GAZİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ (BAP)
PROJE KESİN RAPORU

PROJE KODU	**01/2016-05**
PROJE TÜRÜ	( ) Bağımsız Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) ( ) Yüksek Lisans (X) Doktora ( ) Tıpta Uzmanlık ( ) Altyapı Projeleri ( ) Çok Disiplinli Araştırma Projeleri ( ) Sanayi İşbirliği Projeleri
PROJE ADI	**Yaşlanma sürecinde hücre ölüm mekanizmalarının araştırılması**
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ	**PROF.DR. KAZİME GONCA AKBULUT**
PROJE EKİBİ	**PROF.DR. HAKAN AKBULUT** **Dr Öğrencisi, ARZU KESKİN AKTAN**
FAKÜLTE/ENSTİTÜ/YÜKSEK OKUL	**Tıp Fakültesi**
BÖLÜM/ANABİLİM/BİLİM DALI	**Temel Tıp Bilimleri/ Fizyoloji Anabilim Dalı**
RAPOR TARİHİ	**06.12.2017**

26 sayfadan oluşan bu rapordaki bilgilerin/belgelerin doğruluğunu kabul ediyorum.

İmza:

İÇİNDEKİLER **Sayfa**

1. **PROJE RAPORU……3**
2. **PROJE BÜTÇESİ ÖZET BİLGİLERİ……14**
3. **PROJE ÇIKTILARI ……15**
4. **PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ TARAFINDAN YAPILACAK GENEL DEĞERLENDİRME ……17**
5. **EKLER……18**

1. PROJE RAPORU

Özet

YAŞLANMA SÜRECINDE HÜCRE ÖLÜM MEKANIZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Güçlü bir radikal süpürücü, tümör supresörü ve anti-aging hormon olarak bilinen melatonin yaşlanmayla belirgin olarak azalır. Curcumin, anti-inflamatuar, anti-proliferatif ve anti-oksidan etkilere sahip bir polifenoldür. Sirtuinler, FOXO' lar ve BCL-2 ailesi de dahil olmak üzere çok sayıda proteinin ekspresyonlarındaki değişimler melatonin ve curcuminin nöroprotektif etkilerinin ortaya çıkmasına aracılık eder.

Bu çalışmada, melatonin (MEL; 10 mg/kg/gün, sc), curcumin (CUR; 30 mg/kg/gün, ip) ve salermid (sirtuin inhibitörü-SLM; 100µmol/µl/gün, ip) uygulamalarının genç ve yaşlı sıçan beyninde oksidatif stres, SIRT2, FOXO3a ekspresyonu ve apoptotik aktivite (BCL-2, BAX, BCL-2/BAX oranı ve BIM) üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmada, toplam 48 adet (3 aylık genç, n=24; 22 aylık yaşlı n=24) Wistar albino cinsi sıçan kullanılarak 8 grup oluşturuldu: Genç-Kontrol, Genç-MLT, Genç-CUR, Genç-SLM; Yaşlı-Kontrol, Yaşlı-MLT, Yaşlı-CUR, Yaşlı-SLM. Kontrol ve deney gruplarının enjeksiyonları 21 gün boyunca sürdürüldü. Deneyin 22. gününde sıçanlar feda edildi ve beyinde serebral korteks ve hipokampus dokuları izole edildi. Total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) ölçümleri ticari kitlerin kullanımı ile yapıldı ve TOS' un TAS' a oranlanması ile elde edilen 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 salermid uygulamaları, hipokampusta yaşlanmaya bağlı görülen tüm değişiklikleri tersine çevirdi. Serebral kortekste ise bu üç uygulamanın SIRT2 üzerine etkisi izlenmedi ancak melatonin uygulamasının yaşlanmada BIM, TOS ve OSI duzeylerini azalttığı, BCL-2 ve TAS düzeylerini ise arttırdığı görüldü. Curcumin ve salermid uygulamalarının yaşlanmada korteks FOXO3a, TOS, OSI düzeylerini azalttığı, BCL-2, BCL-2/BAX oranını ise arttırdığı bulundu.

Sonuç olarak, yaşlanmada eksojen melatonin ve curcumin uygulamaları, etkileri beyinde bölge spesifik olmak üzere oksidatif stres ve apoptotik aktiviteyi baskılayabilir. Dolayısıyla melatonin ve curcumin yaşlanmaya bağlı gelişen nörodejenerasyonun ve nöral kayıpların engellenmesinde yardımcı olabilir. Melatonin ve curcuminin nöroprotektif etkilerine, hücresel stres cevapların ve hücre ölüm mekanizmalarının düzenlenmesi gibi süreçlerde rol oynayan FOXO3a ve SIRT2 proteinlerinin inhibisyonu aracılık ediyor olabilir.

Anahtar kelimeler: Yaşlanma, apoptoz, BCL-2, sirtuin 2, FOXO3a

Abstract

INVESTIGATION OF CELL DEATH MECHANISMS IN AGING PROCESS

Melatonin, which is known as a powerful scavenger of radicals, tumor supressor and anti-aging hormone, significantly decreases with aging. Curcumin is a polyphenol which has anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-oxidant effects. Melatonin and curcumin can reveal their neuroprotective effects through altering the expressions of several proteins including sirtuins, FOXOs, and BCL-2 family.

In the current study, we investigated the effects of melatonin (MLT; 10 mg/kg/day, sc), curcumin (CUR; 30 mg/kg/day, ip), and salermide (sirtuin inhibitory- SLM; 100μmol/μl/day, ip) treatments on oxidative stress parameters, SIRT2, FOXO3a expression levels and apoptotic activity (BCL-2, BAX, BCL-2/BAX ratio and BIM) 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: Young-Control, Young-MLT, Young-CUR, Young-SLM; Aged-Control, Aged-MLT, Aged-CUR, Aged-SLM. The injections of the control and treatment groups were maintained for 21 days. On the 22nd day of the experiment, the rats were sacrificed and their brain tissues were removed. After removing the brains, tissues were sampled from the cerebral cortex and hippocampus. Total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) were measured using commercial kits. The ratio of TOS to TAS, i.e. the 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 completely reversed the age-related changes in the hippocampus. The effect of these three treatments on SIRT2 was not observed, but melatonin decreased BIM, TOS, OSI levels, and increased BCL-2 and TAS levels in aging. Curcumin and salermide administration decreased cortical FOXO3a, TOS, OSI levels, and increased BCL-2, BCL-2/BAX ratio in aging.

In sum, exogenous melatonin and curcumin treatments may suppress oxidative stress and apoptotic activity in aging brain, while their effects are region specific. Therefore, melatonin and curcumin may prevent neurodegeneration and neural losses due to aging. These neuroprotective effects of melatonin and curcumin seem to involve the inhibition of FOXO3a and SIRT2 proteins, the proteins that play a role in cellular stress responses and regulation of cell death mechanisms.

Key words: Aging, apoptosis, BCL-2, sirtuin 2, FOXO3a

Projenin Amacı, Önemi, Kapsamı ve Yapılan Çalışmaların Belirtilmesi

Amaç: Genç ve yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermid uygulamalarının serebral korteks ve hipokampusta oksidatif stres ve hücre ölüm mekanizmaları üzerine etkilerinin araştırılması.

Önem: Yaşlanma, başta nörodejeneratif hastalıklar ve kanser olmak üzere pek çok hastalık için önemli bir risk faktörüdür ve yaşlanma ile beyinde oksidatif stres, inflamasyon ve apoptotik aktivite artmaktadır. Dolayısıyla oksidatif stres ve apoptoz sürecinde rol oynayan yolakların aydınlatılması, bu yolakların aktivatör ve inhibitörlerinin belirlenmesi, nöral yaşlanmayı ve nörodejenerasyonu önlemeye yönelik stratejilerin geliştirilmesinde önem arz eder.

