



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

**DOKTORA
TEZİ**

**YAŞLANMA SÜRECİNDE AGK-2 UYGULAMASININ
APOPTOZ VE OKSİDATİF STRESE ETKİSİ**

SAİDE MURATOĞLU

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2020



**YAŞLANMA SÜRECİNDE AGK-2 UYGULAMASININ APOPTOZ VE
OKSİDATİF STRESE ETKİSİ**

Saide MURATOĞLU

**DOKTORA TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2020

Saide MURATOĞLU tarafından hazırlanan “YAŞLANMA SÜRECİNDE AGK-2 UYGULAMASININ APOPTOZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT
Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi



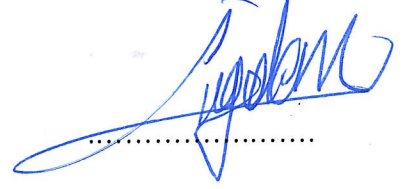
Başkan: Prof. Dr. Sami AYDOĞAN
Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek İhtisas Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



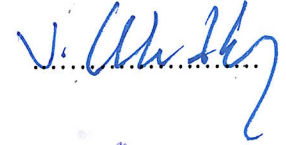
Üye: Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK
Fizyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



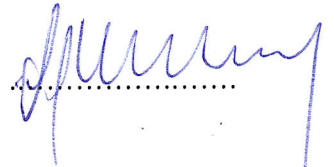
Üye: Prof. Dr. Çiğdem Özer
Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Doç. Dr. Murat Timur BUDAK
Fizyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Doç. Dr. Şevin GÜNEY
Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 21/02/2020

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

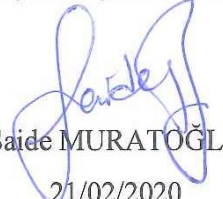
Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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


Saide MURATOĞLU
21/02/2020

YAŞLANMA SÜRECİNDE PANKREAS DOKUSUNDA AGK-2 UYGULAMASININ APOPTOZA VE OKSİDATİF STRESE ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Saide MURATOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2020

ÖZET

Yaşlanma tüm canlılar için evrensel zamana bağlı, fonksiyon kaybı ile giden süreç olarak tanımlanır. Yaşa bağlı vücutta pek çok fonksiyon değişimi olmakta, pankreas dokusu da salgı ve hacim kaybı ile yaşlanma sürecinden etkilenmektedir. SIRT2 uzun yaşam proteinleri olarak adlandırılan sirtuin ailesinin bir üyesidir. Bu çalışmada amacımız, spesifik SIRT2 inhibitörü olan AGK-2 uygulamasının, pankreas dokusunda yaşlanma sürecini açıklamada popüler teorilerden olan programlı hücre ölümü ve oksidatif stres belirteçleri ile ilişkisini araştırmaktır. Çalışmamızda toplam 24 adet Wistar albino cinsi sıçan kullanılarak genç (3 aylık, n=12) / yaşlı (22 aylık, n=12) deney ve kontrol grupları oluşturuldu. Deney gruplarına AGK-2 (10µM/bw), kontrol gruplarına ise aynı hacimde (%4 DMSO+PBS) uygulaması 30 gün boyunca yapıldı. Uygulama sonunda tüm sıçanların pankreas dokuları çıkarıldı ve çalışılncaya kadar -80 °C’de derin dondurucuda saklandı. Pankreas dokusunda total oksidan durum (TOS), total antioksidan durum (TAS) ve bu parametrelerin oranlanması ile oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı. SIRT2 protein ekspresyonu hem sandviç ELISA hem de Western Blot yöntemi ile çalışıldı. Kaspaz-3 enzim aktivitesi ise sandviç ELISA yöntemi ile çalışıldı. İstatiksel değerlendirme için ANOVA, LSD ve Pearson r’si kullanıldı. İstatiksel anlamlılık için p<0,05 olarak kabul edildi. Bulgularımız pankreas dokusunda yaşlanmanın TOS düzeyini, kaspa-3 ve SIRT2 protein ekspresyonlarını arttırdığını, NOx düzeyinin ise kontrolden farksız olduğunu gösterdi. AGK-2 uygulamasının yaşlı sıçanlarda daha etkili olduğu, yaşlanma ile artış sergileyen TOS, kaspa-3 ve SIRT2 protein düzeylerini azalttığı, TAS düzeyini ise yaşlı kontrole göre arttırdığı izlendi (p<0,05). Bulgularımız, AGK-2 uygulaması pankreas dokusunda, yaşlanmada artan oksidan stres ve apoptozu geriye döndürdüğünü göstermiştir. Artan antioksidan savunma düzeyi yaşı bağı pankreas dokusunda koruyucu etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 1023

Anahtar Kelimeler : Yaşlanma, AGK-2, Sirtuin-2, Oksidatif Stres, Apoptoz

Sayfa Sayısı : 89

Danışman : Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT

EFFECT OF AGK-2 ADMINISTRATION ON APOPTOSIS AND OXIDATIVE STRESS IN PANCREATIC TISSUE DURING AGING PROCESS

(Ph. D. Thesis)

Saide MURATOĞLU

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2020

ABSTRACT

Aging is defined as the universal time-dependent process with loss of function for all living organisms. Like many age-related changes in the body, the pancreatic secretion and tissue mass are also affected by the aging process. SIRT2 is a member of the sirtuin family called longevity proteins. Our aim in this study is to investigate the relationship between AGK-2, a specific SIRT2 inhibitor, and programmed cell death and oxidative stress markers, which are popular theories for explaining the aging process in pancreatic tissue. In our study, 24 Wistar albino male were used. Young (n=12, 3 months old) / elderly (n = 12, 22 months old) rats were randomly divided into experimental(n=6) and control (n=6) subgroups. AGK-2 (10µM / bw) was applied to the experimental group and the same volume (4% DMSO + PBS) was applied to the control group for 30 days. At the end of the application, the pancreatic tissues of all rats were removed and stored at -80°C until working. Total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) were measured in pancreatic tissue. Oxidative stress index (OSI) was calculated as the ratio at TOS to TAS levels. SIRT2 protein expression was measured by both sandwich ELISA and Western Blot methods. Caspase-3 enzyme activity was evaluated by sandwich ELISA method. ANOVA and Pearson r were used for statistical evaluation. For statistical significance p <0.05 was accepted. Our findings showed that aging increased TOS level, caspase-3 and SIRT2 protein expressions in pancreatic tissue and NOx level was not different from control. It was observed that AGK-2 application was more effective in elderly rats and decreased TOS, caspase-3 and SIRT2 levels, which are increased with aging and increased TAS level compared to elderly control (p <0.05). In the light of these findings, the application of AGK-2 reversed the increased oxidant stress and apoptosis in aging pancreatic tissue. Increasing antioxidant defense level may show protective activity in aging pancreatic tissue.

Science Code : 1023

Key Words : Aging, AGK-2, Sirtuin 2, Oxidative Stres, Apoptosis

Page Number : 89

Advisor : Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bana yol gösteren, değerli fikirlerini, bilgisini ve desteğini esirgemeyen, her durumda ve koşulda yanımda olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu uzun soluklu süreçte bana katmış oldukları emek ve destekleri için bölüm hocalarımdan başta emekli Prof. Dr. Aydan BABÜL'e, Prof. Dr. Lamia PINAR'a ve Prof. Dr. Deniz ERBAŞ'a, Prof. Dr. Sibel DİNÇER'e, Prof. Dr. Çiğdem ÖZER'e ve Doç. Dr. Şevin GÜNEY'e teşekkürlerimi sunarım. Tez izleme komitesi jüri üyelerim Doç. Dr. Şevin GÜNEY ve Doç. Dr. Murat Timur BUDAK hocalarıma değerli katkı, görüş ve destekleri için teşekkür ederim. Tezin deneysel çalışmaları sürecinde yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı hocalarından Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu sürece benim kadar emek veren, her zaman desteklerini hissettiren, motive eden ve yanımda olan başta değerli annem, ailem, eşim ve arkadaşlarıma, hiçbir konuda desteğini ve yardımını esirgemeyen, yol gösteren sevgili arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Arzu KESKİN AKTAN'a, laboratuvar çalışmaları sırasında yardımları için tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamız Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2019-09 proje numarası ile desteklenmiştir. Sağladıkları bu destek için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Yaşlanma.....	5
2.1.1. Yaşlanma teorileri	5
2.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma.....	7
2.2.1. Nitrik oksit, oksidatif stres ve yaşlanma	11
2.3. Programlı Hücre Ölümü: Apoptoz	13
2.3.1. Apoptoz süreci ve kaspazlar	14
2.3.2. Yaşlanma ile oksidatif stres, antioksidan sistem ve apoptoz ilişkisi.....	18
2.4. Sirtuinler.....	19
2.4.1. Genel özellikleri ve fonksiyonları.....	19
2.4.2. Sirtuin-2	23
2.5. Yaşa Bağlı Pankreas Değişiklikleri.....	25
2.5.1. Pankreas dokusunda SIRT2, oksidan stres, antioksidan sistem ve apoptoz ilişkisi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Gereç	31
3.1.1. Deney hayvanları	31

	Sayfa
3.1.2. Kullanılan laboratuvar aletleri ve cihazlar	32
3.1.3. Kullanılan ticari kitler, antikorlar ve kimyevi sarf maddeler	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Dokuda total oksidan durum (TOS) - total antioksidan durum (TAS) tayini.....	33
3.2.2. NOx düzeyinin Griess yöntemi ile tayin edilmesi	36
3.2.3. Kaspaz-3 ve SIRT2 protein ekspresyonunun Sandviç ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile tayin edilmesi	37
3.2.4. SIRT2 protein ekspresyonunun Western-Blotting/SDS-PAGE metodu ile tayini.....	43
3.2.5. Kullanılan istatistiksel yöntem.....	49
4. BULGULAR	51
4.1. TAS, TOS Değeri ve OSI Değişimleri.....	51
4.2. NOx Düzeyinin Gruplardaki Değişimleri	52
4.3. Kaspaz-3 Değişimleri.....	53
4.4. SIRT2 Değişimleri	54
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69
EKLER.....	85
EK-1. Etik Kurul Onayı	86
ÖZGEÇMİŞ	88

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Apoptotik süreçte görev alan belirteçler.....	15
Çizelge 2.2. Sirtuinlerin lokasyon, fonksiyon ve enzimatik aktiviteleri.....	20
Çizelge 3.1. Kontrol ve deney grupları.....	31
Çizelge 3.2. Laboratuvarında kullanılan donanımlar.....	32
Çizelge 3.3. Ticari kitler	32
Çizelge 3.4. Kimyasal sarf malzemeler	33
Çizelge 3.5. Antikorlar ve uygun dilüsyon oranları.....	33
Çizelge 4.1. AGK-2 uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve yaşlı sıçanlarda oksidatif stres, kaspaz-3 ve SIRT2 değerleri ortalama $\pm$ standart hata	55

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. ROS aracılı yaşlanma	7
Şekil 2.2. Farklı reaktif türlerin fizyolojik ve patofizyolojik reaksiyon döngüsü	8
Şekil 2.3. Fizyolojik ve patolojik koşullarda ROS üretimi.....	9
Şekil 2.4. Endojen ve ekzojen antioksidanlar	11
Şekil 2.5. Pankreasta NO bioktivitesini etkileyen faktörler.....	13
Şekil 2.6. Apoptoz süreci: intrinsik ve ekstrinsik yollar	17
Şekil 2.7. Sirtuinlerin redoks homeostazisindeki rolü	21
Şekil 2.8. Sirtuin ailesinin genel fonksiyonları.....	21
Şekil 2. 9. Sirtuinlerin çeşitli hastalıklardaki etkileri.....	23
Şekil 4.1. TAS, TOS, OSI değişimleri.....	51
Şekil 4.2. NOx değişimi.....	53
Şekil 4.3. Kaspaz-3 değişimi	54
Şekil 4.4. SIRT2 değişimleri.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
μl	Mikrolitre
μmol	Mikromol
Cu^2	Bakır
gr	Gram
H_2SO_4	Sülfirik Asit
KCl	Potasyum Klorür
mg	Miligram
mM	Milimol
NaOH	Sodyum Hiroksit
ng	Nanogram
nmol	Nanomol
pg	Pikogram
VaCl₂	Vanadium Klorid
ZnSO₄	Çinko Sülfat Heptahidrat

Kısaltmalar	Açıklamalar
AD	Alzheimer Disease (Alzheimer Hastalığı)
ADP	Adenozin Di-Fosfat
AGK-2	Arabidopsis Guanylate Kinase-2
ALA	Alfa Lipoik Asit
ALI	Akut Karaciğer Hasarı (Acute Liver Injury)
APAF-1	Apoptotik Proteaz Aktivatör-1
APS	Amonyum Per Sülfat
ATP	Adenozin Tri-Fosfat
Bad	Bcl-2 Antagonist of Cell Death
Bak	Bcl-2 Antagonistic Killer
Bax	Bcl-2 Associated X Protein

Kısaltmalar**Açıklamalar**

BCA	Bisknoninik Asit
Bcl-2	B Cell Lymphoma-2 Protein
Bcl-Xl	Bcl-Extra Long
Bcl-Xs	Bcl-Extra Short
BDNF	Brain-Derived Neurotrophik Factor (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör)
Bid	Bcl-2 Interacting Domain Death Agonist
Bik	Bcl-2 Interacting Killer
Bim	Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death
BMAL1	Brain and Muscle ARNT-Like-1
Bmf	Bcl-2 Modifying Factor
Bok	Bcl-2 Related Ovarian Killer
Boo	Bcl-2 Homolog of Ovary
BSA	Bouine Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
CAT	Katalaz
c-GMP	Siklik-Guanozin Monofosfat
Cl⁻	Klorür İyonu
CR	Kalori Kısıtlaması
CVR	Kardiovasküler Risk
DISC	Death-Inducing Signaling Complex (Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi)
Di Su	De İyonize
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DR	Death Reseptor (Ölüm Reseptörü)
eNOS	Endotelyal NOS
FADD	Fas-Associated Death Domain (Fas İle İlişkili Ölüm Alanı)
FasL	Fas Ligand
Fe	Demir
FOXO-1	Forkhead Box Protein-1
FOXO-3a	Forkhead Box Protein-3a
G6P	Glikoz-6-Fosfat
G6PD	Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GLUT-4	Glukoz Transporter-4
GRx	Glutasyon Redüktaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
GSH	Glutasyon
GSH-Px (GPx)	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	Okside Edilmiş Glutasyon
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HD	Huntington Disease (Huntington Hastalığı)
HGU	Hepatic Glukose Uptake (Hepatik Glukoz Alımı)
HRP	Horseradish Peroksidaz
I/R	İskemi/Reperfüzyon
IAP	İnhibitör Apoptoz Proteinleri
IL-1β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
iNOS	İndüklenebilir NOS
İp	İntraperitoneal
JNR	c-Jun NH ₂ Terminal Kinaz
L-Arg	L-Arginin
LPS	Lipopolisakkarit
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK-1	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz Fosfotaz – 1
MDA	Malondialdehit
MnSOD	Manganez Bağımlı SOD
MPO	Miyeloperoksidaz
mRNA	Messenger RNA
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NEDD	N-(1-Naphthyl) Ethylene-Diamine Dihydrochloride
NF-κB	Nükleer Faktör-Kappa B
NH₂	Terminal Kinaz
nNOS	Nöronal NOS
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
NOX	NADPH Oksidaz
Nrf2	Nuklear Faktör Ertroit-2 İlişkili Faktör-2
O.D.	Optical Density
O⁻²	Süperoksit Anyon Radikali
O₂ •	Süperoksit
O⁻²	Süperoksit Anyon Radikali
OH⁻	Hidroksil Radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
PBS	Fosfat Tamponu
PD	Parkinson Disease (Parkinson Hastalığı)
PEPK	Fosfoenolpiruvat Karboksikinaz
PGC1α	Ppär Gamma Koaktivator 1 α
R, RO, ROO •	Lipit Radikalleri
RH	Oksitlenmemiş Lipit
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Azot (Nitrojen) Ürünleri
RONMS	Reaktif Oksijen, Azot ve Metal Ürünleri
ROOH	Lipit Peroksit
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
RS	Reaktif Ürünler
SA	Sulfanilamide
SAMP8	Senescence-Accelerated Mouse Prone-8 (Yaşlanması Hızlandırılmış Fare-8)
SAMR1	Senescence-Accelerated Mouse Resistant-1 (Yaşlanmaya Dirençli Fare-1)
Sc	Subkutan
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SIRT (1-7)	Sirtuin (1-7)
SLM	Salermi
SOD	Süperoksit Dismutaz
T2DM	Tip-2 Diabetes Mellitus
TAA	Thioasetamid
TAS	Total Antioksidan Durum

Kısaltmalar	Açıklamalar
TBS	Tris Baz
TEMED	Tetrametil- Etilendiamin
TG	Tris/ Glisin
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör - α
TOS	Total Oksidan Durum
UV	Ultraviyole Radyasyon
α-Syn	α -Sinüklein



1. GİRİŞ

Yaşlanma; her canlıda görünen, tüm işlevlerde azalmaya neden olan evrensel bir süreçtir. Metabolik, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığın altında yatan önemli bir risk faktörüdür. Yaşlanma sürecinde rol oynayan ve kabul gören teorilerden biri ‘Serbest Radikal Teorisi’dir. Normal hücrel metabolizma sırasında üretilen serbest radikaller deoksiribonükleik asit (DNA), protein ve lipid gibi makromoleküllere saldırarak hasar yaratır ve fizyolojik işleyişi bozarlar. (Davydov, Dobaeva ve Bozhkov, 2004). Antioksidanlar ise, serbest radikallerle reaksiyona girerek onların zararlı etkilerini azaltan maddelerdir. Katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD), vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği antioksidan enzimler arasında yer alırlar (Blokhina, Virolainen ve Fagerstedt, 2003). Yaşlanma ile birlikte antioksidan enzimlerin azalması, hasarların birikmesine zemin hazırlar (Rattan, 2006). Serbest radikal teorisine göre yaşlanma, oksidan ve antioksidan sistemlerdeki dengenin bozulmasıyla oluşan oksidatif stres nedeniyle ortaya çıkar (Cao, Leers-Sucheta ve Azhar, 2004). Doku ve serumda yapılan birçok çalışmada yaşlanma ile oksidan stresin arttığı; antioksidan sistemin ise azaldığı gösterilmiştir (Akbulut, Gönül ve Akbulut, 1999; Akbulut, Akbulut, Akgün ve Gönül, 2012; Aydın, Küçükgergin, Özdemirler-Erata, Koçak-Toker ve Uysal, 2010).

Apoptoz genlerle düzenlenen, organizmada homeostazisi koruyan inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi ölümlerini düzenleyen programlanmış olayların tümüdür. Yaşlanma, apoptotik aktivite artışı ile birlikte seyreder (Tresguerres, Kireev, Forman, Cuesta, Tresguerres ve Vara, 2012; Zhang ve Herman, 2002a). Apoptoz, hücre membran reseptörlerinin apoptotik sürecin başlangıç noktası olarak hareket ettiği ekstrensek yol ve mitokondrinin merkezi bir rol oynadığı intrinsek yol ile düzenlenir. Hem intrinsek hem de ekstrensek yollarda, kaspazların aktivasyonu vazgeçilmez bir rol oynar. Kaspazlar (sistein bağımlı aspartat spesifik proteazlar), 1 ile 14 arasında üyesi olan, substratlarında aspartat kalıntılarına ayırma özelliğine sahip bir proteaz ailesidir. Özellikle kaspaz-3, apoptozda hem intrinsek hem de ekstrensek yolun ortak noktasında devreye giren önemli proteazdır (Zhang, JH., Zhang, Y. ve Herman, 2003). Sıçan karaciğer dokusunda yapılan bir çalışmada kaspaz-3 aktivitesinin yaşlanma ile arttığı ve reaktif oksijen ürünleri (ROS) ile apoptotik ölümü indüklediği bildirilmiştir (Molpeceres ve diğerleri, 2007). Önceki çalışmalarımızda yaşlı sıçan temporal ile frontal kortekslerinde ve midede kaspaz-3

aktivitesinin gençlere göre anlamlı olarak yüksek bulduk (Akbulut, 2012; Akbulut, Güney, Akgün, Aktaş ve Akbulut, 2013). Pankreatik beta hücrelerinde yaşlanmaya bağlı olarak apoptozun (Gunasekaran ve Gannon, 2011), ROS ile oksidatif stresin arttığı ve e-NOS'un down regüle edildiği gösterilmiştir (Kassem ve diğerleri, 2017). Yaşlanma ile artan oksidatif stres dokularda apoptotik sürecin artışına da katkı sağlar.

Nitrik oksit (NO), endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak tanımlanan, hücre ve dokularda birçok fizyolojik sürece katılan haberci bir moleküldür. L-Arjinin'den nitrik oksit sentetaz (NOS) aracılığıyla NO sentezlenir. Dokuda oluşan hasara karşı verilen yanıt olan inflamasyon, vücudun oluşturduğu yerel bir yanıttır. NO, bu inflamatuvar yanıtları modüle etmede kompleks bir role sahiptir. Bu süreçte nitrik oksitin nitrifikasyonu neticesinde oluşan nitrit/nitrat düzeyi özellikle yaşlanma ile birlikte artış gösterir. Bu artış dokular için oksidatif stresin ve apoptotik aktivitenin de tetiklemesine neden olur (Sastre, Pallardo ve Vina, 2000).

Pankreasın beta hücrelerinde, hücresel yaşlanma belirgin olarak gözlenir. Genç beta-hücrelerin proliferatif kapasiteleri yüksektir; yetişkinlerde ise beta-hücre proliferasyonu önemli ölçüde azalır (Perl ve diğerleri, 2010). İlerleyen yaşla beraber pankreasta atrofi, fibrozis, pankreatik salgıda ve fonksiyonlarda azalma belirgindir (Manes ve Malfertheiner, 2003). Yaşlanma, pankreatik beta hücrelerin glukoz uyarımlı insülin sekresyonunda belirgin bir düşüş ile ilişkilidir (De Fronzo, 1984). Böylelikle ilerleyen yaşla korele bir şekilde diyabete yatkınlık, Tip-2 Diabetes Mellitus (T2DM) insidansı ve duyarlılığı da artış gösterir. Sonuçta beta hücre proliferasyonu yaşlanma ile azalırken; apoptoz ve insülin direncinin arttığı görülür (Gunasekaran, 2011).

Uzun yaşam proteinleri olarak adlandırılan sirtuinler, genom stabilitesini ve homeostazisi devam ettirme özelliği ile yaşam süresini arttırabilen, Nikotinamid Adenin Difosfat (NAD) bağlı histon/protein deasetilaz ailesinin üyeleridir. Memelilerde farklı lokalizasyon ve fonksiyon çeşitliliği gösteren 7 sirtuin (SIRT1-7) üyesi bulunur (de Oliveira ve diğerleri, 2017).

Beyin ve perifer dokularda fazlaca araştırılan SIRT1, yaşlanma ile frontal, temporal, oksipital loblarda ve hipokampusta artış gösterdiği (Braidı ve diğerleri, 2015); buna ek olarak SIRT1 aşırı ekspresyonunun serum insülin, kolesterol, adipoz doku hacminin ve

obezitenin indüklediği insülin direncini azalttığı belirtilmiştir (Banks ve diğerleri, 2008; Bordone ve Guarente, 2007). Ayrıca SIRT1'in, pankreas β hücrelerini inflamatuvar strese karşı koruduğu bildirilmiştir (Gines ve diğerleri, 2017). Beyinde bol miktarda eksprese edilen SIRT2'nin; karaciğer, akciğer, böbrek, pankreas gibi periferik organlarda da bulunduğu ve son zamanlarda kanser, diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşlanmanın ileri dönemlerinde oluşan birçok hastalığın önemli düzenleyicileri olduğu üzerinde durulmaktadır. SIRT2, adiposit farklılaşması, yağ asidi oksidasyonu, glukoneojenez ve insülin duyarlılığının yanı sıra inflamatuvar yanıtı içeren metabolik homeostazın korunması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli roller üstlediği literatürde giderek artan makale sayısı ile gözlenmektedir (Gomes, Fleming Outeiro ve Cavadas, 2015).

SIRT2'nin aşırı ekspresyonunun ise GLUT-4 üzerinden glikoz alımını artırdığı (Liu, Yang, Pang, Yu ve Yan, 2018) ve hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirdiği ifade edilmiştir (Dryden, Nahhas, Nowak, Goustin ve Tainsky, 2003). Bulgular fare hepatositlerinde SIRT2 aşırı ekspresyonunun, insülin duyarlılığını artırdığını, ROS üretimi ile mitokondriyal disfonksiyonu azalttığını ve tüm olumsuz mitokondriyal değişiklikleri iyileştirdiği yönündedir. Bu bilgiler ışığında insülin duyarlılığının düzenlenmesinde hepatik SIRT2'nin yeni bir fonksiyona sahip olduğu düşünülmektedir. SIRT2 aktivatörlerinin insülin direncini ve T2DM'nin önlenmesi/tedavisi bakımından yeni fırsatlar sunduğu ifade edilmektedir (Lemos ve diğerleri, 2017). Bu sebeple SIRT2 ile ilgili yapılan çalışmalar çelişkili ve yetersizdir.

