

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GERONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Serhat BOZKURT

YÜKSEK LİSANS

2022-ANTALYA

MORUSİNİN İNSAN FİBROBLAST HÜCRE HATTINDA
MATRİKS METALOPROTEİNAZ-1 ÜZERİNE ETKİSİNİN
***IN-VITRO* ARAŞTIRILMASI**

Serhat BOZKURT

YÜKSEK LİSANS

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GERONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**MORUSİNİN İNSAN FİBROBLAST HÜCRE HATTINDA MATRİKS
METALOPROTEİNAZ-1 ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN-VITRO* ARAŞTIRILMASI**

Serhat BOZKURT

YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan Hüseyin BAŞIBÜYÜK

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2021-5716 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Gerontoloji Anabilim Dalı Gerontoloji Y¼ksek Lisans Programında Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 13/05/2022

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hasan H¼seyin BAřIB¼Y¼K

Akdeniz niversitesi

¼ye : Doç. Dr. Mahir BUDAK

Cumhuriyet niversitesi

¼ye : Dr. Öğr. Üyesi Gökçe Yaęmur G¼NEř GENCER

Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Serhat BOZKURT

Prof. Dr. Hasan Hüseyin BAŞIBÜYÜK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hasan Hüseyin BAŞIBÜYÜK’e,

Tez çalışmam sırasında Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Merkezi (AKVUAM) laboratuvarının tüm imkanlarından faydalanmamı sağlayan Merkez Müdürü Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN’a

Tez geliştirme ve çalışma aşamalarında benden bilgi ve yardımlarını eksik etmeyen Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Merkezi Müdür Yardımcısı Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK’e

Tez çalışmam sırasında benden bilgi ve yardımlarını eksik etmeyen Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Doktora Öğrencisi Orhan KOÇAK’a

Tez çalışmamın her aşamasında benden desteğini esirgemeyen her daim güler yüzüyle yanımda olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans öğrencisi Merve TÜRK’e

Bu süreçte bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Gerontoloji Bölümü öğretim üyelerine ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca maddi ve manevi olarak beni destekleyen, varlığını hiçbir zaman üzerimden eksik etmeyen, benim için her türlü fedakarlıkta bulunan, sadece yorucu ve uzun eğitim hayatım boyunca değil nefes aldığım her an üzerimde çok büyük emeği olan başta annem Kudret BOZKURT ve babam Hasan BOZKURT’a olmak üzere aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Serhat BOZKURT

ÖZET

Amaç: Morusinün insan fibroblast Hs68 hücre hattında, MMP-1 üzerine etkisi *in-vitro* olarak araştırmaktır.

Yöntem: Hs68 hücreleri çoğaltılıp Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 96 kuyucuklu plaklara bölünmüştür. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda morusin 32- 0,015625 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyon aralığındaki dozlar hücrelere uygulanmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonunda hücre proliferasyonu üzerine etkileri WST-1 kiti ile çalışılmıştır. Çoğaltılan hücreler bu sefer 6 kuyucuklu plaklara bölünmüştür. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda morusin 4 - 0,5 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyon aralığındaki dozlar hücrelere uygulanmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda MMP-1 salınımına etkisi MMP-1 kiti ile çalışılmış ve absorbans değerleri ELISA okuyucuyla alınmıştır.

Bulgular: Morusin'in Hs68 hücre hattına uygulanan 32, 16 ve 8 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonları hücrelerin tamamına yakınıni öldürdüğü görülmüştür. 4 ve 2 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarında anlamlı bir sitotoksik etki, 1 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda daha az sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. MMP-1 miktarı, uygulanan morusin konsantrasyonuna bağlı olarak 24 saat inkübasyon süresi sonunda 4 $\mu\text{M/mL}$ 'de %1,64 ve 0.5 $\mu\text{M/mL}$ 'de %1,72 artmış; 2 $\mu\text{M/mL}$ 'de %2,80 ve 1 $\mu\text{M/mL}$ 'de %8,70 azalmıştır. MMP-1 miktarı 48 saat sonra 4 $\mu\text{M/mL}$ 'de %1,90; 2 $\mu\text{M/mL}$ 'de %11,90 ve 0.5 $\mu\text{M/mL}$ 'de %4,12 azalmış, 1 $\mu\text{M/mL}$ 'de ise %1,67 artmıştır. MMP-1 miktarı 72 saat sonra 4 $\mu\text{M/mL}$ 'de %10,64; 2 $\mu\text{M/mL}$ 'de %8,26; 1 $\mu\text{M/mL}$ 'de %21,78 ve 0.5 $\mu\text{M/mL}$ 'de ise %12,80 artmıştır.

Sonuç: Morusinün uygulanan konsantrasyonları Hs68 hücreleri için sitotoksik ve hücre proliferasyonunu azaltıcı özellik göstermiştir. Kullanılan morusinün zamana bağlı olarak sadece 2 konsantrasyonu MMP-1 miktarını azaltması, hücreler için yaşlanma karşıtı bir sonuç ortaya koyarken diğer konsantrasyonlarının yaşlanmayı hızlandırıcı bir etki gösterdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Morusin, *Morus alba*, Flavonoid, MMP-1, Hücre kültürü, Yaşlanma

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of morusin on MMP-1 in human fibroblast Hs68 cell line in-vitro.

Method: Hs68 cells were multiplied and lifted with Trypsin-EDTA and divided into 96-well plates. At the end of the 24-hour incubation period, morusin was applied to the cells at a concentration range of 32-0.015625 $\mu\text{M/mL}$. Its effects on cell proliferation at the end of 24, 48 and 72 hours incubation was studied with the WST-1 kit. Proliferated cells were divided into 6-well plates this time. At the end of the 24 hours incubation period, morusin was applied to the cells at doses in the concentration range of 4-0.5 $\mu\text{M/mL}$. The effect on the MMP-1 release at the end of the 24, 48, and 72 hours incubation periods was studied with the MMP-1 kit and the absorbance values were taken with the ELISA Reader.

Results: It was observed that Morusin killed almost all of them on the Hs68 cell line applied at concentrations of 32, 16 and 8 $\mu\text{M/mL}$. It was determined that it had a significant cytotoxic effect at 4 and 2 $\mu\text{M/mL}$ concentrations, and less cytotoxic effect at 1 and 0.5 $\mu\text{M/mL}$ concentrations. The amount of MMP-1 was increased 1.64% at 4 $\mu\text{M/mL}$ and 1.72% at 0.5 $\mu\text{M/mL}$ depending on morusin concentration in as the 24 hours incubation period, it decreased 2.80% at 2 $\mu\text{M/mL}$ and 8.70% at 1 $\mu\text{M/mL}$. The amount of MMP-1 was decreased 1.90% at 4 $\mu\text{M/mL}$, 11.90% at 2 $\mu\text{M/mL}$ and 4.12%, at 0.5 $\mu\text{M/mL}$ in as the 48 hours incubation period, it was increased 1.67% at 1 $\mu\text{M/mL}$. In the 72-hour, the amount of MMP-1 was increased 10.64% at 4 $\mu\text{M/mL}$, 8.26% at 2 $\mu\text{M/mL}$; 21.78% at 1 $\mu\text{M/mL}$ and 12.80% at 0.5 $\mu\text{M/mL}$.

Conclusion: The applied concentrations of morusin showed cytotoxic or cell proliferation reducing properties for Hs68 cells. It was observed that the morusin used decreased the amount of MMP-1 in only 2 concentrations depending on time, while it showed an antiaging effect for the cells, while other concentrations showed an accelerated aging effect.

Key words: Morusin, *Morus alba*, Flavonoid, MMP-1, Cell culture, Aging

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Biyolojik Yaşlanma Teorileri	5
2.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Yaşlanmanın Serbest Radikal Teorisi	6
2.3. Biyolojide Oksijen	8
2.4. Cilt Yaşlanması ve Serbest Oksijen Türlerinin (ROS) İlişkisi	8
2.5. Epidermis	9
2.6. Dermis	10
2.7. Dermal Bağ Doku	10
2.8. Dermiste Yaşlanma Süreci	11
2.9. Matriks Metalloproteinazlar	12
2.9.1. Matriks Metalloproteinazların Sistemik Konumu	12

2.9.2. Matriks Metalloproteinazların Yapısı	15
2.9.3. Matriks Metalloproteinazların Aktivitesinin Düzenlenmesi ve Aktivasyonlarını Etkileyen Faktörler	16
2.9.3.1. Transkripsiyonel Düzenleme	16
2.9.3.2. Transkripsiyon Sonrası Düzenleme	18
2.9.3.3. ProMMP'ler ve ProMMP'lerin Aktivasyonu	18
2.9.4. Matriks Metalloproteinazların Görevleri	21
2.9.5. Matriks Metalloproteinaz-1 (MMP-1) Özellikleri ve Görevleri	22
2.10. Hücresel Yaşlanma ve Patogenezi	23
2.11. Antioksidanlar	24
2.12. Bir Antioksidan Olarak Morusin	26
2.13. Fibroblastların Hücresel Yaşlanması	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları	28
3.2. Besiyerlerinin Hazırlanması	28
3.2.1. %10'luk FBS İçeren DMEM Besiyerinin Hazırlanması	28
3.2.2. %1'lik FBS İçeren DMEM Besiyerinin Hazırlanması	28
3.2.3. Dondurma Besiyerinin Hazırlanması	29
3.3. Morusinun Hazırlanması	29
3.4. Hücrelerin Deneyler İçin Bölünmesi	29

3.4.1. Hücrelerin Tripsinasyonu	29
3.4.2. Hücrelerin Proliferasyon Deneyleri İçin 96-Kuyucuklu Plaklara Bölünmesi	30
3.4.3. Hücrelerin ELISA Deneyleri İçin 6-Kuyucuklu Plaklara Bölünmesi	30
3.5. Morusinin Fibroblast Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkileri	30
3.5.1. Morusin Uygulamaları	30
3.5.2. Deneylerin Sonlandırılması	31
3.6. Hücrelerin Besiyerine Salınan MMP-1 Miktarının Belirlenmesi	31
3.6.1. Morusin Uygulamaları	31
3.6.2. Hs68 Hücrelerinden Besiyerine Salınan MMP-1 Miktarının Belirlenmesi	32
3.7. İstatistiksel Analizler	34
4. BULGULAR	35
4.1. Morusinin Hs68 Hücre Hattı Üzerine Gösterdiği Sitotoksik ve Proliferatif Etkiler	35
4.2. Morusinin Hs68 Hücrelerinden Salınan MMP-1 Miktarı Üzerine Etkisi	44
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	MMP ailesinin üyelerinden kollojenazlar, doku dağılımları ve substratları	13
Tablo 3.1.	Morusinin hazırlanma protokolü	29
Tablo 3.2.	MMP-1 standartların hazırlanma protokolü	33
Tablo 4.1.	Morusinin 1. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi	36
Tablo 4.2.	Morusinin 1. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi	37
Tablo 4.3.	Morusinin 1. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi	39
Tablo 4.4.	Morusinin 2. Ve 3. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi	40
Tablo 4.5.	Morusinin 2. Ve 3. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi	41
Tablo 4.6.	Morusinin 2. Ve 3. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi	43
Tablo 4.7.	Morusinin 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında MMP-1 salınımı üzerine etkisi	45
Tablo 4.8.	Morusinin 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında MMP-1 salınımı üzerine etkisi	46
Tablo 4.9.	Morusinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında MMP-1 salınımı üzerine etkisi	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Evrimsel ve fizyolojik yaşlanma teorilerinin sınıflandırılması	6
Şekil 2.2.	MMP'lerin etki alanları ve yapısı	14
Şekil 2.3.	Temsili olarak MMP-2'nin hücre yüzeyi aktivasyonu	20
Şekil 2.4.	MMP'lerin fizyolojik süreçlerdeki temsili rolleri	22
Şekil 2.5.	Reaktif oksijenlerin oluşumu	25
Şekil 2.6.	Morusinin moleküler yapısı	26
Şekil 3.1.	Standart seyreltmelerin yapılması	33
Şekil 4.1.	Yapışmış Hs68 fibroblast hücrelerinin plaktaki görüntüsü	35
Şekil 4.2.	Çeşitli konsantrasyonlardan morusin uygulanmış Hs68 fibroblast hücrelerine WST-1 canlılık testi uygulandıktan sonraki renk dönüşümü.	36
Şekil 4.3.	Morusinin 1. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$ kontrole kıyasla).	37
Şekil 4.4.	Morusinin 1. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$ kontrole kıyasla).	38
Şekil 4.5.	Morusinin 1. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$ kontrole kıyasla).	39
Şekil 4.6.	Morusinin 2. ve 3. setlerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda,	41

Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p<0.01$).

Şekil 4.7. Morusinin 2. ve 3. setlerin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 42
Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p<0.01$).

Şekil 4.8. Morusinin 2. ve 3. setlerin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 44
Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p<0.01$).

Şekil 4.9. Morusin uygulanmış Hs68 fibroblast hücrelerinin dışarıya salmış 45
olduğu MMP-1 miktarının ölçülmesi için çalışılmış plak görseli

Şekil 4.10. 24 saat inkübasyon sonunda 4 $\mu\text{M/mL}$, 2 $\mu\text{M/mL}$ 1 $\mu\text{M/mL}$ ve 0,5 46
 $\mu\text{M/mL}$ morusinin Hs68 hücrelerinden salınan MMP-1 miktarı
üzerine etkisi ($p<0.01$).

Şekil 4.11. 48 saat inkübasyon sonunda 4 $\mu\text{M/mL}$, 2 $\mu\text{M/mL}$ 1 $\mu\text{M/mL}$ ve 0,5 47
 $\mu\text{M/mL}$ morusinin Hs68 hücrelerinden salınan MMP-1 miktarı
üzerine etkisi ($p<0.01$).

Şekil 4.12. 72 saat inkübasyon sonunda 4 $\mu\text{M/mL}$, 2 $\mu\text{M/mL}$ 1 $\mu\text{M/mL}$ ve 0,5 48
 $\mu\text{M/mL}$ morusinin Hs68 hücrelerinden salınan MMP-1 miktarı
üzerine etkisi ($p<0.01$).

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADAM	: A disintegrin and Metalloproteinase / Bir parçalayıcı ve Metalloproteinaz
AP	: Activator Protein / Etkinleştirici Protein
ATCC	: American Type Culture Collection / Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
CBFA	: Core binding factor / Çekirdek Bağlanma Faktörü
COX	: Cyclooxygenase / Siklooksijenaz
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium / Dulbecco'nun Modifiye Kartal Besiyeri
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide / Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoxyribonucleic Acid / Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Extracellular Matrix / Hücre Dışı Matriks
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid /Etilendiamintetraasetik asit
EGF	: Erythrocyte Growth Factor / Eritrosit Büyüme Faktörü
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay / Enzim Bağlı İmmünosorbent Test
ETS	: Erythroblast Transformation Factor / Eritroblast Dönüşüm Faktörü
FBS	: Fetal Bovine Serum / Fetal Bovin Serum
FR	: Free Radical / Serbest Radikal

FRTA	: Free Radical Theory of Aging /Yaşlanmanın Serbest Radikal Teorisi
GSH	: Glutathione / Glutasyon
HIV	: Human Immunodeficiency Virus /İnsan İmmünyetmezlik Virüsü
Hs68	: Human Fibroblast Cell Line / İnsan Fibroblast Hücre Hattı
IGF-BP	: Insulin-like Growth Factor Binding Proteins / İnsülin benzeri Büyüme Faktörü Bağlanma Proteini
IL	: Interleukin / İnterlökin
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry / Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
MMP	: Matrix Metalloproteinase / Matriks Metalloproteinaz
MT-MMP	: Membrane type-MMP / Membran Tipi-MMP
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate / Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat
NF-κB	: Nuclear Factor kappa B / Nükleer Faktör Kappa B
OA	: Osteoarthritis /Osteoartrit
OD	: Optical Density / Optik Dansite
PDGF	: Platelet-derived Growth Factor / Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
ROS	: Reactive Oxygen Species / Reaktif Oksijen Türleri
SDF	: Stromal Cell-derived Factor / Stromal Hücre Kaynaklı Faktör

SOD	: Superoxide Dismutase / Süperoksit dismutaz
TGF	: Transforming Growth Factor / Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TIMP	: The Tissue Inhibitors of Metalloprotease / Metalloproteinazların Doku İnhibitörü
TNF	: Tumor Necrosis Factor / Tümör Nekroz Faktör
TPA	: Tissue Plasminogen Activator / Doku Plazminojen Aktivatörü
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor / Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mL	: Mililitre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre

1. GİRİŞ

Hücreesel yaşlanma, büyüme faktörlerine ve hücre proliferasyonunu indükleyen sinyallere dirençli olan kalıcı bir hücre döngüsü durması olarak tanımlanır (Stein ve ark., 1991). Bu fenomen ilk olarak insan diploid fibroblastlarının *in vitro* olarak sonlu proliferatif potansiyel sergilediğini gözlemleyen Hayflick ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Hayflick ve Moorhead, 1961). Artık birçok somatik proliferatif hücre tipinin hücreesel yaşlanmaya uğradığı kabul edilirken, yaşlanma henüz tam olarak anlaşılmayan mekanizmalar yoluyla *in vivo* yaşlanma sürecine ve yaşa bağlı hastalıklara katkıda bulunur (Vijg ve Campisi, 2008). Yaşlanan hücreler arasında insan keratinosit, melanosit, fibrosit ve endotelyal hücreler bulunur (Toussaint ve ark., 2000; Lewis ve ark., 2008).

Aerobik organizmalarda reaktif oksijen türleri (ROS) esas olarak oksijenli solunum yoluyla, ATP (Adenozin Trifosfat) sentezi sırasında oksidatif fosforilasyonun yan ürünleri olarak oluştuğu düşünülmektedir (Sarniak ve ark., 2016).

ROS, içsel ve dışsal cilt yaşlanması sırasında üretilir. Bu nedenle, ROS üretimini engelleyen antioksidanlar, cilt yaşlanmasını geciktirmede rol oynayabilir (Lee ve ark., 2022).

ROS'un ana hücreesel kaynağı, mitokondriyal solunum zinciri ve aktif NADPH'dir. Dahası ROS, endoplazmik retikulumda, peroksizomlarda, ksantin ve endotelyal oksidazın katılımıyla, küçük moleküllerin otoksidasyon işlemi sırasında üretilir. Mitokondriyal solunum zinciri, ROS'un ana hücreesel kaynağıdır (Sarniak ve ark., 2016).

Hücreesel düzeyde, oksidatif stresler, fibroblastların genç hücrelerden yaşlılara geçişini hızlandırır (Remacle ve Renard, 1996).

Serbest radikaller vücudumuzda çeşitli sistemler tarafından üretilir. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki denge, uygun fizyolojik fonksiyon için önemli bir konudur. Serbest radikaller, antioksidan mekanizmaların kontrol edebileceğinden daha fazla üretilirse oksidatif stres olarak bilinen bir durum ortaya çıkar ve bunun sonucunda

vücutta birtakım hastalıklar tetiklenir. Antioksidanlar bu oksidatif stresle mücadeleye katkıda bulunabilirler (Alkadi, 2020).

Mevcut veriler, antioksidanların maksimum yaşam süresini uzatamayacağını gösterse de antioksidanların yaşa bağlı çeşitli dejeneratif hastalıklar üzerindeki faydalı etkisi, yaşam beklentisinde artışa ve yaşam kalitesinde iyileşmeye yardımcı olabilir (Bonney ve Drai, 2002).

Preflavonoidler doğada yaygındır. Bitkiler, flavonlar, flavanonlar, kalkonlar ve auronları içeren izoprenil gruplarına sahip doğal polifenolik bileşiklerin değerli kaynaklarıdır. Çiçekler, ağaç kabuğu ve saplarda bulunabilirler. Beyaz dut (*Morus alba*) kabuğunda bulunan en önemli preflavonoidlerden biri de morusindir. Şimdiye kadar yapılan araştırmalar, morusinin antioksidan, antitümör, antiinflamatuvar ve antialerjik aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. (Krzysko ve Gorący, 2021).

Matriks metalloproteinazların (MMP) indüksiyonu, cilt yaşlanmasının ana nedenleri arasındadır. Parçalanmış kollajen fibrillerinin birikmesi, neokollajenezi önler ve pozitif geri besleme düzenlemesi aracılığıyla hücre dışı matriksin daha fazla bozulmasına yol açar (Kohl ve ark., 2011).

MMP-1, hücre dışı matriks (ECM) kollajenazın enzimatik proteolizini enerjik olarak tetikler ve ilerleyen cilt yaşlanmasına neden olur. Doğal flavonoidler, antioksidan özellikleri ile iyi bilinir ve insanda matriks metalloproteinlerin inhibisyonu için kullanılabilir (Lee ve ark., 2020).

MMP'ler, kollajenler, elastinler, jelatin, matriks glikoproteinler ve proteoglikan dahil olmak üzere ECM'nin doku yeniden şekillenmesinden ve bozulmasından sorumlu olan kalsiyuma bağımlı çinko içeren endopeptidazların geniş bir ailesidir. MMP'ler normal fizyolojik koşullarda genellikle minimal düzeyde eksprese edilir ve bu nedenle homeostazi korunur (Kapoor ve ark., 2016).

Hücrel deformasyon insan derisinde matriks metalloproteinazların (MMP'ler) ifadesini artırır. MMP'ler kollajen, fibronektin, elastin ve proteoglikanlar gibi hücre dışı matriks

(ECM) proteinlerini parçalamaktan sorumludur ve yaşlanmaya neden olur (Kapoor ve ark., 2016).

MMP'ler, geniş bir substrat özgünlüğü yelpazesine sahiptir. ECM'nin farklı bileşenlerinin bozulmasına aracılık ederler. Oksidatif stres, UV radyasyonu ve sitokinler gibi çoklu uyaranlara yanıt olarak keratinositler ve dermal fibroblastlar tarafından salgılanırlar. Bugüne kadar, yaşlanma, yara iyileşmesi, iskelet büyümesi ve yeniden şekillenmesi, artrit, inflamasyon, anjiyogenez ve kanser dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik süreçlerde önemli roller oynayan en az 28 farklı MMP türü tanımlanmıştır (Kapoor ve ark., 2016).

Literatür morusin, MMP-1 ve fibroblast anahtar kelimeleri ile tarandığında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca morusinin yaşlanma karşıtı çalışmalarda bir etkisinin olup olmadığına dair bir veri de görülememektedir.

Çalışmamızda morusinin yaşlanma karşıtı etkisini sınavabilmek amacıyla morusinin Matriks Metaloproteinaz-1 (MMP-1) seviyesinde değişikliğe sebep olup olmadığının ve morusinin Hs68 hücrelerinin inhibisyonu üzerinde etkisi olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Yaşlanma, genetik olarak programlanmaktan çok, birçok içsel ve dışsal değişkenin birlikte hareket ettiği rastlantısal bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Yaşlanmanın sosyal, kültürel, psikolojik ve biyolojik yönlerini ele alan bilim dalı gerontoloji olarak tanımlanmaktadır (Başibüyük, 2017).

Günümüzde tıbbın ilerlemesi ve daha iyi yaşam koşulları sayesinde artık Türkiye'de insanlar daha uzun yaşama şansını elde etmiştir. Bu, Türkiye'de gerontolojiyi bir araştırma alanı olarak ilginç kılmaktadır (Tufan ve ark., 2019).

Gerontolojinin bir alt disiplini olan biyogerontoloji ise, yaşlanmanın biyolojik nedenlerini ve mekanizmalarını anlamaya çalışır. Neden “yaşlanma” olarak adlandırılan bir olgu vardır? Yaşlanma hangi biyolojik süreçler ile ilişkilidir? Yaşlanma genetik olarak programlanmış mıdır? Yoksa çok değişkenli rastlantısal (stokastik) bir süreç midir? Yaşlanma ile ilişkili biyo-belirteçler var mıdır? Yaşlanmayı yavaşlatmak veya engellemek mümkün müdür? Yaşlanma ile birlikte hangi kronik hastalıklar görülür? Birbirleriyle ilişkili böylesi birçok sorunun cevabı biyogerontoloji araştırmalarından gelmektedir (Başibüyük, 2017).

Bu bağlamda biyolojik yaşlanma sürecini etkileyen içsel faktörler arasında çeşitli hücresel ve moleküler süreçler sayılabilir. Bunlar esasen, genom kararsızlığı, epigenetik farklılıklar, transkripsiyon düzeyinde değişimler, moleküler hasar, hücre yaşlanması ve ölümü, inflamasyon ve metabolik bozukluk gibi olgulardır. Bu olguları üreten mekanizmaların ayrıntılı olarak incelenmesi ve anlaşılması biyogerontoloji temel biliminin güncel araştırma alanlarını oluşturmaktadır (Başibüyük, 2017).