Kapsam ve Yapılan Çalışmalar:

Apoptoz ile yaşlanan hücrelerin ortadan kaldırılması doku homeostazının sağlanmasında önem taşır; ancak yaşlanmayla beraber nöronal ve glial hücrelerin sayısında ve sağkalım oranlarında azalma olduğu bilinmektedir (1). FOXO alt ailesinde yeralan FOXO1, FOXO3a, FOXO4, FOXO6 transkripsiyon faktörleri insulin/insulin-like growth factor(IGF) sinyal yolağında yer alır ve metabolizma, yaşlanma ve apoptotik süreçlerde düzenleyici role sahiptirler. mRNA düzeylerine bakıldığında FOXO1'in yağ dokuda, FOXO3'ün beyinde, FOXO4'ün kalpte, FOXO6'nın ise nöral gelişim evresinde yine beyinde bol miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir. FOXO' lar manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekpresyonlarını arttırarak hücrede metabolizma ve stres yanıtların düzenlenmesinde rol oynarken, diğer taraftan hücre döngüsü inhibitörü $p27^{kip1}$, p130, ve BIM gibi proapoptotik faktörlerin ekspresyonlarını arttırarak apoptozu da indükleyebilirler (2,3).

Uzun yaşam proteini olarak adlandırılan sirtuinler ise genom stabilitesini ve homeostazisi devam ettirme özelliği ile yaşam süresini arttırabilen, Nikotinamid Adenin Difosfat (NAD) bağımlı histon/protein deasetilaz ailesinin üyelerindendir (4). Memelilerde sirtuin ailesinin SIRT 1-7 olmak üzere yedi üyesi bulunur. Sirtuinlerin yaşa bağlı çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkileri gösterilmiştir (5,6). SIRT2 güçlü bir deasetilazdır ve beyinde bol miktarda eksprese edilir. Maxwell ve ark. SIRT2' nin yaşlı farelerde santral sinir sisteminde biriktiğini göstermiştir (7). Ayrıca, SIRT2 ekspresyonunun hidrojen peroksit tedavisi sonucu oksidatif stres ile arttığı ve artan SIRT2'nin FOXO3a deasetilasyonu ile BIM aracılı apoptozu indükleyebildiği gösterilmiştir (2). Dolayısıyla oksidatif stresle başa çıkmada SIRT2 aracılı FOXO3a deasetilasyonu etkili olabilir, ancak bu durum hücrenin maruz kaldığı stres düzeyiyle ilişkili olarak hücrenin ölümü-apoptozla da sonuçlanabilir.

Melatonin ve curcumin anti-oksidan ve anti-apoptotik özellikleri ile beyinde nöroprotektif etki göstermektedirler (8,9). Salermid ise sirtuinlerin (SIRT1 ve SIRT2) potansiyel inhibitörü olarak tanımlanmış ve in vitro olarak salermidin kanser hücrelerinde apoptotik etkili olduğu gösterilmiştir (10).

Yaşlanma ile beyinde SIRT2 ve FOXO3a düzeylerinin nasıl değiştiği, bu değişimlerin de yaşlanan nöronlarda apoptotik aktiviteyi nasıl etkilediği henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada genç ve yaşlı sıçanların serebral korteks ve hipokampus dokularında oksidatif stres, apoptotik markerlar (BCL-2, BAX, BIM), SIRT2 ve FOXO3a düzeylerinin ve bu değişkenler arasındaki olası ilişkilerin araştırılacak olması, yaşam süresinin belirleyicisi olan hücre ölüm mekanizmalarının aydınlatılmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca, melatonin ve curcumin tedavisinin yaşlanma sürecinde bu değişkenler üzerine etkilerinin gösterilecek olması yeni tedavi hedeflerinin ortaya çıkarılmasında temel teşkil edebilecektir.

Kaynaklar:

1. Savory J., Rao JK., Huang Y., Letada PR., Herman MM. (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), 805-817.
2. Wang F., Nguyen M., Qin FX., Tong Q. (2007). SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell,* 6(4), 505-14.
3. Luo H., Duan J., Wu P., Jiang Q., 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.
4. Michian S., Sinclair D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J,* 404,1–13.
5. Bishop NA., Lu T., Yankner BA. (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature,* 464, 529-35.
6. Donmez G., Guarente L. (2010). Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell,* 9(2), 285-90.
7. Maxwell MM., Tomkinson EM., Nobles J., Wizeman JW., Amore AM., Quinti L., Chopra V., Hersch S. M., Kazantsev AG. (2011). The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Hum Mol Genet,* 20, 3986–3996.
8. Akbulut K.G., Gonul B., Akbulut H. (2008). Exogenous melatonin decreases age-induced lipid peroxidation in the brain. *Brain Res,* 1238, 31–35.
9. Siddique YH., Naz F., 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 Res Int,* 606928.
10. Lara E., Mai A.,Calvanese V., Altucci L., Lopez-Nieva P., Martinez-Chantar ML. (2009). Salermide, a sirtuin inhibitor with a strong cancer-spesific proapoptotic. *Oncogene,* 28, 781-791.

Projenin Yöntemi

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. Sıçanların temini ve bakımı G.Ü. Laboratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel araştırmaları Merkezi (GÜDAM) tarafından sağlandı ve tüm hayvanların bakımı eşit aydınlık/karanlık siklusunda olacak şekilde standart laboratuvar koşullarında altında yapıldı.

Çalışmamız için genç ve yaşlı sıçan grupları içinde birer adet kontrol (KNT), melatonin (MLT), curcumin (CUR) ve salermid (SLM) grupları bulunmak üzere toplam 8 grup oluşturuldu. Çalışmada kullanılan kontrol ve deney grupları, eksojen uygulaması yapılan maddelerin dozları ve enjeksiyon yolları Çizelge 1' de özetlenmiştir. Melatonin (M5250-1G, Sigma-Aldrich, Germany) önce etanolde içinde çözülüp sonra fosfat tamponu (PBS, pH 7,4) ile dilüe edilerek (% 1 etanol-PBS), curcumin (C1386-5G, Sigma-Aldrich, Germany) ve salermid (13178, Cayman Chemical Company, USA) ise önce dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülüp sonra PBS ile dilüe edilerek (% 4 DMSO-PBS) hazırlandı. Genç ve yaşlı kontrol gruplarına ise sadece uygun hacimlerde % 1 etanol-PBS verildi. Melatonin, curcumin ve salermid için günlük enjeksiyon dozları melatonin için 10 mg/kg, curcumin için 30 mg/kg, ve salermid için 100 µmol/µl olarak belirlendi. PBS ve melatonin uygulamaları subkuten (sc) yoldan, curcumin ve salermid uygulamaları ise intraperitoneal (ip) yoldan yapıldı. Enjeksiyonlar günde bir kez, saat 17:00' da yapılmak üzere 21 gün boyunca sürdürüldü.

Çizelge 1. 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 µmol/µl	% 1 etanol-PBS	10 mg/kg	30 mg/kg	100 µmol/µl
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: salermid)

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. Derhal sıvı nitrojende dondurulan izole dokular ilgili parametreler çalışılıncaya 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.

SDS-PAGE / Western blot yöntemi ile protein ekspresyonlarının gösterilmesi

SIRT2, FOXO3a, BIM, BAX, BCL-2 ve yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktin proteinlerinin ekspresyonları sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) / Western blot yöntemi ile gösterildi (1). Bu yöntem için öncelikle serebral korteks ve hipokampus dokuları lizis tamponu (RIPA: radioimmunoprecipitation assay buffer) ile homojenize edildi ve elde edilen supernatanlardaki total protein düzeyleri (mg/ml) Bradford metodu ile ölçüldü (2).

Her örnekten eşit miktarda alınan protein (20 µg), SDS-PAGE ile % 6-12' lik jellerde moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırıldı ve ardından nitrosellüloz membrana transferi yapıldı (Ek 1- Resim 1, 2). Membranlar % 5 yağsız süt tozu içeren TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20) ile +4 ºC' de gece boyu bloklandı. Membranların primer ve HRP (horseradish peroxidase)-konjuge sekonder antikorlar ile inkübasyonu % 5 yağsız süt tozu yada sığır serum albumini (BSA) içeren TBST içinde, oda sıcaklığında ve 1,5 saat süre ile yapıldı. Primer ve sekonder antikorların dilüsyon oranları imalatçı firmanın önerdiği protokole göre optimize edildi. Bloklama, primer ve sekonder antikorlar ile inkübasyon işlemleri arasındaki tüm membran yıkamaları 3 kez, 5 dk olacak şekilde yine TBST kullanılarak yapıldı.

Membranların son yıkama işlemini takiben kemilüminesans çalışma kiti (ECL: enhanced chemiluminescence) kullanılarak, karanlık odada, X-ray film üzerinde proteinlere spesifik bantların görünür hale gelmesi sağlandı. Bu şekilde elde edilen bantların yoğunlukları 'Image J' programı kullanılarak hesaplandı (Windows version of NIH Image, http://rsb.info.nih.gov/nih-image/). Son olarak, tüm proteinler için ölçülen bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktin' e oranlanarak standardize edildi.

