morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler

4. Apoptotik cisimlerin fagositozu

Apoptozun başlatılması (sinyal üretici yollar)

Memeli hücrelerinde apoptozis birkaç yolla başlatılabilir. Apoptoz indükleyicileri; (i) büyüme faktörleri, (ii) onkojenler ve (iii) tümör supresör genler olarak üç ana başlık altında toplanabilir. Apoptozun indüklenmesini sağlayan başlıca uyaranlar şu şekilde sıralanabilir (Orrenius, Nicotera, & Zhivotovsky, 2011);

- Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi
- Sitokinler
- Oksidatif stres
- DNA hasarı sonucu p53 aktivasyonu
- Hücre içindeki kalsiyum miktarındaki artış
- TNF-alfa (tümör nekroz faktör-alfa)
- TGF-beta (transforming growth factor-beta)
- Fas/FasL sisteminin aktivasyonu
- Viral/ bakteriyel enfeksiyonlar
- Glukokortikoidler ve onkojenler (c-myc vb.)
- UV, radyasyon, hipertermi, sitotoksik antikanser ilaçlar, seramid tedavisi vb.

Hücrelerin ölüm sinyallerine verdiği yanıt, gelen uyarının türüne ve lokasyonuna göre değişebilir. Bu farklılıklara göre hücrede iki ana apoptotik yoldan birisi sürecin esas belirleyicisi olur; (i) intrinsik (iç/mitokondriyal) apoptotik yolak ya da (ii) ekstrinsik apoptotik yolak. Bu yollar hücre dışından ve/veya içinden kaynaklanan sinyaller ile başlatılabilir. Dış sinyaller plazma membran reseptörlerine bağlanan ölüm ligandlarına, iç sinyaller ise hücresel streslere bağlı olarak gelişir. Hücresel stres nedenleri arasında en önemlileri oksidatif stres, büyüme faktörlerinin azlığı, kimyasal/viral enfeksiyonlardır. İç ve dış ölüm sinyal kaynaklarını ayıracak olursak;

Hücre içi ölüm sinyallerinin kaynağı;

- DNA hasarları
- Hücre içi Ca^{++} artışı

- Hücre içi pH'da düşme
- Metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları
- Oksidatif stres

Hücre dışı ölüm sinyallerinin kaynağı;

- Çevresel yaşam sinyalleri ve büyüme faktörlerinin yetersizliği
- Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (TNF-R ailesinden TNF-R1 ve Fas en bilinenleridir)
- Hücrenin maruz kaldığı dış etkenler (hipoksi, hipertermi, UV, radyasyon, anti-kanser ilaçlar vb)

Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu

Kaspazlar büyük bir proteaz enzim ailesidir ve “hücrel giyotinler” olarak bilinirler. Aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedef proteinleri aspartik birimlerden kestikleri için bu ismi almışlardır (caspase: cysteine-containing aspartate specific proteases). Vertebralılarda apoptotik yollar kaspaz bağımlı (kaspaz yolu) ve kaspaz bağımsız (non-kaspaz yolu) yollar olarak; kaspaz bağımlı yollar ise intrinsik ve ekstrinsik yollar olarak ikiye ayrılabilir. İntrinsik yollar Bcl-2 ailesi tarafından, ekstrinsik yollar ise diğer hücrelerden kaynaklı sinyaller ile şekillenir (Ola, Nawaz, & Ahsan, 2011) (Şekil 2.9). Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla, iç sinyaller ise mitokondriden serbestleşen Sit-c, Smac ve Omi gibi apoptotik modülatörler aracılığıyla ve farklı zincirleme reaksiyonlar ile sitoplazmadaki efektör kaspazları aktive ederler ve sonuçta hücreyi apoptoza götürürler. Ayrıca mitokondriden serbestleşen endonükleaz G ve AIF (apoptosis inducing factor) gibi modülatörlerde non-kaspaz yoldan apoptozu sürdürebilir

Morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler

Apoptozisin erken evrelerinde salınmış olan kaspazlar hücrel pek çok substratın kesilmesini sağlarken ek olarak hücre içindeki diğer sindirim enzimlerini de harekete geçirir. Aktive olan ölüm yollarının son aşamada kromatin kondensasyonu ve DNA kırıklarının oluşumuna neden olması, hücreyi artık geri dönüşümsüz bir yola sokar. Bu süreçte membran, sitoplazma ve nükleus düzeyinde meydana gelen biyokimyasal ve

morfolojik değişimler izlenir. Hücre neredeyse total hacminin yarısı kadar küçülmeye ve kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir.

Plazma membranında Na^+ , K^+ , Cl^- taşıyıcı sistemlerin bozulması intrasellüler ve ekstrasellüler ortam arasındaki sıvı hareketinin durmasına ve dolayısıyla hücresel küçülmeye neden olur. Takip eden süreçte membranın şekli bozulur, membranda kabarcıklanmalar oluşur ve parçalara ayrılır. Sonuçta hücre “apoptotik cisimler” adı verilen parçalara ayrılmış olur

Apoptotik cisimlerin fagositozu

Apoptotik cisimlerin fagositoz yoluyla eliminasyonu hücre ölümünün son aşamasıdır. Apoptozisin indüklenmiş olması normalde ATP bağımlı translokaz enzimi ile aktif olarak korunan membran fosfolipit asimetrisini bozar. ATP-translokaz enzim aktivitesinin kaybı membranda intrasellüler yüzeye bakan fosfatidilserinin ekstrasellüler yüzeye doğru yer değiştirmesine ve apoptotik cisimlerin fagositik hücrelerce tanınır hale gelmesine neden olur. Sonuçta apoptotik cisimler sitokin salınımı, inflamasyon gelişimi vb durumlara yol açmadan doku makrofajları yada komşu hücrelerce fagosit ediliş ortamdan tümüyle elimine olurlar.

2.3.3. Apoptozda mitokondrinin rolü ve moleküler süreç

Apoptozisin intrinsik yolağı “mitokondriyal yolak” olarak bilinir, çünkü bu yolak mitokondri merkezli gelişir. Hücre dışından kaynaklı uyarılar ya da DNA hasarları ile sonuçlanan çok çeşitli stres koşullarına cevaben hücre tarafından en sık devreye sokulan ölüm yolağıdır. Mitokondri merkezli bu yolak daha sonraki bölümde tekrar değinilecek olan Bcl-2 ailesi tarafından biçimlenir (Şekil 2.9). Dış mitokondri membranında bulunan Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri (Bcl-2, Bcl-x1) hücreyi sağkalıma, pro-apoptotik üyeleri ise (Bax, Bad) hücreyi apoptoza yöneltir. Genelde hücre içi membranlara tutunarak yerleşke gösteren Bcl-2'nin aksine Bax, Bad, Bim, Bid gibi pro-apoptotik üyeler sitoplazma ve organeller arasında mekik dokur. Hücredeki proteolitik (ya da defosforilasyon) mekanizmalar ile pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri aktive olur ve normalde sitoplazmada inaktif formda bulunan pro-apoptotik proteinler apoptotik sinyallerin varlığında mitokondriye transloke olurlar. Pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 aile üyeleri arasında

karşılıklı etkileşim söz konusudur ve direkt ya da indirekt olarak birbirlerinin etkinliklerini düzenleyebilirler. Anti-apoptotik Bcl-2'nin baskılanması ile Bcl-2'nin inhibisyonundan kurtulan Bax ve Bak mitokondriyal dış membrana internalize olup membran permeabilitesini değiştiren geçiş porlarının oluşumuna aracılık eder. Bax ve Bak proteinleri, aktivatör proteinler olarak da bilinen pro-apoptotik Bim, Bid, Puma ve ayrıca p53 tarafından direkt olarak da aktiveleştirilebilir (Ola et al., 2011).

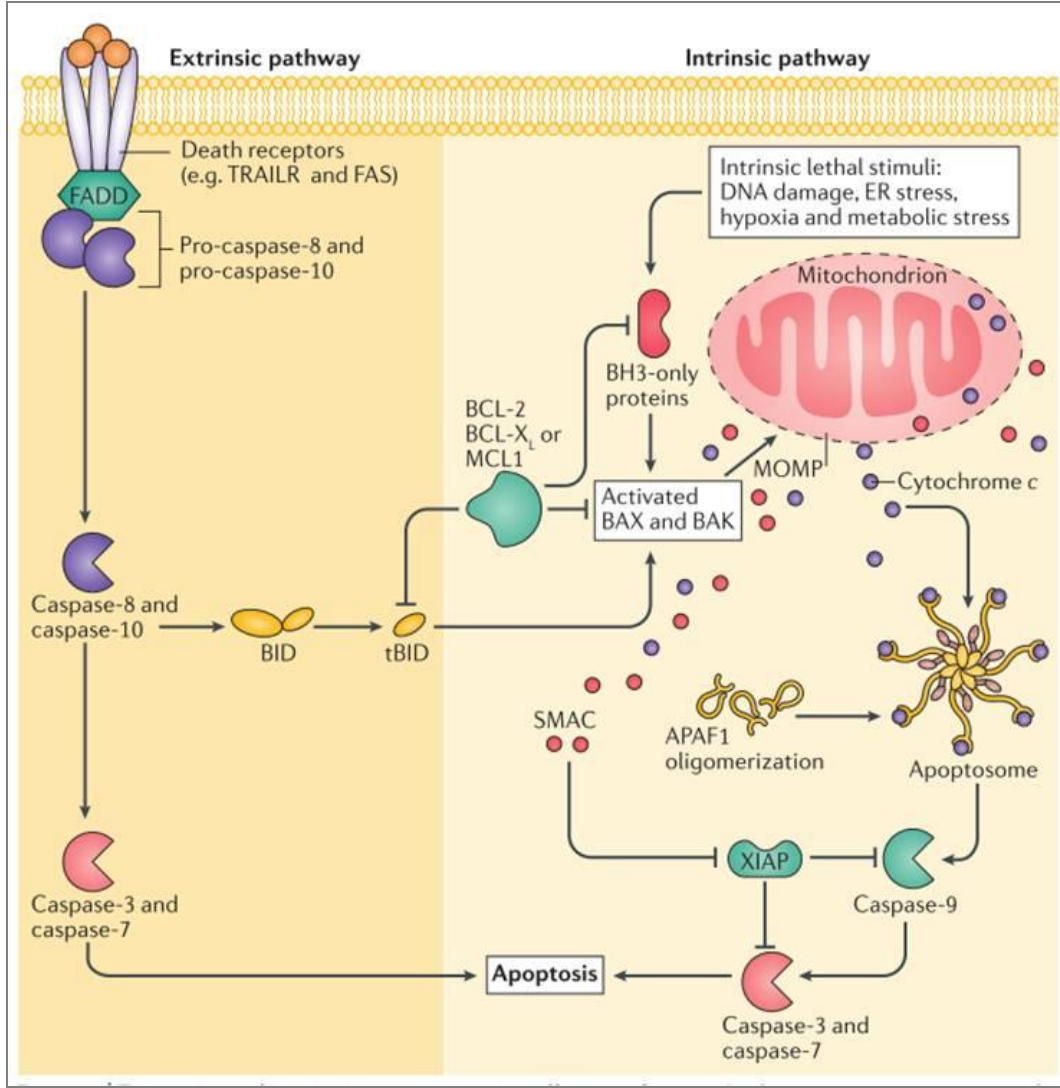
Aktif Bak ve Bax'ın mitokondriyal dış membrandaki hetero/homo oligomerizasyonu ile mitokondrial intermembrandan sitokrom-c (sit-c), AIF, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 ve endonükleaz G (endo G) gibi apoptotik proteinler sitoplazmaya salınır. Bu proteinler arasında önemlisi kabul edilen sit-c, sitoplazmada Apaf-1(Apoptosis protease-activating factor-1) ve dATP (deoksi ATP)'ye bağlanarak 'apoptozom' adı verilen aktif kompleksi oluşturur. Apoptozom öncelikle apoptoz başlatıcı kaspazları (kaspaz 9) ardından da efektör kaspazları (kaspaz 3,7) aktiveleştirir. Sonuçta proteolitik kaspaz aktivitesi DNAzı aktive ederek hücrenin ölümüne neden olur (Riedl & Salvesen, 2007)(Ola et al., 2011). Bu süreçte yine mitokondriyal intermembrandan salınan Smac (Second mitochondrial activator of caspase) ve Omi (Mammalian serine protease) ise apoptozom üzerinden apoptozu inhibe edebilen IAP (Inhibitor of apoptosis protein)' ın inhibisyonunu sağlayarak apoptozun devamlılığına katkıda bulunur (Orrenius et al., 2011).

Kaspaz bağımlı intrinsik apoptotik yolağın başlatılmasında endoplazmik retikulum (ER) da rol oynayabilir. Proteinlerin katlanma problemiyle ortaya çıkabilen ER stresi, hücre içi Ca^{2+} artışı ile beraber proteaz ve kinazların aktivasyonuna neden olup mitokondriyal apoptotik yolağı aktive edebilmektedir (Malhotra & Kaufman, 2011).

Merkezi mitokondri olmayan ekstrinsik apoptotik yolak "ölüm reseptör yolu" olarak bilinir. Bu yolda rol oynayan transmembran ölüm reseptörleri içinde en önemli grup TNFR ailesidir ve bu reseptörlerin etkileri sadece apoptozla sınırlı değildir. Bu aile içinde apoptozla ilişkili en iyi tanımlanmış reseptörler Fas (CD95, APO-1) ve TNFR1' dir. Fas ligandın (FasL), Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası Fas adaptör proteinle (FADD: Fas-associated death domain protein) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini oluşturur (DISC: Death-inducing signaling complex). Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları başlatıcı kaspazları (kaspaz 8,10), başlatıcı kaspazlar da efektör kaspazları (kaspaz 3, 7) aktiveleştirerek apoptoza neden olur. TNFR1

reseptörü içinse DISC kompleksi TNF + TNFR1 + TRADD şeklinde oluşur. Ancak Fas reseptörünün aksine, TNFR1'in TRADD'la etkileşimi her zaman apoptozla sonuçlanmaz. TRADD sonrasında FADD ile birleşirse başlatıcı kaspazları aktive ederek hücreyi apoptoza götürür; ancak FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanırsa NFkB transkripsiyon faktörü etkinliği ile hücre canlılığını devam ettirebilir (Wilson, Dixit, & Ashkenazi, 2009).

Ekstrinsik yolda DISC kompleksi aracılığıyla aktifleşen başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8,10) efektör kaspazların yanı sıra Bcl-2 ailesinden Bid'i aktif forma (tBid) dönüştürerek mitokondriyal membranda Bax/bak oligomerizasyonunu sağlar. Bu sayede ekstrinsik kaspaz yolu Bid aracılığıyla intrinsik kaspaz yolunu da aktive edebilir (Ola et al., 2011) (Wilson et al., 2009). CTL (Sitotoksik T lenfositler) ve NK (natural killer) hücreleri aracılığıyla gerçekleşen perforin/granzim sistemi de ekstrinsik yolda yer alır. Bu sitotoksik hücreler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, stoplazmalarına Granzim B salgırlar. Granzim B hedef hücrede kaspaz aktivasyonu (kaspaz 3,7) yaparak hücrenin apoptozuna neden olur. Ayrıca Granzim B'nin de Bid'i aktif tBid formuna dönüştürerek yine mitokondriyal yoldan hücre ölümüne yol açabildiği gösterilmiştir (Waterhouse et al., 2005).



Şekil 2.9. Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik sinyal yolları (Ichim & Tait, 2016)

2.3.4. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan genler ve Bcl-2 ailesi

Apoptoz ilk kez *C.elegans* nematodunda çalışılmıştır ve *C.elegans*' ta tanımlanmış ilgili genler Ced-3 ve Ced-4'tür. Ced-3 bir sistein proteazı şifreler ve memelilerdeki sistein proteazlardan ICE (interleukin 1b converting enzyme)' ye benzer. Ced-4 ise Ca^{2+} ' ya bağlı bir proteini şifreler ve memelilerdeki Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1) ile homoloji gösterir. Diğer bir gen Ced-9 ise apoptozu durdurmaktadır ve insandaki homoloğu Bcl-2' dir. Apoptozda rol oynayan çok sayıda gen tanımlanmıştır ve bunların bir kısmı hücre yüzeyinde, bir kısmı hücre içi sinyal iletim yollarında görev alır. Apoptoziste görev alan en önemli gen grubu Bcl-2 ailesi olup apoptoz ilişkili genler şu şekilde sıralanabilir;

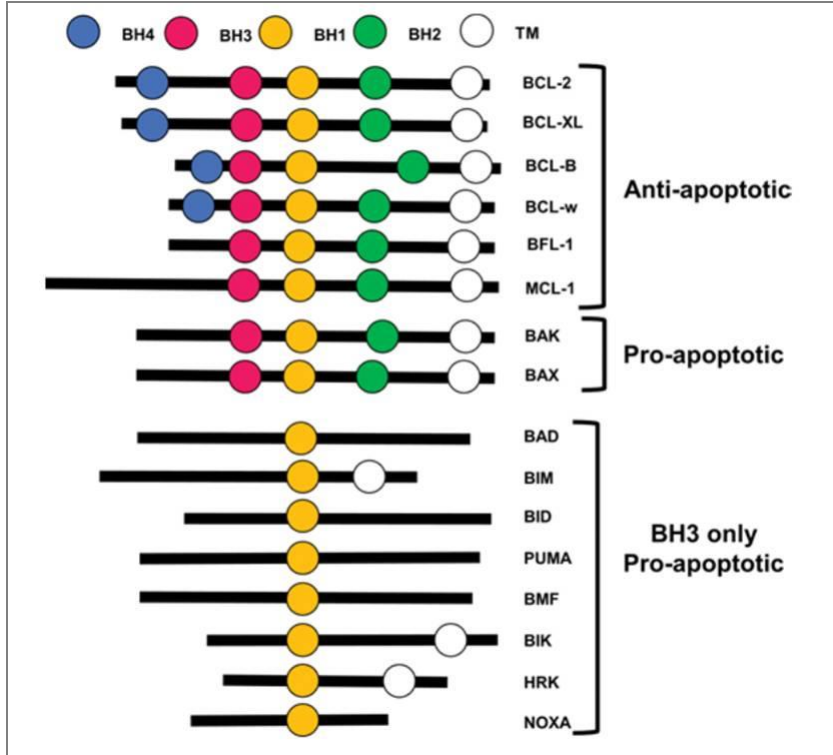
- Bcl-2 ailesi proteinleri
- Transkripsiyon Faktörleri (p53, myc, Nur77)
- Proteazlar, Kaspazlar, Granzim, Kalpain
- Fas, trail, TNF (reseptör ve ligandlar)
- Kinaz grubu (RIP3, CAP, AKT, PKA, MAPK)
- Mitokondriyal proteinler (sit c, AIF, SMAC, VDAC, ANT)
- Kaspaz düzenleyicileri (IAP/Survivin, Apaf-1)
- Diğerleri (FADD, TRADD, DAD1)

Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi proteinleri apoptozun kritik kontrol noktalarında görev alır. Ailenin kurucu üyesi Bcl-2' dir ve B-hücre lenfomasında tanımlandığından bu adı almıştır (B cell lymphoma/leukemia-2). Bu aile üyelerinden bazıları apoptozisi hızlandırırken “pro-apoptotikler”, bazıları inhibe eder “anti-apoptotikler”. Bcl-2 proteinleri genelde pro-apoptotik ve anti-apoptotik özelliklerine göre ya da Bcl-2 homoloji (BH) domainlerine göre (BH1-BH4) iki farklı şekilde sınıflandırılmaktadır (Ola et al., 2011). Bcl-2 ailesi için örnek bir sınıflama ve şematik gösterim Çizelge 2.4' te ve Şekil 2.10'da sunulmuştur.

Çizelge 2.4. Bcl-2 aile üyeleri

Bcl-2 AİLESİ	BH bölgeleri	Aile üyeleri
Anti-apoptotik	BH1-4	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, Boo...
	BH1-3	Mcl-1 (myleoid cell leukemia factor 1)
Pro-apoptotik	BH1-3	Bax, Bak, Box....
	BH3-only	Hrk, Bid, Bim, Bmf, Puma, Noxa, Bad, Bik...
	BH3 ve BH4	Bcl-xs

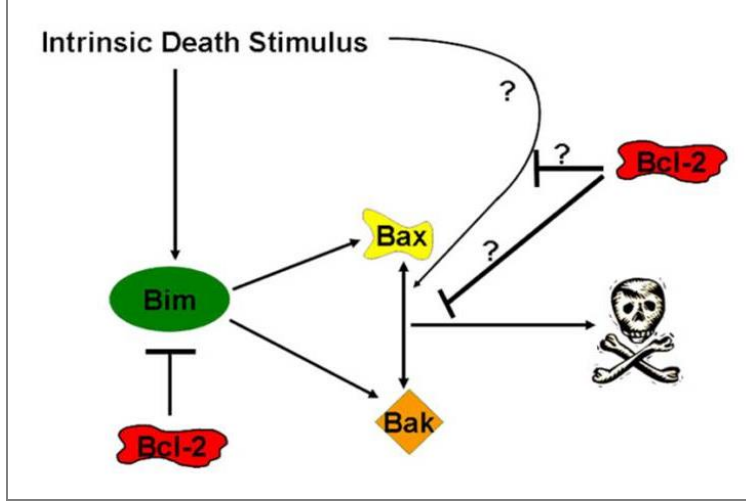


Şekil 2.10. Bcl-2 aile üyelerinin şematik listesi (Pohl, Agostino, Dharmarajan, & Pervaiz, 2018)

Bu proteinler hidrofobik C-terminal kuyrukları ile mitokondri dış membranına yerleşirler (nadiren endoplazmik retikulum hatta nukleus membranı) ve proteinin büyük kısmı ise sitoplazmaya bakar. Bcl-2 aile üyeleri genelde BH3 bölgelerinden birbirine bağlanır ve ölüm sinyallerine cevaben mitokondriyal dış membranda homo- yada heterodimer yapılar oluşturarak membran geçirgenliğini artırırlar. Multi-domaine sahip Bax ve Bak canlı hücrede monomer olarak bulunur ve inaktif formdaki Bax ya sitoplazmada yerleşik ya da mitokondri membranına zayıf olarak bağlanmış durumdadır. Ölüm sinyalinin varlığı ile Bax homodimerize olarak mitokondriyal dış membrana internalize olur. Mitokondride yerleşik olan inaktif Bak da ölüm sinyaline cevaben dimerize olur. Hatta Bax ve Bak heterodimer organizasyon da gösterebilir. Sonuçta Bax ve Bak' ın hetero- yada homodimerizasyonu ile mitokondriyal dış membranda permeabilite artışı olur ve bu durum intermembranöz boşluktaki sit-c gibi apoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınmasıyla sonuçlanır (Youle & Strasser, 2008) (Shamas-Din, Brahmbhatt, Leber, & Andrews, 2011).

Apoptozun indüklenmesi ya da baskılanma sürecinde Bcl-2 aile üyeleri arasında karşılıklı etkileşim söz konusudur. Örneğin Bax ve Bak oligomerizasyonu, Bim, Bid, Puma vb BH3-only proteinler başta olmak üzere pro-apoptotik üyelerce direkt olarak aktive edilebilirken,

BH3-only proteinler Bcl-2 inhibisyonu ile indirekt yoldan da apoptoz aktivasyonu sağlayabilir. Diğer taraftan apoptozun durudurulması ise Bax ve Bak oligomerizasyonunun anti-apoptotik üyelerce direkt/indirekt yollardan inhibe edilmesi ile sağlanabilir (Hutcheson et al., 2005)(Rautureau, Day, & Hinds, 2010)(Ola et al., 2011) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Bcl-2 aile üyeleri arasındaki etkileşimler (Hutcheson et al., 2005)

Anti-apoptotik Bcl-2

Bcl-2, başta mitokondri olmak üzere ER ve nukleus membranı da dahil olmak üzere hücre içinde mebranöz yerleşke gösterir. Nükleer yerleşkesi ile p53, NFκβ, AP1, CRE, NFAT vb transkripsiyon faktörlerinin etkinliklerini düzenler, ER yerleşkesi ile intrasellüler Ca²⁺ regülasyonunda rol oynar (Hetz & Glimcher, 2007). Hücrel ROS üretiminin esas kaynağı olan mitokondri, Bcl-2' nin ana yerleşkesidir ve Bcl-2 burada hem redoks düzenleyicisi gibi çalışır hem de gerektiğinde apoptozu durdurabilir (Steinman, 1995) (Jang & Surh, 2003).

Bcl-2' nin hematopoetik, lenfoid ve fibroblastik hücrelerde büyüme kayıplarında, nörotrofik faktörlerin yetersizliğinde, UV, γ-radyasyon, ısı şoku, ROS artışı vb stres koşulları altında hem anti-oksidan hem de anti-apoptotik özelliği ile hücrede koruyucu etkinliği gösterilmiştir. (Jang & Surh, 2003)(Pohl et al., 2018). Bcl-2, antioksidan özelliği ile lipid peroksidasyonu azaltabilir, glutatyon tükenmesi ve H₂O₂ indüklü apoptotik ölümüne karşı direnç sağlar (Steinman, 1995). Bcl-2, sadece apoptozda değil, otofajinin regülasyonunda da kritik öneme sahiptir (Levine, Sinha, & Kroemer, 2008). Bcl-2, Beclin 1 üzerindeki inhibitör etkisinden ötürü anti-otofajik protein olarak da kabul edilmektedir

(Patingre et al., 2005). Bcl-2 ekspresyonunu arttırmaya yönelik uygulamalar beyinde nöroprotektif etkili bulunurken (Martinou et al., 1994)(Kinarivala, Patel, Boustany, Al-Ahmad, & Trippier, 2017)(Keskin-Aktan et al., 2018); lösemi, lenfoma, kolon, nöroblastoma ve melanoma gibi pek çok kanser çeşidinde Bcl-2' nin aşırı eksprese edildiği görülür (Pohl et al., 2018).

Pro-apoptotik Bax

Bax (Bcl-2 associated X protein), normalde büyük oranda sitoplazmik yerleşke gösterir çünkü Bcl-2/Bcl-xl tarafından devamlı olarak mitokondriden sitoplazmaya yönlendirilmeye çalışılır. Bu sayede mitokondriyal dış membranda Bax akümüasyonu ve oligomerizasyonu ayrıca membranın da permeabilizasyonu engellenmiş olur. (Edlich et al., 2011). Daha önce bahsedildiği gibi DNA hasarı, ROS vb çeşitli stres koşulları altındaki hücrede Bax'ın direkt/indirekt yollardan aktivasyonu mitokondriyal dış membran permeabilitesinde artışla beraber sitokrom c salımı ve kaspaz kaskadının başlatılmasına neden olacaktır. En önemli tümör baskılayıcı genlerden p53, Bax'ın direkt transkripsiyonel aktivatörü gibi çalışmaktadır (Toshiyuki & Reed, 1995), hücrelerin sağkalımına aracılık eden NF-kB transkripsiyon faktörünün inhibe edilmesi de kanser hücre hattında Bax ekspresyonunu arttırmaktadır (Bentires-Alj et al., 2001).

Apoptotik sinyallerin varlığında Bax ve Bak mitokondriyal dış membranda hetero- ve/veya homodimerizasyonu membran geçirgenliğini artırır bu durum sit-c' nin sitoplazmaya serbestleşmesi apoptotik kaskadın baslatılmasına neden olur. Bax ve Bak aktivasyonu bahsi geçen etkinliklerinden ötürü çok sıkı kontrol edilir. 14-3-3 protein izoformları, humanin, Ku70, ARC, HSPs (heat shock proteins) Bax'ı sitoplazmada inaktif tutarken; VDAC ve HSP60 Bak'ı inaktif formda tutar. Akt sinyal yolağı Bax fosforilasyonu ile Bax'ın mitokondriyal internalizasyonunu engeller. Buna karşılık endofilin B1, p53 ve ASC (apoptosis-associated speck-like protein) proteinleri Bax ve Bak aktivasyonunu sağlayarak hücre ölümünü uyarırlar (Ohtsuka et al., 2004)(Ichim & Tait, 2016).

Pro-apoptotik Bim

Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death), BH3-only proteinler arasında yer alır ve 3 izoformu vardır; BimEL, BimL ve BimS. BH3-only proteinler Bcl-2 aile üyeleri arasındaki

etkileşimde anahtar rol üstlenirler. Bax ve Bak'ı direkt aktive edebilirler, antiapoptotik Bcl-2 ile karşılıklı etkileşimleri de hücrenin apoptoza yönelip yönelmeyeceğinde belirleyici olabilirler ayrıca apoptozun yanı sıra otofajinin de başlatılmasında yer alırlar.

Bim, sağlıklı hücrelerde mikrotübüllerle ilişkidir, esas olarak mitokondride yerleşiktir ve aşırı ekprese edildiği apoptotik hücrelerde diğer intrasellüler membranlarda da yerleşke göstermektedir. (Shamas-Din et al., 2011). Bim ekspresyonu esas olarak “forkhead” transkripsiyon faktörleri ailesinden FOXO3a tarafından kontrol edilir. FOXO dışında STAT1, c-JUN, Smad3, E2F1 ile Bim transkripsiyonu aktive edilebilir. Bim ekspresyonunu baskılayan transkripsiyon faktörleri arasında YY-1 (Yin Yang 1), Spi-1/PU.1, Trim33 (Tripartite motif containing 33), Pokemon, HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1- alpha) sayılabilir ve Bim ekspresyonunun baskılanması tümör gelişimi ve otoimmünite ile ilişkilendirilmiştir (Shukla, Saxena, Singh, & Kakkar, 2017). FOXO3a aracılı Bim ekspresyonundaki artış hücreyi apoptoza yöneltmektedir (F. Wang, Nguyen, Qin, & Tong, 2007)(Carbajo-Pescador et al., 2013).

p53

En önemli tümör baskılayıcı genlerden biri olan p53 geni hücrel streste apoptozisi tetikler. Dolayısıyla başta Bcl-2 ailesi olmak üzere apoptoz sürecinde rol oynayan pek çok gen p53 hedef genleri arasında yer alır. p53 hedef genleri;

- Bcl-2 proteinleri (Bax, Puma, Noxa, Bim, Bid vb)
- Ölüm reseptörleri (DR5, CD95, Fas vb.)
- Adaptör proteinler (Apaf-1)
- Diğerleri (p53AIP1, p53DINP1, Peg3, PERP, PIG1 vb)

DNA vb hasar durumları olmayan, stres altında olmayan hücrelerde sitoplazmik p53'ün transkripsiyon amaçlı nukleusa translokasyonu engellenir ve hücredeki konsantrasyon düzeyi de oldukça düşüktür. p53'ün apoptoziste transkripsiyon bağımlı ve transkripsiyon bağımsız rolleri vardır. DNA hasarı varlığında mdm2 inhibisyonundan kurtulan p53 hasar tamiri için hücre siklusunu durdurur; ancak tamir mümkün olmaz ise Bcl-2 ailesinden pro-apoptotik proteinlerden Bax/bak' ın direkt aktivasyonunu sağlayarak mitokondri aracılığıyla hücrenin apoptozunu başlatır (Li et al., 2012). Ya da dolaylı olarak

mitokondride Bcl-2/Bcl-XL proteinlerine bağılı BH-3-only proteinleri serbestleşmesini sağlayarak Bax oligomerizasyonunu sağlar ve yine apoptozu indüklemiş olur. p53 geni hücrenin apoptozunda major rol oynayan genlerden birisidir ancak Bax/bak aktivasyonu ile hücrenin ölümü p53 ve diğeri pro-apoptotik proteinlerin (Bid, Bim, puma vb) yokluğunda da gerçekleşebilir (Zhang, Huang, O'Neill, Pang, & Luo, 2016).

