

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YAŞLANMA SÜRECİNDE BEYİNDE SİRTUİN AKTİVASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞDEM YAZICI MUTLU

Tez Danışmanı
Prof.Dr. K. Gonca Akbulut

ANKARA
Haziran 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YAŞLANMA SÜRECİNDE BEYİNDE SİRTUİN AKTİVASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞDEM YAZICI MUTLU

Tez Danışmanı
Prof.Dr. K. Gonca Akbulut

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından 01/2011-48 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Haziran 2012

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**FİZYOLOJİ Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : .04./07./2012



**İmza
Prof. Dr. Aydan BABÜL
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**İmza
Prof. Dr. Kazime Gonca AKBULUT
Gazi Üniversitesi**



**İmza
Prof. Dr. Dicle BALKANCI
Hacettepe Üniversitesi**



İÇİNDEKİLER

Şekiller, Grafikler	VII
Tablolar	IX
Semboller ve Kısaltmalar	X
Önsöz	XV
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Yaşlanma	4
2.1.1Yaşlanma Nedir ?	4
2.1.2.Yaşlanma Teorileri	5
2.1.3.Evrimsel Teoriler	5
2.1.4.Moleküler Teoriler	6
2.1.5.Hücrel Teoriler	7
2.1.6.Yaşlanmanın Sistem Bazlı Teorileri; Nöroendokrin ve Nöroimmün Teoriler	8
2.1.7.Yaşlanmanın Serbest Radikal Teorisi	9
	II

2.2.Serbest Radikaller	10
2.2.1.Serbest Radikallerin Oluşumu	10
2.2.2.Oksidanların Kaynağı	11
2.2.3.Nitrik Oksit	13
2.2.4.Yaşlanma ve Nitrik Oksit	18
2.2.5.Oksidanların Hedefleri	18
2.2.6.Oksidatif Stres ve Yaşlanma	21
2.2.7.Oksidatif Stres Enflamasyon ve Yaşlanma	22
2.3.Antioksidan Savunma	23
2.3.1.Glutatyon	26
2.3.2.Antioksidan Yaşlanma ve Nörodejenerasyon	27
2.4.Melatonin	30
2.4.1.Melatonin Biyosentezi ve Fizyolojisi	30
2.4.2.Melatoninin Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem	34
2.4.3. Melatonin ve Yaşlanma	38

2.5.Sirtuin	41
2.5.1.Sirtuinin Keşfi	41
2.5.2.Memelilerde Sirtuin	42
2.5.3.Biyolojik Dokularda Sirtuin	45
2.5.4.Sirtuin, Yaşlanma ve Oksidatif	46
2.5.5.Sirtuin ve Melatonin	47
2.5.6.SİRT2	48
2.6.Sirtuin Aktivatör ve İnhibitörleri	51
2.6.1.Polifenoller	51
2.6.2.Polifenollerin Biokimyası ve Fizyolojik Özellikleri	51
2.6.3.Polifenoller ve Yaşlanma	53
2.6.4.Polifenoller ve Sirtuin	53
2.6.5.Curcumin	54
2.6.6.Salermid	56
3.GEREÇ- YÖNTEM	57

3.1. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler	57
3.1.1.Deney hayvanları	57
3.1.2.Kullanılan Araçlar ve Kimyasallar	57
3.1.3.Araştırma Planı	58
3.2.Tayin Yöntemleri	61
3.2.1.Dokuda TBARS Tayin Yöntemi	61
3.2.2.Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi	61
3.2.3.Dokuda Nitrik Oksit Tayin Yöntemi	62
3.2.4.Bradford Protein Tayin Metodu	62
3.2.5.Western Blotting Tekniği ile Protein Belirlenmesi	63
3.2.6.Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	64
3.2.7.Jel Transferi ve İmmunoblotting	65
3.2.8.İstatistiksel Değerlendirme	66
4.BULGULAR	67
4.1. Korteks Doku MDA Düzeyleri	67

4.2. Korteks Doku Glutasyon Düzeyleri	67
4.3. Korteks Doku NO_x Düzeyleri	68
4.4.Korteks Doku Sirt2 Düzeyi	68
5.TARTIŞMA	75
6.SONUÇ	81
7.ÖZET	82
8.SUMMARY	84
9.KAYNAKLAR	86
10.EKLER	115
11. ÖZGEÇMİŞ	116
12.TEŞEKKÜR	117

ŞEKİLLER, GRAFİKLER

Şekil1.	Yaygın reaktif O ₂ türlerinin elektron yapıları	12
Şekil2.	Nitrik oksit(NO) kaynakları ve oluşumu	17
Şekil3.	Oksidanların hedefleri	20
Şekil4.	Vücudun doğal savunma sistemi SOD,CAT,GPX	25
Şekil5.	Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı	29
Şekil6.	Melatoninin yapısı N-asetil-5 metoksitriptamin	31
Şekil7.	Melatonin sentezi	32
Şekil8.	Melatoninin antioksidan fonksiyonu	36
Şekil9.	Melatonin sentezinin yıllara göre değişimi	39
Şekil10.	Sirtüinnin enzimatik aktivitesi	43
Şekil11.	Memelilerde sirtüin ailesi	43
Şekil12.	Memelilerde sirtüin hücresel fonksiyonları	44
Şekil13.	Sirt2 düzenleyici ağ	50

Şekil14. Curcuminoidler	55
Şekil15. Salermid	55
Şekil16. Gruplarımızın Sirt2 bantları ve beta-aktin bantı	69
Grafik1. Gruplar arası korteks doku MDA düzey değişimleri	71
Grafik2. Gruplar arası korteks doku GSH düzey değişimleri	72
Grafik3. Gruplar arası korteks doku NOx düzey değişimleri	73
Grafik4. Grupların Sirt2/beta-aktin oranlarının PBS grubuna göre % değişim grafiği	74

TABLÖLAR

Tablo1. Melatoninin radikaller ve antioksidan enzimlere etkileri	37
Tablo2. Çalışma grupları ve özellikleri	60
Tablo3. Bulguların istatistiksel değişimleri	70

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AANAT	Aril-alkilamin N-asetil transfera
ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin mono fosfat
ATP	Adenozin tri fosfat
BHT	Butillenmiş hidroksi toluen
BSA	Bovine serum albumin
c AMP	Siklik adenozin mono fosfat
C. elegans	Caenorhabditis elegans
DMSO	Dimethyl sülfoksit
DTNB	Elman reaktifi
EGCG	Epigallo catechin galate
FOXO	Forkhead protein trankripsiyon faktörü
GPX	Glutatyon peroksid

GRd	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
HAT	Histon deasetilaz transferaz
HDAC	Histon deasetilaz
HIOMT	Hidroksiindole-O-Metiltransferaz
HOXA	Homeobox transkripsiyon faktörü
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IGF-1	İnsülin growth faktör
i NOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
İp	İntraperitoneal
MDA	Malondialdehid
MnSOD	Manganez süperoksit dismutaz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid indirgenmiş NAD

Na_2HPO_4	Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
$\text{NF-}\kappa\text{B}$	Nüklear faktör kapa B
NO	Nitrik oksit
NO_3	Nitrat
N_2O_3	Nitrojen trioksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
n NOS	Nöral nitrik oksit sentaz
OAADPr	2-O-asetil-ADP- riboz
O_2	Oksijen
$\bullet\text{OH}$	Hidroksil radikali
OL	Oligodentrosit
ONOO	Peroksi nitrit
PBS	Phosphat buffered saline

PLP	Proteo lipid protein
PGC1	Transkripsiyonal coaktivator
PPAR γ	Peroksisom proliferator-aktivated receptor gama
ROS	Reaktif oksijen türleri
ROOH	Fenton reaksiyonu
SCN	Suprakiazmatik nukleus
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Sir2	Silent information regulator
SIRT	Sirtüin
Sc	Subkutan
STAC	Sirtüin aktivatör bileşikler
STAT	Signal transducers and activators of transcription
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiobarbitürik asit

TBARS	Tiobarbitürik asit reaktifi
TCA	Triklora asetik asit
THU1	Tetrahidrocurcumin
UCP2	Mitokondrial uncoupling protein 2
VaCl ₄	Vanadyum klorür
ZnSO ₄	Çinko sülfat

ÖNSÖZ

Diyabet, Katarakt, Parkinson, Alzheimer gibi pek çok kronik hastalık yaşlanma sürecinde ortaya çıkar. Yaşlanmanın kendisi bu hastalıkların oluşması için bir risk faktörüdür. Yaşlanmayı açıklamada kullanılan teorilerin hiçbiri bu süreci açıklamada yeterli değildir. Serbest radikal teorisi yaşlanma sürecinde; radikal artışı ve antioksidan savunmanın azalması şeklinde açıklanır. Yaşlanma sürecinde çalışılan maddelerden Melatonin ve Curcumin, radikal hasarı azaltırlar ve antioksidan savunmayı artırır.

Son çalışmalar yaşlanma sürecini kontrol etmeye yönelik genler ve yollar üzerine odaklanmıştır. Yaşlanmada hücre döngüsü üzerine etkili moleküllerden deasetilasyon üzerinden etki gösteren Sirtuin proteini çalışılmaktadır. SIRT2'nin yaşlanmayla korteks dokusu üzerine olan etkisini Malondialdehid, Glutasyon ve Nitrik Oksit parametreleri ile araştırmayı amaçladık

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yaşlanma sürecinin nasıl gerçekleştiği, insanlık tarihi boyunca merak konusu olmuştur. Bu nedenle bu konuya ilişkin birçok teori ortaya atılmıştır; bu teoriler arasında serbest radikal teorisi hala popüleritesini korumaktadır. Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır.^{1,2} Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen ürünleri (ROS) meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROS oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir.^{3,4} Serbest radikallerin; DNA, protein ve lipitler üzerinde oluşturduğu hasar ve birikim sonucunda yaşlanmaya yol açtığı belirtilmiştir.^{4,5}

İnspire edilen oksijenin %20 sini tüketen beynin metabolik süreci, önemli miktarda serbest radikal oluşturur. Beynin bol miktarda poliansatüre yağ asidi ve yüksek miktarda Demir (Fe) ve askorbat içermesi onu, ROS için önemli bir hedef yapar.⁶ Ayrıca beyin antioksidan savunmadan zengin değildir. Bu durum beynin oksidatif hasarlanması için bir potansiyel oluşturur.⁷

Melatonin (MLT) organizmanın antioksidatif savunma sisteminde yer almaktadır.⁸ MLT hem lipofilik hem de hidrofilitir bundan dolayı da hücresel kompartmanlara (nükleus, sitozol ve membranlar)

diffüze olur, kan beyin bariyerini geçebilir, ve bu şekilde antioksidan etkinliğini gösterir.⁹ Ayrıca MLT, orta yaştan sonra dereceli olarak azaldığı bilinen bir hormondur ve bu azalma yaşla insan serumundaki antioksidan kapasitesindeki azalmayla korelasyon gösterir.¹⁰

Sirtüin aktivatör bileşiklerinden (STACs) biri olan Curcumin'in (CUR) antioksidan, anti-enflamatuar, anti-kanser aktivitesi yanı sıra hücre döngüsü üzerinde de etkisi bulunur.¹¹ Curcumin kalori kısıtlamasını taklit ederek etkili olur. Diğer bileşiklerle karşılaştırıldığında peroksidasyona karşı beyin lipitlerini korumada etkilidir.¹²

Salermid (SLM) sirtuin1 (sirt1) ve sirtuin2 (sirt2) üzerine potansiyel inhibitör etkiye sahip yeni bir moleküldür.¹³

Yaşlanmanın nedenleri birçok teori ile açıklanmaya çalışırken moleküler teorilerde transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin yaşam süresini etkilediğinin bulunması¹⁴ ve transkripsiyonal suskunluğu sağlayan protein komplekslerinden biri olan Sir2 (Silent Information Regulator) dikkat çekmiştir. Son çalışmalarda sirtüin ailesinin, oksidatif stres ya da DNA hasarı ile oluşan streslerle uyarılan hücrelerin yaşamının uzaması arasında bağlantı kurulması¹⁵ ayrıca bu proteinin bazı moleküllerle (CUR ve SLM) aktivasyonunun değiştirilebilmesi çalışma hipotezimizi belirledi. Sirtuin ailesinden en çok çalışma yapılan sirt1dir fakat son yıllarda diğer sirtüin izoformları hakkındaki çalışmalar hızla artmaktadır. Oksidatif strese karşı en hassas dokulardan biri olan beyinde yaşlanmayla sirt2 değişimlerinin nasıl olduğu, aktivasyonundaki değişimlerin MDA, GSH ve NOx'yu nasıl değiştireceği ve güçlü bir antioksidan olan melatonin uygulanmasının bu parametrelere etkisini

araştırmayı hedefledik. Amacımız yaşlanmanın moleküler temelindeki birçok bilinmeyeninin içinde yaşlanma ile sirtüin 2 ve melatonin ilişkisini ortaya koymaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Yaşlanma

2.1.1 Yaşlanma Nedir ?

Yaşlanma genellikle, ölüme ve hastalık oluşumuna neden olan ilerleyen yaşın, doku ve hücrelerde meydana getirdiği zararlı etkilerin birikimi olarak tanımlanır¹⁶.

Srehler, yaşlanma sürecini, birikerek devam etmeli, evrensel ve ilerleyici olmalı, iç etkenlerle oluşmalı ve sağlık için zararlı olmalı şeklin de dört kriterle açıklıyor. ¹⁷

Yaşlanma, zamanla organizmanın normal fonksiyonundaki değişimleri artıran olayların sonrasında oluşan karmaşık bir süreçtir.¹⁸ Bu değişimler, hücresel protein oluşumundan başlayan ve hücresel makro özelliklerin (sinyal reseptörlerin varlığı ve yayılımı gibi) konfigürasyonu değişen tüm organizma fonksiyonlarında görülür. Yaşlanma daha büyük ölçeklerde de meydana gelebilir. İç organ ya da sistemlerin fonksiyonlarının etkinliğinde yaygın bir azalma oluşturarak hastalık gelişimine neden olabilir ya da belli dokularda bulunan hücrelerin fizyokimyasal çevrelerindeki değişimler hastalıkların başlamasına neden olabilir.¹⁹

Yaşlanmayla tüm fizyolojik fonksiyonlar etkinliklerini ve hemeostazisi sağlama kapasitesitelerini kaybederler. Yaşlanma aşırı derecede karmaşık ve çok faktörlü bir süreçtir. Son yıllarda yaşlanmanın tek nedeni üzerinde durulmuş ve 300 ün üzerinde teori ortaya atılmış.²⁰

2.1.2.Yaşlanma Teorileri

Bu teoriler yaşlanma sürecini açıklayabilmek için birçok kategori içinde sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırmalar içerisinde en çok kabul görenleri, programlanmış ve hata teorileri altında yer alırlar. Programlanmış teoriler, yaşlanmanın; gelişme, olgunlaşma ve ileri yaş olan büyüme aşamaları boyunca yaşam süresinin zamanlamasını düzenleyen bir biyolojik saate bağlı olduğunu ve bu düzenlemede savunma cevabını oluşturma ve homeostazisi sağlamada gerekli olan sinir, endokrin ve immün sistemlerin sinyallerini açıp kapayan genlere bağlı olduğunu savunur.

Hata teorileri ise yaşayan organizmaya farklı seviyelerde ilerleyici zararlar veren çevresel yaralanmaları tanımlar (mitokondrial DNA hasarı, oksijen radikallerinin birikimi)

Yaşlanma teorilerini evrimsel, moleküler, hücresel ve sistemik olarak da sınıflandırabiliriz.²¹

2.1.3.Evrimsel Teoriler

Evrimsel teori ilk 1940'ların başlarında ortaya kondu. Bu teoriye göre yaşlanma, doğal seçimin etkinliğini yitirmesi olarak açıklanır. Evrimsel teoriler iki temel görüş etrafında şekillenmektedir. Bunlardan birisi mutasyon birikim teorisidir. Hastalık doğal seçimin gücüne karşı koyar. Yaşlanmanın Mutasyon Birikim teorisi zararlıların ve geç etki eden mutasyonların toplumda birikebildiğini ve daha sonra patolojilere ve

yaşlanmaya yol açtığını açıklamaktadır. Bu teori hakkında kanıtlar yetersizdir.²²

Yaşam süresi türler için özeldir çünkü üreme ve hayatta kalmak için yarışmak zorundadır. Birincil olarak predasyon ve çevresel zararlılardan dolayı ölen organizmalar kendi yaşam çevreleri için optimize bir yaşam süresi evrimleştirecektir. Üreme yeteneği yaşam süresini belirler. Bu teori neden belli bir periyot da yaşadığımızı açıklar yaşlanmanın spesifik nedenini bize göstermez.

Antagonistik Pleiotropik teoriyle, genler genç yaşta yararlıdır yaşlandıkça zararlı hale gelirler.²¹ deneysel olarak üreme ile yaşam süresi arasında zıt bir ilişki, germ line hücrelerinin yıkılmasıyla üremenin kısıtlandığı, Drosophila ve Caenorhabditis elegans (C. Elegans) deneylerinde gösterilmiştir.²³

2.1.4.Moleküler Teoriler

Gen Düzenleme teorileri, yaşlanmanın gen ekspresyonundaki değişiklikler sonucunda oluştuğunu önerir. Yaşlanma bir çok genin ekspresyonu değiştirmekle birlikte, direkt yaşlanmayı artırıcı genler üzerine seçici etkileri olup olmadığı belirsizdir.²¹ Son dönemlerde araştırmacıların yaşlı model organizmalarda yaptıkları genom-geniş transkripsiyonel değişiklikleri incelemeleriyle belki yaşlanmayı hızlandıran yada yavaşlatan gen altyapısını oluşturabilirler.²⁴

En ilginç gelişmelerden birisi İnsulin-like sinyallemenin azaltılmasıyla korunan transkripsiyon faktör aktivitesinin yaşam süresini

düzenlendiği kurtçuklarda, sineklerde ve farelerde gösterilmiştir.¹⁴ Bu da göstermiştir ki gen ekspresyonu yaşam süresini etkileyebilir. Nüklear Faktör Kappa B (NF- κ B), insan ve farelerin değişik dokuların da yaşlanma ile ilgili transkripsiyonel değişikliklerin aktivatörü olarak tanımlanmıştır. Genler arasında Sir 2 (Slient Information Regulator ailesi ve ortologlarının farklı türlerde yaşlanmayı düzenlediği gösterilmiştir.²⁵

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda yaşlanmaya neden olan genlerin yaşlanmanın moleküler hastalıklarının kalıcı ekspresyonlarını değiştiremedikleri gösterilmiştir.²⁶

2.1.5.Hücresel Teoriler

Hücre replikasyonuna bağlı oluşan hücresel yaşlanma ile strese bağlı oluşan yaşlanma arasında fark vardır. Replikatif yaşlanma telomer kaybına bağlı meydana gelir. İmmortal hücrelerde sabit telomer uzunluğu varken mortal hücrelerde hücre bölündükçe telomerin boyu kısalmaktadır. Telomerazın varlığı, kromosomal stabilite ve hücrenin mortalitesi arasında ilişki oluşturur.²⁷

Normal somatik hücrelerde telomer kısalması ve telomerazın kaybı, yaşla ilgili patolojileri ve proliferatif kapasitenin azalmasını hücresel yaşlanmayı tetikleyen moleküler bir saat olarak gösterilmiştir.

Stresle bağlı oluşan yaşlanmada, farklı stres yapıcılara karşı DNA hasarı, heterokromatin yapıdaki değişiklikler ve onkogen ekspresyonu sonucunda, güçlü mitojenik sinyaller gelişir, fakat sınırlı değildir.

Strese bağlı yaşlanmanın yaşla ilgili moleküler değişikliklere karşı bir cevap olduğu da tartışılır. Bu bakışla farklı hasar birikim teorileri ile uyumludur.

2.1.6.Yaşlanmanın Sistem Bazlı Teorileri; Nöroendokrin ve Nöroimmün Teoriler

Bu teorilerde, yaşlanma süreci organizmadaki sistemlerin kontrolü ve organizmanın yaşadığı çevreye adapte olabilmesi için gerekli olan temel organ sistemleri ile ilgilidir.

Nöroendokrin teoriler, yaşlanmanın;

1)Dış çevreyle tüm vücut sistemlerini iletişiminin sağlayan

2)  evresel uyarılara karşı fizyolojik cevapları programlayan

3)  evresel talepleri karşımlarken hayatı devam ettirebilmek ve üreyebilmek için en uygun koşulların sağlayan nöronal ve endokrin cevaplardaki, değişikliklere bağlı olduğunu gösterir.²¹ Bu teorinin en önemli dayanağı; hipotalomo-hipofizier aksın büyümenin düzenlenmesinde ve yaşlanmanın temel mekanizmasında yer alıyor olmasıdır. Özellikle kadınlarda üretkenlik sona erdik e bu aksın fonksiyonlarında azalma görülür. Bu teori hipofizektomi yapılmış farelerde, test edilmiş ve doğrulanmıştır. Bu teoride en önemli konu; ortaya çıkan bulgulardan hangisinin patolojik, hangisinin yaşlılığa bağlı değişiklik olduğunun çözümlenememiş olduğudur.²⁸

Nöroendokrin ve immun teorilerde, iki sistem arasındaki uyum ve etkileşimin önemli bir rolü vardır. İki sistem arasındaki etkileşim nöropeptitler, hormonlar ve sitokinler aracılığıyla sağlanır. Her iki sistemde yüksek derecede plastisite yeteneğine sahiptir.

İmmunolojik yaşlanma; enfeksiyöz hastalıklara direncin azalması, kansere karşı korumanın azalması ve kendini tanımanın bozulmasıdır (otoimmünite). Farklı immün cevaplar yaşla farklı bir şekilde etkilenir. Timus bezi, puberte sırasında hem fonksiyon hem de büyüklükte en aktif dönemdedir ve kısa bir süre sonra atrofi olur ve ilerleyici olarak olgun T hücreleri ve hormon üretimi azalır.²⁹

2.1.7 Yaşlanmanın Serbest Radikal Teorisi

Denham Harman, aerobik solunum sırasında oluşan serbest radikallerin rastlantısal ve birikimsel, hücre hasarı oluşturarak doku ve organ yaşlanmasına yol açtığını bildirmiş, radikallerin büyük çaplı hücre hasar, mutagenез, kanser ve yaşlanmanın dejeneratif sürecinden sorumlu olabileceği görüşünü öne sürmüştür.¹⁶ Yaşlanma ve iyonize radyasyonun etkileri arasındaki paralellığe dikkat çekmiş. Suyun radyolizisinin hidroksil radikalini ($\cdot\text{OH}$) ürettiğini keşfetmiştir.

Harman 1972'de serbest radikal teorisinin özgün bir devamı olarak, yaşlanmanın mitokondrial teorisini açıklamıştır. Harman, bu teoride hücredeki kusurlu mitokondrilerin artışının yaşlanmaya yol açan esas etken olduğu görüşünü savunmuştur. Mitokondrial solunum zincirinin, hücredeki oksijen radikalinin esas kaynağı olduğu ve tüketilen Oksijenin

(O₂) yaklaşık %1-4 lük kısmının serbest radikallere dönüştüğü ise ancak 1988 yılında kesinlik kazanmıştır.³⁰

Mitokondri endojen oksidanların kaynağıdır. Yaşlanma çalışmalarında, metabolik hızları yüksek olan türlerin potansiyel maksimum yaşam sürelerinin kısaldığı gösterilmiştir.³¹ Enerji tüketiminin yaşlanmadan sorumlu olduğu ortaya atılmıştır. Mitokondrial solunum hızındaki artış daha fazla oksijen radikali oluşması ile birliktedir ve yaşlanmayı hızlandırır. Gerçekte mitokondrinin enerji tüketimi, serbest radikaller teorisiyle ve yaşam hızı teorisiyle uyumlu olarak O₂ oluşumuna neden olur.