FOXO3a ve SIRT2 protein miktarlarının sandviç ELISA metodu ile ölçümü

FOXO3a ve SIRT2 düzeylerinin kantitatif ölçümleri ticari ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) kitlerinin (Rat Forkhead Box O3A (FOXO3A) ELISA Kit- MBS9305817, MyBioSource, Inc., CA, USA; Rat Sirt2 ELISA Kit-ER0299, Wuhan Fine Biological Tech., Wuhan, CHINA) kullanımı ile belirlendi (Ek 1- Resim 3, 4). Doku homojenizasyonu ve elde edilen homojenatlardan FOXO3a ve SIRT2 ve protein düzeylerinin belirlenmesinde imalatçı firmanın önerdiği protokol takip edildi. Kit vasıtası ile örneklerden ölçülen FOXO3a ve SIRT2 protein miktarları, Bradford yöntemi ile ölçülen total protein miktarlarına (mg/ml) oranlanarak standardize edildi ve sonuçlar FOXO3a için pg/ml, SIRT2 için ng/ml şeklinde ifade edildi.

Dokuda oksidatif stres düzeyinin gösterilmesi

Serebral korteks ve hipokampus dokularında oksidatif stres düzeyinin belirlenmesi amacıyla total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) ölçüm kitleri (RL0024, RL0017, Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, TURKEY) kullanıldı.

TOS ve TAS tayinlerinlerinde 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 süpernatanlar - 80°C' de muhafaza edildi. Süpernatanlarda TOS ve TAS kitlerinin çalışılmasında imalatçının önerdiği protokol ve ilgili literatür referans alındı (3,4) (Ek 1- Resim 5). Ayrıca TOS ve TAS ölçümleri kullanılanılarak oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı.

OSI, oksidatif stres düzeyinin göstergesi olarak kabul edilir ve TOS değerlerinin TAS değerlerine oranlanması ile bulunan birimsiz (AU: arbitrary unit) bir parametredir. Hesaplamada önce TAS birimi (mmol Trolox Equiv./L), µmol Trolox Equiv./L şekline dönüştürüldü ve OSI = [(TOS, µmol H2O2 Equiv./L) / (TAS, µmol Trolox Equiv./L) × 100] formülü kullanılarak hesaplama yapıldı (5,6).

Kullanılan İstatistiksel Yöntem

Çalışmamızdaki verilerin değerlendirilmesinde ''SPSS 15.0 for Windows'' programı kullanıldı. Yaş ve madde etkisini incelemek için 2 (Yaş: Genç - Yaşlı) x 4 (Grup: Kontrol - Melatonin - Curcumin - Salermid) 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.

Kaynaklar

1. Towbin H, Staehelint T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 76:4350–4354.
2. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254.
3. Erel O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem 37:277–285.
4. Erel O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem 38:1103–11111.
5. Yanik M, Erel O, Kati M. 2004. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. ACTA Neuropsychiatr 16:200–203.
6. Deska M, Romuk E, Anna O, Grzegorz S, Witold B, Dominika T, Birkner E, Gawrychowski J. 2017. Oxidative stress and angiogenesis in primary hyperparathy- roidism. Eur Surg 49:118–126.

Projenin Sonuçları/Bulguları

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 salermid uygulamalarının ise yaşlı kontrollere kıyasla hipokampus dokusunda SIRT2 ekpresyonunu anlamlı olarak azalttığı görüldü ($p < 0,05$) (Çizelge 1, 2) (Ek 2- Şekil 1 A, B). Yaşlı grupta melatonin, curcumin ve salermid uygulamalarının korteks SIRT2 ekpresyonuna anlamlı düzeyde etkisi izlenmedi. Ayrıca gençlerde melatonin, curcumin ve salermid uygulamalarının genç kontrollere kıyasla her iki beyin bölgesinde de anlamlı bir etki oluşturmadığı görüldü.

ELISA yöntemi ile ölçülen SIRT2 (ng/mg proterin) sonuçları ile western blot sonuçları 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 salermid uygulamalarının hipokampusta SIRT2 düzeyini anlamlı olarak azalttığı bulundu ($p < 0,05$) (Çizelge 1, 2) (Ek 2- Şekil 1 C, D). Ayrıca, ELISA sonuçlarına göre korteks ve hipokampus SIRT2 düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon olduğu görüldü ($r = 0,309$; $p = 0,039$)

FOXO3a ekspresyonlarındaki değişimler

Western blot sonuçları serebral korteks ve hipokampus FOXO3a ekpresyonlarının 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 ($p < 0,05$) (Çizelge 1, 2) (Ek 2- Şekil 2 A, B). Yaşlı kontrol grubuna kıyasla, yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermid uygulamalarının hipokampusta; curcumin ve salermid 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 salermid uygulamalarının ise bu etkiyi tersine çevirdiği görüldü ($p < 0,05$) (Çizelge 1) (Ek 2- Şekil 2 C). Ayrıca gençlerde salermid 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 (Çizelge 2) (Ek 2- Şekil 2 D).

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 $r = 0,417$; $p < 0,001$).

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 $r = 0,323$; $p = 0,033$) ve yaşlanma ile serebral kortekste BIM ekspresyonlarının anlamlı olarak artarken, yaşlılarda melatonin uygulamasının bu etkiyi anlamlı olarak tersine çevirdiği görüldü ($p < 0,05$) (Çizelge 1) (Ek 2- Şekil 3 A). Hipokampusta ise kontrol ve deney grupları arasında anlamlı düzeyde farklılaşma saptanmadı (Çizelge 2) (Ek 2- Şekil 3 B).

BAX ekspresyonlarındaki değişimler

BAX ekpresyonları (BAX/β-aktin) açısından serebral kortekste gruplar arası anlamlı farklılaşma izlenmezken (Ek 2- Şekil 4 A) (Çizelge 1), hipokampusta yaşlanma ile BAX ekspresyonlarının anlamlı olarak arttığı, yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermid uygulamalarının ise BAX ekpresyonunu anlamlı olarak azalttığı bulundu ($p < 0,05$) (Çizelge 2) (Ek 2- Şekil 4 B). Genç kontrol grubuna kıyasla genç deney gruplarının hipokampus BAX ekspresyonlarında anlamlı farklılaşma görülmedi.

BCL-2 ekspresyonlarındaki değişimler

BCL-2 ekpresyonları 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 ekpresyonlarının anlamlı olarak azaldığı, buna karşılık yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermid uygulamalarının BCL-2 ekspresyonlarını anlamlı olarak arttırdığı görüldü ($p < 0,05$) (Çizelge 1, 2) (Ek 2- Şekil 5 A, B). Ayrıca, genç kontrol grubuna kıyasla genç sıçanlarda salermid uygulamasının her iki beyin bölgesinde, curcumin uygulamasının ise sadece hipokampusta olmak üzere BCL-2 ekpresyonunu anlamlı olarak arttırdığı görüldü ($p < 0,05$). Genç sıçanlarda melatonin uygulamasının ise anlamlı düzeyde etkisi görülmedi.

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 salermid uygulamalarının her iki beyin bölgesinde, melatonin uygulamasının

ise sadece hipokampusta BCL-2/BAX oranını anlamlı olarak arttırmada etkili olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Çizelge 1, 2) (Ek 2- Şekil 6 A, B). Genç kontrol ve genç deney grupları arasında her iki beyin bölgesi için de anlamlı farklılaşma saptanmadı.

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 salermid uygulmalarının TOS düzeylerini anlamlı olarak azalttığı bulundu ($p < 0,05$) (Çizelge 1, 2) (Ek 2- Şekil 7 A, B). 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 ($p < 0,05$) (Çizelge 1, 2) (Ek 2- Şekil 7 C, D). Buna karşılık, yaşlı sıçanlarda melatonin ve salermid 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, µmol H2O2 Equiv./L) / (TAS, µmol Trolox Equiv./L) × 100] şeklinde hesaplandı ve her iki beyin bölgesinde OSI değerlerinin yaşlanma ile anlamlı olarak arttığı görüldü ($p < 0,05$) (Çizelge 1, 2) (Ek 2- Şekil 7 E, F). Buna karşlık, hem genç hem de yaşlı sıçanlarda melatonin, curcumin ve salermid uygulamalarının yine her iki beyin bölgesinde OSI değerlerini anlamlı olarak azaltmada etkili olduğu bulundu ($p < 0,05$) (Çizelge 1, 2) (Ek 2- Şekil 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, $r = 0,744$; $p < 0,001$, $r = 0,482$; $p = 0,001$, $r = 0,448$; $p = 0,003$, $r = -0,641$; $p < 0,001$, $r = -0,605$; $p = 0,014$).