Hücre ölümünün aksine, hücrede canlılığının sürdürülebilmesini sağlayan iki ana yolak tanımlanmıştır; (1) PI3-Kinaz/Akt yolağı ve (2) NF-kB yolağı. Bunların dışında Ras/Raf/MAP kinaz yolağı da hücrenin hayatta kalımını teşvik eder. Görüldüğü üzere hücrenin canlılığını devam ettirmesi ya da apoptozu yönelmesi pek çok yolak ve genin kontrolü altında gerçekleşen kompleks bir süreçtir.

2.4. Sirtuinler

Günümüzde uzun yaşam proteinleri olarak bilinen sirtuinler ilk olarak mayalarda “sessiz bilgi düzenleyici 2” (the silent information regulator 2 proteins, sir2) ya da “genetik susturucu faktörler” adıyla tanımlanmıştır. Memelilerde ise sirtuinlerin yedi alt tipi gösterilmiştir; SIRT1-SIRT7. Sirtuinler nikotinamid adenin difosfat (NAD⁺) varlığında histonlar ve diğeri substratlar üzerine etki ederler. NAD⁺ bağımlı çalışan histon/protein deasetilaz III (HDAC III) ailesinde yer alırlar. Lysine rezidülerinde gerçekleştirdikleri deasetilasyon aktiviteleri genelde transkripsiyonel baskılama/susturma şeklindedir. Farklı olarak bazı sirtuinlerin substratları non-histon proteinlerdir ve bazı sirtuinler de deasetilaz aktivitesine sahip değildir (Herskovits & Guarente, 2014)(Neo & Tang, 2017).

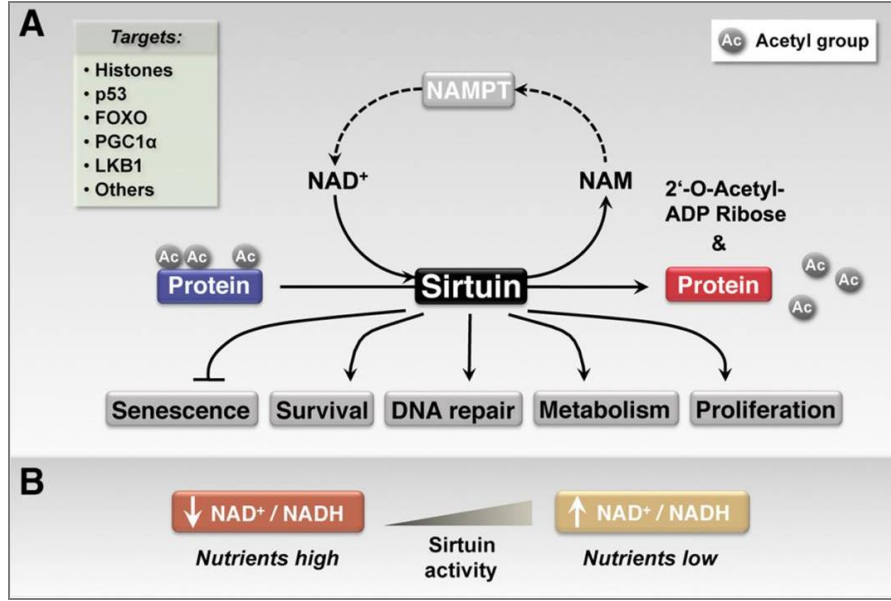
Subsellüler lokalizasyonları ve enzimatik aktivitelerine göre memeli sirtuinleri (SIRT1-7) farklılaşmaktadır; SIRT1 ve 6 nukleusta, SIRT7 nukleolusta, SIRT3, 4, 5 mitokondride, SIRT2 ise sitoplazmaya yerleşiktir. SIRT1' in sitoplazmaya, SIRT2' nin de nukleusa translokasyonu mümkündür. Enzimatik aktiviteleri açısından SIRT1, 2 ve 3, histon/non-histon proteinlerin lysine rezidülerinde, NAD⁺-bağımlı kuvvetli deasetilaz aktiviteye sahiptir (Herskovits & Guarente, 2014). Sirtuinler, çeşitli substratlar üzerinden lipid homeostazisi, metabolizma, oksidatif strese direnç, hücre döngüsü, apoptoz, yaşlanma ve kanser gibi pek çok önemli süreçte rol oynamaktadırlar (Herskovits & Guarente, 2014)(Sidorova-Darmos et al., 2014). Memeli sirtuinlerinin genel özellikleri, ilişkide oldukları gen/proteinler ile biyolojik etkileri Çizelge 2.5' de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Memeli sirtuinlerinin genel özellikleri (Haigis & Sinclair, 2010) (Herskovits & Guarente, 2014)

Sirtuinler	Lokasyon	Enzimatik Aktivite	Etkileşim	Genel biyolojik etki
SIRT1	Nukleus	NAD-bağımlı deasetilaz	FOXO, PGC-1 α , NF- κ B, Ku70 vb.	Metabolizma, stres
SIRT2	Sitoplazma	NAD-bağımlı deasetilaz	Tubulin, H4, FOXO	Hücre döngüsü
SIRT3	Mitokondri	NAD-bağımlı deasetilaz	AceCS2, GDH complex I	Termogenez, ATP üretimi
SIRT4	Mitokondri	ADP-riboziltransferaz	GDH, IDE, ANT	İnsülin sekresyonu
SIRT5	Mitokondri	NAD-bağımlı demalonilaz, deasetilaz, desuccinylase	CPS1	Üre döngüsü
SIRT6	Nukleus	Deasetilaz ve ADP-ribosyltransferaz	Histone H3, NF- κ B	DNA tamiri, metabolizma
SIRT7	Nukleolus	NAD-bağımlı deasetilaz	Pol 1	rRNA transkripsiyonu

2.4.1. Sirtuinlerin beyindeki rolü

Sirtuinlerin yaşlanma ve yaşam süresinin belirlenmesindeki rolü mayalardan memelilere kadar çok çeşitli canlı türlerinde gösterilmiştir. Sirtuinler insülin-FOXO ve mTOR (mammalian (ya da mechanistic) target of rapamycin) yolları başta olmak üzere pek çok sinyal yolağı ile etkileşimdedir ve bu sayede yaşam süresinin manipülasyonuna aracılık ederler (Satoh et al., 2017). Sirtuinler FOXOs, p53, NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleri ve DNA tamir sistemlerinde görev alan çeşitli proteinlerle (DNA-PK; DNA-dependent protein kinase) etkileşim halindedir (Jeřsko, Wencel, Strosznajder, & Strosznajder, 2016) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Sirtuinlerin hedef genleri ve hücresel etkileri

Sirtuinlerin nöron-spesifik yada beyin-spesifik genetik manipülasyonu sadece nöronal aktiviteyi değil periferel dokuların fonksiyonlarını da modüle eder. Örneğin hipotalamik SIRT1, kahverengi yağ dokusu, insülin duyarlılığı, sistemik glukoz ve lipid metabolizması gibi periferel organların metabolik işlevlerinde rol oynar (Michan & Sinclair, 2007)(Satoh et al., 2017). Sirtuinlerin beyindeki genel fonksiyonları Çizelge 2.6' de özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. Farklı beyin fonksiyonlarında sirtuinlerin rolü (Satoh et al., 2017)

Hücrel ya da davranışsal parametre	Sirtuin	Etki/rol	Hedef
Erişkin nörojeniz	SIRT1	NSC' lerin farklılaşması, kendini yenilemesi ve oligodendrositlere farklılaşmaya yol açan hücre akıbetinin belirlenmesi	HES1, PAX2 and NOTCH Unknown
	SIRT2	Oligodendrositlere farklılaşmaya yol açan hücre akıbetinin belirlenmesi	?
		Hipokampal nörojeniz	?
Sinaptik plastisite	SIRT1	Sinaptik formasyon ve plastisitede artış	miR-134
Kognisyon	SIRT1	Hipokampus bağımlı bellek	CREB, BDNF
Anksiyete	SIRT1	Anksiyete	MAO-A
		MDD	MAO-A
	SIRT2	Depresyon benzeri davranışlar	?
	SIRT6	Anksiyete benzeri davranışlar	GR
Sirkadiyen Ritimler	SIRT1	SCN' de sirkadiyen kontrol	BMAL1
Uyku-uyanıklık paterni	SIRT1	Non-REM delta gücünde artış	NKX2.1–OX2R
		Uyanıklık süresini belirler	?
	SIRT3	Mecburi/zoraki uyanıklığa karşı adaptif yanıtlar	FOXO3a and PGC1 α
Yaşa bağlı işitme kaybı	SIRT3	Kohlear dejenerasyonun azaltılması	Mitochondrial NADPH-dependent IDH2
		Kohlear tüy hücrelerinin gentamisin ototoksitesine karşı korunması	?
	SIRT1	Kohlear tüy hücrelerinin yaşa bağlı işitme kaybına karşı korunması	p53 and FOXO3
Mikroglial aktivasyon	SIRT1	MMP9, iNOS ve IL-1 üretimi	miR204
		IL-1 üretimi	IL1- β
	SIRT2	LPS indüklü mikroglial aktivasyon	NF-kB
Nöroprotektif etkiler		Alzheimer hastalığı	Tau
		Parkinson hastalığı	LC3- α -synuclein
	SIRT1	Huntington hastalığı	TORC1, CREB, FOXO3a
		Amyotrofik lateral skleroz	FOXO3a, p53
	SIRT2	Parkinson hastalığı	?
		Huntington hastalığı	SREBP2
	SIRT3	Eksitotoksik hasara karşı koruma	?
		Amyotrofik lateral skleroz	?
		Kahverengi yağ dokusunun yeniden şekillenmesi	?
Periferik dokulardaki metabolik olaylar	SIRT1	İnsülin duyarlılığında artış	?
		Sistemik glukoz ve lipid	?
		metabolizmasının regülasyonu	

2.5. FOXO (ForkHead/Winged Helix Box Class O) Transkripsiyon Faktörleri

FOXO transkripsiyon faktörleri “Fork-head” protein ailesinde yer alır. Forkhead transkripsiyon faktörleri (FOX), “forkhead/winged helix box” olarak bilinen, yüksek oranda korunmuş 110 aminoasitlik DNA-bağlanma bölgelerine sahiptir. Bu sayede mayalardan insanlara kadar pek çok canlı türünde proliferasyon, farklılaşma, metabolizma,

yaşlanma, apoptoz ve kanser gibi süreçlerde etkili olan genlerin ekspresyonunu kontrol eder. Dolayısıyla canlılar için hayati öneme sahiptirler (Obsil & Obsilova, 2011).

İnsanlarda A' dan S' ye 19 alt gruba ayrılan ve 39 farklı üyeden oluşan FOX(A-S) ailesi oldukça geniştir (Greer & Brunet, 2005). FOX alt gruplarının fonksiyonları organogenezden (FOXC) lisan gelişimine (FOXP) kadar çok çeşitlilik göstermektedir (Lehmann, Sowden, Carlsson, Jordan, & Bhattacharya, 2003).

Caenorhabditis elegans' ta DAF-16, forkhead- tipi transkripsiyon faktörüdür. DAF-16 insülin/IGF sinyal yolağında yer alır ve *Caenorhabditis elegans*' ların yaşam süresinin regülasyonunda belirleyicidir. DAF-16' nın insadaki homologları FOXO alt grubunda yer alan FKHR, FKHL1 ve AFX'tir. Bu FOXO üyeleri de DAF-16 gibi Ser/Thr kinazlar ve Akt/protein kinazlar B (PKB) için fosforilasyon alanlarına sahiptirler (Furuyama, Nakazawa, Nakano, & Mori, 2000). FOXO alt grubu esasen 4 üyeye sahiptir; FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXO6. FOXO ailesi ilk olarak insanlarda tanımlanmıştır çünkü bu ailenin 3 üyesi (FOXO1/FKHR, FOXO3/FKHL1 ve FOXO4/AFX) insan tümörlerinde kromozomal translokasyonda yer almaktadır (Galili et al., 1993)(Parry, Wei, & Evans, 1994)(Anderson, Viars, Czekay, Cavenee, & Arden, 1998). FOXO' larla ilgili gelen bu ilk bulgular FOXO' ların tümör gelişiminde önemli rol oynadığını düşündürmüştür.

Memelilerde düzeyleri değişmekle beraber FOXO1, FOXO3, ve FOXO4' ün mRNA ekspresyonları tüm dokularda izlenmektedir (Anderson et al., 1998)(Furuyama et al., 2000). FOXO1 yağ dokuda, FOXO3 beyinde, FOXO4 kalpte daha çok olmak üzere dokuların FOXO mRNA ekspresyon düzeyleri farklılaşmaktadır (Greer & Brunet, 2005). FOXO6 mRNA ekspresyonunun gelişmekte olan beyinde daha yüksek bulunması, FOXO6' nın da sinir sisteminin gelişiminde önemli rol oynadığını göstermektedir (Jacobs et al., 2003). FOXO' ların aktivasyonu genel olarak büyüme faktörlerindeki yetersizlik ile azalmış IGF-1 aktivitesi veya azalmış PI3K/AKT/mTOR yolak aktivitesini gerektirmektedir.

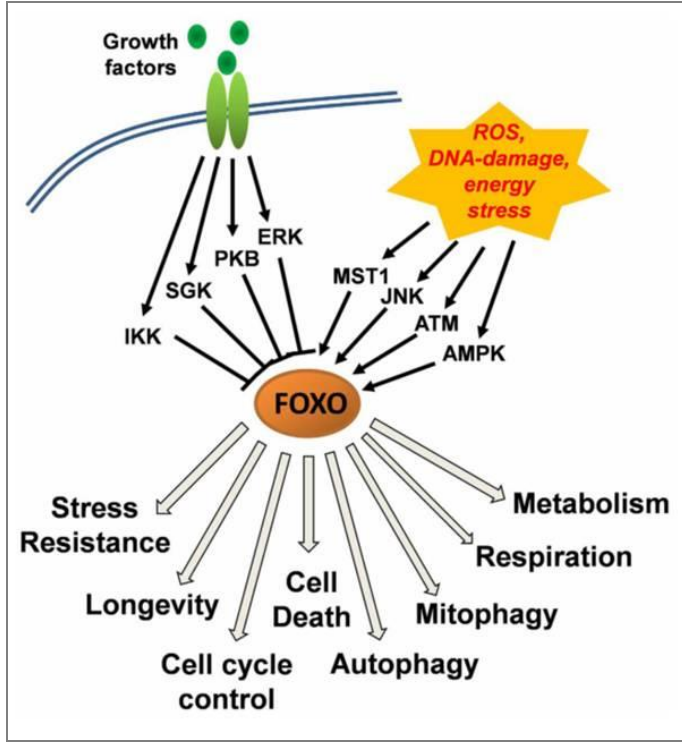
Çizelge 2.7. Memelilerde FOXO ailesi üyeleri (Greer & Brunet, 2005) (Hagenbuchner & Ausserlechner, 2013)

Gen adı	Alternatif adlandırma	Farelerdeki adlandırma	Ekspresyonu olan organlar	Knockout fenotip
FOXO1a	FKHR	fkhr1, Foxo1a	Hemen her yerde mevcut (en yüksek; kalp, dalak, adipoz, böbrek beyin)	E10.5 letalite anjiyogenez kusurları
FOXO1b	FKHR pseudogene 1 (FKHRP1)			
FOXO3a	FKHRL1, AF6q21, FOXO2	fkhr2, Foxo3a	Hemen her yerde mevcut (en yüksek; beyin, kalp, dalak, akciğer, böbrek, adipoz, overler)	Dişilerde kısırlık, anemi, glukoz-alım kusurları, yardımcı T hücrelerinin aşırı proliferasyonu, artmış nötrofil apoptozu
FOXO3b	FKHRL1 pseudogene 1 (FKHRL1P1)			
FOXO4	AFX, AFX1, MLLT7	afx, Afxh, Foxo4, Mllt7	Hemen her yerde mevcut (en yüksek; kalp, beyin, dalak, akciğer)	Daha ılımlı düzeyde değişiklikler
FOXO5	zFKHR			
FOXO6	FOXO6	Foxo6	Beyin, timus, böbrek	Daha ılımlı düzeyde değişiklikler

2.5.1. FOXO' ların regülasyonu ve biyolojik süreçlerdeki rolü

FOXO' lar insülin ya da büyüme faktörlerinin varlığında aktive olan PI3K (phosphoinositide 3 kinase)-AKT yolağında protein kinaz AKT' nin direkt hedef substratlarındandır ve FOXO' ların aktivitesi esas olarak bu yolak üzerinden kontrol edilir (Cantley, 2002) İnsülin ya da büyüme faktörlerinin tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile aktive olan PI3K-AKT yolağı oldukça komplekstir ve bu yolda pek çok genin kontrolü yapılır (Cheng, Tseng, & White, 2010).

ROS, DNA hasarı ya da enerji stresi gibi çeşitli stres koşulları altında aktive olan MST1, JNK, ATM, AMPK vb yollar FOXO' ların aktivasyonunu sağlayarak; stres yanıtların düzenlenmesi, uzun yaşam, hücre döngüsünün kontrolü, apoptoz, otofaji, mitofaji, solunum ve metabolizma gibi vital fonksiyonları sürdürürler (Hagenbuchner & Ausserlechner, 2013) (Şekil. 2.13). Bu vital fonksiyonların açığa çıkarılmasında FOXO' ların hedef genleri oldukça çeşitlilik göstermektedir ve ilgili genler ile fonksiyonları Çizelge 2.8' de listelenmiştir.



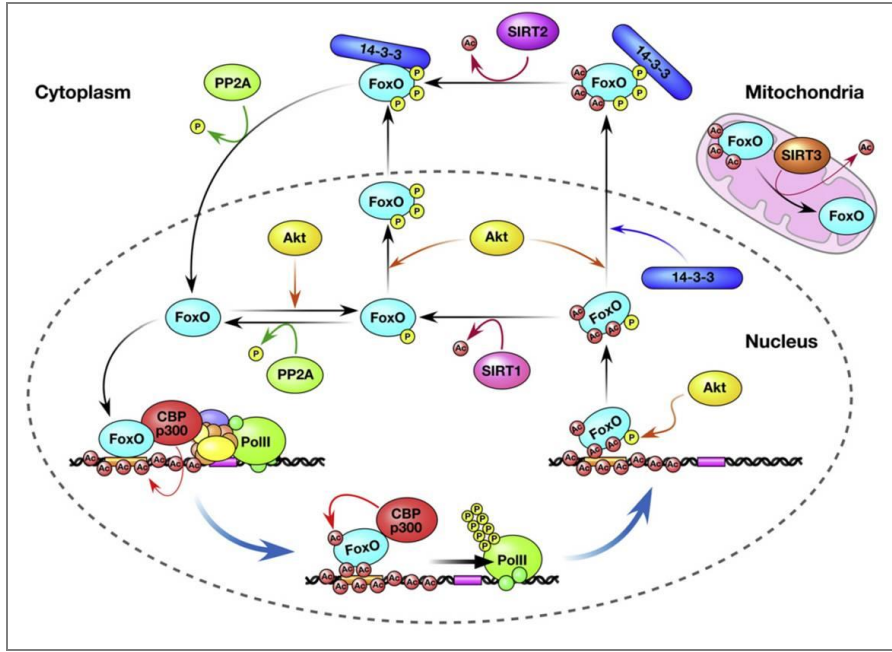
Şekil 2.13. Büyüme faktörleri ve stres indüklü kinaz kaskadlarında FOXO' ların kontrolü (Hagenbuchner & Ausserlechner, 2013)

Çizelge 2.8. FOXO hedef gen fonksiyonları (Greer & Brunet, 2005)

Fonksiyon	Genler
Hücre ölümü	BIM-1, bNIP3, Bcl-6, FasL, Trail
Atrofi	atrogin-1
Metabolizma	G6Paz, PEPCK
G1 fazında hücre döngüsünün durdurulması	p21CIP1, p27KIP1, p130
G2 fazında hücre döngüsünün durdurulması	GADD45, Cyclin G2
DNA tamiri	GADD45, DDB1
Detoksifikasyon	MnSOD, katalaz, PA26
Farklılaşma	p21CIP1, BTG1

FOXO transkripsiyon faktörleri IGF-1' in yanı sıra besinler, sitokinler ve oksidatif stres düzeyi gibi çeşitli eksternal uyarılar ile aktive edilebilir. Bu uyarılara bağlı olarak FOXO' ların aktivitesi sadece fosforilasyon/defosforilasyon yolu ile düzenlenmez. FOXO' ların posttranslasyonel modifikasyonları; fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon ve mono/poly-ubikütinasyon şeklinde olabilir ve bu modifikasyonlara göre de FOXO' ların subsellüler lokasyonları, protein düzeyleri, DNA-bağlanma özellikleri ve transkripsiyonel aktivitesi değişir (Calnan & Brunet, 2008).

FOXO'ların deasetile ve defosforile formları genelde aktiftir ve aktif formdayken nukleusa transloke olarak metabolizma, uzun yaşam, büyüme-gelişme ve tümör supresyonu ilişkili hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol edebilir. FOXO' lar PP2A (protein fosfataz 2A) ile sitoplazmada defosforile, histon deasetilazlardan SIRT1 ile nukleusta, SIRT3 ile mitokondride, SIRT2 ile de sitoplazmada deasetile edilerek transkripsiyonda aktif rol alabilirler (Daitoku, Sakamaki, & Fukamizu, 2011)(Şekil. 2.14.) SIRT1'in yaşlanma, nörodejenerasyon, metabolizma gibi süreçlerdeki etkinliğini FOXO' lar üzerindeki deasetilaz aktivitesi ile ortaya çıkardığına değinen hatırı sayılır miktarda çalışma vardır (Brunet et al., 2004)(Eijkelenboom & Burgering, 2013). SIRT2' nin de oksidatif strese cevaben FOXO3a deasetilasyonu ile Bim aracılı apoptozu indükleyebildiği gösterilmiştir (F. Wang et al., 2007).



Şekil 2.14. FOXO' ların geridönüşümlü fosforilasyonu ve asetilasyonu (Daitoku et al., 2011)

2.6. Melatonin

2.6.1. Melatonin fizyolojisi

Pineal bezin esas hormonu melatonin (N-asetil-5-metoksitripta-min), anti-oksidan, anti-aging, ve anti-tümör özellikleriyle tanınmaktadır. Melatonin iki önemli enzimin etkisiyle N-asetil transferaz (NAT) ve hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) ile serotonininden sentezlenir. Işık şiddeti ve süresine bağlı olarak pineal bezin serotonin düzeyi değişir ve

melatonin ile serotonin ritmi ters yöndedir. Melatonin sentezi için gece (karanlık) gereklidir ve gece ışığa maruz kalınırsa pineal fonksiyonlar akut olarak baskılanır. Melatonin düzeyi gece saatlerine doğru (20.00-23.00) yükselmeye başlar, 01.00-05.00 saatleri arasında pik değerlerine ulaşır, sabah saatlerinde (07.00-09.00) ise tekrar azalmaya başlar. Melatoninin bu ritmi pineal bezde, kanda, beyin omirilik sıvısında ve idrarda izlenebilir. Plazma melatonin düzeyi sağlıklı kişilerde gündüz 0-20 pg/ml, gece 20-200 pg/ml (ortalama 60-70 pg/ml) şeklindedir ve bir günde % 80' i gece olmak üzere yaklaşık 30 mg melatonin üretilir (R. J. Reiter, 1991)(Şener, 2010). Memelilerde melatonin biyosentezi ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde suprakiazmatik nukleus (SCN) merkezi role sahiptir. Retinal fotoreseptörler, hipotalamusta SCN ve PVN, süperior servikal ganglion ve pineal bez şeklinde ilerleyen ileti dizisinde süperior servikal gangliyondan köken alan sempatik inervasyon pineal bezde β adrenerjik reseptörler aracılığı ile hücre içi cAMP' yi artırır. cAMP artışı NAT enzim aktivitesini artırıp melatonin sentez ve sekresyonunu sağlamış olur.

Melatonin, pineal bezin yanı sıra gastrointestinal kanal, retina, lens, deri, immün ve hematopoetik hücreler, bazı reproduktif organlar ve endokrin bezler gibi ekstrapineal organ ve dokular tarafından da sentezlenir ancak plazma düzeyini belirleyen esas olarak pineal bezdir. Melatonin beyin, retina, hipofizer bez gibi daha birçok dokuda etkilerini hücre membranında yerleşik ve G proteini eşlenik olan MT1, MT2 reseptörleri ile ayrıca nükleer yerleşke gösteren ROR (tirozin kinaz benzeri orphan reseptör) ve RZR (retinoid Z reseptör) reseptörleri aracılığıyla gösterir, hatta reseptörden bağımsız etkileri de görülmektedir (Pandi-Perumal et al., 2008)(Luchetti et al., 2010).

MT1 ve MT2 reseptörleri santral sinir sinir sisteminde SCN, basal gangliyonlar, ventral tegmental alan, nükleus akkübens, retinal hücreler (horizontal, amakrin ve gangliyon), hipotalamus, talamus, preoptik alan, hipokampus, serebral ve serebellar kortekste bulunur. Non-nöronal reseptör yerleşkeleri ise kan damarları, meme bezleri, GIS, karaciğer, böbrek, mesane, overler, testisler, prostat, deri ve immün sistemdir (Luchetti et al., 2010). Görüldüğü üzere melatonin reseptörlerinin hem beyinde hem de periferel organlarda yaygın dağılımı vardır; bu durum melatoninin tüm vücut sistemleri üzerinde etkili bir hormon olduğunun göstergesidir.

2.6.2. Oksidatif stres, apoptoz, SIRT2, FOXO3a ve nöronal yaşlanma ilişkisi üzerine melatonin etkileri

Pek çok organda olduğu gibi beyindeki ROS artışı ve bu artışın antioksidan savunma sistemler tarafından dengelenemeyişi oksidatif stres tablosunun ortaya çıkmasına neden olur. Beyin dokusu (i) kolayca okside olabilen serbest yağ asitlerinden oldukça zengindir, (ii) oksijen tüketimi ve metabolizması yüksektir; tüm vücudun kullandığı total oksijenin ve ayrıca şeker miktarının yaklaşık % 20' sini tüketir, (iii) demir ve askorbat içeriği yüksektir; bu iki madde membranda lipid peroksidasyonda anahtar rol oynar, (iv) antioksidan savunma sistemleri açısından görece fakirdir (Floyd, 1999) (Floyd & Hensley, 2002). Tüm bu özellikleri ile beyin, ROS üretim potansiyeli yüksek, ROS hasarlarına açık ve ROS' larla başa çıkmada yetersiz kalan bir organdır. Dolayısıyla oksidatif stres açısından beyin risk altında olan bir organdır. Yaşlanma ile beyinde lipid peroksidasyon, protein oksidasyon ve nitrasyon ürünlerinin arttığı buna karşılık GSH, GSH reduktaz, GSH-Stranferaz, tiyoredoksin reduktaz, SOD, katalaz, gibi antioksidan enzimlerin azaldığı gösterilmiştir (Akbulut, Gonul, & Akbulut, 2008) (Öztürk, Akbulut, Güney, & Acuna-Castroviejo, 2012) (Venkateshappa, Harish, Mahadevan, Sirinivas Bharath, & Shankar, 2012). Yaşlanmayla beraber nöral ve glial hücre aktivitelerinde azalma ve bu hücreler arasında metabolik ilişkilerin bozulması GSH metabolizmasını da etkiler, dolayısıyla yaşlanma ve nörodejenerasyon karşıtı GSH-antioksidan savunma sistemleri çalışmaz hale gelebilir (Schmidt & Dringen, 2012).

Yaşlanma ve yaşlanmaya eşlik eden Alzheimer (AD), Parkinson (PD), amiotrofik lateral skleroz (ALS) ve Huntington (HD) vb nörodejeneratif hastalıklarda ROS yapımındaki artışla beraber, hatalı protein üretimleri ve hücre içi Ca artışlarının izlendiği, buna karşılık antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı gösterilmiştir. Bu durum frontal kortes, hipokampus ve limbik bölgelerdeki kademeli nöron kayıpları, beyindeki genel atrofi, demans, kognitif ve motor becerilerdeki bozuklukların ya da kayıpların nedeni olarak gösterilmektedir (Sastre & Pallard, 2000) (Denham Harman, 2002) (Floyd, Towner, He, Hensley, & Maples, 2011) (Venkateshappa et al., 2012). Genel beyin volümü yaşlanma ile yılda % 0,2-0,5 azalma gösterirken, en büyük atrofik değişikliğin frontal kortekste olduğu belirtilmektedir. Ne var ki yapılan çalışmalar temporal kortekste dahil tüm serebral alanlarda ve subkortikal alanlarda farklı derecelerde atrofi olduğunu göstermektedir. Atrofik değişikliklerden en çok etkilen bölgelerden hipokampus yılda % 0,79-2,0; entorinal

korteks ise % 0,3-2,4 kadar kayıp yaşamaktadır. AD gibi nörodejeneratif hastalıklarda bu oranlar çok daha yüksek olabilmektedir (Fjell, McEvoy, Holland, Dale, & Walhovd, 2014).

Beyindeki apoptotik aktivite artışı Bcl-2' nin down-regülasyonu ve Bax' ın up-regülasyonu ile sağlanmaktadır (Savory et al., 1999)(Weinreb et al., 2015). Bcl-2 ve Bax proteinleri arasındaki tersinir düzenleme oksidatif stres (Zhu et al., 2004), serebral iskemi (Isenmann et al., 1998), AD (Lu et al., 2005), travmatik beyin hasarı (Raghupathi et al., 2002) vb nörodejeneratif olgularda görülmektedir. Kireev ve arkadaşları yaşlanma ile dentat gyrusta Bax, Bak, AIF gibi pro-apoptotik proteinlerin arttığını, buna karşılık XIAP, NIAP, Mcl-1 gibi antiapoptotik proteinlerin azaldığını göstermiş, ayrıca melatonin uygulamasının bu dengeyi tersine çevirmede etkili olduğunu bildirmişlerdir (Kireev et al., 2013).