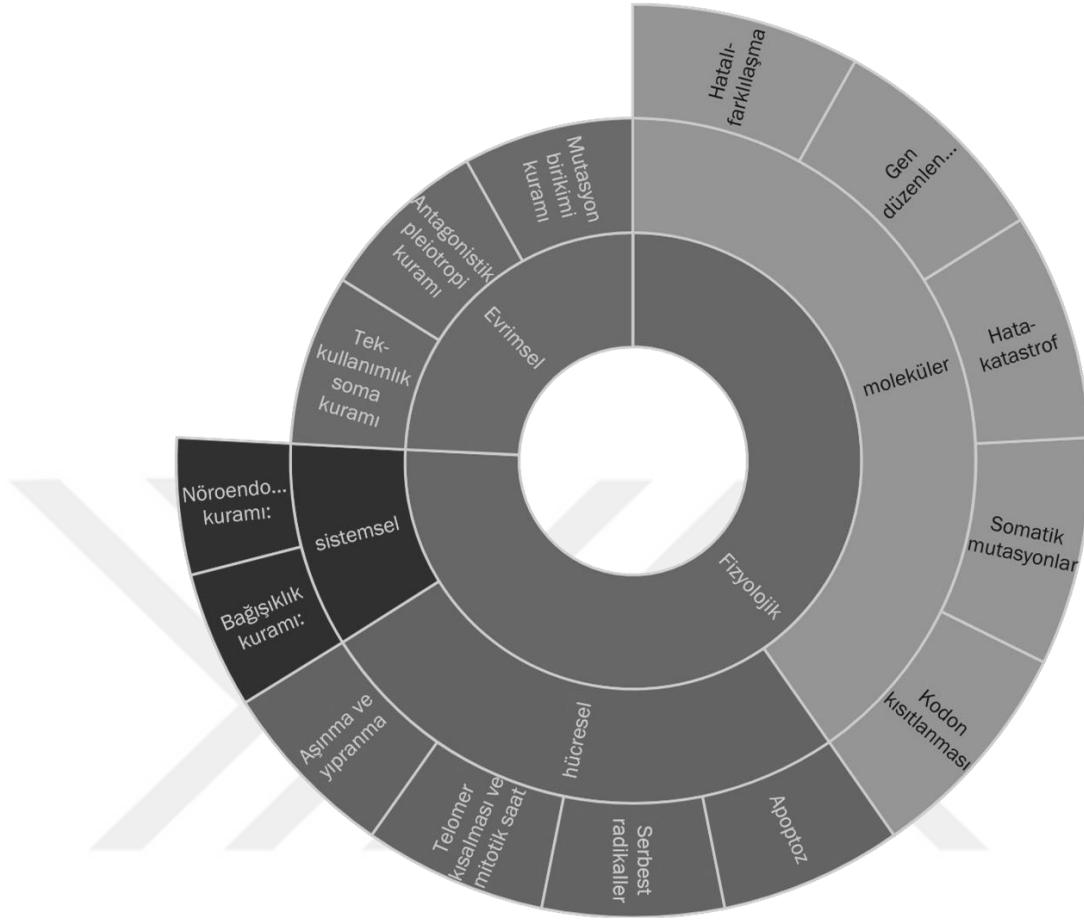
Gerontolojinin tarihsel gelişimi içinde, yaşlanmanın nedenlerine cevap arayan birçok biyolojik yaşlanma kuramı önerilmiştir.

2.1 Biyolojik Yaşlanma Teorileri

Yaşlanmanın neden meydana geldiğine dair birçok teori bulunmaktadır. Çoğu kişi aynı fikirde olmamasına ve tartışmanın hala devam etmesine rağmen, mevcut teoriler yaşlanmaya neden olan tek bir süreci tanımlamaktadır (Tower, 2015). Medvedev, 300'ü aşan sayısız yaşlanma teorisini rasyonel olarak sınıflandırmaya çalışmıştır (Medvedev, 1990). Yaşlanma, moleküler çapraz bağlanma (Bjorksten, 1968), serbest radikallerin neden olduğu hasarlar (Harman, 1993), immünolojik fonksiyonlardaki değişiklikler (Effros, 2005), telomer kısalması (Kruk ve ark., 1995) ve DNA'da yaşlanma genlerinin varlığına bağlanmıştır (Warner ve Mount, 1987).

Ancak daha yakın zamanlarda, genleri, genetik bakım ve onarım sistemlerinin performansını, ortamı ve şansı kapsayan birleşik bir teori, yaşlanma sürecinin sistematik ve bütünleştirici bir analizine duyulan ihtiyacı vurgulayarak giderek daha fazla kabul görmüştür (Rattan, 2006).

Yaşlanma ve yaşlanmayla ilgili süreçlerle ilgili yapılan çok sayıda araştırma, ileri sürülen yaşlanma teorilerine tam bir genel bakış sunmayı neredeyse imkânsız hale getirmektedir. Bunların hepsi olmasa da çoğu, ancak iki kategoride sınıflandırılabilir: Evrimsel yaşlanma teorileri ve fizyolojik yaşlanma teorileri.



Şekil 2.1. Evrimsel ve fizyolojik yaşlanma teorilerinin sınıflandırılması

Bununla birlikte, teori ne olursa olsun, hepsi tek bir soruyu yanıtlamayı amaçlamaktadır: Yaşlanmanın nedeni nedir? Çalışan hipotez ne olursa olsun, yaşlanmanın tek bir nedeni olduğuna dair temel varsayımın doğru olmayabileceği düşünülmelidir. Ayrıca, gerontologlar, tüm canlı organizmalar için geçerli olan evrensel bir yaşlanma nedeni olmayabileceği ihtimaliyle yüzleşmek zorunda kalabilirler (da Costa ve ark., 2016).

2.2 Reaktif Oksijen Türleri ve Yaşlanmanın Serbest Radikal Teorisi

Yaşlanmanın serbest radikal teorisi (FRTA), en popüler yaşlanma teorilerinden biridir ve birçok yaşlanma karşıtı ürün ve stratejinin temelini oluşturur. Serbest radikaller (FR'ler), organik moleküllerle yıkıcı bir şekilde reaksiyona giren oldukça reaktif moleküllerdir. İnsanlarda en bol bulunan FR olan ROS, hem normal metabolizmanın bir yan ürünü olarak hem de çevresel faktörlerden kaynaklanır.

İlk olarak 1950'lerde Harman tarafından önerilen FRTA, yaşlanmanın FR tarafından lipitlere, DNA'ya, proteinlere ve dokuya verilen oksidatif hasarın birikmesinden kaynaklandığını varsaymaktadır. 1970'lerin başında, bilim adamları FR'in çoğunu mitokondrilerin ürettiğini ve elektron taşıma zinciri enzimleri üzerinde FR hasarının fizyolojik düşüşe neden olduğunu öne sürmüşlerdir (Harman, 2004). Mitokondri, DNA onarım enzimlerinden yoksundur, bu da mitokondriyal DNA'yı hasara karşı daha duyarlı hale getirir. Hasarlı mitokondri, artan hücrel hasara ve yaşlanmaya yol açan kısır bir mutasyon ve FR oluşumu döngüsü yaratan serbest radikaller üretmeye daha yatkındır (Sanz ve Stefanatos, 2010). Bununla birlikte, mitokondriyal teoriye karşı çıkanlar, ROS'un hücreler arası metabolizmanın normal bir ürünü olduğuna ve kötü şöhretlerine rağmen hücrel sağlıkta önemli bir rol oynadığına dikkat çekmektedirler. Framingham Koroner Kalp Hastalığı Uzun Ömür Çalışması sonuçlarına göre uzun ömürlülük babadan çok annenin yaşı ile güçlü bir ilişki olup, mitokondriyal DNA'nın uzun ömür ile bağlantılı olduğunu düşündürmektedir (Tosato ve ark., 2007).

Süperoksit dismutaz gibi enzimler, ROS'u su ve oksijene dönüştüren reaksiyonları katalize ederek serbest radikalleri nötralize edebilir. A ve C vitaminleri gibi enzimatik olmayan antioksidanlar, flavonoidler ve karotenoidler gibi fitokimyasallar gıdalarda doğal olarak bulunan serbest radikalleri de nötralize eder. Serbest radikallerin yaşlanmayı teşvik ettiği fikri, oluşumlarını sınırlamaya yönelik müdahalelerin yaşlanmayı yavaşlatabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, oksidatif hasarın biriktiğine dair kanıtlar olsa da sürecin tüm organizmalarda yaşlanmaya katkıda bulunduğu açık değildir. Şaşırtıcı bir şekilde, bazı hayvanlarda süperoksit dismutazı olumsuz etkileyen genetik mutasyonlar aslında ömrü uzatır. Şu anda, geleneksel olarak kabul edilen tek antioksidan tedavi, makula dejenerasyonudur. Sigara içmek serbest radikaller ürettiğinden, araştırmacılar tütünün serbest radikal hasarı ile akciğer kanserini indüklediğini öne sürdümüşlerdir ve antioksidan olan beta-karotenin sigara içenlerde kanser riskini azaltıp azaltmadığını test etmek için bir deneme geliştirmişlerdir. Ancak araştırmacılar, beta-karoten alan grup, kontrol grubundan önemli ölçüde daha fazla kanser geliştirdiği için randomize çalışmayı sonuçlanmadan durdurmuştur. Dolayısıyla yaşlanma örüntüsünü değiştirmek için orantısız bir antioksidan seviyesi yerine ideal bir

oksidan, antioksidan ve biyomolekül dengesi gerektiriyor olabilir (Lipsky ve King, 2015).

2.3 Biyolojide Oksijen

Solunum sistemi, oksijene bağımlı yaşamı gerçekleştiren temel sistemdir. Atmosferden kana aktarılan oksijen, enerji üretmek için besin ögelerini (örneğin karbonhidratlar, yağlar ve proteinler) metabolize etmek için kullanılır. Hücresel aerobik metabolik solunumda, glikoz tipik olarak hücrenin mitokondrileri içinde enerji açısından zengin ATP molekülleri üretmek için kullanılan moleküldür ve homeostazı sürdürür (Lephart, 2016; Martini, 2009). Biyolojik sistemler atmosferik oksijene bağımlıyken, çok az veya çok fazla oksijen hücrelere ve dokulara zarar verebilir (Lephart, 2016; Martini, 2009). Bu bağlamda oksijen, biyolojik sistemlerde hem yararlı hem de potansiyel olarak zararlı yan etkileri olan bir Janus gaz olarak adlandırılır (Burton ve Jauniaux, 2011). Oksijen, oksidatif metabolizma yoluyla bol miktarda temel ATP molekülünün oluşumunu destekleyen yüksek enerjili elektron transferlerine katılır. Ancak, biyolojik sistemlerde ve hücrelerdeki sayısız kimyasal reaksiyon sırasında, serbest radikaller gibi oksijenle ilişkili çok zararlı moleküllerin veya parçacıkların oluşumuyla sonuçlanan hatalar meydana gelebilir (Lephart, 2016; Martini, 2009).

2.4. Cilt Yaşlanması ve Serbest Oksijen Türlerinin (ROS) İlişkisi

Denham Harman'ın yaşlanma araştırması, 1956'da merkezi bir bulguya odaklanmıştır ve aynı yıl ROS'un zamanla biriktirdiğini ve yaşlanma sürecinin temel nedeni olduğunu öne sürmüştür (Harman, 1956). Bu kuram 16 yıl sonra Harman'ın kendisi tarafından genişletilmiştir. Mitokondriyi ROS'un ana kaynağı olarak tanımlamış ve yaşlanmanın mitokondriyal serbest radikal teorisinin temelini atmıştır (Harman, 1972). Ancak, özellikle son on yılda, ROS'un aslında yaşlanmayı hızlandıran en önemli bileşenlerden biri olduğuna dair ciddi kanıtlar ortaya çıkmıştır (Lapointe ve Hekimi, 2010).

Yaşlanmanın serbest radikal teorisi insan vücudunun herhangi bir organı için geçerliyse bu, deridir. Derideki ROS yükü diğer herhangi bir organdan daha yüksek olmakla kalmaz, aynı zamanda birçok durumda dış ve iç hasarlardan kaynaklanan ROS ile

yaşlanmayı geciktirme etkisi arasında açık bir korelasyon bulunabilir. Bu organın bir özelliği de dış yaşlanmanın en az içsel yaşlanma kadar önemli olmasıdır (Harman, 1956). Yaşlanma, birçok dejeneratif hastalığın ana nedenidir. Yaşlanmanın en fark edilir sonucu esas olarak ciltte kendini gösterir ve cilt yapısında, işlevinde ve görünümünde artan kırışıklıklar, gevşeklik, elastoz, telenjektazi ve cildin anormal pigmentasyonu gibi kümülatif değişikliklerle sonuçlanır. İnsan vücudunun diğer organlarından farklı olarak, cilt sadece içsel yaşlanma sürecinden kaçınılmaz olarak etkilenmekle kalmaz, aynı zamanda yaşlanmayı hızlandıran çeşitli dış çevresel faktörlerden, özellikle ultraviyole (UV) radyasyonundan etkilenir (Gu ve ark., 2020).

2.5 Epidermis

Epidermis derinin en yüzeysel katmandır ve asıl işlevi, vücudu zararlı çevresel uyarılardan korumak ve sıvı kaybını azaltmaktır. Keratinleşmiş hücrelerin dökülmesi ile yaşam boyunca sürekli yenilenen çok tabakalı, çok katlı yassı bir epiteldir. Keratinositler epidermin ana hücreleridir ve epidermal homeostaziyi sürdürürler (Blumenberg ve Tomić-Canić, 1997). Epidermis, içten dışa bazal, spinosum, granulosum, lucidum ve corneum olarak 5 tabakadan oluşur. Bazal tabaka, dermoepidermal bileşkedeki bir bazal membran üzerine oturur (Sotiropoulou ve Blanpain, 2012). Bu hücreler yüzeye doğru hareket edip corneum tabakasına farklılaştıkça bölünme, büyüme ve sağlam hücreler arası bağlantı kurma yeteneklerini kaybederler. Keratinositler, hücre içi keratohyalin granülleri ve lamelli cisimlerin varlığı ile karakterize edilen granüler tabakayı oluşturmak üzere uzar ve düzleşir (Odland, 1960). Keratohyalin granülleri, profilagrin ve lorikrin gibi keratinleşmiş zarfın oluşumunda anahtar olan proteinleri içerir. Keratinositler, son olarak *stratum corneum*'u oluşturan korneositlere farklılaşır (Yoneda ve ark., 1992).

Bu geçiş sırasında hücreler çekirdeklerini ve ana organellerini kaybederler, lipidler hücreler arası boşluğa salınır ve hücre zarının yerini keratinleşmiş zarf olan korun tabakası alır.

Derinin bariyer işlevi esas olarak, yoğun şekilde paketlenmiş lipid katmanlarıyla ayrılmış, terminal olarak farklılaşmış, düzleştirilmiş korneositlerden oluşan 10 ila 20 mikron kalınlığında bir tabaka olan *stratum corneum*'a atfedilir (Menon ve ark, 2012).

2.6. Dermis

Dermis, epidermin altında bulunur. Dermis, epidermise çok önemli bir destek sağlar. Epidermin aksine, kıl folikülleri, sinir uçları ve salgı bezleri gibi uzantıların yanı sıra vasküler ve lenfatik sistemler dermise yayılır. Epidermise dermo-epidermal tabaka ile bağlanır. Dermoepidermal bağlantı dermisi ve epidermisi ayırır ve düzenli madde alışverişini ve bazal keratinositlerin polaritesini kolaylaştırır. Dermal bağ dokusu dermisi oluşturur ve dermin ana hücre tipi olan fibroblastlar tarafından üretilen ve hücre dışı boşluğa salgılanan kollajen lifler, elastik lifler, fibronektin, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar gibi hücre dışı matriks proteinlerini içerir (Makrantonaki ve Zouboulis, 2007).

2.7. Dermal Bağ Doku

Kollajen, dermal bağ dokusunda en bol bulunan proteindir. Kuru cilt kütlelerinin %70'ini oluşturur (Gniadecka ve ark., 1998). Karakteristik bir üçlü sarmal konfigürasyona sahiptir. Üçlü sarmal kompleksler, kollajen demetleri olarak adlandırılan düzenli olarak düzenlenmiş fibriler yapılar oluşturmak için küçük proteoglikanlarla birleşirler (Bateman ve Chothia, 1996). İnsan derisine güç ve destek vermekten sorumludur (Oxlund ve Andreassen, 1980). Elastik lifler ise esas olarak elastin ve fibrilinden oluşur. Çapraz bağlı elastinin merkezi lif çekirdeğini oluşturduğu ve fibrilinden zengin mikrofibrillerin çekirdeği çevrelediği bir şekilde oluşturulur. Elastin, dermal ağırlığın %1-2'sinden daha azını oluşturur, ancak deformasyon kuvvetlerine direnmede ve ince bir ağ oluşturarak elastikiyet sağlamada işlevsel bir rol oynar (Makrantonaki ve Zouboulis, 2007). Proteoglikanlar ayrıca cildin kuru ağırlığının sadece %0,1-0,3'ünü oluşturan elastik liflere benzer kollajen olmayan proteinlerdir ve doku içindeki hücre dışı boşlukların çoğunu doldururlar. (Frantz ve ark., 2010) Kollajen fibrillojenezini etkileyerek ve kollajen fibrillerinin çapını ve yapısını düzenleyerek hücre dışı matriksin birleştirilmesinden sorumludurlar (Okamoto ve Fujiwara, 2006). Dermal bağ

dokusundaki bu çeşitli hücre dışı matriks proteinleri, esas olarak cilt bütünlüğünün ve mimarisinin korunmasına katkıda bulunur. Bu nedenle, yaşlanma süreci dermal bağ dokusunda meydana gelen hasarlar, cildin kırışma, elastikiyet kaybı ve sarkma gibi yapısal değişikliklerle yakından ilişkili olabilir (Okamoto ve Fujiwara, 2006).

2.8. Dermiste Yaşlanma Süreci

İnsan derisi esas olarak dışta epidermis ve altında dermis olmak üzere iki katmandan oluşur. Epidermis ve dermis, bazal lamina ile birbirine bağlıdır. Hücre dışı matriksin bozulması, içsel ve dışsal yaşlanmanın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Morfolojik olarak derinin yaşlanması, kollajen lifler, elastik lifler ve hyaluronik asidin azalmasına bağlı ince olarak karşımıza çıkmaktadır (Rinnerthaler ve ark., 2015). İçsel ve dışsal yaşlanma bağlamında, hücre dışı matriksin bozulması önemli bir rol oynar. Ekstrasellüler matriksteki (ECM) enzimler elastik liflerin, kollajen liflerin ve proteoglikanların işlenmesinden sorumludur (Timme ve ark., 2003; Shapiro ve ark., 1991). Elastik lifler, fibrilinden zengin mikrofibrillerin, glikoproteinlerin, elastinlerin ve diğer farklı proteinlerin yapılarını oluşturur (Kielty ve ark., 2002). Fibrilinler ve fibriller kollajenler, farklı dallı oligosakkaritlerin modifikasyonlarına sahip glikoproteinlerdir. Proteoglikanlar ise uzun, dallanmamış bir glikozaminoglikan yan zincirinden oluşur. Bu glikoproteinler birbirine hyaluronik asit ile bağlanır ve dermal bir ağ oluşturur. Kollajen I ve III'ten gelen uzun kollajen fibrilleri iç içe geçmiş ve kollajen VII tarafından dermal-epidermal tabakaya sabitlenen bir intradermal ağ oluşturur (Naylor ve ark., 2011; Graham ve ark., 2010; Keene ve ark., 1987). İçsel yaşlanma sürecinde kollajen lifler ve elastik lifler bozulmadan kalır, ancak bir süre sonra daha geniş bir ağ oluşturarak birbirlerinden ayrılırlar (Naylor ve ark., 2011). Dışsal yaşlanma sırasında cilt kollajen I, III ve VII'yi önemli ölçüde kaybeder (Craven ve ark., 1997; Talwar ve ark., 1995). Uzun kollajen fibrilleri, elastik lifler, glikoproteinler ve glikozaminoglikanlar artık işlevsel bir ağ oluşturmak için iç içe geçmezler, organize olmayan bir dermal yayılmış aglomerasyon oluştururlar (Naylor ve ark., 2011). Bu bozulma, inflamasyon veya UV maruziyetinden sonra dermise göç eden nötrofiller tarafından üretilen elastazlar ve matriks metalloproteazların (MMP'ler) aktivasyonu ile daha da şiddetlenir (Labat-Robert ve ark., 2000). Özellikle MMP-1, -2, -3 ve -9, dermal hücre dışı matriksin bozulmasında

yoğun bir şekilde yer alır (Birkedal-Hansen ve ark., 1993). Kollajen sadece MMP-1 tarafından parçalanabilir ve daha sonra bu parçalar MMP-2, -3 ve -9 tarafından tamamen yıkılır. MMP-2 ve -9 da elastik lifleri parçalayabilir (Berton ve ark., 2000; Jenkins, 2002). Yaşlanma süreci sırasında bu MMP'ler yukarı regüle edilirken, inhibitörleri, yani TIMP1 ve TIMP3 aşağı regüle edilir. (Jenkins, 2002; Millis ve ark., 1992).

2.9. Matriks Metaloproteinazlar

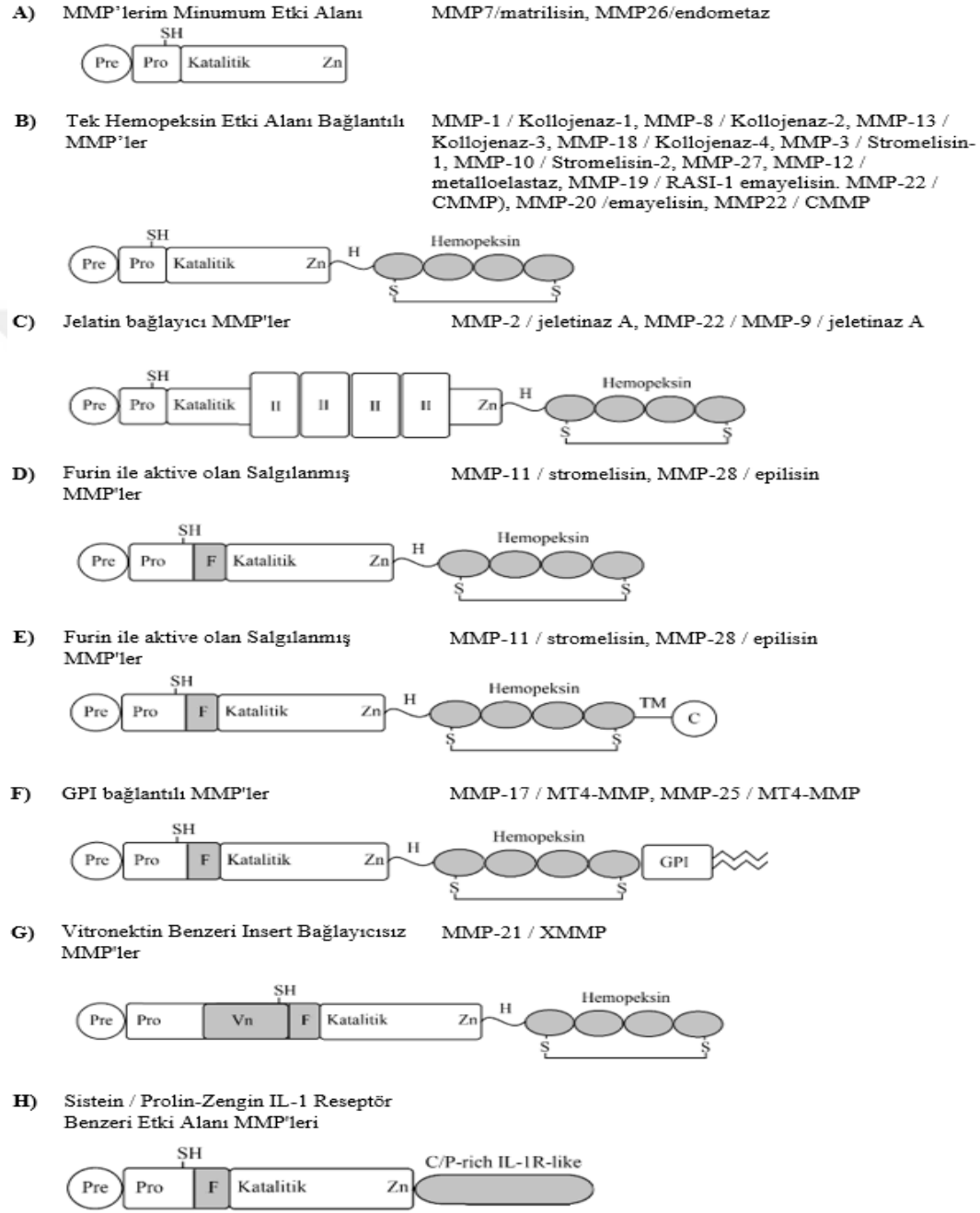
2.9.1 Matriks Metaloproteinazların Sistemik Konumu

Proteolitik enzimler, sırasıyla terminal veya peptit bağlarını parçalamalarına bağlı olarak ekzopeptidazlar veya endopeptidazlar olarak sınıflandırılır. Çoğu endopeptidaz, katalitik mekanizmalarına ve inhibitör duyarlılıklarına göre serin, sistein, aspartik, sınıflandırılmayanlar veya metalo olarak sınıflandırılır ve metalolar, dizi özelliklerine göre ayrıca iki üst aileye ayrılır. Bunlardan metzincin üst ailesi, çinkoyu katalitik bölgede bağlayan üç histidin ve aktif bölge olan çinko bölgesinin altında oturan korunmuş bir metionin kıvrımı içeren yüksek oranda korunmuş bir motif ile ayırt edilir (Stöcker ve ark., 1995). Diğer bir sınıflandırma kolu olarak matriksinler, matriks metaloproteinazları barındırır. Omurgalılarda, MMP ailesi 28 üyeden oluşur, en az 23'ü insan dokularında eksprese edilir ve bu MMP'lerin 14'ü damar sisteminde eksprese edilir (Visse ve Nagase, 2003). MMP'ler yaygın olarak substratlarına ve yapısal alanlarının kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler, membran tipi (MT)-MMP'ler ve diğer MMP'ler olarak düzenlenmesi temelinde sınıflandırılır. Ek olarak, farklı MMP sınıfları, onları prototipik MMP yapısından ayıran belirli yapısal özelliklere sahiptir (Tablo 2.1.) (Kucukguven ve Khalil, 2013; English ve ark., 2001; Pei ve ark., 2000).