Çizelge 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_2O_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 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_2O_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.*

1. PROJE BÜTÇESİ ÖZET BİLGİLERİ

Proje Süresi: 18 (Ay)				
Başlama Tarihi	**Bitiş Tarihi**	**Ek Süre (Ay)**	**Ek Süre Dahil Bitiş Tarihi**	**Toplam Proje Süresi (Ay)**
06/04/2016	05.01.2018			18

Proje Bütçesi: 15000 TL		
Harcanan	**Kalan**	**Ek Bütçe**
14185	815	-

2. PROJE ÇIKTILARI

(Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nde istenilen hususlar dikkate alınarak aşağıdaki başlıklar açıklanmalı ve yönergede belirtilen belgeler eklenmelidir.)

Yazılı Ürünler

(Kitap, uluslar arası/ulusal dergilerde yayımlanan makaleler, uluslar arası/ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler ve posterler, teknik raporlar, kısa notlar vb. dokümanlar. Yayınlanan, yayınlanacak olan ve gelecekte yayınlanabilir olan ürünler belirtilir, yazılı ürün ve belgeler eklenir.)

1. Arzu Keskin-Aktan, K. Gonca Akbulut, Hakan Akbulut. **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).** (Bildiri özeti Ek-3' te sunuldu)

2. Arzu Keskin-Aktan, K. Gonca Akbulut, Hakan Akbulut. **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).** (Bildiri özeti Ek-4' te sunuldu)

Proje Konusu Olarak Yüksek Lisans veya Doktora Konusu Olan Tezler

(Yüksek lisans ve doktora tezleri proje kodu, öğrencinin ve tezin adı belirtilerek listelenmelidir. Tezlerin tamamlanmış veya devam ediyor durumda olmaları belirtilmelidir ve eklenmelidir.)

1. Proje kodu: 01/2016-05
   Doktora tezi (devam ediyor)
   Tezin Adı: Yaşlanma sürecinde hücre ölüm mekanizmalarının araştırılması
   Öğrencinin Adı Soyadı: Arzu Keskin Aktan

Yazılım ve Donanım Ürünleri;

(Proje sonucunda ortaya çıkan yazılımlar listelenerek, donanım ürünleri ise şema veya resimlendirilerek sunulmalıdır.)

Patent(ler) / Faydalı Model(ler)

(Proje kapsamında alınan yada alınması planlanan patent varsa adı ve numaraları ile belirtilmelidir.)

Proje Sonunda Ortaya Çıkan Ürün Hakkında Bilgiler

(Proje sonunda ortaya çıkan ürüne ait teknik resim, prototip fotoğrafları, uygulama şekilleri ve teknik özellikleri belirtilir.)

Üniversiteye, Ülkeye ve/veya Bilime Sağlanan Katkılar
Bu bölüme proje faaliyetleri neticesinde elde edilen yararlar eklenmelidir

Çalışmamızda beyin yaşlanmasıyla ilişkili olan SIRT2 ve FOXO3a gibi proteinlerin ve hücre ölümü-apoptoz yolaklarında yer alan BCL-2 aile üyelerinin rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ayrıca melatonin ve curcumin tedavilerinin yaşlanmada bu protein ve yolaklar üzerine de etkisi gösterilmiştir. Yaşlanma sürecini ve hücre ölüm mekanizmalarını sadece bu çalışmada araştırdığımız proteinler ve oksidatif stres göstergeleri üzerinden açıklamak elbette tek başına yeterli değildir, ancak bu çalışma ile ortaya konan muhtemel ilişkiler özellikle beyin yaşlanmasının aydınlatılmasına önemli bir katkı sağlamaktadır ve yaşlanmanın geciktirilmesi, nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi konusunda yeni tedavi yaklaşımlarının oluşturulmasında da temel oluşturabilecektir. Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerdeki yaşlı popülasyonda ve buna paralel olarak kanser, kronik hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıkların insidansında belirgin bir bir artış olduğu göz önüne alındığında yaşlanmayla ilgili yapılan tüm araştırmaların büyük önem arz ettiği söylenebilir.

3. PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ TARAFINDAN YAPILACAK GENEL DEĞERLENDİRME

(Bu bölümde, projenin kabulünden itibaren geçen süre ve süreçler, yazışmalar ve değerlendirmelerle ilgili karşılaşılan sorunlar özetlenir. Bu kısmın sonunda BAP süreçleri ile ilgili öneriler de BAP Komisyonuna iletilmek üzere sunulabilir.)

ÖNERİ

Proje değerlendirilmeleri uzun süre almaktadır.

BAP projeleri diğer üniversitelerde olduğu gibi hızlı destek olarak farklı bütçe, multidisipliner olarak bütçe sınırlaması olmaksızın değerlendirilmelidir.

Satın alma aşamasında araştırıcı teknik şartname yazılması halinde istediği malzemeyi seçebilmelidir.

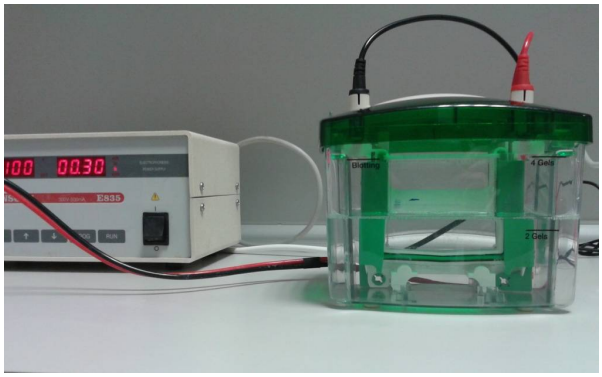
AÇIKLAMA

Doktora öğrencisi Arzu Keskin Aktan tez savunma şartı olan yurtdışı yayını henüz gerçekleştiremediği için tez kapağı ve sınava girememektedir. Ancak proje çalışmaları tamamlanmıştır. Makale yazılmış ve revize aşamasındadır. Kesin raporun yüklenmesi aşamasında onay lama işlemini gerçekleştirme amacıyla bu açıklama yapılmıştır.

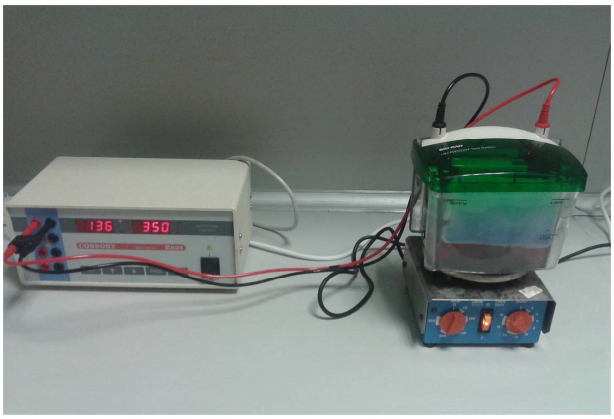
4. EKLER

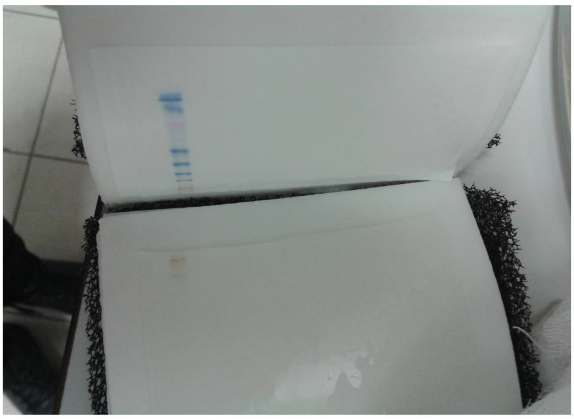
Proje ile ilgili her türlü çizim, resim, fotoğraf, plan vb. gibi dokümanlar var ise bu bölüme eklenmelidir.