Yaşlanmaya bağlı olarak Bim ekspresyonlarındaki değişim iskelet kasında (Sin et al., 2015) ve kalpte (Sin et al., 2014) gösterilmiştir ve yaşlanma ile Bim ekspresyonlarının bu dokularda arttığı bildirilmiştir. Bim ekspresyonlarının beyinde yaşa bağlı değişimini bildiren çalışmaya rastanmamıştır ancak NGF azalmasına bağlı nöral kayıplarda (Whitfield et al., 2001), serebral iskemiye bağlı nöral kayıplarda (Inta et al., 2006), Alzheimer hastalığında β -Amyloid indüklü hipokampal ve kortikal nöron kayıplarında (Biswas et al., 2007) ve Huntington hastalığında (Shimmyo et al., 2008) olduğu gibi nörodejenerasyona bağlı apoptotik kayıplarda Bim artışı görülmektedir.

Maxwell ve arkadaşları yaşlanma ile santral sisteminde SIRT2 birikimini göstermişler ve bu durumu nörodejenerasyonla ilişkilendirmişlerdir (Maxwell et al., 2011). Braidı ve arkadaşları da kortekste SIRT2 artışıyla korele FOXO3a düzeylerinde artış olduğunu ve SIRT2' nin FOXO3a üzerinde kuvvetli deasetilaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir (Braidı et al., 2015). SIRT2' nin farmakolojik ya da genetik yollardan inhibisyonu ise AD (Biella et al., 2016), PD (X. Chen et al., 2015), HD (Luthi-Carter et al., 2010) vb nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu bulunmuştur.

FOXO3a pek çok dokuda eksprese edilmekle beraber beyinde hipokampus, korteks ve serebellumda ekspresyonu oldukça yüksektir (Hoekman, Jacobs, Smidt, & Burbach, 2006), ancak yaşlanmaya bağlı beyinde FOXO3a protein ekspresyonlarındaki değişime değinen çok az çalışmaya rastlanmıştır. Jakson ve arkadaşları yaşlı sıçanlarda oksidatif stres ve metabolik stres gibi çeşitli stresörlere karşı daha hassas olan CA1 bölgesinde FOXO3a

ekspresyonunun çok daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Jackson, Rani, Kumar, & Foster, 2009). FOXO3a oksidan streslere cevaben MnSOD ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin transkripsiyonu sağlar, p27 ve p21 genlerinin transkripsiyonu ile hücre döngüsünün durdurulması ve DNA tamir sistemlerinin devreye girmesine aracılık edebilir, ayrıca Bim, FasL, TRAIL ve PUMA transkripsiyonu ile apoptozu ve/veya otofajiyi kontrol edebilir (Nho & Hergert, 2014). Wang ve arkadaşları, hidrojen peroksit indüklü oksidatif strese cevaben artan SIRT2' nin deasetile FOXO3a ve FOXO3a hedef genleri MnSOD ve p27Kip1 ekspresyonlarını arttırdığını göstermiştir. Bu artışlar oksidan stresle başa çıkma ve hasar tamirleri için gereklidir. Diğer taraftan hidrojen peroksit konsantrasyonunun arttırılması pro-apoptotik Bim ekspresyonunda artışa ve hücrelerin kaybedilmesine neden olmuştur (Wang et al., 2007). SIRT2 gibi FOXO3a' nın inhibisyonu da AD' de (Qin et al., 2008) ve travmatik beyin hasarında (Sun et al., 2018) nöroprotektif etkili bulunmuştur. Pino ve arkadaşları SIRT2 inhibisyonuna FOXO3a' inhibisyonunun eşlik ettiğini ve bu durumun Parkinson hastalığı patogenezinin önlenmesinde etkili olduğunu göstermişleridir (Pino et al., 2014).

Melatonin kuvvetli bir radikal süpürücü olup bu etkinliği için reseptör ya da herhangi bir bağlanma bölgesine ihtiyaç duymaz. Lipofilik ve hidrofilik özellikte bir hormondur, bu sayede hücre içi kompartmanlara kolayca diffüze olabilir, kan-beyin bariyerini geçebilir. Melatonin, yapısında bulunan pirol halkası nedeniyle $\bullet\text{O}_2$ ve $\text{OH}\bullet$ radikallerini yakalamada yüksek bir kapasiteye sahiptir (Benot et al., 1999) ve DNA gibi makromolekülleri oksidatif hasara karşı korumada glutatyon ve mannitolden çok daha etkili bulunmuştur (R. Reiter, Carneiro, & Oh, 1997).

Melatonin, yaşlanma, metabolizma artışı ya da çevresel stres gibi çeşitli stres koşullarında reseptör bağımlı/bağımsız yollardan hücrede direkt olarak ROS' ları süpürebilir, lipid peroksidasyonu azaltabilir hatta strese cevaben ilgili gen ekspresyonlarını (Nf- κ B, AP-1, Nrf2) kontrol ederek GSH, GPx, GRd, SOD, katalaz vb antioksidan enzimlerin düzeylerini de arttırabilir (Akbulut et al., 2008)(Cristofanon et al., 2009)(Luchetti et al., 2010)(Öztürk et al., 2012). İlerleyen yaşla beraber melatonin salınımı azalmaktadır (Karasek, 2007) ve bu durumun yaşlanma ile artan hastalıkların patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (Bonfont-Rousselot & Collin, 2010)(Hardeland et al., 2011). Yaşlanmaya bağlı hastalıkların gelişiminde melatoninin geciktirici rolü belirtilmekle beraber uzun süreli ekzojen melatonin kullanımının yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (Oaknin-Bendahan,

Anis, Nir, & Zisapel, 1995). Melatonin çeşitli stres koşulları altında inflamasyonu ve apoptotik aktiviteyi baskılayarak nöronların sağkalım oranlarını arttırabilmektedir (Luchetti et al., 2010)(Paredes et al., 2015). Ayrıca spinal kord yaralanması (Esposito et al., 2009), Parkinson (Tapias et al., 2009), Alzheimer (Rosales-Corral et al., 2012), iskemik hasar (Xin Wang et al., 2009) ve oksidatif stres (Martinez-Cruz et al., 2002) modeli oluşturulan çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalarda melatoninin nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir.

Melatonin uygulamasının yaşlanan beyinde SIRT2 ve FOXO3a düzeylerine etkisini gösteren yeterli çalışma bulunmamaktadır. Kendi çalışmalarımızda melatonin uygulamasının erişkin sıçanların hipokampuslarında oksidan parametrelerle korele olan SIRT2 düzeyini azaltmada etkili olduğunu (Keskin-Aktan et al., 2018), ayrıca yaşlanma ile kolonda artan SIRT2 ekspresyonunu inhibe edebildiğini gösterdik (Akbulut, Aktas, & Akbulut, 2015). Zhao ve arkadaşları, melatonin uygulamasının FOXO3a inhibisyonu ile Alzheimer hastalığı nöropatolojilerini hafifletmede etkili olduğunu ve nöral kayıpların engellenebildiğini göstermişlerdir (Yue Zhao et al., 2018).

2.7. Curcumin

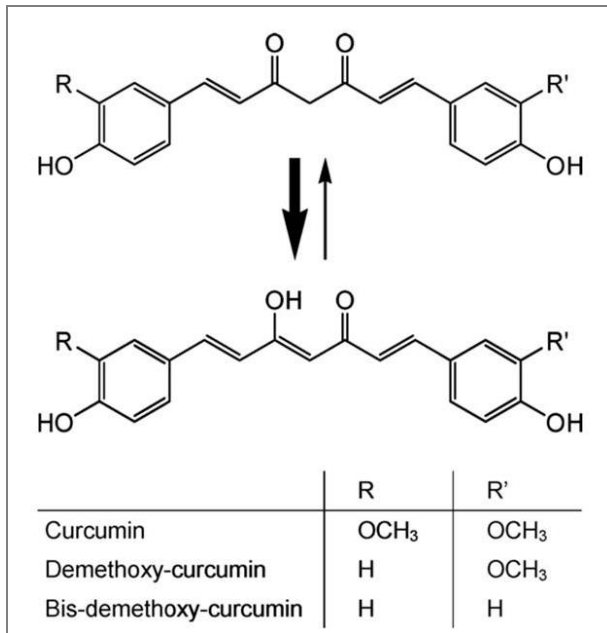
2.7.1. Curcumin ve metabolizması

Curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene- 3,5-dione], turmeric' in (curcuma longa) ana komponentidir. Curcumin, bis- α , β -unsature ve β -diketon bileşik olarak tanımlanır ve lipofilik özellikli doğal bir polifenoldür. Güney Doğu Asya kökenli olup zerdeçal, hint safranı, safran kökü, zerdeçöp, sarıboya vb farklı isimlerle de bilinmektedir. Yapısındaki diferuloylmethene, köri baharatına sarı rengini veren maddedir. Curcumin peynirlerde, tereyağı, kozmetiklerde ve daha çok baharatlarda kullanılır.

Curcuminin kuvvetli anti-oksidan ve anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle klinik çalışmalarda çok fazla kullanılmaktadır ancak curcuminin oral biyoyararlanımı oldukça düşüktür (%1) (Liu et al., 2016). Curcumin oral olarak alındığında, büyük oranda feçes yoluyla vücuttan atılır ve barsaklarda emilebilen oranı ise çok düşüktür. Emilimi gerçekleşen curcumin ise karaciğerlerde ve plazmada hızla metabolize edilir. Curcuminin suda çözünürlüğü zayıftır ve yaygın olarak suda çözünen metabolitlerine (glukuronidler ve

sülfatlar) dönüştürülüp idrar yoluyla atılır. Curcuminin tetrahidro-, heksahidro- ve oktahidro- metabolitleri ağırlıklı olarak glukuronidler olarak mevcuttur, ancak önemli oranda sülfat konjugatları da bulunur (Hoehle, Pfeiffer, Sólyom, & Metzler, 2006)(Şekil 2.15).

Günümüzde, lipozomlar, nanopartiküller ve polimerik miçeller, fosfolipid kompleksleri ve mikroemülsiyonlar dahil olmak üzere curcuminin çözünürlüğünü ve oral biyoyararlanımı arttırmaya yönelik çok fazla çalışma yapılmaktadır. Oral kullanımın kısıtlılıklarından ötürü rodent çalışmalarında oral gavaj uygulamasının yanı sıra intraperitoneal ve intraserebroventriküler girişimler de tercih edilmektedir (Liu et al., 2016).



Şekil 2.15. Turmericteki (zerdeçal) curcuminoidlerin kimyasal yapıları (Hoehle et al., 2006)

2.7.2. Curcuminin oksidatif stres, apoptoz, SIRT2, FOXO3a ve nöral yaşlanmadaki rolü

Curcuminin oldukça güçlü anti-inflamatuar, anti-proliferatif, anti-oksidan ve anti-tümör etkilerinin olduğu bilinmektedir (Bala, Tripathy, & Sharma, 2006)(Mansouri, Sabetkasaei, Moradi, Masoudnia, & Ataie, 2012). Curcuminin yapısında azid, halopiroksil, Br2 radikalleri ile birlikte birçok reaktif oksidanla reaksiyona giren fenolik OH grubu yer alır. Anti-oksidan etkisi, fenolik yapısından ve β -diketon türevinden ileri gelir. Curcumin bu özellikleri ile oksidatif DNA hasarını inhibe eder, lipooksijenaz ve siklooksijenaz

inhibisyonu sonucunda araşidonik asit salınımını azaltır. Ayrıca NF- κ B aktivasyonunu inhibe edip anti-inflamatuar etki oluşturur, TNF α , IL-1, granulosit koloni stimulan faktör miktarını artırır (Choudhary, Chandra, & Kale, 1998)(Indira, 1997).

Birçok in vivo ve in vitro çalışmada yaşlanma, nörodejenerasyon, kanser ve çeşitli stres koşulları altında curcuminin, koruyucu etkileri gösterilmiştir (Duvoix et al., 2005)(Bala et al., 2006)(Jayasena et al., 2013). Antioksidan ve nöroprotektif etkileri yaşlı sıçanların korteks, hipokampus, serebellum gibi farklı beyin bölgelerinde görülmektedir (Bala et al., 2006)(Keskin-Aktan et al., 2018). Curcumin, yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli toksik koşullar altında beyinde lipid peroksidasyon ürünlerini azaltıp antioksidan sistemleri (SOD, GSH, GST ve GPx vb) aktive edebilir (Lim et al., 2001)(Al-Omar, Nagi, Abdulgadir, Al Joni, & Al-Majed, 2006)(Motaghinejad et al., 2015). Ayrıca, nörogenezi uyarır (Kim et al., 2008), Bcl-2 ekspresyonunu artırarak nöral kayıpları azaltabilir, öğrenme ve bellek işlevlerini geliştirebilir (Pan, Qiu, Lu, & Dong, 2008).

Curcumin, büyümesi inhibe edilmiş hücreleri restore ederek apoptozu engellerken, kemopreventif etkisiyle kanser hücrelerinde apoptozu indükler. Curcuminin insan hepatoma ve lösemi hücrelerinde apoptozu uyardığı ve insan bazal hücre karsinom hücrelerinde apoptoz oluşturduğu bildirilmiştir. Ayrıca, kaspaza bağlı apoptozu inhibe ettiği, NF- κ B ve COX2 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Belakavadi & Salimath, 2005). Curcumin sitokrom P450 potent inhibitörüdür ve glutatyon S transferaz aktivasyonu ile potansiyel kanser koruyucu bir ajandır (Oetari, Sudibyo, Commandeur, Samhoedi, & Vermeulen, 1996).

Curcuminin nöroprotektif etkisine sirtuinlerin aracılık ettiğini gösteren çalışmalar daha çok SIRT1 ile olan ilişkisi üzerinedir. Curcuminin sıçan kortikal nöronlarında SIRT1 aktivasyonu ile amyloid- β_{25-35} nörotoksisitesini engellediği gösterilmiştir (Sun et al. 2014). Curcuminin SIRT1 aracılı nöroprotektif (Doggui et al. 2013) ve antikanser etkisini (Hu et al. 2015) gösteren çalışmalar mevcut olmasına karşın, SIRT2' nin inhibisyonu ile nöroprotektif etkisi ilk kez çalışmamız ile gösterilmiştir (Keskin-Aktan et al., 2018).

Literatürde curcumin FOXO' lar ile ilişkisini gösteren çalışmalar çok azdır ve genelde FOXO1 ilişkilidir. Curcumin, palmitatla apoptozu indüklenmiş pankreatik beta hücrelerinde Bcl-2/Bax oranını arttırmış, PI3K/Akt/FoxO1 yolağında Akt aktivasyonu ve

FOXO1 inhibisyonu ile hücre kayıplarını azaltmıştır (Hao et al., 2015). Myokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında curcumin ön-tedavisi SIRT1 ve Bcl-2 ekspresyonlarını arttırmış, Bax ve asetile-FOXO1 ekspresyonlarını ise azaltmıştır (Yang et al., 2013)

Curcuminin beyinde FOXO3a düzeyi ile ilişkisini gösteren çalışma bulunmamakla birlikte, monosit/makrofajlardaki lipid akümüasyonu üzerine düzenleyici etkisinin FOXO3a ile aracılık ettiği ve curcuminin FOXO3a hedef gen ekspresyonlarını arttırabildiği gösterilmiştir (Zingg et al., 2012).

2.8. Salermide

Salermide, (N-{3-[(2-hydroxy-naphthalen-1-ylmethylene)-amino]-phenyl}-2-phenyl-propionamide) farmakolojik sirtuin inhibitörleri arasında yer alır ve in vitro testte 25 μ M' de SIRT2 aktivitesini % 80 oranında inhibe edebilir. Salermide 100 μ M' ye kadar olan konsantrasyonlarda fareler tarafından da iyi tolere edilebilmektedir (Alcaín & Villalba, 2009).

In vitro kanser hücrelerinde salermidin SIRT1 ve SIRT2 inhibisyonu ile, asetile p53 ve apoptozda artış sağladığı gösterilmiştir (Peck et al., 2010) (Lara et al., 2009). Ayrıca salermidin Chagas hastalığı kemoterapisinde de etkili olabileceği düşünülmektedir (Moretti et al., 2015). Salermidin in vivo kullanımı henüz çok yaygın değildir. Bir çalışmada travmatik beyin hasarı öncesi salermidin (2 μ l; 200 μ M veya 400 μ M) intracerebroventricular enjeksiyon yolu ile uygulanmasının SIRT1 ekspresyonunu azalttığı, bu nedenle de nöronların sağ kalım oranlarında azalma olduğu bildirilmiştir (Yongbo Zhao et al., 2012).

SIRT2' nin çeşitli farmakolojik inhibitörleri AD (Biella et al., 2016), HD (Luthi-Carter et al., 2010) ve PD (X. Chen et al., 2015) gibi nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkili gösterilmiştir. SIRT2 inhibisyonunun sinir sistemindeki koruyucu etkisinin altta yatan mekanizması henüz aydınlatılamamış olsa da özellikle nörodejeneratif olgularda SIRT2 inhibitörlerinin kronik kullanımlarının motor fonksiyonları iyileştirdiği, nöral hücrelerin sağkalımlarını arttırdığı ve beyin atrofisini de azalttığı gösterilmiştir (H. Chen, Wu, Ding, & Ying, 2015) (Chopra et al., 2012).

Erişkin sıçanlarda yapmış olduğumuz çalışmamızda 30 gün boyunca süren günlük 100 µM intraperitoneal salermide uygulamasının hipokampus dokusunda SIRT2 inhibisyonu ile beraber lipid peroksidasyonun azaltılmasında, GSH düzeyinin arttırılmasında etkili olduğunu göstermiştik (Keskin-Aktan et al., 2018). Bu çalışmamızda ise genç ve yaşlı sıçanların serebral korteks ve hipokampus dokularında SIRT2 inhibisyonunun oksidatif stres ve apoptotik aktiviteyi nasıl etkilediğini ve SIRT2 ile FOXO3a arasındaki olası ilişkiyi gösterebilmek adına yine benzer doz uygulaması ile salermide kullanımını planladık. Ayrıca çalışmamızda salermide aracılı SIRT2 inhibisyonu, melatonin ve curcumin uygulamalarının SIRT2' nin potansiyel inhibitörü olma özelliklerini de test etmemize olanak sağlayacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney hayvanları

Hayvan deneyleri süreci Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' nun onayını (27/01/2016 tarih ve 66332047-604.01.02- sayılı karar) takiben, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi' nde (GÜDAM) başlatıldı. Çalışmada kullanılan toplam 48 adet Wistar albino cinsi erkek sıçanların temini ve deney sürecindeki bakımları GÜDAM tarafından sağlandı. Dolayısıyla, deney süresince tüm sıçanların bakımı standart laboratuvar koşullarında altında yapıldı; eşit aydınlık/karanlık siklusunda (12sa aydınlık/12sa karanlık; 08:00/20:00) kalmaları, normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile *ad libitum* beslenmeleri sağlandı.

3.1.2. Kullanılan laboratuvar aletleri ve cihazlar

Bu çalışmada kullanılan Gazi Üniversitesi, Fizyoloji Araştırma Laboratuvarlarına ait donanımlar marka/model özellikleri ile beraber Çizelge 3.1' de listelenmiştir. Farklı olarak Ankara Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarında kullanılan cihazlar, marka/model sütunu içinde (AÜ) şeklinde belirtilmiştir.

3.1.3. Kullanılan kimyasallar, antikorlar ve kitler

Çalışmada kullanılan çeşitli kimyevi sarflar (Çizelge 3.2), ticari kitler (Çizelge 3.3) ve Western blot yöntemi için kullanılan antikorlar (Çizelge 3.4) imalatçı firma, katalog numaraları vb özellikleri ile beraber ilgili çizelgelerde listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Laboratuvar donanımları

Alet/Cihaz Adı	Marka/Model
1 Doku homojenizatörü	Sonics vibracell, VCX130FSJ
2 Spektrofotometre	BİOKİT, EL x 800, Bioelisa Reader Thermo Scientific, Multiskan GO-spectrophotometer (AÜ)
3 Etüv	SHEL LAB CO2 Incubator (AÜ)
4 Spektrofotometre-Printer	EPSON, LX-300+
5 Soğutmalı santrifüj	MPW-350R
6 Elektroforez ve blotting cihazı	Mini protean system, BIO-RAD, Hercules, CA, USA
7 Güç kaynağı	Consort, E835, Electrophoresis Power Supply
8 Isıtıcı (ependorf için)	Eppendorf, Thermomixer Compact
9 Hassas tartı	SHIMADZU, AX200
10 Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Assistent, TMA 2071
11 Çalkalayıcı (shaker)	Mini Rocker MR-1, BOECO
12 Vorteks	VELP, Scientifica, Vortex, Mixer
13 Saf su /DI cihazı	MES, mpMINIpure
14 Derin dondurucu (- 80 °C)	WiseCryo, Simplified Freezing System
15 pH metre	Eutech Instruments, Singapur
16 Steril enjektör (1-5 ml)	Hayat, Türkiye
17 Steril şırınga ucu filtre (0,45 µm)	Merck Milipore
18 Otomatik mikropipetler	GILSON, France ve Nichipet EX, Japan
19 Farklı hacimlerde otomatik pipet uçları ve eppendorf tüpleri	
20 Cerrahi malzemeler	

Çizelge 3.2. Çeşitli kimyevi sarflar

Kimyasal/malzeme adı	Katalog No	İmalatçı Firma
1 Melatonin (1 g)	M5250-1G	Sigma-Aldrich, Germany
2 Curcumin (from curcuma longa (Turmeric) powder) (5 g)	C1386-5G	Sigma-Aldrich, Germany
3 Salermid (10 mg)	13178	Cayman Chemical Company, USA
4 Lizis tamponu (RIPA Lysis Buffer System)	sc-24948	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
5 Bradford çözeltisi	BRA222.500	BioShop Canada Inc.
6 Sığır serum albumini (BSA)	ALB003.25	BioShop Canada Inc.
7 Protein standardı (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard)	LC5925	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
8 Kemilüminesans substrat (ECL Western Blotting Substrate)	32106	Pierce™ (Thermo Sci.), IL, USA
9 Nitrosellüloz membran (0,2 µm)	162-0112	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
10 Tris baz	sc-3715	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
11 Glisin	sc-29096	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
12 Gliserol	15514-011	Invitrogen, CA, USA
13 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	8.170.341.000	MERCK, Germany
14 Bromofenol mavisi	sc-24971	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
15 β-merkaptotanol	sc-202966	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
16 Metanol	24229	Riedel-de Haen, Seelze, Germany
17 40 % Acrylamide/Bis Solüsyonu, 29:1 (3.3% C)	161-0146	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
18 Amonyum per sulfat (APS)	sc-202946A	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
19 Tetrametil-etilendiamin (TEMED)	15524-010	Invitrogen, CA, USA
20 Yağsız süt tozu (Blotto, Non-fat dry milk)	sc-2324	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
21 Sodyum klorür (NaCl)	13423	Riedel-de Haen, Seelze, Germany
22 Tween 20	TWN508.500	BioShop Canada Inc.
23 Medikal X-ray film / MXG Film (18x24 cm)	811 6428	Carestream Health, Inc., NY, USA
24 X-ray film banyo solüsyonu-developer, ILFORD ILFOSOL 3	1131778	HARMAN Technology Limited, UK
25 X-ray film banyo solüsyonu-fixer, ILFORD RAPID FIXER	1984253	HARMAN Technology Limited, UK
26 Potasyum klorür (KCl)	4935	MERCK, Darmstadt, Germany
27 Coomassie brilliant mavisi- G	B-1131	Sigma-Aldrich, Germany

Çizelge 3.3. Kitler

Kit Adı	Katalog No	İmalatçı Firma
1 Total Oxidant Status (TOS) ASSAY KIT	RL0024	Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, TURKEY
2 Total Antioxidant Status (TAS) ASSAY KIT	RL0017	Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, TURKEY
3 Rat Sirt2 ELISA Kit	ER0299	Wuhan Fine Biological Tech., Wuhan, CHINA
4 Rat Forkhead Box O3A (FOXO3A) ELISA Kit	MBS9305817	MyBioSource, Inc., CA, USA

Çizelge 3.4. Antikorlar

Antikor	MA	Dilüsyon*	Katalog No	İmalatçı Firma
1 SIRT2 (anti-mouse monoclonal)	43 kDa	1:500	sc-28298	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
2 FOXO3a (anti-rabbit polyclonal)	87-99 kDa	1:250	sc-11351	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
3 BIM (anti-rabbit polyclonal)	24 kDa	1:300	sc-11425	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
4 BAX (anti-rabbit polyclonal)	23 kDa	1:500	sc-493	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
5 BCL-2 (anti-mouse monoclonal)	26 kDa	1:1.000	MA1-12246	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
6 β -Aktin (anti-rabbit polyclonal)	43 kDa	1:125	sc-130657	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
7 Goat anti-rabbit IgG-HRP	-	1:5.000	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
8 Goat anti-mouse IgG-HRP	-	1:5.000	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA

*Bu sütunda antikorların çalışmada kullanılan dilüsyon oranları belirtilmiştir. Antikorların dilüsyon tamponları ise antikora göre farklılık göstermektedir. Bu durum ‘Kullanılan çözeltiler’ ve ‘Western blot yöntemi’ bölümlerinde ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.1.4. Kullanılan çözeltiler

Bu kısımda sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) / Western blot yöntemi için gerekli olan ve manuel olarak hazırlanan çözeltiler verilmiştir. Ticari olarak temin edilen kit içerikleri (stok ve dilüsyon oranları vb) ise ilgili yöntem bölümlerinde verilmiştir.

Jel dökümü için hazırlanan çözeltiler

- Ayırma jeli (resolving gel) % 12’ lik, 10 ml (2 jel için)
 - 4,25 ml distile su
 - 3 ml % 40’ lık Acrylamide/Bis solüsyonu
 - 2,5 ml 1,5 M tris (pH 8,8)
 - 100 μ l % 10’ luk SDS
 - 100 μ l % 10’ luk APS
 - 10 μ l TEMED
- Ayırma jeli (resolving gel) % 10’ luk, 10 ml (2 jel için)
 - 4,75 ml distile su
 - 2,5 ml % 40’ lık Acrylamide/Bis solüsyonu
 - 2,5 ml 1,5 M tris (pH 8,8)
 - 100 μ l % 10’ luk SDS
 - 100 μ l % 10’ luk APS
 - 10 μ l TEMED

- Yığınlama jeli (stacking gel) % 6' lık 5 ml (2 jel için)
 - 2,9 ml distile su
 - 0,75 ml % 40' lık Acrylamide/Bis solüsyonu
 - 1,25 ml 0,5 M tris (pH 6,8)
 - 50 µl % 10' luk SDS
 - 50 µl % 10' luk APS
 - 5 µl TEMED
- 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Tris baz MA:121,14 g/mol)
 - 6 g tris baz 60 ml distile su ile çözülür
 - 6 N HCl ile pH ayarı yapılır (pH 6,8)
 - Son hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlanır
- 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Tris baz MA:121,14 g/mol)
 - 27,23 g tris baz 80 ml distile su ile çözülür
 - 6 N HCl ile pH ayarı yapılır (pH 8,8)
 - Son hacim distile su ile 150 ml' ye tamamlanır
- % 10 (w/v) SDS
 - 10 g SDS 100 ml distile su ile çözülür
- % 10 (w/v) APS
 - 0,1 g APS 1 ml distile su ile çözülür
 - Günlük taze hazırlanması gerekir

SDS-PAGE / Western blot yöntemi için hazırlanan diğer çözeltiler

- Örnek tamponu (sample buffer) (×2) stok
 - 1,25 ml tris-HCl (0,5 M pH 6,8)
 - 2,5 ml gliserol
 - 2 ml % 10' luk SDS
 - 0,2 ml % 0,5' lik bromofenol mavisi
 - Son hacim 9,5 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır.
 - Kullanımdan hemen önce, 1 ml için; 50 µl β-merkaptoetanol ve 950 µl hazırlanan bu tampondan karıştırılır.
- % 0,5 (w/v) Bromofenol mavisi
 - 0,05 gr bromofenol mavisi 10 ml distile su içinde çözülür
 - Steril filtreden geçirilir

- Yürütme tamponu (running buffer) ($\times 10$) stok, pH 8,3
 - 30,3 g tris baz
 - 144 g glycine
 - 10 g SDS
 - Son hacim 1 L olacak şekilde distile su içinde çözülür
 - ($\times 1$) kullanım için; 100 ml stok yürütme tamponu distile su ile 1 L' ye tamamlanır.
- Transfer tamponu (transfer buffer) ($\times 10$) stok
 - 30,3 g tris baz
 - 144 g glycine
 - Son hacim 1 L olacak şekilde distile su içinde çözülür
 - İhtiyaç duyulan tampon miktarı % 20 metanol içerecek şekilde hazırlanır. ($\times 1$) kullanım için; 100 ml stok transfer tamponu ve 200 ml metanol, distile su ile 1 L' ye tamamlanır.
- Yıkama tamponu (TBS-T; Tris Buffered Saline with Tween 20) ($\times 10$) stok, pH 7,5
 - 12,11 g tris base
 - 87,66 g NaCl
 - 5 ml tween 20
 - 800 ml distile suda çözülür ve konsantre HCl ile pH ayarı yapılır (pH 7,5)
 - Son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlanır
 - ($\times 1$) kullanım için; 100 ml stok yıkama tamponu distile su ile 1 L' ye tamamlanır
- Membran bloklama tamponu (% 5' lik)
 - 5 gr yağsız süt tozu son hacim 100 ml olacak şekilde yıkama tamponu ile çözülür.
 - Transfer işlemi sonrasında tüm membranlar, membranı kaplayacak miktarda kullanılan bu tampon içinde (yaklaşık 25 ml) + 4 °C' de gece boyunca bloklanır.
- Antikor tamponu (% 5' lik)
 - Membranların primer ve sekonder antikorlar ile inkübasyonu için kullan bu tampon esasen uygun antikor dilüsyonlarının yapıldığı (Çizelge 3.4) membran bloklama tamponudur. Farklı olarak, β -Aktin primer antikoru için % 2' lik süt tozu, FOXO3a ve BCL-2 primer antikorları için süt tozu yerine BSA kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Araştırma planı ve deney süreci

Bu çalışmada 3 aylık genç (n = 24) ve 22 aylık yaşlı (n = 24) olmak üzere toplam 48 adet Wistar albino cinsi, erkek sıçanlar kullanıldı. Genç ve yaşlı gruplar içinde birer adet kontrol (KNT), melatonin (MLT), curcumin (CUR) ve salermide (SLM) grupları bulunmak üzere toplam 8 grup oluşturuldu. Çalışmada kullanılan kontrol ve deney grupları, eksojen uygulaması yapılan maddelerin dozları ve enjeksiyon yolları Çizelge 3.5' te özetlenmiştir. Melatonin (M5250-1G, Sigma-Aldrich, Germany) önce etanol içinde çözülüp sonra fosfat tamponu (PBS, pH 7,4) ile dilüe edilerek (% 1 etanol-PBS), curcumin (C1386-5G, Sigma-Aldrich, Germany) ve salermide (13178, Cayman Chemical Company, USA) ise önce dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülüp sonra PBS ile dilüe edilerek (% 4 DMSO-PBS) hazırlandı. Daha önceki tez çalışmasında çözücü olarak kullanılan % 1 etanol-PBS ve % 4 DMSO-PBS uygulamaları çalışılan parametreler üzerinde istatistiksel anlamlılık oluşturmadığı için bu çalışmada sadece uygun hacimlerde % 1 etanol-PBS verilen kontrol grupları kullanıldı. Melatonin (10 mg/kg), curcumin (30 mg/kg) ve salermidin (100 µmol/µl) günlük enjeksiyon dozları daha önceki çalışmalarımızla benzer şekilde kullanıldı (Akbulut, Gonul, & Akbulut, 2008)(Akbulut, Keskin Aktan, Yazıcı Mutlu, & Akbulut, 2015) (Keskin-Aktan et al., 2018). PBS ve melatonin uygulamaları subkuten (sc) yoldan, curcumin ve salermide uygulamaları ise intraperitoneal (ip) yoldan yapıldı. Enjeksiyonlar günde bir kez, saat 17:00' da yapılmak üzere 21 gün boyunca sürdürüldü.