2.2.Serbest Radikaller

2.2.1.Serbest Radikallerin Oluşumu

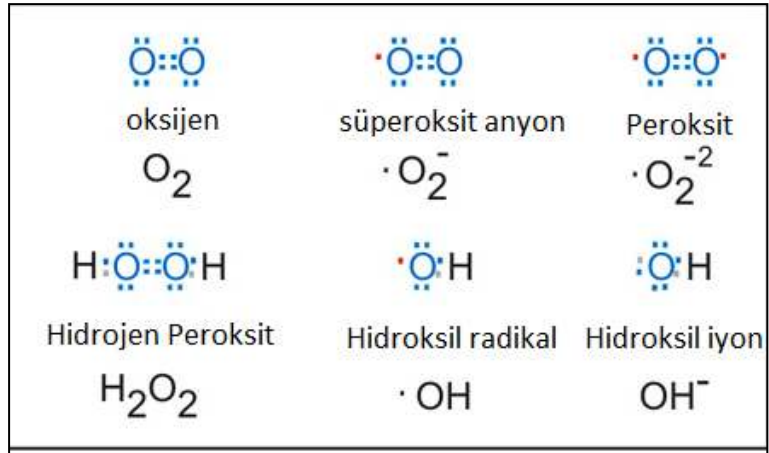
Bir diğer tanımlama ise serbest radikaller; yapılarında tek sayıda elektron içeren, açık elektron kabuğu yapısına sahip atom veya moleküllerdir.³² Radikal terimi, serbest radikallerin su molekülleri tarafından tutulmuş bağlı formunu ifade etmek için kullanılmaktadır.

Tek hücreli organizmaların ortaya çıkışından yaklaşık bir milyar yıl sonra, fotosentetik aktivite sonucunda oluşan O₂ hayatı başlattığı kabul edilmektedir. Birçok biyolojik sistem O₂ ile yaşamaya uyum sağlamakla birlikte; O₂ ve onun minor metabolik ürünleri olan süperoksit ($\bullet\text{O}_2^-$), hidrojen peroksit (H₂O₂, serbest radikal değildir), hidroksil radikali (OH $\cdot$) ve single oksijen ($^1\text{O}_2$) canlı sistemler için genellikle toksiktir. Bu ürünler kısaca ROS olarak adlandırılır.

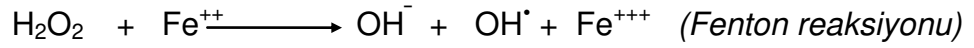
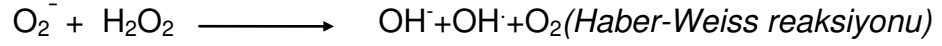
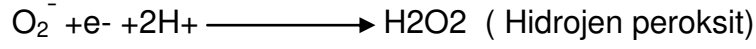
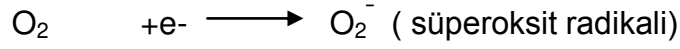
2.2.2.Oksidanların Kaynağı

En önemli ROS kaynakları mitokondriyal elektron transportu, peroksimal yağ asit metabolizması, sitokrom p450 reaksiyonu ve fagositik hücrelerdir. ROS, DNA, protein ya da lipit gibi temel kimyasal yapıların çoğunu hedef molekülden bir ya da daha çok elektron transferi yaparak okside eder. Bu reaktif oksijen türleri organizmada genellikle normal fizyolojik olaylar esnasında oluşur ve birçok önemli fonksiyona aracılık eder.³³ Mitokondriyal solunum sırasında oksijen molekülü sitokrom oksidaz enzimi ile doğrudan suya indirgenir. Bu sırada oksijenin çok az bir kısmı elektron transport zincirindeki elektron kaçakları nedeniyle süperoksit anyonunu oluşturur. Ayrıca hücrelerde çeşitli enzimler (ksantin oksidaz, sitokrom p450, NADPH oksidaz vb) aracılığıyla, küçük moleküllerin (katekolaminler, flavinler, vb.) otooksidasyonu ile veya ksenobiyotiklerin (parakuat, nitrofurantoin, adriamisin vb) redoks döngüsü gibi değişik mekanizmalarla $\bullet\text{O}_2^-$ ve H_2O_2 meydana gelir.³⁴ Hidroksil radikali ise H_2O_2 ile $\bullet\text{O}_2^-$ arasındaki reaksiyon (Haber-Weiss reaksiyonu) sonucunda oluşur. Bu reaksiyon geçiş metalleri (başlıca demir) tarafından katalizlenir ve Fenton reaksiyonu olarak adlandırılır.³⁵

Hidroksil radikali oldukça reaktiftir ve hücresel elemanların hemen tamamı ile reaksiyona girer ve toksiktir. Tiyol radikali orta reaktif iken nitrik oksit (NO) radikali ise zayıftır.³⁴



Şekil 1. Yaygın reaktif O_2 türlerinin elektron yapıları



2.2.3.Nitrik Oksit

Radikal hasarından sorumlu önemli bir molekülde nitrik oksittir. Küçük molekül ağırlıklı ve heterodiatomik molekülü, zehirli bir gaz olan NO, daha önce endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak bildirilen maddenin NO olduğunun gösterilmesiyle bilimsel çalışmaların odağı haline geldi.^{36,37} Lipid ve suda çözünen serbest radikal bir gaz olan NO, NO₂ gibi diğer radikaller, Nitrit (NO₂⁻) gibi orta derecede stabil anyonlar, Nitrat (NO₃) gibi dayanıklı anyonların yanında, Nitrojen trioksit (N₂O₃) gibi dayanıksız oksitler ve Peroksinitrit (ONOO⁻) gibi dayanıksız peroksitler oluşturur. Düşük pH'da biriken NO₂⁻ proton kazanarak nitroz aside ve daha sonra dismutasyonla NO'e dönüşür. NO tiollerle reaksiyona girerek "reaktif parçacıklı nitrik oksit" gibi depo formlar oluşturur. Bu depo formların bir elektron kaybetmesiyle sülfhidrifilik reaktanlar, nitrosoniyum (NO⁺) oluşur. Bu formların birçoğu biyolojik olarak bir kaç saniye gibi kısa bir sürede oluşmaktadır.³⁸

Serbest bir radikal olan NO, nitrik oksit sentaz (NOS) denilen enzim ailesi tarafından, bir aminoasit olan L-arginin'in terminal guanidin grubunun NO'e çevrilmesiyle üretilir.



Bu oluşum esnasında moleküler oksijen ile, kofaktör olarak, nikotinamid adenin dinükleotid, (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiyopterin (BH₄)'e ihtiyaç vardır. Bu şekilde üretilen ve işlevini yerine getiren NO, hızla hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötraliz'e edilir veya 10 saniye içinde NO₃ veya NO₂⁻'e dönüştürülür. NO[•] radikalının stabil son ürünleri NO₂⁻ ve NO₃⁻. Plazma gibi çoğu vücut sıvısında nitritin çoğu nitrata dönüşmüştür.^{39,40}

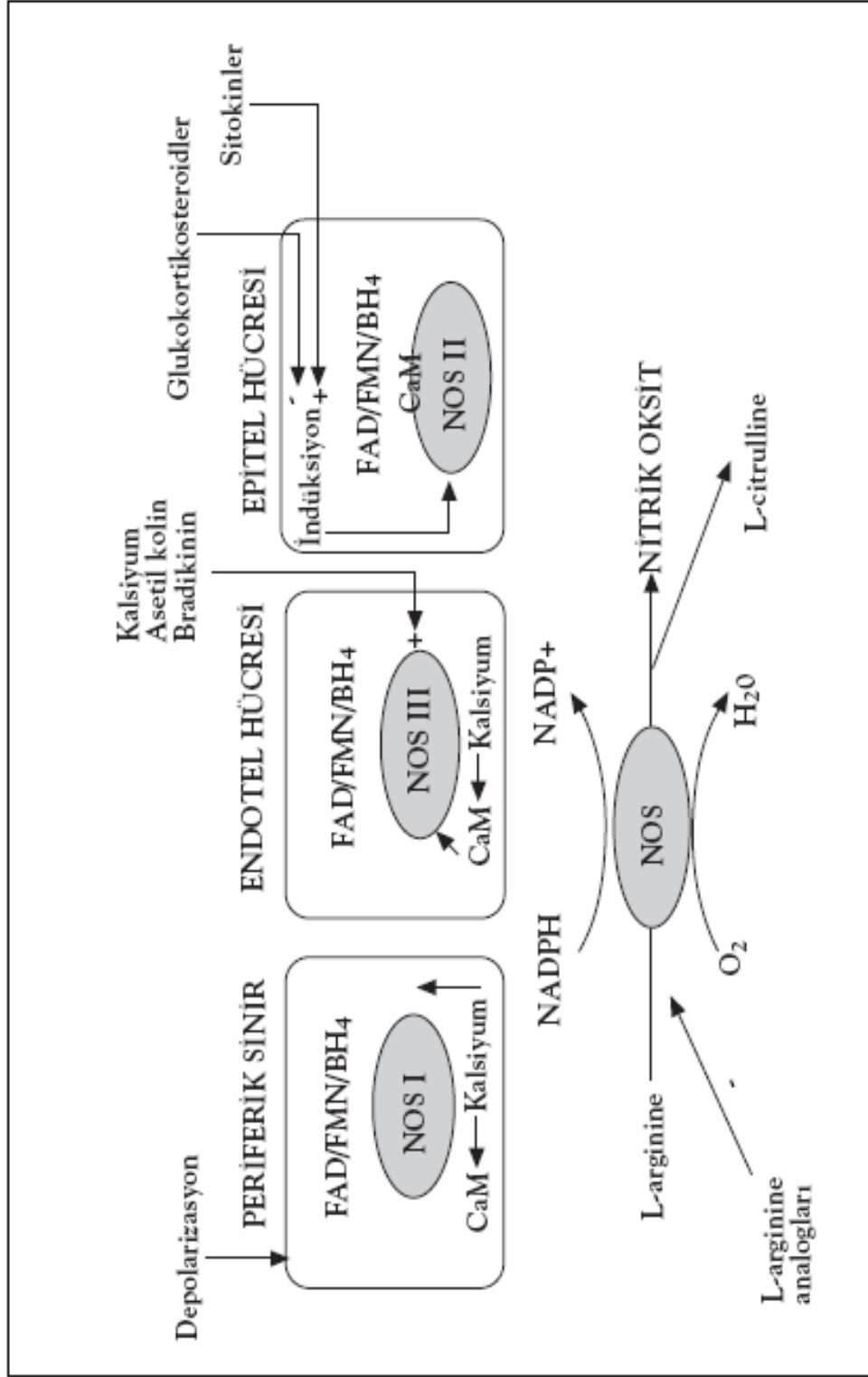
Nitrik oksit (NO) oluşuktan sonra: Methemoglobin ile NO₂⁻ ve NO₃⁻ dönüştürülerek inaktive olur; süperoksit anyonları (O₂^{•-}) ile ONOO⁻ dönüşür. Peroksinitrit, OH[•] ve tirozinle birleşerek nitrotirozini oluştururlar. OH[•] ve ONOO⁻ radikal hasarına sebep olurlar.⁴¹

NOS, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerine göre iki gruba (konstitutif ve indüklenebilir) ayrılır. NOS'ları sentezleyen 3 gen bulunur ve bu genlerden her biri bir NOS izoformunu oluşturur (NOS1, NOS2, NOS3).^{42,43} Nöronal (nNOS) ve endotelial (eNOS) olarak ta bilinen NOS1 ve NOS3, aktif hale gelmek için Ca⁺⁺'a ihtiyaç duyar ve bu nedenle konstitutif NOS olarak adlandırılırlar. Nöronlardan ve endotelial hücrelerden izole edilen konstitutif NOS'in sentez süresi kısa ve üretilen

NO miktarı çok düşüktür. Bunun sebebi, hücre içi iyonize kalsiyum konsantrasyonu azalmaya başladığı anda enzimin inaktif duruma geçmesidir.^{44,45} Endotoksin veya değişik sitokinlere cevap olarak makrofajlar ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla Ca^{++} 'dan bağımsız olarak salgılanan ve normal şartlarda gösterilemeyen NOS2'ye indüklenebilen veya uyarılabilen NOS (iNOS) adı verilir. Bu izoforma ayrıca immunolojik NOS de denilmektedir. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- γ (IFN γ) ile uyarılan makrofajlar bol miktarda NO üretirler. Bu şekilde iNOS'le üretilen NO sentezi saatlerce hatta günlerce devam edebilir.^{46,47} (Nitrik oksitin oluşumu Şekil 2'de gösterilmiştir.)

Düşük dozda özellikle nöronlarda ve damar düz kas hücre membranında bulunan guanilat siklazı aktive eden NO, damar dilatasyonu, sinirlerden uyarı geçişi gibi fonksiyonları gerçekleştirir.⁴¹ düşük konsantrasyonunun aksine yüksek konsantrasyondaki NO, nörotoksik bir döngüyü başlatır.⁴⁸ Fokal iskemi'de, İnme'de, Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda, NO'nin N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörlerini etkileyerek ortaya çıkardığı aşırı miktarda glutamat'ın hücre ölümünde etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır. NMDA'nin aktivasyonu muhtemelen intrasellüler kalsiyumda artışa neden olmakta, bu da glutamatın nörotoksisitesini başlatmaktadır.⁴⁹ NO, bu tip nörotoksisitenin dışında, merkezi sinir sisteminde oksijen nörotoksisitesi, AIDS demansındaki gibi başka tip nörotoksisitelere de kısmen aracılık edebilmektedir.^{49,50} Ayrıca, NO'nin myelin kılıf üreten oligodendrositlere de direkt toksik etki yaparak, merkezi sinir sisteminin inflamatuvar olaylarında rol oynadığı bildirilmiştir. NO'nin bu etkilerine karşı NOS inhibitörlerinin koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir.⁵¹

Reaktif nitrojen ürünleri (RNS; NO_2^- , ONOOH , N_2O_3^- , HNO_2) DNA bazları'nın nitrolanmasına veya deaminasyonuna neden olmaktadır. RNS etkisi ile sitozinden urasil, guaninden ksantin ve adeninden hipoksantin oluşmaktadır. ONOO^- guaninden 8-nitroguanin ve hipoksantin oluşturabilir. 8-nitroguanin DNA yapısı içinde dayanıksız olduğundan spontan olarak depürinasyona uğrar ve abazik alanların oluşmasına neden olur.⁵²



Şekil 2. Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu

2.2.4.Yaşlanma ve Nitrik Oksit

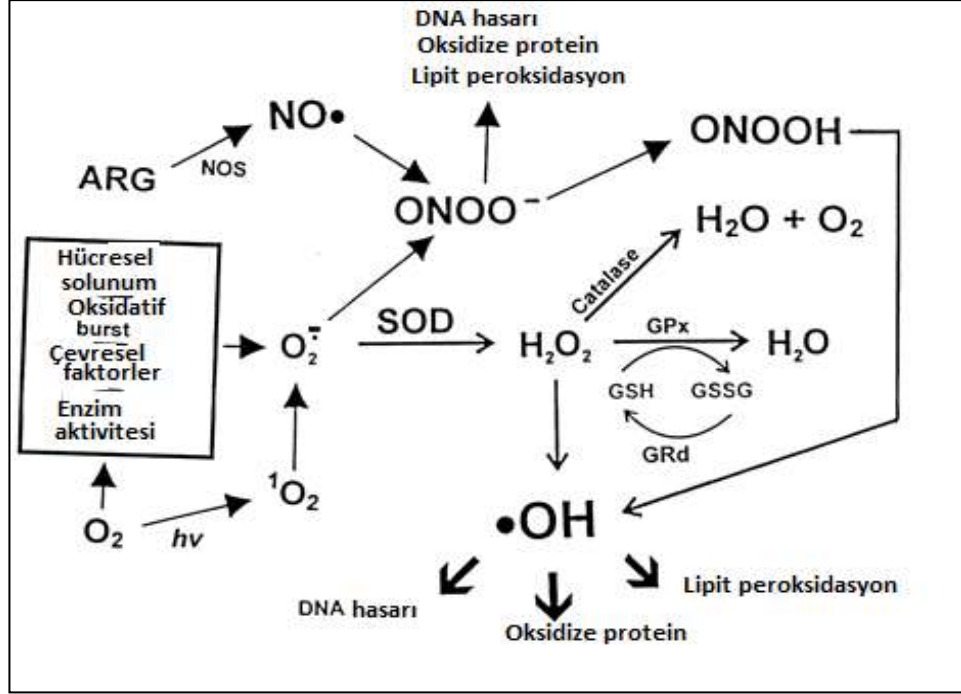
Yapılan araştırmalarda yaşlanma ile nitrik oksit düzeylerinde artış belirlenmiştir.⁵³ Serbest radikal olarak işlev gören NO'nun merkezi sinir sisteminin yaşlanmasında etkili olduğu belirtilmiştir.⁵⁴ Yaşlanma ile birlikte artış gösteren peroksinitrit seviyesi öncelikli olarak mitokondriyal oksidatif hasara neden olur.⁵⁵ Yaşlanma ile paralel artış gösteren peroksinitrit; nitrozatif strese ve apoptoza neden olmaktadır.⁵⁶ Yapılan çalışmalarda, genç ve yaşlı sıçanlarda yaşa bağlı olarak beyin⁵⁷ NO düzeyinde artış saptanmıştır. Ayrıca bu NO daki artış dan iNOS ve/veya nNOS sorumlu tutulmakla birlikte tersine sonuçlarda bulunmaktadır.⁵⁸ Beyinde, yaşlanmayla NO değişiklikleri bölgelere göre de farklılık göstermektedir.⁵⁹ NO nörodejeneratif süreçte de önemli rol oynar.⁶⁰

2.2.5.Oksidanların Hedefleri

ROS en önemli hasarı lipidler üzerinde yapar. Poliansature yağ asitleri serbest radikallere karşı çok duyarlıdır. Yağ asitlerinin oksitlenmeye başlamasıyla birlikte bir dizi reaksiyon sonucunda lipit peroksidasyon ürünleri meydana gelir. Örneğin serbest radikalin, hücre membranında yer alan fosfolipid tabakasındaki doymamış yağ asitlerinin alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırması ile yağ asidi radikal özelliği kazanır.⁶¹ Oluşan bu lipid radikali dayanıksız olup hemen lipid konjuge dien molekülü ve daha sonra buna oksijen molekülünün bağlanmasıyla lipid peroksit radikali meydana gelir. Lipid peroksit radikali de daha sonra lipit hidroperoksit molekülünü oluşturur veya lipid endoperokside dönüşür. Lipid peroksit molekülleri aynı zamanda membrandaki diğer yağ asidi moleküllerini de etkileyerek başlamış olan

peroksidasyon olaylarının zincir halinde devamını sağlar. Lipid peroksitleri daha sonra aldehit (en önemlisi 4-hidroksinonenal), keton, alkol ve eter moleküllerine ayrışır.⁶¹

Serbest radikallere bağlı hücre hasarında başlıca 3 ana mekanizma rol oynar: (1) serbest radikallerin direkt olarak yaptıkları hasar, (2) lipid peroksidasyonu sonucu biyolojik membranlarda (hücre membranı, ve bunlara bağlı olarak görev yapan enzimler, ör; sinyal iletiminde rol alan moleküller, membran taşıma sistemleri vb. yaptıkları hasar ve (3) lipid peroksidasyonu sonucu radikal olmayan fakat toksik olan maddelerin hücre içinde kolayca yayılarak diğer bölgelerde meydana getirdikleri hasarlar. Günümüzde oksidatif stres esnasında hücre ölümüne yol açan olaylar arasında lipid peroksidasyonu başta olmak üzere serbest radikallerin nükleik asitlerde ve proteinlerde meydana getirdiği değişiklikler de sorumlu kabul edilmektedir. (Şekil 3)



Şekil 3: Oksidanların hedefleri

2.2.6.Oksidatif Stres ve Yaşlanma

Yaşlılıkta sıklığı artan birçok hastalığın patogeneğinde serbest radikallerin yer alması oksidatif stres ve yaşlanma ilişkisini güçlendirmiştir.⁶²

Oksidatif stres, iskemi reperfüzyon, Alzheimer, Parkinson, Diabetes Mellitus vb. birçok hastalığın patogeneğinde rol oynar.⁶ Oksidatif stres ve yaşlanma arasında doğrudan ilişki vardır. Yapılan çalışmalarda genellikle yaşlanma ile birlikte dokulardaki serbest radikal düzeylerinin arttığı bildirilmektedir. Rodriquez ve ark. çalışmasında yaşlı sıçan beyin ve karaciğer homojenatlarında ve yaşlı insan plazmalarında da lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı gösterilmiştir.^{63,64} Yine yaşlılar, iskemi-reperfüzyon hasarına daha duyarlıdır ve reperfüzyondan sonra kalp dokusunda oluşan oksidatif hasar yaşlılarda gençlere göre daha yüksek bulunmuştur.⁶⁵

Yaşlanma, serebral korteks ve beynin diğer bölümlerinde nöronların kaybıyla karakterizedir.⁶⁶ Akbulut ve arkadaşlarının çalışmasında frontal, oksipital ve serebellumda yaşla birlikte MDA düzeylerinin de arttığı ve yaşlanma ile oluşan nörodejenerasyonda en çok etkilenen bölgenin serebral korteks olduğu gösterilmiştir.⁶⁸

Yaşlanma sürecinde serbest radikal artışına zıt olarak antioksidan enzim etkinliğinde de azalma izlenir. Yaşlanma sürecinde, reaktif oksijen, nitrojen, lipid peroksidasyon ve “Advanced glikolizasyon end product” (AGE) ürünlerine bağlı olarak gen ekspresyonunda ve fonksiyonlarda bozulmalar ortaya çıkar.⁶⁸

Antioksidan kapasitenin arttırılmasının yaşlanmayı geciktirici rol oynayabileceğinin anlaşılması büyük ilgi alanı uyandırmıştır. Ancak Sohol ve arkadaşlarının çalışmaları katalaz ve SOD un fazla eksprese edilmesinin yaşam süresini etkilemediğini göstermiştir.⁶⁹ Yaşlanma süresi üzerine etkili tek faktör kalori kısıtlamasıdır.⁷⁰

2.2.7.Oksidatif Stres Enflamasyon ve Yaşlanma

ROS ve RNS, sinir sisteminde oksidatif strese neden olurlar ve birçok patolojik şartlarda üretilirler. Özellikle NO, mikrogliaların aktivasyonu ile iNOS ve endotelial hücrelerden eNOS oluşur. Enflamatuvar süreçte ROS'un ana kaynağı hasarlanmış mitokondri ve aktive olmuş mikroglialardır.⁷¹

RNS, NO ve kısmen deriveleri yaşlanmada oksidatif stresle birliktedir. NOS içeren nöronlar merkezi sinir sisteminde birçok yerde bulunur (hipotalamus, hipokampus, cerebellum ve cerebral korteks)⁵⁴ NO, hücre ölümüne neden olan kortikosteroid ile ve stres üzerine rol oynayan glutamik asit ile uyarılan N-Metil D-aspartate (NMDA) reseptörü aracılığıyla salınır.⁷²

Glutamat-reseptör aracılı aşırı uyarım sonucunda oluşan İntrasellüler cevaplar, proteolitik enzimlerin, lipid peroksidasyonun, ROS ve RNS'nin⁷³ aşırı oluşumuna neden olur buda nörodejenerasyondaki hücre ölümünün ana mekanizmalarından biri olan apoptozisi tetikler.⁷⁴

2.3.Antioksidan Savunma

ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler.⁷⁵

Hücreler, diyetle alınan meyve ve sebzelerden gelen küçük antioksidan moleküller kadar yoğun antoksidan enzimlerle donatılmıştır.

Antioksidan moleküller ve enzimler aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.³¹

1) Enzimatik süpürücüler; $O_2^{\bullet}$ 'nin H_2O_2 ye dönüşümünü engelleyen, SOD, H_2O_2 i suya çeviren glutatyon peroksit (GPX) ve katalaz (Şekil4).