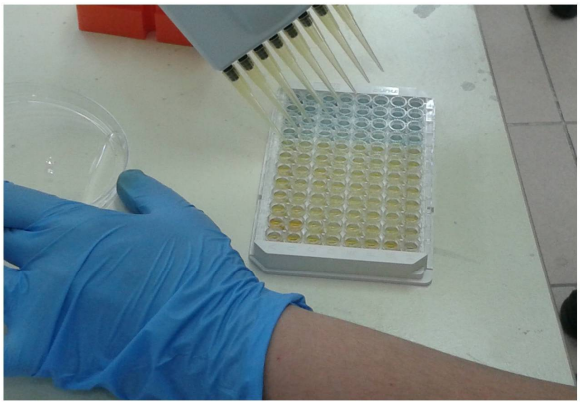
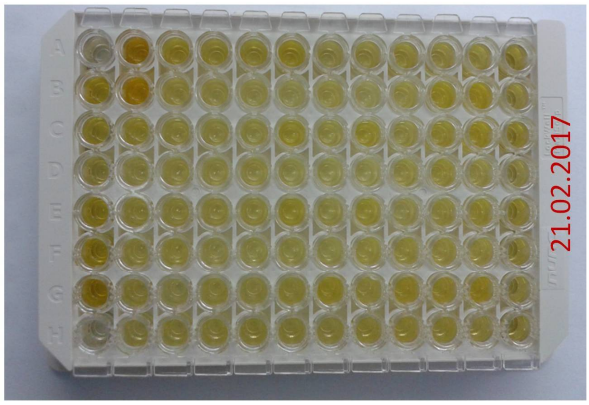
EK 1- Resimler:



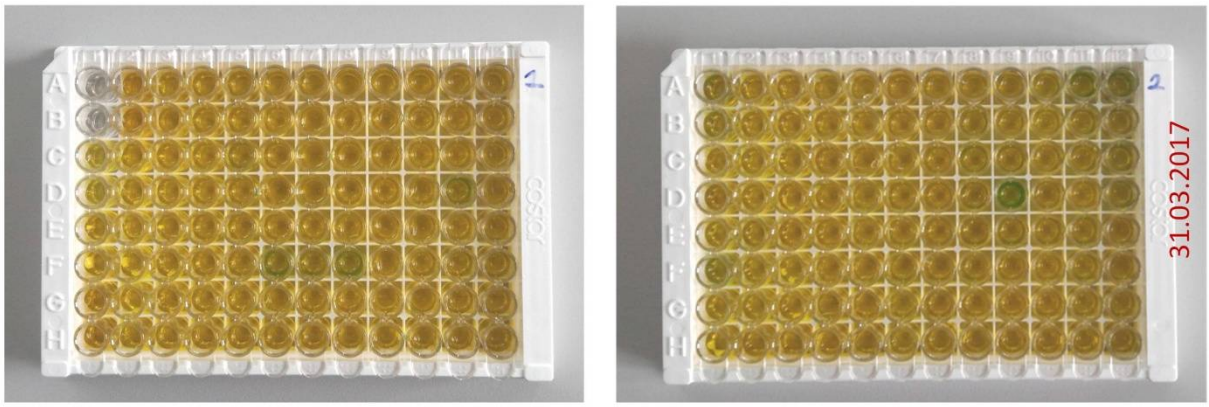
Resim 1. Jel elektroforezi



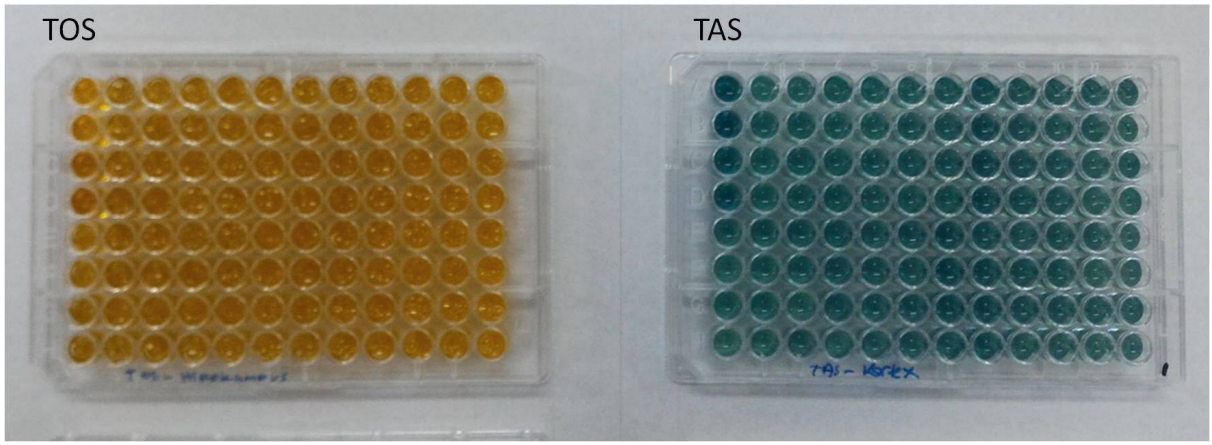

Resim 2. Transfer işlemi (Blotlama)