Deneyin 22. günü ketamin-ksilazin anestezisi altındaki sıçanların intrakardiyak kanları alınarak sıçanlar feda edildi. Akabinde sıçanların beyin dokuları çıkartılıp buz paketleri üzerinde serebral korteks ve hipokampus dokuları izole edildi (Resim 3.1). Derhal sıvı nitrojende dondurulan izole dokular ilgili parametreler çalışılncaya dek - 80 °C' de muhafaza edildi.

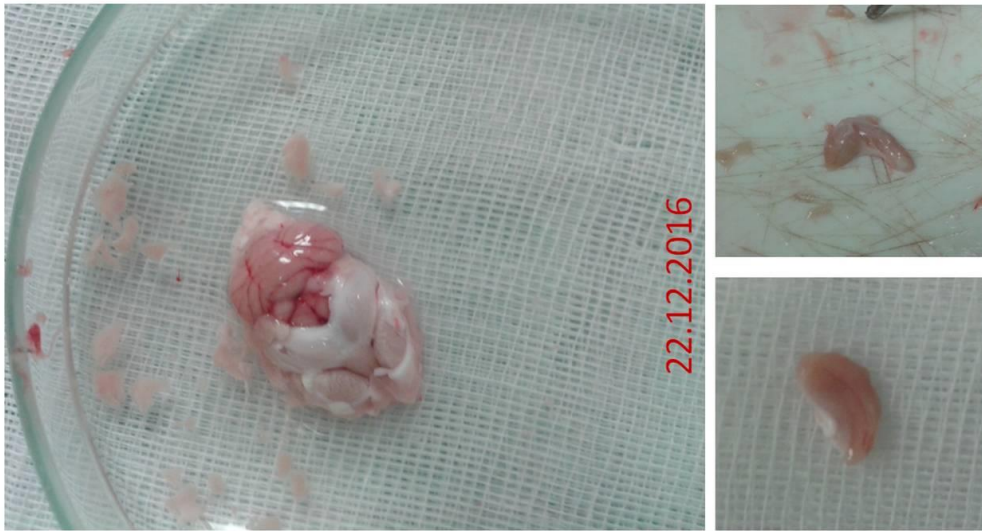
Sıçanların izole serebral korteks ve hipokampus dokularında SIRT2, FOXO3a, BCL-2, BAX ve BIM ekspresyonları Western blot yöntemi ile gösterildi. SIRT2 ve FOXO3a protein miktarlarını tayin etmek için sandviç ELISA yöntemi kullanıldı. Ayrıca, spektrofotometrik yöntemle dokuda total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) ölçümleri yapıldı ve oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı. Serebral korteks ve

hipokampus dokularında yapılan bu çalışmalar Gazi Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Araştırma Laboratuvarları ve Ankara Üniversitesi, Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarlarında sürdürülmüştür.

Çizelge 3.5. Kontrol ve deney grupları

GRUPLAR	GENÇ				YAŞLI			
	KNT	MLT	CUR	SLM	KNT	MLT	CUR	SLM
Günlük Doz	% 1 etanol-PBS	10 mg/kg	30 mg/kg	100 μ mol/ μ l	% 1 etanol-PBS	10 mg/kg	30 mg/kg	100 μ mol/ μ l
Uygulama Şekli	sc	sc	ip	ip	sc	sc	ip	ip
Denek sayısı	6	6	6	6	6	6	6	6

(KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermide)



Resim 3.1. Doku izolasyonu

3.2.2. SDS-PAGE / Western blot yöntemi

Moleküler biyolojide uzun yıllardır kullanılan Western blot yöntemi, protein solüsyonunda aranan hedef proteinin varlığının gösterilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Başta moleküler ağırlığı (kDa) belirleyici olmak üzere, aranan hedef proteinin genel karakteristiklerine göre günümüzde bu yöntemde kullanılan teknik donanımlar, tamponlar ve antikorlar çeşitlilik gösterse de bu yöntem belli başlı aşamaların takibini gerektirmektedir. Çalışmamızda SIRT2, FOXO3a, BIM, BAX, BCL-2

ve yükleme kontrolü olarak seçilen β -aktin proteinlerinin ekspresyonları Western blot yöntemi ile gösterilmiş ve yönteme dair aşamalar sırasıyla verilmiştir.

Örneklerin hazırlanması

SDS-PAGE için kullanılacak serebral korteks ve hipokampus doku örnekleri sırasıyla aşağıdaki işlemler takip edilerek hazırlandı;

- Buzlu ortamda 20 mg doku üzerine 300 μ l lizis tamponu (pH 7,4) eklendi. Kullanılan lizis tamponunun (RIPA Lysis Buffer System, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) 1 ml' si, 10 μ l 200 mM phenylmethanesulfonyl floride (PMSF), 10 μ l 100 mM sodium orthovanadate ve 10 μ l proteaz inhibitör kokteyli içerecek şekilde hazırlandı.
- Doku homojenizatörü (Sonics vibracell, % 50 amplitüd, 5-10 sn) vasıtasıyla elde edilen homojenatlar buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.
- İnkübasyonu takiben 10.000 g, + 4 °C' de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Süpernatantlar temiz ependorflara alınıp, yine 10.000 g, + 4 °C' de 10 dk olmak üzere ikinci santrifüj yapıldı.
- Süpernatantlar aliquotlandı ve - 80 °C' de muhafaza edildi.

Total protein düzeylerinin ölçümü

SDS-PAGE için hazırlanan örneklerde total protein düzeylerinin ölçümü için boya temelli, hassasiyeti yüksek, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kabul edilen Bradford metodu kullanıldı (Bradford, 1976). Bradford metodu 0-2 mg/ml aralığında protein içeren çözeltilerin konsantrasyon ölçümü için uygundur. Bu metod için kullanılan Bradford reaktifi, coomassie brilliant mavisi içerir ve boyanın çözelti içindeki proteinlere bağlanması ile 595 nm' de maksimum absorbands ölçülür. Bu yöntemde sıklıkla kullanılan sığır serum albumini (BSA) gibi standart bir protein vasıtasıyla elde edilen konsantrasyon-absorbans eğrisi, çözeltideki bilinmeyen protein miktarının (mg/ml yada μ g/ μ l şeklinde) tayin edilmesine olanak sağlar.

Çalışmamızda Bradford metodu ile protein tayini için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı;

- Protein standardı olarak seçilen BSA (ALB003.25, BioShop Canada Inc.) 20 mg tartıldı ve 1ml PBS pH 7,4 içinde çözüldü. Bu sayede 20 mg/ml' lik stok BSA elde edildi.
- 20 mg/ml' lik stok BSA'nın PBS ile uygun dilüsyonları yapılarak; 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0 mg/ml şeklinde 6 adet protein standardı hazırlandı.
- Mikroplakanın kuyucuklarına ikişer tekrarlı olmak üzere önce standartların her birinden 10 µl, sonra PBS ile 10 kat dilue edilen örneklerin her birinden 10 µl yükleme yapıldı.
- Standartlar ve örneklerin üzerine 200 µl Bradford çözeltisi (BRA222.500, BioShop Canada Inc.) eklendi.
- 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 595 nm' de absorbans ölçümü yapıldı.
- 6 standardın absorbans ölçümleri kullanılarak Microsoft Office Excel' de konsantrasyon-absorbans eğrisi oluşturuldu. Elde edilen lineer eğrinin denklemi ($y_{\text{cons}} = ax_{\text{abs}} + b$) örneklerdeki protein miktarının (mg/ml) hesaplanmasında kullanıldı.
- Son olarak, örnekler 10 kat dilüe edilmiş olduğu için hesaplanan protein ölçümleri dilüsyon katsayısı ($\times 10$) ile çarpıldı.

SDS-PAGE için jel dökümü

SDS-PAGE için % 6-12 ve % 6-10' luk olmak üzere iki tip jel dökümü yapıldı ve bu amaçla BIO-RAD, Mini protean system, (Hercules, CA, USA) içinde bulunan jel dökme standları ve diğer aparatları kullanıldı. Farklı olarak % 6-10' luk jeller moleküler ağırlığı diğer proteinlere kıyasla daha büyük olan (Çizelge 3.4) FOXO3a için tercih edildi.

Çalışmada kullanılan jellerin çözelti içerikleri 'Kullanılan çözeltiler' bölümünde verilmiştir. Jel dökümünde öncelikle ayırma jelinin (2 jel için 10 ml) çözeltisi hazırlandı. Ayırma jelinin çözeltisine APS ve TEMED eklendikten hemen sonra, karışım iyice temizlenmiş cam plakaların arasına döküldü (yaklaşık 5 ml) ve üzeri distile su ile kaplandı. 45 dk jelin polimerizasyonu için beklendikten sonra jelin yüzeyindeki su dökülüp üzerine yığınlama jeli için hazırlanan çözelti (2 jel için 5 ml) döküldü. Son olarak, yükleme kuyucuklarının oluşturulması için tarak yerleştirildi (1 mm, 15 kuyulu) ve jelin polimerizasyonu için yine 45 dk beklendi.

Jel elektroforezi

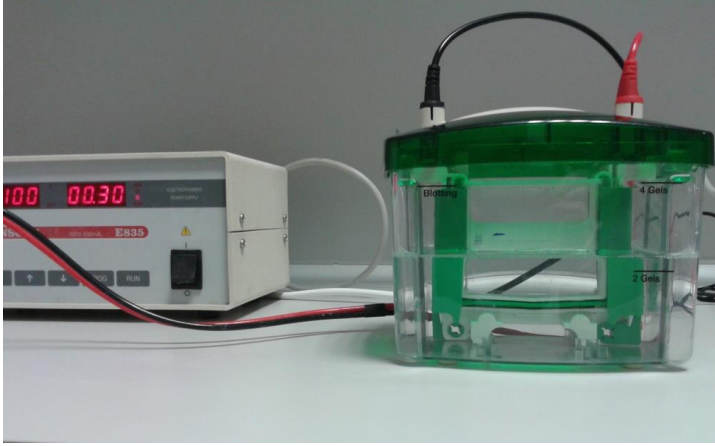
SDS-PAGE öncesinde her bir örnek için, 20 µg proteini (FOXO3a için 40 µg) içerecek şekilde yükleme çözeltileri hazırlandı. Serebral korteks dokusundan hazırlanan ve total protein içeriği 9,1 mg/ml olarak ölçülen bir örneğimizden 20 µg protein yüklemesi yapabilmek için gerekli olan yükleme çözeltisinin içeriği aşağıda örnek olarak verilmiştir:

Örnek yükleme çözeltisi (son hacim 15 µl için):

- Örnek tamponu (sample buffer): (×2) hazırlanmış stoktan 7,5 µl
- Örnek: 2,2 µl [(20 µg protein yüklemek için gerekli volüm = 20 / protein konsantrasyonu) formülü ile hesaplandı ve 2,2 = 20 / 9,1 şeklinde bulundu].
- Distile su: 5,3 µl (yükleme çözeltisinin son hacmini 15 µl' ye tamamlamak için)

Örnekteki hesaplama prensibiyle, her bir örneğin yükleme çözeltisi 0,2 ml' lik eppendorflar içinde hazırlandı ve protein denaturasyonu için 95 °C' de 5 dk kaynatıldı (Eppendorf, Thermomixer Compact). Soğumayı takiben tüm hacim alınarak jel kuyularına yüklendi. Her bir jelin ilk kuyusu genellikle protein standardı (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) için kullanıldı. Moleküler ağırlıkların (kDa) belirlenmesinde referans olacak bu protein standardından herhangi bir işlem yapılmaksızın 3 µl yükleme yapıldı.

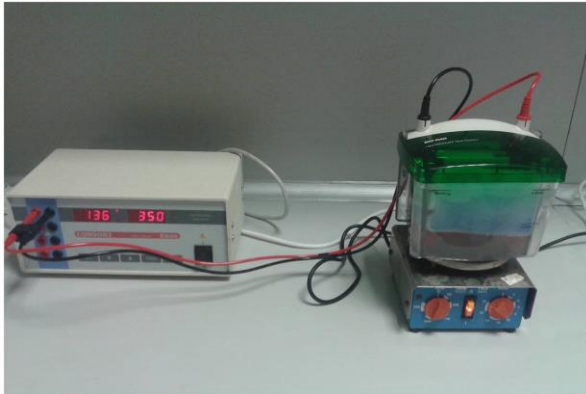
Örneklerin jellere yüklenmesi tamamlandıktan sonra elektroforez tankı (Mini protean system, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) yeterli miktarda yürütme tamponu (running buffer, pH 8,3) ile dolduruldu ve güç kaynağı (Consort E835, Electrophoresis Power Supply) vasıtası ile sabit 100 V' ta yaklaşık 2 saat boyunca elektroforez işlemi sürdürüldü (Resim 3.2).



Resim 3.2. Jel elektroforezi

Proteinlerin membrana transferi (Blotlama)

Elektroforez işlemi ile jel üzerinde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinleri, nitrosellüloz membrana transfer etmek için yine aynı cihazımızın (Mini protean system, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) ıslak-transfer modülü kullanıldı. Islak-transfer modülüne yerleştirilecek transfer kasetinin aparatları, süngerler ve filtre kağıtları elektroforez işleminin tamamlanmasına yakın transfer tamponu içinde ıslatıldı. Nitrosellüloz membran (162-0112, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) ise 1-2 dk distile su içinde ıslatıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra cam plakalar arasındaki jel çıkartılıp önce transfer tamponu içine alındı, akabinde transfer kaseti uygun şekilde hazırlandı (artı kutuptan eksi kutuba doğru sırasıyla; sünger, filtre kağıtları, membran, jel, filtre kağıtları ve sünger). Kasetler transfer modülüne yerleştirilip tank uygun miktarda transfer tamponu ile doldurulduktan sonra güç kaynağı sabit 350 mA ve 1 saat süreye ayarlandı. Bu süre zarfında jelden membrana proteinlerin transferi sağlanmış oldu (Resim 3.3).



Resim 3.3. Transfer işlemi (Blotlama)

İmmunoblotlama (Antikor inkübasyonu)

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membranlar yıkama tamponu olarak kullanılan TBST içinde 5 dk yıkandı. Ardından membranlar yağsız süttozu ile hazırlanan % 5' lik bloklama tamponu içine alındı ve çalkalayıcı üzerinde gece boyu + 4 °C' de inkübe edildi. Bloklama işlemi ile hedef protein için membran üzerindeki non-spesifik bağlanma bölgeleri engellenmiş oldu.

Bloklama işlemini takiben, membranlar çalkalayıcı üzerinde 5 dk süre ile 3 kez TBST içinde yıkandı. Hedef proteinler için seçilen primer antikorların uygun dilüsyonları (Çizelge 3.4) yağsız süt tozu ya da BSA ile hazırlanan % 5' lik antikor tamponuyla yapıldı. Membranların primer antikor ile inkübasyonları çalkalayıcı üzerinde, 1,5 saat süre ile oda sıcaklığında tamamlandı.

Primer antikor ile inkübasyonu tamamlanan membranlar yine 5 dk süre ile 3 kez yıkandı. HRP (horseradish peroxidase)-konjuge seçilen sekonder antikorlar, yağsız süt tozu ile hazırlanan % 5' lik antikor tamponuyla uygun oranlarda dilüe edildi (Çizelge 3.4) ve membranların sekonder antikor inkübasyonları çalkalayıcı üzerinde, 1,5 saat süre ile oda sıcaklığında yapıldı. Sekonder antikor inkübasyonları tamamlandıktan sonra membranlar son kez 5 dk süre ile 3 defa yıkandı.

Görüntüleme ve analiz

İmmunoblotlama aşamalarının ardından membran üzerindeki hedef protein bantlarının görünür hale getirilmesi için önce kemilüminesans çalışma kiti kullanıldı (ECL Western Blotting Substrate, Pierce™ (Thermo Sci.), IL, USA). Kit içinde bulunan iki tampon membran yüzeyini kaplayacak miktarda, 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. Membran yüzeyi bu tampon karışımıyla kaplanıp 1 dk inkübe edildi. Hemen ardından karanlık odada, hedef bantların medikal X-ray film üzerinde görünür hale gelmesi sağlandı.

X-ray filmler 600 dpi' de taranıp görüntüler TIF formatında kaydedildi. Bant yoğunluklarının hesaplanmasında ücretsiz erişimi sunulan Image J programı kullanıldı (Windows version of NIH Image, <http://rsb.info.nih.gov/niH-image/>). Son olarak,

araştırılan her bir hedef proteinin bant yoğunluğu yükleme kontrolü olarak seçilen β -aktine oranlanarak standardize edildi.

3.2.3. Sandviç ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi

Serebral korteks ve hipokampus doku örneklerinde FOXO3a ve SIRT2 protein miktarlarının kantitatif ölçümü için ticari ELISA kitleri (Rat Forkhead Box O3A (FOXO3A) ELISA Kit- MBS9305817, MyBioSource, Inc., CA, USA; Rat Sirt2 ELISA Kit-ER0299, Wuhan Fine Biological Tech., Wuhan, CHINA) kullanıldı.

Kitlerin çalışma prensibi sandviç ELISA yöntemi esaslarına dayanmaktadır ve kitlerin çalışılmasında imalatçının önerdiği protokol referans alındı. ELISA için doku homojenatlarının hazırlanmasında SDS-PAGE / Western blot yönteminde anlatılan örnek hazırlama aşamaları takip edildi. Elde edilen ELISA sonuçları Bradford metodu ile hesaplanan total protein miktarlarına oranlanarak standardize edildi ve sonuçlar FOXO3a için pg/mg protein, SIRT2 için ng/mg protein şeklinde ifade edildi.

FOXO3a ELISA

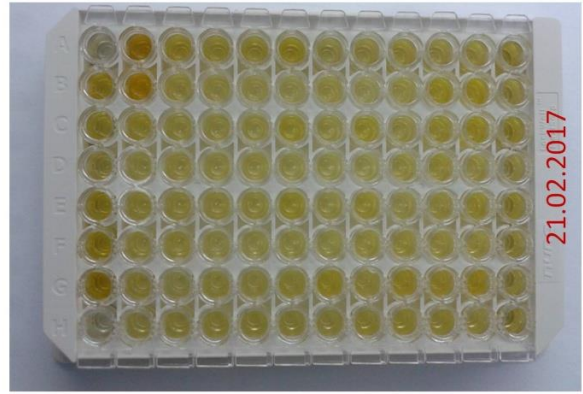
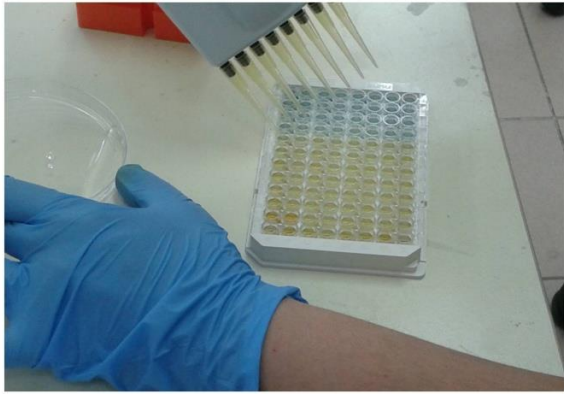
Kit içeriği

- FOXO3a antikoru yüklü 96 kuyulu mikrolaka
- Direkt kullanıma hazır 6 adet standart (1000 – 31,2 pg /ml)
- Örnek dilüsyon tamponu
- HRP-konjuge tampon
- Yıkama tamponu ($\times 20$)
- Durdurucu (stop) solüsyon
- Kromojen solüsyonu A
- Kromojen solüsyonu B

Yöntem

Kit içeriğindeki malzemeler oda sıcaklığına getirilip, konsantre sunulan solüsyonların uygun dilüsyonları yapıldıktan sonra sırasıyla;

- Standartlar ve örneklerden 50 µl kuyulara yükleme yapıldı.
- Tüm kuyulara 100 µl HRP-konjuge tampondan eklendi ve 37 °C' de 60 dk inkübe edildi.
- Mikrolakanın tüm kuyuları aspire edilip, 4 kez yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyulara 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B eklendi ve plaka ışıktan korunarak 37 °C' de 15 dk inkübe edildi.
- En son tüm kuyulara 50 µl stop solüsyonu eklenip plaka dikkatlice çalkalandı. Bu esnada maviden sarıya dönüşen renk değişimi izlendi (Resim 3.4)
- 5 dk içinde 450 nm' de absorbands okuması yapıldı.



Resim 3.4. FOXO3a ELISA uygulaması

Hesaplama

Kit içeriğinde sunulan standartların konsantrasyon değerleri ile absorbands ölçümleri kullanılarak elde edilen eğrinin denklemi örneklerdeki FOXO3a konsantrasyonun hesaplanmasında kullanıldı. Hesaplama sonucu pg/ml cinsinden elde edilen veriler, örneklerin total protein miktarlarına (mg/ml) oranlanarak standardize edildi ve pg/mg protein şeklinde ifade edildi.

SIRT2 ELISA

Kit içeriği

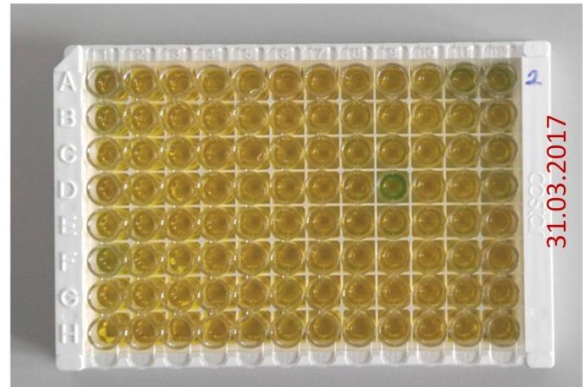
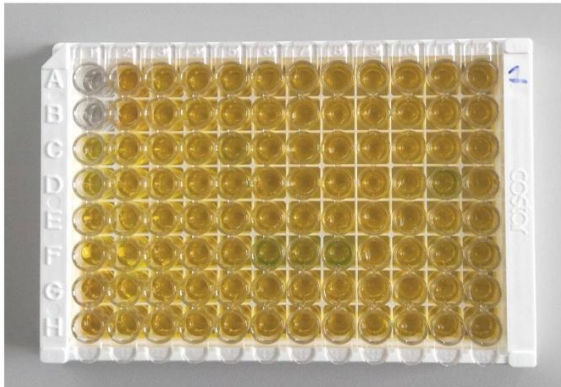
- SIRT2 antikoru yüklü 96 kuyulu mikrolaka
- Liyofilize standart (20 ng/ml)

- Örnekler ve standartlar için dilüsyon tamponu
- Biotin-tespit antikoru (konsantre) ve dilüsyon tamponu
- HRP-Streptavidin Konjugatı (SABC) (konsantre) ve dilüsyon tamponu
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substratı
- Durdurucu (stop) solüsyon
- Yıkama tamponu ($\times 25$)

Yöntem

Kit içeriğindeki malzemeler oda sıcaklığına getirilip, konsantre sunulan solüsyonların uygun dilüsyonları yapıldıktan sonra sırasıyla;

- Yükleme öncesi mikroplakanın tüm kuyuları 2 kez yıkama tamponu ile yıkandı.
- Standartlar ve örneklerden 100 μ l kuyulara yükleme yapıldı ve 37 °C' de 90 dk inkübe edildi.
- Tüm kuyulara 100 μ l biotin-tespit antikoru eklendi ve 37 °C' de 60 dk inkübe edildi.
- Mikroplakanın tüm kuyuları aspire edilip, 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyulara 100 μ l SABC solüsyonu eklendi ve 37 °C' de 30 dk inkübe edildi.
- Mikroplakanın tüm kuyuları aspire edilip, 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyulara 90 μ l TMB substratı eklendi ve plaka ışıktan korunarak 37 °C' de 15-30 dk inkübe edildi.
- En son tüm kuyulara 50 μ l stop solüsyonu eklenip plaka dikkatlice çalkalandı. Bu esnada maviden sarıya dönüşen renk değişimi izlendi (Resim 3.5).
- Hemen 450 nm' de absorbans okuması yapıldı.



Resim 3.5. SIRT2 ELISA uygulaması

Hesaplama

Hesaplama prensibi FOXO3a ELISA için yapılan hesaplamayla benzerdir. Farklı olarak bu kitin hassasiyeti ng/ml düzeyinde olduğu için sonuçlar ng/mg protein şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.4. Dokuda total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) tayini

Serebral korteks ve hipokampus dokularında oksidatif stres düzeyinin belirlenmesi için total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) ölçümleri uygun ticari kitlerin (RL0024, RL0017, Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, TURKEY) kullanımı ile yapıldı. Ayrıca TOS ve TAS ölçümleri kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı.

Doku homojenizasyonu

TOS ve TAS tayinlerinde kullanılmak üzere serebral korteks ve hipokampus dokuları 1:9 (w/v) oranında 140 mM KCl tamponu (pH 7,4) içinde ve buzlu ortamda doku homojenizatörü vasıtasıyla homojenize edildi. Doku homojenatları 3.000 rpm, + 4 °C’ de, 5 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar - 80°C’ de muhafaza edildi.

TOS tayini

Kitin çalışma prensibi

Örnek içinde bulunan oksidanlar, ferröz iyon-şelatlayıcı kompleksi ferrik iyonla okside eder. Ferrik iyon, asidik ortamda kromojenle birlikte renkli bir kompleks oluşturur. Renk yoğunluğu, örnek içindeki oksidan moleküllerin toplam miktarı ile orantılır ve spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Elde edilen ölçümlerin kalibrasyonu, 10 µmol H₂O₂ Equiv./L ile yapılır ve ölçümler µmol H₂O₂ Equiv./L olarak ifade edilir.

Kit içeriği

- Tampon 1 (T1): H₂SO₄ (25 mM, pH 1,75)
- Tampon 2 (T2): H₂SO₄ (25 mM, pH 1,75), Ferröz iyon (5 mM), O-dianisidine (10 mM)

- Standart (SSS: Stabilize Standart Solüsyonu): 10 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L

Yöntem

Kitin çalışılmasında imalatçının önerdiği protokol ve ilgili literatür referans alınmıştır (Erel, 2005). Sırasıyla;

- Mikroplaka üzerindeki kuyucuklara 35 μl deiyonize su, 35 μl standart, 35 μl örnekler konuldu.
- Hepsinin üzerine 225 μl T1 eklenip, mikroplaka 30 sn süre ile dikkatlice çalkalandı.
- 595 nm' de ilk spektrofotometrik okuma yapıldı (A1).
- Hemen ardından kuyulara 11 μl T2 eklenip oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- 595 nm' de ikinci spektrofotometrik okuma yapıldı (A2) (Resim 3.6).

Hesaplama

- $A2 - A1 = \Delta\text{abs}$ (standart veya örnek)
- $\text{Sonuç} = (\Delta\text{abs Örnek}) / \Delta\text{abs Standart} \times \text{SSS konsantrasyonu}$
- Birim = $\mu\text{mol/L}$
- (SSS konsantrasyonu = 10 $\mu\text{mol/L}$)

Bu kitin çalışılmasında deiyonize suyun absorbens ölçümü yapılır ancak hesaplamada kullanılmaz. Suyun kullanım amacı kitin kontrolüdür ve absorbens değeri 0,500' ün üzerinde olduğu takdirde kit kullanılmamalıdır.

TAS tayini

Kitin çalışma prensibi

Örnek içinde bulunan antioksidanlar, koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radikalini soluk/renksiz ABTS formuna indirger ve 660 nm' deki absorbens değişimi örnekteki total antioksidan düzeyi ile ilişkilir. Elde edilen ölçümlerin kalibrasyonu, stabil bir antioksidan standart solüsyonu olan Trolox

Eşdeğeri (Vitamin E analogu, 1 mmol/L) kullanılarak yapılır ve ölçümler mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edilir.

Kit içeriği

- Tampon 1 (T1): Asetat Tamponu (0,4 mol/L, pH 5,8)
- Tampon 2 (T2): ABTS (30 mmol/L)
- Standart: Trolox (1 mmol/L)

Yöntem

Kitin çalışılmasında imalatçının önerdiği protokol ve ilgili literatür referans alınmıştır (Erel, 2004). Sırasıyla;

- Mikroplaka üzerindeki kuyucuklara 5 µl deiyonize su, 5 µl standart, 5 µl örnekler konuldu.
- Hepsinin üzerine 225 µl T1 eklenip, mikroplaka 30 sn süre ile dikkatlice çalkalandı.
- 660 nm' de ilk spektrofotometrik okuma yapıldı (A1).
- Hemen ardından kuyulara 20 µl T2 eklenip oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- 660 nm' de ikinci spektrofotometrik okuma yapıldı (A2) (Resim 3.6).

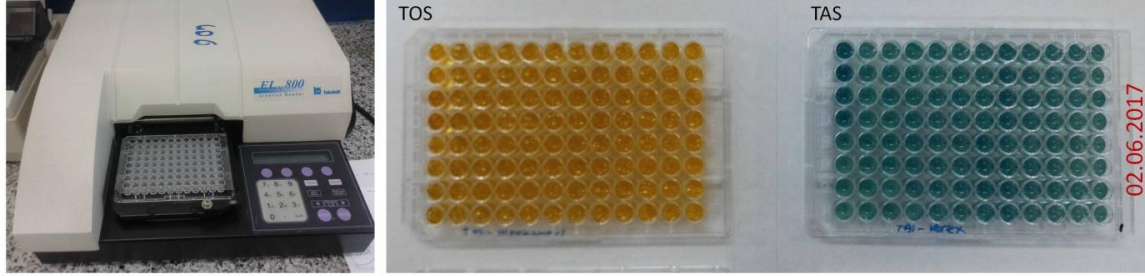
Hesaplama

- $A2 - A1 = \Delta_{abs}$ (su, standart veya örnek)
- $Sonuç = [(\Delta_{abs} Su) - (\Delta_{abs} Örnek)] / [(\Delta_{abs} Su) - (\Delta_{abs} Standart)]$
- Birim = mmol/L

Oksidatif stres indeksinin (OSI) hesaplanması

Oksidatif stres düzeyinin göstergesi olarak kabul edilen oksidatif stres indeksi (OSI), TOS değerlerinin TAS değerlerine oranlanması ile bulunan birimsiz (AU: arbitrary unit) bir parametredir. Hesaplama önce TAS birimi (mmol Trolox Equiv./L), µmol Trolox Equiv./L şekline dönüştürüldü ve $OSI = [(TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) / (TAS, \mu\text{mol Trolox Equiv./L})]$

Equiv./L) $\times 100$] formülü kullanılarak hesaplama yapıldı (Yanik, Erel, & Kati, 2004) (Deska et al., 2017).