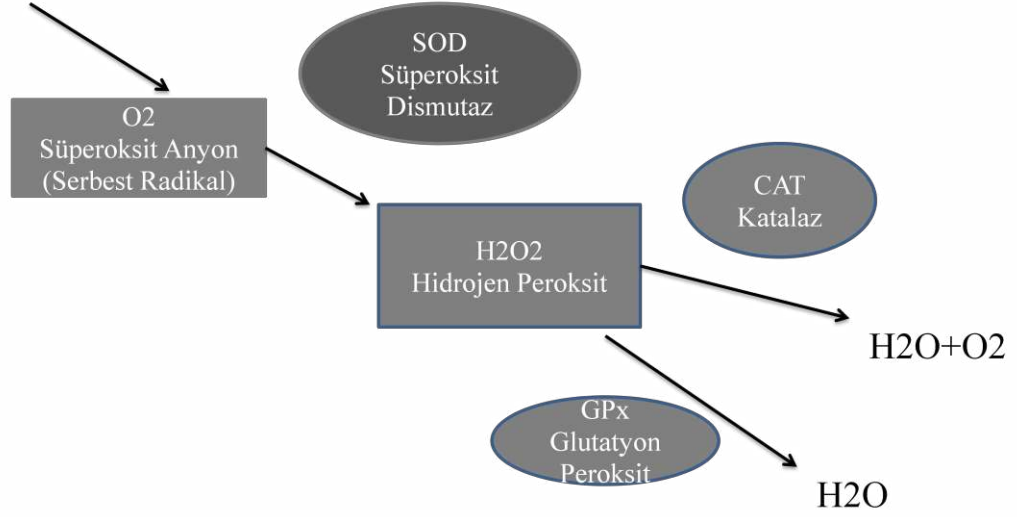
2) Hidrofilik radikal süpürücüler; askorbat, ürat ve glutatyon (GSH).

3) Lipofilik radikal süpürücüler; tokofenoller, flavonoidler, karatonoidler ve yubikuinol.

4) Küçük moleküler antioksidanların okside formların reduksiyonunda bulunan enzimler (GSH reduktaz, dehidroaskorbat redüktaz) ya da protein tiollerin varlığından sorumlu enzimler (tioredoksin redüktaz).

5) Ortamın indirgenmesini sağlayan hücreselel enzimler (örn NADPH ı yeniden oluşturan glukoz 6 fosfat dehidrogenaz). Savunma, organizmalar ya da dokular arasında hatta hücreselel kısımlar arasında farklılık gösterir.

O_2 Doğal Savunma Sistemi



Şekil 4: Vücudun doğal savunma sistemi SOD,CAT, GPx

Antioksidan savunma türler arasında farklılık gösterse bile bazı antioksidanlar evrenseldir. Antioksidan savunma tek tip değildir ve serbest radikal teorisinin bir parçasıdır. Dolayısıyla türler arasındaki antioksidan savunma farklılıkları yaşam süresi farklılıklarını açıklar.

Oksidatif hasarın onarımı, oksidanlara karşı savunmaya benzemez. Oksidatif hasarı onaran makinalar göreceli olarak hala bulunamamıştır. Yinede okside olmuş lipitler, nükleik asitler ve proteinleri onaran hücreler bellidir.³¹ (Şekil5). SOD, superoksit dismutaz; GPx, glutatyon peroksidaz; GRd, glutatyon redüktaz; NOS.

2.3.1.Glutatyon

Glutatyon hücreyi oksidatif strese karşı koruyan en önemli antioksidanlardandır.^{76,77} Glutatyon (GSH) serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan taşınmasını da sağlar. GSH karaciğeri, eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir.⁷⁸

- Glutatyon; GSH-Px, GST gibi antioksidan enzimler için ko-faktör olarak işlev görür.
- Hidroksil ve singlet oksijen radikalini direkt olarak temizler.

- Glutasyon peroksidazı aktive ederek; hidrojen peroksiti ve lipid peroksitleri temizleyici etkisini gösterir.
- Oksidan moleküller ile redoks dengesinin kurulmasında en önemli antioksidanlardandır.⁷⁹

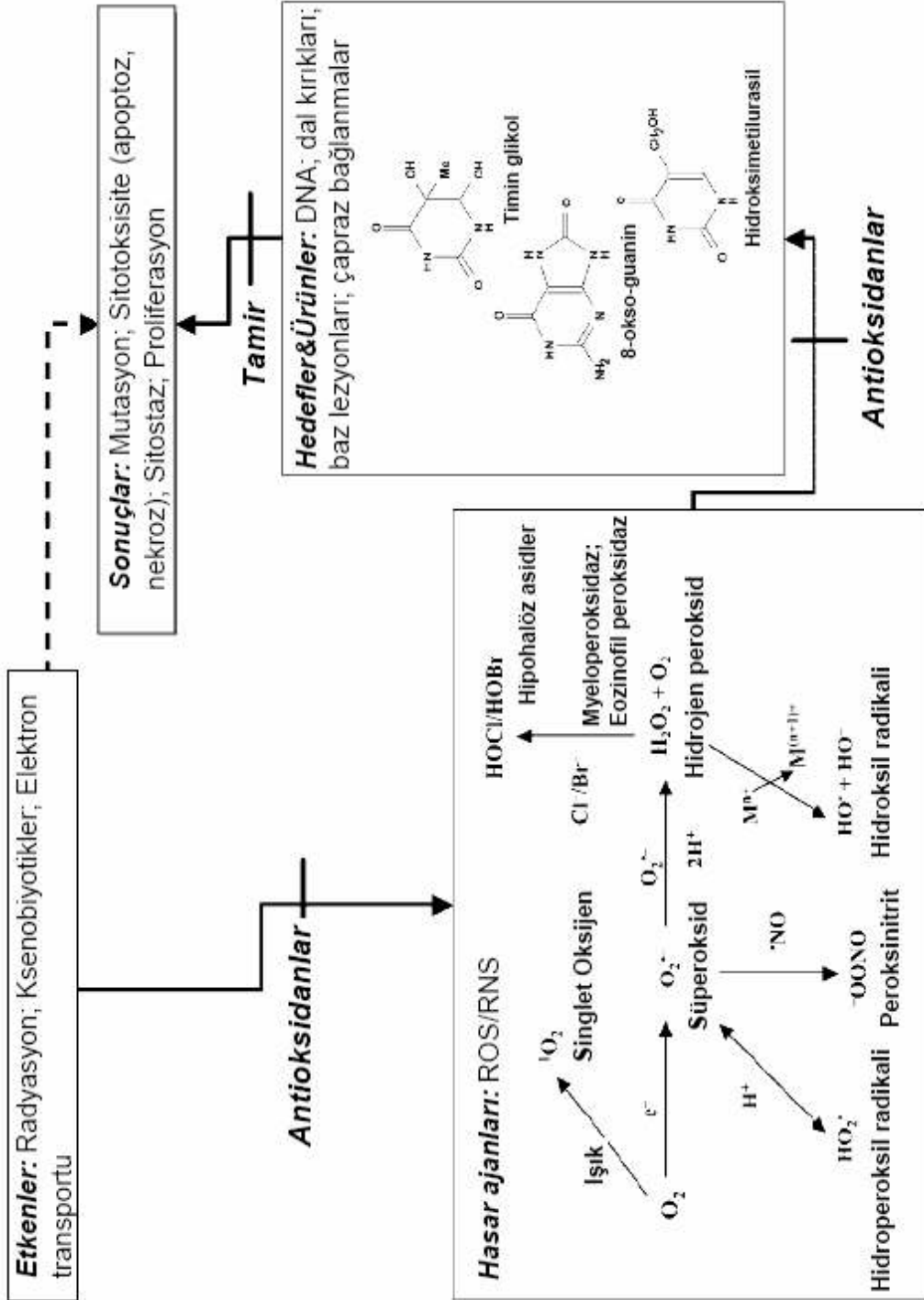
2.3.2. Antioksidan Yaşlanma ve Nörodejenerasyon

Yaşlanma antioksidan enzim etkinliğinin azalması ile birliktedir. Antioksidan kapasitenin arttırılmasının yaşlanmayı geciktirici rol oynaması büyük bir ilgi alanı oluşturmıştır. Yapılan çalışmada; Meyve sineğine SOD uygulanması yaşam süresinin değişiminde etkili olmamıştır.⁸⁰ Sağlıklı insanlarda yapılan çalışmalar sonucunda; Malondialdehid (MDA), NO ve diğer radikal düzeylerinin yaşlanma ile birlikte artış gösterdiği ve buna karşın GSH düzeyinin ve antioksidan moleküllerin düzeylerinde azalış saptanmıştır.^{1,3,78}

İnspire edilen oksijenin %20 sini tüketen beynin metabolik süreci, önemli miktarda serbest radikal oluşturur. Beynin bol miktarda poliansatüre yağ asidi ve yüksek miktarda Demir (Fe) ve askorbat içermesi onu, ROS için önemli bir hedef yapar.⁶ Ayrıca beyin antioksidan savunmadan zengin değildir. Bu durum beynin oksidatif hasarlanması için bir potansiyel oluşturur.⁷ Beyin diğer dokularla karşılaştırıldığında (karaciğer, böbrek ve kas) peroksidasyona daha yatkındır. Yüksek O₂ üretimi ve düşük antioksidan savunma merkezi sinir sistemindeki hasarı artırır. Ayrıca beynin bölgelerine göre değişen antioksidan aktivite ve değişen metabolik hız oksidatif hasarın belli bölgelerde birikmesine neden

olur.⁸¹ Serbest radikallerin artışı antioksidan sistemin up regülasyonu ile düzenlenir.

Alzheimer, inme ve Parkinson hastalığı yaşa bağlı artan ve yaşlılar için tanımlanmış nörodejeneratif hastalıklardır.



Şekil 5: Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı

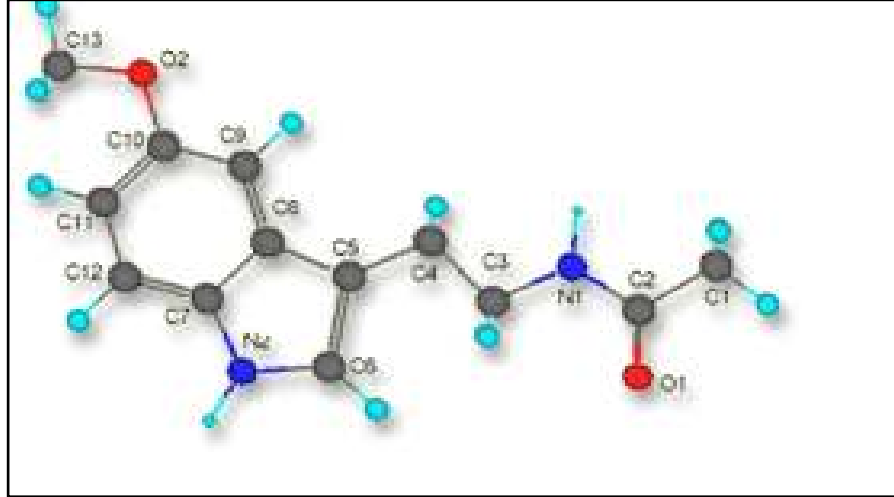
2.4.Melatonin

2.4.1.Melatonin Biyosentezi ve Fizyolojisi

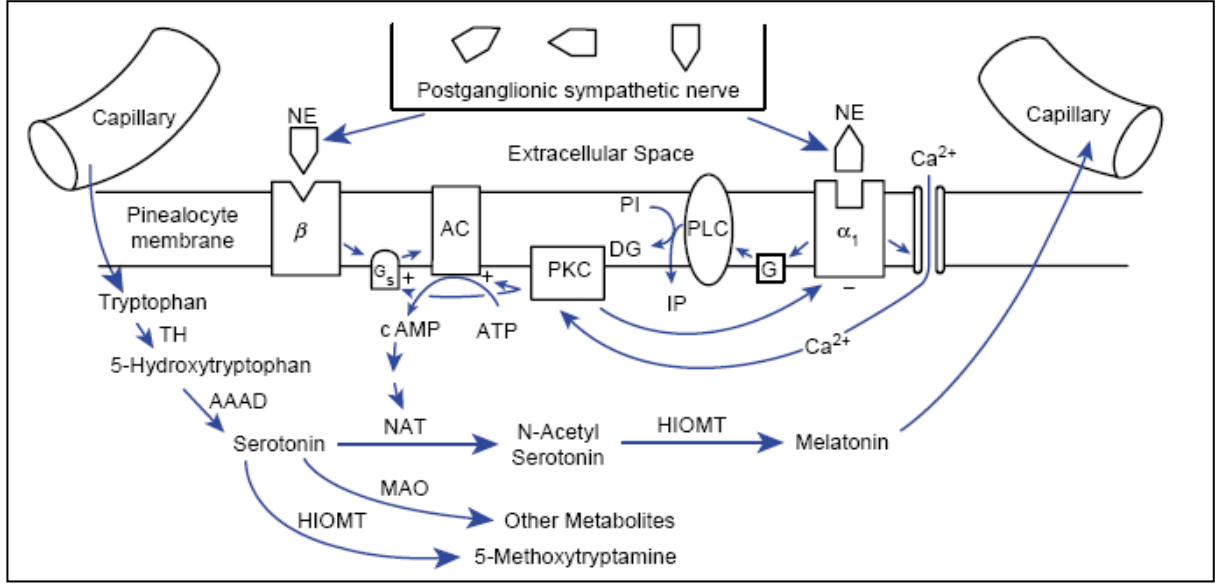
Melatonin (MLT) 1958 de Aaron Lerner ve arkadaşları tarafından, pineal bezin hormonu olarak keşfedildi.⁸² Bir yıl sonrada kimyasal yapısı N-acetil-5-metoksitriptamin olarak tanımlandı.⁸³ (Şekil 6). Melatonin sentez hızını düzenleyen enzim olan aril-alkilamine N-asetiltransferaz'ın (AANAT) aktivitesi arttığında melatonin sentezi başlar ve salgılanır. Serotoninden melatonin sentezi pineal bezle sınırlı iki enzimle katalizlenir (AANAT ve Hidroksindole-O-metiltransferaz HIOMT). Melatonin karaciğerde 6-hidroksimelatoninin hidroksilasyonu ile hızlıbirşekilde metabolize olur. 6-sulfatoksimelatonin olarak idrarla atılır. (Şekil 7).

Melatonin, bir kez sentezlendikten sonra pineal bezde depolanmaz hızla kana verilir. Melatonin kanın dışında diğer vücut sıvılarında da (tükürük, serebrospinal sıvı, safra, semen ve amniotik sıvı) bulunur.⁸⁴ Melatonin yalnızca pineal beze has bir hormon değildir. Periferik dokularda bulunan melatonin pineal bez ve dolaşımda bulunan melatonininden daha fazladır.⁸⁵

Melatonin reseptörleri birçok dokuda saptanmıştır. MT₁ ve MT₂ membran bağlayıcı reseptörleri merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerinde ve periferik organlarda (gastrointestinal sistem, karaciğer, akciğer, deri, handerian bezi, adrenal bez, erkek assesory organ, meme dokusu, böbrek, kalp, kan damarları, adipoz doku, nötrofiller, lenfositler ve lenfoit doku) tanımlanmıştır.⁸⁶



Şekil 6: Melatoninin yapısı N-asetil-5 metoksitriptamin



Şekil 7: Melatonin sentezi.

Pineal bezde sonlanan postganglionik sempatik sinir liflerinden salgılanan noradrenalinin melatonin sentezinin kontrolünde önemli rolü vardır. Pineositlerde β -adrenerjik reseptörlere (birkısımda α -adrenerjik reseptörlere) bağlanır ve adenil siklazı aktive eder ve artan Siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyesi N-asetiltransferazın aktivitesini artırır ve melatonin sentezlenir.⁸⁷

Melatonin sadece pineal bezde sentezlenmez örneğin retina, gastrointestinal yol, kemik iliği, lökositler, membranöz koklea ve haderian bezinde de sentezi yapılır. Melatonin reseptörleri yoğun olarak suprakiazmatik nukleus (SCN), pars tüberalis ve cerebellumda bulunur. Melatonin reseptörünün fazla olduğu bölgelerde daha etkilidir. Melatoninin ana fizyolojik fonksiyonu, sirkadyen ve mevsimsel döngülerin düzenlenmesi olduğu düşünülse bile melatoninin etkisi yüksek reseptör yoğunlukları olan bölgelerle sınırlı değildir. Sirkadyen düzenlemenin bütünleştirici etkisi vardır. SCN, memelilerin tüm organları üzerinde, direkt ve indirekt kontrolle sayısız fonksiyonu ritimler. Melatoninin ikili etkisi var ;

1) SCN üzerine feedback sinyalleri oluşturur.

2) SCN ye bağlı output sinyalleri beynin diğer bölgeleri kadar perifer organlarıda etkiler.⁸

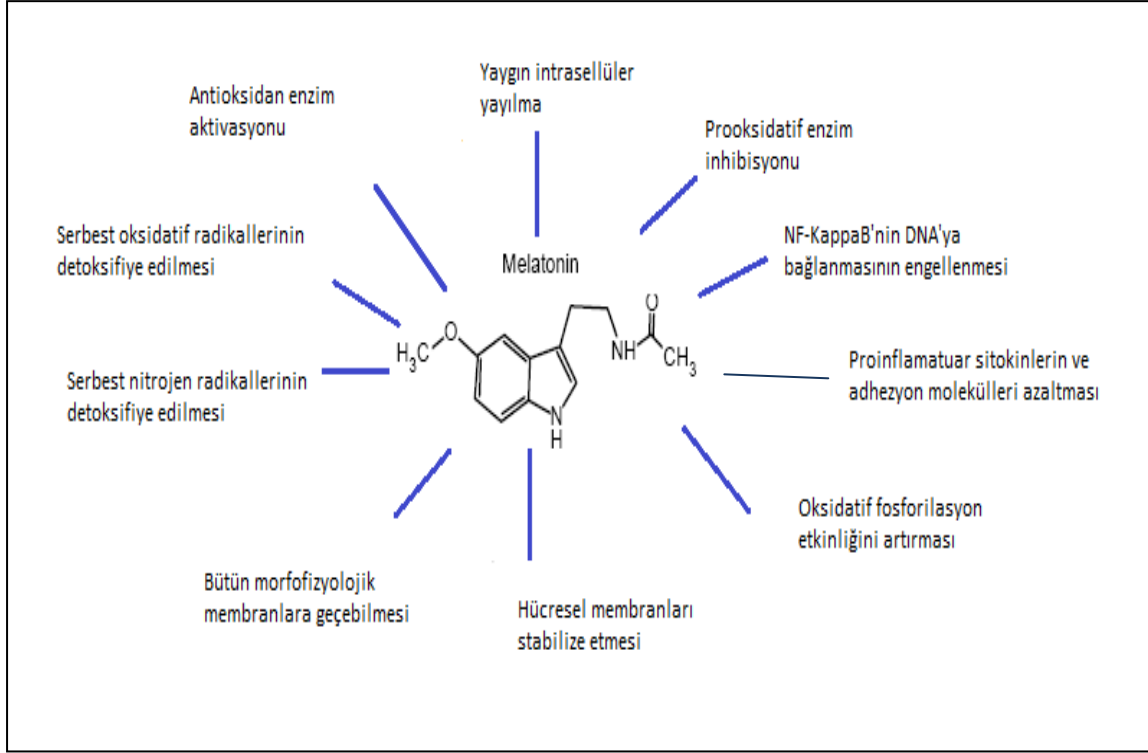
2.4.2.Melatoninin Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Melatonin hücre koruyucu özelliği araştırmaların önemli kısmını oluşturur. Bu özellik antioksidatif koruma, antioksidan enzimlerin upregülasyonu ve radikal oluşum durumundaki koruyucu etkisini kapsar.⁸ Başta kalp hastalıkları ve kanser olmak üzere birçok dejeneratif hastalıkların etyolojisinden serbest radikal hasarı sorumlu tutulmaktadır. Antioksidan moleküller bu hasarı önlemektedirler. Melatoninin antioksidan etkisi in vivo⁸⁸ ve invitro.^{89,90} çalışmalarla gösterilmiştir. Melatoninin yapısında bulunan pirol halkası nedeniyle $\cdot O_2$ ve $OH^\cdot$ radikallerini yakalamada yüksek bir kapasiteye sahiptir. Toksik hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek, bütün hücre konpartmanlarındaki biyomolekülleri, serbest radikal oluşumuna karşı bölgesel olarak yerinde korur. Çok reaktif olan hidroksil radikallerinin yıkıcı etkilerine karşı primer nonenzimatik savunma mekanizmasını oluşturur. Bu koruyucu etki reseptörden bağımsız direkt etkidir. Yapılan çalışmalarda organizmayı oksidatif hasara karşı korumada melatonin bilinen diğer antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, E vitamini, askorbik asit gibi) daha etkili görülmüştür.⁹¹ Melatoninin, özellikle reaktif, yıkıcı, mutajenik ve karsinojenik hidroksil radikallerine karşı süpürücü olduğu keşfedildi.⁹ Çalışmalarda, karbon-oksijen (C-O) merkezli prooksidanlardan korunma ve radikal reaksiyon zincirinin sonlandırılan reaksiyonlarda yapısal analoglardan daha etkili olduğu gösterildi.⁹²

Melatonin hem lipofilik hemde hidrofiliktir bundan dolayı da hücresel kompartmanlara (nükleus, sitozol ve membranlar) diffüze olur, kan beyin bariyerini geçebilir, antioksidan etkinliğini bu şekilde gösterir.⁹ Ayrıca melatoninin, orta yaştan sonra dereceli olarak azaldığı bilinen bir

hormondur ve bu azalma yaşla insan serumundaki antioksidan kapasitesindeki azalmayla korelasyon gösterir.¹⁰

Melatonin direkt radikal süpürerek, indirekt spesifik melatonin reseptörleri aracılığı ile antioksidan enzimleri aktive ederek yada prooksidatif enzimleri inhibe ederek doku koruyucu özellik gösterir. Melatoninin antioksidan enzimlerin (glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, γ -glutamilsistein sentaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, hemoperoksidaz / katalaz, Cu, Zn-ve Mn-superoksit dismutaz) up regülasyonunu sağladığı gösterilmiştir.^{90,93,94,95}



Şekil 8 : Melatoninin antioksidan fonksiyonu

Tablo1: Melatonin'in radikaller ve antioksidan enzimlere etkileri

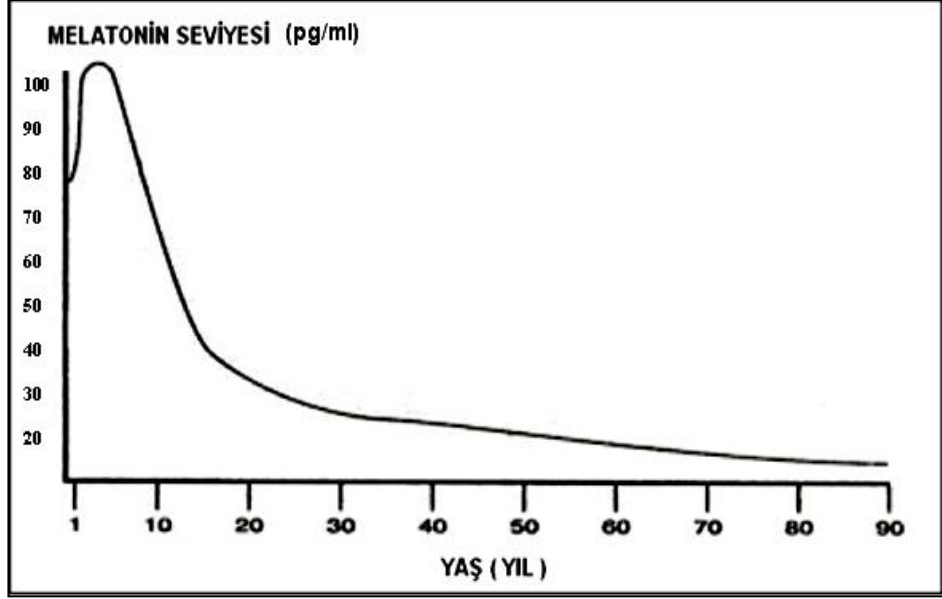
ETKİLENEEN MOLEKÜL	MELATONİN'İN ETKİSİ
Hidroksil Radikali	Süpürür
Peroksil Radikali	Süpürür
Süperoksit Anyon Radikali	Süpürür
Singlet Oksijen	Süpürür
Peroksinitrit Anyon	Süpürür
Süperoksit Dismutaz	m RNA'sını stimule eder
Glutatyon Peroksidaz	Aktivasyonunu uyarır
Glutatyon Redüktaz	Aktivasyonunu uyarır
Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz	Aktivasyonunu uyarır
Nitrik Oksit Sentaz	Aktivasyonunu inhibe eder

Başlıca NAD(P) H oksidaz, NOx'ın izoformları ve mitokondri gösterilmiştir. Melatonin, İnos^{96,97} ve nNOS'u^{96,98} down regüle ederek NOx oluşumunu engelleyebilir. Sitozolik Ca⁺² azalmasıyla radikal oluşumunu azaltır.⁹⁹ Hatta kronobiolojik rolü radikal oluşumunu azaltabilir.⁹⁴ (Şekil8).