Resim 3. FOXO3a ELISA uygulaması

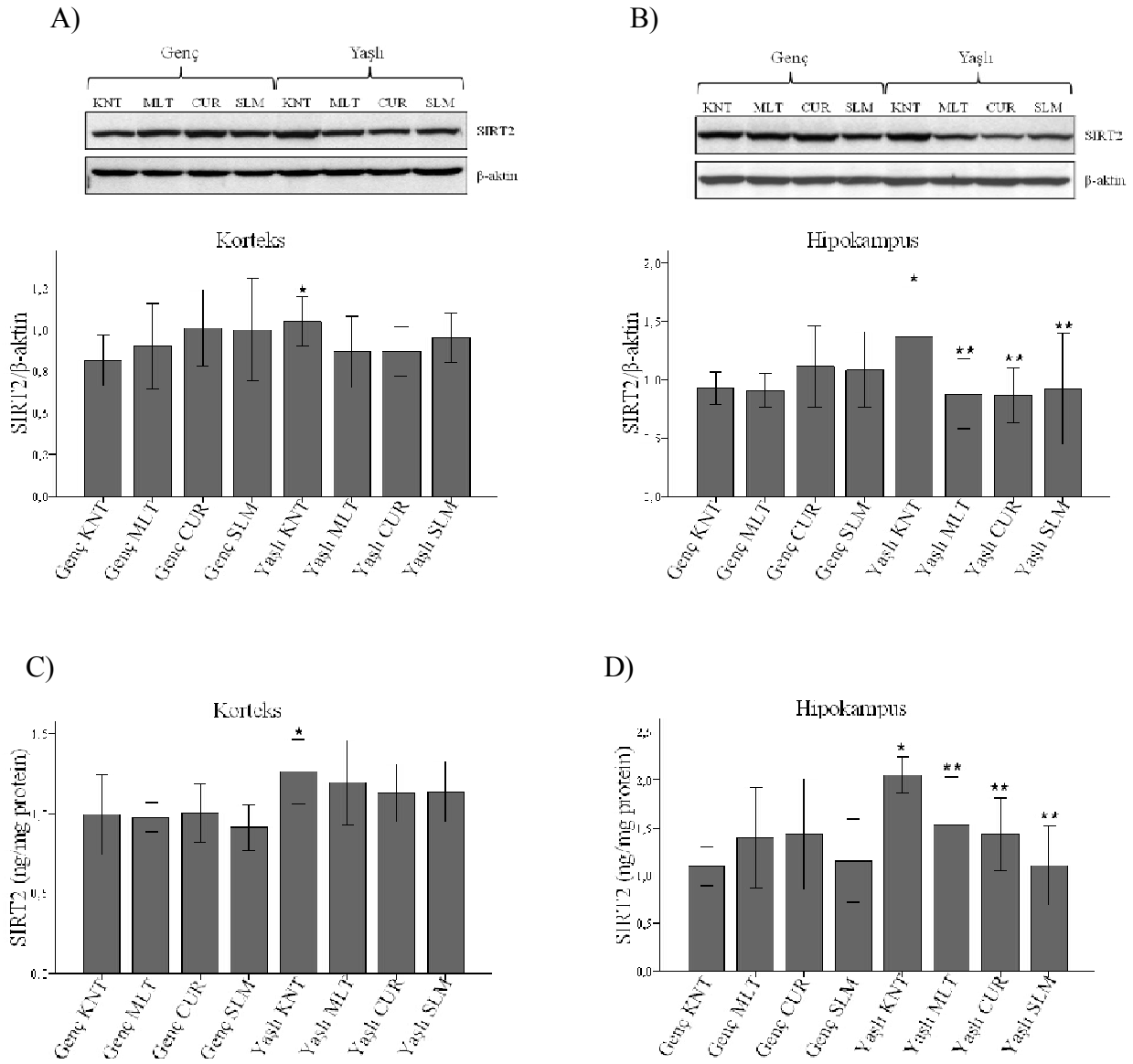


Resim 4. SIRT2 ELISA uygulaması

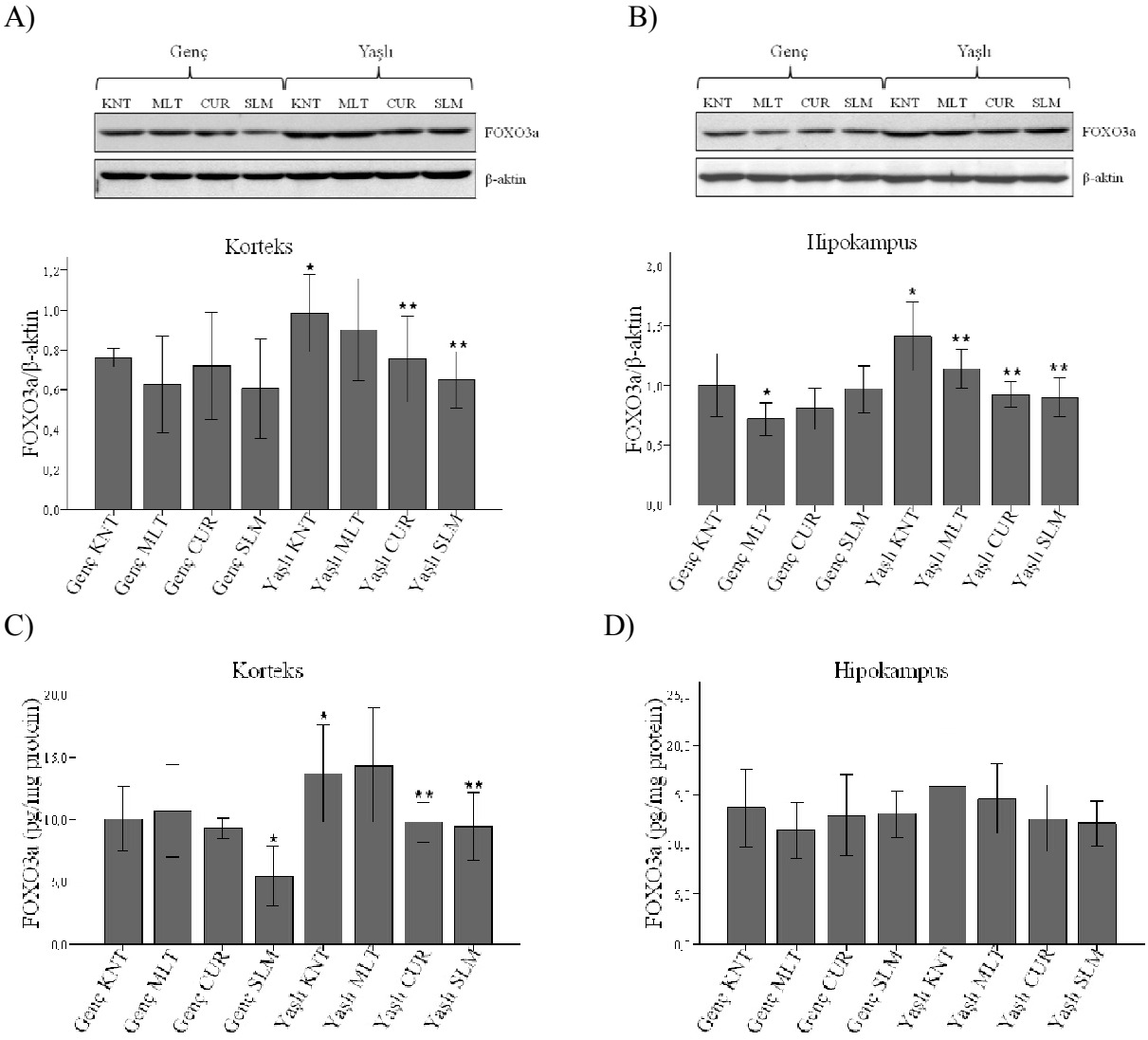


Resim 5. TOS ve TAS tayini

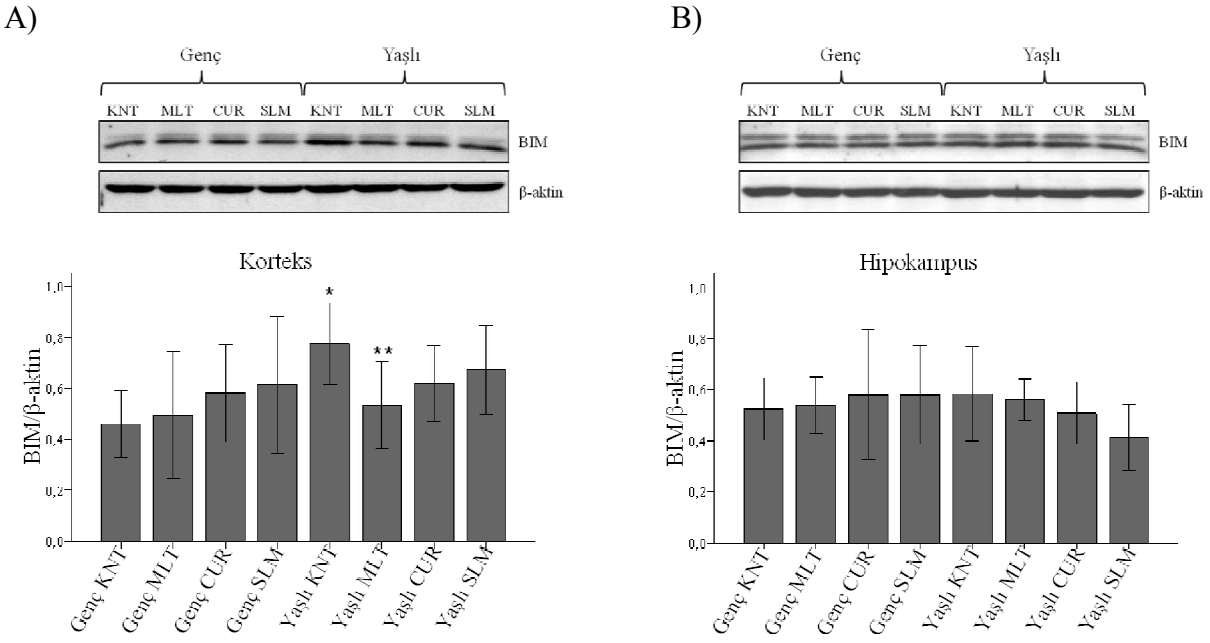
EK 2- Şekiller:



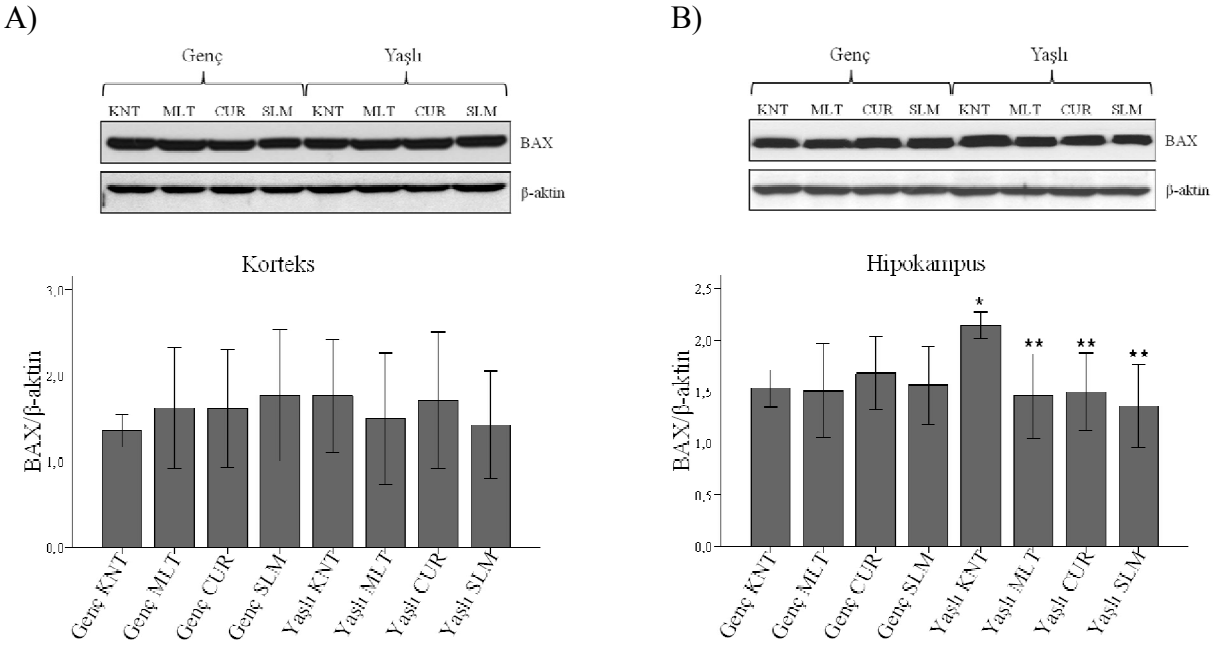
Şekil 1. SIRT2 ekspresyonlarındaki değişimler. Western blot yöntemi ile gösterilen (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularına ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktine oranlanarak (SIRT2/β-aktin) standardize edilmiştir (Her bir grup için n = 6). Sandviç ELISA yöntemi ile ölçülen (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: salermid)



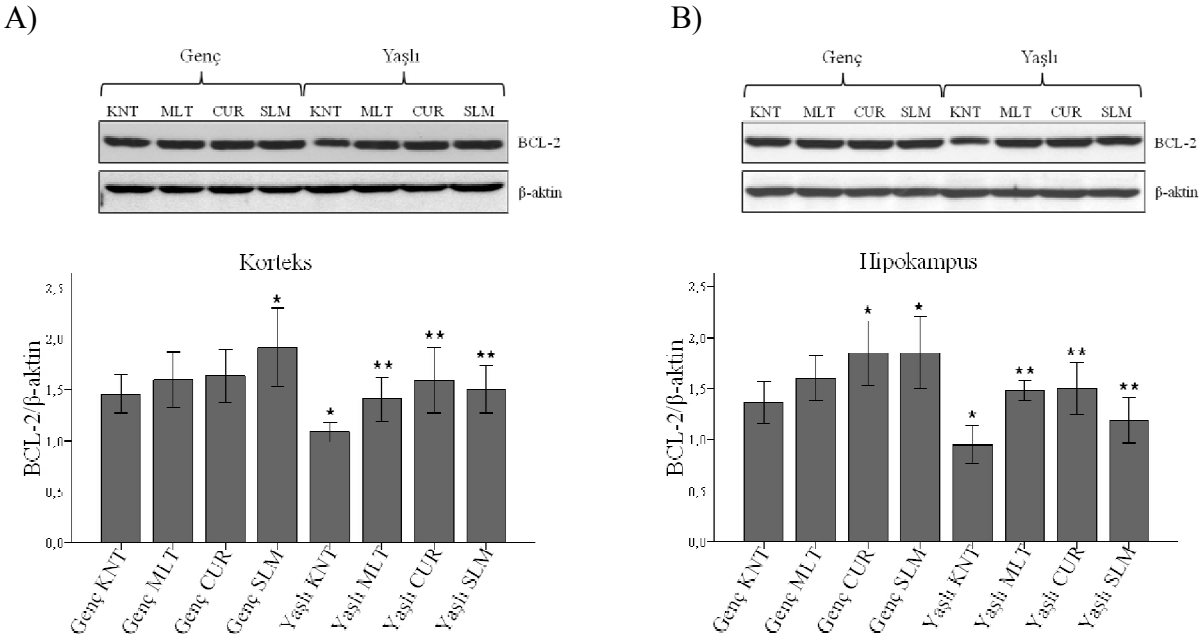
Şekil 2. FOXO3a ekspresyonlarındaki değişimler. Western blot yöntemi ile gösterilen (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularına ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktine oranlanarak (FOXO3a/β-aktin) standardize edilmiştir (Her bir grup için n = 6). Sandviç ELISA yöntemi ile 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: salermid)



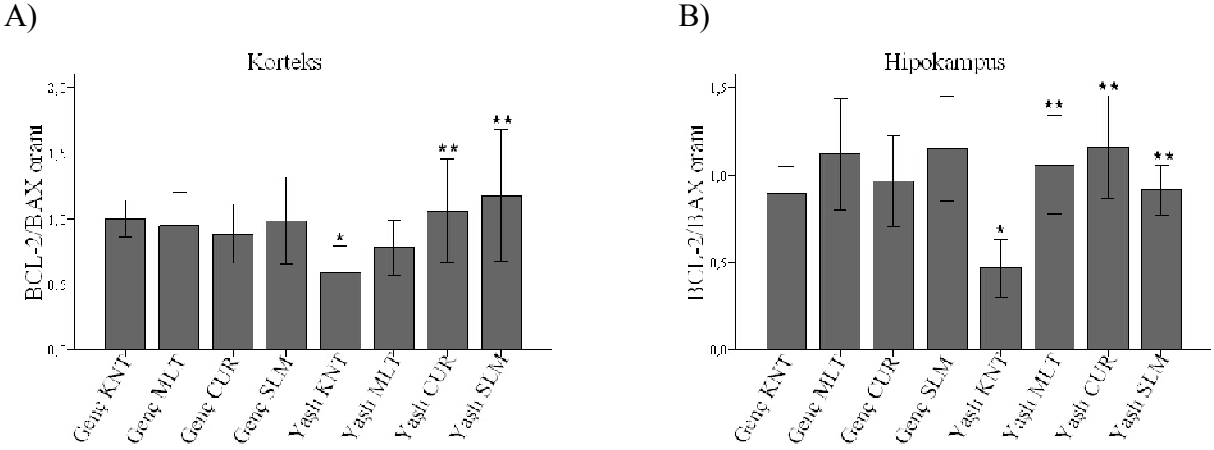
Şekil 3. BIM ekspresyonlarındaki değişimler. Western blot yöntemi ile gösterilen (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularına ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktine oranlanarak (BIM/β-aktin) standardize edilmiştir (Her bir grup için n = 6). **Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla p < 0,05 düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir.* (KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermid)