Resim 3.6. TOS ve TAS tayini

3.2.5. Kullanılan istatistiksel yöntem

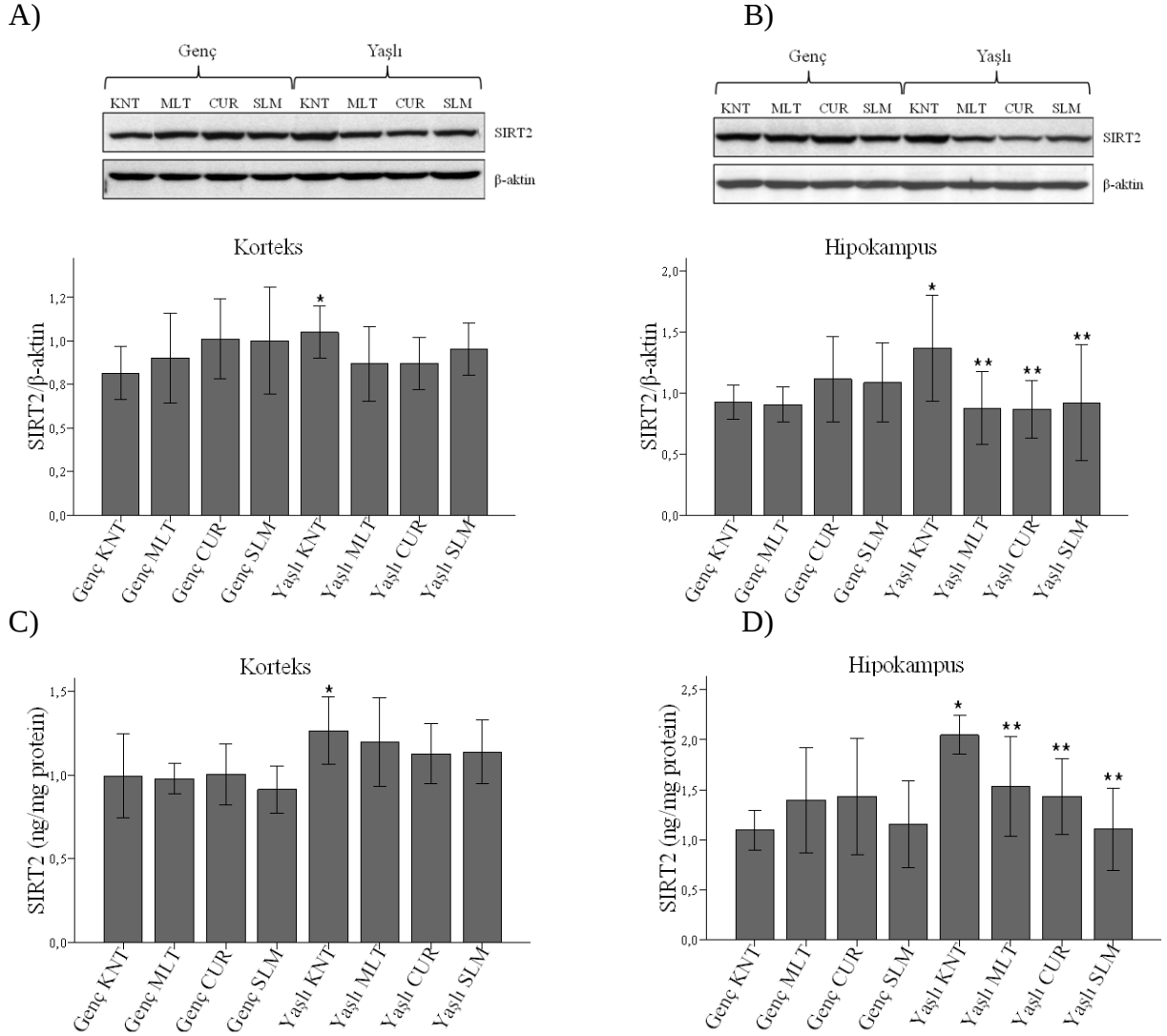
Çalışmamızdaki verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 15.0 for Windows” programı kullanıldı. Yaşın ve eksojen uygulanan maddelerin etkisini incelemek için 2 (Yaş: Genç - Yaşlı) $\times$ 4 (Madde: PBS - Melatonin - Curcumin - Salermide) faktörlü gruplarası ANOVA deseni oluşturuldu. Gruplararası farkları incelemek için LSD testi yapıldı. Serebral korteks ve hipokampus dokuları arasındaki farklılaşmaları incelemek için paired-sample t testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde Pearson r’si hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. SIRT2 ekspresyonlarındaki değişimler

Western blot sonuçlarına göre genç kontrol grubuna kıyasla yaşlı kontrol grubundaki sıçanların serebral korteks ve hipokampus dokularında SIRT2 protein ekspresyonlarının (SIRT2/ β -aktin) anlamlı olarak arttığı, yaşlı grupta melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının ise yaşlı kontrollere kıyasla hipokampus dokusunda SIRT2 ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 4.1 A, B) (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Yaşlı grupta melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının korteks SIRT2 ekspresyonuna anlamlı düzeyde etkisi izlenmedi. Ayrıca gençlerde melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının genç kontrollere kıyasla her iki beyin bölgesinde de anlamlı bir etki oluşturmadağı görüldü.

ELISA yöntemi ile ölçülen SIRT2 (ng/mg protein) sonuçları ile western blot sonuçları arasında pozitif yönde korelasyon olduğu görüldü ($r = 0,267$; $p = 0,011$) ve ELISA sonuçlarına göre de yaşlanma ile her iki beyin bölgesinde SIRT2 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunurken, yaşlanmada melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının hipokampusta SIRT2 düzeyini anlamlı olarak azalttığı bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 4.1 C, D) (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Ayrıca, ELISA sonuçlarına göre korteks ve hipokampus SIRT2 düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon olduğu görüldü ($r = 0,309$; $p = 0,039$).



Şekil 4.1. SIRT2 ekspresyonlarındaki değişimler

*Western blot yöntemi ile gösterilen (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularına ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktine oranlanarak (SIRT2/β-aktin) standardize edilmiştir (Her bir grup için n = 6). Sandviç ELISA yöntemi ile ölçülen (C) serebral korteks ve (D) hipokampus SIRT2 düzeyleri (ng/ml) ise Bradford yöntemi ile tayin edilen total protein düzeylerine (mg/ml) oranlanarak standardize edilmiş ve ng/mg protein şeklinde ifade edilmiştir (Her bir grup için n = 6). *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir. (KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermide)

4.2. FOXO3a ekspresyonlarındaki değişimler

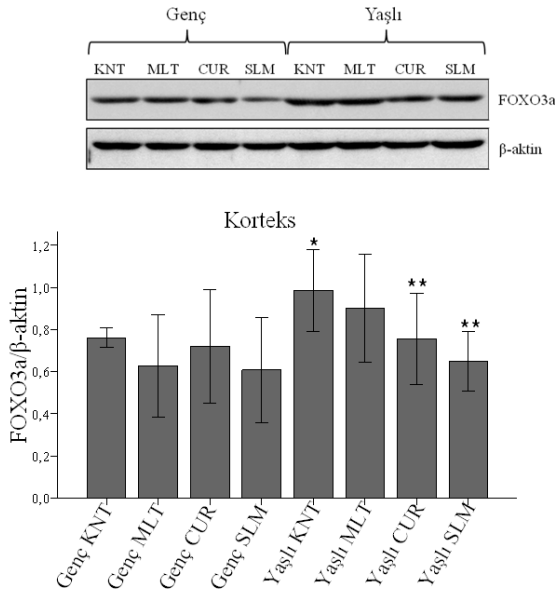
Western blot sonuçları serebral korteks ve hipokampus FOXO3a ekspresyonlarının pozitif yönde korelasyon gösterdiğini ($r = 0,468$; $p = 0,002$) ve yaşlanma ile her iki beyin bölgesinde de FOXO3a ekspresyonlarının (FOXO3a/β-aktin) anlamlı olarak arttığını gösterdi ($p < 0,05$) (Şekil 4.2 A, B) (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Yaşlı kontrol grubuna kıyasla, yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının hipokampusta; curcumin ve salermide

uygulamalarının ise kortekste FOXO3a düzeyini anlamlı olarak azalttığı görüldü ($p < 0,05$). Ayrıca gençlerde melatonin uygulamasının genç kontrol grubuna kıyasla hipokampus FOXO3a ekspresyonunu anlamlı olarak azaltmada etkili olduğu görüldü ($p < 0,05$). Genç gruplarda ise korteks FOXO3a ekspresyonlarında anlamlı farklılaşma izlenmedi.

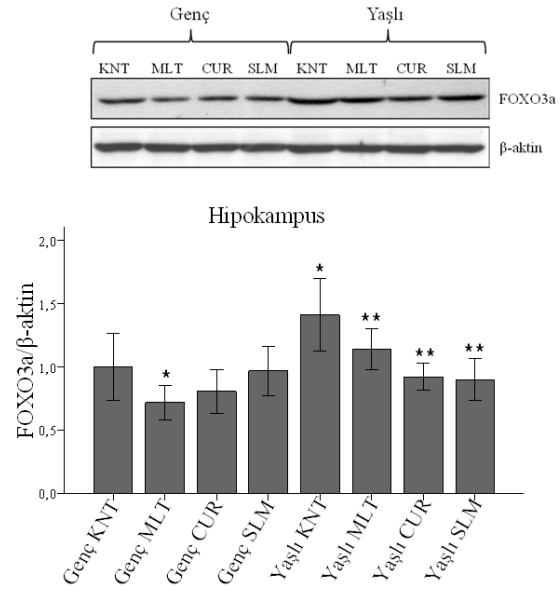
SIRT2' de olduğu gibi FOXO3a için de Western blot (FOXO3a/ β -aktin) ve ELISA (pg/mg protein) sonuçları arasında pozitif yönde korelasyon bulundu ($r = 0,361$; $p = 0,001$). ELISA sonuçlarına göre kortekste yaşlanma ile FOXO3a düzeyinin anlamlı olarak arttığı, yaşlılarda curcumin ve salermide uygulamalarının ise bu etkiyi tersine çevirdiği görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 4.2 C) (Çizelge 4.1). Ayrıca gençlerde salermide uygulamasının genç kontrole kıyasla korteks FOXO3a düzeyini azaltmada etkili olduğu bulundu ($p < 0,05$). Kontrol ve deney gruplarının hipokampus FOXO3a protein düzeylerinde ise anlamlı farklılaşma saptanmadı (Şekil 4.2 D) (Çizelge 4.2).

ELISA sonuçları serebral kortekse kıyasla hipokampusta SIRT2 ve FOXO3a protein düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$). Ayrıca hem ELISA hem de Western blot sonuçlarına göre SIRT2 ve FOXO3a arasında pozitif yönde korelasyon saptanmıştır. (ELISA sonuçları için $r = 0,392$; $p < 0,001$, Western blot sonuçları için $r = 0,417$; $p < 0,001$).

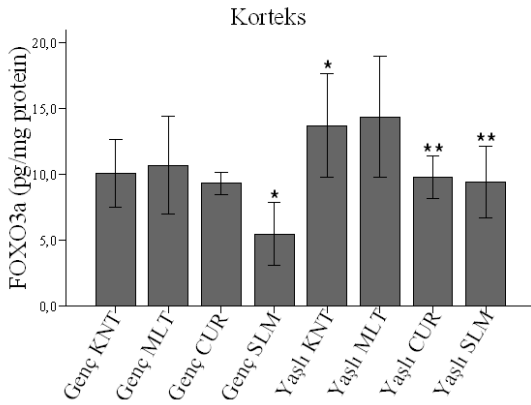
A)



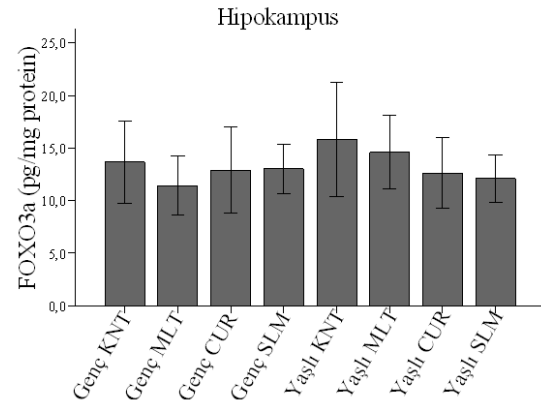
B)



C)



D)



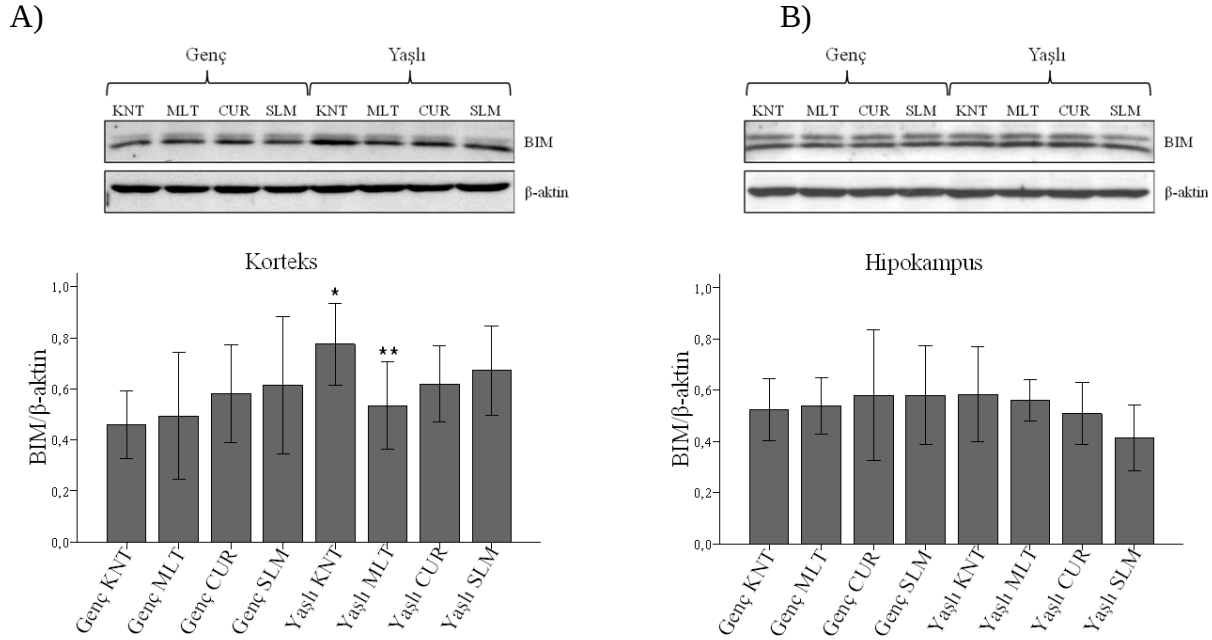
Şekil 4.2. FOXO3a ekspresyonlarındaki değişimler

*Western blot yöntemi ile gösterilen (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularına ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β -aktine oranlanarak (FOXO3a/ β -aktin) standardize edilmiştir (Her bir grup için n = 6). Sandviç ELISA yöntemi ile ölçülen (C) serebral korteks ve (D) hipokampus FOXO3a düzeyleri (pg/ml) ise Bradford yöntemi ile tayin edilen total protein düzeylerine (mg/ml) oranlanarak standardize edilmiş ve pg/mg protein şeklinde ifade edilmiştir (Her bir grup için n = 6). *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla p < 0,05 düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir. (KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermide)

4.3. BIM ekspresyonlarındaki değişimler

Her iki beyin bölgesinde BIM ekspresyonları (BIM/ β -aktin) ile FOXO3a (FOXO3a/ β -aktin) ekspresyonları pozitif yönde korele bulundu (Korteks için r = 0,576; p < 0,001, hipokampus için r = 0,323; p = 0,033). Yaşlanma ile serebral kortekste BIM ekspresyonlarının anlamlı olarak artarken, yaşlılarda melatonin uygulamasının bu etkiyi anlamlı olarak tersine çevirdiği görüldü (p < 0,05) (Şekil 4.3 A) (Çizelge 4.1). Yine serebral kortekste BIM ile BAX arasında

pozitif yönde; BIM ile BCL-2/BAX oranı arasında negatif yönde korelasyon saptandı (sırasıyla, $r = 0,570$; $p < 0,001$, $r = -0,432$; $p = 0,005$). Hipokampusta ise kontrol ve deney grupları arasında anlamlı düzeyde farklılaşma saptanmadı (Şekil 4.3 B) (Çizelge 4.2).



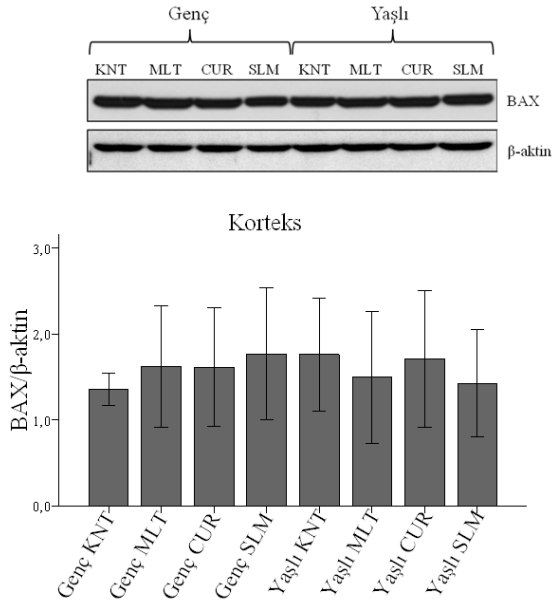
Şekil 4.3. BIM ekspresyonlarındaki değişimler

*Western blot yöntemi ile gösterilen (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularına ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktine oranlanarak (BIM/β-aktin) standardize edilmiştir (Her bir grup için n = 6). *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir. (KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermide)

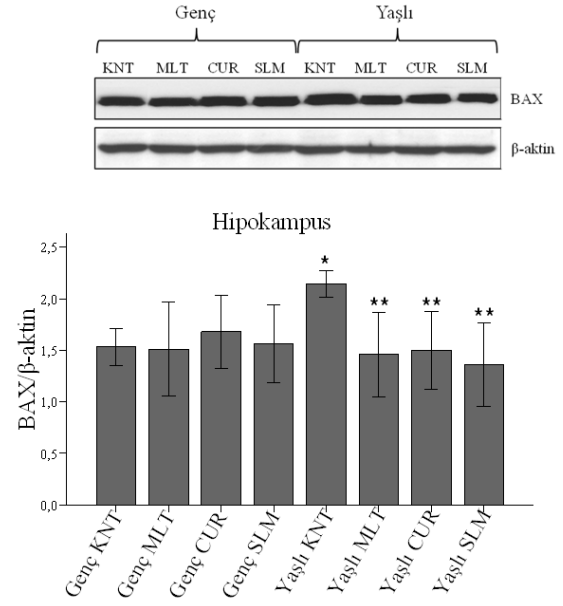
4.4. BAX ekspresyonlarındaki değişimler

BAX ekspresyonları (BAX/β-aktin) açısından serebral kortekste gruplar arası anlamlı farklılaşma izlenmezken (Şekil 4.4 A) (Çizelge 4.1), hipokampusta yaşlanma ile BAX ekspresyonlarının anlamlı olarak arttığı, yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının ise BAX ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 4.4 B) (Çizelge 4.2). Genç kontrol grubuna kıyasla genç deney gruplarının hipokampus BAX ekspresyonlarında anlamlı farklılaşma görülmedi.

A)



B)

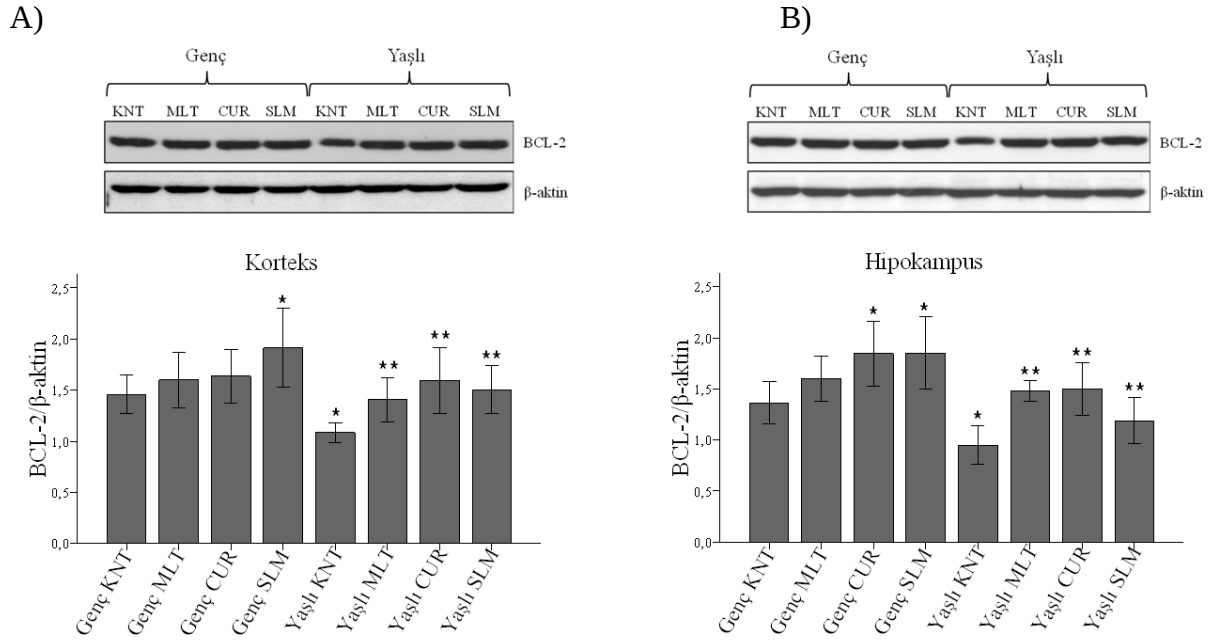


Şekil 4.4. BAX ekspresyonlarındaki değişimler

*Western blot yöntemi ile gösterilen (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularına ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktine oranlanarak (BAX/β-aktin) standardize edilmiştir (Her bir grup için n = 6). *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir. (KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermide)

4.5. BCL-2 ekspresyonlarındaki değişimler

BCL-2 ekspresyonları açısından her iki beyin bölgesi arasında (BCL-2/β-aktin) pozitif yönde korelasyon saptandı ($r = 0,473$; $p = 0,001$) ve yaşlanma ile yine her iki beyin bölgesinde BCL-2 ekspresyonlarının anlamlı olarak azaldığı, buna karşılık yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının BCL-2 ekspresyonlarını anlamlı olarak arttırdığı görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 4.5) (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Ayrıca, genç kontrol grubuna kıyasla genç sıçanlarda salermide uygulamasının her iki beyin bölgesinde, curcumin uygulamasının ise sadece hipokampusta olmak üzere BCL-2 ekspresyonunu anlamlı olarak arttırdığı görüldü ($p < 0,05$). Genç sıçanlarda melatonin uygulamasının ise anlamlı düzeyde etkisi görülmedi.



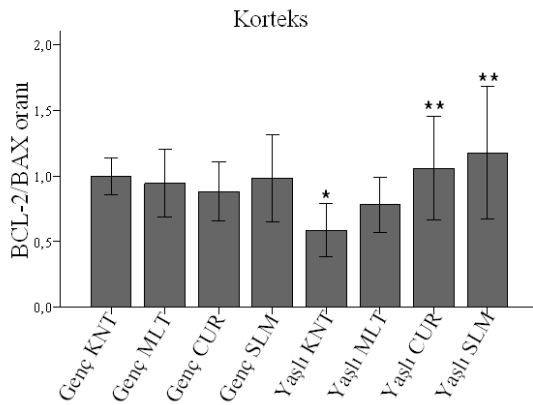
Şekil 4.5. BCL-2 ekspresyonlarındaki değişimler

*Western blot yöntemi ile gösterilen (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularına ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktine oranlanarak (BCL-2/β-aktin) standardize edilmiştir (Her bir grup için n = 6). *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir. (KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermide)

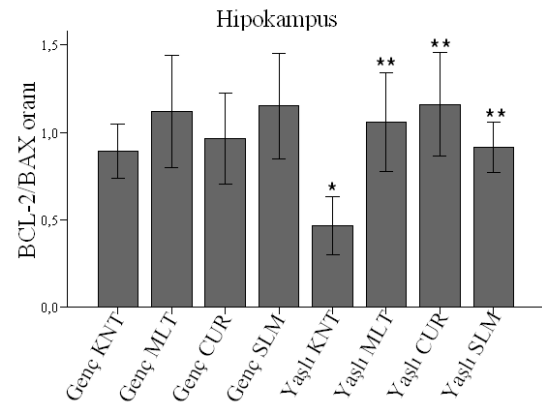
4.6. BCL-2/BAX oranındaki değişimler

BCL-2/BAX oranı açısından da her iki beyin bölgesi arasında pozitif yönde korelasyon saptandı ($r = 0,531$; $p < 0,001$). Yaşlanma ile her iki beyin bölgesinde BCL-2/BAX oranının anlamlı olarak azaldığı, yaşlı sıçanlarda curcumin ve salermide uygulamalarının her iki beyin bölgesinde, melatonin uygulamasının ise sadece hipokampusta BCL-2/BAX oranını anlamlı olarak arttırmada etkili olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 4.6) (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Genç kontrol ve genç deney grupları arasında her iki beyin bölgesi için de anlamlı farklılaşma saptanmadı.

A)



B)



Şekil 4.6. BCL-2/BAX oranındaki değişimler

*Western blot yöntemi ile (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularından elde edilen BCL-2 ve BAX ekspresyon sonuçları birbirine oranlanmış ve BCL-2/BAX oranı şeklinde ifade edilmiştir (Her bir grup için n = 6) *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir. (KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermide)

4.7. TOS, TAS ve OSI değişimleri

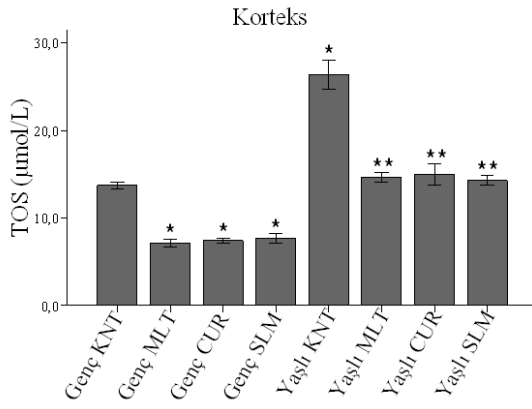
Yaşlanma ile her iki beyin bölgesinde TOS düzeylerinin anlamlı olarak arttığı buna karşılık, genç ve yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının TOS düzeylerini anlamlı olarak azalttığı bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 4.7 A-B) (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Her iki beyin bölgesinde TOS ile TAS düzeylerinin negatif yönde korelasyon gösterdiği (Korteks için $r = -0,545$; $p < 0,001$, hipokampus için $r = -0,576$; $p < 0,001$) ve TOS'un aksine yaşlanma ile TAS düzeylerinin her iki beyin bölgesinde de anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p < 0,05$) (Şekil 4.7. C-D). Buna karşılık, yaşlı sıçanlarda melatonin ve salermide uygulamalarının her iki beyin bölgesinde, curcumin uygulamasının ise sadece hipokampusta etkili olmak üzere TAS düzeylerini anlamlı olarak arttırdığı görüldü ($p < 0,05$).

Oksidatif stres düzeyinin göstergesi kabul edilebilen OSI değerleri her iki beyin bölgesi içinde $OSI = [(TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) / (TAS, \mu\text{mol Trolox Equiv./L}) \times 100]$ şeklinde hesaplandı ve her iki beyin bölgesinde OSI değerlerinin yaşlanma ile anlamlı olarak arttığı görüldü ($p < 0,05$). Buna karşılık, hem genç hem de yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının yine her iki beyin bölgesinde OSI değerlerini anlamlı olarak azaltmada etkili olduğu bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 4.7. E-F).

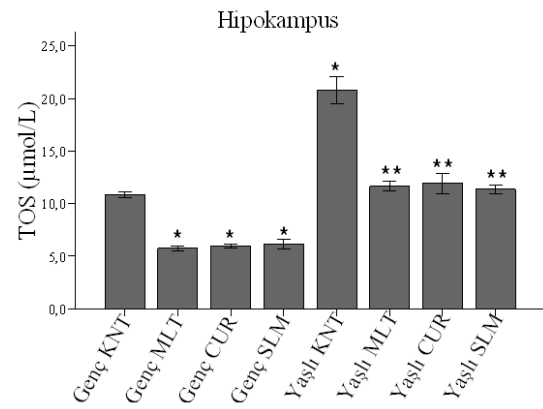
İki beyin bölgesi TOS, TAS, OSI değerleri açısından kıyaslandığında TOS ve OSI değerleri serebral kortekste, TAS değerleri ise hipokampusta anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p <$

0,05). Ayrıca, serebral kortekste OSI düzeyleri ile FOXO3a, SIRT2 ve BIM ekspresyonları arasında pozitif yönde; OSI düzeyleri ile BCL-2 ve BCL-2/BAX oranı arasında negatif yönde korelasyon saptandı (sırasıyla, $r = 0,401$; $p = 0,006$, $r = 0,450$; $p = 0,002$, $r = 0,405$; $p = 0,006$, $r = -0,598$; $p < 0,001$, $r = -0,389$; $p = 0,014$). Hipokampusta ise OSI düzeyleri ile FOXO3a, SIRT2 ve BAX ekspresyonları arasında pozitif yönde; OSI düzeyleri ile BCL-2 ve BCL-2/BAX oranı arasında negatif yönde korelasyon saptandı (sırasıyla, $r = 0,744$; $p < 0,001$, $r = 0,482$; $p = 0,001$, $r = 0,448$; $p = 0,003$, $r = -0,641$; $p < 0,001$, $r = -0,605$; $p = 0,014$).