Tablo 2.1. MMP ailesinin üyelerinden kollojenazlar, doku dağılımları ve substratları. IGF-BP; insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein, IL; interlökin, MW; moleküler kütle, PMNL; polimorfonükleer lökositler, SDF-1; stromal hücre kaynaklı faktör-1 (Cui ve ark., 2017).

MMP (Diğer Adı) Bulunduğu Kromozom	MW KDa Pro/Aktif	Salınım Yeri	Kollajen Substratları	Kollajen Olmayan ECM Substratları	Diğer Hedefler ve Substratlar
MMP-1 (Kollajenaz-1) 11q22.3	55/45	Endotel, intima, SMC'ler, fibroblastlar, vasküler adventiti, trombositler, varisli bdamarlar (interstisyel/fibroblast kollajenaz)	I, II, III, VII, VIII, X, jelatin	Aggrekan, nidogen, perlekan, proteoglikan bağlantı proteini, serpinler, tenascin-C, versican	Kazein, α 1-antikimotripsin, α 1-antitripsin, α 1-proteinaz inhibitörü, IGF-BP-3 ve -5, IL-1 β , L-selektin, ovostatin, pro-TNF- α , SDF-1
MMP-8 (Kollajenaz-2) 11q22.3	75/55	Makrofajlar, nötrofiller (PMNL veya nötrofil kollajenaz)	I, II, III, V, VII, VIII, X, jelatin	Aggrekan, elastin, fibronectin, laminin, nidogen	α 2-antiplazmin, proMMP-8
MMP-13 (Kollajenaz-3) 11q22.3	60/48	SMC'ler, makrofajlar, varisli damarlar, preeklampsi, meme kanseri	I, II, III, IV, jelatin	Aggrekan, fibronectin, laminin, perlekan, tenassin	Kazein, plazminojen aktivatörü 2, proMMP-9 ve -13, SDF-1
MMP-18 (Kollajenaz-4) 12q14	70/53	Ksenopus (amfibi, Xenopus kollajenaz) kalp, akciğer, kolon	I, II, III, jelatin		α 1-antitripsin

Ek olarak, genellikle modüler etki alanı yapılarına göre gruplandırılırlar (Şekil 2.2.) (Nagaset ve Woessner, 1999).



Şekil 2.2. MMP'lerin etki alanları ve yapısı. (Ön, sinyal dizisi; Pro, serbest çinko bağlayıcı tiyol (SH) grubuna sahip propeptid; F, furine duyarlı bölge; Zn, çinko bağlama yeri; II, kollajen bağlayıcı fibronektin tip II ekleri; H, menteşe bölgesi; TM, transmembran alanı; C, sitoplazmik kuyruk; GPI, glikofosfatidil inositol bağlama alanı; C/P, sistein/prolin; IL-1R, interlökin-1 reseptörü. Hemopeksin/vitronektin benzeri alan, ilki ve sonuncusu bir disülfid bağıyla bağlanan dört tekrar içerir) (Sternlicht ve Werb, 2001).

2.9.2. Matriks Metaloproteinazların Yapısı

1960'ların başlarında, MMP'ler ilk olarak iribaş kuyruğunun emilmesi sırasında ECM protein bozulmasına neden olan bir kollajen proteolitik aktivite olarak tanımlanmıştır (Gross ve Lapiere, 1962). MMP'ler, ECM'nin çeşitli protein bileşenlerini parçalayan yüksek düzeyde homolog ve çinko iyonu (Zn^{+2}) içeren metaloproteinazlardır. Tipik olarak MMP'ler, yaklaşık 80 amino asitlik bir propeptid, yaklaşık 170 amino asitlik bir katalitik metalloproteinaz alanı, değişken uzunlukta bir bağlayıcı peptid (menteşe bölgesi) ve yaklaşık 200 amino asitlik bir hemopeksin alanından oluşan ortak bir yapıyı paylaşır (Nagase ve ark., 2006; Holmbeck ve ark., 1999). Çoğu MMP ayrıca üç önemli özelliği paylaşır. İlk olarak, MMP'ler kollajenaz-1 (MMP-1) ile homoloji gösterir.

İkinci olarak, MMP'ler, sistein sülfhidril grubunun aktif bölge Zn^{+2} 'yi şelatladığı ve böylece MMP'leri inaktif proMMP zimojen formunda tuttuğu bir sistein değiştirme motifi PRCGXPD içerir. Üçüncüsü, MMP'lerin katalitik alanı bir Zn^{+2} bağlayıcı motifi barındırır (Visse ve Nagase, 2003; Bode ve ark., 1993). Ayrıca MMP-7 (matrilisin), MMP-26 (endometaz/matrilisin-2) ve MMP-23 dışında, tüm MMP'ler, katalitik alana bir menteşe veya bağlayıcı bölge ile bağlanan hemopeksin/vitronektin benzeri bir alana sahiptir (Gururajan ve ark., 1998; Park ve ark., 2000). Mevcut olduğunda, hemopeksin alanı: (i) TIMP bağlanmasını, (ii) belirli substratların bağlanmasını, (iii) membran aktivasyonunu, (iv) bazı proteolitik aktiviteleri etkiler. Örneğin, kimerik enzim çalışmaları, doğal fibriler kollajenleri parçalaması için MMP-1'in (kollajenaz-1) her iki ucunun da gerekli olduğunu göstermektedir (Murphy ve ark., 1992; Grams ve ark., 1995).

Bu kollajenolitik aktivite: (i) kollajen fibrilinin ilk bağlanmasını ve oryantasyonunu, (ii) üçlü sarmal yapısının lokal olarak çözülmesini, (iii) Katalitik yarık tüm üçlü sarmalı barındırmak için çok dar olduğu için her bir α -zincirinin ayrı ayrı sıralı bölünmesini gerektirir (Overall, 2001). Görünüşe göre, hemopeksin alanı, bu adımların sonuncusu hariç tümüne katılır. Menteşe bölgesi ise çeşitli MMP'ler arasında uzunluk ve bileşim açısından farklılık gösterir ve ayrıca substrat özgünlüğünü etkiler (Knäuper ve ark., 1997).

2.9.3. Matriks Metalloproteinazların Aktivitesinin Düzenlenmesi ve Aktivasyonlarını Etkileyen Faktörler

Normal (veya patolojik) işlevlerini yerine getirmek için, MMP'lerin doğru hücre tipinde ve periselüler lokasyonda, doğru zamanda ve doğru miktarda mevcut olması ve uygun şekilde aktive edilmesi veya inhibe edilmesi gerekir. Bu nedenle MMP'ler, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyelerde sıkı bir şekilde düzenlenir ve ayrıca aktivatörleri, inhibitörleri ve hücre yüzeyi lokalizasyonları aracılığıyla protein seviyesinde kontrol edilir (Martin ve ark., 1996).

2.9.3.1. Transkripsiyonel Düzenleme

MMP substrat özgünlükleri birbiri ile örtüşme eğiliminde olduğundan, MMP'lerin biyolojik işlevi büyük ölçüde farklı ekspresyon örüntüleri tarafından belirlenir. Gerçektende, MMP'lerin zamansal, uzamsal ve uyarılabilir ifadesindeki farklılıklar, genellikle benzersiz rollerinin göstergesidir. Buna göre, çoğu MMP, benzersiz bir enzim aktivasyon mekanizması ve bir dereceye kadar transkripsiyon sonrası mRNA stabilizasyonu yoluyla yapısal olarak eksprese edilen (Overall, 1991) ve kontrol edilen dikkate değer MMP-2 istisnası dışında, transkripsiyon düzeyinde düzenlenir (Strongin ve ark., 1995).

Aksi takdirde, MMP gen ekspresyonu, çoklu sinyal yollarını etkileyen çok sayıda uyarıcı ve baskılayıcı faktör tarafından düzenlenir. Örneğin, çeşitli MMP'lerin ekspresyonu, forbol esterler, integrin türevli sinyaller, hücre dışı matriks proteinleri, hücre stresi ve hücre şeklindeki değişiklikler tarafından yukarı veya aşağı regüle edilebilir. Tip I kollajen, sağlam kollajen tarafından aktive edildiklerinde MMP-1 ekspresyonunu indükleyen ve MMP-1 ile parçalanmış kollajeni bağladıklarında inaktif hale gelen diskoidin alanı içeren reseptör benzeri tirozin kinazlar için bir ligand görevi görür. Böylece MMP-1 ekspresyonu, kendi substratı tarafından indüklenebilir ve o substratı böldüğünde ve artık ihtiyaç duyulmadığında spesifik olarak bastırılabilir. Ek olarak, MMP ekspresyonu, çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (Wang ve ark., 2000). Bu uyarıların çoğu, birkaç MMP gen *promotörü* içindeki *aktivatör* protein-1 (AP-1) bölgelerini heterodimerize eden ve bağlayan c-fos ve c-jun proto-

onkogen ürünlerinin ekspresyonunu ve/veya aktivasyonunu indükler. AP-1 kompleksleri, birkaç MMP geninin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamasına rağmen, başka faktörler de söz konusudur. Bazı durumlarda, bir sinyal bazı MMP genlerini koordineli olarak düzenleyebilir ve diğerlerini farklı şekilde düzenleyebilir. Örneğin, TGF- β , MMP-1 ve MMP-3 (stromelisin-1) genlerinin transkripsiyonunu baskılar, ancak MMP-13 (kollajenaz-3) ekspresyonunu indükler (Uría ve Otín, 2000).

MMP ekspresyonunun hücreye özgü indüksiyonu kültürde de gözlenmiştir. Örneğin, forbol esterler fibroblastlarda MMP-10 yerine MMP-3 ekspresyonunu indükler, ancak keratinositlerde bunun tersi meydana gelir (Windsor ve ark., 1993). Bu nedenle, bir MMP geninin belirli bir girdiye nasıl tepki verdiği, transkripsiyonel promotörünün organizasyonuna ve diğer sinyallerin varlığına veya yokluğuna, yani hücresel içeriğe bağlıdır. Birkaç *cis* düzenleyici eleman, gen promotöründe birbirlerine yakınlıklarına bağlı olarak MMP gen ekspresyonunu etkiler. AP-1 bölgeleri, birkaç MMP genine forbol esterler tarafından indüklenme yeteneği verir ve MMP-1 gibi genlerdeki komşu ETS (Eritroblast dönüşüm faktörü) bağlama bölgeleriyle sinerjistik olarak hareket eder, ancak MMP-13 gibi diğerlerinde indüklenme yeteneği vermez (Pendás ve ark., 1997).

Bu fark muhtemelen, ETS ve AP-1 bölgelerinin MMP-1 gen promotöründe 9 nükleotit ve MMP-13 promotöründe 20 nükleotit ayrı olması ve bu iki bölge arasındaki mesafenin kritik olması nedeniyledir (Gutman ve Wasylyk, 1990).

Çeşitli MMP gen promotörleri içinde birkaç başka varsayılan düzenleyici element daha tanımlanmıştır ve birçoğunun hücreye ve duruma özel gen ekspresyonunu düzenlediği fonksiyonel analizlerle gösterilmiştir. Bunlar;

- MMP-13 gen promotorunda, çekirdek bağlama faktörü-1 (CBFA1)'e yanıt veren osteoblastlara özgü bir elementi bulunur. (Jiménez ve ark., 1999).
- Birkaç MMP geninde, MMP-7 transkripsiyon başlangıç bölgesi yakınında β - catenin ile düzenlenen tanıma bölgesi, TGF- β inhibitör elementleri (Crawford ve ark., 1999).

- Birkaç MMP geninin yakınlarında da AP-2, Sp1, Sp3, NF- κ B , CCAAT(Arttırıcı ve bağlayıcı protein) veya retinoik asit bulunur (Fini, 1998; Lohi ve ark., 2000; (Ludwig ve ark., 2000).

MMP gen regülasyonu anlayışımızdaki sayısız ilerlemeye rağmen, MMP ekspresyonunu düzenleyen birçok sinyal yolu, nükleer faktör ve gen regüle edici elementler arasındaki karşılıklı etkileşim zor anlaşılmıştır (Ye, 2000).

2.9.3.2. Transkripsiyon sonrası düzenleme

Transkripsiyon sonrası mekanizmalar da MMP ifadesini etkileyebilir. Örneğin, MMP-1 ve MMP-3'ü kodlayan mRNA transkriptleri, forbol esterler ve EGF tarafından stabilize edilirken MMP-13 transkriptleri, PDGF ve glukokortikoidler tarafından stabilize edilir ve TGF- β tarafından destabilize edilir. MMP-1'in dönüşümü mRNA'nın AU açısından zengin dizileri tarafından düzenlenir ve benzer diziler, diğer MMP transkriptlerinin stabilitesini de düzenleyebilir (Vincenti, 2001).

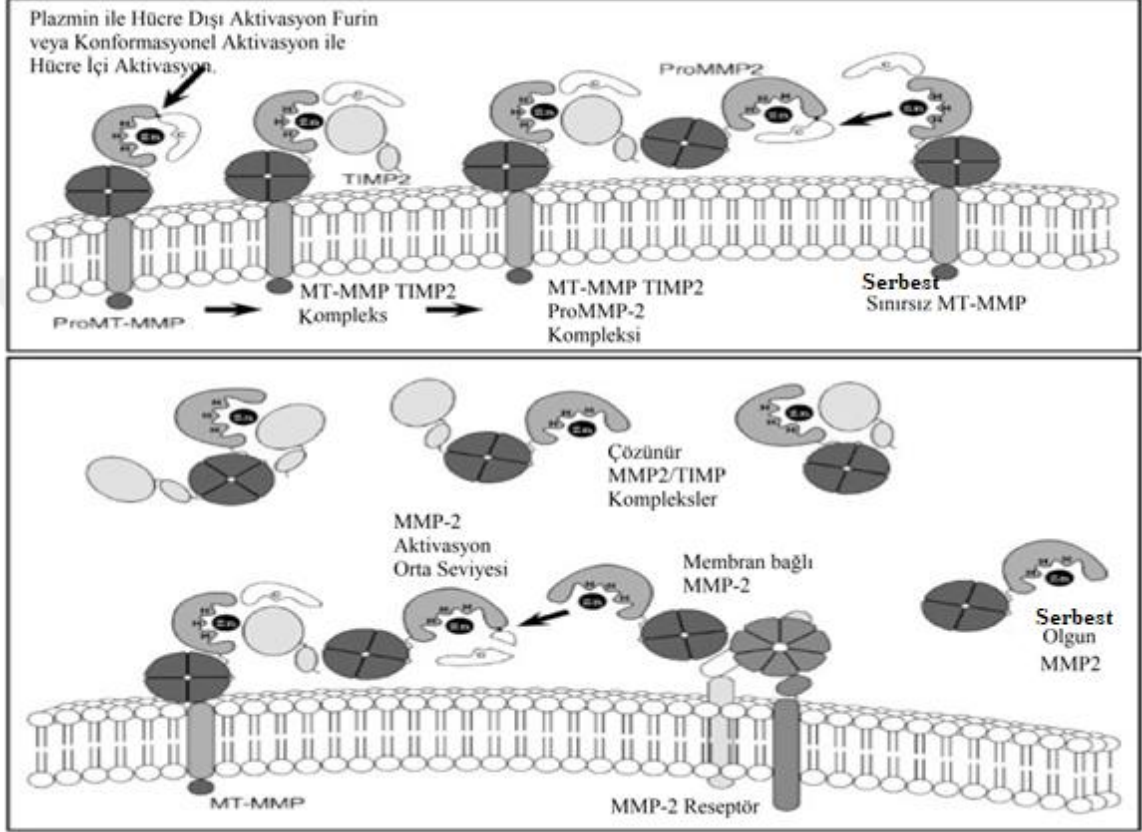
2.9.3.3. ProMMP'ler ve ProMMP'lerin aktivasyonu

MMP'ler, mRNA ekspresyonu, pro-enzimin aktif forma aktivasyonu ve endojen TIMP'lerin karşı koyma eylemleri dahil olmak üzere birçok seviyede düzenlenir. MMP'ler, proMMP'leri oluşturmak için translasyon sırasında sinyal peptidinin çıkarıldığı ön-proMMP'ler olarak sentezlenir. Bu zimojenlerde veya proMMP'lerde, PRCGXPD 'sistein anahtarı' motifinden gelen sistein , proMMP'leri hareketsiz tutmak için katalitik Zn^{+2} ile koordine olur (Nagase ve ark., 2006). Bu zimojenleri veya proMMP'leri işlemek ve aktive etmek için, sistein anahtarı bölünür ve pro-domain, aktif MMP formlarını üretmek için sıklıkla serin proteazlar, endopeptidaz furin, plazmin veya diğer MMP'ler gibi diğer proteolitik enzimler tarafından ayrılır (Nagase ve ark., 2006). MMP-11, MMP-21 ve MMP-28 gibi furin içeren MMP'ler ve MT-MMP'ler, propeptidin C-terminalinde furin benzeri bir pro-protein dönüştürücü tanıma dizisine sahiptir ve hücre içinde furin tarafından aktive edilir (Pei ve Weiss, 1995). MT-MMP'ler önce furin tarafından hücre içi aktivasyona uğrarlar, daha sonra bölünebilecekleri ve diğer proMMP'leri aktive edebilecekleri hücre yüzeyine ilerlerler

(English ve ark., 2001). TIMP, inhibitör olmayan proMMP/TIMP/MT-MMP komplekslerinin oluşumu için de gereklidir (Şekil 2.3.). Progelatinazlar ve TIMP'ler arasındaki inhibitör olmayan kompleksler, proMMP-2 ve TIMP-2, -3 veya -4 ve MMP-9 ve TIMP-1 ile sınırlıdır (Morgunova ve ark., 2002). Örneğin, TIMP-2 önce hemopeksin alanına bağlanarak proMMP-2 ile bir kompleks oluşturur ve daha sonra kompleks, bir MT1-MMP molekülünün aktif bölgesine bağlandığı hücre yüzeyine yerleşir (Strongin ve ark., 1995; Zucker ve ark., 1998). Bu üçlü proMMP-2/TIMP-2/MT1-MMP kompleksi daha sonra başka bir "serbest" MT1-MMP molekülü tarafından bağlı proMMP-2'nin aktif MMP-2'ye bölünmesini ve aktivasyonunu kolaylaştırır. Bu inhibitör olmayan kompleks, TIMP-2/aktif MMP-2'nin inhibitör kompleksinden farklıdır. TIMP-2'nin C-terminal alanı ile MMP-2'nin C-terminal hemopeksin arasında oluşturulur, öyle ki her iki molekül de sırasıyla inhibitör ve proteolitik özelliklerini korur (Morgunova ve ark., 2002). Hücre yüzeyinde MMP-2'nin aktivasyonu, hücre dışı boşlukta lokal olarak belirgin kollajenolitik aktiviteye ulaşabileceği yerde hücre çevresinde birikmesine izin verir (Visse ve Nagase 2003).

Benzer şekilde, stromelisinler MMP-3 ve MMP-10, hücrelerden aktif olmayan proMMP'ler olarak salgılanır, ancak daha sonra hücre yüzeyinde aktive edilir. MMP'ler ayrıca ısı, düşük pH, 4-aminofenilmerkürük asetat, cıva klorür, N-etilmaleimid, oksitlenmiş glutatyon, sodyum dodesil sülfat ve kaotropik maddeler gibi tiyol değiştirici maddeler dahil olmak üzere çeşitli fizikokimyasal maddeler tarafından da aktive edilebilir. Bu aktivatörlerin çoğu, MMP molekülünün sistein değiştirme motifindeki sistein-Zn⁺² koordinasyonunu bozar. Diğer MMP aktivatörleri, MMP-9'u aktive eden plazmin içerir. Ayrıca hem MMP-3 hem de hipokloröz asit MMP-7'yi aktive eder ve MMP-7 de MMP-1'i aktive edebilir (Kucukguven ve Khalil, 2013). MMP ekspresyonu/aktivitesi hormonlardan, büyüme faktörlerinden ve sitokinlerden de etkilenebilir (Verma ve Hansch, 2007). Örneğin, yumurtalık cinsiyet hormonları çeşitli MMP'lerin ekspresyonunu/aktivitesini etkileyebilir ve bu da menstrüel ve östrus döngüleri sırasında endometriyal doku yeniden şekillenmesine ve dökülmesine katılabilir. MMP'ler büyüme faktörleri tarafından düzenlenebilir (Hollborn ve ark., 2007). Örneğin, SNU-5 (Mide kanseri) hücrelerinde VEGFa'nın aşırı ekspresyonu MMP-2 ekspresyonunu artırırken VEGFa'nın aşağı regülasyonu MMP-2 ekspresyonunu

azaltır.(Mao ve ark., 2014) Ayrıca karotid arter plaklarında, epidermal büyüme faktörü (EGF), MMP-1 ve MMP-9 mRNA transkriptlerini yukarı regüle eder ve vasküler düz kas hücrelerinde MMP-9 aktivitesini artırır (Rao ve ark., 2014).