Arabidopsis guanylate kinase-2 (AGK-2), spesifik SIRT2 inhibitörüdür. SIRT2 ile yaşlanma çalışmaları sınırlı olmakla birlikte, SIRT2 inhibisyonunun kolon ve beyin dokusunda oksidatif strese karşı koruyucu olduğu ve AGK-2 uygulanan yaşlı sıçanlarda korteks ve hipokampus dokularında SIRT2 düzeyini azalttığı çalışmalarımızda gösterilmiştir (Akbulut, Aktaş ve Akbulut, 2015; Keskin-Aktan, 2018). Ayrıca Alzheimer oluşturulan sıçan astrositlerinde AGK-2, astrosit aktivasyonunu ve pro-inflamatuvar mediatörlerin üretimini de azaltmıştır (Scuderi ve diğerleri, 2014). Beyindeki bu farklı etki, perifer bir dokuda hala tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. AGK-2 ile SIRT2 inhibisyonunun özellikle pankreas dokusundaki etkisi hakkında henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda, AGK-2 uygulamasının yaşlanma sürecinde pankreas dokusunda oksidatif-nitrosatif stres, apoptotik aktivite ve SIRT2 ile

ilişkisinin araştırılması planlandı. Bu alışma yaşlanma sürecinde görülen oksidatif hasar, apoptotik aktivite ile SIRT2, NOx ve kaspaz-3 düzeylerinin belirlenmesi ile literatüre katkı sağlayacak, yaşlanma ile ortaya çıkan oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyon ile beraber pankreas hastalıklarının önlenmesi konusunda yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkartılmasında yardımcı olabilecektir. Böylece bu tez çalışmasının SIRT2'nin periferik bir dokuda etkinliğinin aydınlatılması, yaşlanma ile artan diyabet insidansı ve obezite gibi hastalıklara yeni yaklaşımlar kazandıracağını düşünmekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaşlanma

Tüm canlı organizmalarda ortaya çıkan yaşlanma, organizmanın en küçük yapıtaşı olan hücreden sistemler düzeyine kadar progresif, disfonksiyonlarla karakterize bir süreçtir. Yaşlanma, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde morbidite, mortalite ve sağlık maliyetlerinin büyük kısmını karşılayan kronik hastalıkların çoğu için ana risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (Kirkland, Stout ve Sierra, 2016). Demans, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar ile ateroskleroz, diyabet, osteoartrit gibi kronik hastalıklar, ilerleyen yaşla birlikte daha yaygın hale gelir. Yaşlanma sürecinde birçok etken devreye girerek, hem fizyolojik hem de patolojik hasarlara yol açar ve bu sürece katkı sağlamış olur.

2.1.1. Yaşlanma teorileri

Yaşlanma, doğumla başlayıp olgunlaşma sürecinden sonra ölümle biten, organların giderek yaşa bağlı işlev bozukluğu ya da kaybı ile sonuçlanan bir süreçtir. Yaşlanmada oksidatif stres, mutasyon ve anormal protein birikimi, programlanmış hücre ölümü, hücre zarı anormallikleri, mitokondriyal farklılaşma ve telomer disfonksiyonu gibi hücresel yaşlanmayı etkileyen multifaktoriyel etkiler söz konusudur. Bu bağlamda yaşlanma sürecinde rol oynayan ve etkinliği fazlaca kabul edilen 300'e yakın teori bulunmaktadır. Bu teoriler: iç (kalıtsal) ve dış (stotastik) etkenler olmak üzere iki ana başlık altında değerlendirilmiştir (Weirnet ve Timiras, 2003).

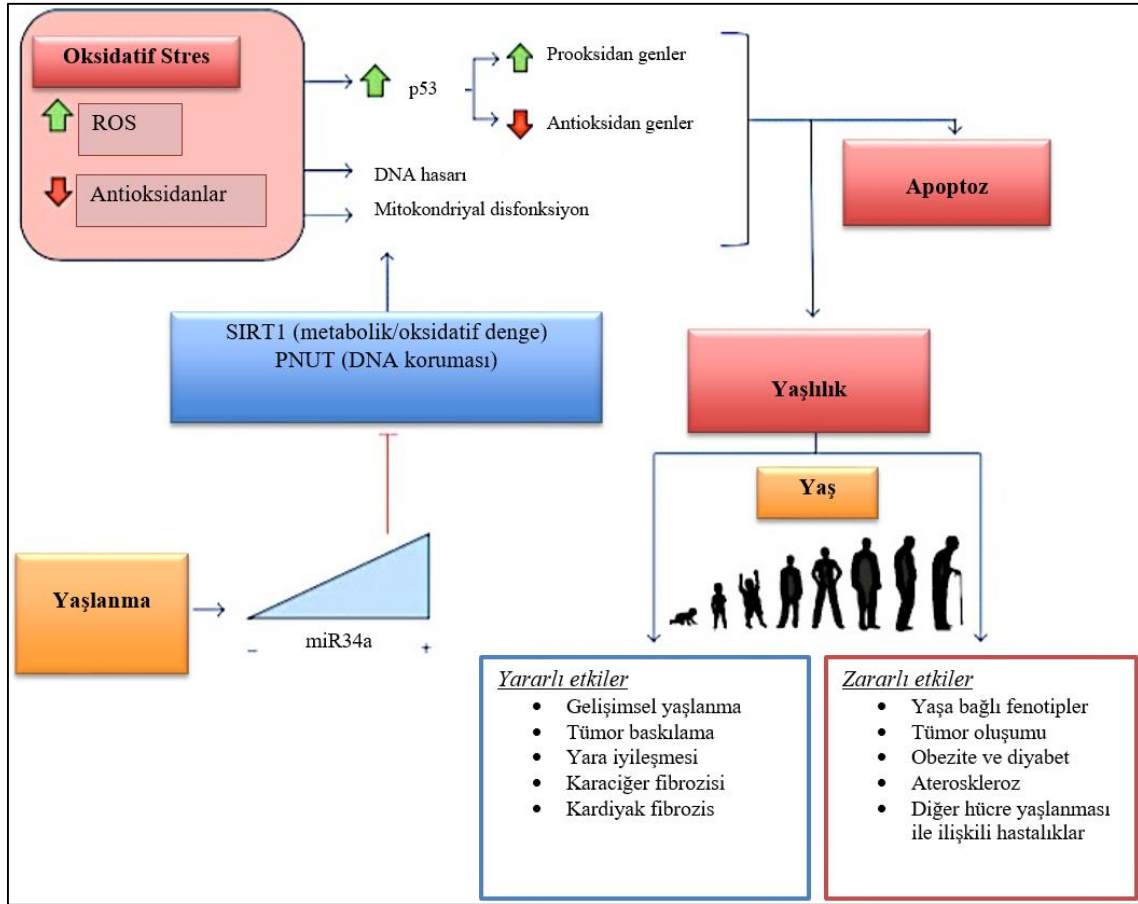
İç (kalıtımsal) etkenler:

- Uzun Yaşam Genleri Teorisi
- Nöroendokrin Teori
- İmmünolojik Teori
- Hücresel Yaşlanma (Telomer) Teorisi
- Hücre Ölümü (Apoptoz) Teorisi

Dış (stotastik) etkenler:

- Somatik Mutasyon ve DNA Tamir Teorisi
- Hata Teorisi
- Proteinlerin Modifikasyon Teorisi
- Serbest Radikal Teorisi

Teorilerden en çok üzerinde çalışılan ‘Serbest Radikal Teorisi’dir. Serbest radikal teorisine göre yaşlanma, oksidan ve antioksidan sistemlerdeki dengenin bozulması nedeniyle gelişir ve oksidatif stres ortaya çıkar (Harman, 2006). Normal hücrel metabolizma sırasında üretilen serbest radikaller deoksiribonükleotid (DNA), protein ve lipit gibi makromoleküllere saldırarak hasar yaratır ve fizyolojik işleyişi bozarlar (Davydov, 2004). Hem kusurlu genom, hem de DNA onarım işlemleri erken yaşlanmanın fenotiplerini teşvik eder. Yaşlanmayı etkileyen genler ve bu süreçleri ilgilendiren disiplin “Yaşlanma epigenetiği” kavramını geliştirmiştir. Mitokondri ve NADPH oksidaz tarafından üretilen düşük ve orta reaktif oksijen ürün (ROS) seviyeleri, ROS duyarlı proteinleri ve epigenetik mekanizmaları aktive eder. Yüksek ROS seviyesi ise, hızlandırılmış yaşlanma, hücre ölümü ve yaşa bağlı hastalıklarda nükleik asitler, lipit ve protein hasarlarına neden olur (Davalli, Mitic, Caporali, Lauriola ve D’Arca, 2016) (Şekil 2.1). Bu tepki, sitotoksik ve mutajenik olan malondialdehit (MDA) ve konjuge dien bileşiklerinin oluşumuna yol açar. Lipid peroksidasyonu radikal bir zincirleme reaksiyonla gerçekleşir, yani bir kez başladığında hızla yayılır ve çok sayıda lipit molekülünü etkiler. Proteinler ayrıca yapısal değişikliklere uğrayabilir ve enzim aktivitesinin kaybına yol açan zararlı durum ortaya çıkar (Halliwell, 2007; Pham-Huy, He ve Pham-Huy, 2008). Yaşlanma total antioksidan durumun (TAS) kademeli olarak azalması ve total oksidan durumun (TOS) artmasıyla ilgilidir (Cachofeiro ve diğerleri, 2008).

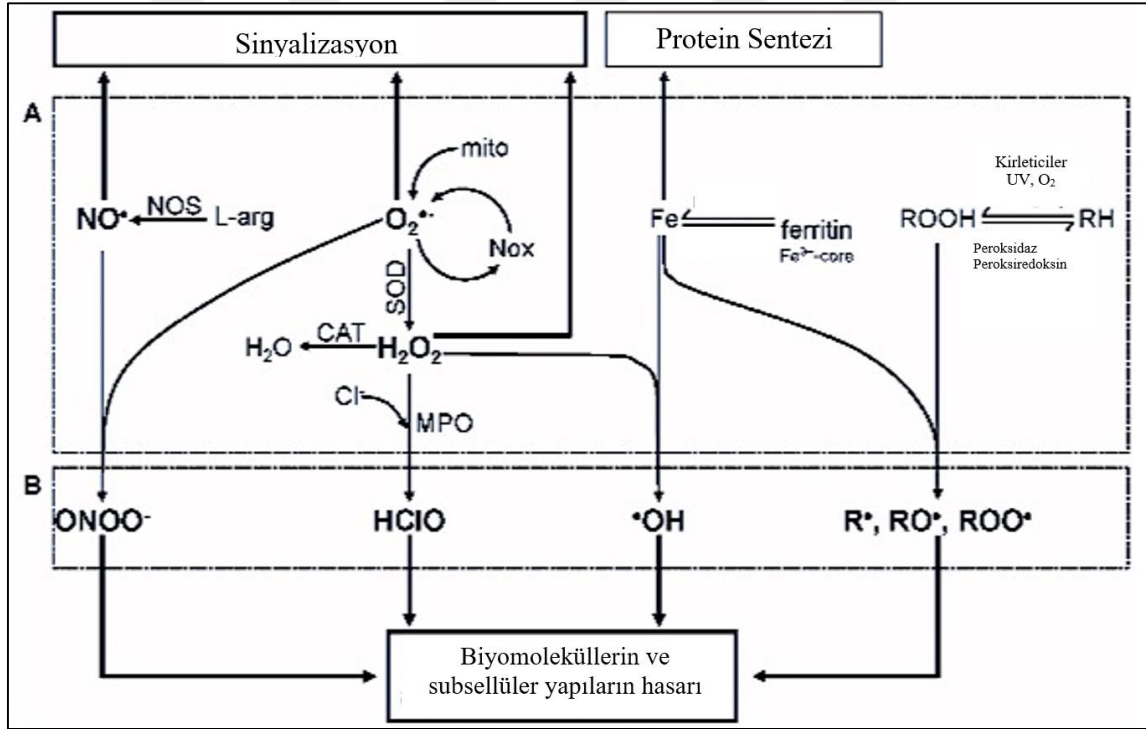


Şekil 2.1. ROS aracılı yaşlanma (Davalli, 2016)

2.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma

Oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasında oksidanlar lehine gelişen bir dengesizliktir. Birçok hastalık ve bozukluk, hücrelerdeki oksidan/antioksidan dengesizliği ile ilişkilendirilmiştir. Bu dengesizlik, redüklenme ve oksitlenme tepkimelerinin bir arada gerçekleşmesi olan redoks sinyalizasyonunun ve kontrolünün bozulmasına yol açtığı gibi ve/veya moleküler hasarın oluşmasını sağlar (Davalli, 2016). Vücutta, oksijen içeren çeşitli reaktif moleküller, azot ve diğer elementler hücresel sinyalizasyon ve biyokimyasal süreçler için gereklidir. Oksidatif streste en yaygın olarak ROS ve reaktif azot ürünleri (RNS) içeren reaktif ürünler rol oynar (RS). Hücredeki bu RS'lerin birincil formları hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyon radikali (O_2^-), nitrik oksit gibi RNS ve ayrıca birçok lipid, protein, ve nükleik asitlerdir (Lushchak, 2014; Weidinger ve Kozlov, 2015). Bu serbest radikaller çok farklı reaktivite gösterir, örneğin süperoksit bir indirgeyici radikaldır; NO'nun reaktivitesi, başka bir serbest radikal ile reaksiyona girmediği sürece düşük kalır; H_2O_2 , diğer ROS'lardan daha az reaktiftir, ancak yapısal parçalara dönüşüm

yoluyla oksidatif strese oluşturma yeteneğini korur. Süperoksit radikal oluşumu yoluyla başlıca endojen H_2O_2 kaynakları arasında NADPH oksidazlar (NOX enzimleri) ve mitokondri bulunur. Diğer enzimler ve organeller de H_2O_2 oluşumuna katkıda bulunur. H_2O_2 'nin aksine, hidroksil radikali ($HO^\bullet$) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi sekonder RS'ler, hücre için daha toksiktir ve genellikle birden fazla primer RS'nin varlığında oluşur. Şekil 2.2'de görüldüğü üzere A: Primer reaktif türler ($NO^\bullet$, $O_2^\bullet$, Fe , $ROOH$) ve iki özdeş reaktif türün (O_2 ile H_2O_2 'nin dismutasyonu) ve geçiş metallerinin (reaktif oksijen, azot ve metal ürünleri = RONMS) etkileşiminin ürünleridir. Bu ürünler ağırlıklı olarak sinyal iletimi ve protein sentezi gibi fizyolojik süreçlere katkıda bulunur. B: İki farklı RONM arasındaki reaksiyonların sekonder ürünleridir. Bu sekonder ürünler çeşitli hücre fonksiyonları üzerinde zararlı etkiler gösterir (Weidinger, 2015) (Şekil 2.2).

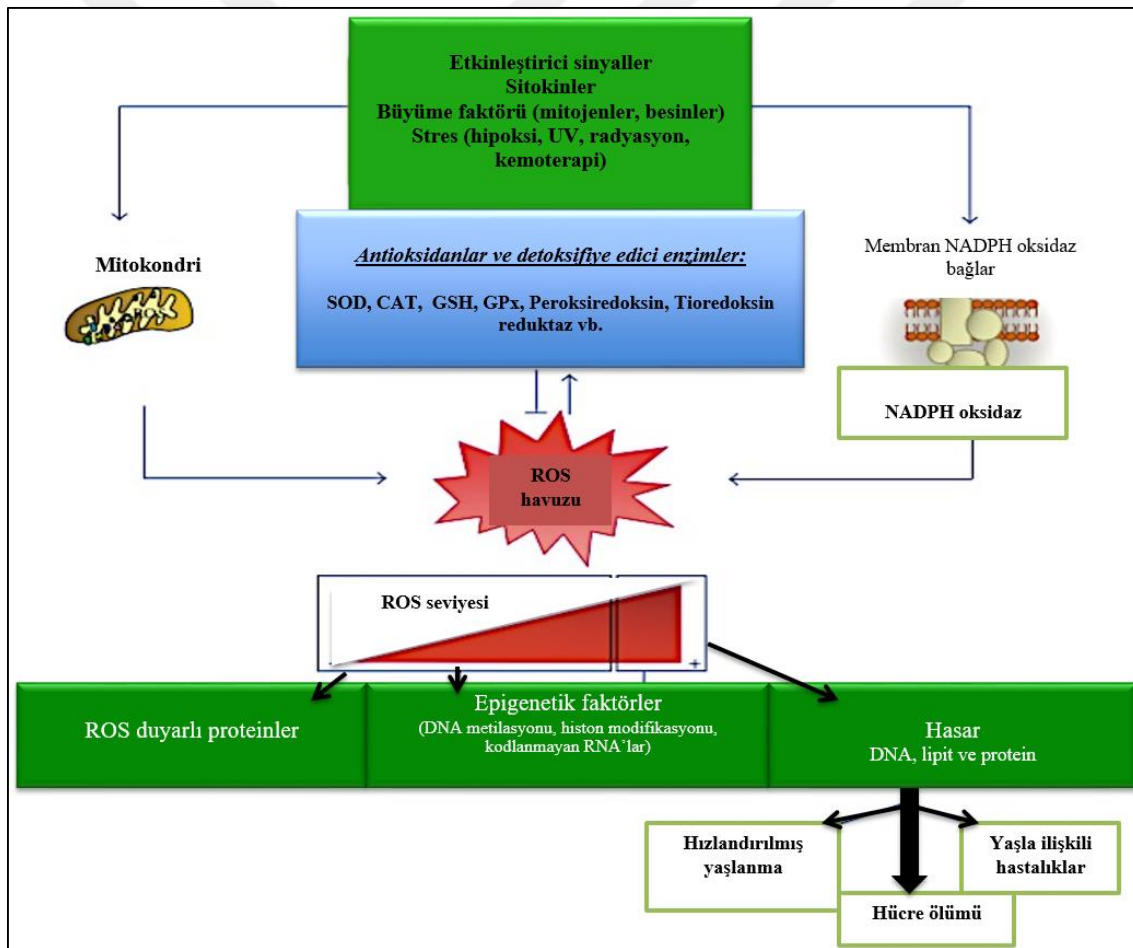


Şekil 2.2. Farklı reaktif türlerin fizyolojik ve patofizyolojik reaksiyon döngüsü (Weidinger, 2015)

Reaktif ürünler, solunum zinciri, fagositoz, prostaglandin sentezi ve sitokrom P450 sistemi de dahil olmak üzere çok sayıda normal metabolik ve biyosentetik yolla endojen olarak üretilir (Bae, Oh, Rhee ve Yoo, 2011). Özellikle aktif bir şekilde çalışan ve kimyasal reaksiyonların fazlaca gerçekleştiği mitokondride, elektron kaçakları olur. Mitokondri, sitozolde mitokondriyal ROS salınımını indüklemek için çeşitli dış sinyalleri ve stresleri algılar. Mitokondriyal ROS normal hücre fonksiyon için vazgeçilmezdir. Bununla

birlikte, mitokondriyal ROS üretiminin düzensizliği veya sitozole salınımı birçok hastalıkta, özellikle de inflamasyon ile ilişkilidir (Bae, 2011).

Pek çok kritik reaksiyonun ve sinyal kaskadının düzgün çalışabilmesi için normal fizyolojik RS seviyeleri gereklidir. Düşük veya orta seviyelerde ROS/RNS, insan sağlığı için hayati öneme sahiptir (Bae, 2011; Pham-Huy, 2008) (Şekil 2.3). Ancak, fazla üretildiğinde veya diğer reaktif ürünler ile kombine edildiğinde, hücresel bileşenler üzerinde ciddi etkilere sahip olabilirler (Halliwell, 2007; Weidinger, 2015). Bu nedenle, ROS ve diğer RS seviyelerinin sıkı bir şekilde kontrolünü sağlamak için hücre, sayısız antioksidan savunmaya sahiptir.



Şekil 2.3. Fizyolojik ve patolojik koşullarda ROS üretimi (Davalli, 2016)

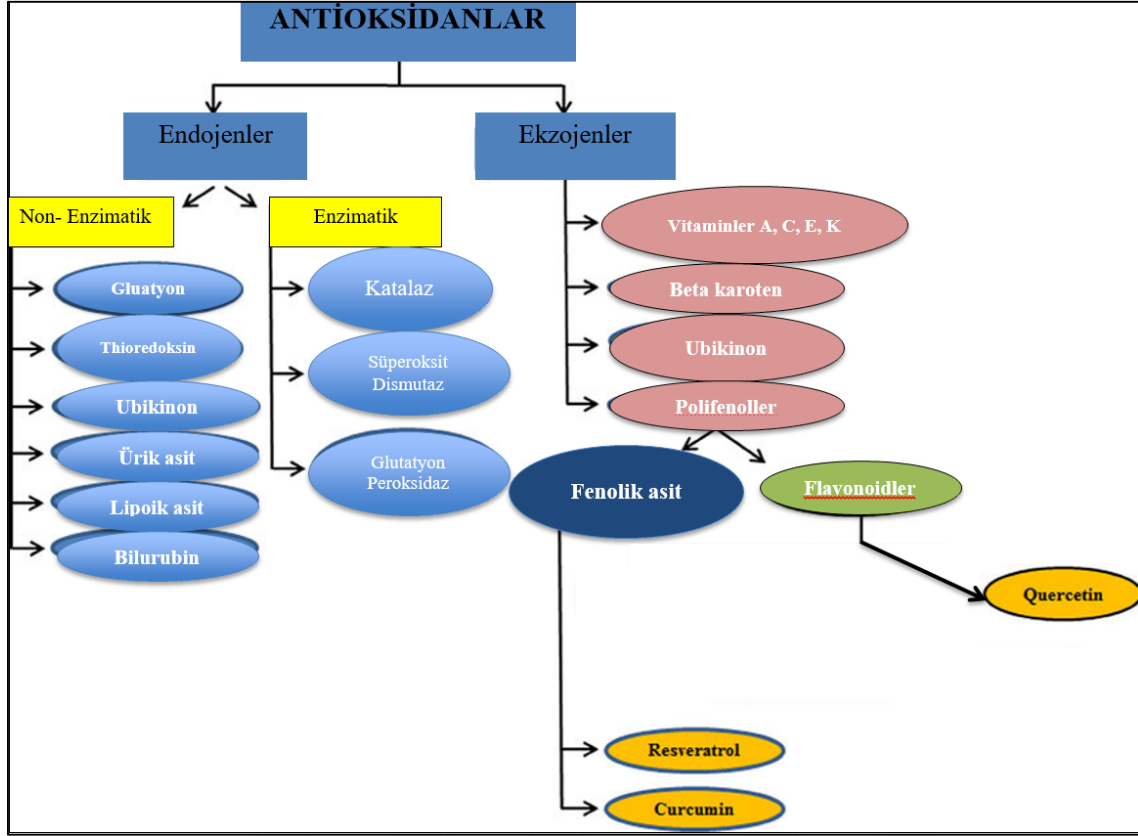
Antioksidanlar, serbest radikallere karşı savaşan, yıkıcı ve zararlı etkilerini azaltan maddelerdir. Hücrelerdeki endojen bileşikler enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir. ROS ve RNS'nin nötralizasyonunda doğrudan rol oynayan başlıca antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon

peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktazdır (GRx). Serbest radikallere karşı ilk savunma hattı olan SOD, süperoksit anyon radikalının ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) içine indirgenerek parçalanmasını katalize eder. Oluşan oksidan H_2O_2 , katalaz veya glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene (O_2) dönüştürülür. Selenoprotein GPx enzimi, H_2O_2 'yi indirgenmiş glutatyonu (GSH), okside edilmiş glutatyona (GSSG) oksitlemek için kullanır. Bir flavoprotein enzimi olan GRx, GSSG'den GSH'yi, azaltıcı bir güç kaynağı olarak NADPH ile yeniden üretir. H_2O_2 yanı sıra GPx, GSH oksitlerken lipid veya hidroperoksitleri de azaltır (Droge, 2002; Young, 2001; Halliwell, 2007).

Non-enzimatik antioksidanlar ayrıca metabolik antioksidanlara ve besin antioksidanlarına ayrılır. Endojen antioksidanlara ait metabolik antioksidanlar, lipoid asit, glutatyon, L-arijinin, koenzim Q10, melatonin, ürik asit, bilirubin, metal şelatlayıcı proteinler, transferrin vb. gibi metabolitik aktivite sonucunda üretilir. Ekzojen antioksidanlara ait besin antioksidanları ise, vücutta üretilemeyen ve dışarıdan alınan E vitamini, C vitamini, karotenoidler, eser metaller (selenyum, manganez, çinko), flavonoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri vb. maddelerdir (Droge, 2002; Willcox, Ash ve Catignani, 2004) (Şekil 2.4).

Antioksidanlar genellikle iki yoldan biriyle çalışır: radikal devam zincirini kırarak veya Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi başlıca antioksidan enzimler, serbest radikallerin üretilmesinden sorumlu molekülleri atarak oksidasyon zincirinin oluşumunu önler (Pham-Huy, 2008; Young ve Woodside, 2001).

Yaşlı ve orta yaşlı insan plazmasında yapılan çalışmada, yaşlı insanlarda TAS'ın, orta yaşlı olanlara göre düşük olduğu gösterilmiştir (Dziegielewska-Gesiak ve diğerleri, 2019). Kadın ve erkek plazma, eritrosit ve tükürüğünde yaşlanma ile birlikte TOS ve oksidatif stress indeksi (OSI) değerinin artarken, TAS ve antioksidan enzimlerin azaldığı bildirilmiştir (Maciejczyk, Zalewska ve Ladny, 2019). Ayrıca TOS ve TAS arasındaki dengesizlik, kardiovasküler hastalık, ateroskleroz ve kanser gibi yaşlanmayla ilişkili birçok patolojik hastalıkla ilişkili bulunmuştur (Dziegielewska-Gesiak, 2019; Saghebjo, Sadeghi-Tabas, Saffari, Ghane ve Dimauro, 2019).



Şekil 2.4. Endojen ve ekzojen antioksidanlar

Özetle; serbest radikaller ile indüklenen oksidatif stres, yaşlanma sürecinde önemli rol oynar. ROS, stres kaynaklı erken yaşlanmayla sonuçlanan önemli bir hücre yaşlanması aracıdır. Antioksidan enzimler, biyolojik makromoleküllerin oluşan oksidatif hasardan zarar görmesini önleyen birincil savunma araçlarıdır. Bu nedenle, yaşlanma sırasında antioksidan enzimlerin kararlı durum seviyeleri, bazı önemli dokuları serbest radikal aracılı hasara karşı koruyabilir.