Melatonin nörodejeneratif hastalıkları önlemede etkili olduğu hayvan modellerinde profilaktik olarak verilen melatoninin beta amyloid toksitidesini azalttığı hem de Alzheimer hastalığının deneysel modellemelerinde hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir.^{100,101} Melatonin Parkinson hastalık modellemelerinde oksidatif hasarı azalttığı bulunmuştur.¹⁰²

2.4.3. Melatonin ve Yaşlanma

Yenidoğanda pineal bez tam olarak fonksiyonel değildir. Yenidoğan melatoninin zamanlama sinyallerini anne sütü aracılığıyla alır. Yaşla gece melatonin düzeyi hızla artar ve 2-4 yaşında pik seviyeye ulaşır ve kandaki melatonin pik konsantrasyonu puberteye kadar azalır ve bir platoya ulaşır. 35-40 yaşlarına kadar bu seviyede tutulurken yaştan ilerlemesiyle düzenli bir azalma görülür. 70 yaş seviyelerine geldiğinde artık gece melatonin seviyesi gün içerisindeki düzeye ulaşmıştır. Gece salgılanan melatonin düzeyinin genetiksel olarak düzenlendiği düşünülmekte ve kişiler arasında büyük farklılıklar görülmektedir.¹⁰³ (Şekil 9). Melatoninin sirkadyen profilli bazı kişilerde altı haftanın üzerinde periyotlarda yeniden oluştuğu bulunmuştur.¹⁰⁴



Şekil 9: Melatonin sentezinin yıllara göre değişimi

Yaşlılıkta, serbest radikal artışı nöronları etkileyerek nörodejenerasyonu kolaylaştırır. Eksitatör aminoasit nörotransmitterlerin serbest radikal oluşumuna yol açtıkları gösterilmiştir.⁷² Sinir sonlanmaları bulunan beyin alanları, eksitatör aminoasitleri salgıladığından, bu alanlar diğer beyin alanlarına göre daha çabuk hasara uğramaktadırlar. Melatoninin yaşlanma ile birlikte azalması da, zararlı oksijen radikalleri ile oluşturulan hasarı artırır. Melatonin düzeyinin azalması, birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinin azalması¹⁰⁵ sonucunda hücre zar kalınlığı ve rijiditesi artarak dejeneratif hasar oluşumu hızlanır.⁸ Böylece hücrelere besin girişi ve metabolik artıkların atılımı zorlaşır. Bütün bunlar aterosklerotik değişiklikleri de içeren yaşlılıkla ilgili birçok sürecin oluşmasına yol açar.

Melatonin verilmesinin, yaşlanma ve ethanol ile oluşan hasarlanmaya karşı glial aktiviteyi stabilize ettiği ve hasarlı sinir sistemi üzerinde serbest radikalleri süpürdüğü gösterilmiştir.¹⁰⁶

Gece başladığında pinealde üretilen melatoninin kanda yükselmeye başlaması bütün vücut hücrelerine sinyaller gönderir. Işık yoğunluğundaki diüurnal değişiklikler günlük saati ve gün uzunluğundaki mevsimsel değişiklikler yıllık saati belirler. Hatta pineal melatonin üretiminin değişim yaş saatini de oluşturabilir.^{107,108} Melatonin ve kalori kısıtlamasının yaşlanmayı engelleyici etkileri araştırılmış ve kalori kısıtlaması yapılan sıçanlarda gece salgılanan melatonin miktarı iki kat fazla bulunmuş^{107,109} Ayrıca Pineal bezdeki melatonin salınımı yapan adrenerjik reseptörlerin sayısı da kalori kısıtlaması yapılan sıçanlarda iki kat fazla olduğu¹¹⁰ ve ayrıca da melatoninin Sirt1 uyarıcısı olduğu da gösterilmiş.¹¹¹

Melatonin yaşlanma ilişkisi;

- Melatonin birçok hayati süreçte görev alır ve salgılanması yaş ilerledikçe azalır.
- Melatonin serbest radikal sprcdr. Yaşla ilgili hastalıklarda melatoninin rolü gösterilmiş ve oksidatif stres ve yaşlanma arasında bağ kurulmuştur.
- Yaşlanmayla azalan melatonin konsantrasyonu ileri yaşta görülen azalmış uyku etkinliği ile ilgili olabilir.
- Melatonin konsantrasyonundaki azalma yaşla bozulan sirkadyen ritimlerle alakalı olabilir.
- Melatonin immün düzenleyici özellikler sergiler ve immün sistem fonksiyonlarının yeniden düzenlenmesi yaşlanmanın integral parçasıdır.⁸⁷

2.5.Sirtuin

2.5.1.Sirtuinin Keşfi

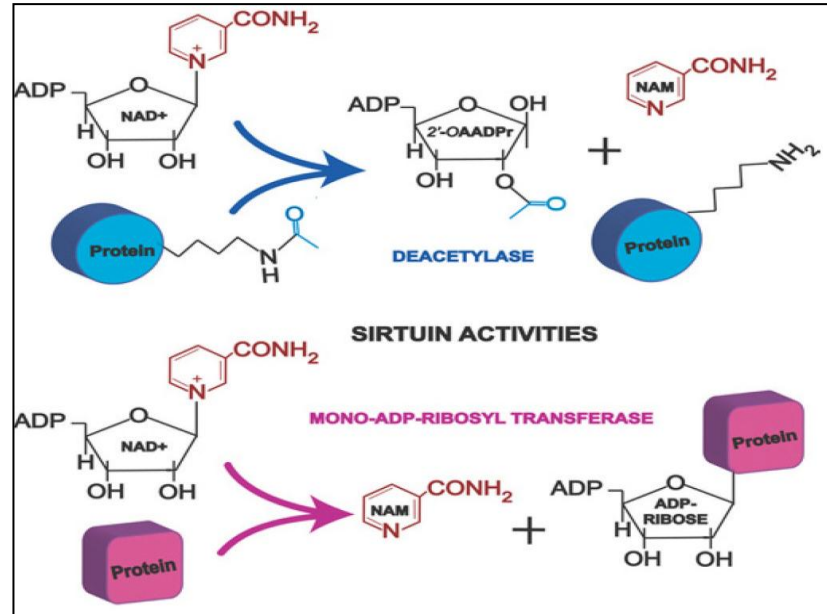
DNA tipik olarak histon proteinleri ile sıkıca çevrilmiş olduğu için transkripsiyonu imkansızdır. Ancak histon asetilasyonu transkripsiyonda önemli düzenleme mekanizmasıdır. Histon deasetilasyon enzimleri (HATs) DNA yı histon kompleksinden ayırarak transkripsiyona izin verirler. Sirtuinler başlangıçta mayada histon yada histon dışı hedeflerin deasetilasyonu ile gen düzenleyicisi olarak tanımlanmışlardır. Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) kofaktörüne ihtiyaç duyan Sirtuinler, Histon deasetilaz (HDAC) tip III histon deasetilazların içinde sınıflandırılırlar. Geleneksel HDAC lara benzemezler histonlar kadar metabolik enzimlerden yapısal proteinlere kadar değişik substratlara

sahiptirler.¹¹² Mayalarda bulunan Sir2 benzerleri, bakteriden, bitkilere ve insanlara kadar geniş organizmalarda bulunmuştur.¹¹³ Roy Frye 1999 yılında, beş Sir2 benzerini insanda tanımladı ve sirtuin ismini verdi.¹¹⁴ Sirtuinler, lizin residülerin ϵ -amino grubundan bir asetilin uzaklaştırılmasını katalizler. Proteinin hedefi, deasetillenmiş protein ürününü, nikotinamid ve 2'-O-asetil-ADP-riboz (OAADPr) u sağlamaktır. Bir molekül NAD hidrolizi sonucunda bir molekül nikotinamid ve bir molekül OAADPr oluşur. (Şekil 10).

2.5.2.Memelilerde Sirtuin

Memelilerde Sirtuin ailesinin yedi üyesi var SIRT 1-7. Her sirtuin korunmuş 273 aminoasit katalitik çekirdek alanıyla karakterizedir ayrıca değişen uzunluklarda N-terminal ve C-terminal sekansları vardır.

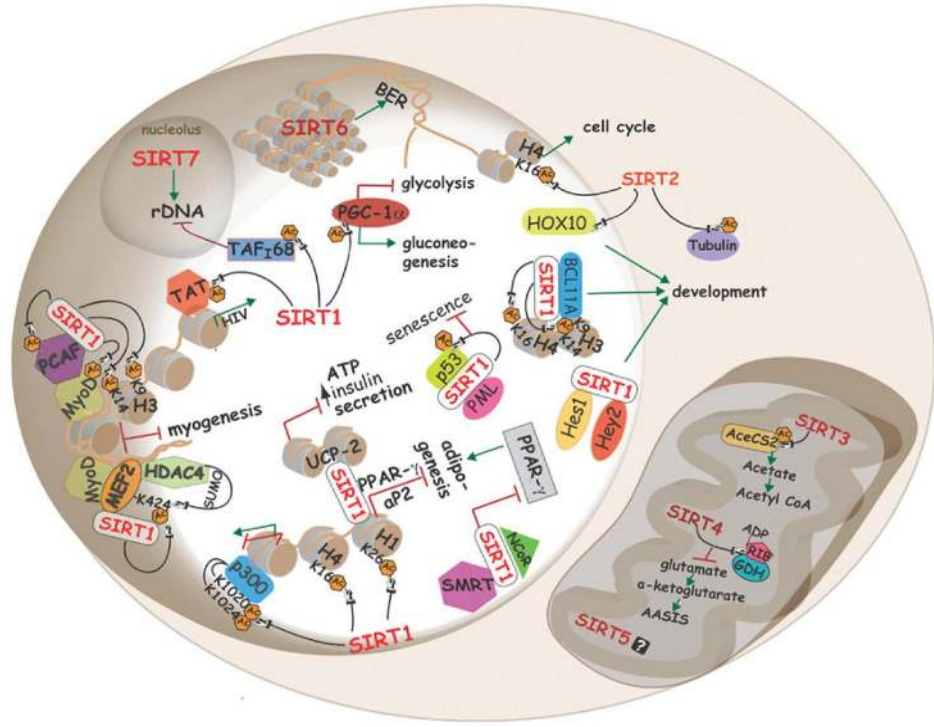
Sirtuinlerin subsellüler lokalizasyonları farklıdır. SIRT 1,SIRT6 ve SIRT 7 hakim olarak nukleusdadır. (SIRT 1 ayrıca önemli stoplazmik fonksiyonlarada sahiptir.) SIRT 1 in büyük kısmı nukleusda ökromatinle birleşmiş ve SIRT 6 da heterokromatinle birleşmiştir. SIRT7 nukleusda bulunur.¹¹⁵ Stoplazmada en baskın olarak bulunan sirtuin, SIRT2 dir.¹¹⁶ SIRT3,SIRT4 ve SIRT5 mitokondrial sirtuin olarak tanımlanmıştır.¹¹⁶ Aktivite açısından bakıldığında, SIRT1 güçlü deasetilasyon aktivitesi gösterirken SIRT5 zayıf deasetilasyon aktivitesi gösterir.¹¹⁷ SIRT 4 ve SIRT 6 mono-ADP-ribozil transferaz aktivitesi gösterirken SIRT2 ve SIRT 3, hem deasetilasyon hemde mono-ADP-ribozil transferaz aktivitesi gösterirler. SIRT 7 nin güçlü aktivitesi henüz bulunmamıştır.¹¹³ (Şekil 11).



Şekil 10: Sirtuin'in enzimatik aktivitesi

HUMAN SIRTUINS			
			KDa
SIRT1	DAC	EUCHROMATIN	62.0
SIRT2	DAC & ART	CYTOPLASM	41.5
SIRT3	DAC & ART	MITOCHONDRIA	43.6
SIRT4	ART	MITOCHONDRIA	35.2
SIRT5	DAC	MITOCHONDRIA	33.9
SIRT6	ART	HETERO-CHROMATIN	39.1
SIRT7	?	NUCLEOLUS	44.8

Şekil 11 : Memelilerde sirtuin ailesi



Şekil 12: Memelilerde, sirtuin'in hücresel fonksiyonları.

2.5.3.Biyolojik Dokularda Sirtuin

Sirtuin ailesinden olan SIRT1nin, antioksidan sistemle ilgili gen ve proteinleri FOXO3, antienflamatuar yanıtı NF κ B, antiapoptatik yanıtı P53 ve FOXO, insülin yanıtını IGF1 ve gen transkripsiyonu PGC1 ile düzenlediği ayrıca snaptik plastisite, öğrenme ve hafıza ile ilgili olduğu gösterilmiştir.¹¹⁸ En çok araştırılan ve hakkında en çok şey bilinen sirtuindir. Karaciğer, kas, pankreas, testis, over ve adipoz dokuda bulunmuştur.

SIRT3, mitokondride NAD bağımlı protein deasetilasyonu yapar. Kalp, beyin, testis, karaciğer, böbrek, kas ve adipoz dokuda bulunur. mitokondride solunumu artırır bunu cAMP'yi uyararak yapar. Asetil coA sentaz (Ace CS1) aktivitesini, Uncoupling protein 1 (UCP-1) ni ve Peroxisome Proliferator-activated reseptor gamma Coactivator Alpha'yı (PGC-1 α) deasetile ederek düzenler. İnsanlar da yapılan çalışmalarda SIRT3, uzun yaşamla ilişkilendirilmiştir.¹¹⁹

SIRT4, tüm dokularda eksprese edilir. En yüksek seviyede kalp, beyin, böbrek, karaciğer ve pankreasda bulunur.¹¹⁴ Karaciğer ve pankreas β hücrelerinde intrasellüler düzenleyici protein olarak fonksiyon görür. Etkisini ADP-ribozil transferans aktivitesiyle gösterir. İnsülin üreten INS-1E hücrelerinde SIRT4 ün azalması glikoza yanıt olarak oluşan insülin sekresyonunu artırır.¹²⁰

SIRT5, NAD bağımlı zayıf deasetilasyon aktivite gösteriyor. Biyolojik dokulardaki fizyolojik fonksiyonu bilinmiyor.¹²¹

SIRT 6, biyolojik dokularda yaygın olarak bulunur. telomerik kromatini değiştiren histonu NAD bağımlı olarak deasetile eder. Buda gösteriyor ki DNA onarma ve yaşlanmada oto ADP-ribozil transferaz aktivitesi rol oynar. Genomik stabiliteyi düzenler tek iplikli DNA kırıklarının onarılmasında fonksiyon göstererek bunu yapar.¹²¹

SIRT7, proliferatif dokularda; dalak, over, tiroit, karaciğer ve testis de bulunur. Nonproliferatif dokuda ekspresyonu yoktur ya da zayıftır.¹²²

2.5.4.Sirtuin, Yaşlanma ve Oksidatif Stres

Yaşlanma bu süreçte etkili genlerin kontrolü (insülin sinyalleme yolağını oluşturan genler ve suskunluk bilgisini düzenleyen genler ya da sirtuin ailesi gibi) ya da antioksidatif savunmanın artırılması yolu ile serbest radikaller üzerinden açıklanmaktadır. Quintas'ın çalışmasında yaşa bağlı olarak serebral korteks ve hipokampüste sirt1 düzeyinin azaldığı ancak kalori kısıtlaması yapılan yaşlı sıçanlarda sirt1 düzeyinin arttığı gösterilmiştir.¹²³ Sirt2 inhibitörleri meyve sineğindeki Parkinson modelinde alfa sinkleine bağlı nrotoksiditeyi azaltır.¹²⁴ İnhibitörlerin nörodejenerasyonda kullanılmasına karşın, sirt2 p53 yolu ile apoptozu indükler. Nöron dışı hücrelerde sirt2 tubulin deasetilaz fonksiyonu ile hücre bölünmesi ve farklılaşmasında rol oynar. Ancak post mitotik hücre olan nöronlarda sirt2 mikrotibl deasetilazı rolü açık değildir.¹²⁵ Maxwell ve ark. yaşlanma ile fare beyin ve spinal korda sirt2 izomerlerinin arttığı gösterilmiştir. Yaşlanmada primer fare kortikal nöronlarında artan sirt2 ekspresyonunun azalmış tubulin asetilasyonu ile korele olduğunu göstermiştir. Yetersiz tubulin asetil transferaz aktivitesi ve

nörodejeneratif hastalıklar arasında ilişki vardır. Yaşlanmada sirt1 in tersine sirt2 nin fazla olması nöronlarda delesyona yol açmakta sirt2 inhibitörlerinin kullanılması nörodejeneratif hastalıklarda tedavi edicidir.¹²⁶

NAD kofaktörü stres, direnç ve yaşam süresi ile ilgili metabolizmalarda anahtar düzenleyici olarak bulunur. Oksidatif stres, NAD⁺ ve sirtuin metabolizması arasındaki ilişki Braidy ve ark. tarafından gösterilmiştir. Yaşa bağlı olarak kalp, karaciğer, akciğer ve böbrek mitokondrilerinde oksidatif strese ve DNA hasarında artma, total antioksidan, NAD⁺ ve sirt1 düzeylerinde azalma saptamışlardır. Sirt1 aktivitesini NAD⁺ üzerinden yürütür.¹²⁷

Sirt1'in fazla eksprese edilmesi Alzheimer hastalığında artan beta amiyloid miktarını azaltmaktadır. Sirtuin bu etkisini amiyloidi yıkan alfa sekretaz aracılığı ile yapmaktadır.¹²²

Dillin ve ark. Sirt1 in aktivasyonu ile sirt2'nin inhibisyonunun aynı etkiyi oluşturduğunu göstermişlerdir.¹²⁸

2.5.5.Sirtuin ve Melatonin

Sirtuinin fonksiyonlarının enerji metabolizmasına uzanması ve mitokondride oksidatif savunmadaki görevleri göz önüne alındığında melatonin ve sirtuin arasında bir bağlantıdan söz etmek mümkün. SIRT1 NO sentezini, insülin /IGF-1(insulin Growth Factor-1) yolağını, FOXO alt gruplarını düzenler ve antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını artırır. Serbest radikal metabolizmasında melatoninle paralellik gösterir. Gutierrez-Cuesta ve ark. yaşlanması hızlandırılmış farelerde melatonin

uygulamasının sirt1 düzeyinin azalmasını önlediğini göstermiştir.¹²⁹ Chang ve ark. total uyku yoksunluğu oluşturulmuş farelerde melatonin uygulamasının hipokampüsde azalan sirt1 düzeyini artırdığını göstermiştir.¹³⁰ Tajes ve ark. genç ve yaşlı sıçanlardan elde edilen nöron kültürlerinde kısa süreli melatonin uygulamasının sirt1 düzeyini artırdığını göstermişlerdir.¹¹¹

Melatonin ve resveratrol (sirtuin aktivatorü) birlikte verilmesinin AMPK yı (AMPyi aktive eden protein kinaz, enerji homeostazisinin düzenleyicisi) aktivasyonunu sinerjistik etkiyle inhibe ederek hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir.¹³¹

2.5.6.SİRT2

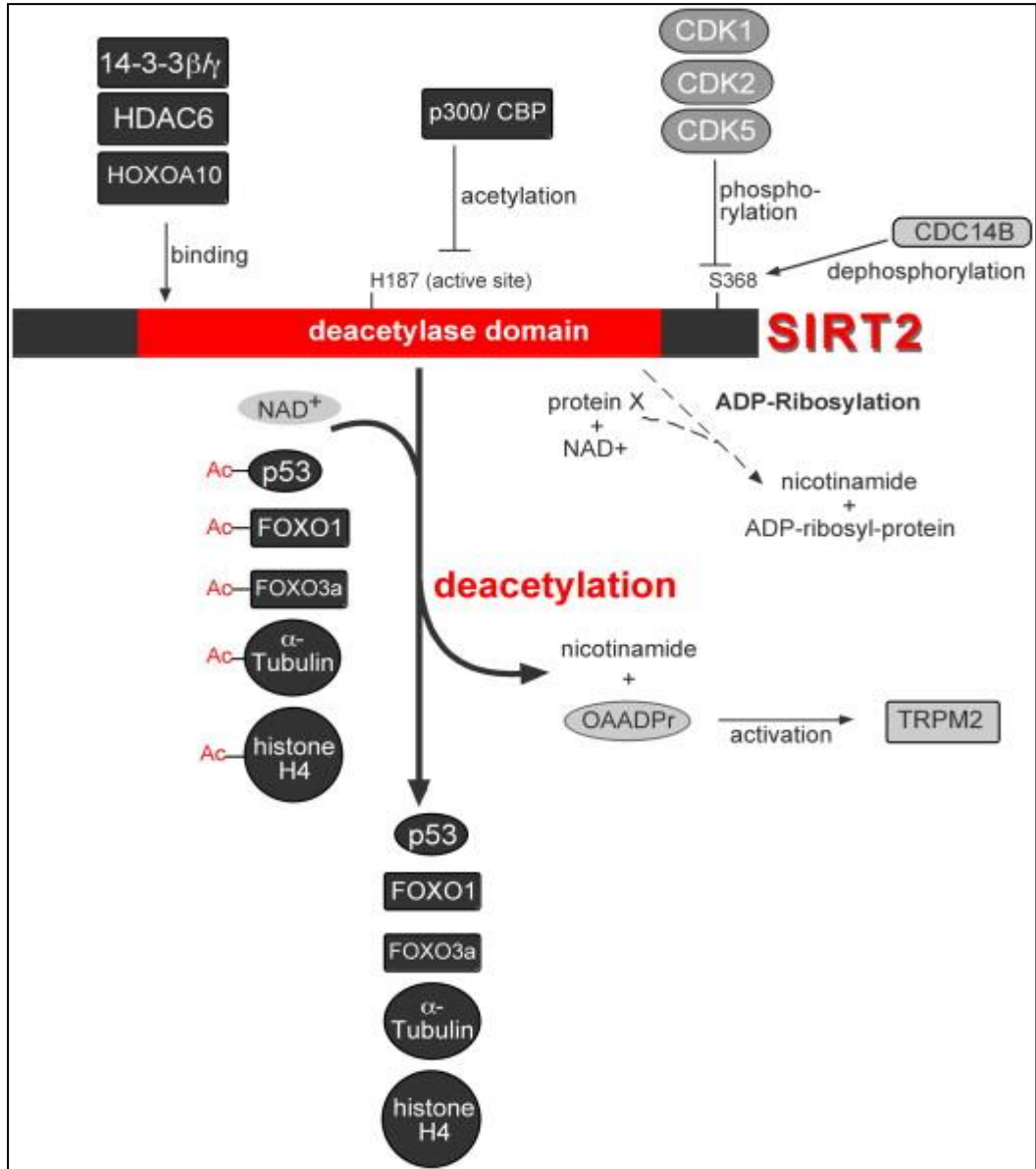
Memelilerde, Sir2 protein ailesinden gelen stoplazmik proteindir. SIRT2, iki farklı formda (352-381 rezidü), alternatif ucuca eklenmesiyle, sentezlenir. Maxwell sirt2'nin beyinde 3 izoformu olduğunu göstermiştir.¹²⁵ SIRT2 hem NAD bağımlı enzimatik reaksiyona hem de ADP ribozilasyon enzimatik reaksiyonuna sahiptir. (Şekil 13).