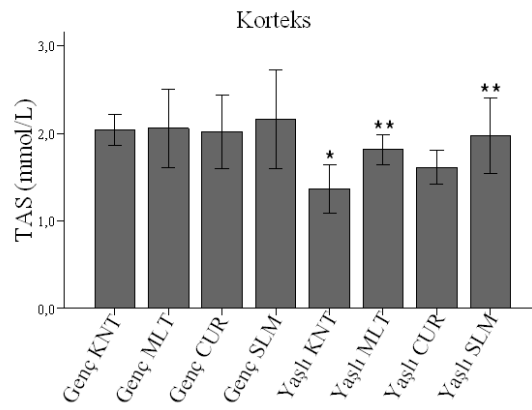
A)



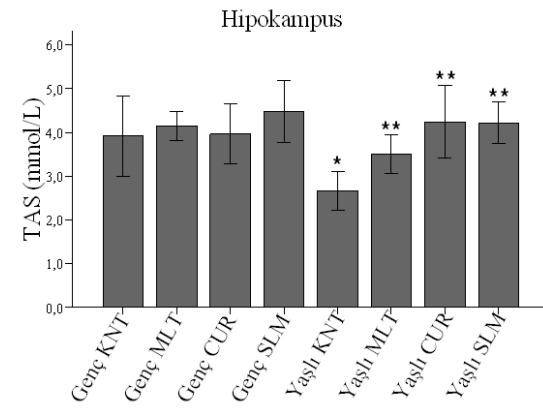
B)



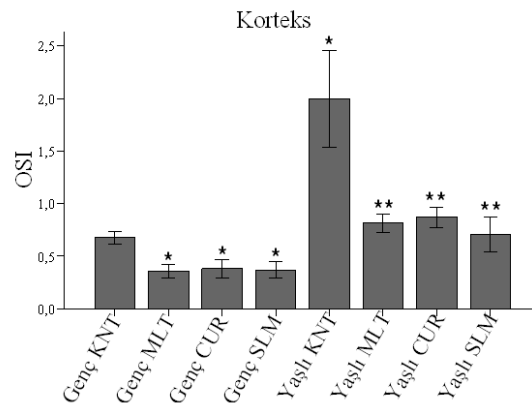
C)



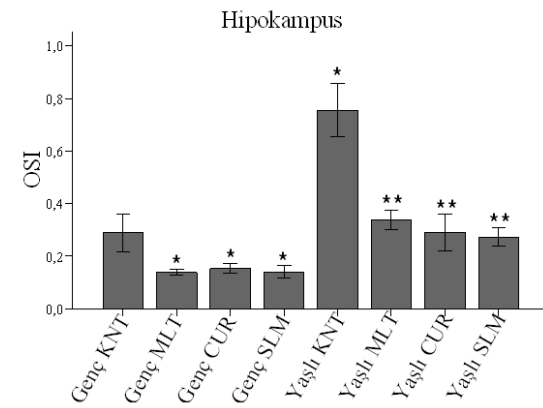
D)



E)



F)



Şekil 4.7. TOS, TAS ve OSI değişimleri

*(A, B) Her iki beyin bölgesi için de ölçülen total oksidan seviyeler (TOS) $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L olarak; (C, D) total antioksidan seviyeler (TAS) ise mmol Trolox Equiv./L olarak verilmiştir. Ayrıca (E, F) her iki beyin bölgesi için $\text{OSI} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol Trolox Equiv./L}) \times 100]$ formülü kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır. (Her bir grup için $n = 6$) *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir. (KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermide)

Çizelge 4.1. Genç ve yaşlı grupların serebral korteks dokularına ait bulgular

SEREBRAL KORTEKS	GENÇ				YAŞLI			
	Kontrol	Melatonin	Curcumin	Salermid	Kontrol	Melatonin	Curcumin	Salermid
SIRT2 (ng/mg protein)	1,00 ± 0,24	0,98 ± 0,09	1,01 ± 0,18	0,91 ± 0,13	1,27 ± 0,19 *	1,20 ± 0,25	1,13 ± 0,17	1,14 ± 0,18
SIRT2/β-aktin	0,81 ± 0,12	0,90 ± 0,21	1,01 ± 0,22	1,00 ± 0,29	1,05 ± 0,14 *	0,87 ± 0,2	0,87 ± 0,14	0,95 ± 0,14
FOXO3a (pg/mg protein)	10,07 ± 2,48	10,69 ± 3,55	9,31 ± 0,82	5,44 ± 2,28 *	13,72 ± 3,77 *	14,36 ± 4,39	9,75 ± 1,55 **	9,40 ± 2,6 **
FOXO3a/β-aktin	0,76 ± 0,04	0,63 ± 0,19	0,72 ± 0,26	0,61 ± 0,2	0,99 ± 0,18 *	0,90 ± 0,24	0,76 ± 0,21 **	0,65 ± 0,11 **
BIM/β-aktin	0,46 ± 0,13	0,49 ± 0,24	0,58 ± 0,18	0,62 ± 0,26	0,78 ± 0,15 *	0,53 ± 0,14 **	0,62 ± 0,14	0,67 ± 0,17
BAX/β-aktin	1,36 ± 0,15	1,62 ± 0,67	1,62 ± 0,66	1,77 ± 0,62	1,76 ± 0,53	1,50 ± 0,62	1,71 ± 0,76	1,43 ± 0,5
BCL-2/β-aktin	1,46 ± 0,18	1,60 ± 0,26	1,64 ± 0,25	1,91 ± 0,31 *	1,09 ± 0,09 *	1,41 ± 0,2 **	1,59 ± 0,31 **	1,51 ± 0,22 **
BCL-2/BAX oranı	1,00 ± 0,13	0,94 ± 0,21	0,88 ± 0,14	0,98 ± 0,31	0,59 ± 0,13 *	0,78 ± 0,17	1,06 ± 0,38 **	1,18 ± 0,41 **
TOS (μmol H ₂ O ₂ Equiv./L)	13,73 ± 0,34	7,13 ± 0,42 *	7,44 ± 0,27 *	7,67 ± 0,55 *	26,37 ± 1,86 *	14,68 ± 0,52 **	14,99 ± 1,18 **	14,3 ± 0,5 **
TAS (mmol Trolox Equiv./L)	2,04 ± 0,17	2,06 ± 0,43	2,02 ± 0,4	2,16 ± 0,54	1,37 ± 0,26 *	1,82 ± 0,16 **	1,61 ± 0,19	1,97 ± 0,41 **
OSI	0,68 ± 0,06	0,36 ± 0,06 *	0,38 ± 0,08 *	0,37 ± 0,08 *	2 ± 0,44 *	0,82 ± 0,08 **	0,87 ± 0,08 **	0,7 ± 0,13 **

Her bir gruba ait veriler ortalama ± standart deviasyon şeklinde verilmiştir.

*Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir.

Çizelge 4.2. Genç ve yaşlı grupların hipokampus dokularına ait bulgular

HİPOKAMPUS	GENÇ				YAŞLI			
	Kontrol	Melatonin	Curcumin	Salermid	Kontrol	Melatonin	Curcumin	Salermid
SIRT2 (ng/mg protein)	1,10 ± 0,19	1,40 ± 0,42	1,43 ± 0,47	1,16 ± 0,41	2,05 ± 0,18 *	1,54 ± 0,47 **	1,43 ± 0,36 **	1,11 ± 0,33 **
SIRT2/β-aktin	0,93 ± 0,13	0,91 ± 0,14	1,12 ± 0,33	1,09 ± 0,31	1,37 ± 0,41 *	0,88 ± 0,29 **	0,87 ± 0,22 **	0,92 ± 0,46 **
FOXO3a (pg/mg protein)	13,66 ± 3,16	11,43 ± 2,7	12,89 ± 3,92	13,01 ± 1,91	15,85 ± 4,39	14,59 ± 3,33	12,63 ± 3,22	12,10 ± 2,14
FOXO3a/β-aktin	1,00 ± 0,25	0,72 ± 0,13 *	0,81 ± 0,14	0,97 ± 0,16	1,41 ± 0,27 *	1,14 ± 0,16 **	0,92 ± 0,1 **	0,90 ± 0,13 **
BIM/β-aktin	0,53 ± 0,12	0,54 ± 0,1	0,58 ± 0,21	0,58 ± 0,16	0,58 ± 0,18	0,56 ± 0,07	0,51 ± 0,12	0,41 ± 0,1
BAX/β-aktin	1,53 ± 0,17	1,51 ± 0,43	1,68 ± 0,29	1,56 ± 0,31	2,14 ± 0,1 *	1,46 ± 0,33 **	1,50 ± 0,31 **	1,36 ± 0,33 **
BCL-2/β-aktin	1,36 ± 0,2	1,60 ± 0,21	1,85 ± 0,3 *	1,85 ± 0,34 *	0,95 ± 0,16 *	1,48 ± 0,09 **	1,50 ± 0,25 **	1,19 ± 0,18 **
BCL-2/BAX oranı	0,89 ± 0,15	1,12 ± 0,3	0,97 ± 0,21	1,15 ± 0,29	0,47 ± 0,16 *	1,06 ± 0,23 **	1,16 ± 0,28 **	0,91 ± 0,14 **
TOS (μmol H ₂ O ₂ Equiv./L)	10,85 ± 0,29	5,77 ± 0,22 *	5,96 ± 0,21 *	6,13 ± 0,43 *	20,81 ± 1,21 *	11,66 ± 0,44 **	11,92 ± 0,94 **	11,36 ± 0,38 **
TAS (mmol Trolox Equiv./L)	3,92 ± 0,87	4,16 ± 0,32	3,97 ± 0,65	4,48 ± 0,67	2,66 ± 0,43 *	3,50 ± 0,42 **	4,25 ± 0,8 **	4,22 ± 0,45 **
OSI	0,29 ± 0,07	0,14 ± 0,01 *	0,15 ± 0,02 *	0,14 ± 0,02 *	0,76 ± 0,08 *	0,34 ± 0,04 **	0,29 ± 0,07 **	0,27 ± 0,03 **

Her bir gruba ait veriler ortalama ± standart deviasyon şeklinde verilmiştir.

*Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir.

4.8. Bulguların % değişim ifadeleri

Yaşlanmaya bağlı olarak serebral korteks ve hipokampusta görülen $p < 0,05$ düzeyindeki değişiklikler ile gençlerde ve yaşlılarda eksojen uygulaması yapılan melatonin, curcumin ve salermidin $p < 0,05$ düzeyindeki etkileri, % değişim olarak Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’ te özetlenmiştir. Ayrıca yaşlı gruplara ait değişiklikler Şekil 4.8’ de şematize edilmiştir.

Çizelge 4.3. Yaşlanmaya bağlı olarak serebral kortekste izlenen (%) değişimler ve eksojen madde uygulamalarının etkileri

	KORTEKS	YAŞLI GRUP			
		Kontrol	Melatonin	Curcumin	Salermide
Yaşlanma ile görülen % değişimler	↑ SIRT2	30 ↑	-	-	-
	FOXO3a	30 ↑	-	23 ↓	34 ↓
	BIM	70 ↑	32 ↓	-	-
	TOS	92 ↑	44 ↓	43 ↓	46 ↓
	OSI	194 ↑	59 ↓	57 ↓	65 ↓
	↓ BCL-2	25 ↓	29 ↑	46 ↑	39 ↑
	BCL-2/BAX	41 ↓	-	80 ↑	100 ↑
	TAS	33 ↓	33 ↑	-	44 ↑

Çizelge 4.4. Yaşlanmaya bağlı olarak hipokampusta izlenen (%) değişimler ve eksojen madde uygulamalarının etkileri

	HİPOKAMPUS	YAŞLI GRUP			
		Kontrol	Melatonin	Curcumin	Salermide
Yaşlanma ile görülen % değişimler	↑ SIRT2	47 ↑	36 ↓	36 ↓	33 ↓
	FOXO3a	41 ↑	19 ↓	35 ↓	36 ↓
	BAX	40 ↑	32 ↓	30 ↓	36 ↓
	TOS	92 ↑	44 ↓	43 ↓	45 ↓
	OSI	162 ↑	55 ↓	62 ↓	64 ↓
	↓ BCL-2	30 ↓	56 ↑	58 ↑	25 ↑
	BCL-2/BAX	47 ↓	126 ↑	147 ↑	94 ↑
	TAS	32 ↓	32 ↑	60 ↑	59 ↑

*Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’ te sadece $p < 0,05$ düzeyindeki değişiklikler sunulmuştur. Çizelgelerdeki yaşlı kontrol grubuna ait % değişimler genç kontrol grubuna kıyasla verilmiştir. Eksojen uygulamaların (melatonin, curcumin ya da salermide) etkilerine ait % değişimler ise yaşlı kontrol grubuna kıyasla

verilmiştir. Protein ekspresyonlarına ait % değişimler verilirken tüm proteinler için Western blotting sonuçları kullanılmıştır. (↑); $p < 0,05$ düzeyindeki artışı, (↓); $p < 0,05$ düzeyindeki azalmayı, (-); $p < 0,05$ düzeyinde farklılaşma bulunmadığını ifade etmektedir.

Çizelge 4.5. Eksojen uygulamalara bağlı olarak genç gruplarda izlenen (%) değişimler

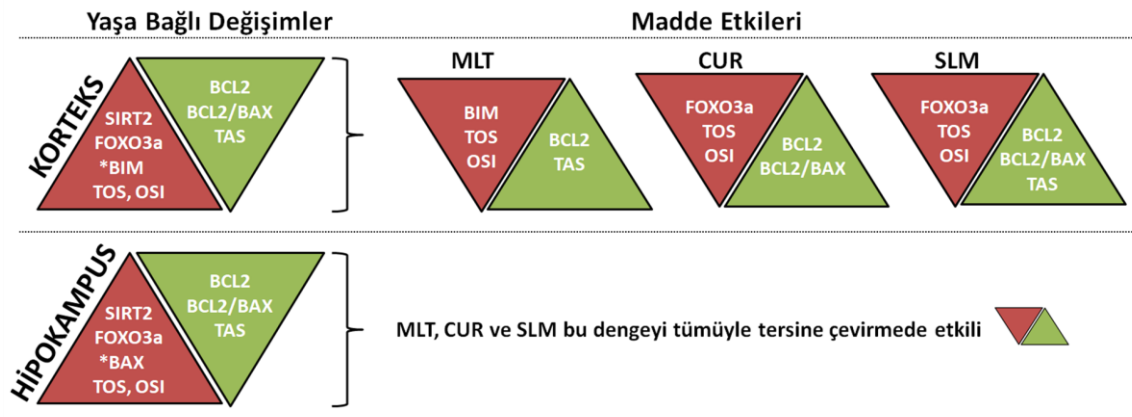
A)

KORTEKS	GENÇ GRUP		
	Melatonin	Curcumin	Salermide
FOXO3a	-	-	-
TOS	48 ↓	46 ↓	44 ↓
OSI	47 ↓	44 ↓	46 ↓
BCL-2	-	-	31 ↑

B)

HİPOKAMPUS	GENÇ GRUP		
	Melatonin	Curcumin	Salermide
FOXO3a	28 ↓	-	-
TOS	47 ↓	45 ↓	44 ↓
OSI	52 ↓	48 ↓	52 ↓
BCL-2	-	36 ↑	36 ↑

*Çizelgede 4.5. (A) serebral korteks, (B) hipokampus için genç kontrol grubuna kıyasla sadece $p < 0,05$ düzeyindeki değişiklikler sunulmuştur. Protein ekspresyonlarına ait % değişimler verilirken tüm proteinler için Western blotting sonuçları kullanılmıştır. (↑); $p < 0,05$ düzeyindeki artışı, (↓); $p < 0,05$ düzeyindeki azalmayı, (-); $p < 0,05$ düzeyinde farklılaşma bulunmadığını ifade etmektedir.



Şekil 4.8. Serebral korteks ve hipokampusta izlenen yaşa bağlı değişimler ve eksojen uygulamaların etkileri

*Bu şekil, $p < 0,05$ düzeyindeki değişiklikler göz önüne alınarak ve tüm proteinler için Western blotting sonuçları kullanılarak hazırlanmıştır. Üst satırda yaşlanmaya bağlı olarak serebral kortekste SIRT2, FOXO3a, BIM, TOS ve OSI düzeylerinin arttığı buna karşılık BCL-2, BCL-2/BAX oranı ve TAS düzeylerinin azaldığı görülmektedir. Yaşlanmada eksojen melatonin (MLT), curcumin (CUR) ve salermide (SLM) uygulamaları ise serebral kortekste yaşa bağlı değişimleri tersi yönde etkilemektedir. Hipokampusta serebral korteksten farklı olarak *BIM yerine *BAX artışı görülmektedir ve her üç eksojen uygulamanın da hipokampusta yaşa bağlı izlenen değişimleri tümüyle tersine çevirmede etkili olduğu görülmektedir ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Yaşlanma her biri genel fenotipe katkıda bulunan çevresel, genetik, epigenetik ve stokastik faktörlerin birleşiminden kaynaklanan oldukça karmaşık bir olgudur. Beyin dokusu sahip olduğu kan beyin bariyeri yapılanması ile diğer organlara kıyasla daha korunaklı görünse de yaşlanma ile kan beyin bariyeri geçirgenliği, nöral transmisyon, sinaptik bağlantılar ve hücrelerin metabolik aktivitelerinde bozulmalar olmaktadır. Yaşlanmada nöral ve glial hücrelerde, hücreler arasındaki metabolik ilişkilerin bozulması ile yaşlanma ve nörodejenerasyon karşıtı antioksidan savunma sistemleri çalışamaz hale gelir, buna astrositlerin merkezi rol üstlendiği GSH metabolizması örnek gösterilebilir (Schmidt & Dringen, 2012). Beyin dokusu zaten oksidan hasarlara oldukça duyarlıdır ve antioksidan savunma sistemlerinden görece fakirdir (Floyd, 1999)(Floyd & Hensley, 2002). Korteks, striatum, hipokampus ve serebellum gibi farklı beyin bölgelerinde oksidan ve antioksidan parametrelerin yaşa bağlı değişimleri incelendiğinde 24 aylık yaşlı sıçanların hipokampus ve serebral kortekslerinde lipid peroksidasyon ürünlerinin daha fazla olduğu, hipokampusta glutatyon peroksidaz aktivitesinin bozulduğu, ayrıca yine hipokampus ve serebellumda total antioksidan kapasite reaktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. (Siqueira et al., 2005).

Nöral yaşlanma ve eşlik eden nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde oksidatif stres, inflamasyon, serebral iskemik hasarlar ve hücrel kayıplar yer almaktadır ve çalışma bulgularımız beklediğimiz üzere beyinde hem serebral kortekste hem de hipokampusta yaşlanmaya bağlı oksidatif stres ve apoptotik aktivitedeki artışı doğrulamaktadır. Yaşlı sıçanların hipokampus ve serebral korteks dokularında TOS düzeylerinde artış, TAS düzeylerinde ise azalma görüldü. Oksidatif stres indeksi ise yaşlanma ile beyinde neredeyse iki kat artış gösterdi (Şekil 4.7) (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Daha önceki çalışmalarımız ve literatürdeki pek çok çalışma yaşlanma ile serebral korteks, hipokampus, serebellum ve limbik alanlarda lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve nitrasyonundaki artışı, buna karşılık antioksidan sistemlerdeki (GSH, GRd, tiyoredoksin reduktaz, SOD, katalaz, vb) azalmayı göstermektedir (Akbulut, Gonul, & Akbulut, 2008)(Venkateshappa, Harish, Mahadevan, Sirinivas Bharath, & Shankar, 2012)(Kireev, Vara, & Tresguerres, 2013)(Akbulut, Keskin Aktan, & Yazıcı Mutlu, 2015)(Keskin-Aktan et al., 2018). Yaşlanmaya bağlı apoptoz ilişkili protein düzeylerine bakıldığında

çalışmamızda yine her iki beyin bölgesinde antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonunun ve Bcl-2/Bax oranının yaşlanma ile azaldığı, buna karşılık proapoptotik proteinlerin (serebral kortekste Bim, hipokampusta Bax) arttığı görüldü (Şekil 4.8) (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Yaşlanma ile serebral korteks ve hipokampusta artan oksidan hasar ve apoptotik aktiviteye Bcl-2 down-regülasyonu, Bax up-regülasyonu eşlik etmektedir (Savory, Rao, Huang, Letada, & Herman, 1999)(Xu, Deng, & Bentivoglio, 2007). Weinreb ve arkadaşları çalışmalarında, farelerde yaşlanmaya bağlı olarak hipokampusta Bcl-2, BDNF, sinapsin 1 ve Trk-B reseptör mRNA ekspresyonlarının azaldığını, ancak Bax ekspresyonunda anlamlı değişiklik izlenmediğini göstermişlerdir (Weinreb, Badinter, Amit, Bar-Am, & Youdim, 2015). Kireev ve arkadaşları ise çalışmalarında, Wistar sıçan dentat giruslarında yaşlanma ile Bax, Bak, AIF gibi pro-apoptotik proteinlerin arttığı, buna karşılık XIAP, NIAP, Mcl-1 gibi antiapoptotik proteinlerin azaldığını göstermişlerdir (Kireev et al., 2013).

Alzheimer hastalığında (AD) A β 1-42' nin Bcl-2' yi down-regüle, Bax' ı up regüle ederek nöron ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Paradis, Koutroumanis, & Goodyer, 1996). Yine Alzheimer hastalığı olan kişilerin frontal kortekslerinde Bcl-2 ve Bax paternlerinin incelendiği postmortem bir çalışmada Bax pozitif hücre sayısı normal yaşlılara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Lu et al., 2005).

Sağlıklı hücrelerde mikrotübüllerle ilişkide olan Bim subsellüler membranlarda yerleşke gösterir (Shamas-Din, Brahmabhatt, Leber, & Andrews, 2011). Bim transkripsiyonu esas olarak FOXO3a tarafından kontrol edilir ve FOXO3a aracılı Bim ekspresyonundaki artış hücreyi apoptoza yöneltir (F. Wang, Nguyen, Qin, & Tong, 2007)(Carbajo-Pescador et al., 2013). Bim' in JNK (c-Jun N-terminal kinase) tarafından serine 65 bölgesindeki fosforilasyonu in vivo ve in vitro nöral hücrelerin apoptozuna yol açmaktadır (Becker, Howell, Kodama, Barker, & Bonni, 2004). NGF' nin azalmasına bağlı nöral kayıplara Bim' in aracılık ettiği ve Bim' in aşırı eksprese edildiği durumlarda apoptoz aktivitesinin arttığı belirtilmektedir (Whitfield, Neame, Paquet, Bernard, & Ham, 2001). Alzheimer hastalığında hipokampal ve kortikal nöronlardaki kayıpların A β peptidinin Bim artışını indüklemesiyle gerçekleştiği gösterilmiştir (Biswas et al., 2007). Bim ve Noxa' nın serebral iskemi modelinde NF-kB alt ünitesi RelA' nın kortikal nöronlardaki yıkıcı etkisine aracılık ettiği (Inta et al., 2006), AMPK aracılı çinko nörotoksitesi ve nöronal ölümde yine Bim ve ayrıca kaspaz-3 aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir (Eom, Lee, Koh, &

Kim, 2016). Temporal epilepsi modelinde hipokampal hasarla korele FOXO3a/Bim ekspresyonunda artış izlenmiş, FOXO3a'nın baskılanması hipokampal nöronların sağkalımında artış sağlamıştır (Shinoda et al., 2004). Huntington hastalığı modeli oluşturulmuş farelerde hastalığın erken evresinde Bid, hastalığın geç evrelerinde ise Bid' in yanı sıra Bim düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bu durum Bim' in nöronal disfonksiyonun ilerleyişi ve ciddiyeti hakkında önemli bir gösterge olduğunu düşündürmektedir (Shimmyo, Kihara, Akaike, Niidome, & Sugimoto, 2008). Pek çok stres modeli ve nörodejenerasyondaki nöral kayıplarda Bim ekspresyonundaki artış rol oynamaktadır, ne var ki literatürde Bim' in yaşlanmaya bağlı olarak farklı beyin bölgelerindeki ekspresyonunu gösteren çalışmaya rastlanmamıştır ancak yaşlanma ile kalpte (Sin et al., 2014) ve iskelet kasında (Sin et al., 2015) Bim artışı bildirilmiştir.

Görüldüğü üzere literatürde pek çok çalışma yaşlanma, nörodejenerasyon, oksidatif stres vb çeşitli stres koşullarında apoptotik aktivitenin artabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla yaşlanmaya bağlı olarak beyinde saptadığımız oksidatif stres ve apoptoza ait bulgularımız literatür ile uyumludur ancak bu çalışmada amacımız yaşlı beyinde farklı beyin bölgelerinde SIRT2 ve FOXO3a' nın oksidatif stres ve apoptoz mekanizması üzerinden fonksiyonunu araştırmaktır. Çünkü FOXO' ların yanı sıra α -tubulin, p53 ve histonlar üzerinde deastilaz aktivitesine sahip SIRT2' nin inhibisyonu pek çok çalışmada yaşlanma ilişkili nörodejeneratif hastalıkların patogenezi önlemede/geciktirmede etkili bulunmuştur.

SIRT2 erişkin beyinde en çok ekprese edilen sirtuindir (Sidorova-Darmos et al., 2014) ve SIRT2 upregülasyonu stres indüklü premature yaşlanmanın spesifik özelliklerinden biri olarak gösterilmiştir (Anwar, Khosla, & Ramakrishna, 2016). Yaşlanma ile santral sinir sisteminde bol miktarda ekprese edilen SIRT2' nin fare beyni ve medulla spinalisinde biriktiği ve bu birikimle korele olarak asetile tubulin düzeyindeki azalmanın nörodejenerasyon sürecinin başlatılmasından sorumlu tutulduğu bildirilmiştir (Maxwell et al., 2011). Braidy ve arkadaşları ise, 24 aylık yaşlı wistar sıçanlarda SIRT2 mRNA ve protein ekspresyonunun özellikle oksipital lobda belirgin şekilde arttığını, diğer kortikal alanlarda ve hipokampusta ise belirgin değişiklik izlenmediğini göstermişlerdir (Braidy et al., 2015). Yine aynı çalışmada yaşlı beyinde SIRT2 artışı ile korele FOXO3a artışı ve SIRT2' nin deastilaz aktivitesine bağlı olarak asetile-FOXO3 düzeyindeki azalmanın eşlik

ettiği de belirtilmektedir. Çalışmamızda yaşlanma ile beyinde SIRT2 ve FOXO3a düzeylerinin korele bir şekilde hem serebral kortekste hem de hipokampusta arttığını gösterdik (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.8).

SIRT2' nin deasetilaz aktivitesi hücrede oksidatif stres yanıtlarının düzenlenmesi için gereklidir. Örneğin eritrositlerde, SIRT2'nin G6PD deasetilasyonu ve aktivasyonu ile, NADPH homeostazisi ve hücre canlılığının sürdürülmesinde rol oynadığı (Y.-P. Wang et al., 2014), makrofajlarda MnSOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzimlerde artış, hücre ROS düzeyinde ise azalma sağlayarak, inflamasyon cevaplarının ve hücre kayıplarının azaltılmasına aracılık ettiği belirtilmektedir (Jin et al., 2013). SIRT2' nin H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese yanıtlarının düzenlenmesinde de görev aldığı gösterilmiştir. H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese cevaben SIRT2 ekspresyonunun arttığı ve SIRT2' nin FOXO3a deasetilasyonu ile MnSOD, p27Kip1 ve Bim gibi FOXO3a hedef genlerinin ekspresyonunu arttırabildiği (F. Wang et al., 2007), diğer taraftan AGK-2 aracılı SIRT2 inhibisyonunun H₂O₂' ye bağlı hücre ölümünü azaltabildiği gösterilmiştir (Nie et al., 2014). Dolayısıyla SIRT2, ROS düzeyinin azaltılmasına aracılık edebilir, diğer taraftan stres düzeyine bağlı olarak Bim aracılı apoptozu da indükleyebilir. Çalışmamızda oksidatif stres indeksi ile SIRT2 ve FOXO3a arasında, hatta FOXO3a ile Bim düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon olduğunu gösterdik.

Beyinde SIRT2-oksidatif stres ilişkisini araştırdığımız önceki çalışmamızda, erişkin sıçanların hipokampuslarında SIRT2 ekspresyonu ile lipid peroksidasyon ürünü MDA düzeyi arasında kuvvetli bir korelasyon olduğunu ve farmakolojik SIRT2 inhibitörü salermidin in vivo kullanımı ile hipokampusta lipid peroksidasyonun azaldığını buna karşılık GSH düzeyinin arttığını bildirdik (Keskin-Aktan et al., 2018). Bu çalışmamızda da yaşlanmaya bağlı olarak oksidatif stresteki artış ile SIRT2 ve FOXO3a düzeylerindeki artış arasında kuvvetli bir korelasyon olduğunu gördük. FOXO3a, SIRT2' nin hedef substratlarından birisidir ve FOXO3a, MnSOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu sağlayarak oksidatif stresle başa çıkılmasına aracılık eden bir transkripsiyon faktörüdür (F. Wang et al., 2007). Ancak daha önce de bahsedildiği üzere hücre stres düzeyine bağlı olarak FOXO3a, hedef genlerinden Bim ekspresyonunu arttırarak apoptozu da indükleyebilir. Nitekim çalışma bulgularımız FOXO3a artışı ile korele Bim artışını doğrulamaktadır. Yaşlanmaya bağlı olarak Bim ekspresyonlarındaki artışı esas olarak

serebral kortekste gözlemledik ve yaşlı sıçanların korteksinde total FOXO3a protein ekspresyonu gençlere kıyasla % 30' luk bir artış gösterirken Bim ekspresyonundaki artış (% 70) çok daha yüksek bir oranda bulundu (Çizelge 4.3). Bim' in transkripsiyonel aktivasyonundan esas sorumlu transkripsiyon faktörü FOXO3a' dır ancak Bim ekspresyonu STAT1, c-JUN, Smad3 ve E2F1 tarafından da aktive edilebilir (Shukla, Saxena, Singh, & Kakkar, 2017). Ayrıca FOXO3a' nın aktif forma geçip nükleer translokasyonunu sağlayan fosforilasyon, asetilasyon vb posttranslasyonel modifikasyonları çeşitlilik göstermektedir, dolayısıyla total FOXO3a protein ekspresyonu % 30' luk bir artış gösterirken aktif FOXO3a düzeyinin çok daha fazla artış göstermiş olması ve bu oranda Bim ekspresyonunu indüklemiş olması da muhtemeldir.