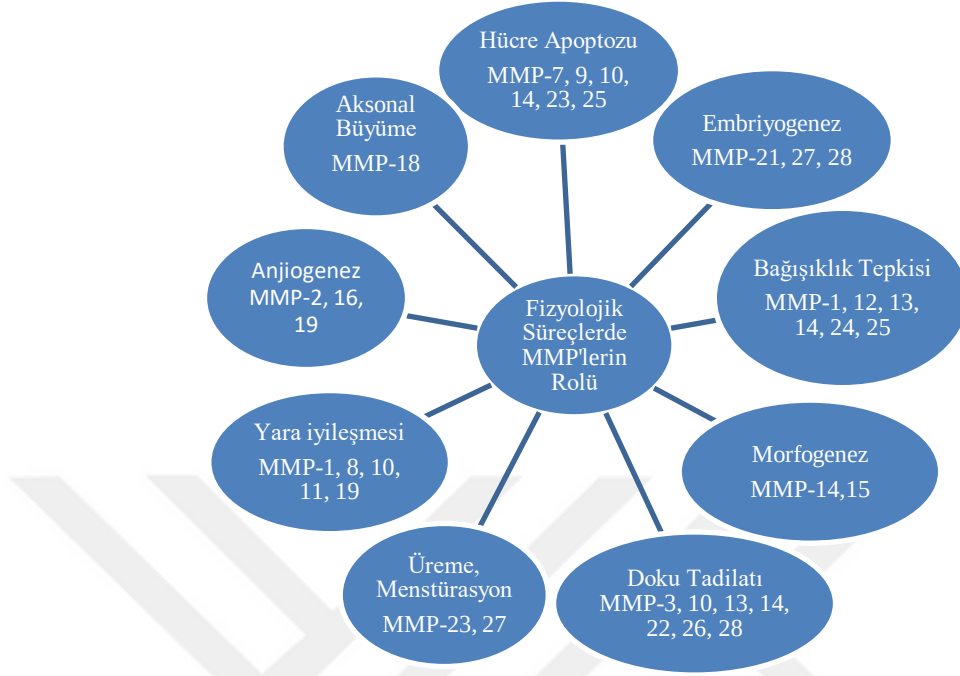


Şekil 2.3. Temsili olarak MMP-2'nin hücre yüzeyi aktivasyonu. (Bir ProMT-MMP hücre yüzeyine taşınma sırasında hücre içi furin benzeri serin proteinaz tarafından, hücre yüzeyinde plazmin tarafından veya proteolitik olmayan konformasyonel değişikliklerle aktive edilir. Aktive edilmiş MT-MMP daha sonra TIMP2 tarafından inhibe edilir ve ProMMP-2'nin hemopeksin alanı, bir trimoleküler kompleks oluşturmak üzere TIMP2'nin C terminal kısmına bağlanır. Engellenmemiş bir MT-MMP daha sonra MMP-2 propeptidinin çoğunu kaldırarak ProMMP-2'yi kısmen aktive eder. Propeptidin geri kalan kısmı, tamamen aktif olgun MMP-2 verecek şekilde hücre yüzeyinde ayrı bir MMP-2 molekülü tarafından çıkarılır. Olgun MMP-2 daha sonra hücre yüzeyinden salınabilir veya başka bir hücre yüzeyi MMP-2 yerleştirme proteini ile bağlanabilir. Ayrıca başka bir TIMP molekülü tarafından inhibe edilebilir veya lokal MMP:TIMP molar oranlarına bağlı olarak inhibe edilmemiş aktif durumda bırakılabilir) (Sternlicht ve Werb, 2001).

2.9.4. Matriks Metalloproteinaz'ların Görevleri

MMP'ler, kollajenler, elastin, jelatin ve diğer matriks glikoproteinleri ve proteoglikanlar dahil olmak üzere çeşitli ECM proteinlerinin dönüşümünü teşvik ederek doku yeniden şekillenmesinde önemli bir rol oynar. Kollajen ve elastin, vasküler duvarın yapısal bütünlüğü için esastır ve önemli MMP substratlarıdır (Tablo 2.1). MMP'ler kollajen tip I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X ve XIV'ü farklı etkinliklerle parçalar. MMP, agrekan, entaktin, fibronektin, tenasin, laminin, miyelin bazik protein ve vitronektin gibi diğer ECM protein substratlarını bozar. Kazein fizyolojik bir MMP substratı olmasa da, birkaç MMP tarafından sindirilir ve bu nedenle, zimografi deneylerinde bu MMP'lerin aktivitesini ölçmek için kullanılır (Küçüküven ve Khalil, 2013). MMP'ler iş birliği yapabilir. Örneğin, Kollajenazlar MMP-1, -13 ve -18 önce üçlü sarmal kollajeni çözer ve fibriller kollajen tip I, II ve III'ün peptit bağlarını $\frac{3}{4}$ ve $\frac{1}{4}$ fragmanlarına hidrolize eder (Nagase ve ark., 2006; Chung ve ark., 2004).

MMP'ler, hücre proliferasyonu, göçü ve farklılaşması, ECM'nin yeniden şekillenmesi ve doku invazyonu ve vaskülarizasyonu dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte önemlidir. (Şekil 2.4.). Bu biyolojik süreçler normal gelişim ve organogenez sırasında birçok kez gerçekleşir, ancak uygun şekilde dengelenmediği takdirde kanser, tümör ilerlemesi ve doku invazyonu gibi zararlı patolojik durumlara da katkıda bulunabilir. MMP'ler, büyüme faktörlerinin doğrudan fiziksel temasta olmayan hücreler tarafından kullanılabilir hale gelmesi için proteolitik bölünmesi, kurucu hücrelerin dokulardan yakındaki stromaya hareket edebilmesi için göç sinyalini ve hücre göçünü sonlandırmak için ECM'nin bozulması ve düzenlenmiş reseptör bölünmesi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla bu işlemlere katılabilir (Chang ve Werb, 2001).



Şekil 2.4. MMP'lerin fizyolojik süreçlerdeki temsili rolleri

Komşu hücreler arasındaki fiziksel temasların dinamik modülasyonu ve doku onarımı gibi durumlar epitelyal süreçlerin ayrılmaz bir parçasıdır. MMP'ler, akut yaralanmadan sonra doku onarımına katılır (Irigoyen ve ark., 2015). MMP aktivitesinin indüksiyonu, hücreler arası bağlantıların çözülmesine ve ECM'nin bozulmasına katkıda bulunur. Böylece hücre hareketindeki fiziksel kısıtlamanın üstesinden gelmiş olur (Mauris ve ark., 2014).

2.9.5. Matriks Metalloproteinaz -1 (MMP-1) Özellikleri ve Görevleri

Kollajenazlar, MMP-1 (interstisyel kollajenaz), MMP-8 (nötrofil kollajenaz), MMP-13 ve MMP-18'i içerir. Bu MMP'ler, fibriler kollajen tip I, II ve III'ün karakteristik $3/4$ ve $1/4$ fragmanlarına bölünmesinde önemli bir rol oynar. Önce üçlü sarmal kollajeni çözerler, ardından peptit bağlarını hidrolize ederler (Chung ve ark., 2004; Nagase ve Fushimi, 2009).

Kollajenaz-1 veya interstisyel kollajenaz olarak da adlandırılan MMP-1, 11q22.3 gen lokasyonunda bulunur. MMP-1 kollajen ve jelatini bozar. MMP-1 ayrıca proMMP-9'u aktif formuna ayırır. Diğer birçok MMP'de olduğu gibi, fizyolojik koşullar altında çoğu

hücrede MMP-1 seviyeleri çok düşüktür, ancak enflamatuvar koşullar ve otoimmün hastalıklarda yukarı regüle edilir (Mittal ve ark., 2016). İyileşmesi yavaş yaralarda ve venöz yaralarda, nispeten düşük TIMP seviyeleri ile MMP-1, -8 ve -9'un artan seviyeleri ve aktiviteleri tespit edilmiştir (Ayuk ve ark., 2016). MMP-1 ekspresyonu, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interlökin-1 (IL-1) gibi inflamatuvar sitokinler tarafından artırılır (Nam ve ark., 2011). İnsan vokal kord fibroblast hücre kültüründe, TNF- α hücre proliferasyonunu inhibe eder, kollajen III ve fibronektin için TIMP-3 ve mRNA transkript seviyelerini aşağı regüle eder ve MMP-1 ve -2 ekspresyonunu yukarı regüle ederek MMP/TIMP-3 oranının artmasına neden olur. Ayrıca MMP-1 vokal kord yaralanmasını takiben yara iyileşmesinde hızlandırabilir (Chen ve Thibeault, 2010).

2.10. Hücresel Yaşlanma ve Patogenezi

Hücresel yaşlanma, çeşitli streslerden kaynaklanan ve geri dönüşü olmayan büyüme durması durumuna yol açan bir süreçtir. Yaşlanan hücreler, yaşlanma sırasında birikir ve yaşa bağlı çeşitli hastalıkları teşvik etmede rol oynar. Hücresel yaşlanma, tümör baskılanmasında, yara iyileşmesinde ve doku fibrozuna karşı korumada önemli bir rol oynayabilir; bununla birlikte, yaşlanan hücrelerin *in vivo* zararlı etkileri olabileceğine ve dokuların yeniden şekillenmesine, organizmanın yaşlanmasına ve yaşla ilgili birçok hastalığa neden olabileceğine dair giderek artan kanıtlar da mevcuttur. Hücresel yaşlanma, çeşitli içsel ve dışsal faktörler tarafından indüklenebilir. Yaşlanan hücreler çok sayıda biyolojik olarak aktif faktör salgılar; yaşlanan hücrenin spesifik salgılama fenotipi, organizmalarda fizyolojik ve patolojik sonuçlara katkıda bulunur (Regulski, 2017).

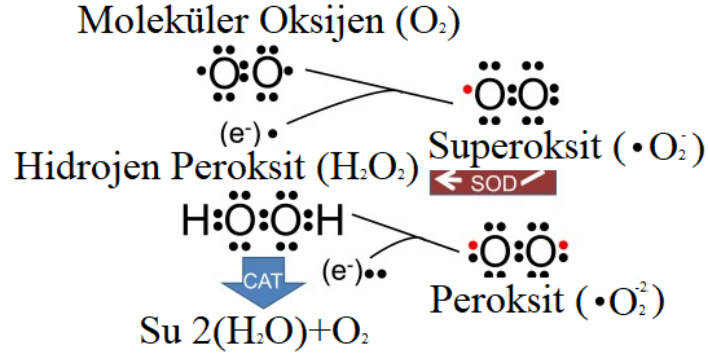
Yaşa bağlı tüm kronik hastalıklara kısmen kronik steril (patojenle ilişkili olmayan) inflamasyon, makromoleküler hasar, progenitör hücre disfonksiyonu ve hücresel yaşlanma dahil yaşa bağlı doku disfonksiyonunun altında yatan temel yakınsak yaşlanma mekanizmaları neden olabilir (Segura ve ark., 2018). Son on yılda, hücresel yaşlanma, genel doku disfonksiyonunun ve yaşlanma fenotiplerinin olası bir nedeni olarak ortaya çıkmıştır (Kirkland ve Tchkonja, 2015; Espín ve Serrano, 2014). Hücresel yaşlanma, telomer erozyonu, DNA hasarı, oksidatif stres ve onkojenik aktivasyon gibi çeşitli hücresel stresörlere yanıt olarak ortaya çıkan, esasen geri dönüşü olmayan bir

büyüme durması olup bir antitümör mekanizması olduğu düşünülmektedir (Campisi ve Fagagna, 2007).

Hücrel yaşlanma, yaşlanmanın dejeneratif ve hiperplastik patolojilerini ilişkilendiren bir stres tepkisidir. Bu dejenerasyon veya kademeli fonksiyon kaybı moleküler, hücrel, doku ve organizma seviyelerinde meydana gelir. Yaşa bağlı fonksiyon kaybı, tek hücreli organizmalardan büyük, karmaşık hayvanlara kadar neredeyse tüm yaşlanan organizmaların bir özelliğidir. Memelilerde, yaşa bağlı dejenerasyon sarkopeni, ateroskleroz, kalp yetmezliği, osteoporoz, makula dejenerasyonu, akciğer yetmezliği, böbrek yetmezliği, nöral dejenerasyon gibi iyi bilinen patolojilere ve Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi yaşa bağlı patolojilerin önde gelen nörodejeneratif hastalıklarına yol açar. Türlerin belirli yaşa bağlı patolojilere karşı duyarlılıkları farklılık gösterse de bu hastalıklar genellikle türe özgü yaşam süresinin yaklaşık orta noktasından başlayarak (örneğin, insanlar için 50-60 yıl) üstel kinetiklerle yükselir (Alliance for Aging Research, 2006; Office, 2013). Hücrel yaşlanma, 1960'larda Hayflick (Hayflick, 1965; Hayflick ve Moorhead, 1961) tarafından resmen tanımlanmıştır. Belli sayıda bölünme geçirdikten sonra, normal insan diploid fibroblastlarının geri dönüşü olmayan, bölünmeyen duruma veya replikatif yaşlanmaya girdiğini göstermiştir. Araştırmalar, normal insan diploid fibroblastlarının 50 ila 60 kez bölünebildiğini, ancak daha sonra geri dönüşümsüz olarak bölünmeyi durdurduklarını göstermiştir (Narita ve ark., 2011; Young ve ark., 2011). Bu nedenle, ömürlerinin sonuna ulaşmadan önce tamamlanan bölünme sayısı Hayflick Limiti olarak adlandırılmıştır.

2.11. Antioksidanlar

Vücudun iki ana savunma sistemi, serbest radikal detoksifiye edici enzimler ve antioksidan moleküllerdir (Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012; Martini, 2009). Katalaz ve glutatyon peroksidazlar, süperoksit dismutaz (SOD) 'ın yapısındaki süperoksit katyonunun 1 hidrojen elektronu alarak, moleküler oksijene (O_2) veya hidrojen peroksit (H_2O_2) bağlanmasını katalize eden antioksidan enzimlerdir (Şekil 2.5.) (Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012).



Şekil 2.5. Reaktif oksijenlerin oluşumu

Bir antioksidan, serbest radikallerin ve/veya ROS'un diğer atomlardan elektron almasını engelleyebilen herhangi bir moleküldür (Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012; Martini, 2009). Başka bir deyişle, bir antioksidan, serbest radikallerin veya ROS tarafından teşvik edilen reaksiyonların neden olduğu oksijen (oksidasyon) hasarını engelleyen herhangi bir maddedir. Antioksidanlar hücre içi ve hücre dışı konumlarda etki gösterir (Ames ve ark., 1981; Becker, 1993; Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012; Martini, 2009). Glutasyon ve ürik asit, vücudun sentezleyebildiği ve endojen antioksidan kaynakları olan iki moleküldür (Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012). Hem glutasyon hem de ürik asit, insan derisinde bulunan önemli antioksidanlardır (Shindo ve ark., 1994).

Birçok farklı antioksidan, besin veya diğer eksojen kaynaklardan elde edilir. En yaygın olarak bilinen antioksidanlar arasında A, C ve E vitaminleri bulunur. (Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012; Martini, 2009). Bununla birlikte, antioksidanların besin kaynakları, birçok bitkide bol miktarda bulunan karotenoidler, lipoik asit ve fenolik bileşiklerdir (Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012; Shindo ve ark., 1994). Bu antioksidanların çoğu, insan derisinin epidermal ve dermal katmanlarına dahil edilir (Shindo ve ark., 1994).

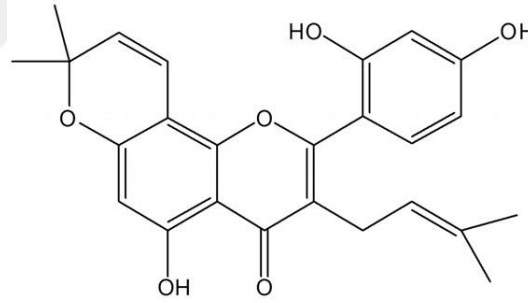
Son olarak, solar UV radyasyonuna, ağır metallere veya diğer toksik ajanlara maruz kalmanın, mitokondriyal fonksiyonla bağlantılı normal metabolik oksidasyon yoluyla kaçınılmaz ROS üretimiyle birlikte serbest radikal veya ROS oluşumunu arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle ROS ve antioksidanlar hastalıklardan arınmış sağlıklı bir yaşam için bir denge meselesi haline gelir; biyolojik sistemler, vücudun maruz kaldığı veya ürettiği çeşitli serbest radikalleri veya ROS'ları "nötralize etmeye" hazır yeterli

miktarda antioksidana sahip olmalıdır. Antioksidanlar ve ROS arasında bir dengesizlik meydana gelirse, oksidatif stres ortaya çıkacak ve homeostazi sağlanamayacaktır (Tulah ve Birch-Machin, 2013).

2.12. Bir Antioksidan Olarak Morusin

Polifenoller, ilginç biyolojik aktiviteye sahip doğal moleküllerdir (Stompor-Gorący, Bajek-Bil ve Machaczka, 2021). Umut verici bir grup, geniş bir farmakolojik aktivite spektrumu ile karakterize edilen doğal prenilflavonoidlerdir (Turdo ve ark., 2021; Koosha ve ark., 2019).

Morus alba (Beyaz dut) Güneydoğu Asya'ya özgü yapraklı bir ağaçtır. Yaprakları, meyveleri, tohumları ve kabuğu flavonoidler (astragalin, kaempferol, kersetin, rutin) ve alkaloidler (1-deoksinojirimycin) gibi bir dizi değerli biyoaktif bileşik içerir.



Şekil 2.6. Morusin'in moleküler yapısı

Morusin, flavonoidler grubuna aittir. *Morus alba*'nın (Moraceae) kök korteksinde doğal olarak bulunan en önemli preflavonoidlerden biridir. Morusin, C-2 ve C-3 arasında çift bağı olmayan hidrojene flavonun bir türevidir. (Panek-Krzyśko ve Stompor-Gorący, 2021)

Morusin, $C_{25}H_{24}O_6$ kimyasal formülüne sahip bir bileşiktir. 420.5 g/mol moleküler ağırlık olup IUPAC adı 2-(2,4-dihidroksifenil)-5-hidroksi-8,8-dimetil-3-(3-metilbut-2-en-1-il)-4H ,8H-pirano[2,3-f]kromen-4-on olarak bilinmektedir. C-5, C-2' ve C-4' de hidroksil grupları olan bir flavonun kimyasal yapısına sahiptir (Şekil 2.6.). Bu serbest hidroksil grupları, morusin'in yapısal analoglarını verecek şekilde çeşitli fonksiyonel gruplarla ikame edilebilir. Morusin, suda çözünmeyen hidrofobik bir hidroksiflavon

olduğundan, vücut sıvılarında da çok az çözünür. Bu nedenle, *in vivo* etkinliğini artırmak için yeni yöntemler geliştirilmektedir (Agarwal ve ark., 2019).

Ayrıca, morusinin güçlü bir antikanser (Park ve ark., 2018; Zhou ve ark., 2021) antioksidan (Martins ve ark., 2021), antiinflamatuvar (Jia ve ark., 2020) ve antimikrobiyal (Pang ve ark., 2019) aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu bileşik ayrıca insan immün yetmezlik virüsünün (HIV) potansiyel bir inhibitörü olarak da hizmet edebilir (Syahdi ve ark., 2012). Son zamanlarda, morusin ayrıca *Herpes simplex* virüs tip 1'e (HSV-1) karşı *Mori ramulus*'un aktif bir antiviral bileşen olarak tanımlanmıştır (Syahdi ve ark., 2012).

2.13. Fibroblastların Hücresel Yaşlanması

Dermal bağ dokusunun homeostazisini koruyan ve dermisten türetilen hücrelerin hücresel yaşlanması, cilt yaşlanmasının temel bir nedenidir ve çoğunlukla içsel yaşlanma süreci tarafından hücrelerin proliferatif kapasitesinin azalması nedeniyle yenilenmenin durmasına neden olur. Tüm organlarda olduğu gibi, matriks proteinlerinin üretilmesinden sorumlu dermal fibroblastlar da yaşla birlikte replikatif yaşlanma gösterir (Stanulis-Praeger, 1989; Cristofalo ve Pignolo, 1993).

Diğer hücrelerde olduğu gibi fibroblastlarda da hücresel yaşlanmayı açıklamak için başka bir mekanizma, gen ekspresyon modellerinde ve hücresel proliferatif kapasitede yaşa bağlı değişikliklerin telomerlerin kontrolü altında olma olasılığı ifade edilir (Kosmadaki ve Gilchrest, 2004). Telomerler, birbirini izleyen tekrarlayan DNA dizilerinden oluşan lineer kromozomların uçlarıdır. Telomerlerin uzunluğu, hücre bölünmesiyle 150 baz çiftine kadar azalır (Harley ve ark., 1990) ve bireyin yaşı ile ters orantılıdır (Allsopp ve ark., 1992). Telomerler kritik derecede kısaldığında, hücreler proliferatif yaşlanmaya girer ve bu nedenle telomerler, hücrelerin genç mi yoksa yaşlı mı olduğunu gösteren biyolojik bir saat görevi görebilir (Wright ve Shay, 1992). Bu nedenle, telomer kısalması, seri hücre bölünmesinden kaynaklandığı için esas olarak içsel yaşlanma tarafından indüklenen hücresel yaşlanmayı açıklayabilir. Bununla birlikte, fotoyaşlanmanın telomer kısalmasını etkilediği de belirlenmiştir (Li ve ark., 2003).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

Tez çalışması kapsamındaki tüm deneylerde ATCC'den temin edilen İnsan Fibroblast hücre hattı Hs68 (ATCC® CRL-1635™) kullanıldı. Hücreler, %10 FBS (besiyerini zenginleştirmek için kullanıldı) ve %2 glutamin (hızlı büyümeyi ve canlılığı uzatır) ile desteklenmiş DMEM (ATCC® 30-2006™) besiyerinde çoğaltılarak, %5 CO₂'li etüvde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin önerdiği şekilde hücrelerin tripsinazyonu için %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı kullanıldı. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak pasajlama oranı 1:2 veya 1:3 olarak belirlendi. Hücreler %95 besiyeri ve %5 DMSO içeren “dondurma” besiyeri içerisinde kısa süreli olarak -80 °C derin dondurucuda uzun vadede sıvı azot tankları içerisinde saklandı.

3.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

3.2.1. %10'luk FBS İçeren DMEM Besiyerinin Hazırlanması

%10'luk FBS içeren DMEM besiyeri hazırlamak için 500 mL'lik besiyeri içerisine 50 mL FBS (Fetal Sığır Serum), 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu (vücudun sentezlediği ihtiyaç duyulan aminoasitler), 1 mL L-Glutamin, 2,5 mL sodyum piruvat (tampon olarak kullanılır) ve 1 mL antibiyotik çözeltisi (olası bir kontaminasyonu engellemek için) ilave edilerek iyice karışması sağlandı. Üzerine hazırlanma tarihi yazılarak +4°C'ye kaldırıldı.

3.2.2. %1'lik FBS İçeren DMEM Besiyerinin Hazırlanması

%1'lik FBS içeren DMEM besiyeri hazırlamak için 500 mL'lik besiyeri içerisine 5 mL FBS (Fetal Sığır Serum), 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu, 10 mL L-Glutamin, 2,5 mL sodyum piruvat ve 1 mL antibiyotik çözeltisi ilave edilerek iyice karışması sağlandı. Üzerine hazırlanma tarihi yazılarak +4°C'ye kaldırıldı.

3.2.3. Dondurma Besiyerinin Hazırlanması

Dondurma besiyeri için 97,5 mL FBS'nin içine 2,5 mL DMSO (Dimetil sülfoksit) sıvısı eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.3. Morusinin Hazırlanması

Morusinin ticari formu liyofilize edilmiş toz şeklinde satılmaktadır. Etken içeriği; morusin (2 mg / 4,7496 mL) ve DMSO (çözücü) ile hazırlanmaktadır. Etkenin tek seferde kullanılan konsantrasyonu 32 µM/mL'dir. Morusin, etkenin besiyerindeki proteinlerle etkileşimini en aza indirebilmek için %1 serum içeren besi yerinde, en yüksek konsantrasyonu 32 µM/mL olacak şekilde, her seferinde ½ kez seyreltme yapılarak seri dilüsyon halinde hazırlandı ve hemen hücrelere uygulandı (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Morusinin hazırlama protokolü

<i>In vitro</i>	DMSO: $\geq 125\text{mg/mL}$ (297.30 mM) * " $\geq$ " çözünür anlamına gelir, ama doygunluk bilinmiyor.					
	Stok Solüsyonları Hazırlamak	Çözücü		Çözünen		
				1 mg	2 mg	5 mg
		Konsantrasyon	1 mM	2,3784 mL	4,7568 mL	11,8920 mL
			5mM	0,4757 mL	0,9514 mL	2,3784 mL
			10 mM	0,2378 mL	0,4756 mL	1,1892 mL

3.4. Hücrelerin Deneyler İçin Bölünmesi

3.4.1. Hücrelerin Tripsinasyonu

Petri kabını en az %70 oranında dolduran hücreler, hücre kültürü kabinine alındı. Burada petri kaplarındaki besiyeri pipetör ile çekilerek atıldı. %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımından büyük petriler (150x25 mm) için 4 mL küçük petriler (100x20 mm) için 2 mL eklendi. Mikroskop ile kontrol edilerek tüm hücrelerin kalkmaları beklendi. Kalkan

hücreler %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri ile falkon tüplere aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısımdaki süpernatant atıldı. Dipte kalan hücre peleti diğer işlemler için kullanıldı.