2.2.1. Nitrik oksit, oksidatif stres ve yaşlanma

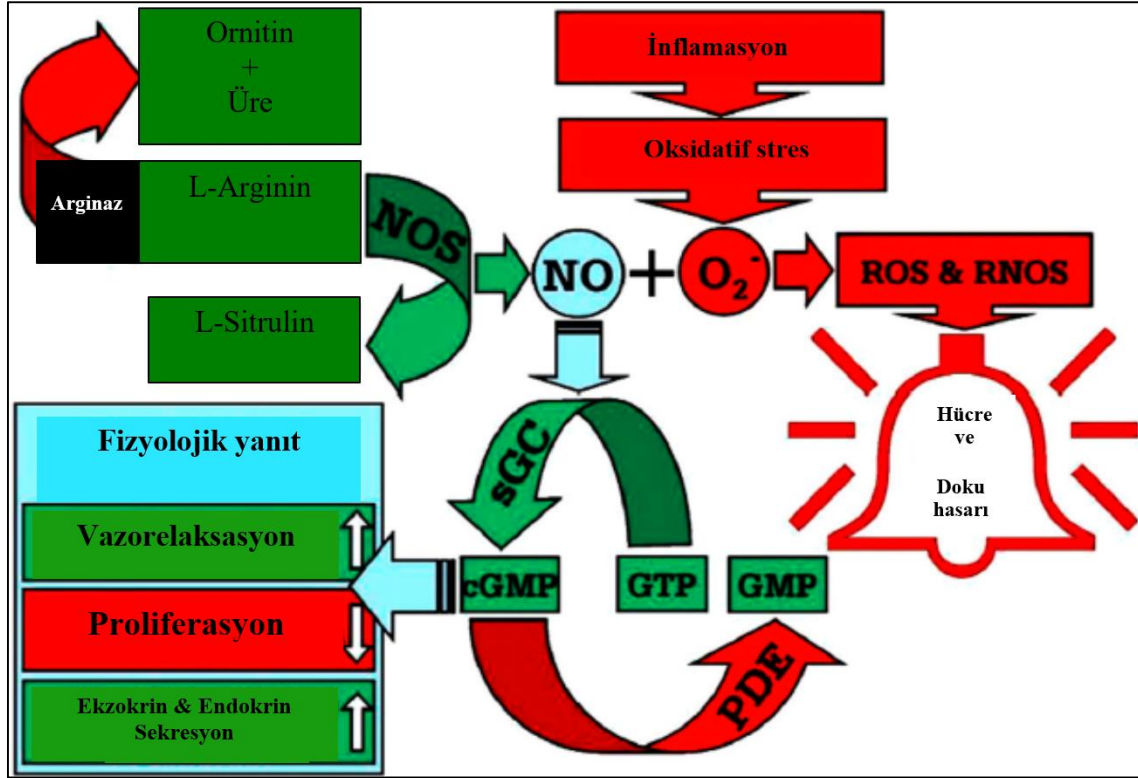
NO, NO sentazlar (NOS enzimleri) tarafından üretilir (Sies ve Jones, 2017). Tüm NOS izoenzimleri pankreas beta hücrelerinde eksprese edilir. Nöronal NOS (nNOS) başlıca, insülin sekrete eden granüllerde bulunurken, endotelial NOS (eNOS) ise beta hücrelerde bulunur. İndüklenebilir NOS (iNOS) ise normalde eksprese edilmezken, yüksek glukoz varlığında sitoplazmada eksprese edilir (Bahadoran ve diğerleri, 2019). NO sentezinde rol oynayan üç NOS formunun pankreas dokusunda gösterilmiş olması NO'nun pankreas yaşlanmasında, oksidan ve antioksidan savunmada ve apoptoz sürecinde muhtemel rolünü ortaya koyar (Buchwalow ve diğerleri, 2018). Bulunduğu hücre tipine ve lokal

konsantrasyonuna bağlı olarak NO serbest radikal öncülü ya da antioksidan gibi davranabilir.

Hücresele düzeyde NO, nöral hücrelerde apoptoz ve sağkalımın düzenlenmesinde rol oynar. Dokulardaki nitrik oksit sentezi, nitratin nitrite indirgenmesi yoluyla meydana gelebilir. Nitrik oksit, doğrudan zincir kopmaları ve baz modifikasyonu ile DNA hasarını indükleyebilir (Burney, Caulfield, Niles, Wishnok ve Tannenbaum, 1999; Niles, Wishnok ve Tannenbaum, 2006). Hücre sağkalımı ile ilgili olarak NO, konsantrasyonuna bağlı olarak hem apoptotik etkiye hem de anti-apoptotik etkiye sahip olabilir. Nispeten düşük konsantrasyonlarda NO genellikle, koruyucu etkisiye aracılık etme ve cGMP sentezine yol açan Guanilat siklazın aktivasyonu ile ilişkilirken (Bobba, Atlante, Moro, Calissano ve Marra, 2007), iskemiye yanıt gibi durumlarda aşırı NO üretimi nörotoksiktir ve oksidatif stresi indükleyerek hücresele hasara yol açabilir (Bobba, 2007). NO, ayrıca karbonhidrat metabolizmasını düzenler ve NO biyoyararlılığının azalması diyabet gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. NO donörleri, insülin salınımını uyarır. Böylece T2DM’de glukoz düzeylerinin düzenlenmesi ve insülin direncinin azalmasında rol oynar.

ROS ve NO, mitokondriyal fonksiyonların önemli fizyolojik modülatörleridir, ancak aşırı miktarlarda mevcut olduğunda mitokondriye zarar verebilir (Şekil 2.5). Süperoksit anyonu ile NO reaksiyonu sonucu oluşan reaktif bir tür olan peroksinitrit tarafından başlatılan oksidatif stres ve hasar, sonuçta hücre apoptozuna veya nekroza neden olabilir (Buchwalow, 2018). Yoon ve diğerleri (2010) yaşlanmanın, insan göbek damarının endotel hücrelerinde NO üretimini, eNOS aktivitesini ve ekspresyonunu azalttığını gözlemlemişlerdir (Yoon, Cho, Ahn ve Yang, 2010). NO’nun bozulmuş üretimi ve sinyalizasyonu, hipertansiyon, hiperlipidemi ve Diabetes mellitus ile ilişkili kardiyovasküler riskine (KVR) önemli ölçüde katkıda bulunur. Hızla yaşlanan toplumlarda ileri yaş, başlı başına tutarlı ve bağımsız bir KVR faktörüdür. Yaşlanma ile ilgili birçok işlem NO ile modüle edilir. Bu nedenle yaşlanma, NO sinyali ve etkisinin belirgin bozulması ile ilişkilidir (Buchwalow, 2018). Yine benzer bir şekilde NO eksikliği, yaşlanmada ortaya çıkar ve yaşa bağlı kardiyovasküler risk ve böbrek hasarına katkıda bulunur (Baylis, 2012). Yaşlı sıçanlarda serebral korteks NO düzeyini araştırdığımız çalışmada, özellikle temporal korteksin nitrit seviyesi gençlerle karşılaştırıldığında daha yüksek bulundu. Nitrit düzeyindeki artış, kaspaz-3 aktivitesini de artırmıştır (Akbulut, 2013). Ayrıca iNOS, NO_x ve OH⁻ içeren oksidatif stres belirteçlerinin, SAMP8 farelerin

(yaşlanması kolaylaştırılmış) pankreasında yaşlanmaya bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (Cuesta, Kireev ve Garcia, 2011).



Şekil 2.5. Pankreasta NO bioktivitesini etkileyen faktörler

2.3. Programlı Hücre Ölümü: Apoptoz

Hücre ölüm mekanizmalarından nekroz ve apoptoz hücre ölümü sağlayan iki yoldur. Apoptoz, başlangıcı sıkı bir şekilde düzenlenmiş, hücresel homeostazisi koruyan, inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi ölümlerini düzenleyen programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozun ana işlevi, organizmanın bir bütün olarak düzgün işleyişine zarar verecek olan hücreleri uzaklaştırıp, hasarlı hücreleri yok ederek homeostazın devamlılığını sağlamaktır. Nekrozu karakterize eden hücre şişmesi ve plazma membran rüptürünün aksine, apoptoz morfolojik olarak hücrelerin büzülmesi ve çekirdeğin yoğunlaşması ile karakterizedir. Apoptotik süreçte fagozomların devreye girmesi ile fagositoz başlatılır (Kerr, 2002). Apoptoz, bir dizi enzime bağımlı biyokimyasal işlemle birlikte hücrenin yapısında bir dizi morfolojik değişiklik ile karakterizedir ve çevre dokulara minimum hasar veren hücrelerin vücuttan temizlenmesi ile sonuçlanır (D'Arcy, 2019). Apoptozun başlatılması, kaspaz olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Moleküler düzeyde kaspazların ve DNazların aktivasyonu, spesifik proteinleri ve

kromozomların bütünlüğünü tahrip ederek etki gösterir. İnsanlarda apoptoz, hücre proliferasyonunun hücre ölümüyle dengelenmesinden ve dokulardaki sabit hücre sayılarının korunmasından sorumludur. Ayrıca apoptoz, virüs bulaşmış hücrelerin ve onkogeneze uygulanan hücrelerin çıkarılabileceği bir savunma ve gözetim mekanizması sağlar (Zhang, Chong ve Herman, 2002b; Zhang, 2003).

2.3.1. Apoptoz süreci ve kaspazlar

Apoptoz süreci çok hücreli organizmalar içinde yüksek oranda korunur ve genetik olarak kontrol edilir (Zhang, 2002b). Apoptoz, bir dizi hücre içi sensör yoluyla hasar tespit edildiğinde hücrenin kendisi tarafından başlatılabilir; apoptozu düzenleyen iki ana yol tanımlanmıştır: mitokondrilerin merkezi bir rol oynadığı içsel yol (intrinsik) ve hücre membran reseptörlerinin apoptotik sürecin başlangıç noktası olarak hareket ettiği dışsal yol (ekstrinsik). Hem içsel hem de dışsal yollarda, kaspazların aktivasyonu vazgeçilmez bir rol oynar (Budihardjo, Oliver, Lutter, Luo ve Wang, 1999). Sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi, kaspazların aktivasyonu, büyüme faktörlerinin azalması veya reaktif oksijen radikallerin oluşturduğu hasar neticesinde apoptoz başlatılabilir. Apoptozda, ölü hücrenin içeriğini taşıyan apoptotik cisimler, çevredeki hücreler tarafından fagositoz edilebilir, ancak bu davranış esas olarak hücre kültüründe gözlenir (Zhang, 2002b). Makrofaj gibi in vivo hücreler, genellikle apoptotik hücreleri parçalanmadan önce çıkarırlar. Bu, hasarlanan dokunun tutulmasına neden olur ve sonuç olarak, çevredeki hücrelerde hasar riski azaltılır.

Apoptoz süreci aşağıdaki basamaklardan oluşur:

- Apoptozun başlatılması (sinyal üretici yollar)
- Hücre içi protezların (kaspazların) aktivasyonu
- Hücrede morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler
- Fagositoz

Kaspazlar, sistein bağımlı aspartata özgü proteaz grubudur. Aslen *C. elegans*'ta Ced-3 homologu olarak bulunan, bugüne kadar memelilerde 14 kaspaz tanımlanmıştır (Çizelge 2.1). Başlatıcı kaspazlar ve uygulayıcı kaspazlar olmak üzere iki kategoride kaspaz vardır. Hücre hasarı tespit edildikten sonra, başlatıcı kaspazlar (kaspazlar 8 ve 9) aktif olmayan prokaspazlardan aktive edilir ve uygulayıcı kaspazları (kaspazlar 3, 6 ve 7) aktive etmeye

devam eder. Öldürücü kaspazlarının aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonundan, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yok edilmesinden, proteinlerin çapraz bağlanmasından, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonundan ve apoptotik cisimlerin oluşumundan, DNA parçalanması ile sonuçlanan bir dizi olayı başlatır (Elmore, 2007; Poon, Lucas, Rossi ve Ravichandran, 2014).

Kaspazlar hem iç hem de dış apoptotik yollarda önemli roller oynarlar. Ayrıca kaspaz olmayan apoptotik yollarla etkileşime girerler. Kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5 ve kaspaz-11, inflamasyonun düzenlenmesinde bir işleve sahipken, kaspaz-14, keratinosit farklılaşması ile ilişkilidir. Kaspazların geri kalanları da apoptozda önemli roller üstlenirler. Kaspazlar hücrelerde zimojen (prokaspaz) formunda bulunur. Aktive edildiğinde, her kaspaz molekülü parçalanır ve iki büyük ile iki küçük alt birim oluşturur (Salvesen ve Dixit, 1999).

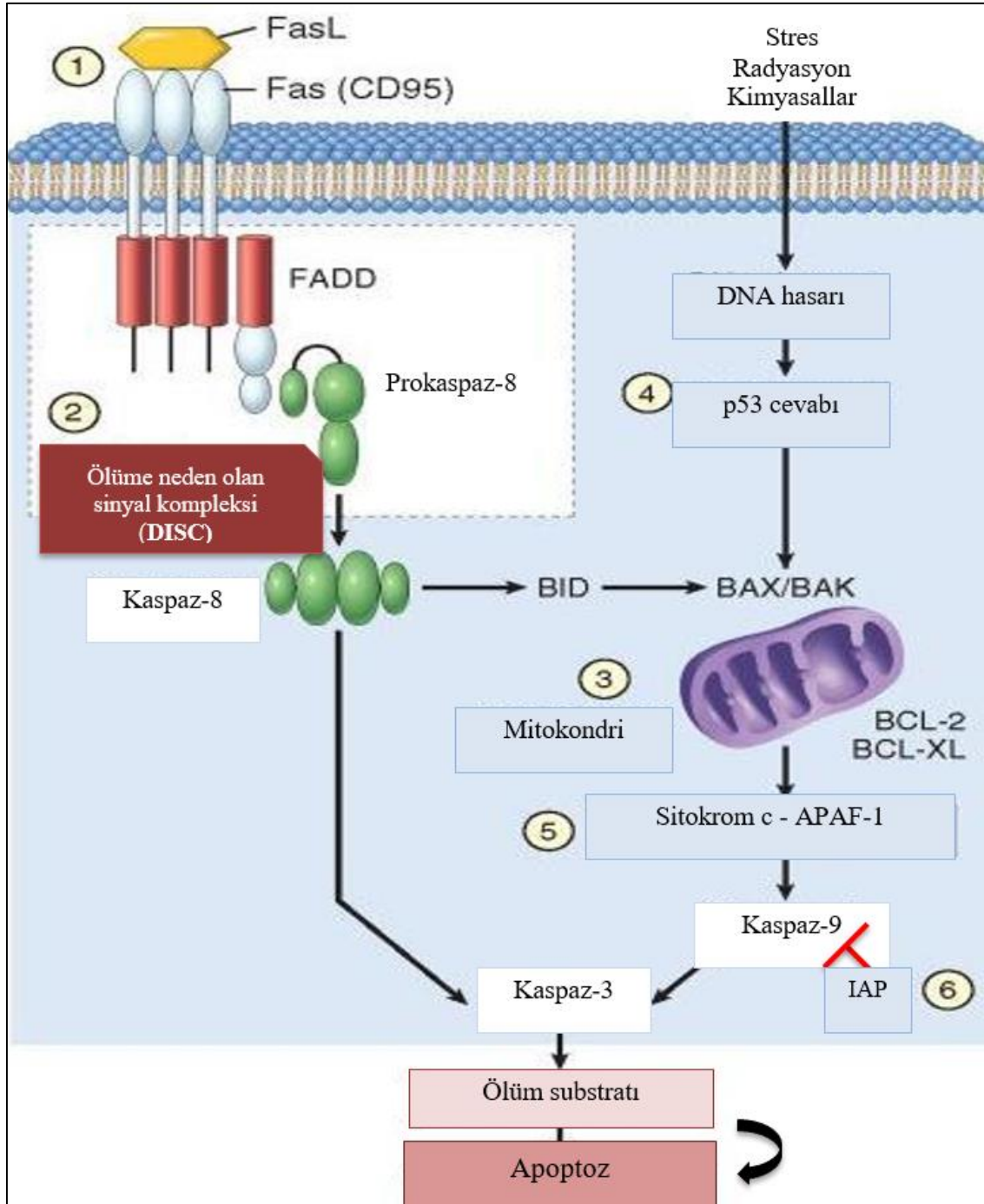
Çizelge 2.1. Apoptotik süreçte görev alan belirteçler (Zhang, 2003)

<u>Kaspazlar</u>	
Apikal kaspazlar	Kaspaz-2, 8, 9 ve 10
Öldürücü kaspazlar	Kaspaz-3, 6 ve 7
Diğer kaspazlar	Kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14
<u>Ölüm Reseptörleri</u>	Fas, TNF-RI, DR3, DR4, DR5, DR6, p75NTR
<u>Bcl-2 ailesi proteinleri</u>	
Anti-apoptotik	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1, Boo
Pro-apoptotik	Bax, Bak, Bcl-xS, Bok, Bid, Bad, Bik, Bim (Bod), Noxa
IAP'ler (İnhibitör apoptoz proteinleri)	XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP, Survivin, Apollon (Bruce), ML-IAP (Livin, KIAP), ILP-2 (Ts-IAP)

Apoptozun hem içsel (intrinsik) hem de dışsal (ekstrinsk) yolları, çok hücreli organizmaların sağlıklı kalmasını ve kusurlu hücrelerin vücuttan çıkarılmasını sağlamak için sinerjik olarak çalışır. Apoptozun düzenlenememesi, birçok hastalıkta ortaya çıkan patolojilere neden olabilir. Alzheimer gibi dejeneratif hastalıklarda, nöron ölümünün apoptotik sürecin önemli enzim grubu olan kaspazların aktivasyonu ile başlatılır (Dickson ve Rhodes, 2004). Apoptozu başlatan diğer faktörler ise stres, hipoksi, toksinler, radyasyon, reaktif oksijen türleri, virüsler ve çeşitli kimyasal ajanlar olarak sıralanabilir (Brenner ve Mak, 2009).

Ekstrinsik, diğer adıyla ölüm reseptör yolunda, ölüm reseptörleri aynı kökenli ligandlarına (Fas-FasL) bağlanarak aktive edilir. Ligandlar reseptörlere bağlanır ve reseptörlerin trimerizasyonunu tetikler. Bu reseptör trimerizasyonu, reseptörün hücre içi alanına

bağlanan adaptör moleküllerini (Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) vb.) toplar. FADD'nin bağlanması, adaptör molekülüne bağlanan prokaspaz-8'in devreye girmesine yol açar ve reseptör ile birlikte, kaspaz-8'in aktive edildiği ölüme neden olan sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Kaspaz-8 eksikliği olan farelerde ölüm reseptörü (DR) vasıtasıyla başlatılan cevabın olmadığı ve ekstrinsik apoptotik yolun aktifleşmediği izlenmiştir (Brenner, 2009). Aktive edilmiş kaspaz-8, daha sonra kaspaz-3 gibi kaspazları aktive ederek süreci başlatır (Peter ve Krammer, 2003). İntrensek yol, mitokondrial yol olarak da adlandırılır. Bu yolda ise, apoptozu indükleyen çeşitli sinyaller mitokondriyal membran geçirgenliğini doğrudan/dolaylı olarak değiştirir ve sitokrom c dahil mitokondriyal intermembran proteinlerin salınmasına neden olur (Parone, James ve Martinou, 2002). Proapoptotik proteinler (sitokrom c, Smac / Diablo ve HtrA2 / Omi dahil) mitokondriden sitoplazmaya sızabilir ve apoptozu aktive eder. Sitoplazmada prokaspaz-9, apoptotik proteaz aktivatör-1 (APAF-1) ve sitokrom c apoptozomu oluşturmak üzere birleşir. ATP'ye bağlı bir işlemle, apoptozomda prokaspaz-9, aktifleştirilmiş kaspaz-9 haline dönüşür. Bu aktive kaspaz-9 enzimleri, aktif kaspaz-3 formunda apoptozu tamamen indükleyebilen yürütücü prokaspaz-3'ü aktive edebilir (Cain, Bratton ve Cohen, 2002). Proapoptotik proteinler, inhibitör apoptoz proteinlerini (IAP'ler) inhibe ederek apoptozun başlatılmasına yardımcı olur, ancak sitokrom c'nin salınması olmadan, tek başına IAP'leri inhibe etmek apoptozu başlatmak için yetersizdir (Ekert ve Vaux, 2005) Apoptotik süreçteki yollar Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Apoptoz süreci: intrinsik ve ekstrinsik yollar

Öldürücü kaspazlar olarak bilinen kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7, kaspaz-8 veya kaspaz-9 aktivasyon kaskadının aşağı akışında bulunur ve hem intrinsik hem de ekstrinsik yolların birleştiği noktayı temsil eder. Aktive edildikten sonra, öldürücü kaspazlar, çok çeşitli hücre proteinlerinin proteolitik bölünmesinden sorumludur (Fischer, Jänicke ve Schulze-Osthoff, 2003). Proteoliz, yukarıda tarif edilen karakteristik apoptotik morfolojik değişikliklere ve hücre ölümüne neden olur.

Kaspazdan bağımsız apoptotik yollar da vardır. Apoptoz indükleme faktörü (AIF), mitokondriyal intermembran boşluğunda bulunur ve bir kez bu yerden serbest bırakıldığında çekirdeğe taşınır ve apoptozu indükler (Cande ve diğerleri, 2002). Katepsinler, kalpainler, granzimler ve endonükleaz G (Li, Luo ve Wang, 2001) dahil olmak üzere kaspaz olmayan proteazlar (Johnson, 2000) apoptozu bağımsız olarak veya kaspazlarla işbirliği halinde indükleyebilir. Apoptoz, apoptotik sürecin merkezine kaspaz aktivasyonunu yerleştirmiştir. Bu multifaktörler, doğrudan veya dolaylı olarak kaspazları aktive ederek apoptozu başlatırlar. Böylelikle kaspazlar hücre ölümüne yol açan, protein yıkımını katalize eden öldürücüler olarak karşımıza çıkar (Zhang, 2003).

2.3.2. Yaşlanma ile oksidatif stres, antioksidan sistem ve apoptoz ilişkisi

Yaşlanma, oksidatif stres ve apoptotik aktivite artışı ile birlikte seyreder. Genç sıçanlarla karşılaştırıldığında yaşlı sıçan karaciğerinde oksidatif stresin ve apoptoz göstergelerinden kaspaz-3'ün arttığı, antioksidan olan GSH'nın ise azaldığı gözlenmiştir (Molpeceres, 2007). Sıçan plazma, akciğer ve karaciğer dokularında yaşlanma ile lipit peroksidasyonun arttığı antioksidan gösterge olan GSH düzeyinin ise azaldığı bildirilmiştir (Akbulut, 1999). Yaşlanması hızlandırılmış SAMP8 farelerin pankreasında yapılan çalışmalarda NO ve OH⁻ içeren oksidatif stres belirteçlerinin, yaşlanmaya bağlı olarak artış gösterdiği (Cuesta, 2011) ve orta yaşlı sıçanlarda gençlerle karşılaştırıldığında pankreas dokusunda oksidatif stresin arttığı ve e-NOS'un azaldığı gösterilmiştir (Kassem, 2017). Yaşlanması kolaylaştırılmış SAMP8 fare akciğerlerinde gençlere göre inflamatuvar ve apoptoz göstergelerin yüksek olduğu belirtilmiştir (Puig ve diğerleri, 2016).

Yaşlanma, apoptotik aktivite artışı ile birlikte seyreder (Tresguerres ve diğerleri, 2012; Zhang, 2002a). Yapılan çalışmalarda artan ROS'un fibroblastlar (Chen, Liu ve Merrett, 2000) ve epidermal keratinositler (Gandarillas, 2000) ve kas hücrelerinin yaşlanması ve apoptozu (Leeuwenburgh ve Heinecke, 2001; Wallace, 1999), ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Yaşlı sıçan karaciğer, akciğer ve dalak dokularında kaspaz-3,6,7,9 ve kaspaz-2'nin yaşlanma ile birlikte arttığı, genç ve orta yaşlı gruplarda ise kaspaz aktivitesi bakımından bir farklılık sergilemediği bildirilmiştir (Zhang, 2003). Önceki çalışmalarımızda yaşlı sıçan korteks (frontal ve temporal) ve mide mukozasında kaspaz-3 aktivitesinin gençlere göre

anlamli olarak yuiksek olduğunu gozlemledik (Akbulut, 2012, 2013). Bunlara ek olarak yaşlanan sıçan gastrocnemius kası artmış Bax seviyeleri, kaspaz-3 aktivasyonu, DNA fragmentasyonunu ve azalmış Bcl-2 gosterilmiştir. NO'nun apoptozu inhibe ya da indukte etmesi kaspaz-3 aracılığı ile gerçekteşir (Kim, Kwon, Chung ve Kim, 2002). Vaskuler duz kas hucrelerinde apoptosis, yuiksek NO duzeyi, proinflatuvar sitokinler ve mekanik hasar neticesinde gelişir (Grootaert, Roth, Schrijvers, De Meyer ve Martinet, 2018). ROS ve RNS, oksidatif stres uzerinden apoptozu indukler (Sastre, Pallardo ve Vines, 2000).

Yaşlanma etkilerinin derecesi muhtemelen onarım sureçlerinin etkinliği ile ilişkilidir. Yaşlanma ile onarım sistemlerinin etkinliği azalır ve buylece vucuttaki temel fizyolojik fonksiyonlar giderek sekteye uğramaya başlar.

2.4. Sirtuinler

2.4.1. Genel ozellikleri ve fonksiyonları

Sirtuinler (SIRT), çeşitli histonlar ve transkripsiyon faktörleri uzerinde zayıf mono-ADP ribosiltransferaz aktivitesine sahip protein deasetilazlardır (Nakagawa ve Guarente, 2011). Nikotinamid adenin dinukleotidi (NAD) bağımlı histon deasetilaz aile uyeleri olan sirtuinler, son yıllarda en çok merak edilen ve çalışılan uzun yaşam proteinleri ailesidir. Protein asetilasyon/deasetilasyon durumunu dengeleyen ve enerji metabolizması, yaşlanma ve oksidatif stres ile ilişkili hastalık durumlarını etkileyen çeşitli faktörleri duzenleyen sirtuinler, anahtar enzimler olarak kabul edilmektedir (Kanwal, 2018). Ayrıca histon deasetilasyonu, kromatinin yeniden şekillenmesi, DNA onarımı, mitokondriyal fonksiyon, yaşlanma, homeostasis, inflamasyon, metabolizma ve oksidatif stres regulyasyonu gibi çeşitli fizyolojik sureçlerde yer alan sirtuinler hucre sel mekanizmada çok önemli roller uştlenmiştir (Finkel, Deng ve Mostoslavsky, 2009; Imai ve Guarente, 2014; Lemos ve diğerleri, 2017; Rajedran, Garva, Krstic-Demonacos ve Demonacos, 2011; Xu ve diğerleri, 2019).