Tüm sirtüinler arasında, postnatal hipokampusu içeren beyinde SIRT2 ekspresyonu en güçlü olandır.¹³² Nöronlarda ve oligodentrositlerin her ikisinde SIRT 2, sitoplazmalar da sınırlanmıştır ve post mitotik hücrelerin nukleuslarında yoktur.^{132,133,134,135}

SIRT2, beyin, kalp, testis ve iskelet kas dokusunda NAD bağımlı deasetilasyon aktivitesini gösterir. Oligodentrogial stoplazmik bir proteindir ve myelin kılıfının Juxtanodal bağlantısında ve daha dışında

yerleşmiştir.¹³³ SIRT2 esas olarak α -tubilini deasetile eder. Siklin-bağımlı fosforilasyon fonksiyonu ile hücre mutilitesini bozar.¹³² Homeobox transkripsiyon faktörü (HOXA) ve histon 4 ile etkileşime girer. Homeotik genler vücut kısımlarının nasıl şekilleneceğini ya da kalıba sokulacağını belirleyen genlerdir. Mitotik döngünün M fazında aşırı ekspre edilerek mitozda hücre döngüsünü düzenler mitotik sonucu kontrol eder. Kalori kısıtlaması ve oksidatif strese cevaben FOXO transkripsiyon faktörünü deasetile eder.¹³⁶

SIRT2'nin aşırı ekspresyonu, adiposit farklılaşmasını inhibe eder, bu azalma adipogenezise neden olur.¹³⁷ SIRT2 hem fetal hemde yetişkin iskelet kaslarında ekspre edilir. Hücre farklılaşması sırasında hücre döngüsünü düzenler. Mikrotübül dinamiklerini de etkiler bunu da redox potansiyelini etkileyerek yapar.¹³⁸



Şekil 13: SiRT2 düzenleyici ağ

2.5.7.Sirtuin Aktivatörleri

Sirtuin, değişik organizmalarda (kurtçuk, maya, sinekler ve balık), diyet kısıtlaması yada genetik manipülasyonlar olmadan sirtuin aktivatör bileşikleri (STAC) kullanarak yaşam süresinin uzatıldığı araştırmalarda gösterilmiştir. Sirtuin kimyasal aktivatörleri üzerine ilk çalışmalar SIRT1 üzerine odaklanış. STAC ların bir serisi olan Resveratrol strese cevaben, sentezlenmiş küçük bitki molekülüdür ve in vitro SIRT1 in aktivatörü olarak tanımlanmıştır.^{113,139}

2.6.Polifenoller

2.6.1.Polifenollerin Biokimyası ve Fizyolojik Özellikleri

Polifenoller bitkilerde zeytinyağı, kırmızı şarap ve çay gibi meyve ve sebzelerde mevcuttur.¹⁴⁰ Deri imalatında kullanılan polifenollerin yüksek oranda kullanıldığı toplumlarda kardiovasküler hastalıklara daha az rastlanması sonucu önemleri ortaya konmuştur.

Edwin Haslam tarafından polihidroksipenil içeren doğal ürünleri üç sınıfta topladı:

1) Proantosiyanidin (proanthocyanidin) (yoğun taninler) örn. Prosiyanidin, prodelfinidinler ve flavan 3-ol unitin oligomerizasyonu sonucu oluşan profosetinidin. Flavan 3- ol ünitlerine örnek (epi)catechin galat (ECG), epigallocatechin (EGCG) ve fisetinidol dır. Flavanoller yeşil çayda oluşurlar. Monomerik flava/flavanoidler ve hidroksibenlere örnek resveratroidir.

2) Gallo-and ellagitannin (hidroliz olabilen tanin) gallik asitden (3,4,5- trihidroksibenzoik asit) kaynaklı shikimate metabolizmaları sonucu oluşurlar. Birçok kırmızı meyvelerde ve dağ çileklerinde bulunur.

3) Kırmızı-kahve alglerde bulunan phlorotanninlerdir. Kapasiteleri tam olarak ispatlanmamıştır.¹⁴¹

Fenilpropanoid kaynaklı curcumin pigmenti. Curcuma longa (zedeçal) bitkisinin kökünden, izole edilmiştir.

Flavonolignana silybin A, silybum marianumdan (deve diken) izole edilmiştir.

Sinir sistemi çevresel toksinleri de içeren tüm stres tiplerinde organizmanın adaptif (hormetik) yanıtında temel öneme sahiptir. Meyve ve sebzelerde mevcut olan fitokimyasalların kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların riskini azalttığına inanılır. Ancak, antioksidan özellikleri farklı şekilde ortaya konur. Çünkü çoğu fitokimyasalın normal fonksiyonu toksin gibi bitkiyi böcek ya da diğer zararlılardan korumaktır. Buna rağmen düşük dozlarda insan ve diğer memelilerde benzer toksik fitokimyasallar adaptif yanıt ile hücreleri zararlı durumdan korurlar.

Polifenoller, fenil halkasına eklenen en az, iki hidroksil grubunun varlığı ile metalleri şelatlama özelliğini kazanır bu özelliği polifenollerin antioksidan nöron koruyucu özelliğini açıklar.¹⁴²

2.6.2.Polifenoller ve Yaşlanma

Son bulgular fitokimyasalların (Resveratrol, Curcumin, Catechin gibi) hücre kültür ve hayvan modellerinde nörolojik hastalıklara karşı adaptif mekanizmalarda ki etkisini açıklamaktadır. Örneğin, fitokimyasallar hormezis ile Nrf2 yi içeren transkripsiyonel faktörleri aktive etmekteki o da sirtuin ailesinin histon deasetilaz ve FOXO transkripsiyon faktörü ile genleri (antioksidan enzim protein şaperonları yada nörotrofik faktörler) aktive etmektedir. Çeşitli hayvan modellerinde fitokimyasallar nörohormetik mekanizma ile Alzheimer hastalığı ve Parkinson gibi nörodejeneratif bozuklukları baskıladığı gösterilmiştir.¹⁴³

İn vivo bir çalışmada, EGCG tedavisinin myokardial reperfüzyon yaralanmasının azalması^{144,145} NF-κB nin aktivitesini azaltarak etkili olmuştur. Yine EGCGnin, in vitro olarak iNOS inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir.¹⁴⁶

Son çalışmalarda polifenollerin nöron koruyucu etkileri gösterilmiştir.¹⁹

2.6.3.Polifenoller ve Sirtuin

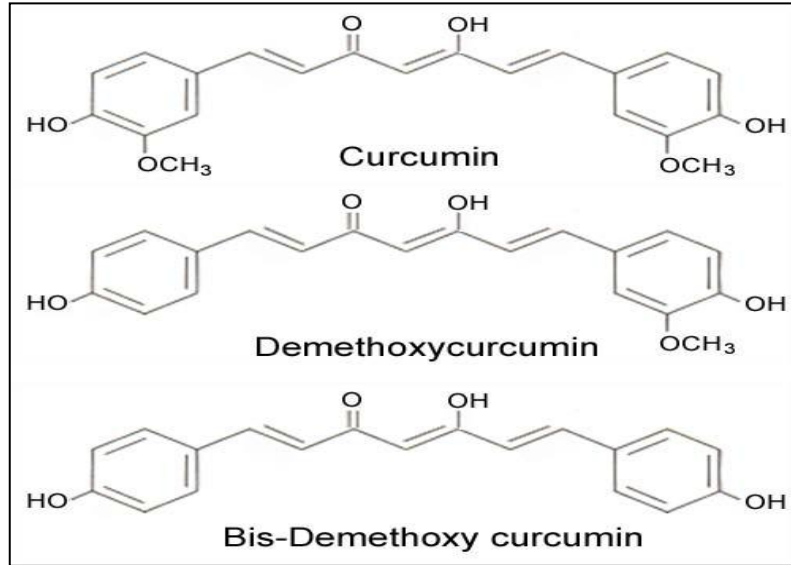
Yaşlanma ile ilgili fenomende düzenleyici olarak yer alan resveratrol benzeri polifenollerin rolü radikalleri süpürme ile kısıtlı değildir. Bire bir proteinlerle etkileşime girerek o proteinin fonksiyonunu etkileyebiliyor. Kırmızı şarapta bulunan resveratrol, piceatannol ve flavonol quercetin SIRT1 gen düzenleyicisini aktive eder. Polifenoller ve sirtuin

arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmaların nerdeyse hepsi resveratrol ve SIRT1 arasındadır.

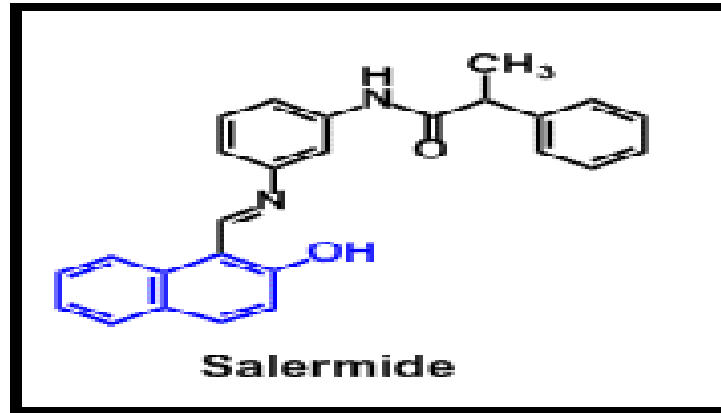
2.6.4. Curcumin

Curcumin (CUR)(diferuloylmethane) zedeçal baharatının baş bileşenidir ve doğu Hindistan'ın bitkisi curcuma longanın köklerinden elde edilir. Curcuma longa, zencefil ailesinin bir üyesidir ve güneydoğu Asya ya has çok yıllık bir bitkidir.¹⁴⁷ Zerdeçal curcuminoidler denilen bir sınıf bileşiği içerir. Şekil 14. Curcumin lipofilik bir polifenoldür. Curcuminoidler, iki α , β unsatüre karbonil grupla bağlantılı iki metoksitlenmiş fenolden ibarettir.

CUR, Asya da yiyeceklerle birlikte ve bitkisel tıp da yaygın olarak kullanılıyor. Ayurvedik tıp da, antikolesteremik¹⁴⁸ antidiabetik¹⁴⁹ , antienflamatuar¹⁵⁰ ve antiromatik¹⁵¹ etkilerinden olayı çok önemlidir. CUR, demir-bağlantılı lipit peroksidasyonunu¹⁵² reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve demir iyonunun oksidasyonunu¹⁵³ inhibe ettiği gösterilmiştir. Birçok in vivo ve in vitro çalışmalarda^{154,155,156} farklı organlardaki değişik kanserlerde CUR, lipit peroksidasyonu inhibe ettiği ve antioksidan (SOD, GSH, GST ve GPx) aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca curcuminin beyin üzerine etkileri de gösterilmiştir. CUR'un, beyin homejenatlarında, demir iyonu, ferrik –askorbat ve ferrik-ADP-askorbatla oluşan lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.¹⁵⁷ CUR ile beslenen farelerin beyinlerinden alınan mikrosomlarda, Na⁺, K⁺, -ATP az aktivitesinde artış gözlenmiştir.¹⁵⁸



Şekil 14 : Curcuminoidler



Şekil 15: Salermid

CUR, linoateleri (yağ asiti radikali şekli ve oksitlenebilme yeteneği olan bir poliunsatüre yağ asiti) kullanarak lipid peroksidasyonu inhibe eder. CUR bir diğer aktivitesi, serbest radikalleri temizleme olarak gösterilmiştir. CUR, makrofajlarda iNOS aktivitesini down regüle eder ve bunu da ROS miktarını azaltarak yapar. Mikroglial hücrelerdeki çalışmalarda CUR tedavisi sonrasında oksidatif stresden sinir hücrelerinin korunması ve NO ürünlerinin azaldığı gösterilmiştir.¹¹

Fautschy ve ark. çalışmasında CUR uygulamasının 22 aylık farelerin beyinlerinde beyin hasarı oluşturan beta-amyloid proteinine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.¹⁵⁹

2.6.5.Salermid

Salermid (SLM), (N - {3 - [(2 – hydroxy – naphthalen – 1 - ylmethylene) – amino] – phenyl }–2-phenyl-propionamide), Sirt1 ve Sirt2 için potansiyel inhibitör olarak, tanımlanan yeni bir moleküldür. Salermid kanserli hücrelerde apoptozisi uyarırken normal hücrelerde etki göstermez.¹³ Şekil 15.

3.GEREÇ- YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler

Bu çalışma 30.06.2011 tarih ve G.Ü. ET-11.056 kodlu etik kurul kararı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.Deney hayvanları

Denekler G.Ü. Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmaları Merkezinden (GÜDAM) temin edilmiş ve bakılmıştır.

Çalışmamızda; erkek, 13 aylık orta yaşlı, wistar albino sıçanlar kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan tüm sıçanlar laboratuvar ortamında, 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta olacak şekilde normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Bu düzen otomatik çalışan bir zaman saati ile sağlandı.

3.1.2.Kullanılan Araçlar ve Kimyasallar

Santrifüj: MPW-350(soğutma sistemli)

Sonikatör: Sonics vibrocell

ELİSA Okuyucu: BİOKİT EL x 800 Bioelisa Reader

Elektroforez ve Blotting: Bio-Rad mini protean system

Güç kaynağı: Consort E 835 Electrophoresis Power Supply

Isıtıcı: Eppendorf Thermomixer Compact

Tartı: SARTORIUS Basic

İstatistik Programı: SPSS FOR Windows

Araştırmada kullanılan TBARS, GSH, NOx tayininde kullanılan kimyasallar Sigma Chemical Co. (St. Lois, MO), western blot kimyasalları Santa Cruz Biotechnology den temin edilmiştir. Melatonin (Sigma M 5250-16) . Curcumin (C 1386-56). Primer Antikor Santa Cruz; Sirt2 (A-5) Sc: 28298, Beta Aktin (R22) Sc:130657. Sekonder Antikor Santa Cruz; goat anti-mouse IgG-HRP : Sc 2005, Goat anti- rabbit IgG-HRP:Sc-2030. Sirt 2 Pozitif Kontrol 3611 RF Whole Cell Lysate Sc: 2215. ECL Novex Chemiluminescent substrates (İnvitrogen WP 20002). Marker İnvitrogen SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard LC5925. Pro-Prep Protein Extraction Solution İntron Biotechnology 17081. Trans-Blot Pure Nitrocellulose Membrane Bio-Rad 162-0112.

3.1.3.Araştırma Planı

Çalışma gruplarımız Tablo 2 de gösterildiği gibi 7 olarak belirlendi ve her grupta 6 adet sıçan yer aldı. 1.ve 2. grup kontrol olarak

belirlendi ve birinci gruba subkutan (sc) (Phosphate Buffered Saline) PBS (%1 lik etanol), 2. gruba intraperitoneal (ip) DMSO 100µl/bw (Dimethyl Sulfoxide) bir ay boyunca her gün saat 17:00 de uygulandı. 3. grubumuza MLT sc olarak 10mg/kg (%1 lik etanol-pbs çözeltisinde, 0,2 cc), 4. grubumuza CUR ip olarak 30mg/kg, 5. grubumuza ise MLT 30mg/kg sc + CUR 10mg/kg ip olarak, 6. grubumuza SLT 100µmol/µl ip olarak, 7. grubumuza MLT 30mg/kg sc + SLT 100µmol/µl ip 30 gün, saat 17:00 de uygulandı. 30 günün sonunda birer gün ara ile gruplardaki sıçanlar kalplerinden kan alınıp takiben dekapite edildi. Beyin korteks olarak ayrılıp azot tankında derhal, dondurularak daha sonra çalışılmak üzere -80° C de derin dondurucuda saklandı. Alınan örneklerle aşağıdaki parametreler çalışıldı.

Radikal hasarın göstergesi olarak kabul edilebilecek ve lipid peroksidasyonu ile paralel değişim gösteren korteks dokusunda MDA düzeyi Tiobarbitürik asit reaktif (TBARS) madde oluşumu yöntemi ile çalışıldı.^{160,161} Radikal hasarına neden olabilecek korteks dokusunda Nitrik Oksit (NOx) düzeyi Griess yöntemi ile çalışıldı¹⁶² Antioksidan kapasitesinin göstergesi olarak kabul edilen; korteks dokusunda GSH tayini modifiye Elman yöntemi ile çalışıldı.¹⁶³ Korteks dokusundan, hücre lizatları elde edildi. Bu lizatlardaki protein miktarı Bradford protein tayin metodu ile ölçüldü.¹⁶⁴ Lizatlarda bulunan Sirt2 proteini, proteinlerin moleküler büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan Western Blotting tekniği ile tayin edildi.

Tablo 2: Çalışma grupları ve özellikleri

GRUPLAR	UYGULAMA	DENEK SAYISI	AĞIRLIĞI (gr)
1. grup (kontrol)	PBS+ETANOL	6	356,5±36,7
2. grup (kontrol)	DMSO	6	347,3±27,3
3. grup	PBS+ETANOL + MLT	6	371,6±22,4
4. grup	DMSO + CUR	6	356,1±34,3
5. grup	PBS+ETANOL+ MLT ve DMSO+CUR	6	362,4±28,2
6.grup	DMSO+SLM	6	374,5±32,7
7.grup	PBS+ETANOL+ MLT ve DMSO+SLM	6	382,6±33,9

3.2.Tayin Yöntemleri

3.2.1.Dokuda TBARS Tayin Yöntemi

Korteks dokusunda lipid peroksidasyon derecesi tiobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemi ile çalışıldı. Doku örnekleri sonikatör (%50) ile soğuk Trikloraasetik Asit (TCA) (0,1gr korteks dokusu +0,9ml %10luk TCA) içinde buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra +4 °C 15 dk. süreyle 4000rpm de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak 4000 rpm de 8 dk. tekrar santrifüj edildi. Örneklerden 250 µl alınarak üzerine 10µl %1 lik Butillenmiş Hidroksitoluen (BHT), 250 µl Tiobarbitürik Asit (TBA) eklendi. Daha sonra örnekler 100 °C de kaynayan su banyosunda 15 dk. bekletildi, daha sonra soğutulurak 4000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak her bir örneğin absorbansı 532 nm de tayin edildi. Korteks dokusu için lipid peroksidan düzeyi $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak MDA eşdeğeri olarak ifade edildi.

3.2.2.Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi

Korteks dokusunda GSH tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı.¹⁶³ Lipid peroksidasyonda anlatıldığı şekilde homojenize edilip santrifüj edildikten sonra 100µl örnek + 400µl (0.3M) Di Sodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) + 50µl Elman Reaktifi (DTNB) eklendi, vortekslendikten sonra 10dk. beklendi. Daha sonra Elisa okuyucusunda karışımın absorbansı 412nm dalga boyunda ölçüldü ve glutasyon düzeyleri $13\ 600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak hesaplandı.

3.2.3.Dokuda Nitrik Oksit Tayin Yöntemi

Korteks dokusunda NOx miktarı Griess yöntemi ile çalışıldı. 0,05 gr doku aldık üzerine 0,5ml PBS ekleyerek homojenize ettik. 2000 RCF de +4°C de 5 dk santrifüj ettikten sonra 400µl süpernatanı aldık. Süpernatanın üzerine 200µl N Sodyum Hidroksit (NaOH) konarak oda ısısında 5 dk inkübe ettik. Daha sonra karışıma 200µl%10 luk Çinko Sülfat (ZnSO₄) ekleyip vorteksledik ve 3000 rcf de +4 °C de 5dk santrifüj ettik. 500µl örneklerden ayırarak 14000rpm de +4 °C de 5dk santrifüj ettikten sonra örneklerimiz NOx ölçümü için hazır hale geldi.

NOx ölçümü için; 100µl örnek, 100µl Vanadyum Klorür (VaCl₂) 50µl sülfanilamid, 50µl NEDD karışımı ekleyip 37 °C de 30 dk bekledikten sonra hazırlanan karışım Elisa okuyucusun da 540nm dalga boyunda okundu. NOx miktarı hazırlanan standart çözeltiye göre hesaplandı.

3.2.4.Bradford Protein Tayin Metodu

Bradford protein ölçümü prensibi, asidik çözelti Comassie Brilliant Mavisi, proteine bağlandığında 465-595 nm dalga boyları arasında maksimum absorbands değişikliğine dayanır. Miktardaki protein tayini için hızlı duyarlı bir yöntemdir. Bu yöntemle korteks dokusundaki protein miktarını ölçebilmek için 0,02 gr doku tarttık. Bu dokuların üzerine 1,200µl PRO-PREP Protein Extraction Solution ekledik. Sonikatörle buz içinde homojenize ettikten sonra 30 dk – 20 °C de inkübe ettik. Örneklerimizin 13000 rpm, +4 °C 5 dk. santrifügasyonu sonrası süpernatanlarımızı ayırdık.

Örnekler ölçülmeden önce standartları hazırladık. BSA (Bovine Serum Albumin) standart protein olarak kullanıldı. Standartlarımız için 200mg/ml stok BSA hazırlandı ve bu stoktan yapılan 1,5mg/ml-1mg/ml-0,5mg/ml-0,25mg/ml-0mg/ml oranlarındaki protein solüsyonlarından bir protein konsantrasyonu-abzorbans için standart bir grafik oluşturduk. Elde ettiğimiz grafik eğimi ve absorbans değerlerinden protein yoğunluğunu hesaplarken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Protein (mg/ml)} = \text{Absorbans} / y - \text{standart grafiğinin eğimi}$$

10µl örnek 250µl Bradford çözeltisi şeklinde standartlar ve örnekler ikili olarak kuyucuklara yüklendi ve Elisa okuyucusunda 595nm dalga boyunda okundu. İki yüklemenin ortalaması alındıktan sonra formülden her örnekteki protein miktarı belirlendi.

3.2.5.Western Blotting Tekniği ile Protein Belirlenmesi

Lizatlardaki proteinlerin, moleküler büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan bir metottur. Örneklerdeki protein miktarını Bradford metoduyla bulduktan sonra yükleme için kullanacağımız protein miktarını 20µg olarak belirledik ve örneklerden hangi hacimde alacağımızı aşağıdaki formülle hesapladık.

$$20\mu\text{g için yükleme hacmi} = 20 / \text{protein konsantrasyonu}$$

Yüklemek hacmimizi 40µl belirledikten sonra yükleme hacminin %50 x2 örnek tamponu (Sample Buffer) +örneklerimiz ve kalan hacimde saf su ile tamamlandı. Daha sonra örneklerimiz vortekslendi ve

95 °C 5dk. kaynatılarak protein denature edildi. Örnek tamponu (β -merkaptoetanol, gliserol, SDS, Bromofenol-blue boyası ve Tris HCl, Ph:6,8) , proteinlerin jel üzerinde düzgün bir şekilde yürümesini sağlar. SDS örneklerdeki proteinleri sararak negatif yüklenmelerini sağlar.

3.2.6.Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (PAGE)

Poliakrilamid jeller hedef proteinimiz olan Sirt2 için %10 olacak şekilde hazırlandı. Jellerimiz iki kısımdan oluştu 1. Ayırma Jeli (Resolving gel) 2,5ml %40 akrilamid, 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH8,8), 100 μ l % 10 luk SDS, 4,8ml saf su, 100 μ l Amonyum persülfat (APS), 10 μ l TEMED karşımı jel hazırlama camları arasına döküldü jelin üst kısmı hava ile teması kesmek için distile su ile kaplandı 30 dk polimerizasyonu için beklendi. Daha sonra jelin üzerindeki su uzaklaştırıldı ve 2. Yığınlama Jeli (Stacking gel) bir önceki jelin üzerine döküldü kuyucukları oluşturmak için jelin içine tarak yerleştirildi. Yığınlama jelin de polimerize olması için 30 dk beklendi. Örneklerin yüklendiği bu jelin diğerinden tek farkı 0,5M Tris-HCl (ph:6,8) içermesidir.

Jeller elektroforez tankına yerleştirildikten sonra tankın içine bir miktar Yürütme Tamponu (Running Buffer: Tris baz, Glisin ve SDS) konuldu, kuyucukları oluşturan tarak çıkarıldı ve örnekler dikkatli bir şekilde kuyucuklara yüklendi. Birinci kuyucuğa bize referans olacak olan renkli markerımız yüklendi, yürütme tamponu tankın içinde gerekli seviyeye kadar getirildi ve güç kaynağına bağlandı. Güç kaynağı, yığınlama jel de 100V da ayırma jel de 160V da ayarlandı. Yürüme işlemi 50 dakika sürdü.

3.2.7.Jel Transferi ve Immunoblotting

Proteinlerin antikor ile saptanmasından önce, jeldeki protein içeriği nitrosellilöz membrana aktarılması için, elektroforez tamamlandıktan sonra jeller cam plakalardan dikkatlice ayrıldı ve Transfer Tamponunda (Transfer Buffer: Tris-baz, glisin, distile su ve son olarak Methanol) 20 dk bekletildi. Nitrosellilöz membran 3dk distile su içinde yıkandı ve transfer tamponu içinde kullanılabilecek kadar bekletildi.