3.4.2. Hücrelerin Proliferasyon Deneyleri İçin 96-Kuyucuklu Plaklara Bölünmesi

Tripsinasyon işlemi ile santrifüj sonrası falkon tüpte elde edilen hücreler üzerine 10 mL %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek iyice karışması sağlandı. Daha sonra ependorf tüpün içerisine 900 µL %10'luk DMEM besiyeri, 100 µL'de içerisinde hücre bulunan besiyerinden eklenerek 10 kat sulandırıldı. Bu hücre karışımı Thoma lamında sayıldı. Dört tane 16 karenin bulunduğu Thoma lamında bu alanlardaki hücrelerin sayısının ortalaması alındı. Bu ortalama değer sulandırma katsayısı ve 10^4 ile çarpılarak mL'deki hücre sayısı elde edildi. Hücreler 96 kuyucuklu plaklara her kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde bölündü.

3.4.3. Hücrelerin ELISA Deneyleri İçin 6-Kuyucuklu Plaklara Bölünmesi

Tripsinasyon işlemi ile santrifüj sonrası falkon tüpte elde edilen hücreler üzerine 10 mL %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek iyice karışması sağlandı. Daha sonra ependorf tüpün içerisine 900 µL %10'luk DMEM besiyeri, 100 µL de içerisinde hücre bulunan besiyerinden eklenerek 10 kat sulandırıldı. Bu hücre karışımı Thoma lamında sayıldı. Dört tane 16 karenin bulunduğu Thoma lamında bu alanlardaki hücrelerin sayısının ortalaması alındı. Bu ortalama değer sulandırma katsayısı ve 10^4 ile çarpılarak mL'deki hücre sayısı elde edildi.

3.5. Morusinın Fibroblast Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkileri

3.5.1. Morusin uygulamaları

Morusinin fibroblast hücre hatları üzerindeki etkilerini inceleyen *in vitro* bir çalışma olmadığı için, Hs68 hücrelerinin proliferasyonları üzerine etkisini belirlemek amacı ile öncelikle bir doz taraması yapıldı. Bu amaçla, hücreler 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara bölündü ve yapışmaları için 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin besiyerleri çekilerek her bir kuyucuğa farklı

konsantrasyonlardaki (32-16-8-4-2-1-0,5-0,25-0,125 $\mu\text{M/mL}$) morusin 100 μl /kuyucuk olacak şekilde uygulandı. Yüksek konsantrasyonlarda hücrelerin tamamına yakını öldüğü gözlenince daha düşük konsantrasyonlarda çalışma tekrar planlanarak (4-2-1-0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125-0,015625 $\mu\text{M/mL}$) morusin 100 μl /kuyucuk olacak şekilde uygulandı.

3.5.2. Deneylerin sonlandırılması

Morusinin hücrelerinin büyümesini üzerine etkisi olup olmadığı WST-1 Test Kiti (WST Assay Kit / Cell Proliferation) kullanılarak belirlendi. WST-1 kitinin yüksek oranda suda çözünen tetrazolyum tuzu, WST-1 canlı hücrelerdeki dehidrogenaz aktiviteleriyle redüklenerek sarı renkli formazana dönüşür. Test sonucu ortaya çıkan renk yaşayan hücre sayısı ile doğru orantılıdır. İlaç uygulamasının hemen arkasından, başlangıçtaki hücre sayısını belirlemek için başlangıç zamanı (Time Zero (T0)) okuması yapıldı. Bunun için T0 olarak belirlenen kuyucuklardaki besiyeri çekilerek yerine 90 μl serum içermeyen besiyeri koyuldu ve içerisine kit içerisindeki WST-1 solüsyonun'dan 10 μl eklendi. 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda plak kapağı açılmadan absorbands değerleri ELISA kit okuyucuda 450 nm'de okundu. Bu okumanın ardından hücreler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda inkübe edildi. Her bir inkübasyon süresi sonunda deneyler T0 okumasındaki gibi sonlandırıldı. Her biri kendi içinde 8 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu Instad 4.0 istatistik programında tek yönlü ANOVA Testi ve Dunnett Testi ile değerlendirilip, kontrol grubu (ilaç uygulanmamış grup) ile karşılaştırılarak yorumlandı.

3.6. Hücrelerden Besiyerine Salınan MMP-1 Miktarının Belirlenmesi

3.6.1. Morusin uygulamaları

İnsan fibroblast hücre hattında morusinin Matriks Metaloproteinaz-1 salınımı üzerine etkisinin belirlenebilmesi için, WST-1 testi sonuçlarına göre ölüm oranının en düşük olduğu proliferasyonun inhibe edildiği en yüksek 2 konsantrasyon (4-2 $\mu\text{M/mL}$) ve proliferasyonun inhibe edilmediği en yüksek 2 konsantrasyon (1-0,5 $\mu\text{M/mL}$) seçildi.

Hücreler 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu plaklara bölündü ve yapışmaları için 24 saat inkübe edildi. Hücreler yapıştıktan sonra belirlenen konsantrasyonlar (4, 2, 1 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$) 2ml/kuyucuk olacak şekilde hücrelere uygulandı. 24 48 ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda besiyerleri toplanarak kit prosedürlerine uygun şekilde çalışıldı.

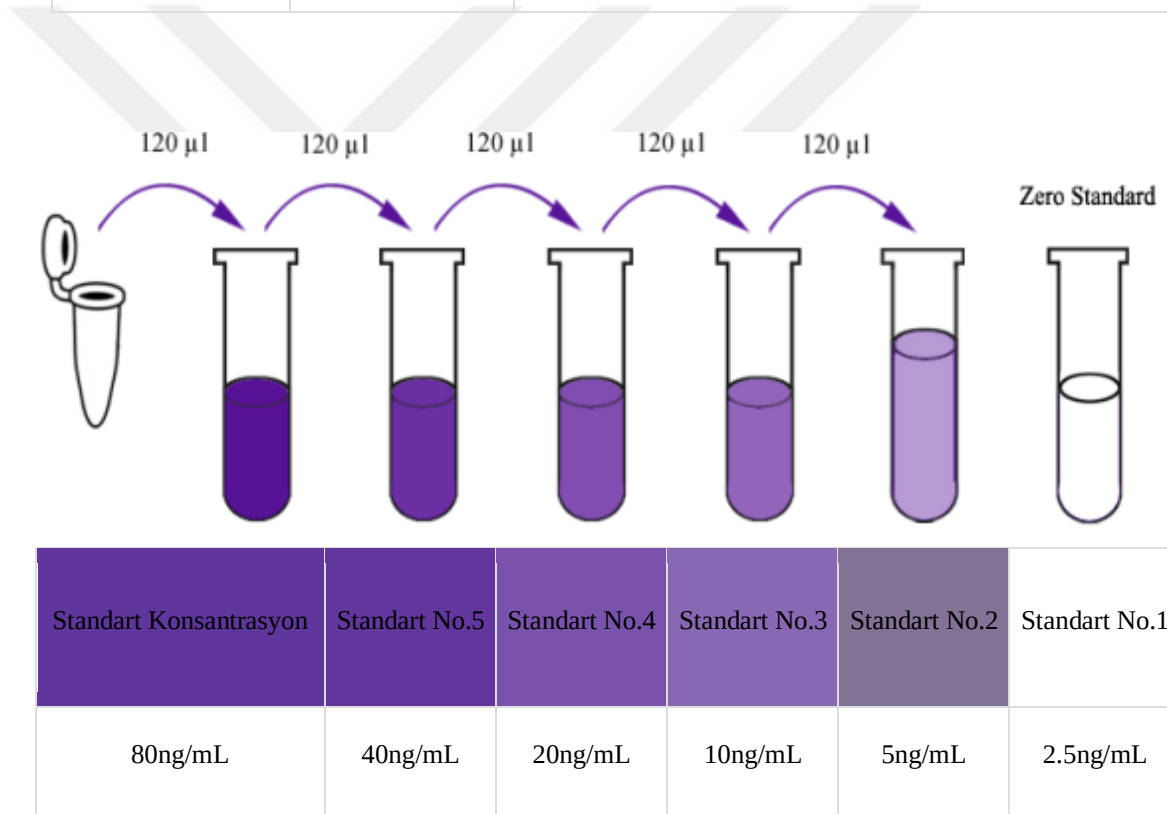
3.6.2. Hs68 hücrelerinden besiyerine salınan MMP-1 miktarının belirlenmesi

Hs68 Fibroblast hücrelerinden besiyerin salınan MMP-1 miktarları, 24, 48 ve 72saatlik inkübasyon süreleri sonunda Human MMP-1 ELISA Kit (BioLegend Kat. No: 440707) kullanılarak belirlendi. Bu kit hücre kültürü süpernatantlarında MMP-1'un hem pro hem de aktif formunun kantitatif olarak belirlenmesini sağlamaktadır. Kit içerisinde MMP-1'a özel monoklonal antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak vardır.

Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler talimatlara göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına gelmesi için beklenildi. Testler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Standart Bir 40ng/mL standart stok solüsyonu oluşturmak için 120 μL standart (80ng/mL) 120 μL standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapılmadan önce standardın hafif çalkalama ile 15 dakika oturmasına izin verildi. 20ng/mL, 10ng/mL, 5ng/mL ve 2.5ng/mL solüsyonlar üretmek için standart stok solüsyonunu (40ng/mL) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyrelterek çift standart noktalar hazırlandı. Kalan solüsyon daha sonra -20°C'de dondurularak yapılacak başka çalışmalar için saklandı. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi şu şekildedir:

Tablo 3.2. MMP-1 standartların hazırlanma protokolü

40ng/mL	Standart No.5	120 µL Orjiinal standart + 120 µL Standart dilüent
20ng/mL	Standart No.4	120 µL Standart No.5 + 120 µL Standart dilüent
10ng/mL	Standart No.3	120 µL Standart No.4 + 120 µL Standart dilüent
5ng/mL	Standart No.2	120 µL Standart No.3 + Standart dilüent
2.5ng/mL	Standart No.1	120 µL Standart No.2 + Standart dilüent



Şekil 3.1. Standart seyreltmelerin yapılması

Test için gereken strip sayısı belirlendi. Şeritleri kullanılmak üzere çerçevelere yerleştirildi. Kullanılmayan stripler 4°C'de koruma altına alındı.

Standart kuyuya 50 µL standart eklendi. Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyuya antikor eklenmedi.

Numune kuyularına 40 µL numune eklendi ve ardından 10 µL insan MMP-1 antikoru eklendi, daha sonra numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µL streptavidin-HRP eklenerek iyice pipetlendi. Plaka bir kapatıcı ile örtülerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

Daha sonra kapatıcı çıkartılarak plaka 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyular her yıkamada 30 saniye ile 1 dakika arasında 300 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Otomatik yıkama için her kuyu boşaltıldı ve yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Plaka kurutma kâğıdı ile iyice kurulandı.

Her kuyuya önce 50 µL substrat solüsyonu A ardından 50 µL substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plak inkübe edildi.

Her kuyucuğa daha sonra 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve mavi rengin sarıya dönüşümünü gözlemlendi.

Durdurma solüsyonunu ekledikten sonraki 10 dakika içerisinde 450 nm'ye ayarlanmış optik yoğunluğu (OD değeri) ölçülmüştür.

3.7. İstatiksel Analizler

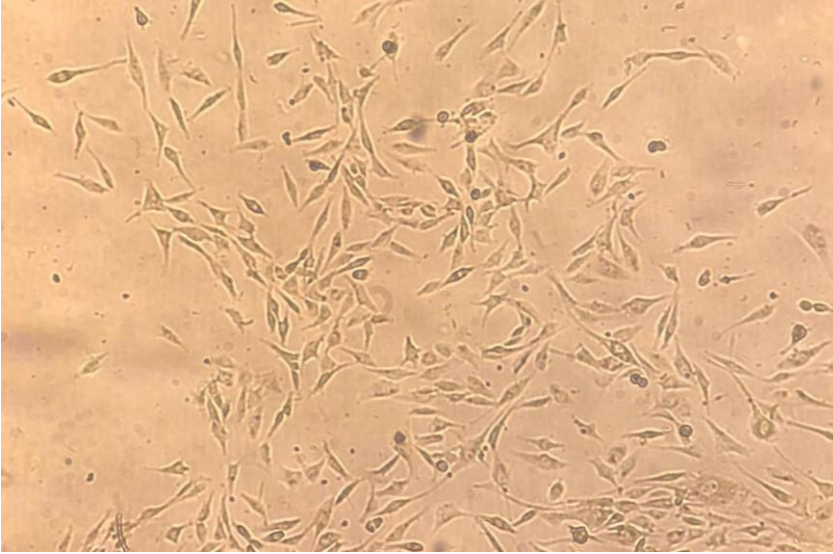
Çalışmadan elde edilen veriler grup içi değerlendirmeler için Dunnett's Multiple Comparison post-test, gruplar arası değişimlerin değerlendirilmesi için ise Tukey-Kramer multiple comparison test, the Student's paired t-test ve ANOVA testleri ile analiz edildi ($p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi). Elde edilen verilerin Sigma Plot 10.0 (SPSS Inc., USA) programı ile grafikleri oluşturuldu.

4. BULGULAR

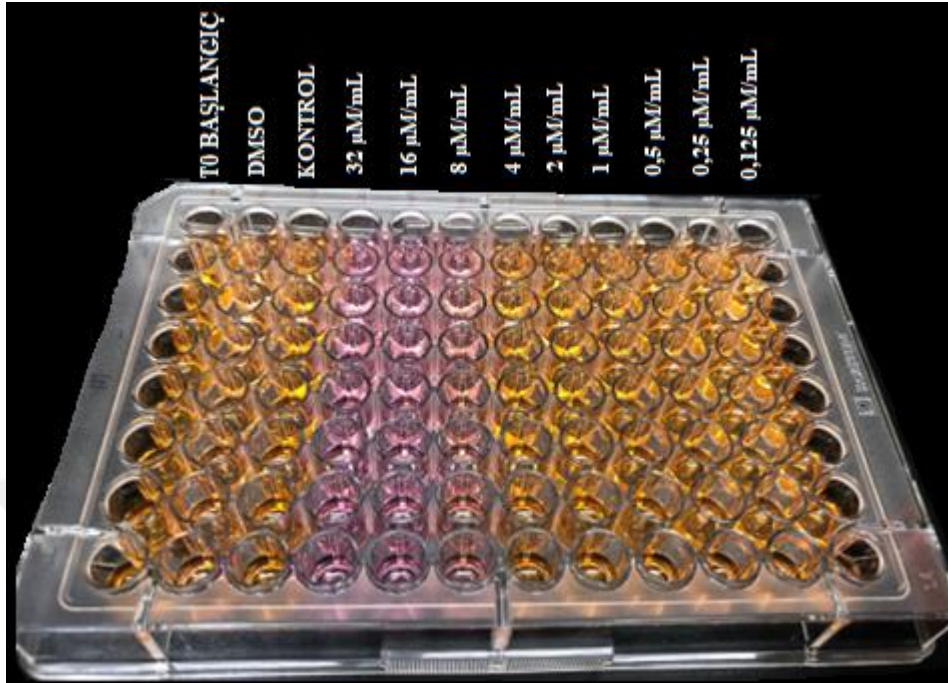
4.1. Morusinin Hs68 Hücre Hattı Üzerine Gösterdiği Sitotoksik ve Proliferatif Etkiler

Kendi içerisinde sekiz tekrar ve birbirinden bağımsız üç deney seti halinde gerçekleştirilen (Şekil 4.2.) başlangıç konsantrasyon tarama çalışmalarında, morusinin Hs68 hücreleri üzerine her bir inkübasyon süresi için farklı konsantrasyonlarda sitotoksik ve proliferatif etkiler gösterdi.

Morusinin, birbirinden bağımsız üç deney seti 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, çeşitli morusin konsantrasyonlarının Hs68 hücreleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Hücre canlılığı WST-1 uygulanarak ELISA okuyucu ile OD değerleri alınmıştır (Tablo 4.1., Tablo 4.2., Tablo 4.3., Tablo 4.4., Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.) ve bu değerlere bağlı oluşturulmuş grafikler sunulmuştur (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.).



Şekil 4.1. Yapışmış Hs68 fibroblast hücrelerinin plaktaki görüntüsü.



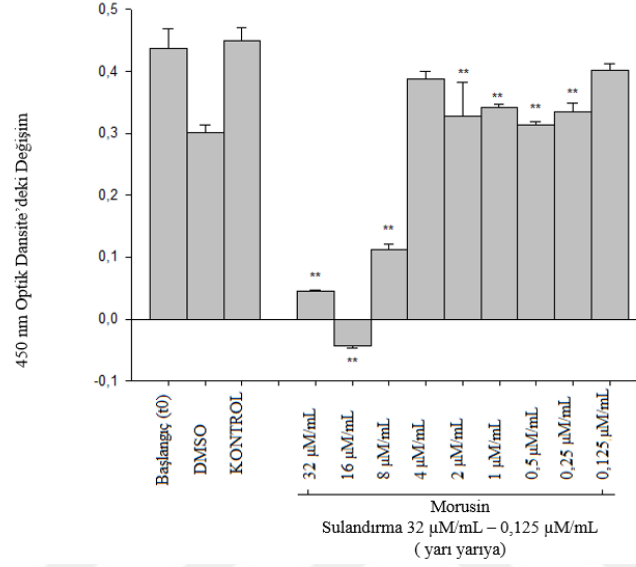
Şekil 4.2. Çeşitli konsantrasyonlardan morusin uygulanmış Hs68 fibroblast hücrelerine WST-1 canlılık testi uygulandıktan sonraki renk dönüşümü (WST-1 kitinin yüksek oranda suda çözünen tetrazolyum tuzu, WST-1 canlı hücrelerdeki dehidrogenaz aktiviteleriyle redüklenerek sarı renkli formazana dönüşür).

Tablo 4.1. Morusinun 1. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi (WST-1 uygulaması sonucu ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri)

T0	DMSO	KONTROL	32 µM/mL	16 µM/mL	8 µM/mL	4 µM/mL	2 µM/mL	1 µM/mL	0,5 µM/mL	0,25 µM/mL	0,125 µM/mL
0,332	0,230	0,329	0,037	-0,056	0,081	0,338	0,345	0,319	0,286	0,282	0,388
0,370	0,294	0,426	0,037	-0,049	0,077	0,395	0,356	0,343	0,330	0,387	0,409
0,333	0,280	0,449	0,044	-0,042	0,088	0,392	0,363	0,340	0,311	0,400	0,410
0,411	0,288	0,466	0,048	-0,039	0,121	0,365	0,491	0,347	0,296	0,308	0,367
0,447	0,323	0,465	0,043	-0,031	0,127	0,422	-0,037	0,348	0,315	0,311	0,359
0,550	0,346	0,492	0,046	-0,040	0,122	0,419	0,369	0,371	0,328	0,319	0,434
0,553	0,344	0,519	0,057	-0,043	0,154	0,420	0,368	0,339	0,316	0,311	0,444
0,492	0,300	0,452	0,041	-0,050	0,124	0,351	0,360	0,325	0,322	0,352	0,400
Ortalama		0,450	0,044	-0,044	0,112	0,388	0,379	0,342	0,313	0,334	0,401

Morusin uygulanmış Hs68 Fibroblast hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda WST-1 uygulaması ile alınmış OD değerleri tablodaki gibidir. Konsantrasyonlara bağlı ölçülmüş OD değerinin ortalamaları kontrol grubunun OD değerlerinin ortalaması ile

karşılaştırıldığında sırasıyla 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %90,22; 16 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %100; 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %75,11; 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %13,78; 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %15,78; 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %24; 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %30,44; 0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %25,78 ve 0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %10,88 azalmıştır.



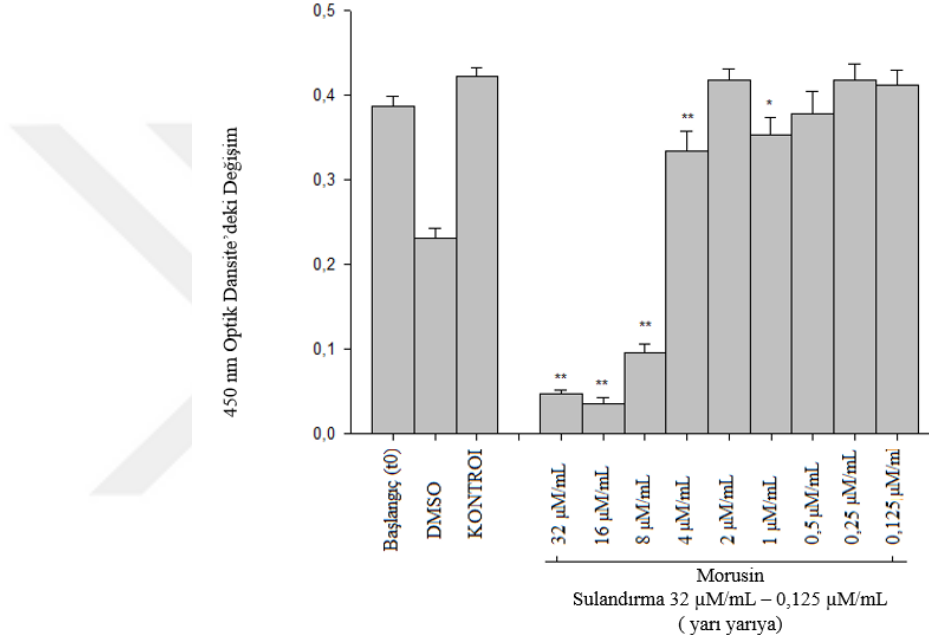
Şekil 4.3. Morusin'in 1. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliği etkisi (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

Kontrol grubuna kıyasla 32, 16, 8, 2, 1, 0,5 ve 0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksik etki görülmüştür. 4 ve 0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna kıyasla azalış vardır (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

Tablo 4.2. Morusin'in 1. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi (WST-1 uygulaması sonucu ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri)

T0	DMSO	KONTROL	32 $\mu\text{M}/\text{mL}$	16 $\mu\text{M}/\text{mL}$	8 $\mu\text{M}/\text{mL}$	4 $\mu\text{M}/\text{mL}$	2 $\mu\text{M}/\text{mL}$	1 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$
0,415	0,197	0,418	0,055	0,041	0,064	0,309	0,422	0,353	0,211	0,423	0,359
0,411	0,233	0,400	0,062	0,032	0,095	0,328	0,436	0,282	0,421	0,399	0,383
0,367	0,186	0,417	0,032	0,022	0,070	0,259	0,391	0,296	0,409	0,537	0,434
0,408	0,291	0,469	0,048	0,034	0,101	0,355	0,485	0,461	0,396	0,426	0,522
0,322	0,263	0,436	0,038	0,050	0,108	0,470	0,404	0,392	0,458	0,420	0,364
0,355	0,228	0,417	0,022	0,001	0,073	0,301	0,416	0,354	0,407	0,393	0,416
0,396	0,223	0,445	0,053	0,049	0,165	0,288	0,436	0,329	0,374	0,374	0,410
0,423	0,226	0,374	0,066	0,058	0,085	0,365	0,354	0,364	0,354	0,374	0,407
Ortalama		0,422	0,047	0,036	0,095	0,334	0,418	0,354	0,379	0,418	0,412

Morusin uygulanmış Hs68 Fibroblast hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda WST-1 uygulaması ile alınmış OD değerleri tablodaki gibidir. Konsantrasyonlara bağlı ölçülmüş OD değerinin ortalamaları kontrol grubunun OD değerlerinin ortalaması ile karşılaştırıldığında sırasıyla 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %88,86; 16 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %91,50; 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %77,46; 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %20,76; 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %0,95; 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %16,24; 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %10,25; 0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %0,89 ve 0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %2,40 azalmıştır



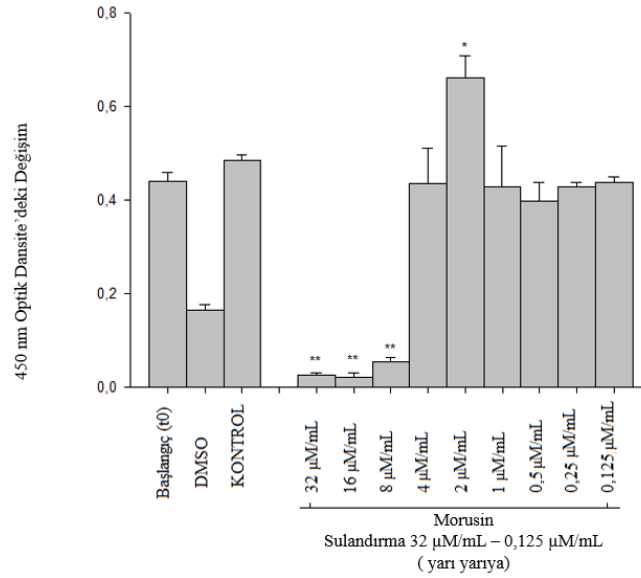
Şekil 4.4. Morusin'in 1. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

Kontrol grubuna kıyasla 32, 16, 8, 4 ve 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksik etki görülmüştür. 2, 0,5, 0,25 ve 0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna kıyasla azalış vardır (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

Tablo 4.3. Morusin 1. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi (WST-1 uygulaması sonucu ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri)

T0	DMSO	KONTROL	32 µM/mL	16 µM/mL	8 µM/mL	4 µM/mL	2 µM/mL	1 µM/mL	0,5 µM/mL	0,25 µM/mL	0,125 µM/mL
0,532	0,122	0,430	0,007	0,018	0,028	0,345	0,927	0,338	0,445	0,431	0,403
0,469	0,169	0,463	0,031	0,020	0,043	0,279	0,630	-0,043	0,403	0,437	0,413
0,369	0,105	0,494	0,009	-0,027	0,029	0,933	0,593	0,644	0,448	0,421	0,430
0,447	0,202	0,526	0,035	0,042	0,068	0,464	0,617	0,394	0,602	0,430	0,490
0,436	0,206	0,493	0,039	0,039	0,068	0,358	0,691	0,485	0,423	0,470	0,468
0,387	0,175	0,522	0,009	0,007	0,047	0,357	0,703	0,384	0,256	0,374	0,419
0,427	0,173	0,474	0,035	0,022	0,059	0,355	0,464	0,780	0,262	0,452	0,481
0,461	0,172	0,480	0,045	0,051	0,100	0,405	0,667	0,455	0,345	0,419	0,403
Ortalama		0,485	0,026	0,022	0,055	0,437	0,662	0,430	0,398	0,429	0,438

Morusin uygulanmış Hs68 Fibroblast hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda WST-1 uygulaması ile alınmış OD değerleri tablodaki gibidir. Konsantrasyonlara bağlı ölçülmüş OD değerinin ortalamaları kontrol grubunun OD değerlerinin ortalaması ile karşılaştırıldığında sırasıyla 32 µM/mL’de %94,60; 16 µM/mL’de %95,57; 8 µM/mL’de %88,62; 4 µM/mL’de %9,94; 1 µM/mL’de %11,46; 0,5 µM/mL’de %17,98; 0,25 µM/mL’de %11,54 ve 0,125 µM/mL’de %9,44 azalmıştır. 2 µM/mL’de ise %36,32 artmıştır.