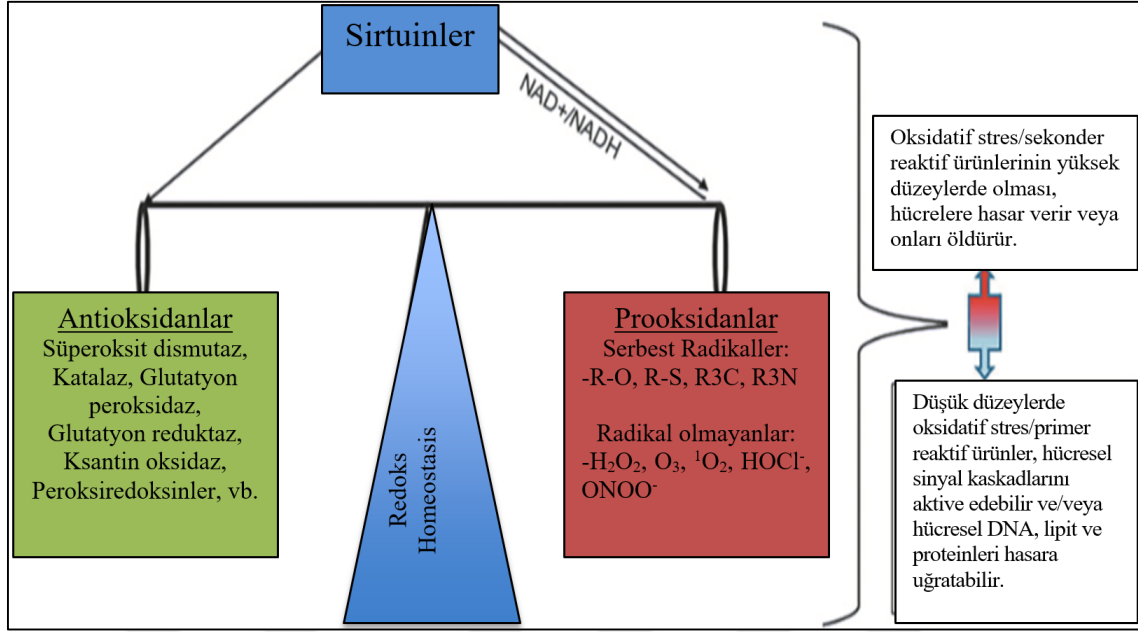
Memeli sirtuinlerinde SIRT1-7 olmak uzer e yedi uye vardır. Sirtuinler lokasyonlarına gore; SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 çekirdekte (SIRT1 ayrıca önemli sitoplazmik fonksiyonlara da sahiptir) SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 ise mitokondride bulunur. SIRT2 ise sitoplazmada en çok bulunan sirtuindir. SIRT2, hucre doğgusune bağlı bir şekilde çekirdeğe geçici olarak

da geçebilir (North ve Verdin, 2007). Sirtuinlerin genel fonksiyonları, lokalizasyonları ve enzimatik aktiviteleri Çizelge 2.2’de listelenmiştir.

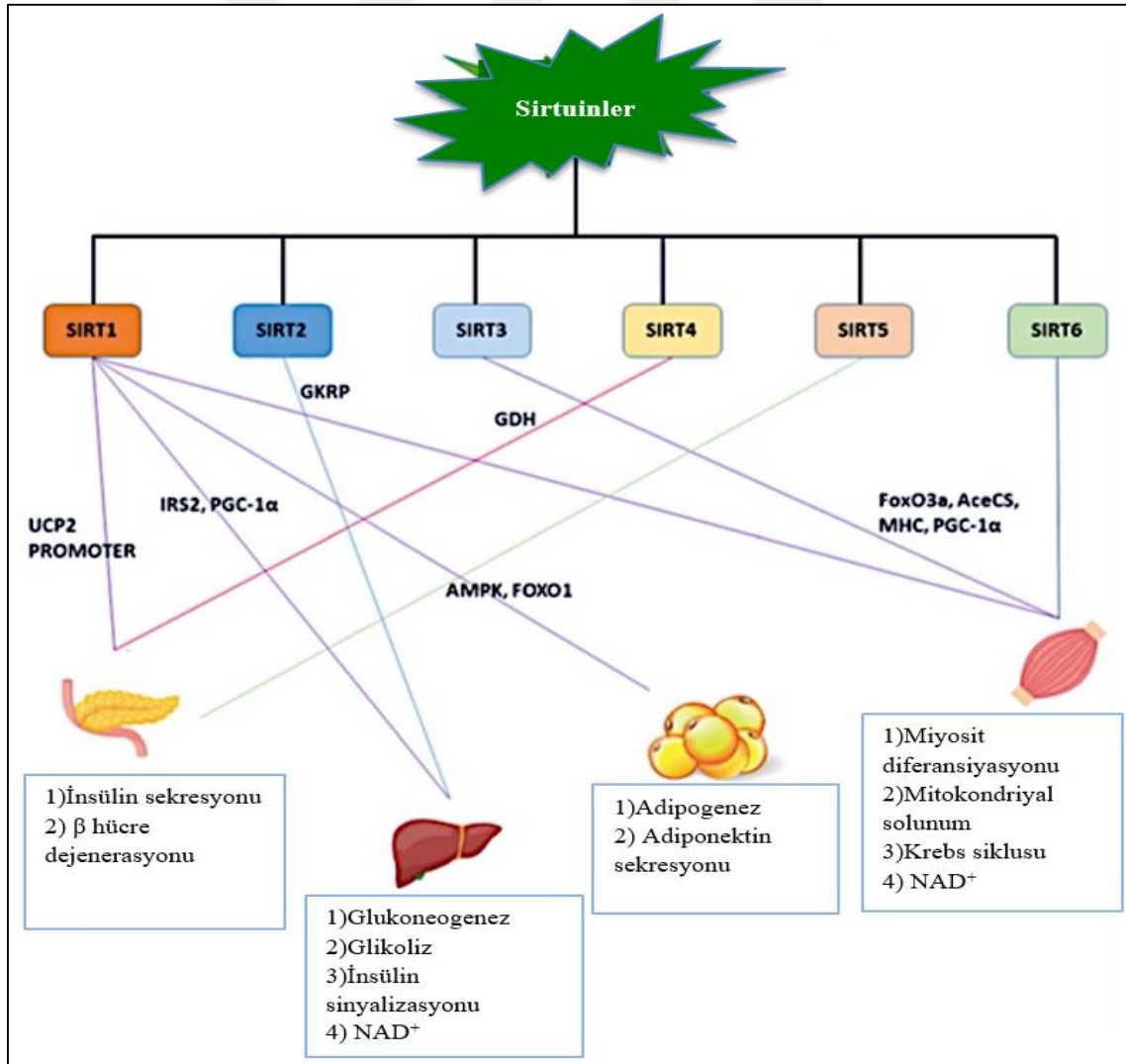
Çizelge 2.2. Sirtuinlerin lokasyon, fonksiyon ve enzimatik aktiviteleri (Kanwal, 2019)

Sirtuinler	Genel Fonksiyonları	Lokasyon	Enzimatik Aktivite
SIRT1	Hücre sağkalımı, metabolizma, DNA hasar tamiri, lipid ve glukoz homeostazisi, stres direnci, insülin sekresyonu, inflamasyon, nörodejenerasyon/aksonal dejenerasyon, apoptoz, kanser, ömür uzunluğu, kardiovasküler bozukluklar	Nukleus, sitoplazma	Deasetilaz
SIRT2	Hücre döngüsünün kontrolü, hücre motilitesi/tümörögenesis, hücre farklılaşması, genom stabilitesi, stres yanıtı, nörodejenerasyon, metabolizma	Sitoplazma, Nukleus	Deasetilaz, Demiristolasyon
SIRT3	Termogenez, metabolizma, ömür uzunluğu, oksidatif stres, hücre apoptozu	Mitokondri, Nukleus	Deasetilaz
SIRT4	İnsülin sekresyonu, TCA siklusu, yağ asidi oksidasyonu, tümör, genom stabilitesi	Mitokondri	ADP-ribosilasyon, Deasetilaz
SIRT5	Üre silusu, keton cisimciği sentezi, oksidatif stres, hücre solunum	Mitokondri	Deasetilaz, Demalonilasyon, Desukinilasyon
SIRT6	DNA tamiri, glukoz homeostazisi, genom stabilitesi, metabolizma, inflamasyon, kanser, kardiovasküler hastalıklar	Nukleus	ADP-ribosilasyon, Deasetilaz, Demiristolasyon
SIRT7	rRDNA transkripsiyonu, genom stabilitesi, oksidatif stres	Nukleus	Deasetilaz

Sirtuinler, antioksidan enzimleri ve pro-oksidan radikalleri dengeleyerek redoks homeostazının korunmasına katkıda bulunur. Şekil 2.7’de gösterildiği gibi, sirtuinler antioksidatif enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini ve pro-oksidanların üretimini düzenler. $NAD^+/NADH$ oranı hücresel enerji durumu için bir göstergedir. Pro-oksidanlar, $NAD^+/NADH$ oranının değiştirilmesi yoluyla sirtuinlerin aktivitesini de etkileyerek, hücrenin oksidatif stres durumuna girmesine veya korunmasına yardımcı olan bir geri besleme döngüsüne izin verir. SIRT2, bir kofaktör olarak NAD^+ kullanır ve metabolizma regülasyonunda rol oynar (Singh ve diğerleri, 2018).



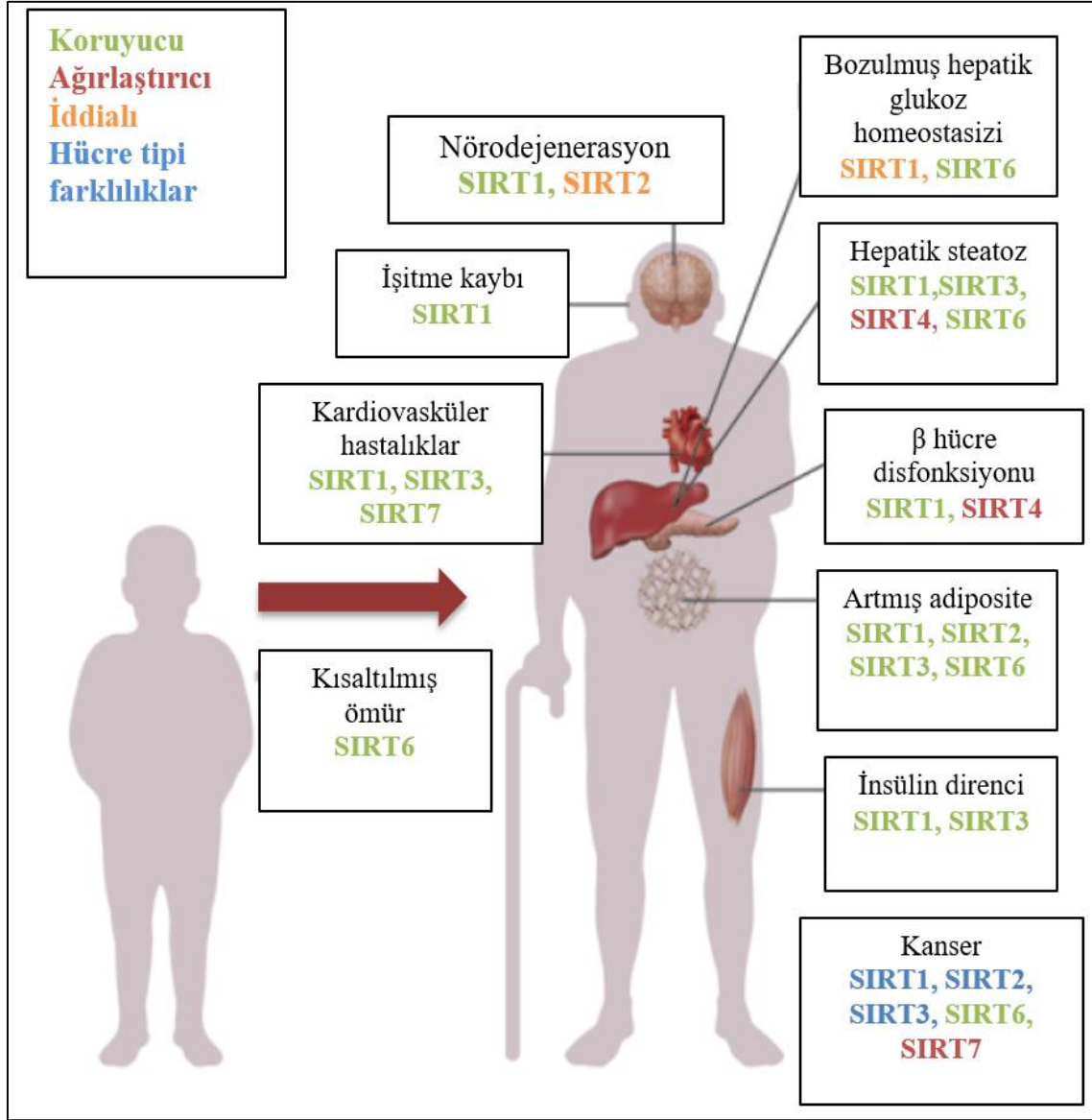
Şekil 2.7. Sirtuinlerin redoks homeostazisindeki rolü (Singh, 2018)



Şekil 2.8. Sirtuin ailesinin genel fonksiyonları (Kanwal, 2019)

En çok çalışılan sirtuin olan SIRT1 ise, pankreasta β adacıklarını apoptozdan korur ve insülin salınımını düzenler. SIRT1'in azalması insülin direncinin oluşmasında rol oynar (Cao ve diğerleri, 2016). SIRT1'in aktivitesinin artması ise kan insülin, kolesterol düzeyini, yağ kitlesini ve obeziteye bağlı insülin direncini de azaltır (Banks, 2008; Bordone ve Guarente, 2007). SIRT1, yağ dokusunda NF-kB deasetilasyonu ile insülin duyarlılığını artırır (Yoshizaki ve diğerleri, 2009). SIRT1, NF-kB nin antagonisti gibi davranır. Kalori kısıtlaması (CR) ömür süresi arasındaki ilişki yapılan birçok deneyde, kalori alımının sınırlandırılmasıyla yaşam süresinin belirgin şekilde uzadığı göstermiştir (Guarente ve Picard, 2005). SIRT1'in yaşam süresi üzerine etkisi yeterince aydınlatılamamış olsa da, farelerde yaşa bağlı gelişen hastalıklara karşı korunmada, sağlık süresinin iyileştirilmesinde ve yaşlanmanın önlenmesinde SIRT1'in önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu enzim ailesinin yaşlanmayı (Khan, Nirzhor ve Akter, 2018), diyabet ve kalp yetmezliğini (Katsuumi, Shimizu, Yoshida ve Minamino, 2018; Pillai ve diğerleri, 2017), kas atrofisini (Samant, Kanwal, Pillai, Bao ve Gupta, 2017), nörodejenerasyonu (Jesko, Wencel, Strosznajder ve Strosznajder, 2017), fibrozisi (Bindu ve diğerleri, 2017) ve diğer metabolik bozuklukları içeren hastalıkları düzenlediği bilinmektedir.





Şekil 2.9. Sirtuinlerin çeşitli hastalıklardaki etkileri (Hall, Dominy, Lee ve Puigserver, 2013)

2.4.2. Sirtuin-2 (SIRT2)

Sirtuin ailesinin diğer üyesi olan SIRT2, özellikle farelerde beyin, böbrekler, pankreas, testisler, karaciğer ve yağ dokusu dahil olmak üzere metabolizma ile ilgili organ sistemlerinde ifade edilir (Bobrowska, Donmez, Weiss, Guarente ve Bates, 2012). SIRT2 beyinde bol miktarda eksprese edilir. Yaşlanma ile birlikte beyin dokusunda SIRT2'nin arttığı gösterilmiştir (Braidı ve diğerleri, 2015; Maxwell ve diğerleri, 2011; Keskin-Aktan, 2018). SIRT2 esas olarak sitoplazmada lokalizedir ve α -tübulini deasetile eder. Bununla birlikte, SIRT2'nin çekirdekte de bulunduğu, H4K16'yı deasetile edebildiği ve hücre döngüsünü düzenlemede görev aldığı da gösterilmiştir (North, 2007). SIRT2; adiposit farklılaşması, yağ asidi oksidasyonu, glukoneojenez ve insülin duyarlılığının yanı sıra

inflatuar yanıtı içeren metabolik homeostazın korunması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmektedir (Gomes, 2015). SIRT2 yağ dokusu üzerinde FOXO1 deasetilasyon yoluyla etki gösterir (Jing, Gesta ve Kahn, 2007). Diğer sirtuinler gibi, SIRT2 de hücrenin enerji durumuna bağlı olarak aktivitesini ve ekspresyonunu değiştirir (Gomes, 2015).

Yaşlanma ile SIRT2'nin, sıçanların serebral korteks, hipokampus ve oksipital lobda arttığı ve santral sinir sisteminde biriktiği gösterilmiştir (Keskin-Aktan, 2018; Maxwell, 2011). Santral sinir sistemi dışında ise kolonik mukozada yaşlanma ile SIRT2 ekspresyonunun ve lipid peroksidasyonun arttığı bulunmuştur (Akbulut, 2015). Sıçan kolon dokusunda yapılan çalışmamızda yaşlanma ile SIRT2 ekspresyonunun gençlere oranla artış gösterdiği bildirilmiştir (Akbulut, 2015). SIRT2 nakavt farelerde lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan inflamasyonda, makrofajlarda NF- κ B'nin, NO ekspresyonun, iNOS ve ROS üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Lee ve diğerleri, 2014).

SIRT2 mRNA düzeyinin, HEK293T hücrelerine H₂O₂ uygulanması sonucu oksidatif stresin artışına cevap olarak arttığı, yine FOXO3a ve Bim proteinlerini arttırdığı, proapoptotik bir protein olan Bim'in artışı yoluyla hücre ölümünü indüklediği, ancak SIRT2'nin MnSOD üzerinden oksidatif stresi de azalttığı gösterilmiştir (Wang, Nguyen, Qin ve Tong, 2007). Çalışmalar, SIRT2 deasetilasyon hedeflerinin, antioksidan ve redoks aracılı hücresel homeostazda önemli rollere sahip olduğunu göstermektedir (Gomes, 2015). SIRT2, hedeflerinden biri olan PP α R gamma koaktivator 1 alpha (PGC1 α)'yı etkisiz hale getirerek mitokondriyal biyogenezi modüle edebilir. SIRT2'nin bu aktivitesi antioksidan enzim ekspresyonlarının düzenlenmesi ve ROS seviyelerindeki azalma ile ilişkilendirilmektedir (Krishnan ve diğerleri, 2012).

Yaşlı sıçanlarda özellikle temporal korteksin nitrit seviyesinin gençlere göre daha yüksek olduğu ayrıca nitrit düzeyindeki artışın kaspaz-3 aktivitesinin de artışına neden olduğu gösterilmiştir (Akbulut, 2013). Yaşlanma hızlandırılmış SAMP8 farelerin pankreasında iNOS, NO_x ve OH⁻ içeren oksidatif stres belirteçlerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Cuesta, 2011).

Sirtuinlerin yaşa bağlı çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkileri gösterilmiştir (Donmez, 2012). Son zamanlarda SIRT1'in aktivasyonu ya da SIRT2'nin inhibisyonunun

nörodejenerasyona karşı koruyucu olduğu, SIRT2'nin genetik ya da farmakolojik inhibisyonunun primer nöron ya da intervertebral hayvan modellerinde alfa-sinüklein ve Hunhington protein nörotoksitesini önlediği gösterilmiştir (Chopra ve diğerleri, 2012; Outerio ve diğerleri, 2007; Luthi-Carter ve diğerleri, 2010). Farelerde kronik hafif stresli depresyon modelinde komponent-33i ile SIRT2 inhibisyonunun, depresyonu belirgin bir şekilde azalttığı, antidepresan etki gösterdiği ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ekspresyonunu indüklediği vurgulanmıştır (Muhoz-Cobo, Belloch, Díaz-Perdigón, Puerta ve Tordera, 2018).

Özetle, bütün bu bulgular SIRT2'nin oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyon yanıtının modülasyonunda kritik bir role sahip olduğunu göstermektedir.

2.5. Yaşa Bağlı Pankreas Değişiklikleri

Yaşlanma süreci diyabet başlangıcı ile ilgili organlar dahil dokuların çoğunu negatif etkiler. Pankreatik adacıklar, temel olarak iki ana alt gruba (β hücreleri ve β olmayan hücreler) bölünmüş bir endokrin hücre ağını temsil eder. Kemirgenlerde, β -hücreleri endokrin pankreasın en yaygın hücre tipidir ve adacık merkezini oluşturur. β hücre olmayanlar (α -, δ -, ϵ - ve pankreatik polipeptit hücreleri) ile çevrelenmiştir. Pankreas adacıklarının ana işlevi hormonların (insülin, glukagon, somatostatin, ghrelin ve pankreatik polipeptit) sentezi ve homeostatik işlemlerin sürdürülmesidir (Kilimnik, Periwai, Zielinski ve Hara, 2012). Endokrin ve ekzokrin salgı bezi olan pankreas, yaşlanmanın etkisiyle birlikte hem morfolojik hem de metabolik değişikliklere uğrar ve glikoz seviyelerinin uygun olmayan bir şekilde düzenlenmesine neden olur. Öncelikle yaşla birlikte insülin salgısının düzenlenmesi bozulur. Yaşlanma ile insülin sekresyonu her yıl %0.5 oranında azalır. T2DM insidansının yaşla birlikte artması tam anlaşılmamakla birlikte bu durum genelde yaşlamayla ilgili periferik dokularda gelişen insülin direnciyle açıklanır (Brown, 2012; Szoke ve diğerleri, 2008). Artan yağ dokusu, azalmış kas kitlesi, beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler ve fiziksel aktivitenin azalması nedeniyle insülin direnci yaşla birlikte artar.

T2DM'li çoğu hastanın pankreasında spesifik herhangi bir morfolojik değişim gözlenmez. Bu hastaların pankreasında bireysel olarak yağ birikmesi, adacık şişmesi, fibrosis,

inflamasyon , adacık hiperplazisi gözlenir. Ancak bu değişiklikler sıklıkla yaşlı kişilerin normal pankreas dokularında da görülmektedir (Matsuda, 2019; Puig, 2016).

Yaşlanma sırasında genellikle birçok dokuda rejeneratif kapasitede azalma gözlenir. Pankreatik adacıklar da birkaç morfolojik ve metabolik değişikliğe uğrar. Proliferatif ve rejeneratif sınırlamaların yanı sıra, endokrin hücreler salgı kapasitelerini kaybederek fonksiyonel adacık kütlelerinde ve düzensiz glikoz homeostazında bir azalma ile karşı karşıya kalırlar. Yaşla birlikte insan ve kemiricilerin her ikisinin de β hücrelerinin çoğalma kapasiteleri azalır. Yaşlanma pankreas β hücrelerinin apoptoza yatkınlığını artırırken; obezite β hücrelerinde apoptozu artırır (Kehm ve diğerleri, 2017). Doğal tip yaşlı farelerde (C57BL/6J) genç farelere kıyasla pankreatik adacık alanının ve adacık büyüklüğünün artmış olması ile yeterli miktarda insülin salgılayabildiği, ilerleyen yaş ile pankreas adacıklarının proliferatif ve rejeneratif kapasitesinde bir düşüş olduğu, pankreasta atrofi, fibrozis, salgısında ve fonksiyonlarında bir azalma olduğu gösterilmiştir (Kehm, 2017; Manes, 2003). Yaşlanma ile pankreas hacmindeki azalmanın yanı sıra, pankreatik kanalda dilatasyon gözlenir (Löhr, 2018; Matsuda, 2019). Yaşlı sıçanlarda yaptığımız daha önceki çalışmamızda da benzer şekilde bazı alanlarda lokalize veziküler yağlanma, perivasküler infiltrasyon ve langerhans adacık hücreleri arasında konjesyon, lenfositik infiltrasyon izlendi. Ekzokrin hücrelerde vakuolizasyon, yer yer atrofi, piknotik çekirdekler ve hiperplazi dikkati çekti. Sıçan pankreasında yaşlanma ile TUNEL pozitif bulundu (Muratoglu, Keskin-Aktan, Akarca-Dizakar, Ömeroğlu ve Akbulut, 2020).

Reaktif oksijen ürünleri, pankreas dokusunda ilerleyen yaşın etkisiyle birlikte artmaya başlar. Orta yaşlı sıçanların, gençlere göre iki kat fazla ROS üretimi yaptıkları belirlenmiştir. Ayrıca endotel aracılı vazodilatatör fonksiyon ilerleyen yaşla birlikte azalır. Yaşlanma, endotelial NOS ekspresyonunda ve NO formasyonunda azalma ile ilişkilidir (Kassem ve diğerleri, 2017).

2.5.1. Pankreas dokusunda SIRT2, oksidan stres, antioksidan sistem ve apoptoz ilişkisi

Genom dengesizliği ve oksidatif stres, yaşlılığın ayırt edici özellikleridir ve özellikle sirtuinlerin biyolojik yaşlanmayı yavaşlattığına dair çok sayıda çalışma mevcuttur. Glikoz-6-fosfat (G6P) glikolitik yolda bir ara ürün olarak enerji oluşumu ya da şant yaparak pentoz fosfat yolunda NADPH oluşturur. NADPH hem yağ sentezinde hem de GSH

redükte kalmasında görev yapar. Sirtuin aktivitesi ve NAD⁺ seviyeleri yaşlılıkla azalır (Braidy, 2015; Gomes ve diğerleri, 2013). Azalmış NAD⁺ seviyesi, SIRT2 aktivitesini, G6P'ı inhibe ederek oksidatif hasarı artırır, nükleotid biyosentezi, genom replikasyonu ve DNA onarımını inhibe eder. Bu nedenle, yaşamımız boyunca NAD⁺ seviyelerini yüksek tutarak. Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) aktivitesinin sürdürülmesi, sağlıklı yaşlanmanın bir yolu olabilir (Wu ve Sinclair, 2014).

Diyabet ve diyabetik komplikasyonlarda oksidatif bileşenlerin fazlaca olduğu, oksidatif stresin veya kronik ROS üretiminin T2DM dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların ilerlemesine katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Watson, 2014). ROS üretimi ılımlı düzeyde olduğu takdirde insülin duyarlılığını artırırken (Loh, Deng, Fukushima, Cai ve Boivin, 2009), aşırı ROS üretiminin hiperglisemiyle ilişkili olarak glukoz toksitesini indüklediği gösterilmiştir (Robertson, 2004).

Proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak pankreas hücrelerinde üretilen NO, hücre akıbetinin belirlenmesinde rol oynar. NO, bir taraftan hücre hasarı tetikleyip hücre işlevini bozarken, diğer taraftan hücre geri kazanımını destekleyen koruyucu yolların etkinleştirilmesiyle hücre sağkalımını destekler (Oleson ve diğerleri, 2016).

Diyetle indüklenen obez fare adipositlerinde SIRT2 ekspresyonunun azaldığı ve bunun sonucunda adipositlerde PGC1 α aracılı mitokondriyal enerji harcamasının regülasyonunun bozulması sonucu, glikoz intoleransı ve insülin direnci geliştiği gösterilmiştir (Krishnan, 2012). Dolayısıyla, SIRT2 metabolik aktivitelerin pozitif bir regülatörü olarak tanımlanmakta ve SIRT2 aktivitesinin artırılması obezite ve Tip 2 diyabet için terapötik bir yaklaşım olarak önerilmektedir.

SIRT1 ile SIRT3'ün iskelet kasında insülin sinyalizasyonunu pozitif etkilediği; SIRT1 ve SIRT3 down regülasyonunun ise C2C12 hücrelerinde insülin sinyalizasyonunu bozarak insülin direncinin oluşmasını indüklediği gösterilmiştir. Buna karşın SIRT2'nin iskelet kasındaki fonksiyonu farklıdır. SIRT2'nin iskelet kasında insülin sinyalizasyonunu bozduğunu gösterilmiştir (Arora ve Dey, 2014). Buna karşılık SIRT2'nin inhibisyonunun insülin direncini azalttığı belirtilmektedir. Kronik hiperinsülinemiye bağlı insüline dirençli nöronal hücrelerde SIRT2 inhibisyonunun insülin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Arora ve Dey, 2016). Bu nedenle "SIRT2 inhibisyonu insülin duyarlılığını geliştirir"

düşüncesi savunulmaktadır (Arora, 2014). Diğer bir çalışmada ise fare hepatositlerinde SIRT2 aşırı ekspresyonunun, insülin duyarlılığını artırdığını, ROS üretimi ile mitokondriyal disfonksiyonu azalttığını ve tüm mitokondriyal değişiklikleri iyileştirdiği bildirilmiştir (Lemos ve diğerleri, 2017). Görüldüğü üzere SIRT2'nin pankreas dokusundaki etkisine ilişkin mevcut literatür bulguları çelişkili ve yetersiz görünmektedir. Diğer taraftan, dokuya özgü işlevsellik, sirtuinlerin ortak bir düzenleme tarzıdır. Bu nedenle de, pankreas dokusunda SIRT2'nin kesin hedefini açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

AGK-2, nikotinamid bağlanma bölgesini hedefler ve böylece SIRT2'ye seçici ve güçlü bir inhibitör olarak işlev görür. SIRT2'nin AGK-2 tarafından inhibisyonunun, primer sıçan embriyo orta beyin kültürlerinde in vivo ve in vitro Drosophila Parkinson (PD) modelinde α -sinüklein toksisitesinden nöronları kurtardığı (Outeiro, 2007) ayrıca HD oluşturulan hayvan modellerinde Huntingin sitotoksitesinden sterol metabolizmasında modülasyon yoluyla koruyucu fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir (Luthi-Carter, 2010). Ayrıca Alzheimer (AD) oluşturulan sıçan astrositlerinde AGK-2, astrosit aktivasyonunu ve pro-inflamatuar mediatörlerin üretimini de azaltmıştır (Scuderi, 2014). Bunlara ek olarak farelerde oluşturulan iki farklı AD modelinde AGK-2 ve AK-7 ile sağlanan SIRT2 inhibisyonunda kognitif fonksiyonların iyileştiği yönünde bulgular sunulmuştur (Biella ve diğerleri, 2016). Bu bulgulara paralel olarak yukarıda açıklandığı gibi, pankreas β hücreleri ve hepatositlerde yapılan çalışmalarda SIRT2 ekspresyonu artışı ya da azalışı ile ilgili insülin duyarlılığı konusunda çelişkili çalışmalar mevcuttur.

Beyin çalışmalarında ise AGK-2 uygulanan yaşlı sıçanlarda korteks ve hipokampus dokularında SIRT2 düzeyinin azaldığı çalışmalarımızda da gösterilmiştir (Keskin-Aktan, 2018). Beyinde yapılan bu çalışmalar özellikle yaşlanma ile artan nörodejeneratif hastalıkların SIRT2 inhibisyonu ile tedavi edilebileceği/ önlenilebileceği fikrini ortaya çıkartmıştır.

AGK-2 ile inhibe edilen SIRT2, sıçan pankreas dokusunda tübülün asetilasyonunu iyileştirmiş ve asiner hücrelerde amilaz salgılanmasını artırmıştır (Binker, Richards, Gaisano ve Cosen-Binker, 2015). Farelerde thioasetamid (TAA) ile indüklenen akut karaciğer hasarında nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu, inflamasyon ve apoptozda artış gözlenmiştir. AGK-2 uygulaması ile SIRT2 inhibisyonu, karaciğer hasarını ve

patolojisini iyileştirdiği, pro-inflamatuar sitokinleri ve TAA kaynaklı apoptozu azalttığı bildirilmiştir (Jiao ve diğerleri, 2019). Çekum ligasyon perforasyon sepsis modelinde AGK uygulaması farelerde inflamatuvar sitokinleri azaltmıştır (Zhao ve diğerleri, 2015). Böbrek iskemi-reperfüzyonu modelinde AGK-2 ile inhibe edilen SIRT2, apoptozu azaltırken hasarı hafiflettiği gösterilmiştir (Wang ve diğerleri, 2017). Benzer bir şekilde gürültüye bağlı koklear hücre hasarında SIRT2 inhibisyonunun oksidatif stress kaynaklı hasarı ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (Liu ve diğerleri, 2019).

Bu çalışmada amacımız; AGK-2 uygulamasının, pankreas dokusunda oksidan ve antioksidan düzeyleri, NO ekspresyonu, kaspaz-3 ve SIRT2 gibi parametrelerin yaşlanma ile nasıl değişikliğe uğradığını tespit ederek, yaşa bağlı Tip 2 diyabet hastalığı açısından muhtemel terapötik bir katkı sağlayıp sağlayamayacağı konusunu araştırmaktır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmada önceden yapılan başvurulardan G.Ü.ET-16.008 kod numaralı ve “Yaşlanma Sürecinde Hücre Ölüm Mekanizmalarının Araştırılması” başlıklı araştırma için alınan etik kurul izninin, gereksiz yere deney hayvanı kullanımından kaçınılması, alınan dokuların çok kıymetli oluşu, daha önce elde edilen verilerle bütüncül bir değerlendirme imkanı sunması adına G.Ü.ET-18.079 kod numaralı izin ile alınan pankreas dokusu kullanıldı.

216S258 proje kodu ile “Yaşlanma sürecinde hücre ölüm mekanizmasının araştırılması” başlıklı proje de alınan pankreas doku örnekleri (24 adet) kullanıldı.

3.1.1. Deney hayvanları

Çalışmamızda genç (3 aylık, n=12) ve yaşlı (22 ay, n=12) olmak üzere iki gruba ayrılan toplam 24 adet Wistar albino cinsi, erkek sıçanlar kullanıldı. Bu gruplar içinde kontrol ve deney grubu olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Çalışmada sıçanlara uygulanan madde, uygulama dozu ve şekli Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kontrol ve deney grupları

Gruplar	Uygulanan Madde ve Dozu	Uygulama Şekli	Süre
Genç Kontrol (G-Knt)	DMSO, 10 µl/bw	sc	30 gün
Genç AGK-2 (G-AGK)	AGK-2, 10µM/bw	ip	30 gün
Yaşlı Kontrol (Y-Knt)	DMSO, 10 µl/bw	sc	30 gün
Yaşlı AGK-2 (Y-AGK)	AGK-2, 10µM/bw	ip	30 gün

AGK-2 (2-Cyano-3-[5-(2,5-dichlorophenyl)-2-furanyl]-N-5-quinolinyl-2-propenamide) (kat no #30489684, Sigma) Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek hazırlandı. Kontrol gruplarına %4’lük DMSO’lu PBS, deney gruplarına ise %4’lük DMSO’lu PBS ile hazırlanan AGK-2 enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyonlar, 30 gün boyunca saat 17:00’de uygulandı. Çalışma grubunu oluşturan tüm sıçanlar laboratuvar ortamında, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslenildi. 30. Günü sonunda ketamin-ksilazin anestezi maddesi etkisi altında olan

sıçanlardan intrakardiyak kan alınarak feda edildi. Alınan doku örnekleri sıvı azotta dondurularak çalışılmak üzere -80°C de muhafaza edildi.

3.1.2. Kullanılan laboratuvar aletleri ve cihazlar

Çalışmamızda kullanılan alet ve cihazlar Gazi Üniversitesi, Fizyoloji Araştırma Laboratuvarları ve Ankara Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarında kullanılan donanımlar Çizelge 3.2’ de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Laboratuvarında kullanılan donanımlar

Cihaz	Marka/Model
Otomatik mikropipetler	ISOLAB
Hassas tartı	Electronic Balance, Shimadzu Corporation, Japan
Doku homojenizatörü	Sonics vibracell, VCX130FSJ
Soğutmalı santrifüj	MPW-350R
Saf su/Deiyonize su cihazı	MES, mpMINIpure
Derin dondurucu (-80°C)	WiseCryo, Simplified Freezing System
pH metre	Eutech Instruments
Çalkalayıcı (shaker)	Mini Rocker MR-1, BOECO
Vorteks	VELP, Scientifica, Vortev, Mixer
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	Assistent, TMA 2071
Isıtıcı (eppendorf)	Thermomixer Compact
Spektrofotometre	BİOKİT, ELx800, Bioelisa Reader
Spektrofotometre yazıcısı	EPSON, LX-300+
Etüv	SHEEL LAB CO ₂ Incubator Aü
Elektroforez ve blotting cihazı	Mini Protean System, BİO-RAD, Hercules, CA, USA
Güç kaynağı	Consort, E835, Electrophoresis Power Supply
Cerrahi malzemeler (pens, makas, bisturi)	
Otomatik pipet uçları	

3.1.3. Kullanılan ticari kitler, antikorlar ve kimyevi sarf maddeler

Çalışmada kullanılan ticari kitler Çizelge 3.3’te, kimyevi sarf maddeler Çizelge 3.4’te Antikorlar ve uygun dilüsyon oranları Çizelge 3.5’te listelenmiştir.

Çizelge 3.3. Ticari kitler

Ticari Kitler	Marka
Total Oksidan Durum (TOS)	Rel Assay Diagnostik, Gaziantep
Total Antioksidan Durum (TAS)	Rel Assay Diagnostik, Gaziantep
SIRT2 ELISA Kit	Cloud-Clone Corp., USA
Caspase-3/CPP32 ELISA Kit	YL Biont Co., Ltd., Shangai
Pierce BCA Protein Ölçüm Kiti	ThermoFisher Scientific, USA
Kemilüminesans substrat kiti (ECL Western Blotting Substrate)	Pierce TM (ThermoFisher Scientific), IL, USA

Çizelge 3.4. Kimyasal sarf malzemeler

Kimyevi Sarf Maddeler	
Zinc sulfate heptahydrate (ZnSO ₄)	Carlo Erba Reagent
Sulfanilamide (SA)	Sigma-Aldrich
Vanadium(III) chloride (VaCl ₂)	
N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride (NEDD)	MERCK, Germany
Sodium Nitrate	Fisher Scientific
Sodyum Hidroksit	MERCK, Germany
Fosfat tamponu (PBS) (10x)	Echotechbiotechnology
Potasyum klorür (KCl)	MERCK, Germany
Sodyum klorür (NaCl)	Riedel-de Haen, Seelze, Germany
Protein ekstraksiyon solüsyonu(Pro-Prep™)	İntron Biotechnology
Sığır serum albümini (BSA)	Pierce™ (ThermoFisher Scientific), IL, USA
Protein standardı (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standart)	ThermoFisher Scientific, MA, USA
Nitroselülöz membran (0,2 µm)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Tris/ Glisin (TG)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Gliserol	İnvitrogen, CA, USA
Tris Baz (TBS)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	MERCK, Germany
Bromofenol mavisi	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
β-merkaptotanol	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
Metanol	Riedel-de Haen, Seelze, Germany
%40 Acrylamide/Bis solüsyonu, 29:1	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Amonyum per sülfat (APS)	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
Tetrametil- etilendiamin (TEMED)	İnvitrogen, CA, USA
Yağsız süt tozu (Blotto, non-fat dry milk)	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
Tween 20	Bioshop Canada Inc.
X-ray film solüsyonu-developer, ILFORD ILFOSOL 3	HARMAN Technology Limited, UK
X-ray film solüsyonu-fixer, ILFORD RAPID FIXER	HARMAN Technology Limited, UK
Medikal X-ray film/ MXG film (18x24)	Carestream Health, Inc., NY, USA

Çizelge 3.5. Antikorlar ve uygun dilüsyon oranları

Antikor	Dilüsyon oranı	İmalatçı Firma
Purified anti β-actin	1:1000	Biolegend
β-actin sekonder	1:2000	İnvitrogen
SIRT2 (anti-rabbit monoclonal)	1:500	St John's Laboratory, Biolegend
Goat- anti mouse IgG(H+L) sekonder antikor	1:2000	İnvitrogen

3.2. Yöntem

3.2.1. Dokuda total oksidan durum (TOS) - total antioksidan durum (TAS) tayini

Pankreas dokusunda total oksidan durum (TOS) ve total antioksidan durum (TAS) tespit etmek için ticari kitler (RL0024, RL0017, Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, TURKEY)

kullanıldı. Prokole uygun olarak çalışılan kitlerden elde edilen TOS ve TAS ölçüm sonuçları kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı.

Doku homojenizasyonu

- Pankreas dokusu tartımı gerçekleştirildikten sonra 1:9 (w/v) oranında 140 mM KCl tamponu (pH: 7,4) eklendi.
- Buzlu ortamda doku homojenizatörü yardımıyla 10-15 sn kadar homojenize edildi.
- Doku homojenizatları 3000 rpm, +4 °C'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar çalışılincaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

TOS tayini

Kit çalışma prensibi:

Örnekte mevcut olan oksidanlar, ferröz iyon-şelatlayıcı kompleksini ferrik iyonla okside eder. Ferrik iyon ise asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu, örnek içindeki oksidan moleküllerin toplam miktarı ile orantılıdır. Ölçümler, hidrojen peroksit (10 µmol H₂O₂) ile kalibre edilir ve litre başına µmol H₂O₂ Equiv./L eşdeğeri cinsinden ifade edilir.

Kit içeriği:

- Tampon 1 (T1): Tampon Solüsyonu H₂SO₄ (25 mM, pH 1,75)
- Tampon 2 (T2): Substrat Solüsyonu H₂SO₄ (25 mM, pH 1,75)
- Standart (SSS: Stabilize Standart Solüsyonu): H₂O₂ (10 µmol/L)

Yöntem:

Kit içerisinde bulunan ve önerilen protokol referans alınmıştır (Erel, 2005). Aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- 30 µl deiyonize su (di su), standart ve örnekler sırasıyla mikropilaya kuyucuklarına eklendi.
- Bütün dolu kuyucuklara sırasıyla 200 µl T1 eklendi ve 30 sn süre ile çalkalandı.

- 595 nm’de spektrofotometre ile birinci okuma (A1) gerçekleştirildi.
- Hemen ardından 10 µl T2 eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 595 nm’de spektrofotometre ile ikinci okuma (A2) yapıldı.

Hesaplama yapılırken;

- $A2-A1 = \Delta \text{ Abs}$ (di su, standart veya örnek)
- Sonuç= $[(\Delta \text{ Abs örnek}) / (\Delta \text{ Abs standart})] \times 10^*$ (*SSS: Stabilize Standart Solüsyonu=10 µmol/L)

TAS tayini

Kit çalışma prensibi:

Hazırlanan süpernatant içindeki antioksidan maddeler, koyu mavi/yeşil renkli olan 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirger. 660 nm dalga boyunda absorbans değişimi, numunenin total antioksidan seviyesi ile bağlantılıdır. Test, geleneksel olarak E vitamini analogu (1 mmol/L) olan stabil bir antioksidan standardı olan Trolox ile kalibre edilir. Sonuçların birimi mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edilir.

Kit içeriği:

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

Yöntem:

Kit içerisinde bulunan ve önerilen protokol referans alınmıştır (Erel, 2004). Aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- 12 µl deiyonize su (di su), standart ve örnekler sırasıyla mikrolaka kuyucuklarına eklendi.
- Bütün dolu kuyucuklara sırasıyla 200 µl T1 eklendi ve 30 sn süre ile çalkalandı.
- 660 nm’de spektrofotometre ile birinci okuma (A1) gerçekleştirildi.

- Hemen ardından 30 µl T2 eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 660 nm’de spektrofotometre ile ikinci okuma (A2) yapıldı.

Hesaplama yapılırken;

- $A2-A1 = \Delta \text{ Abs}$ (di su, standart veya örnek)
- $\text{Sonuç} = [(\Delta \text{ Abs di su}) - (\Delta \text{ Abs örnek})] / [(\Delta \text{ Abs di su}) - (\Delta \text{ Abs standart})]$

Oksidatif stres indeksinin (OSI) hesaplanması

Oksidatif stres düzeyinin göstergesi olarak kabul edilen oksidatif stres indeksi (OSI), TOS değerlerinin TAS değerlerine oranlanması ile bulunan birimsiz (AU: arbitrary unit) bir parametredir. Hesaplama önce TAS birimi (mmol Trolox Equiv./L), µmol Trolox Equiv./L şekline dönüştürüldü.

$\text{OSI} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol Trolox Equiv./L}) \times 100]$ formülü kullanılarak hesaplama yapıldı (Yanık, Erel ve Kati, 2004).

3.2.2. NOx düzeyinin Griess yöntemi ile tayin edilmesi

Pankreas dokusunda Nitrit-nitrat düzeyinin tayini Griess yöntem kullanılarak çalışıldı (Miranda, Espey ve Wink, 2001). Aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulandı:

- 0,80 gr pankreas dokusu tartıldı ve 5 katı hacminde PBS (pH 7,4) eklenerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi.
- Ardından 2000 rcf’de +4 °C’de 5 dk santrifüj edildi.
- Alınan süpernatanın üzerine 250 µl 0,3 N NaOH eklenerek oda ısısında 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Süre bitiminde 250 µl %10’luk ZnSO₄ ilave edilerek vorteksleme işlemi yapıldı.
- 3000 rcf’de +4 °C’de 20 dk santrifüj edildi.
- İşlem bitiminde süpernatanın 500 µl alınarak 14000 rcf’de +4 °C’de 5 dk santrifüj edildi. Ve çalışılncaya kadar süpernatamlar -80 °C’de muhafaza edildi.

- ✓ NOx miktarını ölçmek için 1 birim süpernatant, 1 birim $VaCl_2$, 0,5 birim Süfanilamid, 0,5 birim NEDD (Griees reaktifi= 0,5 birim SA+ 0,5 birim NEDD) karışımı hazırlandı. 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümü yapıldı.

3.2.3. Kaspaz-3 ve SIRT2 protein ekspresyonunun Sandviç ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile tayin edilmesi

Pankreas doku örneğinde SIRT2 proteini ve Kaspaz-3 enzim ekspresyonunun kantitatif ölçümü için ticari ELISA kitleri (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Sirtuin 2(SIRT2), Katalog No:SEA430Ra, Lot#L190319125, Cloud-Clone Corp.,USA; Rat Cysteiny Aspartate Spesifik Proteinases-3 (Caspase-3) ELISA Kit, Katalog No:YLA0017RA, Lot#YL190610825, YL Biont Co., Ltd., Shangai) ile çalışıldı. Kitlerin uygulama aşamasında üreticinin önerdiği protokol referans alınarak deney basamakları tamamlandı.

Kullanılan kitlerin esas çalışma prensibi Nonkompetitif ELISA'ya (Sandwich yöntemi) dayanmaktadır. Bu yöntem diğerlerine göre daha spesifik bir yöntem olup antijen-antikor bağlanmasını sağlayarak sonradan eklenen substrat ile reaksiyona girer ve renk değişimi yaratır. Bu renk değişimi ise 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

ELISA için doku homojenatlarının hazırlanması

- 0,060 g tartılan pankreas dokusu buz üzerine alınarak 800 µl Protein Ekstraksiyon Solusyonu (Prop-Prep, Katalog No: 17081, İtron Biotechnology) her bir örneğe eklendi.
- Doku homojenizasyonu Sonics vibracell aracılığıyla (%50 amplitüd, 15-20 sn) homojenize edildi ve bu homojenatlar 30 dk boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi biter bitmez homojenatlar, +4 °C'de ve 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatantlar çalışılncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Total protein tayini

Hazırlanan örnek süpernatantlarında total protein düzeyini ölçmek için BCA Protein ölçüm kiti (Pierce BCA Protein Assay Kit, Ref:23225, lot#UD282967, Thermo Scientific, USA) kullanılarak, önerilen prokol referans alındı. BCA Protein tahlili, toplam proteinin kolorimetrik tespiti ve kantitatif ölçüm için biskinoninik aside (BCA) dayalı deterjan uyumlu bir formülasyonudur. Bu yöntem, bakır katyonunun (Cu^{+2}) Cu^{+1} 'e, alkali bir ortamda (biuret reaksiyonu) protein ile indirgenmesini, bisenkoninik asit içeren benzersiz bir reaktif kullanılarak, Cu^{+1} 'in oldukça hassas ve seçici kolorimetrik tespitini sağlar. Bu tahlilin mor renkli reaksiyon ürünü, iki BCA molekülünün bir Cu^{+2} iyonu ile şelatlanması ile oluşturulur. Suda çözünen bu kompleks, 540-595 nm'de, geniş bir çalışma aralığında (20-2000 $\mu\text{g/mL}$) artan protein konsantrasyonları ile doğrusal olan bir absorbans sergiler. Konsantrasyon-absorbans eğrisi sığır serum albümininden (BSA) hazırlanan bir dizi dilüsyon proteinden hazırlanır. Bu standart eğri temel alınarak her bir örnek içindeki bilinmeyen protein miktarının (mg/mL - $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) tayin edilmesini sağlar. Buna göre, protein konsantrasyonları genel olarak BSA gibi bilinen bir proteinin standartlarına referansla belirlenmiş olur.

Protein tayin basamakları aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

- Protein standardı olarak kit içerisinde bulunan Albumin standart ampülü (2 mg/ml) kullanılarak stok hazırlandı.
- Stok BSA'nın PBS ile uygun dilüsyonları hazırlanarak sırasıyla; 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml ve 0 mg/ml olacak şekilde 7 protein standardı hazırlandı.
- Mikrolaka kuyucuklarına sırasıyla 10 μl olacak şekilde tüm standartlar, PBS ile 10 kat dilüe edilen örneklerin her birinden 10 μl yüklendi. Bu aşamada ikişer tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara yüklemeler gerçekleştirildi.
- Yükleme tamamlanan standart ve örneklerin üzerine 200 μl Çalıştırma Reaktifi eklendi.
- Mikrolaka shaker=karıştırıcı ile 30 sn örnek/standart ile reaktif karıştırıldı.
- Mikrolaka üzeri seal ile kaplanarak 37 °C'de 30 dk inkübe edildi.
- Dalga boyu 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

- Microsoft Office Excel’de 7 protein standardının absorbansları kullanılarak lineer bir konsantrasyon-absorbans eğrisi oluşturuldu.
- Bu eğrinin denklemi oluşturularak ($y_{\text{cons}} = a x_{\text{abs}} + b$) her bir örnekte bulunan toplam protein miktarı (mg/ml) hesaplanmış oldu. Çıkan örnek sonuçları başlangıç aşamasında dilüe edildikleri için dilüsyon oranı (x10) ile çarpıldı.

SIRT2’nin ELISA ile saptanması

SIRT2’nin ELISA yöntemi ile tayininde Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Sirtuin2 (SIRT2) kiti (Katalog No:SEA430Ra, Lot#L190319125, Cloud-Clone Corp., USA) önerilen protokole uygun olarak çalışıldı. Kitin çalışma prensibi şöyledir:

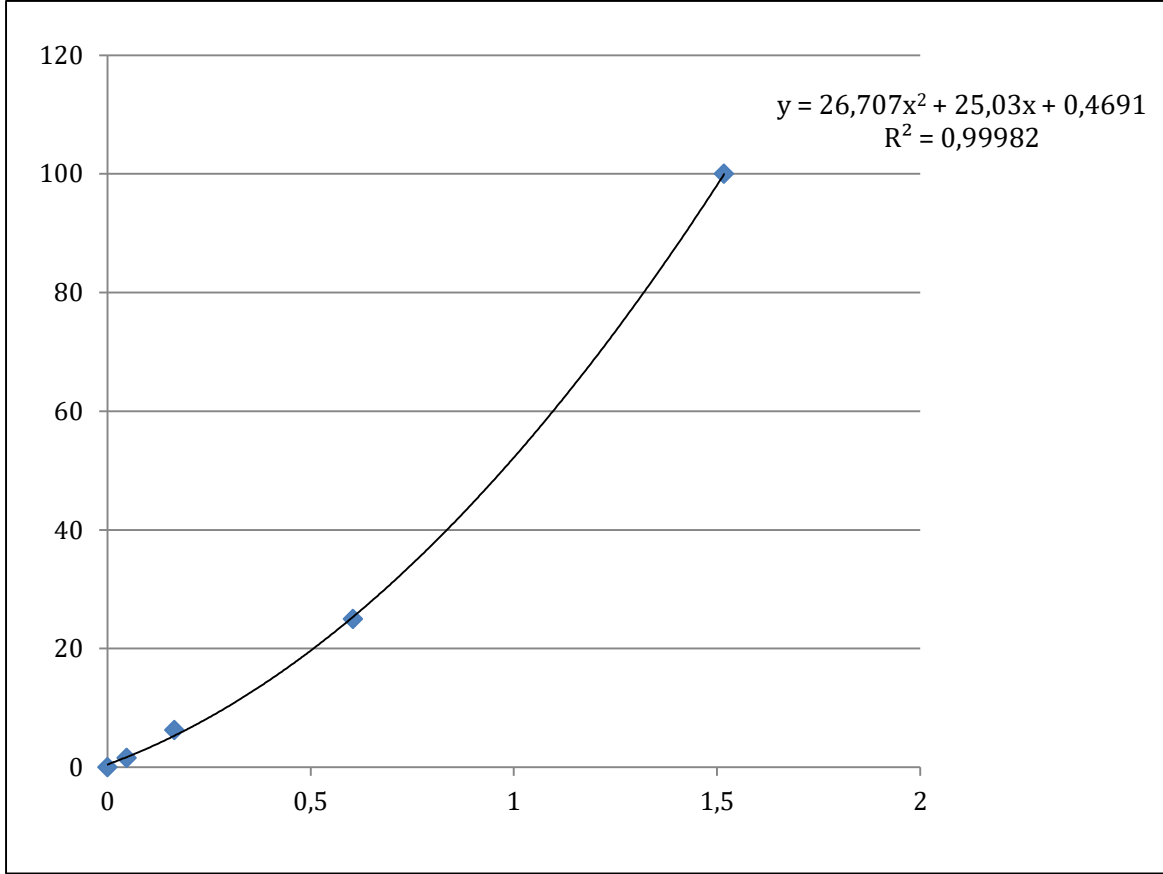
Kit içerisinde bulunan mikrolaka SIRT2’ye özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar veya örnekler daha sonra SIRT2’ye özgü biotin konjuge, antikor ile kaplanmış mikrolaka kuyularına eklenir. Daha sonra, Horseradish Peroxidase (HRP)’ye konjuge Avidin, her bir mikrolaka kuyusuna eklenir ve inkübe edilir. TMB substrat çözeltisi eklendikten sonra, sadece SIRT2, biotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyucukların renginde bir değişiklik yaratır. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisinin eklenmesi ile sonlandırılır ve renk değişikliği, 450nm $\pm$ 10nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Örneklerdeki SIRT2 konsantrasyonu, standartların Optical Density (O.D.) değerleriyle karşılaştırılarak değerlendirilir.