Transfer sandviçi negatif yüklü olacak plakadan başlayarak, sünger, transfer tamponunda ıslanmış filtre kağıtları jel üzerine membran tekrar filtre kağıtları, sünger ve pozitif plaka ile yapıldı. Her katmanda hava kalmamasına dikkat edildi. Güç kaynağı 350 amper'e ayarlandı 30dk da transfer tamamlandı. Bu yöntem ile jelin içinde SDS ile kaplanmış negatif yüklü proteinler elektrik akımı altında pozitif alana yani membrana doğru ilerlemesi sağlanmıştır.

Transfer tamamlandıktan sonra membran ayrılarak, TBS-T Yıkama Tamponu ile yıkandı sonrasında membran bloklama solüsyonu(%5'lik süt tozu+ TBS-T) içinde 2 saat oda sıcaklığında karıştırıcının üzerinde inkübe edildi. Bu basamak ile proteinin özgün olmayan bağlanma noktaları engellendi. Sürenin sonunda membran yıkama tamponu ile 3 kez 5'er dakikalık sürelerle yıkandı. Uygun oranlarda dilüsyonlarla hazırlanan 15ml lik antikor tamponunda (primer antikor+%5'lik süt tozu + TBS-T) +4°C de 1 gece boyunca inkübe edildi.

Ertesi gün membran 3 er kez 5 er dakikalık sürelerle TBS-T yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra 15ml lik antikor tamponunda

(sekonder antikor + +%5'lik süt tozu + TBS-T) oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda membran tekrar 3 er kez 5 er dakikalık sürelerle yıkandı.

En son membran naylon zarf içine yerleştirilip 2ml chemiluminecent çalışma ayracı (ayraç1: ayraç2=1:1) membranların üzerine pipetlendi. Naylon zarf membranların üzerine kapatıldı havası temizlendi. Daha sonra film kasetine membran ve medikal X-Ray film yerleştirildi. 4dk film membrana maruz bırakıldı ve karanlık ortamda yıkandı. İkinci antikorun sağlamış olduğu kemilüminisans sayesinde film üzerinde proteine ait bantlar görüntülendi. Filme baskı işlemi özel bir görüntüleme merkezinde yapıldı. Sirt2 bantları, kontrol amaçlı uyguladığımız Beta aktin bantları referans alınarak Sirt2/Beta aktin oranı olarak ifade edildi. Bant yoğunlukları İmage j programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.8.İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızdaki verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 11.4 for Windows” Programında ANOVA, Mann-Whitney U testi ve Korelasyon yapılarak gruplar birbirleri ile karşılaştırıldı.

4.BULGULAR

4.1. Korteks Doku MDA Düzeyleri

Yedi grup arasında, MLT ve CUR uygulamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serebral korteks MDA düzeyini anlamlı olarak azalttığı bulundu. (Sırasıyla; $4,77 \pm 0,14$ nmol/g doku, $4,90 \pm 0,46$ nmol/g doku; $6,33 \pm 0,71$ nmol/g doku $p < 0,05$). Diğer gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (Grafik 1).

4.2. Korteks Doku Glutasyon Düzeyleri

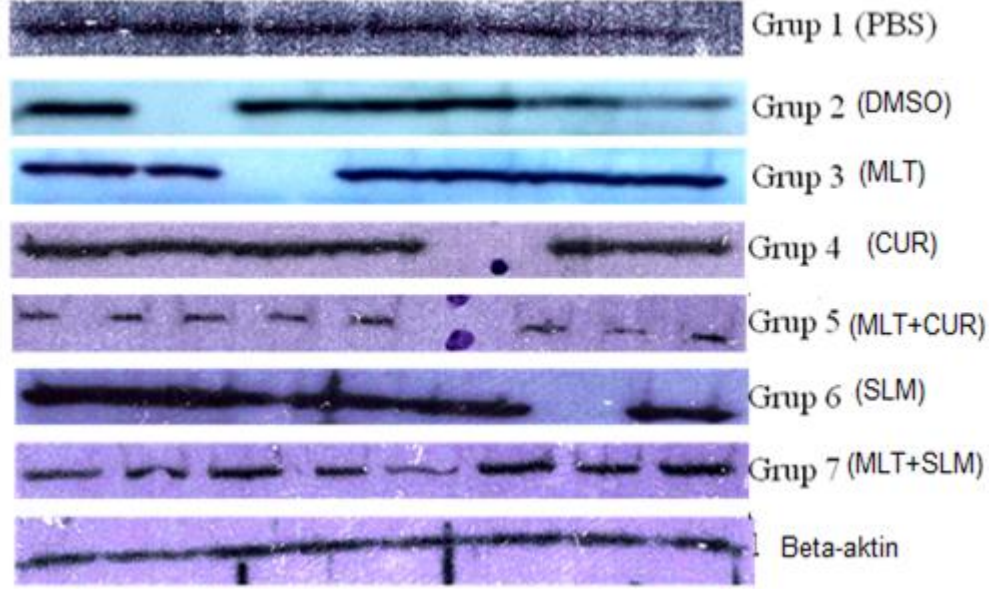
Yedi grup arasında deney gruplarının (MLT+ CUR grubu, SLM grubu ve MLT + SLM grubu) GSH düzeyi kontrol grupları ile (PBS ve DMSO) karşılaştırıldığında, korteks GSH düzeylerini, anlamlı olarak artırdığı gözlemlendi. (Sırasıyla; $2,82 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ doku, $2,74 \pm 0,04 \mu\text{mol/bw}$ doku, $2,70 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ doku; $2,53 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$ doku, $2,48 \pm 0,06 \mu\text{mol/g}$ doku $p < 0,05$). (MLT+ CUR grubu, SLM grubu ve MLT + SLT grubu) tek başına MLT uygulanan grup ile karşılaştırıldığında korteks GSH düzeylerini, anlamlı olarak artırdığı gözlemlendi. (Sırasıyla; $2,82 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ doku, $2,74 \pm 0,04 \mu\text{mol/g}$ doku, $2,70 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ doku; $2,54 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ doku, $P < 0,05$). MLT+CUR uygulaması tek başına CUR ve MLT+SLM ile karşılaştırıldığında korteks GSH düzeylerini, anlamlı olarak artırdı. (Sırasıyla; $2,82 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ doku, $2,61 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$ doku; $2,70 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ doku; $p < 0,05$). (Grafik 2).

4.3. Korteks Doku NO_x Düzeyleri

Çalışmamızda korteks dokusundaki NO_x değerlerine bakıldığında MLT+SLM ve CUR uygulaması DMSO grubu ile karşılaştırıldığında serebral korteks NO_x düzeyini anlamlı olarak artırdı. (Sırasıyla; 28,20±2,14 µmol/g doku, 26,91±2,26 µmol/g doku; 20,63±0,26 µmol/g doku, p<0,05). Ayrıca MLT + SLM grubu; MLT grubu, MLT+CUR grubu ve SLM grupları ile karşılaştırıldığında serebral korteksde NO_x anlamlı olarak yüksekti. (Sırasıyla; 28,20±2,14 µmol/g doku; 23,13±1,74 µmol/g doku, 25,37±3,60 µmol/g doku, 22,75±0,95 µmol/g doku, p<0,05). (grafik 3).

4.4. Korteks Doku Sirt2 Düzeyi

MLT uygulaması DMSO ve CUR uygulanan grup ile karşılaştırıldığında serebral korteks sirt2 düzeyini anlamlı olarak azalttı sırasıyla (88,10±3,48 sirt2/beta aktin; 123,92±17,4 sirt2/beta aktin, 228,85±10,41 sirt2/beta aktin; p<0,05) CUR uygulaması tüm gruplar ile karşılaştırıldığında serebral korteks sirt2 düzeyini anlamlı olarak arttırdı. (Sırasıyla; 228,85±10,41 sirt2/beta-aktin; 99,99±9,02 sirt2/beta-aktin 123,92±17,4 sirt2/beta-aktin, 88,10±3,48 sirt2/beta-aktin, 86,32±8,97 sirt2/beta-aktin, 116,59±11,35 sirt2/beta-aktin, 106,52±13,60 sirt2/beta-aktin; p<0,05).

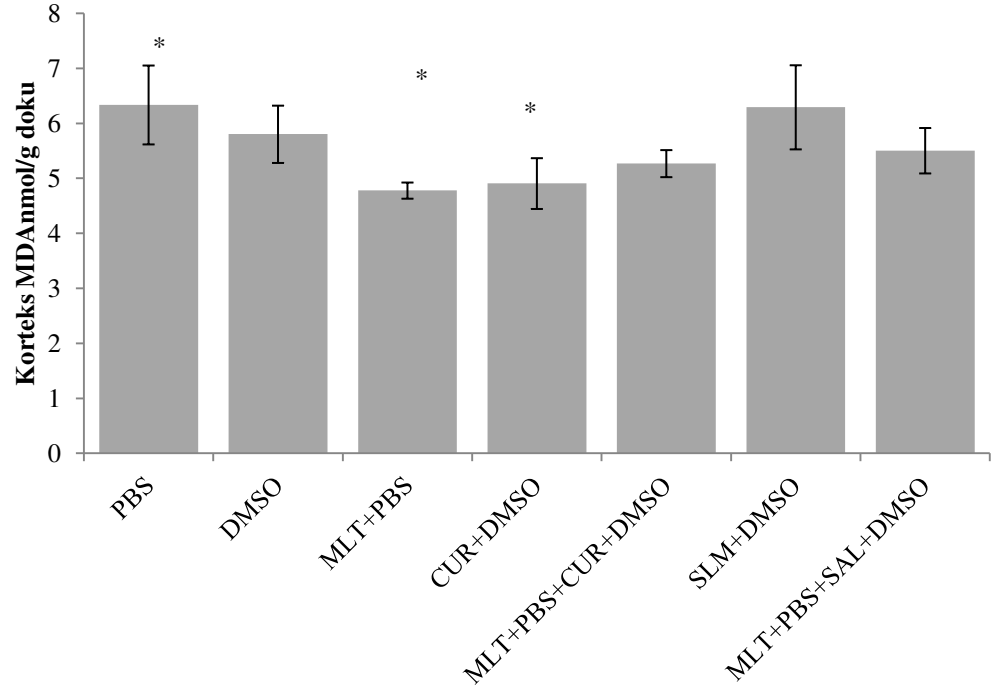


Şekil 16 : Gruplarımızın sirt2 bantları ve beta-aktin bantı

Tablo 3 :Grupların istatistiksel değişimleri (ortalama±SH)

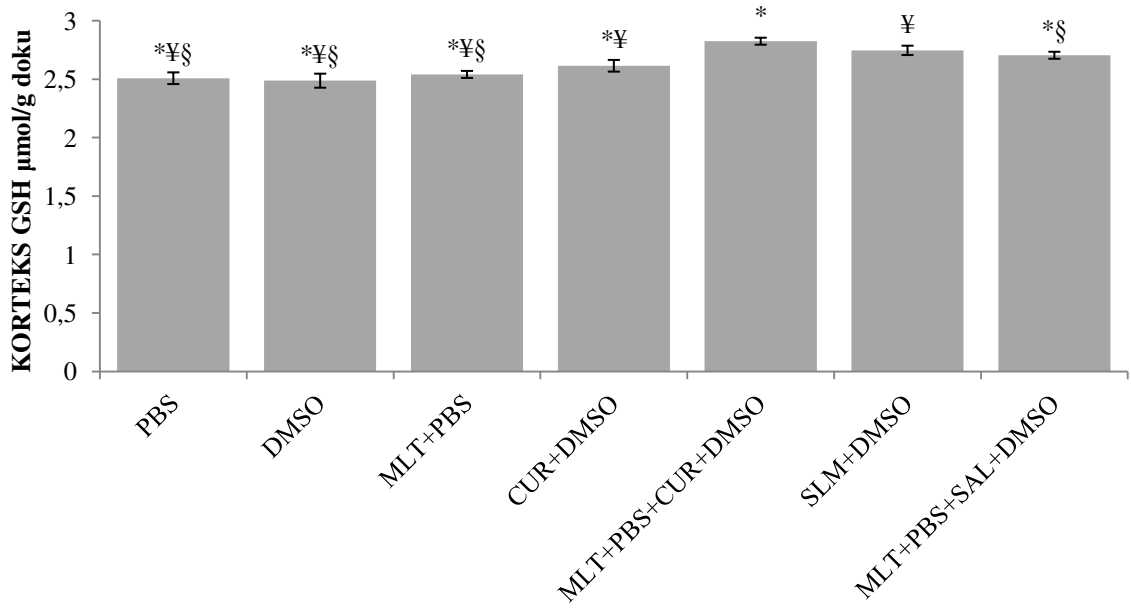
	<i>KONTROL</i>				<i>DENEY</i>		
<i>Parametreler</i>	<i>PBS</i>	<i>DMSO</i>	<i>Melatonin</i>	<i>Curcumin</i>	<i>melatonin+curcumin</i>	<i>Salermid</i>	<i>Salermid+Melatonin</i>
AĞIRLIK	356,5±36,7	347,3±27,3	371,6±22,4	356,1±34,3	362,4±28,2	374,5±32,7	382,6±33,9
MDA (nmol/g)	6,33±0,71 [*]	5,80±0,52	4,77±0,14 [*]	4,90±0,46 [*]	5,39±0,24	6,29±0,76	5,50±0,41
GSH (μmol/gr)	2,53±0,05 ^{*¥§}	2,48±0,06 ^{*¥§}	2,54±0,03 ^{*¥§}	2,61±0,05 ^{*¥}	2,82±0,03 [*]	2,74±0,04 [¥]	2,70±0,03 ^{*§}
NOx (μmol/gr)	24,63±1,66	20,63±0,26 ^{*¥}	23,13±1,74 [*]	25,80±2,15 [¥]	21,86±0,99 [*]	22,75±0,95 [*]	28,20±2,14 [*]
SİRT2/beta aktin	99,99±9,02 [*]	123,92±17,4 ^{*¥}	88,10±3,48 ^{*¥}	228,85±10,41 [*]	86,32±8,97 ^{*¥}	116,59±11,35 [*]	106,52±13,60 [*]

^{+¥§*} *p değeri <0,05*



Grafik1: Gruplar arası korteks dokusu MDA düzeyleri (nmol/g)

Kontrol grubu (PBS); MLT ve CUR grubundan anlamlı olarak yüksek. $p < 0,05$

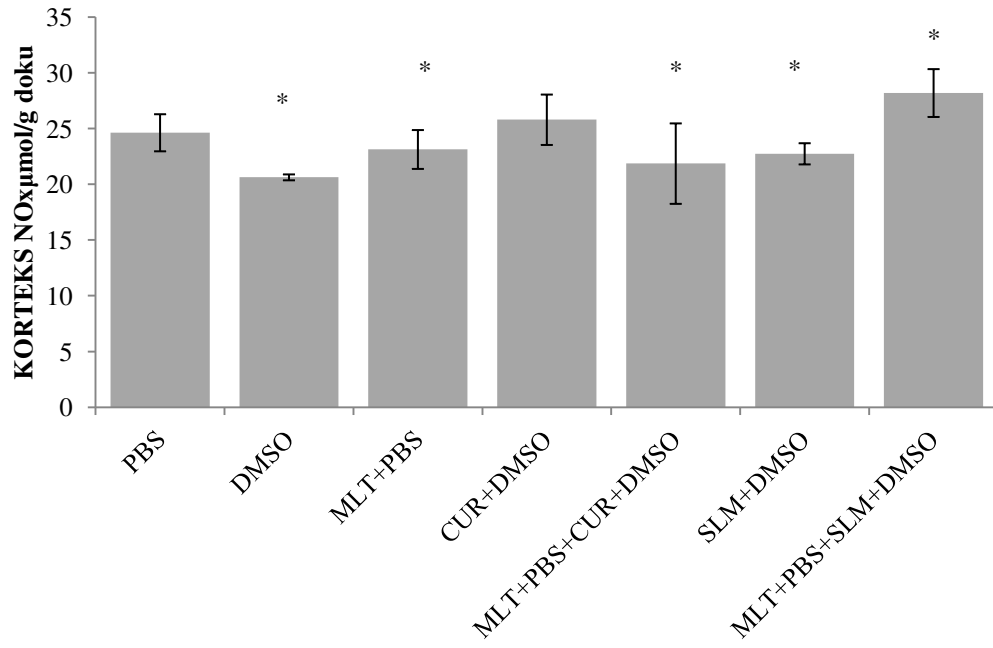


Grafik 2: Gruplar arası korteks doku GSH değişimleri ($\mu\text{mol/g}$)

MLT+CUR grubu; kontrol grubu (PBS, DMSO), MLT, CUR, MLT+SLM gruplarından anlamlı yüksek bulundu. * $p<0,05$

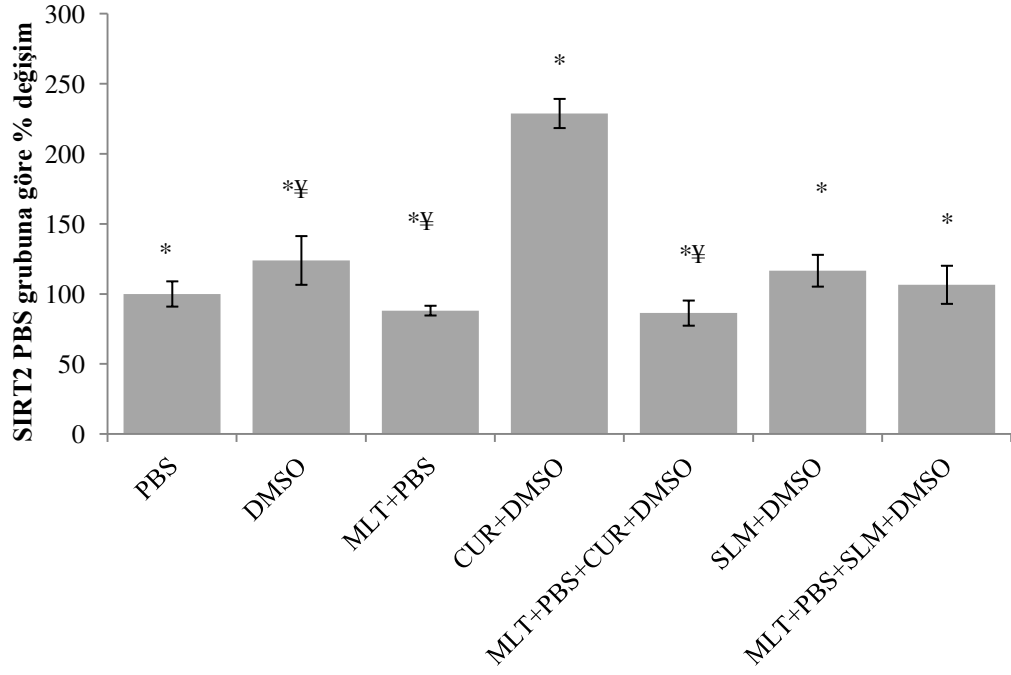
SLM grubu; kontrol grubu (PBS, DMSO), MLT, CUR gruplarından anlamlı yüksek bulundu. ¥ $p<0,05$

MLT+SLM grubu; kontrol grubu (PBS , DMSO) ve MLT grubundan anlamlı yüksek bulundu. § $p<0,05$



Grafik 3: Gruplar arası korteks doku NOx değişimleri (µmol/g)

MLT+SLM grubu; Kontrol grubu (DMSO), MLT, MLT+CUR, SLM gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu * p<0,05



Grafik4: Grupların Sirt2/beta-aktin oranlarının PBS grubuna göre % değişim grafiği

CUR Grubu ; Kontrol grubu (PBS, DMSO), MLT, MLT+CUR, SLM, MLT+SLM gruplarından anlamlı olarak yüksek * p<0,05

Kontrol (DMSO) grubu; MLT ve MLT+CUR gruplarından anlamlı yüksek ¥ p<0,05

5.TARTIŞMA

Biyolojik süreçlerde oksidanlar önemlidir ve ROS üretimi – belli sınırlarda- homeostazisi sağlamada gereklidir. Organizmadaki oksidan stres ile antioksidan kapasite dengesinin oksidan stres lehine bozulması sonucu yaşlanma süreci hızlanmaktadır. Canlılar için serbest radikallerin yararlı ve zararlı etkileri çok hassas bir dengeyi oluşturur; bu denge redoks düzenleyicisi adı verilen sistem tarafından düzenlenir.¹⁶⁵ Redoks düzenleme sistemi oksidatif strese karşı canlıyı korur. Yaşlanmayla mitokondri fonksiyonları da azalmasına paralel olarak antioksidan enzimlerde de bir azalma görülüyor. Antioksidanlardaki bu azalma redoks sisteminin bozulmasına neden olur.¹⁶⁶ ROS üretimi, yaşlanmanın endojen hızını kontrol eden bir parametredir.¹⁶⁷ Yaşlanmaya karşı; her türün, bireyin, organın, dokunun, hücrenin bile farklı cevap verebileceği bildirilmiştir.¹⁶⁸ Yaşlanmanın zararlı etkilerinin en çok gözlemlendiği yer beyin gibi postmitotik dokulardır.

Yaşlanma genellikle serebral korteksi de içine alan beynin bazı bölümlerinde nöron kayıplarıyla karakterizedir.⁶⁶ Normal yaşlanma sırasında, beyin hem morfolojik hem de sinapslar, dentritik dallanmalar, nörotransmitterler, sirkülasyonu ve metabolizması, motor ve duyu sistemleri, uyku, hafıza ve öğrenme, lipofusin birikimi gibi fonksiyonel olarak değişim geçirir. Beyinde meydana gelen bu değişikliklerin moleküler temeli bilinmiyor fakat birçok çalışma ROS ve mitokondriyi sorumlu tutuyor.^{169,170} Hayvanlar ve insanlar üzerine yapılan çalışmalarda serbest radikallerin birikimi, hücresel element ve protein hasarın oluşması yaşlanmanın ana bulgularından biri olduğunu göstermiştir.^{171,172,173} Birçok çalışma, yaşam süresi ile DNA onarım yeteneği, reaktif oksijen

moleküllerinin detoksifikasyonu, strese karşı koyma yeteneği ve yıpranmış hücrelerin yenilenmesi arasında pozitif korelasyon göstermiştir.¹⁷⁴ Aynı zamanda uzun yaşam ve hasar birikim oranı arasında negatif korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar da vardır.^{175,176}

Serbest radikal, süperoksit ve nitrik oksit; büyüme, farklılaşma ve ölüm gibi farklı hücresel fonksiyonlarla ilişkili olan sinyalleme yollarına aracılık eden önemli moleküllerdir. Yaşlanmada nitrik oksit hipotezi serbest radikal teorisiyle bağlantılıdır.¹⁷⁷ Birçok çalışmada, NO üretimindeki bozulmanın, yaşlanmada beyin fonksiyonlarındaki değişimler ve hasarlanma ile birlikte olduğu gösterilmiştir.^{58,178} Yaşlanma ile birlikte insan ve sıçanda çeşitli dokularda NO düzeyinin arttığı bildirilirken^{53,177,179} bazı çalışmalarda sitozolik nitrik oksit düzeyinin yaşlanma ile azaldığı göstermiştir.¹⁸⁰ Yaşlanma ile artan NO dan iNOS sorumlu tutuluyor.¹⁷⁷ Bustamante ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, beyin dokusunda yaşlanma ile görülen NO üretimindeki azalmanın nNOS daki azalmayla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Melatonin birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, güçlü bir radikal süpürücü ve antioksidan özelliğe sahiptir. Bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol glutatyon, vit E,C gibi) daha güçlü serbest radikal süpürücü özelliği vardır. Melatonin, ROS'un özellikle de hidroksil ve peroksid grublarının eliminasyonunu yapar.¹⁸¹ Sağlıklı genç ve yaşlı bireylere melatonin uygulanması; MDA düzeyini azaltmış, SOD düzeyini arttırmıştır. Melatoninin antioksidan etkisinin gençler ile karşılaştırıldığında, yaşlılarda daha fazla olduğu bulunmuştur.¹⁸² Melatonin, iNOS^{96,97} ve nNOS'u^{96,98} down regüle ederek NOx oluşumunu engelleyebilir.

MLT uygulaması yaşı sıçanlarda beyinde olan oksidan hasarı azaltarak antioksidan savunmayı artırır^{181,183,184} ve farelerde¹⁸⁵ oksidatif stresi azaltarak antioksidan sistemi artırır.