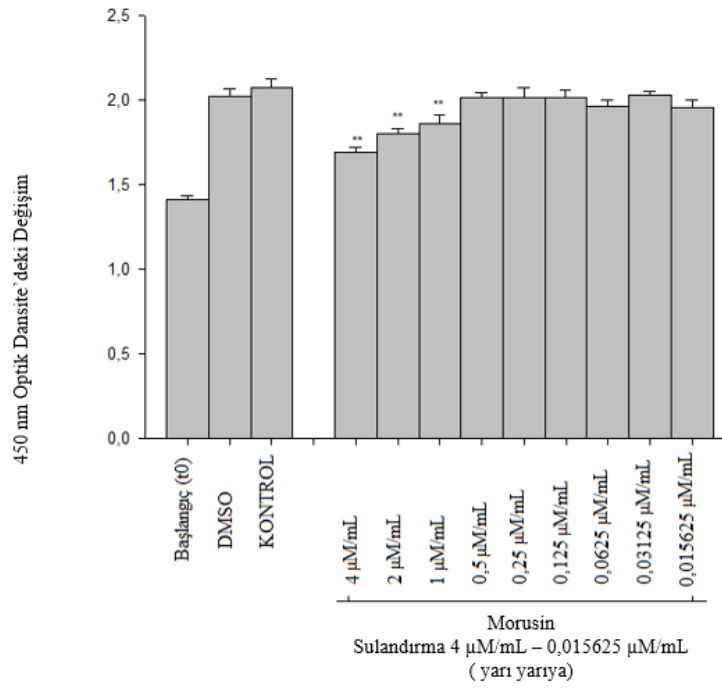
Şekil 4.5. Morusin 1. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, p<0.01; *, p<0.05).

Kontrol grubuna kıyasla 32, 16 ve 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksik etki görülmüştür (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$). 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonda anlamlı bir proliferatif etki görülmüştür. 4, 2, 0.5, 0.25 ve 0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna kıyasla azalış vardır.

Tablo 4.4. Morusin 2. Ve 3. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi (WST-1 uygulaması sonucu ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri)

T0	DMSO	Kontrol	4 $\mu\text{M}/\text{mL}$	2 $\mu\text{M}/\text{mL}$	1 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,0625 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,03125 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,015625 $\mu\text{M}/\text{mL}$
1,378	1,624	2,318	1,704	1,749	1,418	1,974	1,692	1,666	1,861	1,881	2,099
1,326	2,079	2,154	1,859	2,009	1,885	1,979	1,928	1,891	2,173	1,969	1,813
1,265	2,198	2,176	1,773	1,756	1,865	2,081	2,004	1,972	2,150	2,038	1,604
1,299	2,088	2,092	1,825	1,885	1,939	2,074	1,860	2,105	2,024	2,036	1,982
1,394	2,270	2,269	1,494	1,938	1,977	1,877	2,002	2,039	1,974	2,145	2,018
1,343	2,002	2,134	1,691	1,772	1,757	1,812	1,917	2,148	1,798	2,136	2,055
1,423	1,911	1,751	1,593	1,627	2,121	2,149	2,473	2,152	1,912	2,053	2,120
1,399	2,012	1,689	1,626	1,677	1,956	2,161	2,242	2,164	1,821	1,977	1,986
1,593	1,624	2,318	1,704	1,749	1,418	1,974	1,692	1,666	1,861	1,881	2,099
1,473	2,079	2,154	1,859	2,009	1,885	1,979	1,928	1,891	2,173	1,969	1,813
1,345	2,198	2,176	1,773	1,756	1,865	2,081	2,004	1,972	2,150	2,038	1,604
1,397	2,088	2,092	1,825	1,885	1,939	2,074	1,860	2,105	2,024	2,036	1,982
1,443	2,270	2,269	1,494	1,938	1,977	1,877	2,002	2,039	1,974	2,145	2,018
1,448	2,002	2,134	1,691	1,772	1,757	1,812	1,917	2,148	1,798	2,136	2,055
1,478	1,911	1,751	1,593	1,627	2,121	2,149	2,473	2,152	1,912	2,053	2,120
1,614	2,012	1,689	1,626	1,677	1,956	2,161	2,242	2,164	1,821	1,977	1,986
Ortalama		2,073	1,696	1,802	1,865	2,013	2,015	2,017	1,964	2,029	1,960

Morusin uygulanmış Hs68 Fibroblast hücrelerinin 2. ve 3. Setlerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda WST-1 uygulaması ile alınmış OD değerleri tablodaki gibidir. Konsantrasyonlara bağlı ölçülmüş OD değerinin ortalamaları kontrol grubunun OD değerlerinin ortalaması ile karşılaştırıldığında sırasıyla 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %18,20; 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de ise %13,08; 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %10,05; 0.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %2,88; 0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %2,81 ve 0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %2,69; 0,0625 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %5,25; 0,03125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %2,09 ve 0,015625 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %5,47 azalmıştır.



Şekil 4.6. Morusinin 2. ve 3. setlerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

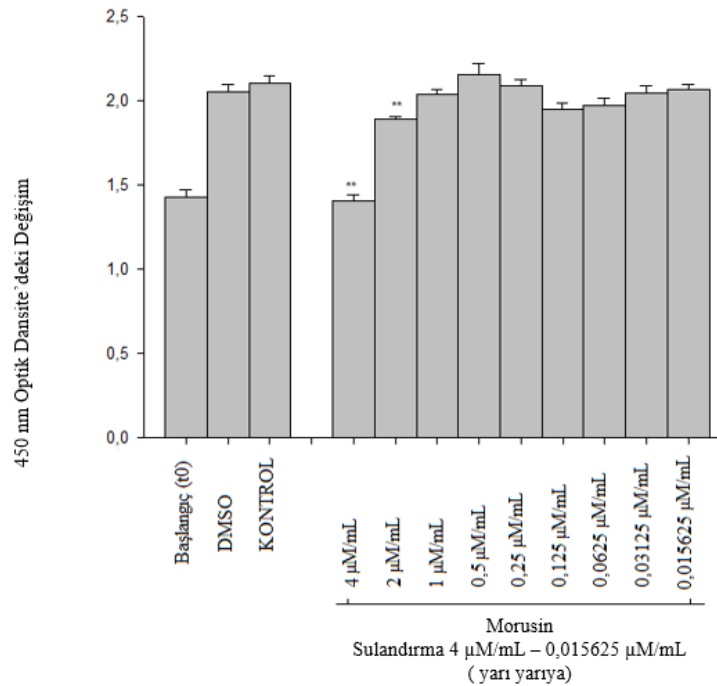
Kontrol grubuna kıyasla 4, 2 ve 1 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksik etki görülmüştür (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$). 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 ve 0,015625 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna kıyasla azalış vardır.

Tablo 4.5. Morusinin 2. Ve 3. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi (WST-1 uygulaması sonucu ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri)

T0	DMSO	Kontrol	4 $\mu\text{M/mL}$	2 $\mu\text{M/mL}$	1 $\mu\text{M/mL}$	0,5 $\mu\text{M/mL}$	0,25 $\mu\text{M/mL}$	0,125 $\mu\text{M/mL}$	0,0625 $\mu\text{M/mL}$	0,03125 $\mu\text{M/mL}$	0,015625 $\mu\text{M/mL}$
1,480	2,069	1,987	1,364	1,650	1,841	1,980	1,834	1,894	1,920	1,976	2,169
1,236	2,251	2,288	1,629	2,034	2,195	2,337	2,102	2,031	2,150	2,104	1,980
1,196	2,201	2,353	1,325	1,907	2,136	2,176	2,180	2,064	2,135	2,144	2,385
1,222	2,273	2,300	1,603	1,889	2,214	2,135	2,270	2,087	2,184	2,221	2,103
1,285	2,193	2,273	1,598	1,907	2,131	2,543	2,111	1,951	2,086	2,231	2,195
1,319	2,254	2,264	1,492	1,843	2,045	2,649	2,324	1,895	2,038	2,516	2,039
1,366	2,249	2,300	1,510	1,926	2,178	2,493	2,335	2,208	2,190	2,109	2,048

1,233	2,113	2,173	1,462	1,844	2,111	2,558	2,227	2,201	2,255	2,152	2,224
1,600	2,007	2,033	1,222	1,875	1,898	1,991	2,023	1,820	2,026	1,849	2,012
1,530	1,854	1,958	1,254	1,930	1,996	1,908	2,094	1,769	1,778	1,802	1,941
1,449	2,108	1,956	1,271	1,854	1,876	1,925	2,075	1,808	1,749	1,910	2,012
1,643	1,880	2,138	1,355	1,883	1,905	1,914	1,996	1,772	1,729	1,804	1,857
1,661	1,797	1,885	1,279	1,844	1,992	2,052	2,067	1,929	1,777	1,895	2,045
1,620	1,709	1,901	1,368	1,880	2,038	1,965	1,769	1,938	1,809	1,918	2,015
1,535	1,943	1,949	1,398	1,983	1,979	1,983	2,098	1,955	1,887	2,050	2,083
1,536	1,912	1,925	1,421	1,952	2,053	1,926	1,904	1,929	1,804	2,006	2,002
Ortalama		2,105	1,409	1,888	2,037	2,158	2,088	1,953	1,970	2,043	2,069

Morusin uygulanmış Hs68 Fibroblast hücrelerinin 2. ve 3. Setlerin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda WST-1 uygulaması ile alınmış OD değerleri tablodaki gibidir. Konsantrasyonlara bağlı ölçülmüş OD değerinin ortalamaları kontrol grubunun OD değerlerinin ortalaması ile karşılaştırıldığında sırasıyla 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %33,05; 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %10,34; 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %3,25; 0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %0,81 ve 0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %7,22; 0,0625 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %6,43; 0,03125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %2,96 ve 0,015625 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %1,70 azalmıştır. 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de ise %2,52 artmıştır.



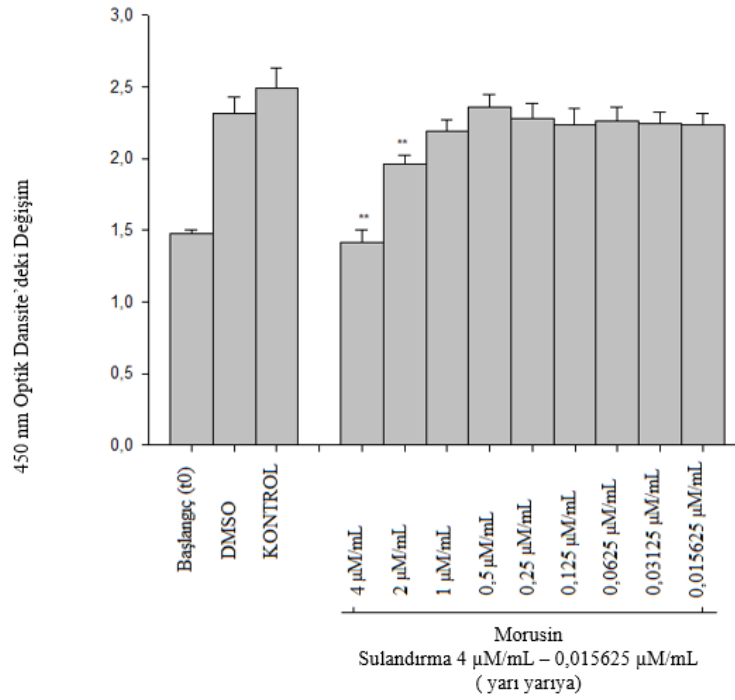
Şekil 4.7. Morusin'in 2. ve 3. setlerin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

Kontrol grubuna kıyasla 4 ve 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksik etki görülmüştür (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$). 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 ve 0,015625 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna kıyasla azalış vardır.

Tablo 4.6. Morusin 2. Ve 3. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığı üzerine etkisi (WST-1 uygulaması sonucu ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri)

T0	DMSO	Kontrol	4 $\mu\text{M}/\text{mL}$	2 $\mu\text{M}/\text{mL}$	1 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,0625 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,03125 $\mu\text{M}/\text{mL}$	0,015625 $\mu\text{M}/\text{mL}$
1,298	2,739	2,787	1,540	2,051	2,476	2,728	2,659	2,734	2,659	2,518	2,772
1,418	2,695	3,093	1,843	2,341	2,303	2,873	2,765	2,648	2,700	2,343	1,948
1,381	2,854	3,456	1,811	2,308	2,262	2,732	2,852	2,839	2,533	2,628	2,542
1,385	2,742	2,821	1,622	2,202	2,336	2,472	2,752	2,801	2,425	2,262	2,669
1,398	2,846	3,010	1,787	2,234	2,881	2,665	2,435	2,903	2,563	2,604	2,355
1,402	2,654	3,078	1,796	2,159	2,496	2,550	2,400	2,281	2,803	2,588	2,303
1,426	2,529	2,948	1,751	2,103	2,490	2,626	2,655	2,297	2,694	2,441	2,754
1,311	2,709	2,825	1,722	2,076	2,348	2,863	2,867	2,657	2,662	2,808	2,500
1,600	1,913	1,786	1,016	1,621	1,872	1,840	1,924	1,855	1,847	1,879	1,976
1,530	1,733	1,974	1,033	1,861	1,955	1,922	1,916	1,813	1,898	2,024	2,023
1,449	1,893	2,032	1,118	1,750	1,944	2,017	2,069	1,849	1,860	1,927	1,900
1,643	1,800	2,232	1,230	1,766	1,930	2,200	1,827	1,844	1,931	1,853	2,044
1,661	1,952	1,970	1,114	1,712	1,934	1,986	1,901	1,912	1,889	2,090	2,028
1,620	1,831	2,135	1,171	1,833	1,984	2,082	1,791	1,781	1,811	1,919	1,894
1,535	1,911	1,830	1,139	1,733	2,051	2,154	1,918	1,740	1,931	1,963	2,022
1,536	2,240	1,824	0,936	1,571	1,768	1,990	1,746	1,847	1,900	1,997	1,993
Ortalama		2,488	1,414	1,958	2,189	2,356	2,280	2,238	2,257	2,240	2,233

Morusin uygulanmış Hs68 Fibroblast hücrelerinin 2. ve 3. Setlerin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda WST-1 uygulaması ile alınmış OD değerleri tablodaki gibidir. Konsantrasyonlara bağlı ölçülmüş OD değerinin ortalamaları kontrol grubunun OD değerlerinin ortalaması ile karşılaştırıldığında sırasıyla 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %43,14; 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %21,30; 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %11,99; 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %5,28; 0,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %8,35; 0,125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %10,05; 0,0625 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %9,28; 0,03125 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %9,94 ve 0,015625 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %10,25 azalmıştır.



Şekil 4.8. Morusin'in 2. ve 3. setlerin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, Hs68 hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

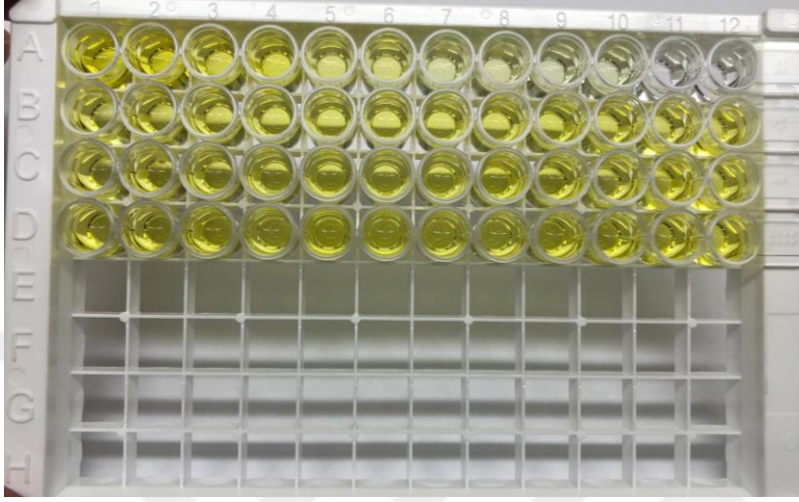
Kontrol grubuna kıyasla 4 ve 2 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksik etki görülmüştür(**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$). 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 ve 0.015625 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna kıyasla azalış vardır.

Deney sonuçlarına göre, morusin'in Hs68 hücre hattı üzerine zaman bağlı olarak 4 $\mu\text{M/mL}$ ve 2 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarında anlamlı şekilde sitotoksik etki 1 $\mu\text{M/mL}$ ve 0.5 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarında ise daha az bir sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle morusin'in 4 $\mu\text{M/mL}$, 2 $\mu\text{M/mL}$, 1 $\mu\text{M/mL}$ ve 0.5 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonları için MMP-1 ELISA kit ile çalışılmasına karar verilmiştir.

4.2. Morusin'in Hs68 Hücrelerinden Salınan MMP-1 Miktarı Üzerine Etkisi

Morusin birbirinden bağımsız üç deney seti 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, çeşitli morusin dozlarının Hs68 hücrelerinin MMP-1 salınımları üzerine etkilerine bakılmıştır. MMP-1 salınım miktarları MMP-1 ELISA kit (Şekil 4.9.) kullanılarak ELISA okuyucu ile OD değerleri alınmıştır (Tablo 4.7., Tablo 4.8. ve Tablo

4.9.) ve bu değerlere bağlı oluşturulmuş grafikler sunulmuştur (Şekil 4.10., Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.).

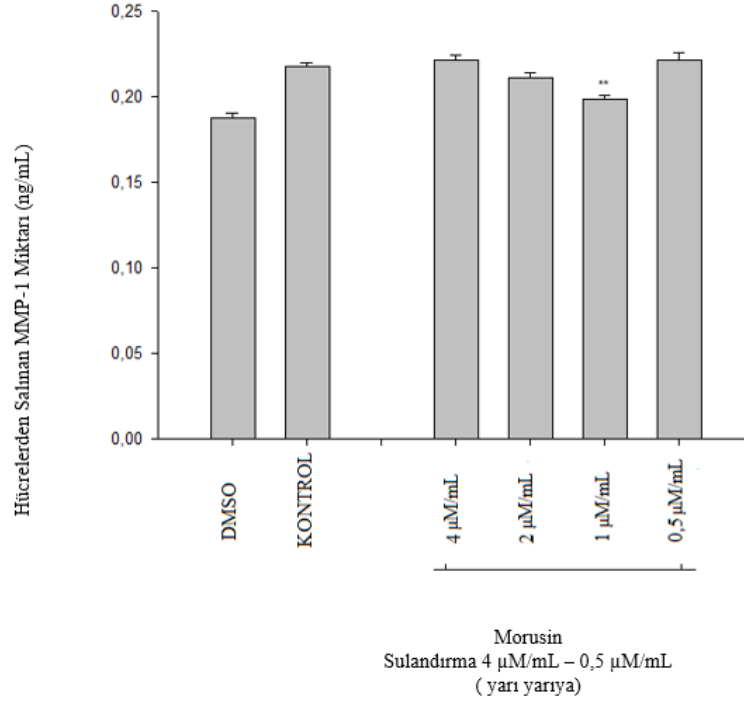


Şekil 4.9. Morusin uygulanmış Hs68 fibroblast hücrelerinin dışarıya salmış olduğu MMP-1 miktarının ölçülmesi için çalışılmış plak görseli

Tablo 4.7. Morusin 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında MMP-1 salınımı üzerine etkisi (MMP-1 ELISA Kit ile yapılan çalışma sonucu ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri)

DMSO	KONTROL	4 μ M/mL	2 μ M/mL	1 μ M/mL	0,5 μ M/mL
0,179	0,206	0,210	0,200	0,188	0,204
0,191	0,225	0,230	0,218	0,202	0,236
0,180	0,207	0,210	0,202	0,188	0,204
0,193	0,225	0,230	0,218	0,203	0,237
0,181	0,209	0,212	0,205	0,193	0,205
0,197	0,227	0,231	0,220	0,206	0,238
0,181	0,210	0,212	0,205	0,194	0,206
0,197	0,228	0,231	0,220	0,207	0,239
0,180	0,210	0,213	0,205	0,194	0,205
0,198	0,227	0,231	0,220	0,207	0,238
0,181	0,210	0,213	0,205	0,194	0,205
0,198	0,227	0,231	0,220	0,208	0,239
Ortalama	0,218	0,221	0,212	0,199	0,221

Morusin uygulanmış Hs68 Fibroblast hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda MMP-1 salınımının ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri tablodaki gibidir. Konsantrasyonlara bağlı ölçülmüş OD değerinin ortalamaları kontrol grubunun OD değerlerinin ortalaması ile karşılaştırıldığında sırasıyla 4 μ M/mL’de %1,64; 0,5 μ M/mL’de %1,72 artarken ; 2 μ M/mL’de %2,80; 1 μ M/mL’de ise %8.70 azalmıştır.



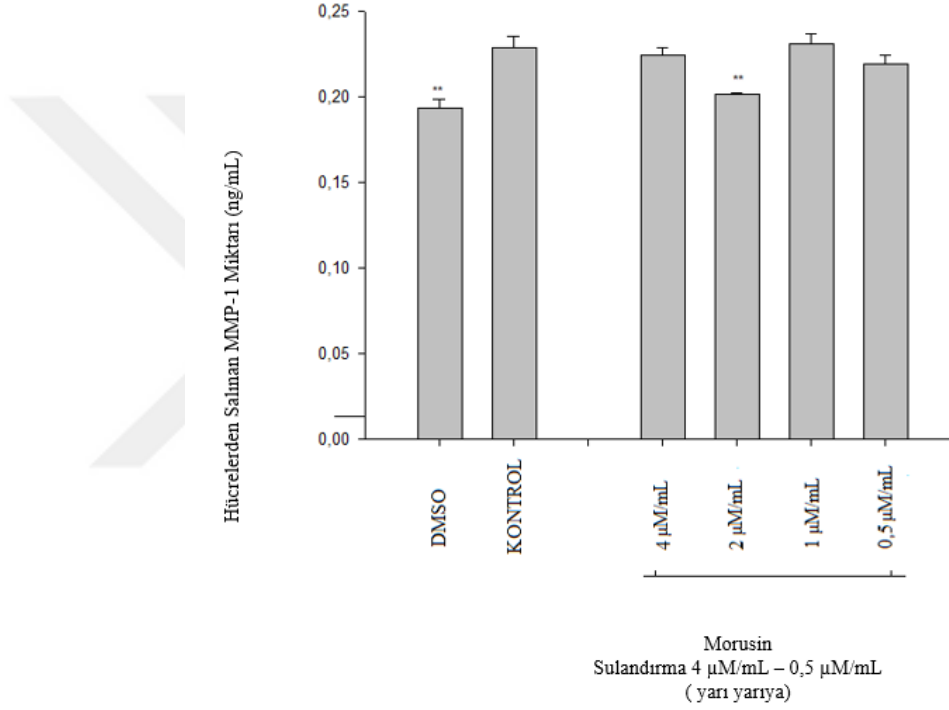
Şekil 4.10. 24 saat inkübasyon sonunda 4 µM/mL, 2 µM/mL 1 µM/mL ve 0,5 µM/mL morusinin Hs68 hücrelerinden salınan MMP-1 miktarı üzerine etkisi (**, p<0.01; *, p<0.05).