Kit İçeriği:

- Antikorla kaplanmış mikrolaka
- Standart
- Tespit (detection) solüsyonu A
- Tespit (detection) solüsyonu B
- Tahlil (assay) solüsyonu A
- Tahlil (assay) solüsyonu B
- TMB substrat solüsyonu
- Yıkama Solüsyonu
- Mikrolaka kaplayıcı
- Durdurma (stop) solüsyonu

İşlem sırası aşağıdaki gibidir:

- 200 ng/ml konsantrasyona sahip olan stok standardından diğer standart dilüsyonları 100 ng/ml, 25 ng/ml, 6,25 ng/ml, 1,56 ng/ml toplamda 4 standart olacak şekilde hazırlandı.
- ELISA için doku homojenatlarının hazırlanma aşamasında anlatıldığı gibi hazırlanan örnekler mikropalakaya yüklenmek için -80 °C'den çıkarılarak hazır hale getirildi.
- Mikropalaka kuyucuklarına 100 µl miktarında ikişer tekrarlı sırayla blank(boş), 4 standart dilüsyonu ve örnekler yüklendi.
- Mikropalaka üzeri kapatılarak 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
- Süre bitiminde mikropalakadaki sıvı dökülerek yıkama yapılmadan 100 µl Detection Reagent A çalışma çözeltisi eklenerek, kuyucuklar plaka kaplayıcı ile kapatıldı ve 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.
- Tamamlanan inkübasyonu takiben sıvı dökülerek her kuyucuğa 350 µl Yıkama solüsyonu (x1) eklendi ve 1-2 dk bekletilerek sıvı döküldü. Bu yıkama işlemini 3 kez yapıldı.
- Ardından 100 µl Detection Reagent B çalışma çözeltisi eklendi ve kuyucuklar plaka kaplayıcı ile kapatılarak 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
- Mikropalakadaki sıvı dökülerek yıkama işlemine geçildi ve 5 kez yıkama yapıldı.
- Her kuyucuğa 90 µL Substrat solüsyonu eklenerek plaka kapatıcı ile kaplandı. 37°C'de 10-20 dk inkübe edildi. Renk maviye dönüştü. Bu aşamada mikropalakanın ışıktan korunması sağlandı.
- İnkübasyon bitiminde her kuyucuğa 50 µl Durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma çözeltisi eklendiğinde mavi olan sıvının sarıya dönüşümü gözlemlendi.
- Plakanın tabanındaki herhangi bir su damlasının, kabarcığın ve parmak izinin kalmamasına dikkat edilerek hemen 450nm'de ölçüm yapıldı.
- Çıkan absorbans sonuçları total protein miktarına oranlanarak hesaplandı.
- R^2 değeri aşağıdaki bulundu:



Şekil 3.1. SIRT2'nin R² değeri

Kaspaz-3 protein miktarının ELİSA yöntemi ile saptanması

Kaspaz-3 protein miktarının ELISA ile saptanmasında Rat Cysteinyl Aspartate Spesifik Proteinases 3 (Caspase-3) ELISA Kiti (Katalog No:YLA0017RA, Lot#YL190610825, YL Biont Co., Ltd., Shanghai) kullanıldı. İmalatçının önerdiği protokole uygun olarak çalışma yapıldı.

Kitin çalışma prensibi:

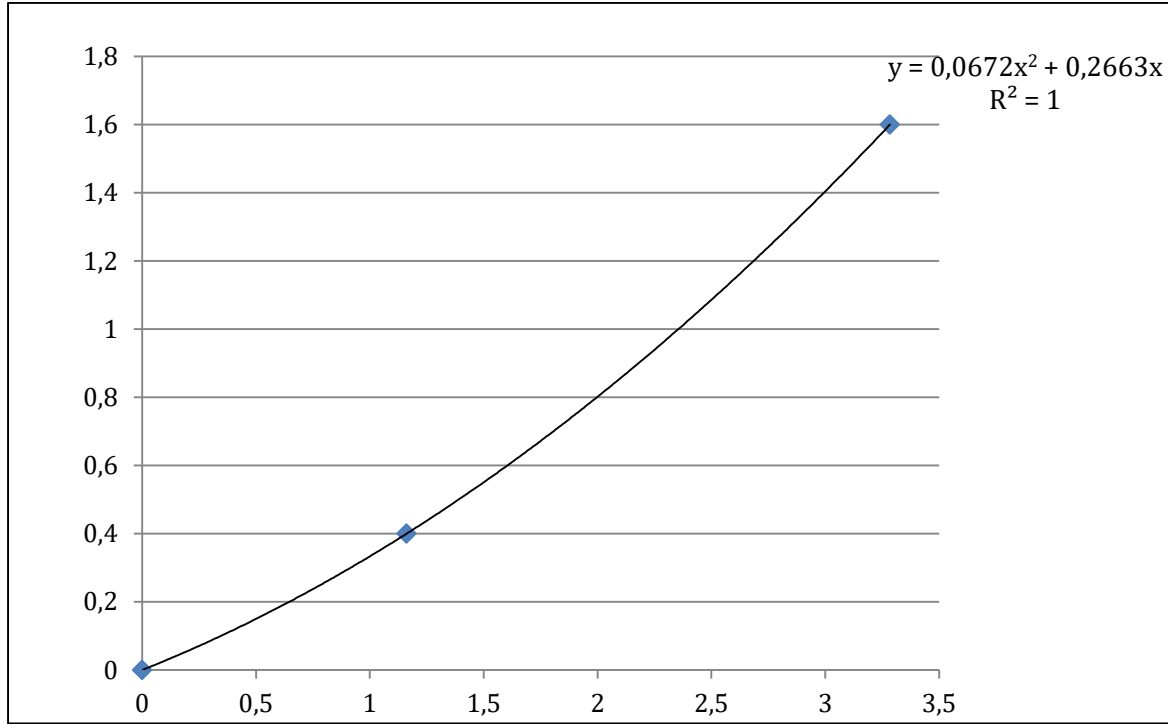
Bu kit, Rat sisteinil aspartat spesifik proteinazlar 3'ü (kaspaz-3) tahlil etmek için biotin çift antikorlu sandviç teknolojisine dayanan enzim bağlı immün sorbent tahlili (ELISA) kullanır. Monoklonal kaspaz-3 antikorlu ile kaplanmış mikropılaka kuyucukları, bağışıklık kompleksi oluşturan streptavidin-HRP ile birleşmesi için biotin ile anti kaspaz-3 antikorları etkileşime girer. Ve mavi renk oluşumu gözlenir. Daha sonradan eklenen substratların asidik etkisiyle mavi renk sarı renge dönüşür. Renk tonlamaları, kaspaz-3 konsantrasyonu ile pozitif olarak koreledir.

Kitin içeriği:

- Antikor ile kaplanmış mikrolaka
- Standart dilüsyonu
- Kromojen A solüsyonu
- Kromojen B solüsyonu
- Streptavidin-HRP tampon
- Standart solüsyon (stok)
- Yıkama solüsyonu
- Durdurma solüsyonu
- Anti-kaspaz-3 antikor (biotinli)

İşlem Basamakları:

- Standart solüsyondan (stok), 0,4 ng/ml, 1,6 ng/ml, 3,2 ng/ml ve 6,4 ng/ml olacak şekilde 4 standart dilüsyonu hazırlandı.
- İlk mikrolaka kuyusu boş bırakılarak sırasıyla 50 µl 4 standart ve 40 µl örnekler yüklendi.
- Örnek ve standartların üzerine son hacim 100 µl olacak şekilde 50 µl streptavidin-HRP eklendi.
- Sadece örneklerin üzerine 10 µl kaspaz-3 antikor eklenerek mikrolaka üzeri kapatıldı ve 37 °C’de 60 dk inkübe edildi.
- Ardından mikrolaka tersyüz edilerek, dilüe edilen yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıldı.
- Her bir kuyucuğa 50 µl Kromojen A eklendi. Hemen ardından 50 µl Kromojen B eklenip iyice karışması sağlandı. Ve renk değişiminin sağlanması için ışıktan koruyarak, 37 °C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- Süre bitimini takiben 50 µl Durdurma solüsyonu eklendi ve mavi rengin aniden sarı renge dönüşümü gözlemlendi.
- 450 nm dalğa boyunda ölçüm gerçekleştirildi.
- R² değeri aşağıdaki gibi bulundu:



Şekil 3.2. Kaspaz-3'ün R^2 değeri

3.2.4. SIRT2 protein ekspresyonunun Western-Blotting/SDS-PAGE metodu ile tayini

Western-Blot yöntemi

Western blot, örneklerde bulunan tüm proteinlerin arasından tespit edilmek istenilen tek bir proteini özgün bir şekilde saptanmasında kullanılan ve moleküler biyolojide en yaygın olan yöntemdir. Bu yöntemle tespit edilmek istenen proteinin örnekte bulunup bulunmadığı ve bulunduğu takdirde kantitatif olarak farklı gruplar arasındaki miktarı hesaplanabilmektedir.

Western blot yöntemi şu aşamalardan oluşur:

- ✓ Örneklerin hazırlanması
- ✓ Jel dökümü
- ✓ Yükleme
- ✓ Yürütme
- ✓ Transfer
- ✓ Bloklama
- ✓ Antikor yükleme
- ✓ Görüntüleme ve analiz

Jel dökümü için hazırlanan çözeltiler

- Ayırma jeli (resolving gel) % 12' lik, 10 ml (2 jel için)
 - 4,25 ml distile su
 - 3 ml % 40' lık Acrylamide/Bis solüsyonu
 - 2,5 ml 1,5 M tris (pH 8,8)
 - 100 µl % 10' luk SDS
 - 100 µl % 10' luk APS
 - 10 µl TEMED
- Yığınlama jeli (stacking gel) % 6' lık 5 ml (2 jel için)
 - 2,9 ml distile su
 - 0,75 ml % 40' lık Acrylamide/Bis solüsyonu
 - 1,25 ml 0,5 M tris (pH 6,8)
 - 50 µl % 10' luk SDS
 - 50 µl % 10' luk APS
 - 5 µl TEMED
- 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Tris baz MA:121,14 g/mol)
 - 6 g tris baz 60 ml distile su ile çözdürüldü.
 - 6 N HCl ile pH ayarı yapılır (pH 6,8)
 - Son hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.
- 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Tris baz MA:121,14 g/mol)
 - 27,23 g tris baz 80 ml distile su ile çözdürüldü.
 - 6 N HCl ile pH ayarı yapılır (pH 8,8)
 - Son hacim distile su ile 150 ml' ye tamamlandı.
- % 10 (w/v) SDS
 - 10 g SDS 100 ml distile su ile çözdürüldü.

- % 10 (w/v) APS
 - 0,1 g APS 1 ml distile su ile çözdürüldü.
 - Günlük taze hazırlanması gerekir.

SDS-PAGE / Western blot yöntemi için hazırlanan diğer çözeltiler

- Örnek tamponu (sample buffer) (×2) stok
 - 1,25 ml tris-HCl (0,5 M pH 6,8)
 - 2,5 ml gliserol
 - 2 ml % 10' luk SDS
 - 0,2 ml % 0,5' lik bromofenol mavisi
 - Son hacim 9,5 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.
 - Kullanımdan hemen önce, 1 ml için; 50 µl β-merkaptoetanol ve 950 µl hazırlanan bu tampondan karıştırıldı.
- % 0,5 (w/v) Bromofenol mavisi
 - 0,05 gr bromofenol mavisi 10 ml distile su içinde çözdürüldü.
 - Steril filtreden geçirilir.
- Yürütme tamponu (running buffer) (×10) stok, pH 8,3
 - 30,3 g tris baz
 - 144 g glisin
 - 10 g SDS
 - Son hacim 1 L olacak şekilde distile su içinde çözdürüldü.
 - (×1) kullanım için; 100 ml stok yürütme tamponu distile su ile 1 L' ye tamamlandı.
- Transfer tamponu (transfer buffer) (×10) stok
 - 30,3 g tris baz
 - 144 g glisin
 - Son hacim 1 L olacak şekilde distile su içinde çözülür

- İhtiyaç duyulan tampon miktarı % 20 metanol içerecek şekilde hazırlanır. (×1) kullanım için; 100 ml stok transfer tamponu ve 200 ml metanol, distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- Yıkama tamponu (TBS-T; Tris Buffered Saline with Tween 20) (×10) stok, pH 7,5
 - 12,11 g tris baz
 - 87,66 g NaCl
 - 5 ml tween 20
 - 800 ml distile suda çözülür ve konsantre HCl ile pH ayarı yapılır (pH 7,5)
 - Son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı.
 - (×1) kullanım için; 100 ml stok yıkama tamponu distile su ile 1 L' ye tamamlandı.
- Membran bloklama tamponu (% 5' lik)
 - 5 gr yağsız süt tozu son hacim 100 ml olacak şekilde yıkama tamponu ile çözülür.
 - Transfer işlemi sonrasında tüm membranlar, membranı kaplayacak miktarda kullanılan bu tampon içinde (yaklaşık 25 ml) + 4 °C' de gece boyunca bloklanır.
- Antikor tamponu (% 5' lik)
 - Membranların primer ve sekonder antikorlar ile inkübasyonu için kullan bu tampon esasen uygun antikor dilüsyonlarının yapıldığı (Çizelge 3.4) membran bloklama tamponudur. Tüm antikorlar için % 2' lik süt tozunda bloklama yapıldı.

Western-Blotting aşamaları

SDS-PAGE için jel dökümü aşaması

SDS-PAGE için jel dökümünü gerçekleştirmek için BIO-RAD, Mini protean system, (Hercules, CA, USA) içinde bulunan jel dökme standları ve diğer aparatları kullanılarak % 6-12 jel dökümü yapıldı. İlk basamak olarak 2 jel için 10ml olacak şekilde ayırma jeli (%12) çözeltisi hazırlandı. Temiz olan cam plakalar hazırlandıktan sonra, çözeltiye APS ve TEMED eklenerek 5 ml bu cam plakalar arasına döküldü. Üzeri distile su ile kaplanarak 45 dk jel polimerizasyonu beklendi. Süre bitimini takiben jelin üstündeki su dökülüp üzerine yığınlama jeli (%6) için hazırlanan çözelti (2 jel için 5 ml) döküldü. Son basamakta,

yükleme kuyucuklarının oluşturulması için tarak (1 mm'lik, 15 kuyucuklu) yerleştirilerek jelin polimerizasyonu için yine 45 dk beklendi.

Jel elektroforez aşaması

Pankreas dokusundan hazırlanan her bir örnek için, 20 µg proteini içerecek şekilde yükleme çözeltileri hazırlandı. Total protein içeriği 12,6 mg/ml olarak ölçülen bir doku örneğinden 20 µg protein yüklemesi yapmak (son hacim 15 µl olacak şekilde) için aşağıda örnek olarak verilen hesaplama kullanıldı:

Örnek yükleme çözeltisi:

- Örnek tamponu (sample buffer): (×2) hazırlanmış stoktan 7,5 µl
- Örnek: 1,6 µl [(20 µg protein yüklemek için gerekli volüm=20/protein konsantrasyonu) formülü ile hesaplandı ve $1,6 = 20 / 12,6$ şeklinde bulundu].
- Distile su: Örnek yükleme çözeltisinin son hacmini 15 µl' ye tamamlamak için 5,9 µl distile su

Yukarda gösterilen hesaplama şekliyle, her bir örnek 0,2 ml' lik eppendorflar içinde hazırlanarak, protein denaturasyonu için 95 °C' de 5 dk kaynatıldı (Eppendorf, Thermomixer Compact). Soğuması için buz içine alınan örnekler, tüm hacim alınarak jel kuyularına yüklendi. Her bir jelin ilk kuyusu protein standardı olacak şekilde (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 3 µl ile yüklendi. Moleküler ağırlıkların (kDa) belirlenmesinde bu protein standardı referans alınacaktır. Örneklerin jellere yüklenmesi tamamlandıktan sonra elektroforez tankı (Mini protean system, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) cam plakaları kapatacak miktarda yürütme tamponu (running buffer, pH 8,3) ile dolduruldu. Güç kaynağı (Consort E835, Electrophoresis Power Supply) 150 V' a ayarlanarak yaklaşık 2 saat boyunca elektroforez işlemi sürdürüldü.

Proteinlerin membrana transferi (Blotlama) aşaması

Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, BIO-RAD, Mini protean system, (Hercules, CA, USA) cihazının ıslak-transfer modülü sayesinde nitroselüloz memrana transfer edilecektir. İşleme geçmeden önce sırasıyla transfer kasetinin aparatları, süngerler

ve filtre kağıtları elektroforez işleminin tamamlanmasına yakın transfer tamponu içinde ıslatıldı. Nitrosellüloz membran (162-0112, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) da 1-2 dk distile su içinde ıslatıldı. Elektroforez işlemi bittikten sonra cam plakalardan dillatlice jel çıkartıldı. Sırasıyla önce transfer tamponu içine alınarak ardından artı kutuptan eksi kutuba doğru; sünger, filtre kağıtları, membran, jel, filtre kağıtları ve sünger şeklinde yerleştirilerek transfer kaseti hazır hale getirildi. Takiben transfer tamponu ile dolu olan modüle yerleştirilerek 350 mA'da 1 saat boyunca transferi sağlandı.

İmmunoblotlama (Antikor inkübasyonu) aşaması

Transferi gerçekleşen nitrosellüloz membranlar yıkama tamponunda (TBST) 5 dk süre ile yıkandı ve %5'lik yağsız süttozunda bloklama işleminin yapılabilmesi için + 4 °C' de gece boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Böylece tespit etmek istediğimiz proteinimizin membranda non-spesifik bağlanma bölgeleri engellendi. Bloklama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar boyutlarına uygun kutulara alınarak çalkalayıcı üzerinde 5 dk süre ile 3 kez TBST içinde yıkandı.

Hedef proteinlerin primer antikorlarının uygun dilüsyonları (Çizelge 3.5) yağsız süt tozu ile hazırlandı. Membranların primer antikor ile inkübasyonları oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat yapıldı. Ardından membranlar 5 dk süre ile 3 kez yıkandı. HRP (horseradish peroxidase)-konjuge seçilen sekonder antikorlar, yağsız süt tozu ile hazırlanan % 5' lik antikor tamponuyla uygun oranlarda dilüe edildi (Çizelge 3.5). Membranların sekonder antikor inkübasyonları çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat süre ile oda sıcaklığında yapıldı. Sekonder antikor inkübasyonları tamamlandıktan sonra membranlar son kez 5 dk süre ile 3 defa yıkandı.

Görüntüleme ve analiz aşaması

İmmunoblotlama işlemleri tamamlanan membranlarda bulunan hedef proteinlerin X-ray filminde görünür olmalarını sağlayan kemilüminesans substrat çalışma kiti kullanıldı (ECL Western Blotting Substrate, Pierce™ (Thermo Sci.), IL, USA). Kit içinde bulunan iki solüsyon eşit oranda karıştırılarak membran yüzeyi kaplanarak 1 dk inkübe edildi. Hemen ardından karanlık odada, hedef bantların medikal X-ray film üzerinde görünür hale gelmesi sağlandı.

X-ray filmler 600 dpi' de tarandıktan sonra, görüntüler TIF formatında kaydedildi. Bant yoğunluklarının hesaplanmasında Image J programı kullanıldı (Windows version of NIH Image, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Son aşama olarak, her bir hedef proteinin bant yoğunluğu yükleme kontrolü olarak seçilen β -aktine oranlanarak standardize edildi.

3.2.5. Kullanılan istatistiksel yöntem

Çalışmamızdaki verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 15.0 for Windows” programı kullanıldı. Yaşlı ve genç grupları arasında ANOVA deseni ile LSD kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde ise Pearson r'si kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

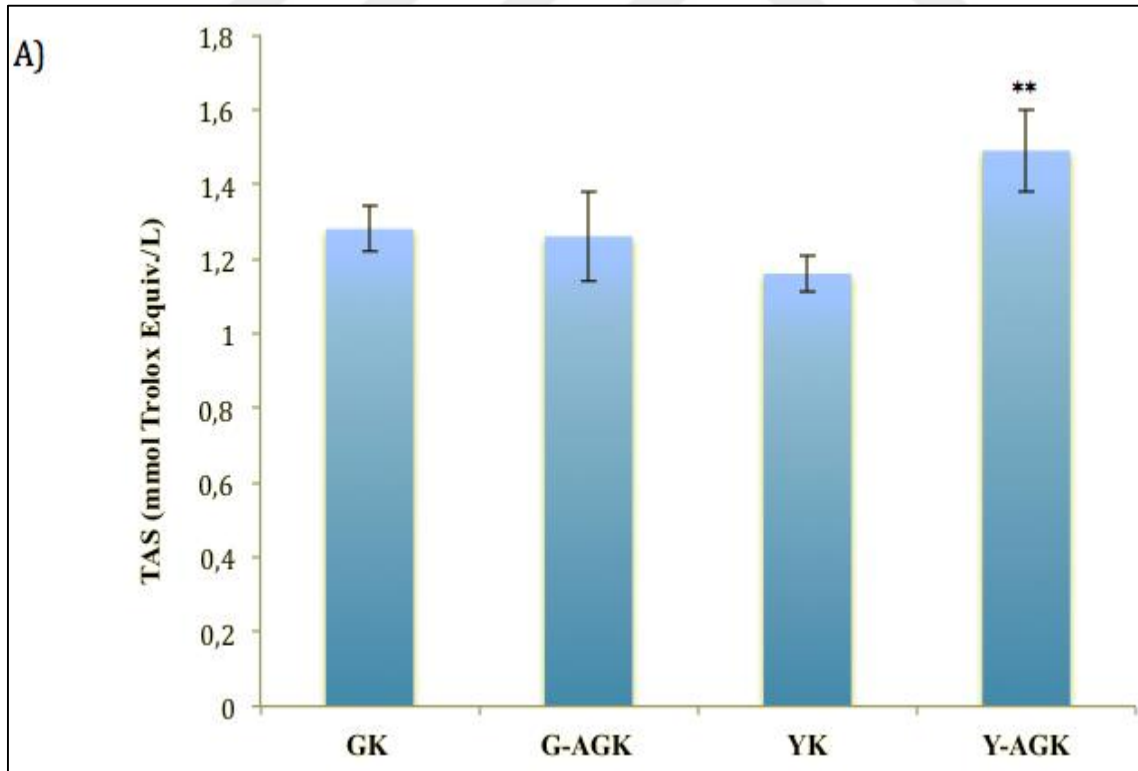


4. BULGULAR

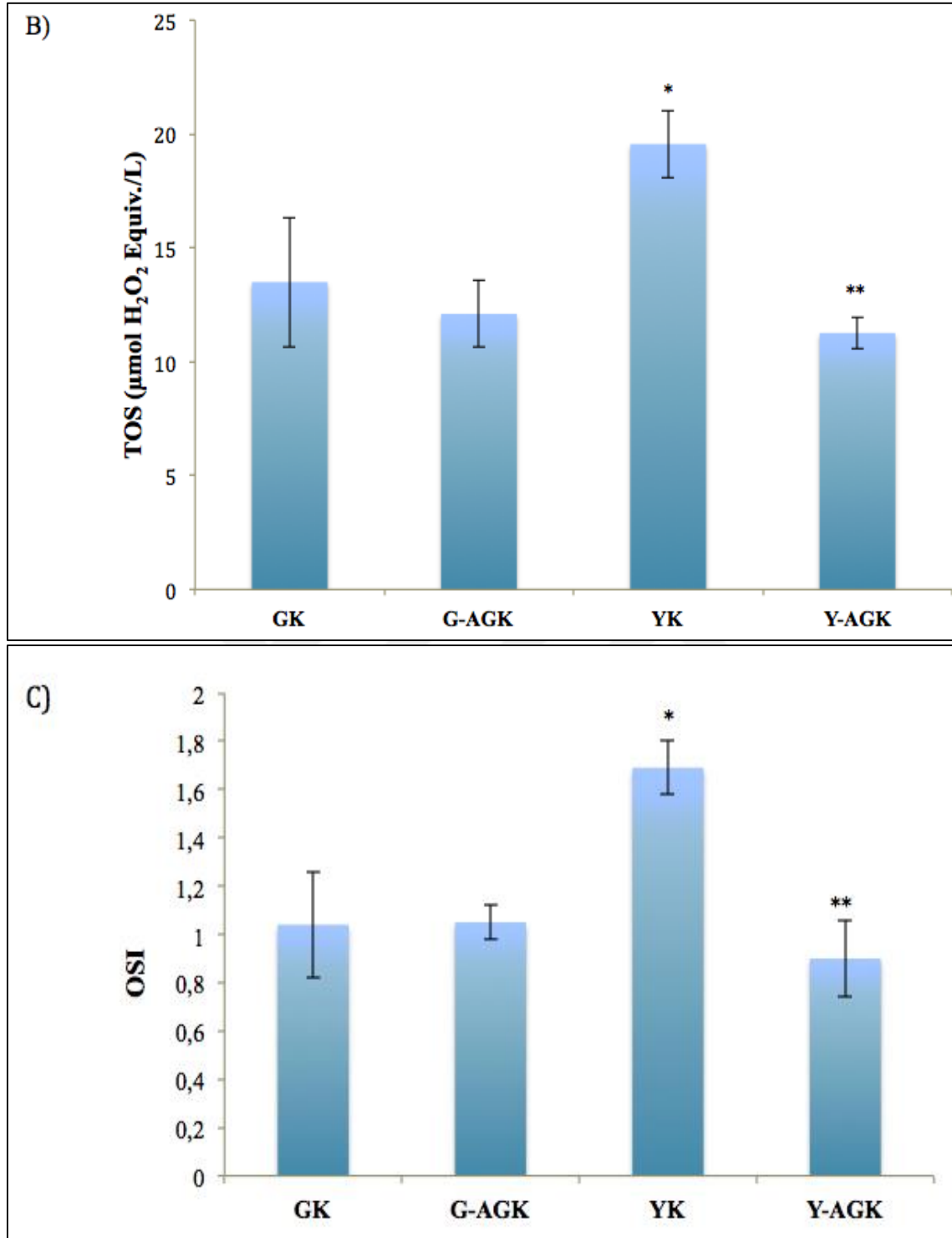
4.1. TAS, TOS Değeri ve OSI Değişimleri

Gençlerde TAS düzeyi deney grubu ile kontrol grubunda farksız iken, yaşlı sıçanlarda AGK-2 uygulaması TAS düzeyini, yaşlı kontrol grubunda anlamlı olarak arttırdı ($p=0,015$). Yaşlanma ile birlikte pankreas dokusunda TOS düzeylerinin genç kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdiği ve AGK-2 uygulamasının ise yaşlı sıçanlarda bu durumu tersine çevirdiği bulundu ($p=0,027$, $p=0,004$, $p<0,05$).