SIRT2' nin apoptozla olan ilişkisi doku/hüce tipine göre farklılık göstermektedir ve henüz mekanizması çok aydınlatılmış olsa da SIRT2' nin oksidatif stres indüklü hücre ölümünde mediyatör gibi davrandığı düşünülmektedir. H₂O₂ tedavisi sonucu feokromasitoma hücrelerinde (PC12 cell line) oksidatif stresle beraber SIRT2 düzeyinin arttığı, buna karşılık AGK-2 aracılı SIRT2 inhibisyonunda kaspaz-3 aktivasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Nie et al., 2014). Yani, SIRT2 inhibisyonu H₂O₂ ile indüklenen apoptozu önemli ölçüde azaltmıştır. Diğer taraftan H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese cevaben artan SIRT2, FOXO3a-BIM aracılı apoptozu da indükleyebilir (F. Wang et al., 2007). Hücrel Parkinson hastalığı (PD) modelinde MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) ile indüklenmiş dopaminerjik nöronların kaybında Bax ve SIRT2' nin aşırı eksprese edildiği izlenmiştir. Ayrıca SIRT2 artışının Bim artışına da aracılık ettiği, MiR-7 tedavisinin ise Bax ve SIRT2' yi hedef alarak nöral kayıpları engellemede etkili olduğu gösterilmiştir (S. Li et al., 2016). Glioma hücrelerinde ise SIRT2' nin aşırı ekspresyonu, kaspaz ve Bax proteinini artırırken Bcl-2 üzerinde down regulasyon yapmaktadır bu nedenle SIRT2 aktivatörlerinin glioma için terapatik bir ajan olabileceği düşünülmektedir (Yanan Li et al., 2013). Diğer taraftan bazı kanser hücrelerinde (C6 glioma ve HeLa) SIRT2 inhibisyonu apoptozisi indüklemeye etkili gösterilmiştir (Yanze Li et al., 2011)(He et al., 2012).

A β PP (amyloid- β protein precursor) aşırı eksprese eden H4-SW nörogloma hücrelerinde ve iki farklı AD transgenik fare modelinde (3xTg-AD ve APP23) SIRT2' nin AGK-2 ve AK-7 ile farmakolojik inhibisyonu sağlandığında A β üretiminin azaldığı ve obje tanıma testlerindeki kognitif performansın arttığı bildirilmiştir. Ayrıca transgenik farelerde AK-7

ile SIRT2 inhibisyonu ile korele asetile tubulin (Ac- α -tubulin/ α -tubulin) düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Biella et al., 2016). SIRT2' nin genetik ya da farmakolojik inhibisyonu Huntington hastalığında (HD) sterol biyosentezini ve mutant huntingtin toksisitesini azaltmada etkili bulunmuştur (Luthi-Carter et al., 2010). SIRT2 inhibisyonu HD genetik fare modelinde mutant huntingtin agregatlarını azaltmanın yanı sıra beyin atrofisini önlemeye ve motor fonksiyonları iyileştirmeye de yardımcıdır (Dompierre et al., 2007) (Pallos et al., 2008) (Chopra et al., 2012).

SIRT2' nin genetik inhibisyonunun, alfa-sinüklein toksisitesini azalttığı bu sayede PD' nin in vitro ve Drosophila modelinde, dopaminerjik hücre kayıplarını engelleyebildiği gösterilmiştir (Outeiro et al., 2007). SIRT2' nin AK-7 aracılı farmakolojik inhibisyonu da in vitro olarak alfa-sinüklein toksisitesini, dopamin azalmasını ve dopaminerjik nöron kaybını önlemede etkili bulunmuştur (Chen et al., 2015). SIRT2 inhibitörü AGK-2, PD hücre modelinde ve myokardiyal iskemi-reperfüzyon hayvan modelinde hücre kayıplarını azaltmaktadır ve çeşitli nörolojik bozuklukların gelişiminde kritik role sahip mikrogliaların sağkalımında ve fonksiyonelliğinin sürdürülmesinde rol oynamaktadır (Yexin Li et al., 2013).

FOXO3a beyinde korteks, hipokampus ve serebellumda bolca eksprese edilmektedir (Hoekman, Jacobs, Smidt, & Burbach, 2006), ancak yaşlanmaya bağlı farklı beyin bölgelerinde total protein düzeyinin değişimine değinen çok sınırlı sayıda çalışma vardır. Oksidatif strese maruziyet hipokampusta FOXO3a ekspresyonu arttırmaktadır (Gómez-Crisóstomo, Rodríguez Martínez, & Rivas-Arancibia, 2014). Metabolik streslerde FOXO3a hipokampal sinaptik plastisite ve bellek fonksiyonlarının düzenlenmesine aracılık etmektedir (Spinelli et al., 2017). Parkinson hastalığı modeli oluşturulan bir çalışmada SIRT2' nin FOXO3a üzerinde artan deasetilaz aktivitesi ile Bim ekspresyonunu tetiklediği ve bunun sonucu nigrostriyatal yol hasarında ve apoptozda artış olduğu bildirilmiştir (Liu, Arun, Ellis, Peritore, & Donmez, 2014). Qin ve arkadaşları AD transgenik (Tg2576) fare modelinde kalori kısıtlaması yoluyla amiloid nöropatolojisinin önlenmesinde IR-PI3K-Akt-FoxO3a sinyal yolağının rol oynadığını, primer Tg2576 kortiko-hipokampal nöron kültürlerinde artmış nükleer FOXO3a aktivitesinin α -sekretaz aktivitesini inhibe ettiğini ve A β üretimini teşvik ettiğini göstermiştir. Dolayısıyla FOXO3a inaktivasyonu sağlayan düzenlemelerin amiloid nöropatolojisini ve spasyal bellek bozukluklarını azaltmada etkili

olabileceği önerilmektedir (Qin et al., 2008). FOXO3a' nın baskılanması, nöronal otofajiyi inhibe ederek travmatik beyin hasarı sonrası nörodavranışsal bozuklukları da hafifletmiştir (Sun et al., 2018). Ayrıca SIRT2 inhibisyonunun iskemik inmede FOXO3a ve MAPK sinyal yollarının baskılanması ile nöroprotektif etki oluşturduğu, Bim, Bad ve kaspaz3 down-regülasyonu ile kortikal nöronların apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (She, Wong, Baik, & Arumugam, 2018). FOXO3a, alfa-sinüklein birikiminden ve substantia nigradaki dopaminerjik nöronların akıbetinin belirlenmesinden de sorumlu tutulur; FOXO inhibisyonu ile nöral kayıpların engellenebildiği gösterilmiştir (Pino et al., 2014).

Melatonin yaşlanma, metabolizma artışı ya da çeşitli çevresel stres koşulları altında görülen ROS artışında, reseptör bağımlı ve/veya bağımsız yollardan ERK1/2 sinyal yolağı aracılığı ile Nf-κB, AP-1, Nrf2 gibi transkripsiyon faktörlerinin etkinliğini değiştirir, antioksidanların ve detoksifikasyon genlerinin ekspresyonlarını artırır. Bu sayede antioksidan enzimleri (GSH, GPx, GRd, SOD, katalaz vb) artırırken, beraberinde anti-apoptotik ve anti-oksidan özellik gösteren redoks duyarlı Bcl-2 düzeyini ve Bcl-2/Bax oranını arttırabilir (Caballero et al. 2009) (Luchetti et al. 2010) (Paredes et al. 2015). Yaşlanma ile melatonin yapımı azalır (Karasek, 2007). Melatoninin, apoptoz üzerine etkisi doku tipine göre farklılık gösterebilmektedir. Örneğin homosistein indüklü hipokampal hücre ölümünde Bcl-2 up-regülasyonu ve Bax down-regülasyonu ile nöral kaybı önlerken (Baydas et al. 2005), kanser hücrelerinde ise Bcl-2/bax oranını azaltarak apoptozu indükleyebilmektedir (Luchetti et al. 2010).

Kuvvetli bir antioksidan olarak bilinen curcumin, anti-inflamatuar, anti-kanser özellikleri ile nöroprotektif etkili bir polifenoldür (Mansouri, Sabetkasaei, Moradi, Masoudnia, & Ataie, 2012). Antioksidan ve nöroprotektif etkileri yaşlı sıçanların korteks, hipokampus, serebellum gibi farklı beyin bölgelerinde görülmektedir (Bala, Tripathy, & Sharma, 2006) (Keskin-Aktan et al., 2018).

Çalışma bulgularımız curcumin, melatonin ve salermide uygulamalarının her iki beyin bölgesinde yaşlanma ile artan TOS ve OSI düzeylerini azalttığını, curcuminin hipokampusta melatonin ve salermidin ise her iki bölgede yaşlanma ile azalan TAS düzeylerini arttırdığını göstermektedir (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Şekil 4.8). Melatonin, curcumin ve salermide yaşlanma ile birlikte hipokampusta artan Bax düzeylerini azaltmış,

ve beraberinde her iki beyin bölgesinde yaşlanma ile azalan Bcl-2 düzeylerini arttırmıştır. Ayrıca melatonin uygulaması yaşlanma ile serebral kortekste artan Bim düzeylerini azaltmıştır. Önceki çalışmalarımızda da melatoninin oksidatif hasarı azaltmada etkili olduğunu, ayrıca apoptoz ilişkili Bcl-2, Bax ve kaspaz 3 gibi apoptoz ilişkili proteinlerin ekspresyonlarını regüle ettiğini göstermiştik (Akbulut et al., 2008)(Akbulut, Akbulut, Akgun, & Gonul, 2012)(Keskin-Aktan et al., 2018)

Daha önce de bahsedildiği üzere AD, PD gibi nörodejeneratif hastalıklarda FOXO3a inhibisyonu nöronların sağkalımlarını arttırmaktadır. Çalışmamızda curcumin uygulamasının yaşlanmada hem korteks hem de hipokampusta FOXO3a inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir. Dolayısıyla curcuminin nöroprotektif etkisine FOXO3a inhibisyonu aracılık ediyor olabilir. Literatürde curcuminin FOXO' lar ile ilişkisini gösteren çalışmalar çok azdır ve genelde FOXO1 ilişkilidir. Curcumin metaboliti tetrahidrocurcuminin (THC), yaşlanma ve oksidatif stres cevaplarını FOXO aracılığı ile ortaya çıkardığı gösterilmiştir (Xiang et al., 2011) .

FOXO3a için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulsa da hem FOXO3a hem de SIRT2 ekspresyonlarının yaşlanmaya bağlı olarak arttığını, hipokampusta % 47 civarında artan SIRT2 ekspresyonunun farmakolojik SIRT2 inhibitörü olan salermide, melatonin ve curcumin uygulamaları ile % 30-40 azaldığını gösterdik. SIRT2 baskılanması beyni nörodejenerasyona karşı koruyucu görünmektedir, nitekim çalışmamızda melatonin uygulaması hipokampusta SIRT2 ve FOXO3a inhibisyonunda etkili bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Literatürde melatonin-SIRT1 ilişkisini gösteren çok sayıda çalışma vardır (Kireev et al., 2013)(Ramis, Esteban, Miralles, Tan, & Reiter, 2015) ancak beyinde SIRT2 ilişkisi sınırlı sayıda çalışmada sunulmuştur. Melatoninle benzer şekilde curcuminin nöroprotektif etkisine sirtuinlerin aracılık ettiğini gösteren çalışmalar da yine SIRT1 ile olan ilişkisi üzerinedir. Curcuminin sıçan kortikal nöronlarında SIRT1 aktivasyonu ile amyloid- β 25-35 nörotoksitesini engellediği gösterilmiştir (Sun et al. 2014). Erişkin sıçan hipokampusunda SIRT2 ekspresyonunun curcumin ile baskılanabildiği ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir (Keskin-Aktan et al., 2018). Curcumin açısından bu çalışma bulgularımız da daha önceki çalışmalarımız ve literatürle uyumludur.

Yaşlanmada hipokampusu ait bulgularımız kortekse ait bulgularımızla büyük oranda korelasyon göstermektedir, farklı olarak melatonin, curcumin ya da salermidin uygulama dozları yaşlanma ile artan kortikal SIRT2 ekspresyonlarını anlamlı düzeyde azaltmada yetersiz kalmıştır (Şekil 4.1 ve Çizelge 4.3). Yine hipokampustan farklı olarak kortekste yaşlanma ile BAX ekspresyonu değişmemiş, fakat FOXO3a ile korele BIM ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır. Ayrıca yaşlı sıçanların korteksinde BIM ekspresyonunu azaltmada sadece melatonin, FOXO3a düzeyini azaltmada curcumin ve salermide uygulamaları etkili bulunmuştur (Şekil 4.8, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Görüldüğü üzere yaşlanmaya ve uyguladığımız maddelere karşı oluşturulan cevaplar beyinde tek tip değildir. Çünkü beyin morfolojik, metabolik ve genomik özellikleri ile birbirinden farklılaşan nöron gruplarından oluşmaktadır. Bu nöron gruplarının gliyal ve diğer hücrelerle olan etkileşimi, kan-beyin bariyeri yapıları da farklılaşmaktadır. Örneğin kortikal alana kıyasla hipokampal alanda yerleşik astrositlerde inflamasyon, metabolizma ve oksidatif stres ilişkili genlerin transkripsiyonunda yaşlanmaya bağlı olarak çok daha dramatik değişiklikler olduğu belirtilmektedir (Clarke et al., 2018). Hatta hipokampus içinde CA1 bölgesi ve dentat gyrus diğer hipokampal alanlara kıyasla oksidan ve metabolik değişikliklerden çok daha fazla etkilenmektedir. Bu nedenle de hipokampusun stres duyarlılığı en yüksek bölgeleri olarak kabul edilirler. Özetle, beyinde her bir bölgenin hatta alt bölgelerinin yaşlanmaya, oksidatif, metabolik ve inflamatuvar streslere duyarlılığı ve cevapları farklıdır (X. Wang & Michaelis, 2010) (Fjell, McEvoy, Holland, Dale, & Walhovd, 2014) (Clarke et al., 2018).

Korteks ve hipokampusta salermide uygulamasının yaşlanmada melatonin ve curcumin uygulamalarının etkilerine benzer olduğunu gördük. Yani salermide yaşlı sıçanların her iki beyin bölgesinde FOXO3a, TOS ve OSI düzeylerini azaltırken TAS ve Bcl-2 düzeylerini arttırmıştır. Ayrıca yaşlanma ile kortekste artan Bim ve hipokampusta artan Bax ekspresyonlarını da azaltmıştır. Yani farmakolojik SIRT2 inhibitörü salermide beyinde oksidatif stres ve apoptotik aktiviteyi azaltmada etkili bulunmuştur. Bu tablo SIRT2 inhibisyonunun oksidatif stres ve apoptozun baskılanmasına aracılık ettiği hipotezimizi güçlendirmektedir.

Son olarak genç sıçanlarda kontrol amaçlı yapmış olduğumuz uygulamaların etkisine bakacak olursak, oksidatif stres parametreleri dışında melatonin, curcumin ve salermide uygulamalarının araştırdığımız parametreler üzerinde yaşlanmada olduğu gibi belirgin

değişiklikler oluşturmadıklarını görüyoruz. Nitekim radikal süpürücü özellikleri ile bilinen melatonin ve curcumin oldukça kuvvetli antioksidanlardır ve gençlerde her iki beyin bölgesinde TOS ve OSI düzeylerini azaltmışlardır. Salermide uygulaması da yaşlanmada olduğu gibi melatonin ve curcuminle benzer etki oluşturmuş, TOS ve OSI düzeylerini azaltmada etkili bulunmuştur (Çizelge 4.5).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaşlanma ve hücre ölümü oldukça kompleks süreçlerdir ve bu süreçler çok sayıda gen ve yolak üzerinden kontrol edilir. Yaşlanma sürecinde izlenen hücre ölüm mekanizmalarını açıklamada elbette mevcut çalışmalar yetersizdir. Ancak, bu çalışmaya ait bulgularımız doğrultusunda şunları söyleyebiliriz;

Serebral korteks ve hipokampusta yaşlanmaya bağlı olarak

- i. Oksidatif stres ve apoptotik aktivite artmaktadır
- ii. Oksidatif stres artışına SIRT2 ile korele FOXO3a ekspresyonlarındaki artışlar eşlik etmektedir
- iii. Radikal hasarın ve nöral kayıpların azaltılmasında SIRT2 ve FOXO3a inhibisyonu stratejik bir yaklaşım olabilir
- iv. Melatonin ve curcumin beyinde nöroprotektif etkilidir ve bu etkilerinde SIRT2 ve FOXO3a inhibisyonu aracılık ediyor olabilir.

Bu çalışmamızın elbette kendi içinde kısıtlılıkları mevcuttur. SIRT2 ve FOXO3a arasındaki ilişkinin daha etkin yorumlanabilmesi için total FOXO3a ekspresyonunun yanı sıra FOXO3a' nın asetile hatta fosforile protein düzeylerinin de araştırılması, ayrıca çalışmamızda western blot yöntemi ile gösterilen tüm proteinlerin mRNA ekspresyonlarının gösterilmesi bu çalışmanın bulgularını destekleyecektir. Hücrelerde tek ölüm biçiminin apoptoz olmadığı düşünülecek olursa diğer ölüm biçimleriyle ilgili olarak örneğin otofajik ölüm yolağında yer alan beclin, atg vb genlerin de araştırılması yaşlanmada hücre ölüm mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Afanas, I. (2010). Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging-Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. *Aging and Disease*, 1(2), 75–88.
- Akbulut, K.G., Akbulut, H., Akgun, N. and Gonul, B. (2012). Melatonin decreases apoptosis in gastric mucosa during aging. *Aging Clinical and Experimental Research*, 24, 15–20.
- Akbulut, K.G., Aktas, S.H. and Akbulut, H. (2015). The role of melatonin, sirtuin2 and FoXO1 transcription factor in the aging process of colon in male rats. *Biogerontology*, 16, 99–108.
- Akbulut, K.G., Gönül, B. and Akbulut, H. (2001). The effects of melatonin on humoral immune responses of young and aged rats. *Immunol Inves*, 30(1), 17–20.
- Akbulut, K.G., Gonul, B. and Akbulut, H. (2008). Exogenous melatonin decreases age-induced lipid peroxidation in the brain. *Brain Research*, 1238, 31–35.
- Akbulut, K.G., Keskin Aktan, A. and Yazıcı Mutlu, Ç. (2015). The Effects of Curcumine on the Oxidative Stress in the Aged Rat Brain. *Acta Physiologica*, 704, 65–66.
- Akbulut, K.G., Keskin Aktan, A., Yazıcı Mutlu, Ç. and Akbulut, H. (2015). The effect of melatonin, curcumin and salermide on sirt2 expression level of hippocampus in middle aged rats. *Acta Physiologica*, 704, 44.
- Alcaín, F.J. and Villalba, J.M. (2009). Sirtuin inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 19(3), 283–294.
- Al-Omar, F.A., Nagi, M.N., Abdulgadir, M.M., Al Joni, K.S. and Al-Majed, A.A. (2006). Immediate and delayed treatments with curcumin prevents forebrain ischemia-induced neuronal damage and oxidative insult in the rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 31(5), 611–618.
- Anderson, M.J., Viars, C.S., Czekay, S., Cavenee, W.K. and Arden, K.C. (1998). Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics*, 47(2), 187–199.
- Anwar, T., Khosla, S. and Ramakrishna, G. (2016). Increased expression of SIRT2 is a novel marker of cellular senescence and is dependent on wild type p53 status. *Cell Cycle*, 15(14), 1883–1897.
- Bala, K., Tripathy, B.C. and Sharma, D. (2006). Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology*, 7(2), 81–89.
- Baydas, G., Reiter, R. J., Akbulut, M., Tuzcu, M. and Tamer, S. (2005). Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience*, 135, 879–886.

- Becker, E.B.E., Howell, J., Kodama, Y., Barker, P.A. and Bonni, A. (2004). Characterization of the c-Jun N-Terminal Kinase-BimEL Signaling Pathway in Neuronal Apoptosis. *Journal of Neuroscience*, 24(40), 8762–8770.
- Belakavadi, M. and Salimath, B.P. (2005). Mechanism of inhibition of ascites tumor growth in mice by curcumin is mediated by NF-kB and caspase activated Dnase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 273(1–2), 57–67.
- Benot, S., Goberna, R., Reiter, R.J., Garcia-Mauriño, S., Osuna, C. and Guerrero, J.M. (1999). Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *Journal of Pineal Research*, 27(1), 59–64.
- Bentires-Alj, M., Dejardin, E., Viatour, P., Van Lint, C., Froesch, B., Reed, J.C., Merville, M.P. and Bours, V. (2001). Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene*, 20(22), 2805–13.
- Biella, G., Fusco, F., Nardo, E., Bernocchi, O., Colombo, A., Lichtenthaler, S.F., Forloni, G. and Albani, D. (2016). Sirtuin 2 Inhibition Improves Cognitive Performance and Acts on Amyloid- β Protein Precursor Processing in Two Alzheimer's Disease Mouse Models. *Journal of Alzheimer's Disease*, 53(3), 1193–1207.
- Biswas, S.C., Shi, Y., Vonsattel, J.P.G., Leung, C.L., Troy, C.M. and Greene, L.A. (2007). Bim Is Elevated in Alzheimer's Disease Neurons and Is Required for β -Amyloid-Induced Neuronal Apoptosis. *Journal of Neuroscience*, 27(4), 893–900.
- Bonnefont-Rousselot, D. and Collin, F. (2010). Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278(1), 55–67.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Braidy, N., Poljak, A., Grant, R., Jayasena, T., Mansour, H., Chan-Ling, T., Smythe, G., Sachdev, P. and Guillemain, G.J. (2015). Differential expression of sirtuins in the aging rat brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(167), 1-16.
- Brody, H. (1970). Structural Changes in the Aging Nervous System. *Interdiscipl Top Gerontol*, 7, 9–21.
- Brunet, A., Sweeney, L., Fitzhugh Sturgill, J., Chua, K., Greer, P., Lin, Y., Tran, H., Ross, S., Mostoslavsky, R., Cohen, H., Hu, L., Cheng, H., Jedrychowski, M., Gygi, S., Sinclair, D., Alt, F. and Greenberg, M. (2004). Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by SIRT1 Deacetylase. *Science*, 303, 2011–2015.
- Caballero, B., Vega-Naredo, I., Sierra, V., Huidobro-Fernandez, C., Soria-Valles, C., Gonzalo-Calvo, D., Tolivia, D., Pallas, M., Camins, A., Rodriguez-Colunga, M. J. and Coto-Montes, A. (2009). Melatonin alters cell death processes in response to age-related oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice. *Journal of Pineal Research*, 46, 106–114.

- Calnan, D.R. and Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Oncogene*, 27(16), 2276–2288.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573), 1655–1657.
- Carbajo-Pescador, S., Steinmetz, C., Kashyap, A., Lorenz, S., Mauriz, J.L., Heise, M., Galle, P.R., González-Gallego, J. and Strand, S. (2013). Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *British Journal of Cancer*, 108(2), 442–449.
- Carocho, M. and Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25.
- Cevenini, E., Bellavista, E., Tieri, P., Castellani, G., Lescai, F., Francesconi, M. and Mishto, M. (2010). Systems Biology and Longevity: An Emerging Approach to Identify Innovative Anti- Aging Targets and Strategies. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 802–813.
- Chen, H., Wu, D., Ding, X. and Ying, W. (2015). SIRT2 is required for lipopolysaccharide-induced activation of BV2 microglia. *NeuroReport*, 26(2), 88–93.
- Chen, X., Wales, P., Quinti, L., Zuo, F., Moniot, S. and Herisson, F. (2015). The Sirtuin-2 Inhibitor AK7 Is Neuroprotective in Models of Parkinson's Disease but Not Amyotrophic Lateral Sclerosis and Cerebral Ischemia. *PLoS ONE*, 10(1), e0116919.
- Cheng, Z., Tseng, Y. and White, M. F. (2010). Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(10), 589–598.
- Chopra, V., Quinti, L., Kim, J., Vollor, L., Kumaraswamy, L., Edgerly, C., Cipicchio, P.M., Lauver, M.A., Choi, S.H., Silverman, R.B., Ferrante, R.J., Hersch, S. and Kazantsev, A.G. (2012). The sirtuin 2 inhibitor AK-7 is neuroprotective in Huntington's disease mouse models. *Cell Reports*, 2(6), 1492–1497.
- Choudhary, D., Chandra, D. and Kale, R.K. (1998). Modulation of radioresponse of glyoxalase system by curcumin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(1), 1–7.
- Clarke, L.E., Liddelow, S.A., Chakraborty, C., Münch, A.E., Heiman, M. and Barres, B.A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(8), E1896–E1905.
- Cristofanon, S., Uguccioni, F., Cerella, C., Radogna, F., Dicato, M., Ghibelli, L. and Diederich, M. (2009). Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kB activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171, 472–478.

- Daitoku, H., Sakamaki, J. and Fukamizu, A. (2011). Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(2011), 1954–1960.
- Deska, M., Romuk, E., Anna, O., Grzegorz, S., Witold, B., Dominika, T., Birkner, E. and Gawrychowski, J. (2017). Oxidative stress and angiogenesis in primary hyperparathyroidism. *European Surgery*, 49, 118–126.
- Doggui, S., Belkacemi, A., Paka, G. D., Perrotte, M., Pi, R. and Ramassamy, C. (2013). Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(9), 1660–1670.
- Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelières, F.P., King, S.J., Humbert, S. and Saudou, F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *The Journal of neuroscience*, 27(13), 3571–3583.
- Donmez, G. (2012). The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(9), 494–501.
- Donmez, G. and Outeiro, T.F. (2013). SIRT1 and SIRT2: Emerging targets in neurodegeneration. *EMBO Molecular Medicine*, 5(3), 344–352.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M. and Diederich, M. (2005). Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Letters*, 223(2), 181–190.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M. M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N. and Youle, R.J. (2011). Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell*, 145(1), 104–116.
- Eijkelenboom, A. and Burgering, B.M.T. (2013). FOXOs: Signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(2), 83–97.
- Eom, J.W., Lee, J.M., Koh, J.Y. and Kim, Y.H. (2016). AMP-activated protein kinase contributes to zinc-induced neuronal death via activation by LKB1 and induction of Bim in mouse cortical cultures. *Molecular Brain*, 9(1), 1–13.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111.
- Esposito, E., Genovese, T., Caminiti, R., Bramanti, P., Meli, R. and Cuzzocrea, S. (2009). Melatonin reduces stress-activated/mitogen-activated protein kinases in spinal cord injury. *Journal of Pineal Research*, 46(1), 79–86.

- Fjell, A.M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A.M. and Walhovd, K.B. (2014). What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Progress in Neurobiology*, 117, 20–40.
- Floyd, R.A. (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222, 236–245.
- Floyd, R.A. and Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, 23, 795–807.
- Floyd, R.A., Towner, R.A., He, T., Hensley, K. and Maples, K.R. (2011). Translational research involving oxidative stress and diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 931–941.
- Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I. and Mori, N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *The Biochemical Journal*, 349(2), 629–34.
- Galili, N., Davis, R., Fredericks, W., Mukhopadhyay, S., Rauscher, F., Emanuel, B., Rovera, G. and Barr, F. (1993). Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genetics*, 3, 73–96.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A.V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K.M., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.M., DeBerardinis, R.J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V. M., Dixon, S. J., Duckett, C. S., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., García-Sáez, A.J., Garg, A.D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.-C., Martin, S. J., Martinou, J.-C., Medema, J. P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkentin, J.D., Moll, U.M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.U., Sistigu, A., Stockwell, B.R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P.,

- Vander Heiden, M.G., Villunger, A., Virgin, H.W., Vousden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G. and Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541.
- Gerschman, R., Gilbert, D., Nye, S., Dwyer, P. and Fenn, W. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *SCIENCE*, 119, 623–626.
- Gómez-Crisóstomo, N.P., Rodríguez Martínez, E. and Rivas-Arancibia, S. (2014). Oxidative stress activates the transcription factors FoxO 1a and FoxO 3a in the hippocampus of rats exposed to low doses of ozone. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–8.
- Greer, E.L. and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24(50), 7410–7425.
- Hagenbuchner, J. and Ausserlechner, M.J. (2013). Mitochondria and FOXO3: breath or die. *Frontiers in Physiology*, 4(147), 1–10.
- Haigis, M.C. and Sinclair, D.A. (2010). Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 253–295.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. (2nd edn). Oxford, UK: Clarendon Press.
- Hao, F., Kang, J., Cao, Y., Fan, S., Yang, H., An, Y., Pan, Y., Tie, L. and Li, X. (2015). Curcumin attenuates palmitate-induced apoptosis in MIN6 pancreatic β -cells through PI3K/Akt/FoxO1 and mitochondrial survival pathways. *Apoptosis*, 20(11), 1420–1432.
- Hardeland, R., Cardinali, D.P., Srinivasan, V., Spence, D.W., Brown, G.M. and Pandi-Perumal, S.R. (2011). Melatonin-A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 350–384.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11, 298–300.
- Harman, D. (2001). Aging: overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 1–21.
- Harman, D. (2002). Alzheimer's Disease: role of aging in pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 959, 384–395.
- He, X., Nie, H., Hong, Y., Sheng, C., Xia, W. and Ying, W. (2012). Biochemical and Biophysical Research Communications SIRT2 activity is required for the survival of C6 glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 468–472.

- Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J. El, Gary, E., Brosseon, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-coray, T., Vitorica, J. and Ransohoff, R.M. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol*, 14(4), 388–405.
- Herskovits, A.Z. and Guarente, L. (2014). Review SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron*, 81(3), 471–483.
- Hetz, C. and Glimcher, L. (2007). The daily job of night killers : alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *TRENDS in Cell Biology*, 18(1), 38–44.
- Hoehle, S.I., Pfeiffer, E., Sólyom, A.M. and Metzler, M. (2006). Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 756–764.
- Hoekman, M.F.M., Jacobs, F.M.J., Smidt, M.P. and Burbach, J.P.H. (2006). Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain. *Gene Expression Patterns*, 6(2), 134–140.
- Hu, A., Huang, J.-J., Li, R.-L., Lu, Z.-Y., Duan, J.-L., Xu, W.-H., Chen, X.-P. and Fan, J.-P. (2015). Curcumin as therapeutics for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma by activating SIRT1. *Scientific Reports*, 5, 13429, 1–14.
- Hutcheson, J., Scatizzi, J.C., Bickel, E., Brown, N.J., Bouillet, P., Strasser, A. and Perlman, H. (2005). Combined loss of proapoptotic genes Bak or Bax with Bim synergizes to cause defects in hematopoiesis and in thymocyte apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(12), 1949–1960.
- Ichim, G. and Tait, S.W.G. (2016). A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539–548.
- Indira, K.I.P. (1997). Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(6), 838–843.
- Inta, I., Paxian, S., Maegele, I., Zhang, W., Pizzi, M., Spano, P., Sarnico, I., Muhammad, S., Herrmann, O., Inta, D., Baumann, B., Liou, H.C., Schmid, R.M. and Schwaninger, M. (2006). Bim and Noxa Are Candidates to Mediate the Deleterious Effect of the NF-kB Subunit RelA in Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroscience*, 26(50), 12896–12903.
- Isenmann, S., Stoll, G., Schroeter, M., Krajewski, S., Reed, J. C. and Bähr, M. (1998). Differential regulation of Bax, Bcl-2, and Bcl-X proteins in focal cortical ischemia in the rat. *Brain Pathology*, 8(1), 49–63.
- Jackson, T.C., Rani, A., Kumar, A. and Foster, T.C. (2009). Regional hippocampal differences in AKT survival signaling across the lifespan: Implications for CA1 vulnerability with aging. *Cell Death and Differentiation*, 16(3), 439–448.
- Jacobs, F.M.J., Van der Heide, L.P., Wijchers, P.J.E.C., Burbach, J.P.H., Hoekman, M.F.M. and Smidt, M.P. (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of

- transcription factors with distinct shuttling Dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35959–35967.
- Jang, J.H. and Surh, Y.J. (2003). Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: Implications for its antiapoptotic function. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1371–1379.
- Jayasena, T., Poljak, A., Smythe, G., Braidy, N., Münch, G. and Sachdev, P. (2013). The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 12(4), 867–883.
- Jęśko, H., Wencel, P., Strosznajder, R.P. and Strosznajder, J.B. (2016). Sirtuins and Their Roles in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Neurochemical Research*, 42(3), 876–890.
- Jin, M., Won, D., Hwan, J., Jin, S., Hern, C., In, J., Ji, E., Bin, S., Ji, H., Hyeon, J., Cho, S., Kim, D., Son, O., Park, J., Hyung, K., Shin, Y. and Sik, W. (2013). Free Radical Biology and Medicine PEP-1 – SIRT2 inhibits inflammatory response and oxidative stress-induced cell death via expression of antioxidant enzymes in murine macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 63, 432–445.
- Karasek, M. (2007). Does melatonin play a role in aging processes? *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58(6), 105–113.
- Kerr, J., Wyllie, A. and Currie, A. (1972). Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(6), 239–257.
- Keskin-Aktan, A., Akbulut, K.G., Yazici-Mutlu, Ç., Sonugur, G., Ocal, M. and Akbulut, H. (2018). The effects of melatonin and curcumin on the expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats. *Brain Research Bulletin*, 137, 306–310.
- Kim, S.J., Son, T.G., Park, H.R., Park, M., Kim, M.S., Kim, H.S., Chung, H.Y., Mattson, M.P. and Lee, J. (2008). Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *The Journal Of Biological Chemistry*, 283(21), 14497–14505.
- Kinarivala, N., Patel, R., Boustany, R. M., Al-Ahmad, A. and Trippier, P.C. (2017). Discovery of Aromatic Carbamates that Confer Neuroprotective Activity by Enhancing Autophagy and Inducing the Anti-Apoptotic Protein B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2). *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(23), 9739–9756.
- Kireev, R.A., Vara, E. and Tresguerres, J.A.F. (2013). Growth hormone and melatonin prevent age-related alteration in apoptosis processes in the dentate gyrus of male rats. *Biogerontology*, 14(4), 431–442.
- Kunlin, J. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging Disease*, 1(2), 72–74.
- Lara, E., Mai, A., Calvanese, V., Altucci, L., Lopez-Nieva, P., Martinez-Chantar, M.L., Varela-Rey, M., Rotili, D., Nebbioso, A., Ropero, S., Montoya, G., Oyarzabal, J., Velasco, S., Serrano, M., Witt, M., Villar-Garea, A., Imhof, A., Mato, J.M.,

- Esteller, M. and Fraga, M.F. (2009). Salermide, a sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect. *Oncogene*, 28(6), 781–791.
- Lehmann, O.J., Sowden, J.C., Carlsson, P., Jordan, T. and Bhattacharya, S.S. (2003). Fox's in development and disease. *Trends in Genetics*, 19(6), 339–344.
- Leuba, G. and Kraftsik, R. (1994). Changes in volume, surface estimate, three-dimensional shape and total numbers of neurons of the human primary visual cortex from midgestation until old age. *Anat Embryol*, 190, 351–66.
- Levine, B., Sinha, S. and Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5), 600–606.
- Li, S., Lv, X., Zhai, K., Xu, R., Zhang, Y., Zhao, S., Qin, X. and Yin, L. (2016). MicroRNA-7 inhibits neuronal apoptosis in a cellular Parkinson's disease model by targeting Bax and Sirt2. *Am J Transl Res*, 8(2), 993–1004.
- Li, W., Laskar, A., Sultana, N., Osman, E., Ghosh, M., Li, Q. and Yuan, X.M. (2012). Cell death induced by 7-oxysterols via lysosomal and mitochondrial pathways is p53-dependent. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(11), 2054–2061.
- Li, Y., Dai, D., Lu, Q., Fei, M., Li, M. and Wu, X. (2013). Biochemical and Biophysical Research Communications Sirt2 suppresses glioma cell growth through targeting NF- κ B – miR-21 axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441, 661–667.
- Li, Y., Matsumori, H., Nakayama, Y., Osaki, M., Kojima, H., Kurimasa, A., Ito, H., Mori, S., Katoh, M., Oshimura, M. and Inoue, T. (2011). SIRT2 down-regulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis. *Genes to Cells*, 16, 34–45.
- Li, Y., Nie, H., Wu, D., Zhang, J., Wei, X. and Ying, W. (2013). Poly(ADP-ribose) polymerase mediates both cell death and ATP decreases in SIRT2 inhibitor AGK2-treated microglial BV2 cells. *Neuroscience Letters*, 544, 36–40.
- Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A. and Cole, G.M. (2001). The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *The Journal of neuroscience*, 21(21), 8370–8377.
- Liu, L., Arun, A., Ellis, L., Peritore, C. and Donmez, G. (2014). SIRT2 enhances 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced nigrostriatal damage via apoptotic pathway. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 1–7.
- Liu, W., Zhai, Y., Heng, X., Che, F. Y., Chen, W., Sun, D. and Zhai, G. (2016). Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *Journal of Drug Targeting*, 24 (8), pp. 694–702.
- Lu, G., WH, K., Q, L., Wang, X., Z, F. and Yew, D. (2005). Bcl2, bax, and nestin in the Brains of Patients With Neurodegeneration and Those of Normal Aging. *Journal of Molecular Neuroscience*, 27(1), 167–174.

- Luchetti, F., Canonico, B., Betti, M., Arcangeletti, M., Pilolli, F., Piroddi, M., Canesi, L., Papa, S., Galli, F. and Dell, S. (2010). Melatonin signaling and cell protection function. *The FASEB Journal*, 24, 3603–3624.
- Luo, H., Yang, Y., Duan, J., Wu, P., Jiang, Q. and Xu, C. (2013). PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to reactive oxygen species-mediated apoptosis in selenite-treated colorectal cancer cells. *Cell Death and Disease*, 4(481), 1–11.
- Luthi-Carter, R., Taylor, D. M., Pallos, J., Lambert, E., Amore, A. and Parker, A. (2010). SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis. *PNAS*, 107(17), 7927–7932.
- Malhotra, J.D. and Kaufman, R.J. (2011). ER stress and Its functional link to mitochondria: Role in cell survival and death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(9), 1–13.
- Mansouri, Z., Sabetkasaei, M., Moradi, F., Masoudnia, F. and Ataie, A. (2012). Curcumin has neuroprotection effect on homocysteine rat model of Parkinson. *Journal of Molecular Neuroscience*, 47(2), 234–242.
- Martinez-Cruz, F., Pozo, D., Osuna, C., Espinar, A., Marchante, C. and Guerrero, J.M. (2002). Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *Journal of Neuroscience Research*, 69(4), 550–558.
- Martinou, J.C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J.K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S., Pietra, C. and Huarte, J. (1994). Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 13(4), 1017–1030.
- Maxwell, M.M., Tomkinson, E.M., Nobles, J., Wizeman, J.W., Amore, A.M., Quinti, L., Chopra, V., Hersch, S.M. and Kazantsev, A.G. (2011). The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Human Molecular Genetics*, 20(20), 1–11.
- Medvedev, Z.A. (1990). An attempt at rational classification of theories of ageing. *Biol Rev*, 65, 375–398.
- Michan, S. and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochemical Journal*, 404(1), 1–13.
- Moretti, N.S., da, S.A.L., Clemente, T.M., Antunes, R.P.P., Yoshida, N., Schenkman, S., Torrecilhas, A.C. and Cano, M.I.N. (2015). Characterization of Trypanosoma cruzi Sirtuins as Possible Drug Targets for Chagas Disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 4669–4679.
- Motaghinejad, M., Karimian, M., Motaghinejad, O., Shabab, B., Yazdani, I. and Fatima, S. (2015). Protective effects of various dosage of Curcumin against morphine induced

- apoptosis and oxidative stress in rat isolated hippocampus. *Pharmacological Reports*. 67(2), 230–235.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A. and Remmen, H.V. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 477–503.
- Neo, S.H. and Tang, B.L. (2017). Sirtuins as Modifiers of Huntington's Disease (HD) Pathology. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 154, 105–145.
- Nho, R.S. and Hergert, P. (2014). FoxO3a and disease progression. *World journal of biological chemistry*, 5(3), 346–54.
- Nie, H., Hong, Y., Lu, X., Zhang, J., Chen, H., Li, Y., Ma, Y. and Ying, W. (2014). SIRT2 mediates oxidative stress-induced apoptosis of differentiated PC12 cells. *NeuroReport*, 25, 838–842.
- Nishida, K., Yamaguchi, O. and Otsu, K. (2008). Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circulation Research*, 103(4), 343–351.
- Nordberg, J. and Arner, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11), 1287–1312.
- Nunes, T., Bernardazzi, C., de Souza, H. S., Nunes, T., Bernardazzi, C. and de Souza, H.S. (2014). Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. *BioMed research international*, 2014, 1–12.
- Oaknin-Bendahan, S., Anis, Y., Nir, I. and Zisapel, N. (1995). Effects of long-term administration of melatonin and a putative antagonist on the ageing rat. *Neuroreport*, 6, 785–788.
- Obrenovich, M.E., Li, Y., Parvathaneni, K., Yendluri, B.B., Palacios, H.H., Leszek, J. and Aliev, G. (2011). Antioxidants in Health, Disease and Aging. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 10, 192–207.
- Obsil, T. and Obsilova, V. (2011). Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(11), 1946–1953.
- Oetari, S., Sudibyo, M., Commandeur, J.N.M., Samhoedi, R. and Vermeulen, N.P.E. (1996). Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 51(1), 39–45.
- Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y.A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K.I., Aaronson, S.A. and Lee, S.W. (2004). ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nature Cell Biology*, 6(2), 121–128.
- Ola, M.S., Nawaz, M. and Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 351(1–2), 41–58.

- Oliveira, B.F., Nogueira-Machado, J.A. and Chaves, M.M. (2010). The Role of Oxidative Stress in the Aging Process. *The Scientific World Journal*, 10, 1121–1128.
- Orrenius, S., Nicotera, P. and Zhivotovsky, B. (2011). Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Sciences*, 119(1), 3–19.
- Outeiro, T.F., Kontopoulos, E., Altmann, S.M., Kufareva, I., Strathearn, K.E., Amore, A.M., Volk, C.B., Maxwell, M.M., Rochet, J., Mclean, P.J., Young, A.B., Abagyan, R., Feany, M.B., Hyman, B.T. and Kazantsev, A.G. (2007). Sirtuin 2 inhibitors rescue α -synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *SCIENCE*, 317, 516–519.
- Öztürk, G., Akbulut, K.G., Güney, Ş. and Acuna-Castroviejo, D. (2012). Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: Modulation by melatonin. *Experimental Gerontology*, 47, 706–711.
- Pallos, J., Bodai, L., Lukacsovich, T., Purcell, J.M., Steffan, J.S., Thompson, L.M. and Marsh, J.L. (2008). Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a Drosophila model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 17(23), 3767–3775.
- Pan, R., Qiu, S., Lu, D. X. and Dong, J. (2008). Curcumin improves learning and memory ability and its neuroprotective mechanism in mice. *Chinese Medical Journal*, 121(9), 832–839.
- Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J.M., Zisapel, N. and Cardinali, D.P. (2008). Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*, 85(3), 335–353.
- Paradis, E., Koutroumanis, M. and Goodyer, C. (1996). Amyloid Beta Peptide of Alzheimer's Disease Downregulates Bcl-2 and Upregulates Bax Expression in Human Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 16(23), 7533–9.
- Paredes, S.D., Rancan, L., Kireev, R., González, A., Louzao, P., González, P., Rodríguez-Bobada, C., García, C., Vara, E. and Tresguerres, J.A.F. (2015). Melatonin counteracts at a transcriptional level the inflammatory and apoptotic response secondary to ischemic brain injury induced by middle cerebral artery blockade in aging rats. *BioResearch open access*, 4(1), 407–16.
- Parry, P., Wei, Y. and Evans, G. (1994). Cloning and characterization of the t (X; II) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 11, 79–84.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Xiao, H. L., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927–939.
- Peck, B., Chen, C.Y., Ho, K.K., Di Fruscia, P., Myatt, S.S., Coombes, R.C., Fuchter, M.J., Hsiao, C.D. and Lam, E.W.F. (2010). SIRT inhibitors induce cell death and p53

- acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(4), 844–855.
- Peters, A. (2002). Structural changes that occur during normal aging of primate cerebral hemispheres. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 26(7), 733–741.
- Petralia, R.S., Mattson, M.P. and Yao, P.J. (2014). Communication breakdown: The impact of ageing on synapse structure. *Ageing Research Reviews*, 14(1), 31–42.
- Pino, E., Amamoto, R., Zheng, L., Cacquevel, M., Sarria, J.C., Knott, G.W. and Schneider, B.L. (2014). FOXO3 determines the accumulation of alpha-synuclein and controls the fate of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Hum Mol Genet*, 23(6), 1435–1452.
- Pohl, S.O.G., Agostino, M., Dharmarajan, A. and Pervaiz, S. (2018). Crosstalk between cellular redox state and the anti-apoptotic protein Bcl-2. *Antioxidants & Redox Signaling*, (in press), 1-65.
- Price, J.L. and Morris, J.C. (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 45, 358–368.
- Qin, W., Zhao, W., Ho, L., Wang, J., Walsh, K., Gandy, S. and Pasinetti, G.M. (2008). Regulation of forkhead transcription factor FoxO3a contributes to calorie restriction-induced prevention of Alzheimer's disease-type amyloid neuropathology and spatial memory deterioration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 335–347.
- Raghupathi, R., Conti, A. C., Graham, D. I., Krajewski, S., Reed, J. C., Grady, M. S., Trojanowski, J. Q. and McIntosh, T. K. (2002). Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience*, 110(4), 605–616.
- Ramis, M.R., Esteban, S., Miralles, A., Tan, D. X. and Reiter, R.J. (2015). Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SIRT1 and implications for aging and related-diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 146–148, 28–41.
- Rautureau, G.J.P., Day, C.L. and Hinds, M.G. (2010). Intrinsically disordered proteins in Bcl-2 regulated apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1808–1824.
- Reiter, R., Carneiro, R. and Oh, C. (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and Metabolic Research*, 29(8), 363–372.
- Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 12(2), 151–180.
- Riedl, S.J. and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 405–413.

- Risacher, S.L., Anderson, W.H., Charil, A., Castelluccio, P.F., Shcherbinin, S., Saykin, A.J. and Schwarz, A.J. (2017). Alzheimer disease brain atrophy subtypes are associated with cognition and rate of decline. *Neurology*, 89(21), 2176–2186.
- Rosales-Corral, S.A., Acuna-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Boga, J.A., Manchester, L.C., Fuentes-Broto, L., Korkmaz, A., Ma, S., Tan, D. X. and Reiter, R.J. (2012). Alzheimer's disease: Pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 52(2), 167–202.
- Ryu, J.R., Hong, C.J., Kim, J.Y., Kim, E.K., Sun, W. and Yu, S.W. (2016). Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Molecular Brain*, 9(1), 43.
- Sastre, J. and Pallard, F.V. (2000). Critical review mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, 49, 427–435.
- Satoh, A., Imai, S. and Guarente, L. (2017). The brain, sirtuins, and ageing. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(6), 362–374.
- Savory, J., Rao, J., Huang, Y., Letada, P. and Herman, M. (1999). Age-related hippocampal changes in Bcl-2:Bax ratio, oxidative stress, redox-active iron and apoptosis associated with aluminum-induced neurodegeneration: increased susceptibility with aging. *Neurotoxicology*, 20(5), 805–17.
- Schmidt, M. and Dringen, R. (2012). Glutathione (GSH) Synthesis and Metabolism. *Neural Metabolism In Vivo, Advances in Neurobiology*, 4, 1029–1050.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B. and Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(4), 508–520.
- She, D.T., Wong, L.J., Baik, S. and Arumugam, T.V. (2018). SIRT2 Inhibition Confers Neuroprotection by Downregulation of FOXO3a and MAPK Signaling Pathways in Ischemic Stroke. *Molecular Neurobiology*, 1-16.
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T. and Sugimoto, H. (2008). Multifunction of Myricetin on Ab: Neuroprotection Via a Conformational Change of Ab and Reduction of Ab Via the Interference of Secretases. *Journal of neuroscience research*, 86, 368–377.
- Shinoda, S., Schindler, C.K., Meller, R., So, N.K., Araki, T., Yamamoto, A., Lan, J.Q., Taki, W., Simon, R.P. and Henshall, D.C. (2004). Bim regulation may determine hippocampal vulnerability after injurious seizures and in temporal lobe epilepsy. *Journal of Clinical Investigation*, 113(7), 1059–1068.
- Shukla, S., Saxena, S., Singh, B.K. and Kakkar, P. (2017). BH3-only protein BIM: An emerging target in chemotherapy. *European Journal of Cell Biology*, 96(8), 728–738.

- Siddique, Y.H., Naz, F. and Jyoti, S. (2014). Effect of Curcumin on Lifespan, Activity Pattern, Oxidative Stress, and Apoptosis in the Brains of Transgenic *Drosophila* Model of Parkinson's Disease. *BioMed Research International*, 2014, 1–6.
- Sidorova-Darmos, E., Wither, R.G., Shulyakova, N., Fisher, C., Ratnam, M., Aarts, M., Lilge, L., Philippe, P., Monnier, P.P. and Eubanks, J.H. (2014). Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. *Aging Neuroscience*, 6(333), 1–20.
- Šimić, G., Kostović, I., Winblad, B. and Bogdanović, N. (1997). Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*, 379, 482–94.
- Sin, T.K., Yu, A.P., Yung, B.Y., Yip, S.P., Chan, L.W., Wong, C.S., Rudd, J.A. and Siu, P.M. (2015). Effects of long-term resveratrol-induced SIRT1 activation on insulin and apoptotic signalling in aged skeletal muscle. *Acta Diabetologica*, 52(6), 1063–1075.
- Sin, T.K., Yu, A.P., Yung, B.Y., Yip, S.P., Chan, L.W., Wong, C.S., Ying, M., Rudd, J.A. and Siu, P.M. (2014). Modulating effect of SIRT1 activation induced by resveratrol on Foxo1-associated apoptotic signalling in senescent heart. *Journal of Physiology*, 592(12), 2535–2548.
- Siqueira, I.R., Fochesatto, C., De Andrade, A., Santos, M., Hagen, M., Bello-Klein, A. and Netto, C.A. (2005). Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(8), 663–671.
- Sohal, R.S. and Weindruch, R. (1996). Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *SCIENCE*, 273(5271), 59–63.
- Sorrentino, J.A., Sanoff, H.K. and Sharpless, N.E. (2014). Defining the toxicology of aging. *Trends in Molecular Medicine*, 1–10.
- Spinelli, M., Fusco, S., Mainardi, M., Scala, F., Natale, F., Lapenta, R., Mattera, A., Rinaudo, M., Li Puma, D.D., Ripoli, C., Grassi, A., D'Ascenzo, M. and Grassi, C. (2017). Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through. *Nature Communications*, 8(1), 1–14.
- Steinman, H.M. (1995). The bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 3487–3490.
- Sun, L., Zhao, M., Liu, M., Su, P., Zhang, J., Li, Y., Yang, X. and Wu, Z. (2018). Suppression of FoxO3a attenuates neurobehavioral deficits after traumatic brain injury through inhibiting neuronal autophagy. *Behavioural Brain Research*, 337, 271–279.
- Şener, G. (2010). Karanlığın hormonu: Melatonin. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 14(3), 112–120.

- Tapias, V., Escames, G., López, L.C., López, A., Camacho, E., Carrión, M.D., Entrena, A., Gallo, M.A., Espinosa, A. and Acuña-Castroviejo, D. (2009). Melatonin and its brain metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in Parkinsonian mice. *Journal of Neuroscience Research*, 87(13), 3002–3010.
- Terry, R.D., DeTeresa, R. and Hansen, L.A. (1987). Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Annals of Neurology*, 21(6), 530–539.
- Toshiyuki, M. and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2), 293–299.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 76(9), 4350–4354.
- Venkateshappa, C., Harish, G., Mahadevan, A., Sirinivas Bharath, M.M. and Shankar, S.K. (2012). Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res*, 37, 1601–1614.
- Wang, F., Nguyen, M., Qin, F.X.F. and Tong, Q. (2007). SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell*, 6(4), 505–514.
- Wang, Q., Liu, Y. and Zhou, J. (2015). Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration*, 4(1), 1–9.
- Wang, X. and Michaelis, E.K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, 1–13.
- Wang, X., Figueroa, B.E., Stavrovskaya, I.G., Zhang, Y., Sirianni, A.C., Zhu, S., Day, A.L., Kristal, B.S. and Friedlander, R.M. (2009). Methazolamide and melatonin inhibit mitochondrial cytochrome c release and are neuroprotective in experimental models of ischemic injury. *Stroke*, 40(5), 1877–1885.
- Wang, X., Zaidi, A., Pal, R., Garrett, A.S., Bracer, R., Chen, X.W., Michaelis, M.L. and Michaelis, E.K. (2009). Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. *BMC Neuroscience*, 10, 1–20.
- Wang, Y.P., Zhou, L.S., Zhao, Y.Z., Wang, S.W., Chen, L.L., Liu, L.X., Ling, Z.Q., Hu, F.J., Sun, Y.P., Zhang, J.Y., Yang, C., Yang, Y., Xiong, Y., Guan, K.L. and Ye, D. (2014). Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *The Embo Journal*, 1–17.
- Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., Browne, K.A., Wowk, M.E., Newbold, A., Sutton, V.R., Clarke, C.J.P., Oliaro, J., Lindemann, R.K., Bird, P.I., Johnstone, R.W. and Trapani, J.A. (2005). A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4476–4482.

- Weinreb, O., Badinter, F., Amit, T., Bar-Am, O. and Youdim, M.B.H. (2015). Effect of long-term treatment with rasagiline on cognitive deficits and related molecular cascades in aged mice. *Neurobiology of aging*, 36(9), 2628–36.
- West, M.J. (1993). Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 14(4), 287–293.
- Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O. and Ham, J. (2001). Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*, 29(3), 629–643.
- Wilson, N.S., Dixit, V. and Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: Nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunology*, 10(4), 348–355.
- Xiang, L., Nakamura, Y., Lim, Y.M., Yamasaki, Y., Kurokawa-Nose, Y., Maruyama, W., Osawa, T., Matsuura, A., Motoyama, N. and Tsuda, L. (2011). Tetrahydrocurcumin extends life span and inhibits the oxidative stress response by regulating the FOXO forkhead transcription factor. *Aging*, 3(11), 1098–1109.
- Xu, Y.Z., Deng, X.H. and Bentivoglio, M. (2007). Differential response of apoptosis-regulatory Bcl-2 and Bax proteins to an inflammatory challenge in the cerebral cortex and hippocampus of aging mice. *Brain Research Bulletin*, 74(5), 329–335.
- Yang, Y., Duan, W., Lin, Y., Yi, W., Liang, Z., Yan, J., Wang, N., Deng, C., Zhang, S., Li, Y., Chen, W., Yu, S., Yi, D. and Jin, Z. (2013). SIRT1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 667–679.
- Yanik, M., Erel, O. and Kati, M. (2004). The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatrica*, 16, 200–203.
- Youle, R.J. and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47–59.
- Zhang, J., Huang, K., O'Neill, K.L., Pang, X. and Luo, X. (2016). Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. *Cell death & disease*, 7, e2266.
- Zhao, Y., Luo, P., Guo, Q., Li, S., Zhang, L., Zhao, M., Xu, H., Yang, Y., Poon, W. and Fei, Z. (2012). Interactions between SIRT1 and MAPK/ERK regulate neuronal apoptosis induced by traumatic brain injury in vitro and in vivo. *Experimental Neurology*, 237(2), 489–498.
- Zhao, Y., Zhao, R., Wu, J., Wang, Q., Pang, K., Shi, Q., Gao, Q., Hu, Y., Dong, X., Zhang, J. and Sun, J. (2018). Melatonin protects against A β -induced neurotoxicity in primary neurons via miR-132/PTEN/AKT/FOXO3a pathway. *BioFactors*, 1–10.
- Zhu, Y., Chen, X., Chen, Z., Zeng, Y., Shi, G., Su, Y. and Peng, X. (2004). Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(12), 1606–12.

- Zingg, J.M., Hasan, S.T., Cowan, D., Ricciarelli, R., Azzi, A. and Meydani, M. (2012).
Regulatory effects of curcumin on lipid accumulation in monocytes/macrophages.
Journal of Cellular Biochemistry, 113(3), 833–840.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 28/01/2016-11887



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Kazime Gonca AKBULUT
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu K.Gonca AKBULUT, Arzu KESKİN AKTAN ve Hakan AKBULUT'tan oluşan, G.Ü.ET-16.008 kod numaralı ve "*Yaşlanma Sürecinde Hücre Ölüm Mekanizmalarının Araştırılması*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-16.008 and entitled "*The Investigation of Apoptosis Mechanisms During Aging Process*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://ehk.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Keskin Aktan, Arzu
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 29.04.1982, Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 530 602 03 23
 Faks : 0 (352) 324 00 04
 e-mail : arzu keskinaktan@gmail.com, aaktan@nny.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniv. / Fizyoloji A.D.	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniv. / Fizyoloji A.D.	2013
Lisans	Hacettepe Üniv. / FTR Bölümü	2004
Lise	Batıkent Lisesi (YDA)	2000

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016-Devam ediyor	Nuh Naci Yazgan Üniv. (Kayseri)	Öğretim Görevlisi
2015-2016	Toros Üniv. (Mersin)	Öğretim Görevlisi
2013-2015	Tübitak-1001 proje (113S256)	Bursiyer
2004-2013	Farklı kurum/kuruluşlarda	Fizyoterapist

Yabancı Dil

İngilizce (Mart 2017 YÖKDİL sınav puanı: 87,5)

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

Aktaş SH, Akbulut H, Elçin AE, Parmaksız M, Keskin-Aktan A, Çöleri Cihan A, Elçin YM, İçli F. (2016). Baculoviral vector loaded mesenchymal stem cells as efficient gene therapy tools for cancer treatment. Turkish Journal of Biology, 40, 1-8. (SCI-E)

Keskin-Aktan A, Akbulut KG, Yazıcı-Mutlu Ç, Sonugur G, Ocal M, Akbulut H. (2018). The effects of melatonin and curcumin on the expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats. Brain Research Bulletin, 137:306–310. (SCI)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan Bildiriler

Akbulut H, Aktaş SH, Elçin AE, Parmaksız M, Keskin-Aktan A, Çöleri Cihan A, Elçin YM, İçli F. (2016). Mesenchymal stem cell directed baculoviral gene therapy of colon cancer. Annual Meeting of the American-Society-of-Clinical-Oncology (ASCO), JUN 03-07, 2016, Chicago, IL.

Keskin-Aktan A, Akbulut KG, Akbulut H. Oxidative stress, FOXO3a and BIM expressions in aging cerebral cortex: modulation by curcumin. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), October 11-13, 2017, Gazi University, Turkey. Poster presentation (P74).

Keskin-Aktan A, Mutlu N, Şen H, Keskin Dilbay N, Yazıcı M, Şırayder U, Menevşe Ö. Investigation of relationship between reaction time and hand dexterity (Reaksiyon zamanı ile el beceri düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması). 1st International Health Science And Life Congress (IHSLC 2018), 02-05 May 2018, Burdur, Oral presentation (OP471).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Yazıcı-Mutlu Ç, Akbulut KG, Keskin-Aktan A. (2012). Yaşlanmada serebral korteks oksidatif stres ve melatonin ilişkisi. 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Trabzon.

Keskin-Aktan A, Akbulut KG, Yazıcı-Mutlu Ç, Güney Ş, Akbulut H. (2013). Orta yaşlı

sıçanlarda hipokampusta oksidatif stres ve bcl-2 ilişkisi. 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, İzmir.

Yazıcı-Mutlu Ç, Akbulut KG, Keskin-Aktan A, Akbulut H. (2013). Orta yaşlı sıçanlarda serebral kortekste oksidatif stres ve sirtuin 2 ilişkisi. 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, İzmir.

Yazıcı-Mutlu Ç, Akbulut KG, Keskin-Aktan A. (2013). Melatonin ve curcumin uygulamasının karaciğer dokusunda oksidatif stres üzerine etkisi. 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara.

Keskin-Aktan A, Akbulut KG, Yazıcı-Mutlu Ç. (2014). Melatonin, curcumin ve salermid uygulamalarının farklı beyin bölgelerinde oksidatif stres düzeyine etkisi. 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Kayseri.

Muratoğlu S, Akbulut KG, Keskin-Aktan A, Yazıcı-Mutlu, Ç. (2014). Yaşlı sıçanlarda melatonin ve curcumin uygulamasının testis dokularına etkisi. 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Kayseri

Akbulut KG, Keskin-Aktan A, Yazıcı-Mutlu Ç. (2015). Curcuminin yaşlı sıçan beyinde oksidatif stres düzeyine etkisi. 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Çanakkale.

Akbulut KG, Keskin-Aktan A, Yazıcı-Mutlu Ç, Akbulut H. (2015). Orta yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermid uygulamalarının hipokampus sirt2 düzeyine etkisi. 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Çanakkale.

Keskin-Aktan A, Akbulut KG, Akbulut H. Genç ve yaşlı sıçanlarda curcumin uygulamasının hipokampus SIRT2, BCL-2, BAX ve BIM ekspresyonlarına etkisi. 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 07-10 Eylül 2017, Denizli. Sözel bildiri SS02 (0118).

Keskin-Aktan A, Koçer MB, Demirtaş G, Aktar M, Karataş C, Koçak H, Keskin Dilbay N, Yazıcı M. Akut aerobik egzersizin reaksiyon zamanı ve el beceri düzeyine etkisi. 1 Nörolojik Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Kongresi, 29-31 Mart 2018, İzmir. Sözel Bildiri.

Projeler

Yaşlanma Sürecinde Beyinde Sirtuin Aktivitesi. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje kodu 01/2011-48 (Araştırmacı)

Sirtuin'in Beyinde Apoptoz Üzerine Etkisi. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje kodu 01/2011-49 (Araştırmacı)

Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Fenoksazin ve Fenotiyazin Yapılı Bileşiklerin Kullanımlarının Değerlendirilmesi ve Etki Mekanizmalarının Araştırılması. 113S256-TÜBİTAK-1001, 2013-2016 (Bursiyer)

Yaşlanma Sürecinde Hücre Ölüm Mekanizmalarının Araştırılması. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje kodu 01/2016-05 (Araştırmacı)

Yaşlanma Sürecinde Hücre Ölüm Mekanizmalarının Araştırılması. Proje kodu: 216S258-TÜBİTAK-3001, (01/03/2017-01/09/2018) (Bursiyer)



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