Kontrol grubuna kıyasla 2 µM/mL konsantrasyonda MMP-1 miktarı azalmıştır. 1 µM/mL konsantrasyonda MMP-1 miktarında ise anlamlı bir şekilde azalış görülmüştür (**, p<0.01; *, p<0.05). 4 ve 0,5 µM/mL konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna kıyasla artış vardır.

Tablo 4.8. Morusinin 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında MMP-1 salınımı üzerine etkisi (MMP-1 ELISA Kit ile yapılan çalışılma sonucu ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri)

DMSO	KONTROL	4 µM/mL	2 µM/mL	1 µM/mL	0,5 µM/mL
0,174	0,206	0,207	0,202	0,211	0,200
0,208	0,256	0,238	0,198	0,242	0,236
0,174	0,205	0,207	0,199	0,210	0,199
0,208	0,248	0,239	0,199	0,243	0,237
0,178	0,206	0,209	0,199	0,214	0,201
0,212	0,250	0,240	0,205	0,251	0,237
0,178	0,206	0,210	0,200	0,215	0,202
0,212	0,251	0,240	0,205	0,252	0,238
0,178	0,207	0,210	0,199	0,214	0,201
0,213	0,250	0,240	0,205	0,253	0,238
0,178	0,206	0,210	0,199	0,215	0,202
0,213	0,251	0,240	0,206	0,254	0,238
Ortalama	0,229	0,224	0,201	0,231	0,219

Morusin uygulanmış Hs68 Fibroblast hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda MMP-1 salınımının ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri tablodaki gibidir. Konsantrasyonlara bağlı ölçülmüş OD değerinin ortalamaları kontrol grubunun OD değerlerinin ortalaması ile karşılaştırıldığında sırasıyla 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %1,90; 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %11,90; 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de %4,12 azalırken 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 'de ise %1.67 artmıştır.



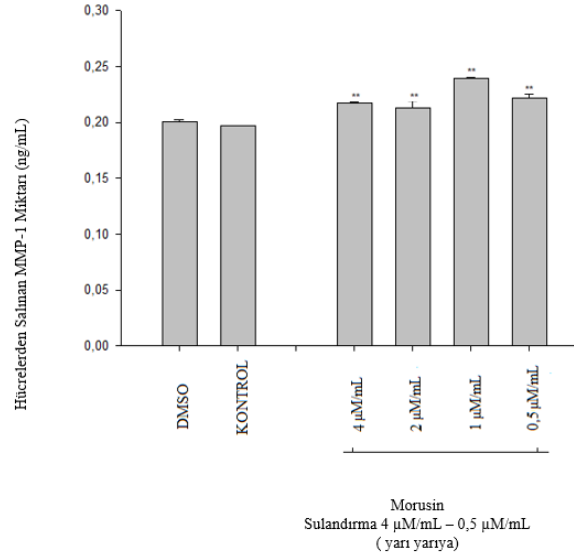
Şekil 4.11. 48 saat inkübasyon sonunda 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ ve 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ morusinin Hs68 hücrelerinden salınan MMP-1 miktarı üzerine etkisi (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$).

Kontrol grubuna kıyasla 4 ve 0.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonda MMP-1 miktarı azalmıştır. 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda MMP-1 miktarı anlamlı bir şekilde azalış görülmüştür (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$). 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna kıyasla artış vardır.

Tablo 4.9. Morusinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında MMP-1 salınımı üzerine etkisi (MMP-1 ELISA Kit ile yapılan çalışılma sonucu ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri)

DMSO	KONTROL	4 $\mu\text{M/mL}$	2 $\mu\text{M/mL}$	1 $\mu\text{M/mL}$	0,5 $\mu\text{M/mL}$
0,194	0,196	0,214	0,193	0,235	0,207
0,201	0,194	0,211	0,231	0,238	0,227
0,195	0,195	0,214	0,193	0,235	0,208
0,202	0,194	0,213	0,232	0,240	0,228
0,196	0,197	0,219	0,194	0,239	0,213
0,207	0,198	0,219	0,233	0,241	0,233
0,196	0,197	0,220	0,193	0,240	0,213
0,208	0,198	0,219	0,233	0,241	0,234
0,196	0,197	0,220	0,193	0,241	0,214
0,208	0,198	0,220	0,233	0,241	0,235
0,196	0,197	0,221	0,193	0,241	0,214
0,208	0,198	0,220	0,233	0,241	0,235
Ortalama	0,197	0,218	0,213	0,239	0,222

Morusin uygulanmış Hs68 Fibroblast hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MMP-1 salınımının ELISA okuyucu ile alınmış OD değerleri tablodaki gibidir. Konsantrasyonlara bağlı ölçülmüş OD değerinin ortalamaları kontrol grubunun OD değerlerinin ortalaması ile karşılaştırıldığında sırasıyla 4 $\mu\text{M/mL}$ 'de %10,64; 2 $\mu\text{M/mL}$ 'de %8,26; 1 $\mu\text{M/mL}$ 'de %21,78 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ 'de ise %12,80 artmıştır.



Şekil 4.12. 72 saat inkübasyon sonunda 4 $\mu\text{M/mL}$, 2 $\mu\text{M/mL}$, 1 $\mu\text{M/mL}$ ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ morusinin Hs68 hücrelerinden salınan MMP-1 miktarı üzerine etkisi (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

Kontrol grubuna kıyasla 4, 2, 1 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda MMP-1 miktarı anlamlı bir şekilde artış görülmüştür (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$).



5. TARTIŞMA

Yaşlı bireylerin sayısı önümüzdeki otuz yılda çarpıcı biçimde artacaktır. Dünya çapında en hızlı büyüyen yaş-katmanı olarak, 60 yaşın üzerindeki küresel nüfus, 2050'ye kadar iki milyarı aşacaktır. 20. yüzyıldan itibaren azalan ölümler ve ortalama insan ömrünün uzaması, dünya çapındaki demografik yapıyı yaşlı nüfus lehine değiştirmektedir (Khan ve ark., 2017).

Yaşlanma, tüm çok hücreli organizmaları etkileyen kaçınılmaz, evrensel, biyolojik bir fenomendir. Yaşlanmanın hücresel ve moleküler mekanizmalarını açıklamak için farklı hipotezler öne sürülmüş olsa da son çalışmalar yaşlanmanın moleküler hasarın birikmesinden kaynaklandığını giderek daha açık bir şekilde ortaya koymuştur. Bu hasara neden olan reaksiyonlar arasında, şekerler ve reaktif aldehitler gibi metabolitlerin reaksiyonları ve biyokimyasal süreçlerdeki spontan hatalar dışında, serbest radikallerin ve diğer reaktif oksijen türlerinin reaksiyonları ana nedendir (Sadowska-Bartosz ve Bartosz 2014)

Moleküllerin oksidasyonu ve indirgenmesi dahil olmak üzere kimyasal reaksiyonlar her hücrede meydana gelir. Bu reaksiyonlar serbest radikallerin üretimine yol açabilir. Serbest radikaller, lipidler, proteinler ve DNA gibi organik substratlarla reaksiyona girer. Oksidasyon yoluyla serbest radikaller bu moleküllere zarar vererek normal işlevlerini bozarlar ve bu nedenle çeşitli işlev kayıplarına sebep olabilirler. Enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan anti-oksidasyon sistemi, oksidatif strese karşı koruma sağlar (Somogyi ve ark., 2007).

Polifenoller, doğal antioksidanlar grubuna aittir. Antioksidan özellikleri, yapılarında serbest hidroksil gruplarının varlığından kaynaklanmaktadır. Bu şekilde organizmayı serbest radikallerin zararlı etkilerinden korurlar. Polifenollerin aktivitesi, reaktif oksijen türlerinin nötralizasyonuna, hücrelerde hidroksil radikalının oluşumunu engelleyen geçiş metallerinin şelatlanmasına, küçük moleküllü antioksidanların oksidasyondan korunmasına ve lipoprotein oksidasyonunun inhibisyonuna dayanır (Zoofishan, 2018).

Morus alba'nın birçok farklı etkisi vardır. Örneğin, yüzyıllardır temel gıda olarak tüketilen beyaz dut yaprakları hipertansiyon, diyabet, artrit ve akşamdan kalmalık tedavisinde kullanılırken (Katsube ve ark., 2006), meyveleri idrar söktürücü olarak, kök kabukları ise öksürük, iltihap, şeker hastalığı, kanser, hepatit ve kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Gao ve ark., 2017; Bae ve Suh, 2007).

Yapılan çalışmalarda *Morus alba*'dan başta terpenoidler (Chan ve ark, 2016), alkaloidler (Asano ve ark., 2001; Kusano ve ark., 2002), flavonoidler (Numora,1978; Du ve ark., 2003), fenolik asitler (Hunyadi ve ark., 2012), amino asitler, glikozitler (Doi ve ark., 2001) ve kumarinler (Piao ve ark., 2009) olmak üzere bir dizi bileşiğin izole edilebildiğini göstermiştir. Morusin ise *Morus alba*'dan elde edilmiş yeni bir flavonoidtir (Kim ve ark., 2011).

Kanserler, modern uygarlığın en ciddi hastalıklarından biridir. Şu anda kanser hücre döngüsü düzensizliği dışında kanserleri tedavi etmek için kullanılan kemoterapi, normal hücreleri de etkiler ve hastaların genel sağlık durumunu olumsuz yönde etkileyen bir dizi yan etkiye neden olur. Bu nedenle, yalnızca kanser hücrelerini seçici olarak ortadan kaldıracak yeni, daha verimli ve daha güvenli terapötik yöntemlere büyük ilgi vardır. Tıbbi kullanım için yüksek potansiyelleri nedeniyle izoprenil grubuna sahip polifenoller de dahil olmak üzere doğal bileşikler, günümüzde yeni moleküler hedefli ilaçların, diyet takviyelerinin veya antimikrobiyal ajanların geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Stompor ve Żarowska, 2016)

Yapılan araştırmalar morusinin yüksek antioksidan potansiyeli nedeniyle akciğer, kolon, prostat, meme, karaciğer ve rahim ağzı kanseri gibi birçok kanser türüne karşı *in vitro* antikanser aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar belirli miktarlarda kullanılan morusinin kanser hücrelerin ölümünü indüklediğini, proliferasyonunu ve büyümesini azalttığını ayrıca hücre göçünü önemli ölçüde inhibe ettiği ortaya koymuştur (Panek-Krzysko ve Stompor-Gorący, 2021).

Ayrıca yapılan başka önemli bir çalışmada ise günümüzde en fazla ölüme sebep olan enfeksiyon hastalıklarının etkenleri olan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*,

Enterococcus faecalis, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* ve *Plasmodium falciparum* üzerinde düşük dozlarda kullanılan morusinun antimikrobiyal, antifungal ve antiprotozoal etkinlik gösterdiği ortaya konulmuştur (Panek-Krzysko ve Stompor-Gorący, 2021).

Sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda kullanılan morusin, TPA ile indüklenen ROS üretimini doza bağlı olarak azalttığı bulunmuştur (Yin ve ark., 2018). Ayrıca JB6 P+ hücre modeli (fare deri hücresi / epidermal hücreler) üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise morusin, hücre proliferasyonu ve malign transformasyona aracılık edebilen TPA ile indüklenen aktivatör protein-1 (AP-1) ve nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) aktivasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur.

Morusin AP-1 ve NF- κ B tarafından düzenlenebilen siklooksijenaz-2'nin (COX-2) TPA yukarı regülasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca, morusin GSH (glutasyon) seviyesi ile ilişkili olan N-cadherin ve vimentinin TPA ile indüklenen motilitesini ve ekspresyonunu azaltmıştır (Panek-Krzyśko ve Stompor-Gorący, 2021).

Çok sayıda çalışma MMP'lerin başta oksidatif stres dahil olmak üzere birçok faktörün bir kombinasyonu tarafından modüle edildiğini göstermektedir. Yaşlanma artan MMP ekspresyonu bağlı artan kolajen yıkımı ve azalan kolajen sentezi ile ilişkilidir (Vo ve ark., 2013; Rittié ve Fisher, 2002). MMP-1 ise cilt fibroblastlarının yaşlanmasında önemli rol oynar. Örneğin, artan bir MMP ekspresyonu, yaşlanmanın hızlanmasına ve cilt elastikiyeti ile ilgili genlerin bozulmasına neden olabilir (Kim ve ark., 2016).

Chen ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada *Rhizoma drynariae* bitkisinden elde edilen toplam flavonoidlerin klinik olarak osteoartrit (OA) üzerinde faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar, TFRD'nin (*Rhizoma drynariae*'nin toplam flavonoidleri) OA model sıçanlarda diz kıkırdağındaki patolojik değişiklikleri hafifletebileceğini göstermiştir. *In vivo*, qPCR analizi, matriks metalloproteinazlar MMP-1, MMP-3 ve MMP-13'ün mRNA seviyelerinin azaldığını, MMP-4'ün doku inhibitörünün kıkırdakta arttığını ve bu değişikliklerin TFRD tarafından kısmen önlenilebileceğini göstermiştir (Chen ve Thibeault, 2010).

Calniquer ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada karotenoidler ve polifenollerin kombinasyonunun cilt hücrelerinde UV kaynaklı hasardan daha fazla koruyucu etki üretilip üretilmediğini test ettiler ve çalışma sonucu olarak MMP-1 salınımı seviyesinde bir azalış olduğunu ortaya koymuşlardır (Calniquer ve ark., 2021). Soğan suyunun (kersetin ve kaempferol) ve kersetinin doğrudan kullanımının MMP-1'in ekspresyonunu hem *in vitro* ve *in vivo* olarak belirgin şekilde arttırdığı gösterilmiştir (Cho ve ark., 2010).

Yapmış olduğumuz literatür taraması sonucunda morusinun insan fibroblast hücrelerinden salınan matriks metaloproteinaz-1 üzerine nasıl bir etki gösterdiğine yönelik herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Dolayısıyla bizim temel hipotezimiz bir flavonoid olan morusinun diğer birçok flavonoid gibi insan fibroblast hücre hattında (Hs68) matriks metaloproteinaz-1 (MMP-1) salınımı üzerinde azaltıcı bir etki göstereceği yönünde olmuştur. Böylece morusin bağ dokunun korunumunu sağlayacak, matriks metaloproteinaz-1'in (MMP-1) azalmasıyla, bağ dokusu sentezleyen hücrelerin yıkımının azalması sonucu *in vitro* koşullarda yaşlanma karşıtı bir etki göstereceği varsayılmıştır.

Ancak yapmış olduğumuz çalışmalarda morusinun 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 16 $\mu\text{M}/\text{mL}$ ve 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda yüksek sitotoksik bir etki göstererek Hs68 insan fibroblast hücrelerinin tamamı ve tamamına yakını öldürdüğü ($p < 0.01$), 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ ve 0.015625 $\mu\text{M}/\text{mL}$ arasında çalışılan dozlarda ise proliferatif bir etki göstermekten ziyade ağırlıklı olarak sitotoksik bir etki göstererek hücre proliferasyonunda azalmaya sebep olduğunu göstermiştir.

Sağlıklı hücrelerin tamamı ve tamamına yakını öldüren bu dozlardan daha azı kullanılarak Panek-Krzysko ve Stompor-Goracy'nin 2021 yılında yapmış olduğu çalışmada akciğer, kolon, prostat, meme, karaciğer ve rahim ağzı kanseri gibi birçok kanser için *in vitro* anti kanser aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmanın sonuçlarından hareketle sitotoksik az gözlendiği dozların seçilmesi uygun bulunmuştur. Aynı zamanda, morusinun 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ ve 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ konsantrasyonlarının MMP-1 üzerine etkisini ölçen elisa kiti ile aldığımız ilk veriler bu dozların uygun olacağını göstermiştir.

Çalışmanın devamında çeşitli dozlarla etkileşime giren Hs68 hücrelerinin MMP-1 salınımlarına bakıldığında; 24 saatte sonrasında 4 $\mu\text{M/mL}$ 'de %1,64 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ 'de %1,72 artarken, 2 $\mu\text{M/mL}$ 'de %2,80 ve 1 $\mu\text{M/mL}$ 'de ise %8,70 azalmıştır. 48 saat çalışma sonrasında MMP-1 salınımlarına bakıldığında 1 $\mu\text{M/mL}$ 'de %1,67 artarken, 4 $\mu\text{M/mL}$ 'de %1,90; 2 $\mu\text{M/mL}$ 'de %11,90 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ 'de %4,12 azalmıştır. 72 saat sonrasında ise MMP-1 salınımları 4 $\mu\text{M/mL}$ 'de %10,64; 2 $\mu\text{M/mL}$ 'de %8,26; 1 $\mu\text{M/mL}$ 'de %21,78 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ 'de ise %12,80 artmıştır.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında; 24 saat sonrasında morusin 4 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda MMP-1 miktarını arttırarak hücrel yaşlanmayı teşvik ettiği, 2 ve 1 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlar ise MMP-1 miktarını azaltarak yaşlanma karşıtı etki göstermiştir. 48 saat sonra 1 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonda MMP-1 miktarını arttırarak hücrel yaşlanmayı teşvik ettiği 4, 2 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda MMP-1 miktarlarını azaltarak yaşlanma karşıtı etki göstermiştir. 72 saat sonra ise 4, 2, 1 ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonda yani tamamında MMP-1 miktarını arttırarak hücreleri yaşlanmaya sürüklemiştir.

24 ve 48 saatlik deney sonuçlarına bakıldığında morusinin zamana bağlı olarak etkilediği MMP-1 salınımları her bir konsantrasyon için birbirinden farklı sonuçlar göstermiştir. Fakat 72 saat gibi bir süre sonra morusin kullanımının her bir konsantrasyonu Hs68 fibroblast hücrelerinin MMP-1 salınımlarını arttırmıştır.

Morusinin konsantrasyonlarının uygulanmasında 24 saat sonra 1 $\mu\text{M/mL}$ morusin uygulaması ve 48 saat sonra 2 $\mu\text{M/mL}$ morusin uygulaması MMP-1 miktarı anlamlı bir şekilde azalmıştır. 72 saat sonra ise tüm dozlar için MMP-1 salınımının anlamlı bir şekilde artması bize zamana bağlı uygulamanın morusinin MMP-1 salınımı üzerine etkisinin değişkenlik gösterebileceğini göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada sigara içmemin serbest radikaller üretimini arttırdığı ve tütünün serbest radikal hasarı ile akciğer kanserini indüklediğini öne sürülmüş ve beta-karotenin sigara içenlerde kanser riskini azaltıp azaltmadığı araştırılmıştır. Araştırmacılar, beta-karoten alan grubun, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha fazla kanser geliştirdiği için randomize olarak yapmış oldukları çalışmayı sonuçlanmadan

durdurmuştur. Araştırma sonucu ortaya çıkan sonuç; kanser örüntüsünü değiştirmek, orantısız bir antioksidan seviyesi yerine ideal bir oksidan, antioksidan ve biyomolekül dengesi gerektirdiği yönündedir (Lipsky ve King, 2015).

Bizim çalışmamızda da durum bundan farklı değildir. Morusinin yaşlanma karşıtı çalışmalarda kullanılabilmesi ancak doğru bir doz kullanımı ve doğru bir uygulama süresi, yani doğru bir biyomolekül dengesi sağlanması ile mümkündür. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda morusinin hücrelerde dejenerasyonu arttırması MMP-1 seviyelerindeki artışın bir göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tüm bu verilerle birlikte;

Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre canlılığı test sonuçlarına göre; Hs68 hücre hattında morusin 32 – 0,015625 $\mu\text{M/mL}$ arasındaki tüm konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığında istatistiksel anlamda önemli azalma görülmüştür.

Tez kapsamında gerçekleştirilen MMP-1 ELISA sonuçlarına göre; Hs68 hücre hattında morusin 24 saat sonrasında 2 $\mu\text{M/mL}$ 48 saat sonrasında 1 $\mu\text{M/mL}$ anlamlı bir azalış gösterdiği görülmüştür. 72 saat sonrasındaki 4 $\mu\text{M/mL}$, 2 $\mu\text{M/mL}$, 1 $\mu\text{M/mL}$ ve 0,5 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda anlamlı bir artış gösterdiği ortaya çıkmıştır ($p<0.01$). Diğer konsantrasyonlarda ise 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda istatistiksel olarak önemli bir artış veya azalış görülmemiştir.

Yukarıdaki iki sonuca bağlı olarak morusin Hs68 hücrelerinin 32 $\mu\text{M/mL}$ 16 $\mu\text{M/mL}$ ve 8 $\mu\text{M/mL}$ konsantrasyonlarda öldürdüğü, 4 $\mu\text{M/mL}$ ve 0.015625 $\mu\text{M/mL}$ arasındaki tüm konsantrasyonlar ise çoğalmalarını baskılamıştır. Hücre proliferasyonunu baskılayan tüm dozlarda ise 72 saat sonunda MMP-1 seviyesini artırarak hücreyi yaşlanmaya sürüklediğini sonucunu ortaya koymuştur.

Araştırma sonuçlarımız ve mevcut literatür bilgisi ışığında, kuvvetli bir antioksidan olan morisinin yüksek dozlarda ve/veya uzun inkübasyon sürelerinde hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, düşük doz ve kısa inkübasyon sürelerinde MMP-1 salınımını inhibe etmesi, yaşlanma karşıtı potansiyeline sahip oluşunun bir kanıtı olarak yorumlanabilir. Yaşlanma karşıtı tam olarak etkisinin ortaya konulabilmesi için düşük konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Agarwal S, Mohamed MS, Mizuki T, Maekawaa T, D, Kumar S. Chlorotoxin modified morusin-PLGA nanoparticles for targeted glioblastoma therapy. *Journal of Materials Chemistry B*. 2010; 7(39): 5896–5919.
- Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infectious disorders drug targets*. 2020; 20(1), 16–26.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(21), 10114–10118.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981. 78(11 II), 6858–6862.
- Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kizu H, Kameda Y, Kato A, Nash RJ, Lee HS, Ryu KS. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001; 49(9), 4208–4213.
- Ayuk SM, Abrahamse H, Houreld NN. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *Journal of Diabetes Research*. 2016.
- Bae SH, Suh H J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT - Food Science and Technology*. 2007; 40(6), 955–962.
- Başıbüyük, HH. Biyogerontolojide Güncel Gelişmeler: Yeni Araştırma Perspektifleri”, *Yaşlı Sorunları Araştırma Dergisi (YSAD), Elderly Issues Research Journal (EIRJ)*. 2017; 10, 51–59.
- Bateman A, Chothia C. Fibronectin type III domains in yeast detected by a hidden Markov model. *Current biology: CB. Curr Biol*. 1996; 6(12), 1544–1547.

Becker BF. Towards the physiological function of uric acid, *Free Radical Biology and Medicine*. 1993; 14(6), 615–631.

Berton A, Godeau G, Emonard H, Baba K, Bellon P, Hornebeck W, Bellon G. Analysis of the ex vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2000; 19(2), 139–148.

Birkedal-Hansen, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1993; 4(2), 197–250.

Bjorksten J. The crosslinkage theory of aging. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1968; 16(4), 408–427.

Blumenberg M, Tomić-Canić M. Human epidermal keratinocyte: keratinization processes. *EXS*. 1997 78, 1–29.

Bode W, Gomis-Rüth F X, Stöckler W. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins. *FEBS letters*. 1993;331(1–2), 134–140.