Çalışmamızda yaşı sıçanlara MLT uygulaması serebral korteks MDA düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır. Literatürde MLT uygulamasının yaşı sıçanlarda oksidatif stresi azalttığına dair pek çok çalışma mevcuttur ve bulgularımızla uyumludur.

Curcumin de toksik özelliği olmayan antioksidan, serbest radikal süpürücüsü ve antienflamatuar özelliği ile yaşlanmada çalışılan bir polifenoldür.¹⁴³

Kalori kısıtlaması ile mayalardan kemirgenlere ve hatta primatlara kadar geniş aralıktaki organizmalarda hayatta kalma süresini artırdığı gösterilmiştir.^{186,187} Kalori kısıtlamasını taklit eden bileşikler (STACs) sirtüin aktivatörü olarak bilinirler. Curcumin STACs lardan biridir. Curcuminin, demir-bağılantılı lipit peroksidasyonunu¹⁵² reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve demir iyonunun oksidasyonunu¹⁵³ inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca curcuminin beyin üzerine etkileride gösterilmiştir. Curcuminin, beyin homejenatlarında , demir iyonu, ferrik –askorbat ve ferrik-ADP-askorbatla oluşan lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.¹⁵⁷ Curcumin ile beslenen farelerin beyinlerinden alınan mikrosomlarda, Na⁺, K⁺, -ATPaz aktivitesinde artış gözlenmiştir.¹⁵⁸ Curcumin, linoateleri (yağ asiti radikali şekli ve oksitlenebilme yeteneği olan bir poliunsatüre yağ asiti) kullanarak lipit peroksidasyonu inhibe eder. Curcuminin bir diğer aktivitesi, serbest radikalleri temizleme olarak gösterilmiştir. Curcumin, makrofajlarda i NOS aktivitesini down regüle

eder ve bunuda ROS miktarını azaltarak yapar. Mikroglial hücrelerdeki çalışmalarda curcumin tedavisi sonrasında oksidatif stresden sinir hücrelerinin korunması ve NO ürünlerinin azaldığı gösterilmiştir.¹¹ Hayvan modellerindeki çalışmalar; curcuminin nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer hastalığı) faydalı olabileceğini göstermişlerdir.^{188,189}

Literatürde CUR'nin iNOS aktivitesini inhibe ettiği gösterilirken^{140,190} NOS ve e NOS da artışa neden olduğu da gösterilmiştir.¹⁹¹

DMSO, çalışmamızda bir çözücü olarak kullanılmasına rağmen literatürde nöroprotektif özelliğinden de bahsedilmektedir.^{192,193,194}

Çalışmamızda curcuminin tek başına uygulaması serebral korteks MDA düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır. MLT ve CUR radikal süpürücü özellikleri ile yaşlanmada etkilidirler. Birlikte uygulandıklarında serebral korteks MDA düzeyine sinerjistik bir etki göstermemişlerdir.

MLT, CUR ve SLM uygulaması kontrol grubuna göre serebral korteks GSH düzeyini anlamlı olarak artırmıştır. MLT+CUR, SLM ve MLT+SLM uygulaması tek başına MLT uygulaması ile karşılaştırıldığında korteks GSH düzeyini anlamlı olarak artırmıştır. MLT+CUR uygulaması tek başına MLT ya da CUR uygulamasına göre serebral korteks GSH üzerinde daha etkili olmuştur. Tek başlarına MLT ya da CUR uygulamasının GSH düzeyine etkisi önceki çalışmalarla uyumludur.

CUR uygulaması DMSO grubu ile karşılaştırıldığında korteks NO düzeyini artırmıştır. SLM+MLT uygulaması kontrol MLT, MLT+CUR ve SLM uygulamasına göre serebral korteks NO düzeyinde anlamlı artışa yol açmıştır.

Yaşlanma üzerine yapılan son çalışmalarda sirtuin olarak isimlendirilen NAD bağımlı protein deasetilazın, model organizmalarda yaşam süresini uzatabildiği ve kalori kısıtlamasının yaşlanmayı engelleyici etkisine aracılık ettiği gösterilmiştir.¹²² Sirtuinlerin birçok fizyolojik süreçteki rolü araştırılıyor. Son yıllardaki çalışmalar sirtuin ve farklı biyolojik süreçler arasındaki bağlantıyı aydınlatmaya başladı. SIRT1'in DNA hasarı ya da oksidatif streslerle uyarılarak hücresel yaşlanmayı ya da apoptozisi inhibe ederek hücrelerin hayatta kalmasını artırdığı gösterilmiştir.¹⁵

Sirt2 yetişkin beyinde baskın olarak bulunan nöronal bir proteindir. Sirt2 nin etkileri; mayalarda, enerji metabolizması ve yaşam süresinin uzunluğu vertebralılarda, metabolik ve insanda nörolojik hastalıkların tedavisinde gösterilmiştir.^{113,195} Fazla Sirt2 nöronlar için zararlı olabilir.^{196,197} Tersine olan bazı çalışmalarda ise, Sirt2 düzeyindeki azalma p53 seviyesini etkileyerek hücre apoptozisini uyardığı gösterilmiştir.¹⁹⁸ Sirt2 nin farmakolojik inhisyonu ile Parkinson hastalığında¹⁹⁹ huntington hastalığında²⁰⁰ nöroprotektif etki göstermiştir. Hücre kültüründe, Sirt2 aktivasyonu artarak Bid ekspresyonunu uyararak, apoptozise neden olur.²⁰¹

CUR uygulaması DMSO ve MLT, SLM ve MLT+SLM grupları ile karşılaştırıldığında sirt2 nin beta aktine oranını anlamlı olarak artırmıştır.

Çalışmamızda yaşlanmayla sirtuin proteininin, serebral korteks dokusundaki değişimlerini MLT ile yaşlanma üzerine olan etkilerini karşılaştırabilmeyi hedefledik. Sirtuin proteinin aktivitesini küçük moleküllerle değiştirebilmemiz, yaşlanmış sıçanların korteks dokularında sirt2 in inhibitörü salermid ve STACs curcuminin, MDA GSH ve NOx üzerine etkilerini görebilmemizi ve bu etkileri melatoninin etkileri ile karşılaştırmamıza olanak verdi.

Korteks dokusunda, MLT ve CUR alan gruplarda MDA düzeyinin düşük bulunması bize MLT ve CUR'nin lipid peroksidasyon oluşumunu SLM den daha fazla engellediğini düşündürdü. Sirt2 inhibitörü olan SLM antioksidan olarak etkili olmuştur. MLT ve CUR nin antioksidan oluşumuna etkileri aralarında fark oluşturmazken birlikte etkileri anlamlı farklar oluşturdu. Literatürdeki yayınlarda da yaşlanma ile sirt2'nin arttığı gösterilmiştir.¹²⁵ Literatürde sirt2 ile melatoninin oksidan ve antioksidanlar üzerine etkilerinin karşılaştırıldığı bir araştırmayla karşılaşmadık. NOx oluşumu en fazla MLT+SLM alan gruptaydı CUR grubu da kontrol gruplarından daha fazla NOx oluşumu göstermişti. NOx oluşumundaki bu artışları açıklayabilmemiz için NOS izoformlarında araştırılmasına ihtiyacımızın olduğunu görülmüştür.

6.SONUÇ

Sonuç olarak, mevcut çalışmadan elde edilen bulgular, halen yaşlanmayı açıklayan yardımcı teorilerden biri olan serbest radikal teorisini desteklemektedir. Ayrıca yaşlanmayla birlikte fizyolojik olarak melatonin düzeylerinin azaldığı göz önünde bulundurulursa orta yaşlı sıçanlarda melatonin uygulamasının etkili olduğu söylenebilir. Curcumin uygulaması melatonin de olduğu gibi radikal düzeyini azaltmış ve antioksidan savunmayı arttırmıştır. Ancak birlikte uygulandıklarında glutatyon üzerinde göstermiş oldukları anlamlı etkiyi malondialdehid üzerinde göstermemişlerdir.

Yine curcumin uygulaması nitrik oksit ve sirt2 düzeyinde artışa yol açmıştır. Sirt2 inhibitörü olarak uygulanan salermid ise, glutatyon düzeyini artırmıştır. Salermid melatonin ile birlikte uygulandığında glutatyon düzeyindeki etkisi daha belirgindir. Sirt2 üzerinde inhibitör etkisi bulunmadı.

Tüm veriler gözönüne alındığında; salermide ve curcumin melatonin ile birlikte uygulandığında malondialdehid, glutatyon ve sirt2 değerlerine etkileri benzer bulundu.

Elde edilen verilerin mekanizmalarını açıklayabilmek için NO daki artışın hangi NOS dan kaynaklandığı , sirt2 nin ya da diğer sirtuinlerin ekspresyonunun, aktive ve inhibisyonunun araştırılması için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

7.ÖZET

YAŞLANMA SÜRECİNDE BEYİNDE SİRTUİN AKTİVASYONU

SIRTUIN ACTIVATION OF BRAIN DURING AGING PROCESS

Yaşlanma çeşitli dokularda radikal yapımını artırır ve bu artış, nörodejeneratif hastalıklarla birlikte. Yaşlanma sürecinde güçlü bir radikal süpürücü olarak fonksiyon gören melatonin azalır. Curcumin antiproliferatif, antioksidan ve antienflamatuar özelliklere sahiptir.

Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) kofaktörüne ihtiyaç duyan tip III histon deasetilaz enzim (HDAC) ailesi içinde Sirtuin proteini yer alır. Bu ailenin bir üyesi olan sirt2 nin nörodejenerasyonla ilgili olduğu ve Sirt2 inhibitörü olan salermid (SLM) in uygulanmasının nörodejeneratif hastalıklarda olumlu etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur.

Etik kurul onayını takiben Wistar sıçanlar laboratuvar şartları altında 12 saat aydınlık- karanlık siklusunda kontrol (%1 etanol-PBS sc saat 17:00'de, 30 gün süre) melatonin (MLT) grubu (10mg/kg+etanol-PBS sc saat 17:00'de 30 gün süre), dimetilsülfoksit (DMSO 100µl/bw ip, saat 17:00'de, 30gün) Curcumin (CUR) (30mg/kg+DMSO ip saat 17:00'de, 30 gün), SLM (100µmol/1µl+DMSO ip, saat 17:00'de, 30 gün) ve MLT+CUR, MLT+SLM gruplarına ayrıldı. Orta yaşlı (13 aylık n=42) sıçanlarda beyin korteks dokusun da lipid peroksidasyonu ve sirt2 düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

MLT ve CUR uygulaması yaşlı sıçanların kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, serebral korteks MDA düzeylerini anlamlı olarak azalttı (sırasıyla; $4,77 \pm 0,14 \text{ nmol/g doku}$, $4,90 \pm 0,46 \text{ nmol/g doku}$; $6,33 \pm 0,71 \text{ nmol/g doku}$, $5,80 \pm 0,52 \text{ nmol/g doku}$; $p < 0,05$). MLT in tek başına ya da CUR ve SLM, ile uygulaması serebral korteks GSH düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdı. (Sırasıyla; $2,54 \pm 0,03 \mu\text{mol/g doku}$, $2,82 \pm 0,03 \mu\text{mol/g doku}$, $2,70 \pm 0,03 \mu\text{mol/g doku}$; $2,53 \pm 0,05 \mu\text{mol/g doku}$, $2,48 \pm 0,06 \mu\text{mol/g doku}$; $p < 0,05$). CUR ve MLT+SLM uygulaması NO düzeyini kontrol gruba göre anlamlı arttırdı (sırasıyla; $25,80 \pm 2,15 \mu\text{mol/g doku}$, $28,20 \pm 2,14 \mu\text{mol/g doku}$; $20,63 \pm 0,26 \mu\text{mol/g doku}$; $P < 0,05$). MLT+SLM grubunun korteks NO düzeyi MLT, MLT+CUR, SLM gruplarından anlamlı olarak yüksekti. (Sırasıyla; $28,20 \pm 2,14 \mu\text{mol/g doku}$; $23,13 \pm 1,74 \mu\text{mol/g doku}$, $21,86 \pm 0,99 \mu\text{mol/g doku}$, $22,75 \pm 0,95$, $28,20 \pm 2,14 \mu\text{mol/g doku}$; $p < 0,05$). CUR uygulaması diğer gruplar ile karşılaştırıldığında sirt2 düzeyini anlamlı olarak arttırdı. (Sırasıyla, $228,85 \pm 10,41$ sirt2/beta-aktin; $99,99 \pm 9,02$ sirt2/beta-aktin, $123,92 \pm 17,4$ sirt2/beta-aktin, $88,10 \pm 3,48$ sirt2/beta-aktin, $86,32 \pm 8,97$ sirt2/beta-aktin, $116,59 \pm 11,35$ sirt2/beta-aktin, $106,52 \pm 13,60$ sirt2/beta-aktin; $p < 0,05$).

Sonuç olarak yaşlanma ile serebral korteks dokusunda serbest radikallerin arttığı, MLT ve CUR uygulamasının serbest radikal düzeyini azalttığı antioksidan savunmayı arttırdığı, MLT+SLM ve CUR uygulamasının NO ve CUR, sirt2 düzeyini arttırdığı bulundu. Yaşlanmada sirt2 gen ekspresyonunun farklı ajanlar ile modüle edilebileceği ve bu modülasyonun yaşlanma sürecini etkileyebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Yaşlanma, melatonin, sirt2, curcumin, salermide, oksidatif stres, glutatyon, NO

8.SUMMARY

SIRTUIN ACTIVATION OF BRAIN DURING AGING PROCESS.

YAŞLANMA SÜRECİNDE BEYİNDE SIRTUİN AKTİVASYONU

Aging increases the production of radicals in various tissues and this increase goes hand by hand with neurodegenerative diseases. Melatonin, which is a powerful scavenger of radicals, significantly decreases in the aging process. Curcumin has antiproliferative, antioxidant and antiinflammatory features.

Sirtuins are family of NAD-dependent deacetylase (class III histone deacetylase). Several studies indicated that SIRT2 is related to neurodegeneration and treatment of salermide, i.e. an inhibitor of SIRT2, has positive impact on neurodegenerative diseases.

Following approval of the ethical committee, Wistar rats were divided in the groups of control (1% ethanol-PBS, sc at 17:00 for 30 days), Melatonin (MLT) (10mg/kg+ethanol-PBS, sc at 17:00pm for 30 days), dimethylsulfoxide (DMSO 100µl/bw, ip at 17:00pm for 30 days), Curcumin (CUR) (30mg/kg+DMSO, ip at 17:00pm for 30 days), SLM (100µmol/1µl+DMSO, ip at 17:00pm for 30 days), MLT+CUR and MLT+SLM in the laboratory under condition of equal period light and dark, 12 hours of light/12 hours dark cycle. The aim of the present study was to investigate the relation between levels of lipid peroxidation and SIRT2 in cerebral cortex of middle-aged rats (13 months, n=42).

Comparing to the control groups, treatment of MLT and CUR significantly decreased MDA levels in cerebral cortex of the rats ($4,77 \pm 0,14 \text{ nmol/g tissue}$, $4,90 \pm 0,46 \text{ nmol/g tissue}$; $6,33 \pm 0,71 \text{ nmol/g tissue}$, $5,80 \pm 0,52 \text{ nmol/g tissue}$, respectively, $p < 0,05$). Furthermore, treatment of MLT alone and its combination with CUR or SLM significantly increased the level of GSH in cerebral cortex more than the control groups ($2,54 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$, $2,82 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$, $2,70 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$; $2,53 \pm 0,05 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$, $2,48 \pm 0,06 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$, respectively, $p < 0,05$). Treatment of CUR and MLT+SLM increased the level of NO ($25,80 \pm 2,15 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$, $28,20 \pm 2,14 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$; $20,63 \pm 0,26 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$, respectively $p < 0,05$). The level of cortex NO in the group of MLT+SLM was higher than the groups of MLT, MLT+CUR, and SLM ($28,20 \pm 2,14 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$; $23,13 \pm 1,74 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$, $21,86 \pm 0,99 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$, $22,75 \pm 0,9528$, $20 \pm 2,14 \text{ } \mu\text{mol/g tissue}$, respectively, $p < 0,05$). Treatment of CUR significantly increased the level of SIRT2 in compared to the other groups ($228,85 \pm 10,41 \text{ SIRT2/beta-aktin}$; $99,99 \pm 9,02 \text{ SIRT2/beta-aktin}$, $123,92 \pm 17,4 \text{ SIRT2/beta-aktin}$, $88,10 \pm 3,48 \text{ SIRT2/beta-aktin}$, $86,32 \pm 8,97 \text{ SIRT2/beta-aktin}$, $116,59 \pm 11,35 \text{ SIRT2/beta-aktin}$, $106,52 \pm 13,60 \text{ SIRT2/beta-aktin}$, respectively $p < 0,05$).

In sum, it was found that (1) free radicals in cerebral cortex were increased by aging, (2) treatment of MLT and CUR decreased levels of free radicals, and increased antioxidant defense, (3) treatment of MLT+SLM and CUR increased the levels of NO. However, alone CUR increased SIRT2 level. Finally, it was concluded that SIRT gene expression could be modulated by various agents in aging, and this modulation would have impact on the process of aging. **Key words:** Aging, melatonin, sirt2, curcumin, salermide, oxidative stress, glutathion, NO

9. KAYNAKLAR

1. Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C, Oxidative stress and electron spin resonance, Clin Chim Acta 2006; 364 : 61-66.
2. Staroverov VN, Davidson ER, Distribution of effectively unpaired electrons, Chem Phys Lett 2000; 330 : 161-168.
3. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J 2003; 17 : 1195-1214.
4. Evans MD, Cooke MS, Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. Bio Essays 2004; 26 : 533-542.
5. Akkuş İ, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1. Baskı, Konya, Mimoza Yayınları 1995.
6. Floyd AR, Hensley K, Oxidative stress in brain aging Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. Neurobiology of Aging 2002;23: 795-807.
7. Floyd AR, Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 222: 236-245.

8. Hardeland R., Cardinali D.P.,Sirinivasan V.,Warren S.D.,Brown G.M.,Pandi-Perumal S.R.Melatonin - A pleiotropic, orchestrating regular molecule.Progress in Neurobiology 2011; 93: 350-384.
9. Tan DX, Chen LD,Poeggeler B,Manchester LC,Reither RJ.Melatonin:a potent,endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocrine J. 2003;1: 57-60
10. Benot S, Goberna R, Reither RJ, Garsio-Mourino E, Osuna C, Guerrero JM,Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. J Pineal Res 1999;27: 59-64.
11. Wilken R, Veena MS,Wang MB, Srivatsan ES.Curcumin: A review of antü-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. Molecular Cancer, 2011; 10: 1-19.
12. Ataie A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Moghaddam AH, Kazeminejad B,Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent Curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat.Pharm Biochem and Behav, 2010; 96:378-385.
13. Lara E, Mai A,Calvanese V, Altucci L, Lopez-Nieva P, Martinez-Chantar MLve ark.Salermide, a sirtuin inhibitor with a strong canser-specific proapoptotic. Oncogene, 2009; 781-791.
14. Tatar M, Bartke A, ve Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. Science, 2003; 1346-1351.

15. Jung-Hynes B, Reiter JR, Ahmad N, Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. *J Pineal Res*, 2010; January 48(1):9-19.
16. Harman D, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry *J Gerontol*, 1957; 22: 98-300.
17. Srehler BL, *Cell and Aging*; New York, Academic pres, 1977.
18. Di Giuio C, Antosiewicz J, Walski M. Physiological carotid body denervation during aging, *Adv Exp Med Biol*, 2009; 648: 257-263.
19. Queen BL, Tollefsbol TO. Polyphenols and aging, *Curr Aging Sci*. 2010; 3: 34-42.
20. Medvedev ZA, An attempt at a rational classification of theories of aging, *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1990; 375-398.
21. Weinert BT, Timiras PS, *Physiology of Aging Invited Review; Theories of aging*. *J Appl Physiol*, 2003: 1706-1716.
22. Medawar PB, *An Unsolved Problem in Biology*. London, Lewis, 1952.
23. Arantes-Oliveira N, Apfeld J, Dilin A, Kenyon C. Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2002; 295: 502-505.

24. Pletcher SD, Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*, *Curr Biol*, 2002;712-723.
25. Ljubuncic P, Reznick AZ, The evolutionary theories of aging revisited- a mini- review, *Gerontology*, 2009; 55: 205-216.
26. Hayflick L, Anti-Aging is an oxymoron, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2004: 573-578.
27. Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari MC, The aging process and potential interventions to extend life expectancy, *Clin Inter Aging* 2007:401-412.
28. Jazwinski SM, Aging and longevity genes, *Science*, 2000;47:269-279.
29. George AJ, Ritter MA. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today*, 1996; 17: 267-272.
30. Richter C, Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett*, 1988; 241: 1-5.
31. Kenneth BB, Ames BN, The free radical theory of aging matures, *Physiol Review* 2011;547-581.
32. Staroverov VN, Davidson ER, Distribution of effectively unpaired electrons. *Chem Phys Lett*, 2000; 330:161-168.

33. Aruoma O, Kaur H, Halliwell B, Oxygen free radicals and human diseases, J Roy Soc Health, 1991; 172-177.
34. Mehlhorn RJ, Oxidants and Antioxidants in Aging. Timiras, PSPhysiological Basis of Aging and Geriatrics, 3th edition. Florida, CRC Press Florida, 2003.
35. Gutteridge JMC, Rowley DA, Griffiths E, Halliwell B, Low molecular weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis, Clin Sci, 1985; 68: 460-467.
36. Furchgott RF, Zawadzki JV, The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, Nature 1980; 288: 373-376.
37. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S, Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 1987;327: 527-526.
38. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA, Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite; implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87 : 1620-1624.
39. Star RA,Nitric oxide.Am J Med Sci,1993;306:348-358.

40. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A, Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Reviews* 1991; 43(9):109-137.
41. Özkan M, Yüksekol İ, Nitrik Oksit ve Akciğerler *Toraks Dergisi* 2003;4(1): 88-94.
42. Bloch KD, Wolfram JR, Brown DM, Roberts JDJ, Zapol DG, Lepore JJ, Filippov G, Thomas JE, Jacob HJ, Bloch DB, Three members of the nitric oxide synthase II gene family colocalize to human chromosome 17, *Genomic*, 1995;27:526-530.
43. Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC, Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int*, 1994; 46:653-665.
44. Busse R, Fleming I, Schini VB, Nitric oxide formation in the vascular Wall: regulation and functional implications. *Curr Top Microbial Immunol*, 1995;196:7-18.
45. Nathan C, Xie QW, Nitric oxide synthases: roles, tolls, controls. *Cell* 1994; 78: 915-918.
46. Marletta MA, Approaches toward selective inhibition of nitric oxide synthase. *J Med Chem* 1994; 37 : 1899-907.

47. Nussler AK, Billiar TR, Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54 (2) : 171-178.
48. Dawson TM, Snyder SH, Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci*, 1994;14: 5147-5159.
49. Meldrum B, Garthwaite J, Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, 1990;11:379-387.
50. Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD, Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89: 9715-9719.
51. Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE, Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide, *J Immunol*, 1993;151: 2132-2141.
52. Aust AE, Eveleigh JF, Mechanisms of DNA oxidation. *PSEBM*, 1999; 222: 246-252.
53. Yılmaz E, Yılmaz S, Karakurt L, Serin E, Osteoartritde nitrik oksit ve malondialdehid düzeyleri, *J of Artroplasty & Arthoscopic Surgery*, 2004;15: 7-11.
54. Mccann SM, Licinio J, Wong ML, et al, the nitric oxide hypothesis of brain aging. *Exp Gerontol*, 1997;32:431-440.