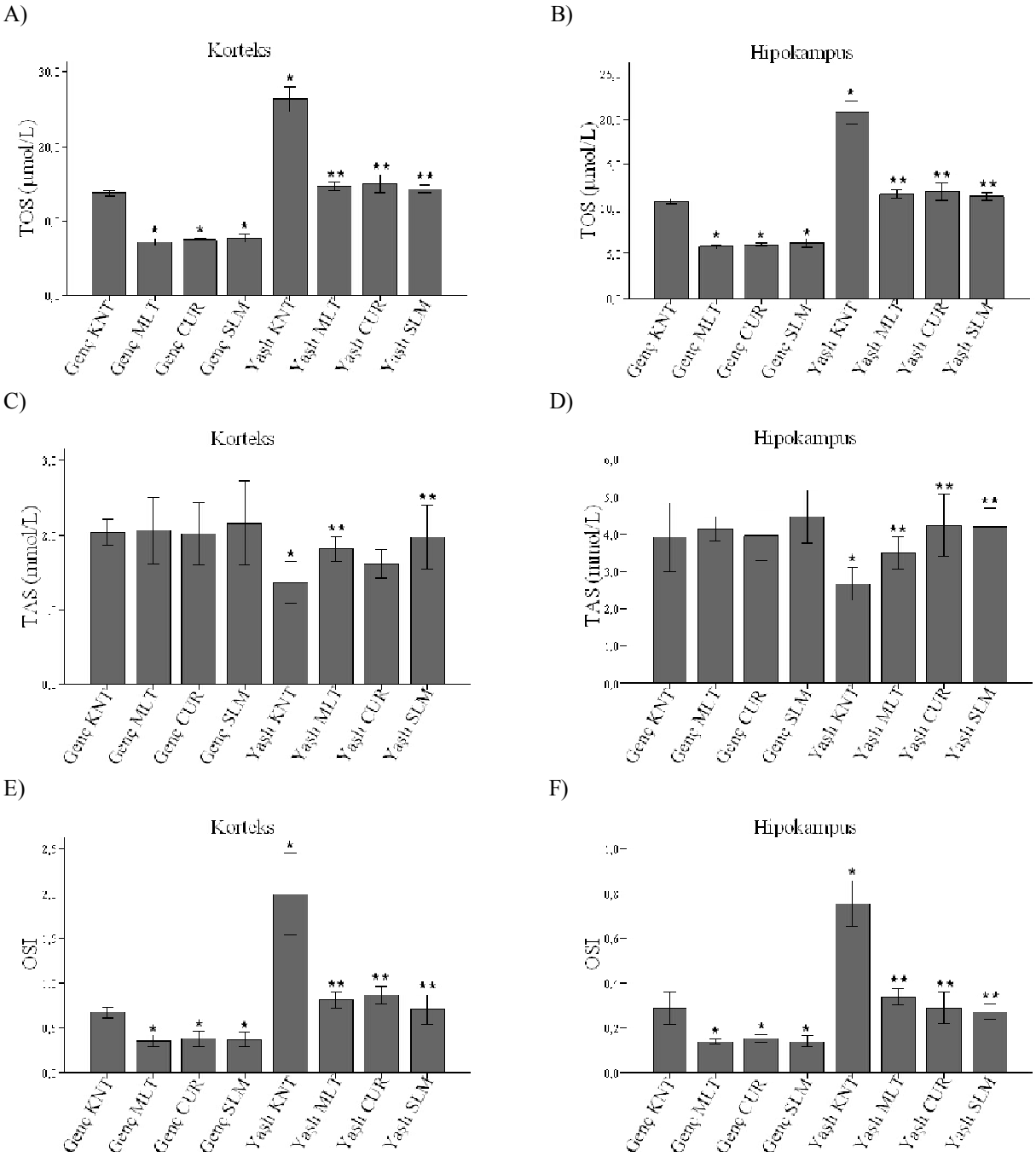
Şekil 4. BAX ekspresyonlarındaki değişimler. Western blot yöntemi ile gösterilen (A) serebral korteks ve (B) hipokampus dokularına ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β-aktine oranlanarak (BAX/β-aktin) standardize edilmiştir (Her bir grup için n = 6). **Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla p < 0,05 düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir.* (KNT: kontrol; MLT: melatonin; CUR: curcumin; SLM: salermid)



Şekil 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: salermid)



Şekil 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: salermid)



Şekil 7. TOS, TAS ve OSI değişimleri. (A, B) Her iki beyin bölgesi için de ölçülen total oksidan seviyeler (TOS) µmol H_2O_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 OSI = [(TOS, µmol H_2O_2 Equiv./L) / (TAS, µmol Trolox Equiv./L) × 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: salermid)

EK-3

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği
43. Ulusal Fizyoloji Kongresi
Pamukkale Üniversitesi Kongre Merkezi
07-10 Eylül 2017

SS02

Genç Ve Yaşlı Sıçanlarda Curcumin Uygulamasının Hipokampus SIRT2, BCL-2, BAX Ve BIM Ekspresyonlarına Etkisi

Arzu Keskin Aktan[1] , K. Gonca Akbulut[2] , Hakan Akbulut[3]

[1] Nuh Naci Yazgan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Kayseri

[2] Gazi Ünversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara

[3] Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, Ankara

GİRİŞ-AMAÇ: Curcumin, anti-apoptotik, anti-oksidan ve anti-aging özellikleri gösterilmiş doğal bir polifenoldür. SIRT2' nin farmakolojik inhibitörleri beyinde nöroprotektif etkili görünmektedir ve curcuminin hipokampusta SIRT2 protein ekspresyonuna etkisi çalışılmamış, apoptotik süreçle olan ilişkisi yeterince aydınlatılmamıştır. Bu çalışmamızda genç ve yaşlı sıçanlarda curcumin uygulamasının hipokampusta SIRT2, anti-apoptotik BCL-2 ve pro-apoptotik BAX, BIM ekspresyonlarına etkisini göstermeyi amaçladık.

YÖNTEMLER: Bu çalışmada, toplam 24 adet (3 aylık genç, 22 aylık yaşlı), wistar albino cinsi, erkek sıçanlar kullanılarak (1) Genç-kontrol, (2) Genç-curcumin, (3) Yaşlı-kontrol, (4) Yaşlı-curcumin grupları oluşturuldu. Curcumin dozu 30 mg/kg/gün olarak belirlendi ve dimetilsülfoksitte çözülerek hazırlandı. Kontrol ve curcumin gruplarının intraperitoneal enjeksiyonları 21 gün boyunca sürdürüldü. Hipokampus dokularında SIRT2, BCL-2, BAX ve BIM ekspresyonları Western blot yöntemi ile gösterildi. Ayrıca,sandviç ELISA yöntemiyle SIRT2 için protein miktarı ölçümü yapıldı. İstatistiksel analiz için ANOVA, LSD ve Pearson r'si kullanıldı ve $p < 0,05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

BULGULAR: Yaşlanma ile hipokampusta SIRT2 ve BAX ekspresyonlarının arttığı, BCL-2 ve BCL-2/BAX oranının ise azaldığı, buna karşı- lık yaşlı sıçanlarda curcumin uygulamasının bu etkiyi anlamlı olarak tersine çevirdiği görüldü ($p < 0,05$). SIRT2 için ELISA sonuçları da Western blot bulguları ile benzer bulundu ($p < 0,05$). Ayrıca SIRT2 ile BAX arasında pozitif, SIRT2 ile BCL-2/BAX oranı arasında ise negatif yönde korelasyon bulundu ($p < 0,05$). BIM ekspresyonlarında ise gruplar arası anlamlı bir farklılaşma saptanmadı.

SONUÇ: Curcumin yaşlanmada hipokampal apoptozu baskılayarak nöral kayıpları engelleyebilir ve curcuminin nöroprotektif etkisinde SIRT2 inhibisyonu rol oynuyor olabilir.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (proje kodu. 01/2016-05).

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, BCL-2, Curcumin, Hipokampus, SIRT2

EK-4

P74

OXIDATIVE STRESS, FOXO3A AND BIM EXPRESSIONS IN AGING CEREBRAL CORTEX: MODULATION BY CURCUMIN

Arzu Keskin-Aktan[1], K. Gonca Akbulut[2], Hakan Akbulut[3]

[1] Health Science Faculty, Nuh Naci Yazgan University, Kayseri, Turkey
[2]Department of Physiology, School of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey
[3]Department of Internal Medicine, School of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

Curcumin is a polyphenol derived from turmeric (Curcuma longa), which is known to have anti-oxidant, anti-apoptotic and anti-aging activity. FOXO transcription factors play crucial role in stress resistance, cell cycle arrest and apoptosis. In the current study, we investigated the effects of curcumin treatment on oxidative stress parameters, FOXO3a and pro-apoptotic BIM expressions in the cerebral cortex of young and aged rats. Twenty four wistar albino male rats (young: 3 months old, aged: 22 months old) were divided into following groups: young-control, young-curcumin, aged-control, aged-curcumin. Curcumin (30 mg/kg/day) was dissolved in 4% DMSO-PBS. Intraperitoneal injections of control and curcumin groups were maintained for 21 days. Total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) were measured using commercial kits. The ratio of TOS to TAS, i.e. the oxidative stress index (OSI), was calculated. FOXO3a and BIM expressions were tested by Western blotting, and FOXO3a protein levels was also measured by a sandwich ELISA method. ANOVA, LSD, Pearson's r were used for statistical analysis ($p<0.05$). Our findings showed that aging increased TOS, OSI, FOXO3a and BIM, and decreased TAS in cerebral cortex ($p<0.05$). Curcumin administration in aged rats decreased age-related increase in TOS, OSI and FOXO3a ($p<0.05$). In aging, curcumin caused slight, but not-significant decrease in BIM, which was positively correlated with FOXO3a. Curcumin seems to be effective in reducing oxidative stress in the aging brain, which may result in suppression of the FOXO3a transcription factor that upregulates target genes involved in stress resistance and cell death.