Bonnefoy M, Draï J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med*. 2002; 27;31(25):1174-84.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2011;25(3):287-99.

Calniquer G , Khanin M, Ovadia H, Linnewiel-Hermoni K, Stepensky D, Trachtenberg A, Sedlov T, Braverman O, Levy J, Sharoni Y. Combined Effects of Carotenoids and Polyphenols in Balancing the Response of Skin Cells to UV Irradiation. *Molecules*. 2021; 26(7).

- Campisi, J, D'Adda Di Fagagna, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8(9), 729–740.
- Chan EWC, Lye PY, Wong SK. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Chinese journal of natural medicines*. 2016; 14(1), 17–30.
- Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology*. 2001; 11(11).
- Chen X, Thibeault SL. Role of tumor necrosis factor- α in wound repair in human vocal fold fibroblasts. *The Laryngoscope*. 2010; 120(9), 1819–1825.
- Cho JW, Cho SY, Lee SR, Lee KS. Onion extract and quercetin induce matrix metalloproteinase-1 *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Molecular Medicine*. 2010;25(3), 347–352.
- Chung L, Dinakarbandian D, Yoshida N, Lauer-Fields JL, Fields GB, Visse R, Nagase H. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *The EMBO Journal*. 2004; 23(15), 3020–3030.
- Craven NM, Watson RE, Jones CJ, Shuttleworth CA, Kielty CM, Griffiths CE. Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *British Journal of Dermatology*. 1997; 137(3), 344–350.
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*. 1999;18(18), 2883–2891.
- Cristofalo VJ, Pignolo RJ. Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiological reviews*. 1993, 73(3), 617–638.
- Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2017; 147, 1–73.

da Costa JP, Vitorino R, Silva GM, Vogel C, Duarte AC, Rocha-Santos T. A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing research reviews*. 2016; 29, 90-112.

Doi, K, Kojima T, Makino M, Kimura Y, Fujimoto Y. Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2001; 49(2), 151–153.

Du J , HeZD, Jiang RW, Ye WC, Xu HX, But PPH. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry*. 2003; 62(8), 1235–1238.

Effros RB. Roy Walford and the immunologic theory of aging. *Immunity & ageing : I & A*. 2005; 2(1).

English WR, Holtz B, Vogt G, Knäuper V, Murphy G. Characterization of the role of the "MT-loop": an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP-2) activating membrane-type matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(45), 42018–42026.

Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE. Matrix Metalloproteinases II Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression. In: by Parks WC, Mecham MP. *Matrix Metalloproteinases*. 1998.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt24), 4195–4200.

Gao L, Li YG, Zhu BK, Li ZY, Huang LB, Li XY, Wang F, Ren FC, Liao TG. Two new prenylflavonoids from *Morus alba*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2017; 20(2), 117–121.

García-Irigoyen O, Latasa MA, Carotti MU , Uriarte I, Elizalde M, Urtasun R, Vespasiani-Gentilucci U, Morini S, Benito P, Ladero JM, Rodriguez JA, Prieto J, Orbe J, Páramo JA, Fernández-Barrena MG, Berasain C, Avila MA. Matrix Metalloproteinase 10 Contributes To Hepatocarcinogenesis in a Novel Crosstalk With the Stromal Derived Factor 1/C-X-C Chemokine Receptor 4 Axis. *Hepatology*. 2015; 62(1),166–178.

Gniadecka M, Nielsen OF, Wessel S, Heidenheim M, Christensen DH, Wulf HC. Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *The Journal of investigative dermatology*. 1998; 111(6), 1129–1133.

Graham HK, Hodson NW, Hoyland JA, Millward-Sadler SJ, Garrod D, Scothern A, Griffiths CEM, Watson REB, Cox TR, Erler JT, Trafford AW, Sherratt MJ. Tissue section AFM: In situ ultrastructural imaging of native biomolecules. *Journal of the International Society for Matrix Biology*. 2010; 29(4),254–260.

Grams F, Reinemer P, Powers JC, Kleine T, Pieper M, Tschesche H, Huber R, Bode W. X-ray Structures of Human Neutrophil Collagenase Complexed with Peptide Hydroxamate and Peptide Thiol Inhibitors: Implications for Substrate Binding and Rational Drug Design. *European Journal of Biochemistry*. 1995;228(3), 830–841.

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1962;48(2), 1014–1022.

Gu Y , Han J, Jiang C, Zhang Y. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing research reviews*. 2020; 59:101036.

Gururajan R, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ. Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3. *Genomics*. 1998;52(1),101–106.

Gutman A , Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *The EMBO Journal*. 1990; 9(7), 2241–2246.

Harley CB, Futcher AB, ve Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990; 345(6274), 458–460.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 1956; 11(3), 298–300.

Harman D. Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs & Aging*. 1993; 3(1), 60–80.

Harman D. The biologic clock: the mitochondria?, *Journal of the American Geriatrics Society*. 1972; 20(4), 145–147.

Harman D. The Free Radical Theory of Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2004; 5(5), 557–561.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1961;25(3): 585–621.

Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1965; 37(3), 614–636.

Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*. 2018; 28(6): 436–453.

Hollborn M, Stathopoulos C, Steffen A, Wiedemann P, Kohen L, Bringmann A. Positive Feedback Regulation between MMP-9 and VEGF in Human RPE Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007; 48(9): 4360–4367.

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease due to Inadequate Collagen Turnover. *Cell*. Elsevier. 1999; 99(1), 81–92.

Hunyadi A, Martins A, Hsieh TJ, Seres A, Zupko I. Chlorogenic Acid and Rutin Play a Major Role in the *In Vivo* Anti-Diabetic Activity of Morus alba Leaf Extract on Type II Diabetic Rats. Published by Public Library of Science. 2012; 7(11), 50619.

Jenkins, G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of ageing and development*. 2002; 123(7), 801–810.

Jia Y, He W, Zhang H, He L, Wang Y, Zhang T, Peng J, Sun P,2 Qian Y. Morusin Ameliorates IL-1 β -Induced Chondrocyte Inflammation and Osteoarthritis via NF- κ B Signal Pathway. *Drug design, development and therapy*. 2020; 14, 1227–1240.

Jiménez MJG, Balbín M, López JM, Alvarez J, Komori T, López-Otín C. Collagenase 3 Is a Target of Cbfa1, a Transcription Factor of the runt Gene Family Involved in Bone Formation. *Molecular and Cellular Biology*. 1999; 19(6), 4431–4442.

Khan SS, Şarkıcı BD, Vaughan DE. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell*. 2017; 16,624–633

Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V, Hitesh, Kaur G, Pathak A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *Journal of cancer research and therapeutics*. 2016; 12(1), 28–35.

Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, Yamazaki Y, Shiwaku K, Yosuke Yamane. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2006; 97(1), 25–31.

Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *The Journal of Cell Biology*. 1987;104(3), 611.

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. “Elastic fibres”, *Journal of cell science*. 2002;115(14), 2817–2828.

Kim JY, Lee WS, Kim YS, Curtis-Long MJ, Lee BW, Ryu YB, Park KH. Isolation of cholinesterase-inhibiting flavonoids from *Morus lhou*. *Journal of agricultural and food chemistry*. (2011); 59(9), 4589–4596.

Kim YM, Jung HJ, Choi JS, Nam TJ. Anti-wrinkle effects of a tuna heart H₂O fraction on Hs27 human fibroblasts. *International journal of molecular medicine*. 2016; 37(1), 92–98.

Kirkland JL, Tchkonian T. Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents. *Experimental gerontology*. 2015; 68, 19–25.

Knäuper V, Docherty AJP, Smith B, Tscheschec H, Murphy G. Analysis of the contribution of the hinge region of human neutrophil collagenase (HNC, MMP-8) to

stability and collagenolytic activity by alanine scanning mutagenesis. *FEBS Letters*. 1997; 405(1), 60–64.

Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies RM. Skin ageing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2011; 25(8), 873–884.

Koosha S, Mohamed Z, Sinniah A, Ibrahim ZA, Seyedan A, Alshawsh MA. Antiproliferative and apoptotic activities of 8-prenylnaringenin against human colon cancer cells. *Life sciences*. 2019; 232.

Kosmadaki MG, Gilchrest BA. The role of telomeres in skin aging/photoaging. *Micron*. 2004; 35(3), 155–159.

Krishnamurthy P, Wadhwani A. Antioxidant Enzymes and Human Health. *Antioxidant Enzyme*. 2012; 48109.

Kruk PA, Rampino NJ, Bohr VA. DNA damage and repair in telomeres: relation to aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(1), 258–262.

Kucukguven A, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases as Potential Targets in the Venous Dilation Associated with Varicose Veins. *Current Drug Targets*. 2013; 14(3), 287–324.

Kusano G, Orihara S, Tsukamoto D, Shibano M, Coskun M, Guvenc A, Erdurak CS. Five new nortropane alkaloids and six new amino acids from the fruit of *Morus alba* LINNE growing in Turkey. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2002; 50(2), 185–192.

Labat-Robert J, Fourtanier A, Boyer-Lafargue B, Robert L. Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin. Effect of UV-irradiation. *Journal of photochemistry and photobiology*. 2000; 57(2–3), 113–118.

Lapointe J, Hekimi S. When a theory of aging ages badly. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010; 67(1), 1–8.

Lee KE, Bharadwaj S, Yadava U, Kang SG. Computational and *In Vitro* Investigation of (-)-Epicatechin and Proanthocyanidin B2 as Inhibitors of Human Matrix Metalloproteinase 1. *Biomolecules*. 2020; 10(10), 1–25.

Lee S, Jang T, Kim KH, Kang KS. Improvement of Damage in Human Dermal Fibroblasts by 3,5,7-Trimethoxyflavone from Black Ginger (*Kaempferia parviflora*). *MDPI AG*. 2022; 11(2), 425

Lephart ED. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews*. Elsevier. 2016; 31, 36–54.

Lewis DA, Yi Q, Travers JB, Spandau DF. UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53. *Molecular biology of the cell*. 2008; 19(4), 1346–1353.

Li GZ, Eller MS, Firoozabadi R, Gilchrest BA. Evidence that exposure of the telomere 3' overhang sequence induces senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100(2), 527–531.

Lipsky MS, King M. Biological theories of aging. *Disease-a-Month*. 2015;61(11), 460–466.

Lohi J, Lehti K, Valtanen H, Parks WC, J Keski-Oja J. Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene*. 2000; 242(1–2), 75–86.

Ludwig MG, Basset P, Anglard P. Multiple regulatory elements in the murine stromelysin-3 promoter. Evidence for direct control by CCAAT/enhancer-binding protein beta and thyroid and retinoid receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275(51), 39981–39990.

Makrantonaki E, Zouboulis CC. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). *Experimental gerontology*. 2007; 42(9), 879–886.

Mao D, Zhang Y, Lu H, Zhang H. Molecular basis underlying inhibition of metastasis of gastric cancer by anti-VEGF α treatment. *Tumor Biology*. 2014; 35(8), 8217–8223.

Martin DC, Rüther U, Sanchez-Sweatman OH, Orr FW, Khokha R. Inhibition of SV40 T antigen-induced hepatocellular carcinoma in TIMP-1 transgenic mice. *Oncogene*, 1996; 13(3), 569–576.

Martini F. Fundamentals of anatomy & physiology. 8th ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings. 2009

Martins BA, Sande D, Solares M D, Takahashi J.A. Antioxidant role of morusin and mulberrofuran B in ethanol extract of *Morus alba* roots. *Natural Product Research*. 2021;35(24), 5993–5996.

Mauris J, Woodward AM, Cao Z, Panjwani N, Argüeso P. Molecular basis for MMP-9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. *Journal of Cell Science*. 2014; 127(14), 3141–3148.

Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 1990; 65(3), 375–398.

Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012; 435(1), 3–9.

Millis AJ, Hoyle M, McCue H M, Martini H. Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Experimental cell research*. 1992;201(2), 373–379.

Mittal R, Patel AP, Debs LH, Nguyen D, Patel K, Grati M, Mittal J, Yan D, Chapagain P, Liu XZ. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *Journal of Cellular Physiology*. 2016; 231(12), 2599–2621.

Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K. Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(11), 7414–7419.

Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014; 15(7), 482–496.

Muroyama A, Lechler T. Polarity and Stratification of the Epidermis. *Seminars in cell & developmental biology*. 2012; 23(8), 890.

Murphy G, Allan JA, Willenbrock F, Cockett MI, O’Connell JP, Docherty AJ. The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(14): 9612-9618.

Nagase H, Fushimi K. Elucidating the Function of Non catalytic Domains of Collagenases and Aggrecanases. *Connective Tissue Research*. 2008; 49(3–4), 169–174.

Nagase H, Visse R. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research*. 2003; 92(8):827-839

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 2006; 69(3), 562–573.

Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274(31), 21491–21494.

Nam SI, Yu GI, Kim HJ, Park KO, Chung JH, Ha E, Shin DH. A polymorphism at –1607 2G in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) increased risk of sudden deafness in korean population but not at –519A/G in MMP-1. *The Laryngoscope*. 2011;121(1), 171–175.

Narita M, Young AR, Arakawa S, Samarajiwa SA., Nakashima T, Yoshida S, Hong S, Berry LS, Reichelt S, Ferreira M, Tavaré S, Inoki K, Shimizu S, Narita M. Spatial Coupling of mTOR and Autophagy Augments Secretory Phenotypes. *Science* 2011; 332(6032): 966-70.

Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011; 69(3),249–256.

Nomura T, Fukai T, Katayanagi M. Studies On Constituents Of Cultivated Mulberry Tree. III. Isolation Of Four New Flavones, Kuwanon A, B, C and Oxydihydromorusin From the Root Bark of *Morus alba* L. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1978;26(5):1453-1458.

Odland GF. A Submicroscopic Granular Component in Human Epidermis. Journal of Investigative Dermatology. 1960;34(1), 11–15.

Office GP. National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control, and Preventi, eds. Health, United States. 2013; 2007.

Okamoto O, Fujiwara S. Dermopontin, a novel player in the biology of the extracellular matrix. Connective tissue research. 2006; 47(4), 177–189.

Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. Journal of Biological Chemistry. 1991;266(21): 14064-71

Overall CM. Matrix Metalloproteinase Substrate Binding Domains, Modules and Exosites. Methods in molecular biology. 2001; 151, 79–120.

Oxlund H, Andreassen TT. The roles of hyaluronic acid, collagen and elastin in the mechanical properties of connective tissues. Journal of Anatomy. 1980; 131: 611.

Panek-Krzyśko A, Stompor-Gorący M. The Pro-Health Benefits of Morusin Administration—An Update Review. Nutrients. 2021;13(9): 3043.

Pang D, Liao S, Wang W, Mu L, Shen W, Liu F, Zou Y. Destruction of the cell membrane and inhibition of cell phosphatidic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*: an explanation for the antibacterial mechanism of morusin. Food & function. 2019;10(10): 6438–6446.

Park H, J N, Fe G, D L, Ve B, Qx S. Identification and Characterization of Human Endometase (Matrix Metalloproteinase-26) from Endometrial Tumor. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(27): 20540–20544.

Park₁ HJ, Min TR, Chi GY, Choi YH, Park₁ SH. Induction of apoptosis by morusin in human non-small cell lung cancer cells by suppression of EGFR/STAT3 activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;505(1): 194–200.

Pei D, Kang T, Qi H. Cysteine Array Matrix Metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 Is a Type II Transmembrane Matrix Metalloproteinase Regulated by a Single Cleavage for Both Secretion and Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(43): 33988–33997.

Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 1995;375(6528): 244–247.

Pendás AM, Balbin M, Llano E, Jimenez MG, Lopez-Otín C. Structural Analysis and Promoter Characterization of the Human Collagenase-3 Gene (MMP-13). *Genomics*. 1997;40(2): 222–233

Piao SJ, Qiu'su F, Chen LX, Pan Y, Dou DQ. New stilbene, benzofuran, and coumarin glycosides from *Morus alba*. *Helvetica Chimica Acta*. 2009;92(3): 579–587.

Rao VH, Kansal V, Stoupa S, Agrawal DK. MMP-1 and MMP-9 regulate epidermal growth factor-dependent collagen loss in human carotid plaque smooth muscle cells. *Physiological Reports*. 2014; 2(2): 224.

Rattan SIS. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free radical research*. 2006;40(12): 1230–1238.

Regulski Matthew J. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds*. 2016; 168–174.

Remacle J, Renard P. Role of oxidative stress in aging. *Pathologie-biologie*. 1996;44(1): 65–76.

Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules*. 2015;5(2): 545.

Rittié L, & Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing research reviews*. 2002; 1(4), 705–720.

Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins MJ. Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *The British journal of dermatology*. 2003;149(5): 951–959.

Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *BioMed Research International*. 2014; 17

Sanz A, Sefanatos RKA. The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: A Critical View. *Current Aging Science*. 2010;1(1): 10–21.

Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiol. Meas.* 2007; 28,41

Sarniak A, Lipinska J, Tytman K, Lipinska S. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. 2016;70: 1150–1165.

Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, Pierce JA, Campbell EJ. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *The Journal of clinical investigation*. 1991;87(5): 1828–1834.

Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L. Enzymic and Non-Enzymic Antioxidants in Epidermis and Dermis of Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1994;102(1): 122–124.

Sotiropoulou, PA, Blanpain C. Development and homeostasis of the skin epidermis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012; 4(7): 008383.

Stanulis-Praeger B. *In-vitro* studies of aging. Clinics in Geriatric Medicine. 1989; 5(1): 23–40.

Stein GH, Drullinger LF, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR. Senescent cells fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991;88(24): 11012–11016.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annual review of cell and developmental biology. 2001;17: 463–516.

Stompor-Gorący M, Bajek-bil A, Machaczka M. Chrysin: Perspectives on Contemporary Status and Future Possibilities as Pro-Health Agent. Nutrients. 2021;13(6).

Stompor M, Żarowska B. Antimicrobial Activity of Xanthohumol and Its Selected Structural Analogues. Molecules. 2016; 21(5), 608.

Stöcker W, Gram F, Reinemer P, Bode W, Baumann U, Xaver F, Rüth G, McKay DB. The metzincins — Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. Protein Science. 1995;4(5): 823–840.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. The Journal of biological chemistry. 1995;270(10): 5331–5338.

Syahdi RR, Mun'im A, Suhartanto H, Yanuar A. Virtual screening of Indonesian herbal database as HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. Bioinformation. 2012;8(24): 1206–1210.

Talwar HS, Griffith'ler CE, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. The Journal of investigative dermatology. 1995;105(2):285–290.

The Silver Book. Washington, DC. Alliance for Aging Research. 2006.

Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clinical Interventions in Aging*. 2007;2(3): 401.

Toussaint O, Medrano EE, Von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental gerontology*. 2000;35(8): 927–945.

Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing research reviews*. 2015;23: 90.

Tufan İ, Kılavuz A, Özgür Ö, Ayan FS, Gürdal FY, Engin B. Türkiye’de Gerontoloji Atlası: Yaşlı Yoksulluğu ve Yalnızlık Üzerine Bulgular. *Geriatric Bilimler Dergisi*. 2019; 2 (1): 1-7

Tulah AS, Birch-Machin MA. Stressed out mitochondria: The role of mitochondria in ageing and cancer focussing on strategies and opportunities in human skin. *Mitochondrion*. 2013;13(5): 444–453.

Turdo A, Glaviano A, Pepe G, Calapà F, Raimondo S, Fiori ME, Carbone D, Basilicata MG, Sarno VD, Ostacolo C, Parrino B, Cascioferro S, Pecoraro C, Franco SD, Bellavia D, Gaggianesi M, Veschi V, Iacono ML, Ganduscio G, Pantina VD, Mangiapane LR, Bongiorno MR, Alessandro R, Todaro M, Maria RD, Diana P, Campiglia P, Stassi G. Nobiletin and Xanthohumol Sensitize Colorectal Cancer Stem Cells to Standard Chemotherapy. *Cancers*. 2021;13(16).

Uría JA, López-Otín C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res*. 2000; 1;60(17):4745-51.

Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007;15(6): 2223–2268.

Vijg J, Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*. 2008;454(7208): 1065–1071.

Vincenti MP. The Matrix Metalloproteinase (MMP) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) Genes. *Methods in molecular biology*. 2001;151: 121–148.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*. 2003;92(8): 827–839.

Vo NV, Hartman RA, Yurube T, Jacobs LJ, Sowa GA, Kang JD. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2013; 13(3), 331–341.

Wang X, Jung J, Asahi M, Chwang W, Russo L, Moskowitz MA, Dixon CE, Fini ME, Lo EH. Effects of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Knock-Out on Morphological and Motor Outcomes after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(18): 7037–7042.

Warner HR, Butler RN, Sprott RL, Schneider EL. Modern biological theories of aging. *American Journal of Physical Anthropology*. New York: Raven Press; 1987;324.

Windsor LJ, Grenett H, Birkedal-Hansen B, Bodden MK, Engler JA, Birkedal-Hansen H. Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters. *J Biol Chem*. 1993; 15;268(23):17341-7.

Wright WE, Shay JW. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends in genetics*. 1992;8(6): 193–197.

Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2000;19(7): 623–629.

Yin XL, Lv Y, Wang S, Zhang YQ. Morusin suppresses A549 cell migration and induces cell apoptosis by downregulating the expression of COX-2 and VEGF genes. *Oncology reports*. 2018;40(1): 504–510.

Yoneda K, Hohl D, McBride OW, Wang M, Cehrs KU, Idler WW, Steinert PM. The human loricrin gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(25): 18060–18066.

Young AR, Narita M, Narita M. Spatio-temporal association between mTOR and autophagy during cellular senescence. *Autophagy* 2011;7(11): 1387–1388.

Zhou Y, Li X, Ye M. Morusin inhibits the growth of human colorectal cancer HCT116-derived sphere-forming cells via the inactivation of Akt pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 2021;47(4).

Zoofishan Z, Hohmann J, Hunyadi A. Phenolic antioxidants of *Morus nigra* roots, and antitumor potential of morusin. *Phytochem Rev*. 2018;17, 1031–1045

Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJ, Cao J. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) Binds to the Catalytic Domain of the Cell Surface Receptor, Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(2): 1216–1222.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Serhat	Uyruğu	T.C.
Soyadı	BOZKURT	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2005
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2012
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2022

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Sorumlu Müdür / Ar-Ge Personeli	Aycmed Medikal ve Tıbbi Cihazlar Sanayi ve Ticaret A.Ş.	2016-2018

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Serapias vomeracea subsp. laxiflora (Soò) Gölz and Reinhard (Orchidaceae) Tohumlarının Doğal Şartlarda Çimlenme Fizyolojisinin Belirlenmesi ve Tohumdan Üretimi	Tubitak	2014-2016
Staphylococcus aureus klinik izolatlarında metisilin direncinin hızlı tespiti için geliştirilmiş olan “StaResMet” kitinin ticari kullanım için üretimi	KOSGEB	2016-2018

Substance K'nın MCF7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinden salınan Substance P, VEGF ve Thrombospondin-1 miktarları üzerine etkilerinin <i>in vitro</i> araştırılması	Akdeniz Üniversitesi BAP	2020-2022
Acinetobacter baumannii izolatlarında kolistin direncinin belirlenmesinde kolorimetrik yeni hızlı bir antibiyotik duyarlılık test yöntemi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2020-2022
Morusinin insan fibroblast hücre hattında matriks metaloproteinaz-1 üzerine etkisinin <i>in-vitro</i> araştırılması	Akdeniz Üniversitesi BAP	2021-2022

Burslar-Ödüller:

- 1- Tubitak 2014-2016 (Burs)
- 2- KOSGEB 2016-2018 (Burs)

Yayınlar ve Bildiriler:

- 1- Bahar NT, Akkaya D, Kılıç D, **Bozkurt S**, Başbüyük HH. Yaşlı bakımında gerontoloji'nin rolü.10. Ulusal Yaşlılık Kongresi. 2019; 02,140-146.
- 2- Canpolat M, **Bozkurt S**, Şakalar C, Çoban AY, Karaçaylı D, Toker E. Rapid thermal inactivation of aerosolized SARS-CoV-2. Journal of Virological Methods. 2022; 301, 114465.
- 3- Özdener Kömpe Y, Akın Mutlu V, Özkoç İ, Demıray S, **Bozkurt S**. Fungal diversity and ex vitro symbiotic germination of Serapias vomeracea (Orchidaceae). Acta Bot. Croat. 2022; 81 (1), 108–116.
- 4- **Bozkurt S**. Morusinin Hs68 fibroblast hücreleri üzerine etkisinin *in vitro* değerlendirilmesi. 1. International Congress Of Gerontology. 2022;9-10.