TOS düzeyinin, TAS düzeyine oranlanması ile elde edilen OSI, yaşlı kontrol grubunda genç kontrole göre yüksek bulundu ($p=0,007$). Ayrıca yaşlı sıçanlara uygulanan AGK-2, yaşlı kontrol grubuna göre OSI değerini anlamlı olarak azalmasını sağladı ($p=0,002$). Ayrıca TAS düzeyi, OSI değeri arasında negatif yönde korelasyon görülürken ($p=0,046$), TOS düzeyi ile OSI arasında pozitif yönde korelasyon bulundu ($p=0,000$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. TAS, TOS, OSI değışimleri

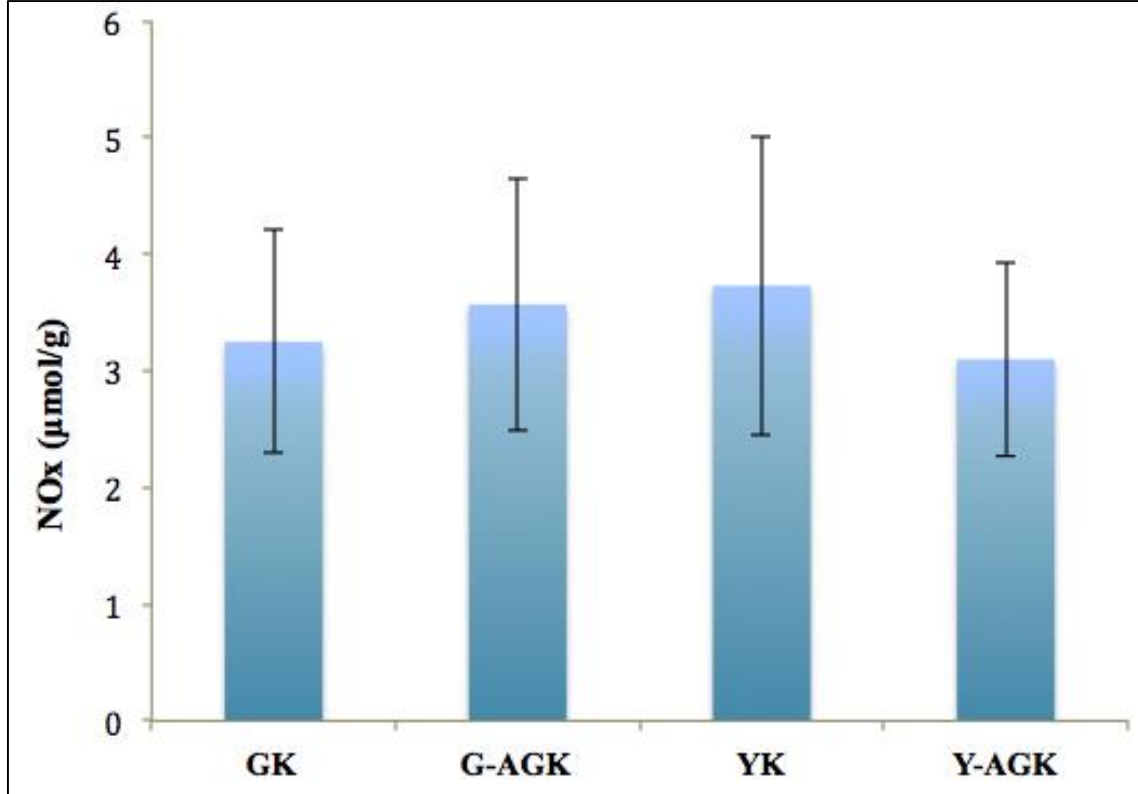


Şekil 4.1. (devam) TAS, TOS, OSI değişimleri

AGK-2 uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve yaşlı sıçanlarda değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir: A) TAS (mmol Trolox Equiv./L) (YK=1,16 $\pm$ 0,05; Y-AGK=1,49 $\pm$ 0,11) B) TOS (μ mol H₂O₂ Equiv./L)(GK=13,5 $\pm$ 2,85; YK=19,56 $\pm$ 1,48; Y-AGK=11,26 $\pm$ 0,71) C) OSI değişimleri (OSI = [(TOS, μ mol H₂O₂ Equiv./L) / (TAS, μ mol Trolox Equiv./L) $\times$ 100] formülü kullanılarak hesaplama yapıldı (GK=1,04 $\pm$ 0,22; YK=1,69 $\pm$ 0,11; Y-AGK=0,90 $\pm$ 0,16). *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmekte (GK:Genç Kontrol, G-AGK: Genç AGK, YK:Yaşlı Kontrol, Y-AGK: Yaşlı AGK)

4.2. NOx Düzeyinin Gruplardaki Değişimleri

Yaşlı kontrol grubunda, gençlere göre artan bir NOx değişimi dikkat çekmekle birlikte gruplar arasında anlamlı bir değişim tespit edilmedi ($p>0,05$). Benzer şekilde Yaşlı AGK-2 grubu, yaşlı kontrol grubuna göre NOx düzeyini azaltmakla birlikte bu iki grup arasında anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$).

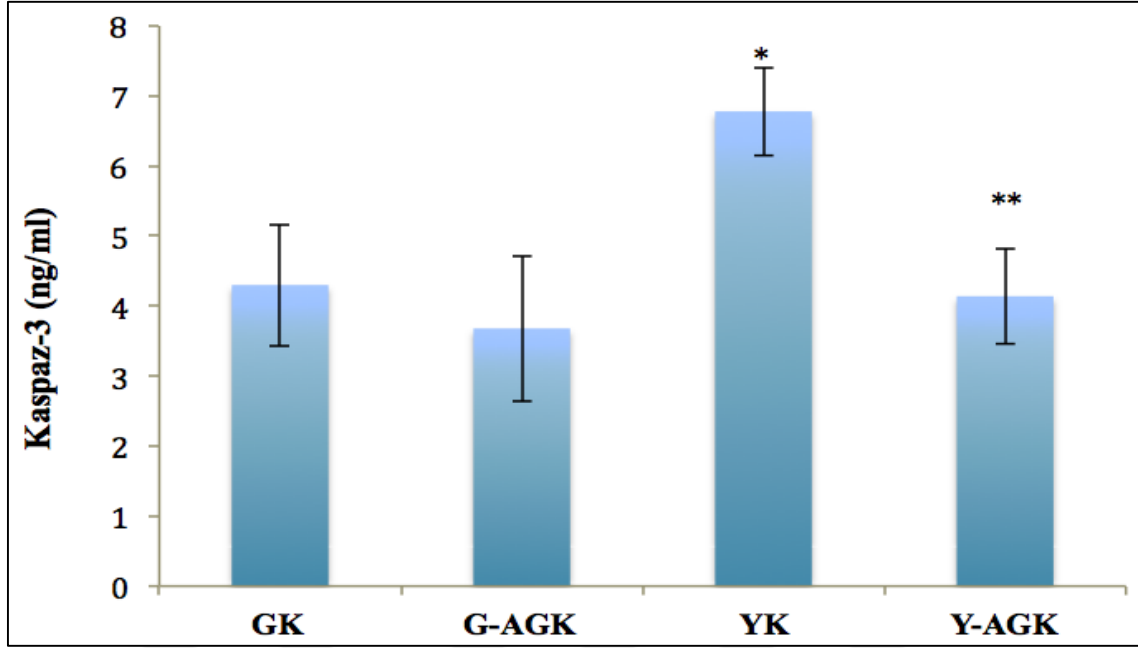


Şekil 4.2. NOx değişimi

AGK-2 uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve yaşlı sıçanlarda NOx değişimi (µmol/g) değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir ($p>0,05$). $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. (GK:Genç Kontrol, G-AGK: Genç AGK, YK:Yaşlı Kontrol, Y-AGK: Yaşlı AGK)

4.3. Kaspaz-3 Değişimleri

Pankreas dokusunda Kaspaz-3 protein ekspresyonu yaşlanma ile anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,046$). Yaşlı gruba uygulanan AGK-2, kendi kontrol grubuna göre kaspaz-3'ü anlamlı olarak azaltılmasında etkili görüldü ($p=0,034$). Ayrıca kaspaz-3, hem western hem de ELISA ile tayin edilen SIRT2 ekspresyonu ile pozitif korelasyon bulundu ($p=0,025$, $p=0,002$, $p<0,05$).



Şekil 4.3. Kaspaz-3 değişimi

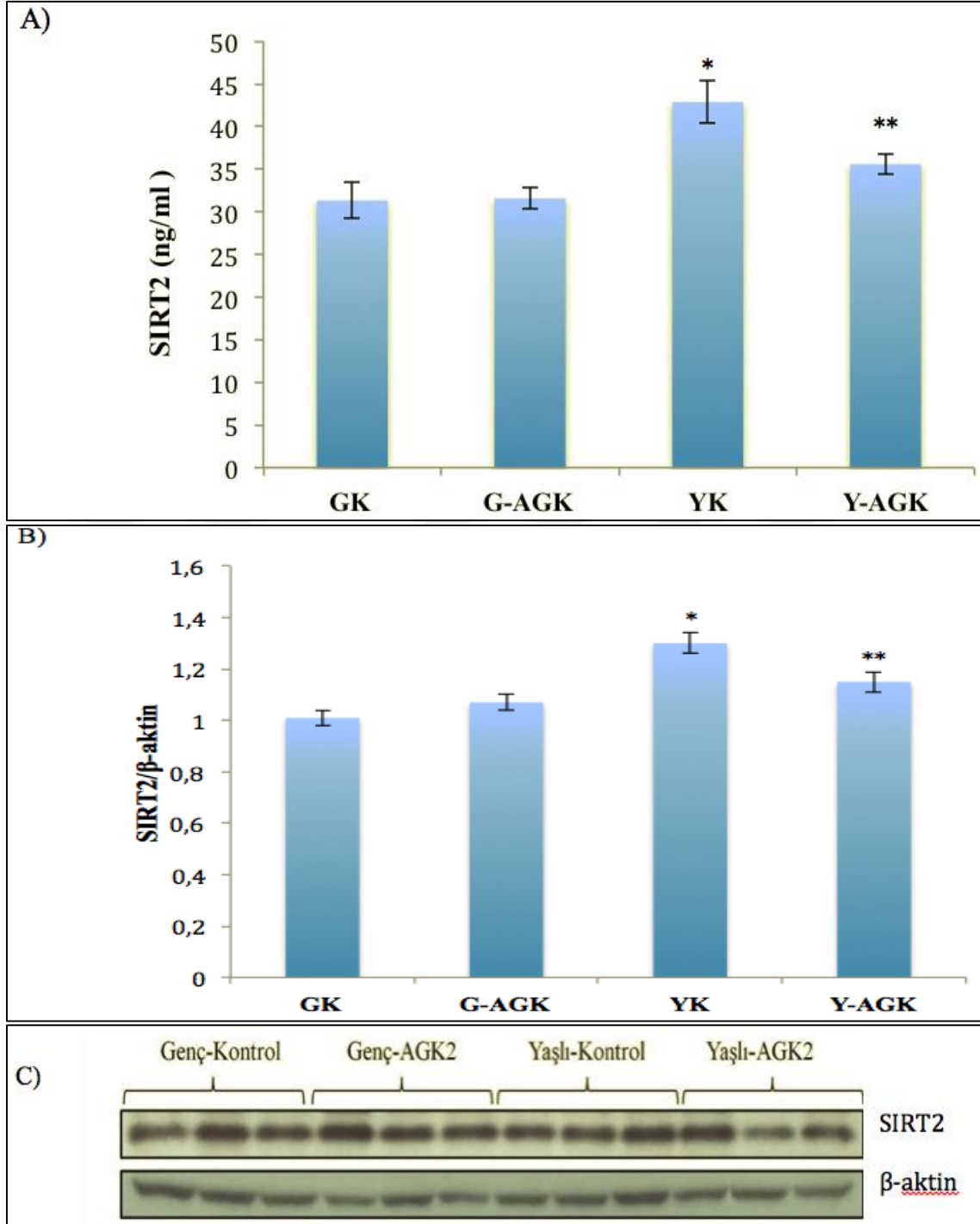
AGK-2 uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve yaşlı sıçanlarda Kaspaz-3 protein miktarı (ng/ml) değerleri ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir (GK=4,30 $\pm$ 0,87; YK=6,78 $\pm$ 0,63; Y-AGK=4,14 $\pm$ 0,68). *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmektedir. (GK:Genç Kontrol, G-AGK: Genç AGK, YK:Yaşlı Kontrol, Y-AGK: Yaşlı AGK)

4.4. SIRT2 Değişimleri

Western blotlama ile tayin edilen SIRT2 protein ekspresyonu (SIRT2/ β -aktin), yaşlı kontrol grubunda genç kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,000$). Bu bulgulara benzer bir biçimde ELISA yöntemi ile ölçülen SIRT2 protein ekspresyonu (ng/mg protein) genç kontrol grubuna göre yaşlı kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,000$).

Yaşlı sıçanlara uygulanan AGK-2, hem western hem de ELISA ölçümlerinde yaşlı kontrol grubuna göre SIRT2 protein ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı bulundu ($p=0,009$, $p=0,011$).

SIRT2 protein ekspresyonunun Western ve ELISA yöntemleri ile ortaya çıkan sonuçları arasında pozitif yönde korelasyon olduğu tespit edildi ($p=0,015$). Western ile tayin edilen SIRT2 ekspresyonu ile kaspaz-3 protein ekspresyonu arasında pozitif yönde korelasyon olduğu ($p=0,025$), aynı pozitif korelasyonun ELISA ile tayin edilen SIRT2 ile kaspaz-3 arasında da olduğu görüldü ($p=0,002$). Bu verilere ek olarak Western ile tayin edilen SIRT2 protein ekspresyonu ile TOS ve OSI değerleri sınırda pozitif yönde korelasyon bulundu ($p=0,065$, $p=0,067$).



Şekil 4.4. SIRT2 değişimleri

A) AGK-2 uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve yaşlı sıçanlarda SIRT2 protein miktarı (ng/ml), ELISA. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir (GK=31,34 $\pm$ 2,14; YK=42,87 $\pm$ 2,45; Y-AGK=35,59 $\pm$ 1,23). *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmekte B)AGK-2 uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve yaşlı sıçanlarda SIRT2 protein miktarı (SIRT2/ β -aktin), Western-blot. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir (GK=1,01 $\pm$ 0,03; YK=1,30 $\pm$ 0,04; Y-AGK=1,15 $\pm$ 0,04). *Genç kontrol grubuna kıyasla; **Yaşlı kontrol grubuna kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşmayı ifade etmekte C) AGK-2 uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve yaşlı sıçanlarda SIRT2 protein miktarı (SIRT2/ β -aktin), Western-blot. Western blot yöntemi ile pankreas dokusuna ait bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak seçilen β -aktine oranlanarak (SIRT2/ β -aktin) standardize edilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir (GK:Genç Kontrol, G-AGK: Genç AGK, YK:Yaşlı Kontrol, Y-AGK: Yaşlı AGK).

Çizelge 4.1. AGK-2 uygulanmayan (kontrol) ve uygulanan (deney) genç ve yaşlı sıçanlarda oksidatif stres, kaspaz-3 ve SIRT2 değerleri ortalama $\pm$ standart hata

Pankreas	Genç		Yaşlı	
	Genç-Kontrol	Genç-AGK2	Yaşlı-Kontrol	Yaşlı-AGK-2
TAS (mmol Trolox Equiv./L)	1,28 $\pm$ 0,06	1,26 $\pm$ 0,12	1,16 $\pm$ 0,05 *	1,49 $\pm$ 0,11 *
TOS (μ mol H ₂ O ₂ Equiv./L)	13,5 $\pm$ 2,85	12,10 $\pm$ 1,45	19,56 $\pm$ 1,48 *	11,26 $\pm$ 0,71 **
OSI	1,04 $\pm$ 0,22	1,05 $\pm$ 0,07	1,69 $\pm$ 0,11 *	0,90 $\pm$ 0,16 **
NOx (μ mol/g)	3,25 $\pm$ 0,96	3,57 $\pm$ 1,08	3,73 $\pm$ 1,28	3,10 $\pm$ 0,83
Kaspaz-3 (ng/ml)	4,30 $\pm$ 0,87	3,68 $\pm$ 1,04	6,78 $\pm$ 0,63 *	4,14 $\pm$ 0,68 **
SIRT2 (ng/ml)	31,34 $\pm$ 2,14	31,57 $\pm$ 1,21	42,87 $\pm$ 2,45 *	35,59 $\pm$ 1,23 **
SIRT2/ β -aktin	1,01 $\pm$ 0,03	1,07 $\pm$ 0,03	1,30 $\pm$ 0,04 *	1,15 $\pm$ 0,04 **

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

5. TARTIŞMA

Yaşlanma; her canlıda görünen, tüm işlevlerde azalmaya neden olan evrensel bir süreçtir. Fizyolojik gerilemeyle ilişkili doğal bir biyolojik süreç olan yaşlanma, yaşamsal fonksiyonlarda ve salgı sentezleme kapasitelerinde genel bir azalma ile birlikte (Guevara, Gianotti, Roca ve Oliver, 2011; Long ve diğerleri, 2009). Yaşlanma özellikle T2DM, kanser, metabolik kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların insidans ve mortalitenin artmasına neden olur (Haigis ve Sinclair, 2010).

Yaşlanma genellikle glukoz toleransının azalması ve diyabete yatkınlığın artışı ile birlikte (De Fronzo, 1984). Yaşlanma sürecinde öncelikle pankreas organ ağırlığı azalmaya başlar (Sawabe ve diğerleri, 2006). Bu azalma yaşlılarda çeşitli pankreas hastalıkları veya fonksiyon bozuklukları gelişme olasılığını artırır. Pankreasta, histolojik değişikliklerin yanında salgı salgılama düzeyleri de yaşlanma ile birlikte azalmaya başlar. Lipomatoz olarak da bilinen yağ replasmanı insidansı ilerleyen yaşla birlikte artar. Yağ replasmanı, kademeli ekzokrin doku kaybının son aşaması olabilir. Lipomatoz ayrıca obezite, DM, kronik pankreatit, pankreas kanalı tıkanıklığı, şiddetli ateroskleroz ve kistik fibroz ile ilişkilidir.

Kan şekeri kontrolünde önemli bir rol oynayan adacık fonksiyonu, hacim yoğunluğu genellikle yaşa bağlı azalır. Yaşlanma ile hem β hem de non- β hücrelerinin kaybı ve salgı sentezleme kapasitelerinde azalma belirgindir (Mizukami ve diğerleri, 2014; Novelli, 2000). Ayrıca yaşlanma ile birlikte β hücre proliferasyonu da azalır (Reers ve diğerleri, 2009). Yaşlanma ile insidansı artan T2DM’de, hipergliseminin beta hücrelerinde ROS üretimini indüklediği bilinmektedir. ROS yapımının artması mitokondriyi etkileyerek apoptozu tetikler (Brownlee, 2001, 2003). T2DM’li hasta pankreasında, lipomatoz, fibroz, inflamasyon, adacık hiperplazisi ve adacık şişmesi gözlenirken; bununla birlikte, bu değişiklikler özellikle yaşlı kişilerin normal pankreaslarında da gözlenir (Matsuda, 2019).

Biz de çalışmamızda sıçanların başlangıç ve 30 günlük uygulama sonrası ağırlık değişimini değerlendirdik. Yaşlanma ile birlikte ağırlık değişimi anlamlı bulunmazken, genç sıçanlarda ağırlık artışı görüldü.

Sirtuin ailesi, memelilerde farklı hücresel lokalizasyonlarda (mitokondri, sitoplazma veya çekirdek) ve doku dağılımında bulunan yedi protein (SIRT1–SIRT7) içerir. Sirtuinler, geniş bir hedef substrat yelpazesine sahiptir ve bunlar kombinasyon halinde enerji metabolizması regülasyonu (Chang ve Guarente, 2014; Houtkooper, Pirinen ve Auwerx, 2012) sirkadiyen ritim kontrolü (Masri ve Sassone-Corsi, 2014), hücresel sağkalım ve stres yanıtları (Tang, 2011) yanı sıra hücresel/doku homeostazisi ve onarımını içeren sayısız önemli süreci etkilemektedir (Mimura, Kaji, Noma, Funatsu ve Okamoto 2013; Someya ve diğerleri, 2010). Sirtuin aktiviteleri, sadece hücresel sağkalımı değil; aynı zamanda organizasyonel sağlık alanını ve yaşam süresini de etkileyebilir.

SIRT1, yüksek yağlı diyetle indüklenen metabolik hasara ve diyabete karşı koruyucu özellik göstermiştir (Pflugger, Herranz, Velasco-Miguel, Serrano ve Tschop, 2008). Açlık koşulları altında, SIRT1'in insülin duyarlılığı ve glikoz toleransı üzerinde olumsuz bir etkisi vardır (Rodgers ve Puigserver, 2007). Bununla birlikte, beslenme koşullarında, SIRT1'in aktivasyonu glikoz homeostazini ve insülin duyarlılığını geliştirir (Baur ve diğerleri, 2006; Lagouge ve diğerleri, 2006; Sun ve diğerleri, 2007). Ayrıca, SIRT1 aktivatörü olan resveratrol ile yapılan tedavinin H_2O_2 ile indüklenen hücre ölümünü önlediği, hücre proliferasyonunu azalttığı ve yaşlanmayı baskıladığı gösterilmiştir. Alternatif olarak, SIRT1 inhibitörleri sirtinol ve nikotinamidin H_2O_2 ile indüklenen hücre ölümünü arttırdığı bulunmuştur (Cao ve diğerleri, 2009; Ido ve diğerleri, 2015). Yaşlanması hızlandırılmış SAPM8 farelerde yaşlanma ile SIRT1 mRNA, FOXO1 ile FOXO3A ekspresyonu, antioksidan enzimler azalmış, inflamasyon belirteci olan NF- κ B yolağının (p50, p52, p65) ise artış sergilediği bildirilmiştir (Gines ve diğerleri, 2017).

SIRT2 bu ailenin daha az çalışılan bir üyesidir. SIRT2; genom stabilitesi, mitoz, besin metabolizması, yaşlanma, mitokondriyal fonksiyon, otofaji, miyelinasyon, apoptoz, antioksidan mekanizmalar ve hücre motilitesi gibi geniş bir fizyolojik süreç yelpazesinin düzenlenmesinde görev alır (North, 2007; Maxwell, 2011; Liu ve diğerleri, 2018; Braidy, 2015; Gomes, 2015; Fourcade ve diğerleri, 2017). Bunlar dışında SIRT2'yi adiposit farklılaşması, hepatik glukoneogenez ve insülin salınımı yanı sıra enflamatuar yolların düzenlenmesini içeren çeşitli metabolik süreçlerde de görmekteyiz (Gomes, 2015). SIRT2 beyinde en fazla eksprese edilen sirtuin aile üyesidir (Pfister, Ma, Morrison ve D'Mello, 2008; Suzuki ve Koike, 2007). SIRT2 düzeyleri merkezi sinir sisteminde, özellikle korteks, striatum, hipokampus ve omurilikte daha fazla eksprese edilir (Maxwell, 2011). SIRT2

aktivitesinin, α -sinüklein birikimi, mikrotübül fonksiyonu, oksidatif stres, inflamasyon ve otofaji dahil olmak üzere Parkinson patogeneğinde yer alan çeşitli süreçlere aracılık ettiğini gösteren kanıtlar vardır (Liu, 2020).