55. Radi R, Cassina, A, Hodara R, Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem*, 2002;383:401-409.
56. Beckman JS, Estevez AG, Crow JP, Barbeito L. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends Neurosci*, 2001;24:15-20.
57. Mccann SM, Mastronardi C, De Laurentiis A and Rettori V, The nitric oxide theory of aging, Revisited *Ann NY Acad Sci*, 2005;1057: 64-84.
58. Yamada K, Nabeshima T, Changes in NMDA receptor/nitric oxide signaling pathway in the brain with aging. *Microsc Res Tech*, 1998;43: 68-74.
59. Lui P, Smith PF, Appleton I, Darlington LC, and Bilkey DK, Nitric Oxide Synthase and Arginase in the Rat Hippocampus and the Entorhinal, Perirhinal, Postrhinal, and Temporal Cortices: Regional Variations and Age-Related Changes. *Hippocampus*, 2003; 13: 859-867.
60. Law A, Gauthier S, Quirion R, Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of Alzheimer's type, *Brain Res Rev*, 2001;35: 73-96.
61. Esterbauer H, Free Radicals in Liver Injury. Poli G, Cheeseman KH, Diamani MV, Slatter TF, Lipid peroxidation products; formation, chemical properties and biological activities. Oxford, IRL Press Limited, 1985.

62. Beckman KB., Ames BN. Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutat Res*, 1999; 424: 51-58.
63. Rodriguez-Martinez M, & Ruiz-Torres A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1992;66: 213-222.
64. Savada M, Carlson JC, Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. *Mech Ageing Dev*, 1987; 41: 125-137.
65. Lucas DT, Szweda LL, Cardiac reperfusion injury: Aging, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95: 510-514.
66. Anderton BH, Ageing of the brain. *Mech Ageing Dev*, 2002;123: 811-817.
67. Akbulut KG, Gönül B, Akbulut H, Exogenous melatonin decreases age-induced lipid peroxidation in the brain. *Brain Research*, 2008;1238: 31-35.
68. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, et al. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle and heart. *Ann N Y Acad Sci*, 2002;959: 93-107.

69. Orr WC, & Sohal RS, Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*, *Science*, 1994;263: 1128-1130.
70. Guarente L, Mitochondria- a nexxus for aging, calorie restriction and sirtuins? *Cell*, 2008;132: 171-176.
71. Emerit J, Edeas M, Bricaire F, Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2004; 58: 39-46.
72. Brown GC, Borutaite V, Nitric oxidine inhibition of mitokondrial respiration and it's role in cell death. *Free Radic Biol Med*,2002;Dec 33(1): 1440-1450.
73. Lipton SA, Choi Y-B, Pan ZH, et.al, Aredox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of NO and related nitroso-compounds. *Nature*, 1993; 364: 626-632.
74. Feidlander RM, Apoptosis and capases in neurodegenerative disease. *N Engl J Med*, 2003; 348: 1365-1375.
75. Yang MH, Schaich KM, Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Radic Biol Med*,1996; 20: 225-236.

76. Nordberg J, Arner ESJ, Reactive oxygen species, antioxidant and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31: 1287-1312.
77. Masella, R, Benedetto DI, Vari R, Filesi RC & Giovannini, C, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 2005; 16: 577-586.
78. Wu G, Fang YZ, Yang S, et al, Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 2004; Mar, 134(3): 489-492.
79. Pastore A, Federici G, Bertini E & Piemonte F, Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 2003;333: 18-39.
80. Seto NOL, Hayashi S and Tener GM, Overexpression of Cu-Zn Superoxide dismutase in *Drosophila* does not affect life-span. *Nat Aca Sciences*, 1990; 87: 4270-4274.
81. Cardozo-Pelaez F, Brooks JP, Stedeford T, Song S, and Sanchez-Ramos J, DNA damage, repair, and antioxidant system in brain regions: a correlative study. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000; 28(5): 779-785.
82. Lerner AB, Cesa JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori N. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, 1958;80: 2587.

83. Lerner AB, Case JD,Heinzelman RU, Structure of melatonin, J Am Chem Soc, 1959;81: 6084-6085.
84. Reiter RJ, Melatonin:clinical relevance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2003; 17: 273-285.
85. Bubenik GA, Gastrointestinal melatonin:localization,function,and clinical relevance. Dig Dis Sci, 2002;47: 2336-2348.
86. Dubocovich ML, Markowska M, Function MT1 and MT2 melatonin reseptors in mammals. Endocrine, 2005; 27: 101-110.
87. Karasek M, Does melatonin play a role in aging processes? J Phys Pharm, 2007;58: 105-113.
88. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vivo. Free Radical Biol Med, 1996; 21: 307-315.
89. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR.Melatonin-a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects ofthe oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. Ann N Y Acad Sci, 1994; 738: 419-420.
90. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Fuentes-Broto L, Drug-mediated ototoxicity and tinnitus: alleviation with melatonin. J Physiol Pharmacol, 2011; Apr 62(2): 151-157.

91. Reiter RJ, Carneiro RG, Oh S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*, 1997; 29: 363-372.
92. Poeggler B., Tuerman S., Dose A., Schoenke M., Burkhardt S., Hardeland R. Melatonin's unique radical scavenging properties-roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J Pineal Res*, 2002;33: 20-30.
93. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R, Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS J*, 2006;273: 2813-2838.
94. Hardeland R, Coco-Montes A, Poeggeler B. Circadian rhythms, oxidative stress and antioxidative defence mechanisms. *Cronobiol Int*, 2003;20: 921-962.
95. Lin AMY, Ho IT, Melatonin suppresses iron-induced neurodegeneration in rat brain. *Free Rad Med*, 2000; 28: 904-911.
96. Jimenez-Ortega V, Cano P, Cardinali DP, Esquifino AJ, 24-Hour variation in gene expression of redox pathway enzymes in rat hypothalamus effect of melatonin treatment. *Redox Rep*, 2009; 14: 132-138.
97. Tapias V, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Camacho E, Carrion MD, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, Acuna-Castroviejo D, Melatonin and its brain metabolite N-acetyl-5-methoxykynuramine prevent

mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. J Neurosci Res, 2009;87: 3002-3010.

98. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Leon J, Carazo A, Khaldy H, Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. Adv Exp Med Biol, 2003;527: 549-557.
99. Prada C, Udin S.B. Melatonin decreases calcium levels in retinotectal axons of xenopus laevis by indirect activation of group III metabotropic glutamate receptors. Brain Res, 2005;1053: 67-76.
100. Pappola MA, Sos M, Omar RA, et. al, Melatonin prevents death of neuroblastoma exposed to the Alzheimer amyloid peptide. J Neurosci, 1997; 17: 1683-1690.
101. Pappolla MA, Chyan Y-J, Bozner P Dual antiamyloidogenic and anti-oxidant properties of melatonin: a new therapy for Alzheimer's disease? Swaab DF, Alzheimer's Disease and Related Disorders. Toronto, John Wiley & Sons, 1999.
102. Bubenik GA, Konturek SJ, Melatonin and aging: prospects for human treatment. J Phys Pharm, 2011;62 1: 13-19.
103. Bergiannaki JD, Soldatos CR, Paparrigopoulos TJ, Syrengelas M, Stefanis CN, Low and high melatonin excretors among healthy individuals. J Pineal Res, 1995;75: 367-369.

104. Selmaui B, Touitou Y, Reproducibility of circadian rhythm of cortisol and melatonin in healthy subject: a study of three different cycles over six weeks. *Life Sci*, 2003;73: 3339-3349.
105. Bondy SC, Li H, Zhou J, Wu M, Bailey JA, Lahiri DK. Melatonin alters age-related changes in transcription faktors and kinase activation. *Neurochem Res*, 2010;35: 2035-2042.
106. Baydas G, Tuzcu M, Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Experimental Neurology*, 2005; 194:175-181.
107. Reither RJ, The melatonin rhythm: both a clock and a calender. *Experientia*, 1993; 49: 654-1664.
108. Touitou Y, Bogdan A, Haus E, Touitou C, Modification of circadian and circannual rhythms with aging. *Exp Gerontol*, 1997; 32: 603-661.
109. Stokkan KA, Reither RJ, Neonaka KO, Lerchl A, Yu BP, Vaughan MK, Food restriction retards aging of the pineal gland. *Brain Res*, 1991; 545: 66-72.
110. Henden T, Stokkan KA, Reiter RJ, Nonaka KO, Lerchl A, Age-associated reduction in pineal beta-adrenergic receptor density is prevented by life- long food restriction in rats. *Biol Signals*, 1992; 1: 34-39.

111. Tajés M, Gutierrez-Cuesta J, Ortuna-Sahagun D, Camins A, Pallas M. Antiaging properties of melatonin in an in vitro murine senescence model: involvement of the sirtuin 1 pathway. *J Pineal Res*, 2009; 47: 228-237.
112. Guarante L, Partridge L, Wallace DC, Molecular biology of aging. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.
113. Michan S, Sinclair D. Sirtuin in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 2007 15;404(1): 1-13.
114. Frye RA, Characterization of human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir 2-like proteins (sirtuin) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 260: 273-279.
115. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT protein. *Mol Biol Cell*, 2005; 16: 4623-4635.
116. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir 2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*, 2003; 11: 437-444.
117. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis HM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*, 2006; 126: 941-954.

118. Sanders BD, Jackson B, Marmorstein R. Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochim Biophys Acta*, 2010; 1804(8): 1604-1616.
119. Bellizzi D, Dato S, Cavalcante P, Covello G, Di Cianni F, Passarino G, Rose G, De Benedictis G. Characterization of a bidirectional promoter shared between two human genes related to aging: SIRT3 and PSMD13. *Genomics*, 2007; 89: 143-150.
120. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*, 2007; 282: 33583-33592.
121. Shoba B, Lwin ZM, Ling LS, Bay BH, Yip GW, Kumar SD, The function of sirtuins in biological tissues. *The anatomical record*, 2009; 292: 536-543.
122. Guarente L, Sirtuin, aging, medicine. *N Engl J Med*, 2011; 364: 2235-2244.
123. Quintas A, de Solis AJ, Diez-Guerra EL, Carrascosa JM, Bogonez E, Age associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus: prevention by late onset caloric restriction. *Exp Gerontol*, 2012; Feb, 47(29): 198-201.
124. Nie H, Chen H, Han J, Hong Y, Ma Y, Xia W, Ying W, Silencing of SIRT2 induces cell death and a decrease in the intracellular ATP level

of PC 12 cells. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2011; 3(1): 65-70.

125. Maxwell MM, Tomkinson EM, Nobles J, Wizeman JW, Amore AM, Quinti L, Chopra V, Hersch SM, and Kazansev AG, The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Human Molecular Genetics*, 2011; 20(20): 3986-3996.
126. Gan L, Mucke L, Paths of convergence: sirtuin in aging and neurodegeneration. *Neuron*, 2008; Apr 10;58(1): 10-14.
127. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R, Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One*, 2011; Apr 26;6(4): 190-194.
128. Dillin A, Kelly JW, The ying-yang of sirtuins. *Science*, 2007; Jul 27; 317(5837): 461-462.
129. Gutierrez-Cuesta J, Sureda FX, Romeu M, Canudas AM, Cabellero B, Coto-Montes A, Camins A, Pallas M. Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8. *J Pineal Res*, 2007; 42: 394-402.
130. Chang HM, Wu UI, Lan CT, Melatonin preserves longevity protein (sirtuin 1) expression in the hippocampus of total sleep-deprived rats. *J Pineal Res*, 2009; 47: 211-220.

131. Kwon KJ, Kim HJ, Shin CY, Han SH, Melatonin potentiates the neuroproperties of resveratrol against beta amyloid induced neurodegeneration by modulating AMP- activated protein kinase pathways. *J Clin Neurol*, 2010; 6: 127-137.
132. Pandithage R, Lilischkis R, Harting K, Wolf A, Jedamzik B, Lu scher-Firzlaff J, Vervoorts J, Lasonder E, Kremmer E, Knoll B B, The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependentkinases affects cell motility. *J Cell Biol*, 2008; 915-929.
133. Li W, Zhang B, Tang J, Cao Q, Wu Y, Wu C, Guo J, Ling EA, Liang F. Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silentinformation regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating alpha-tubulin, *J Neurosci*, 2007; 27:2606-2616.
134. Southwood CM, Peppi M, Dryden S, Tainsy MA, Gow A. Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in nervous system. *Neurochem Res*, 2007; 32:187-195.
135. Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG. Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci*, 2007; 27: 7717-7730.
136. Wang H, Qiang L, Farmer SR. Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21

that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol Cell Biol*, 2008; 28:188–200.

137. Jing E, Gesta S, Kahn CR. SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FOXO 1 acetylation/deacetylation. *Cell Metab*, 2007; 6: 105-114.
138. Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, Hoffman E, Veech RL, Sartorelli V. Sir regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* 2003;12: 51-62.
139. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG and et.al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 2003; 425: 191-196.
140. Ramassamy C, Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* 2006; 545: 51-64.
141. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. *Angew Chem Int Ed*, 2011; 50: 586-621.
142. Perron NR, Brumaghim JL. Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*, 2009; 53: 75-100.

143. Mattson MP, Son TG, and Camandol S, Viewpoint: Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Neurohormetic Phytochemicals. Dose Response, 2007; 5(3): 174-186.
144. Büttemeyer R, Philip AW, Schlenzka L, Mall JW, Beissenhirtz M, Listat F. Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxidative radicals in the reperfusion injury in vivo. Transplant Proc, 2003; 35: 3116-3120.
145. Suzuki J, Ogawa M, sagesaka YM, Isobe M. Tea catechin attenuate ventricular remodeling and graft arterial disease in murine cardiac allografts. Cardiovasc Res, 2006; 69: 272-279.
146. Townsend PA, Scrabelli TM, Pasini E. Epigallocatechin-3-gallate inhibits STAT-1 activation and protects cardiac myocytes from ischemia/perfusion-induced apoptosis. FASEB J, 2004; 18: 1621-1623.
147. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin biological actions and medicinal applications. Curr Sci, 2004; 87: 44-50.
148. Patil TN, Srinevasan M. Hypocholesteremic effect of curcumin in induced-hypercholesteremic rats. Indian J Exp Biol, 1971; 9: 167-169.
149. Srinivasan M, Effect of curcumin on blood sugar as seen in diabetic subject. Indian J Med Sci, 1972; 26: 269-270.

150. Srimal RC, Dhawan BN. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. J Pharm Pharmacol, 1973; 25: 447-452.
151. Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloylmethane). Indian J Med Res, 1980; 71: 601-608.
152. Reddy A Ch, Lokesh BR. Effect of turmeric rat liver. Food Chem Toxicol, 1996; 32: 279-283.
153. Reddy A Ch, Lokesh BR. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and oxidation of ferrous ions. Mol Cell Biochem, 1994; 137: 1-8.
154. Piper JT, Singhal SS, Salameh MS, Torman RT, Awasthi YC, Awasthi S. Mechanism of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzyme in rat liver. Int J Biochem Cell Biol, 1998; 30:445-456.
155. Surh YJ, Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. Mutat Res, 1999; 428: 305-327.
156. Watanabe S, Fukui T. Suppressive effect of curcumin on trichloroethane-induced oxidative stress. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2000; 46: 230-234.

157. Rajakumar DV, Rao MN. Antioxidant properties of dehydrozingerone and curcumin in rat brain homogenates. *Mol Cell Biochem*, 1994; 140: 73-79.
158. Raykrishnan V, Vishwanathan P, Rajasekharan KN, Menon VP. Neuroprotective role of curcumin from *curcuma longa* on ethanol-induced brain damage. *Phytother Res*, 1999; 13: 371-574.
159. Fautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Herris-White ME, Cole GM. Phenolic anti-inflammatory anti-oxidant reversal of a beta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol Aging*, 2001; 22: 993-1005.
160. Casini A, Ferrali M, Pompelam A, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol*, 1986; 123: 520-530.
161. Taskiran D, Kutay FZ, Sozmen E, Pogun S. Sex difference in nitrite/nitrate levels and antioxidant defense in rat brain. *Neuro Report* 1997;8: 881-4.
162. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. Nitric Oxide. *Biol and Chem*, 2001;5(1): 62-71.
163. Aykac G, Uysal M, Yalçın AS, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology*, 1985 36: 71-76.

164. Bradford MM, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976 72: 248-254.
165. Droge W, Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002;82: 47-95.
166. Dorszewska JZ, Adamczewska-Gorczewicz Z, Oxidative damage to DNA, P53 gene expression and P53 protein level in the process of aging in rat brain. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2004; 134:227-236.
167. Barja G, Free radicals and aging, *Trends in neurosciences*, 2004; 27 (10): 595-600.
168. Amrani M, Goodwin AT, Gray CC and Yacoub MH, Ageing is associated with reduced basal and stimulated release of nitric oxide by the coronary endothelium. *Acta Physiol Scand*, 1996; 157: 79-84.
169. Timiras PS, *Physiological Basis of Aging and Geriatrics*, CRC press, 2003.
170. Harman D, Free radical theory of aging: increasing the average life expectancy at birth and the maximum life span. *J Anti-aging Med*, 1999; 2: 199-208.
171. Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM, Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its

modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron, Proc Natl Acad Sci USA, 1997;94: 674-678.

172. Cini M, Moretti A, Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging*, 1995; 16: 53-57.
173. Agarwal S, Sohal RS, Relationship between aging and susceptibility to protein oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993;194: 1203-1206.
174. Rattan SIS, Clarck BFC, Understanding and modulating ageing. *IUBMB Life*,2005; 57: 297-304.
175. Kirkwood TBL, Time of Our Lives.London, Weidenfield & Nicolson,1999.
176. Holiday R, Understanding Ageing, Cambrige, UK, Cambrige University Press, 1995.
177. McCann SM, Licinio J, Wong ML, Yu WH, Karanth S, Rettori V, Nitric oxide hypothesis of aging, *Exp Gerontol*, 1998; 33: 813-826.
178. Calabrese V, Bates TE, Stella AM, NO synthase and NO- dependent signal pathways in the brain aging and neurodegenerative disorders: the rol of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res*, 2000; 25: 1315-1341.

179. Tresquerres JA, Kireev R, Tresquerres AF, Borrás C, Vara E, Ariznavarreta C, Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008; 108(3-5): 318-326.
180. Bustamante J, Czerniczyniec A, Cymeryng C, Lores-Arnaiz S, Age related changes from youth to adulthood in rat brain cortex: Nitric oxide synthase and mitochondrial respiratory function. *Neurochem Res*, 2008; 33: 1216-1223.
181. Reither RJ, Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol*, 1998; 56: 359-384.
182. Kornatowska KK, Golec K, Czurczajko J, Lumen KM, Pawluk H, Motyl J, Karasek M, Kedziora J, Effect of melatonin on the oxidative stress in erythrocytes of healthy young and elderly subjects. *J Pineal Res*, 2007; 42(2): 153-158.
183. Bondy SC, Lahiri DK, Perreau VM, Sharman KZ, Campbell A, Zhou J, Sharman EH, Retardation of brain aging by chronic treatment with melatonin, *Ann N Y Acad Sci*, 2004; Dec 1035: 197-215.
184. Bondy SC, Sharman EH, Melatonin and the aging brain, *Neurochem Int*, 2007; Mar 50(4): 571-580.
185. Sharman EH, Vaziri ND, Ni Z, Sharman KG, Bondy SC, Reversal of biochemical and behavioral parameters of aging by melatonin and acetyl L-carnitine. *Brain Res*, 2002; Dec 13; 957(2): 223-230.

186. Guarente L, Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*, 2006; 444: 868-874.
187. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB et. al., Calori restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 2009; 325: 201-204.
188. Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM, The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci*, 2001; 21: 8370-8377.
189. Begum AN, Jone MR, Lim GB, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Huspeth B et al., Curcumine structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008; 326: 196-208.
190. Zheng M, Ekmekçioğlu S, Walch ET, Tang CH, Grimm EA, Inhibition of nuclear factor-kappaB and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells. *Melanoma Res*, 2004; June 14(3): 165-171.
191. Abdel Aziz MT, Motawi T, Rezg A, Mostafa T, Fouad HH, Ahmed HH, Rashed L, Sabry D, Senbel A, Al-Malki A, El-Shafiey, Effects of a water-soluble curcumin protein conjugate vs. pure curcumin in a diabetic model model of erectile dysfunction. *J Sex Med*, 2012; Apr 30.

192. Di Giorgio AM, Hou Y, Zhao X, Zhang B, Lyeth BG, Russel MJ, Dimethyl sulfoxide provides neuroprotection in a traumatic brain injury model. *Restor Neurol Science*,2008; 26(6): 501-507.
193. Shimizua S, Simona RP, Graham HS, Dimethylsulfoxide (DMSO) treatment reduces infarction volume after permanent focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Letters*,1997; Dec 15;239, 2-3.
194. Bardutzky J, Meng X, Bouley J, Duong TQ, Raton R, Fisher M, Effects of intravenous dimethyl sulfoxide on ischemia evolution in a rat permanent occlusion model. *Journal of Cerebral Blood Flow &Metabolism*, 2005; March 125-127.
195. Harting K., Knöll B. SIRT2- mediated protein deacetylation: An emerging key regulator in brain physiology and pathology. *Europ J Cell Bio*, 2010; 89: 262-269.
196. PfisterJA, Ma C, Morrison, BE and D'Mello SR. Opposing effects of sirtuins on neuronal survival: SIRT1-mediated neuroprotection is independent of its deacetylase activity. *PLoS One*, 2008; 3: e4090.
197. Suzuki K, Koike T. Mammalian Sir 2-related protein (SIRT) 2-mediated modulation of resistance to axonal degeneration in slow Wallerian degeneration mice: a crucial role of tubulin deacetylation. *Neuroscience*, 2007; 147: 599- 612.
198. Li Y, Matsumori H, Nakayama Y, Osaki M, Kojima H, Kurimasa A, Ito H, Mori S,Katoh M, Oshimura M and Inoue T, Sirt2 down regulation in

HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis. *Genes Cells*, 2011; 16: 34-45.

199. Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn, K.E., Amore A.M., Volk, C.B., Maxwell, M.M., Rochet, J.C., McLean, P.J. et al. Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease, *Science*, 2007; 317: 516-519.
200. Luthi-Carter R, Taylor DM, Pallos J, Lambert E, Amore A, Parker A, Moffitt H, Smith DL, Runne H, Gokce O. et al. SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010;107: 7927-7932.
201. Wang F, Nguyen M, Qin FX, and Tong Q, Sirt 2 deacetylase FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell*, 2007; 6: 505-514.

10. EKLER



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/
KONU :

Sayın

Prof.Dr.K.Gonca AKBULUT
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

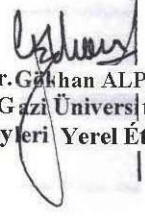
Araştırmacı grubu K.Gonca AKBULUT, Çiğdem YAZICI MUTLU, Arzu KESKİN AKTAN ve Hakan AKBULUT 'tan oluşan, G.Ü.ET-11.056 kod numaralı ve "*Yaşlanma Sürecinde Beyinde Sirtuin Aktivitesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş, ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.056 and entitled "*Sirtuin Expression of Brain During Aging Process*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK: 1 Liste


Prof.Dr. Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: : Çiğdem

Soyadı: : Yazıcı Mutlu

Doğum Yeri ve Tarihi : 07.01.1972

Eğitimi:

Bilim Uzmanlığı: 1999, Hacettepe Üniversitesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Y.O. Ankara

Lisans: 1994, Hacettepe Üniversitesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Y.O. Ankara

Yabancı Dil: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Türkiye Fizyoterapistler Derneği, Türkiye Osteopatlar Derneği

Bilimsel Etkinlikleri:

Mutlu Ç. Diz ekleminde osteoartriti olan hastaların kas kuvveti ve fonksiyonel kapasitelerinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 1999.

12. TEŞEKKÜR

Fizyoloji eğitimim süresince bana her konuda göstermiş olduğu sonsuz sabır ve desteğinden ötürü danışmanım Prof. Dr. Gonca Akbulut'a, ve eğitimime katkı sağlayan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aydan Babül ve değerli hocalarım Prof. Dr. Deniz Erbaş, Prof. Dr. Lamia Pınar, Prof. Dr. Sibel Dinçer ve Prof. Dr. Çiğdem Özer'e şükranlarımı sunarım. Çalışmam sırasında bana öğrettikleri ve çalışmamın her aşamasındaki yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Prof. Dr. Hakan Abulut'a teşekkür ederim. Görüntülemeledeki katkılarından dolayı Dr. Tuğra Tacal'a, her sıkıştığım da yardımına koşan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı Yrd. Doç. Sevin Güney'e ayrıca Dr. Timuçin Aktan ve birlikte yüksek lisans yaptığım arkadaşım Arzu Keskin Aktan'a bana verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana sabır ve destek gösteren eşim M. Emin Mutlu ve kızım Selin Mutlu'ya da teşekkür ederim.