Özellikle SIRT2 seviyeleri yaşlanma ile artış gösterir. SIRT2'nin fare beyni ve omuriliğinde yaşa bağlı olarak arttığı, (Maxwell, 2011) ve up-regülasyonunun strese bağlı erken yaşlanma ile ilişkili spesifik bir özellik olduğu bildirilmiştir (Anwar, Khosla ve Ramakrishna, 2016). Braidy ve diğerleri SIRT2 mRNA ve protein ekspresyonunun, farklı yaşlardaki sıçanlarda oksipital lobda up-regüle edildiğini, ancak diğer beyin bölgelerinde önemli ölçüde değişmediğini göstermişlerdir (Braidy, 2015). SIRT2, ayrıca beyin dışında adipoz doku, karaciğer, testis, pankreas, iskelet kası ve böbrek gibi metabolik olarak aktif olan dokularda eksprese edilmiştir. Yaşlı sıçanların kolon mukozasında SIRT2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Akbulut, 2015).

SIRT2, dokuya bağlı işlevsellik sergiler. SIRT2 nin invitro insüline dirençli karaciğer hücrelerinde, insülin duyarlılığını arttırırken (Lemos, 2017), iskelet kası hücrelerinde ise kas dokusuna insülin duyarlılığını azaltmıştır (Arora, 2014). Literatürdeki bu bulgular, pankreas çalışmalarının birbiri ile çelişkili ve yetersiz olduğunu göstermektedir. Arora ve diğerleri (2014), SIRT2'nin down regülasyonunun, insülin direncinin nöronal hücrelerde insülin aracılı Akt sinyal yolağının duyarlılığı yoluyla etkisini azalttığını ifade etmişlerdir (Arora, 2014). Bu çalışmalara ters olarak SIRT2'nin farmakolojik inhibisyonu ile glikoz alımının uyarılması büyük ölçüde azaltılmıştır. Bu çalışma ile SIRT2'nin normal koşullar altında aşırı glikoz alımını önleyebileceği, metabolik stres sırasında ise glikoz alımının uyarılmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (Liemburg-Apers, Wagenaars, Smeitink, Willems ve Koopman, 2016; Outeiro, 2007).

SIRT1'in oksidan stresi azaltıcı etkileri ile insülin salgısını aktive etmesi, glukoz dengesinde önemlidir. Yaşlanmaya eşlik eden nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi SIRT1 aktivasyonu ya da SIRT2 inhibisyonu pankreas üzerinde de etkili midir sorusundan çıkarak çalışmamız planlandı.

SIRT2'nin farmakolojik inhibisyonunun çeşitli hastalık modellerinde (Alzheimer, Parkinson, Huntington, demans) nöron koruyucu etkiler yaptığını (Biella, 2016; Chopra, 2012; Outeiro, 2007; Spires-Jones ve diğerleri, 2012) ve farklı depresyon fare

modellerinde antidepresan benzeri etkiler sergilediği gösterilmiştir (Erburu, 2017; Munoz-Cobe, 2018). Ayrıca, SIRT2 ekspresyonunun PD modellerinde α -syn toksisitesini arttırmış, SIRT2'nin inhibisyonu ise nöronal hücrelerin hayatta kalmasında bir artışa yol açmıştır (de Oliveira ve diğerleri, 2017).

SIRT2, NF-kB aktivasyonunu p65 yolunu deasetile ederek inhibe edebilir ve inflamatuvar yanıtları azaltabilmiştir (Pais ve diğerleri, 2013; Tafani ve diğerleri, 2013). SIRT2 eksikliğinde, makrofajlarda LPS ile indüklenen NF-kB yolak aktivasyonunun baskılandığı, NO ekspresyonu, iNOS ve ROS üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Lee, 2014). Salermit (SLM) aracılı farmakolojik SIRT2 inhibisyonunun, yaşlı sıçan hipokampusünde oksidatif stresi azaltırken; GSH düzeyini artırdığı gösterilmiştir (Keskin-Aktan, 2018). SirReal2 ile SIRT2 inhibisyonu yapılan post matur sığır oositlerinde otofajiye bağımlı hücresel apoptozise katkıda bulunduğunu ve SIRT2 inaktivasyonunun hücresel yaşlanmanın altında yatan anahtar bir mekanizma olduğu belirtilmiştir (Xu, 2019). Kan beyin bariyerini geçebilen farklı bir SIRT2 inhibitörü olan AK-7, Parkinson ve Huntington (HD)'nin hücresel ve fare modellerinde olumlu sonuçlar göstermiştir (Chen ve diğerleri, 2015; Chopra, 2012). AGK-2'nin, PD modellerinde α -synuclein toksisitesini azalttığı ve HD modellerinde ise koruyucu olduğu bildirilmiştir (Luthi-Carter, 2010; Outeiro, 2007). Ayrıca Alzheimer oluşturulan sıçan astrositlerinde AGK-2, astrosit aktivasyonunu ve pro-inflamatuvar mediatörlerin üretimini de azalttığı (Scuderi, 2014), bunlara ek olarak farelerde oluşturulan iki farklı AD modelinde AGK-2 ve AK-7 ile sağlanan SIRT2 inhibisyonunda kognitif fonksiyonları iyileştirdiği yönünde bulgular vardır (Biella, 2016).

Bozulmuş hepatik glukoz alımı (HGU) tip 2 diyabette postprandiyal hiperglisemiye neden olur (Basu ve diğerleri, 2001) ve SIRT2'nin depleasyonu, obez diyabetik farelerin hepatositlerinde HGU'yu inhibe eder (Watanabe ve diğerleri, 2018). Buna karşın, AGK-2 ile inhibe edilen SIRT2'in, sıçan pankreas dokusunda tübülün asetilasyonunu iyileştirdiği ve asiner hücrelerde amilaz salgılanmasını artırdığı bildirilmiştir (Binker, 2015).

Glukoneogeneizde PEPK enzimi önemli role sahiptir. Spesifik bir SIRT2 inhibitörü olan Sirtinol uygulaması karaciğerde PEPK enzimi azaltarak glukoneogenezi inhibe eder. Böylece pirüvat aracılı kan şekerinin artışını önler (Zhang ve diğerleri, 2017). Song ve diğerleri (2018) ise SIRT2 azalmasının insülin direncine yol açtığını belirtmektedir (Song ve diğerleri, 2018).

AGK-2 uygulaması C2C12 myoblastlarda glukoz alımını arttırırken, SIRT2'yi inhibe etmektedir (Liemburg-Apers, 2016).

SIRT2 konusundaki DM, hücelere glukoz alımı ve insülin üzerindeki çalışmalar birbiri ile çelişmektedir (Lemos, 2017; Arora, 2014; Belman ve diğerleri, 2015).

Çalışmamızda, pankreas dokusunda SIRT2 ekspresyonunun yaşlanma ile birlikte arttığı hem Western blot hem de sandviç ELISA yöntemi ile gösterdik. Her iki yöntem kendi arasında pozitif yönde korelasyon gösterdi. AGK-2 uygulaması ise SIRT2 ekspresyonunu inhibe etti (Çizelge 4.1).

Yaşlanma sürecinde oksidatif stres artarken, antioksidan savunma azalır. Oksidatif stres, vücutta hasar yaratarak hücre ve dokuların homeostazisini etkiler. ROS ve RNS birikmesi ile oluşan oksidatif hasar, özellikle yaşlanma ile belirgin bir artış sergiler. Yaşlanmanın inflamasyon, artmış apoptoz, bozulmuş mitokondriyal aktivite ve bağışıklık fonksiyonunda düşüşün yanı sıra serbest radikal üretim hızında artış ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir.

Yaşlanma ile artan oksidan stres, yaşlı sıçanların pankreas hücrelerini morfolojisini ve sekresyonlarını bozar. Cuesta ve diğerleri yaşlanması kolaylaştırılmış (SAMP8) fareler ile yaşlanmaya dirençli fare (SAMR1) pankreaslarını oksidatif stres bakımından karşılaştırdığında, yaşlanma ile oksidatif stres belirteçlerinin arttığını göstermişlerdir (Cuesta, 2011). Yaşlı sıçanlardan izole edilen pankreas hücrelerine alfa-lipoik asit (ALA) uygulaması, pankreatik adacıklarda oksidan hasarı azaltırken, antioksidan etkinliği ise artırmıştır (Nobakht-Haghighi ve diğerleri, 2018). Daha önceki çalışmalarımızda testis, mide ve beyinde yaşlanma ile oksidatif hasarın arttığını gösterdik (Muratoğlu, Akarca Dizakar, Keskin-Aktan, Ömeroğlu ve Akbulut 2018; Akbulut, 1999, 2012, 2013; Keskin-Aktan, 2018).

Oksidan stresin değerlendirmek amacı ile TOS, OSI indeksi ve antioksidan savunmada TAS düzeyi çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (Azizi ve diğerleri, 2019; Maciejczyk, 2019). Yaşlanmada tükürük, plazma ve eritrositlerde TAS düzeyinin azaldığı, OSI ile TOS düzeyinin ise artmış olduğu bildirilmiştir (Maciejczyk, 2019). Yaşlı sıçan plazmasında TOS ve OSI değerleri gençlerle karşılaştırıldığında yüksek olarak bulunmuşken, TAS düzeylerinde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır (Kuçukatay ve diğerleri, 2012). Benzer

bir şekilde yaşlı sıçanlarda beyin dokularında TOS değerinin yükselmiş, TAS'ın ise azalmış olduğu bildirilmiştir (Yanar ve diğerleri, 2018). Sıçanlarda hipokampus ve serebral kortekste yaptığımız çalışmamızda yaşlanma, TOS ve OSI düzeyini artırırken, TAS düzeyini azalttı (Keskin-Aktan, Karakaş, Öktem ve Akbulut, 2019). SIRT2'nin oksidatif stresle ilişkisi konusundaki çalışmaların bir kısmı da SIRT2'nin oksidatif stresi arttırdığı, bir kısmında ise azalttığı yönünde bulgular mevcuttur (Perier ve diğerleri, 2007).

SIRT2, mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz fosfataz-1 (MAPK-1)'in deasetilasyonu ve inhibisyonu yoluyla hepatik iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarını artırır (Wang ve diğerleri, 2017). AGK-2 ile yapılan SIRT2 inhibisyonu; böbrek I/R modelinde apoptozu azaltırken, I/R hasarını hafifletmiştir (Wang, 2017). SIRT2 inhibisyonunun koruyucu etkileri, karaciğer I/R (Wang, 2017), hepatik fibroz (Arteaga ve diğerleri, 2016) ve APAP ile indüklenen hepatotoksisite gibi çeşitli hayvan karaciğer modellerinde bildirilmiştir. SIRT2 inhibisyonundan sonra hepatosit ölümü ve ER stresinde önemli bir azalma kaydedildi (Sarikhani ve diğerleri, 2018; Lee ve diğerleri, 2019). SIRT2 eksikliğinin, c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK) aktivasyonunu down-regüle ederek oksidatif stres kaynaklı hepatotoksisiteyi azalttığı bildirilmiştir (Sarikhani, 2018). SIRT2 kaynaklı oksidatif strese ve bununla ilişkili hepatosit ölümüne Nrf2 (Nükleer faktör eritroit-2 ilişkili faktör-2) yolağı ve JNK sinyali katkı sağlar. Karbon tetraklorid ile oluşturulan akut karaciğer hasarında (ALI) AK-1 uygulaması ile yapılan SIRT2 inhibisyonu; Nrf2'yi aktive; JNK sinyalini inhibe ederek ALI modelinde oksidatif stres ve hücre ölümünü azalttığı ifade edilmiştir. Böylece SIRT2 inhibisyonunun ALI'yi tedavi etmek için potansiyel bir yaklaşım olabileceği vurgulanmıştır (Zhou, 2020). SIRT2'nin gerek AGK-2 aracılı inhibisyonu, gerekse susturulması invitro PC12 hücrelerinde H₂O₂'nin neden olduğu toksik hasara karşı koruyucu etki gösterilmiştir (Nie ve diğerleri, 2014). SIRT2 inhibisyonunun kolon ve beyin dokusunda oksidatif strese karşı koruyucu olduğu çalışmalarımızda da gösterilmiştir (Akbulut, 2015; Keskin-Aktan, 2018).

Bulgularımız önceki çalışmalara benzer bir şekilde, yaşlanmanın pankreas dokusunda TOS düzeyinde artışa neden olduğu, TAS düzeyinin ise anlamlı olmamakla birlikte yaşlılarda daha düşük olduğunu gösterdi (Çizelge 4.1). Ayrıca TAS ile TOS düzeyini oranlanması ile hesaplanan OSI değeri yaşlı sıçanlarda gençlere göre yüksek bulundu. Bunlara ek olarak TAS düzeyi ile OSI değeri arasında negative korelasyon görülürken, TOS ile OSI pozitif

yönde korelasyon bulundu. Western-Blot ile çalışılan SIRT2 protein ekspresyonu TOS ve OSI değerleri ile sınırdan pozitif yönde korele bulundu.

Yaşlanma ile artan oksidatif stres apoptotik sürecin aktive edilmesinde rol oynar. Apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik yollarla kaspazları aktive ederek hücre ölümünü başlatır. Yaşlı sıçan mide mukozasında, yaşlanmayla birlikte kaspaz-3 ekspresyonunun arttığını gösterilmiştir (Akbulut, 2012). Apoptoz göstergesi olarak hücrede pro-apoptotik ve anti-apoptotik belirteçler bulunur. Bcl-2 ailesi anti-apoptotik, Bax, Bim gibi belirteçler ise pro-apoptotik etkinlik gösterir. Pro- ve anti-apoptotik denge, pro-apoptotik yöne kaydığında apoptotik süreç başlamış olur. Birçok dokuda yaşlanmada azalmış Bcl-2 seviyeleri ile birlikte, kaspaz-3 aktivitesinin yaşlanan hücrelerde genç hücrelerle kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Molpeceres, 2007; Zhang, 2002a, b). Böbrek iskemi reperfüzyon modelinde böbrek dokusunda SIRT2 artışını iskemiden önce verilen AGK-2 uygulamasının ise böbrek tubuler hücrelerinde apoptozu azalttığını gösterilmiştir (Wang ve diğerleri, 2017). Yaşlı sıçan pankreas dokusunu değerlendirdiğimiz bir başka çalışmamızda, yaşlanma ile ekzokrin dokuda lokalize mikro ve makroveziküler yağlanma, perivasküler infiltrasyon ve Langerhans adacık hücreleri arasında konjesyon izlendi. Ayrıca interlobüler alanlarda lenfositik infiltrasyon belirlendi. Asiner hücrelerde vakuolizasyonun yanı sıra, bazı asiner hücrelerde atrofi ve piknotik çekirdekler dikkati çekti. Yine bazı duktal hücrelerde hiperplazi izlendi. (Muratoğlu, Keskin-Aktan, Akarca-Dizakar, Ömeroğlu ve Akbulut, 2020). Bu bulgulara ek olarak pankreas dokusunda, apoptotik süreç belirteci olan TUNEL ile değerlendirme yapıldı ve yaşlanma ile TUNEL de artış gösterildi. Salermit ile yapılan SIRT2 inhibisyonu, pankreas dokusunda yaşa bağlı artan apoptozu azalttı (Muratoglu, 2020). Çalışmamızda ise, apoptoz göstergesi olarak kullanılan kaspaz-3 protein seviyesi yaşlanma ile arttı (Çizelge 4.1). AGK-2 uygulaması ise kaspaz-3 protein seviyesi anlamlı olarak azaldı. Kaspaz-3 protein seviyesi, hem Western blot hem de sandviç ELISA ile tayin edilen SIRT2 arasında pozitif yönde korele bulundu.

NO, lokal konsantrasyonuna bağlı olarak bazen serbest radikal öncüsü, bazen de bir antioksidan ajan olarak davranabilir (Buchwalow, 2018). Bu sebeple NO, konsantrasyonuna, hücre tipine ve ortamdaki oksidatif düzeyine bağlı olarak apoptozu önleyebilir veya indükleyebilir. NO üreten NOS enzimlerinin pankreas dahil çeşitli organlarda bulunması ve lokalizasyonu tartışmaya açıktır. NOS izoformlarının yüksek

ekspresyonu sadece pankreatik adacıklarda saptanmışken, ekzokrin veya vasküler bölgelerde saptanmamıştır (Alm, Ekström, Henningsson ve Lundquist, 1999; Buchwalow, 2018; Lajoix ve diğerleri, 2001). NO'nun, in vitro olarak RAW264.7 makrofajlarda kaspaz aktivasyonu yoluyla (özellikle kaspaz-3) apoptozu indüklediği ve apoptotik yolları desteklediği gösterilmiştir (Kim, 2002). Yaşlı sıçan frontal ve temporal serebral korteks bölgelerinde kaspaz-3 ekspresyonunun arttığı, NO düzeyinin ise özellikle temporal lobda artış sergilediği gösterilmiştir (Akbulut, 2013). Sıçanlarda palmitat ile indüklenen in vitro pankreas modelinde, adacıklarda ROS düzeyinin arttığı fakat NO düzeyinde herhangi bir değişiklik saptanmadığı bildirilmiştir (Carlsson, Hakan Borg ve Welsh, 1999). Cuesta ve diğerleri (2011), SAMP8 farelerde karaciğer, kalp ve pankreas dokularında iNOS'un arttığını göstermişlerdir. Buna rağmen SAMR1 farelerde iNOS artışının görülmedi ifade edilmiştir (Cuesta, 2011). Yaşlanma ile iNOS ekspresyonunun arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Song, Kwak, Kim ve Lawler, 2009; Cuesta, 2011). Çalışmamızda ise pankreas dokusunda kaspaz-3 protein seviyesi artarken, NO düzeyinde yaşlanma ile anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Pankreatik inflamasyonda NO sentezinin, oksidatif hasardan çok sonra ortaya çıktığı ve akut pankreatit sırasında artmış NO jenerasyonunun, biyoaktif NO'nun homeostatik hücresel seviyesini korumayı amaçlayan adaptif bir mekanizma olduğu bildirilmiştir (Buchwalow, 2018). ROS ile kombine edildiğinde ve RONS ayrıştırıldığında NO, kökeni hücreye zarar verebilir ve böylece çeşitli hastalıklara neden olabilir (Tandon ve Garg, 2011). Bunlara ek olarak pankreas dokusunun özellikle stress koşullarına karşı ve ROS oluşumuna özellikle duyarlı/hassas olduğu, bu hasarların ilerlemesi ile hem Tip-1 hem de Tip-2 Diabetes Mellitus'a katkı sağladığı ve hastalıkla sonuçlandığı ifade edilmektedir (Morgan ve diğerleri, 2006). NO sentezinin hem yararlı (Qui, Mei, Ma ve Korsten, 2001; Werner ve diğerleri, 1998; DiMagno, Williams, Hao, Ernst ve Owyon, 2004) hem de zararlı (Ayub, Serracino-Inglott, Williamson ve Mathie, 2001; Cuzzocreas ve diğerleri, 2002) sonuçları açıklanmıştır. Bu alandaki çelişkili bulgular, hücresel düzeyde NO yollarının patolojide NO'nun rolünün yeniden değerlendirilmesi ile daha bütünsel yorumlanmasını gerektirir.

LPS'ye bağlanan sepsis modelinde SIRT2'nini susturulmasıyla böbrek dokusunda, nötrofil ve makrofaj infiltrasyonunu ve inflamatuvar sitokinleri (TNF- α , IL-1 β , IL-6) azaltmıştır (Zhao, 2015). Farelerde thioasetamid (TAA) ile indüklenen akut karaciğer hasarında uygulanan AGK-2'nin, karaciğer hasarını ve patolojisini iyileştirdiği, pro-inflamatuvar sitokinleri azalttığı gösterilmiştir. AGK-2'nin apoptozu inhibe etmesi, hem kaspaz-3 hem

de Bax/Bcl2 oranının azalması ile gerçekleşmiştir (Jiao, 2019). Çalışmamızda AGK-2 uygulamasının yaşlı sıçanlarda NO düzeyini anlamlı olmamakla birlikte, kontrol grubuna göre azalttığı gözlemlendi. AGK-2'nin bu koruyucu etkileri, yaşlanma ile birlikte gelen hasarları azaltmada etkili olabilir.

Çalışmamızda yaşlanmayı açıklamada popüler olan teorilerin SIRT2 inhibisyonu ile ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Sonuç olarak, yaşlanma ile pankreas dokusunda oksidatif stres ve apoptotik aktivitenin arttığı gösterilmiştir. Sirtuin ailesi uzun yaşam proteinleri, oksidatif stres, apoptoz, inflamasyon ile ilişkili bulunmuştur. Ancak ailenin üyelerinin hepsi aynı özelliğe sahip değildir. SIRT1'in diyabette koruyucu olmasının yanında SIRT2 için literatürde birbiri ile çelişen çalışmalar mevcuttur.

Çalışmamız SIRT2 inhibisyonunun, nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi yaşlanmaya bağlı gelişen pankreas değişikliklerinde koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Yaşlı kişilerin pankreaslarında gözlenen yağ ve lenfosit infiltrasyonu, fibrosiz, adacık kaybı vücutta ki inflamasyon ve apoptoz göstergesi olarak kabul edilebilir ve bunların altında da oksidan stresin artıp, antioksidan savunmanın azalması yatmaktadır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamıza göre SIRT2 inhibisyonu yaşa bağlı olarak pankreas dokusunun artan oksidatif stres ve apoptoz sürecini geriye döndürmüştür. Ancak bu konuda net konuşabilmek için çalışmanın eksikliklerinin giderilmesi gerekir.

- Öncelikle sıçanların sabah açlık kan şekerleri ve insülin düzeyleri ile idrarda glukoz düzeyi bakılmalıdır.
- Histolojik incelemede β adacık insülin granülleri gösterilebilir.
- Pankreas dokusunda inflamasyon için NOx'dan farklı olarak NF-kB, inflamatuvar sitokinler bakılmalıdır.
- Apoptoz, kaspaz-3'den farklı olarak Bax/Bcl2 düzeyi, TUNEL yöntemi ile gösterilmelidir.
- Farklı transkripsiyon yöntemleri ile yaşlanmadaki hücre aktivasyonu (p16, p21 gibi) kontrol edilmelidir.



KAYNAKLAR

- Akbulut, K.G., Akbulut, H., Akgun, N. ve Gonul, B. (2012). Melatonin decreases apoptosis in gastric mucosa during aging. *Aging Clinical and Experimental Research*, 24(1), 15-20.
- Akbulut, K.G., Aktaş, S.H. ve Akbulut, H. (2015). The role of melatonin, sirtuin2 and FoXO1 transcription factor in the aging process of colon in male rats. *Biogerontology*, 16, 99–108.
- Akbulut, K.G., Gönül, B. ve Akbulut, H. (1999). Differential effects of pharmacological doses of melatonin on malondialdehyde and glutathione levels in young and old rats. *Gerontology*, 45(2), 67–71.
- Akbulut, KG., Güney, Ş., Çetin, F., Akgün, H.N. ve Akbulut, H. (2013). Melatonin delays brain aging by decreasing the nitric oxide level. *Neurophysiology*, 45, 2.
- Alm, P., Ekström, P., Henningsson, R. and Lundquist, I. (1999). Morphological evidence for the existence of nitric oxide and carbon monoxide pathways in the rat islets of Langerhans: An immunocytochemical and confocal microscopical study. *Diabetologia*, 42(8), 978–986.
- Anwar, T., Khosla, S. and Ramakrishna, G. (2016). Increased expression of SIRT2 is a novel marker of cellular senescence and is dependent on wild type p53 status. *Cell Cycle*, 15, 1883–1897.
- Arora, A. and Dey, C.S. (2014). SIRT2 negatively regulates insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 1372–8.
- Arora, A. and Dey, C.S. (2016). SIRT2 regulates insulin sensitivity in insulin resistant neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(4), 747–752.
- Arteaga, M., Shang, N., Ding, X., Yong, S., Cotler, S. J., Denning, M. F., Shimamura, T., Breslin, P., Lüscher, B. and Qiu, W. (2016). Inhibition of SIRT2 suppresses hepatic fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(11), 1155–1168.
- Aydın, A.F., Küçükgergin, C., Özdemirler-Erata, G., Koçak-Toker, N. ve Uysal, M. (2010). The effect of carnosine treatment on prooxidant–antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. *Biogerontology*, 11, 103–109.
- Ayub, K., Serracino-Inglott, F., Williamson, R.C. and Mathie, R.T. (2001). Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischaemia and reperfusion. *British Journal of Surgery*, 88, 1189–1193.
- Azizi, R., Soltani-Zangbar, M. S., Sheikhsari, G., Pourmoghadam, Z., Mehdizadeh, A., Mahdipour, M. and Yousefi, M. (2019). Metabolic syndrome mediates inflammatory and oxidative stress responses in patients with recurrent pregnancy loss. *Journal of Reproductive Immunology*, 133, 18-26.

- Bae, Y.S., Oh, H., Rhee, S.G. and Yoo, Y.D. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecular of Cells*, 32, 491–509.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Jeddi, S., Carlström, M., Azizi, F. and Ghasemi, A. (2019). Circulating markers of nitric oxide homeostasis and cardiometabolic diseases: insights from population-based studies. *Free Radical Research*, 1–471.
- Banks, A.,S, Kon, N., Knight, C., Matsumoto, M., Gutiérrez-Juárez, R., Rossetti, L., Gu, W. and Accili, D. (2008). SIRT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metabolism*, 8(4), 333–341.
- Basu, A., Basu, R., Shah, P., Vella, A., Johnson, C.M., Jensen, M., Nair, K.S., Schwenk, W.F. and Rizza, R.A. (2001). Type 2 diabetes impairs splanchnic uptake of glucose but does not alter intestinal glucose absorption during enteral glucose feeding: additional evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes*, 50, 1351–1362.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A. and Sinclair, D.A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337–342.
- Baylis, C. (2012). Sexual dimorphism: The aging kidney, involvement of nitric oxide deficiency, and angiotensin II overactivity. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 67(12), 1365–1372.
- Belman, J.P., Bian, R.R., Habtemichael, E.N., Li, D.T., Jurczak, M.J., Alcazar-Roman, A., McNally, L.J., Shulman, G.I. and Bogan, J.S. (2015). Acetylation of TUG protein promotes the accumulation of GLUT4 glucose transporters in an insulin-responsive intracellular compartment. *The Journal of Biology & Chemistry*, 290, 4447–4463.
- Biella, G., Fusco, F., Nardo, E., Bernocchi, O., Colombo, A., Lichtenthaler, S.F., Forlon, G. and Albani, D. (2016). Sirtuin 2 inhibition improves cognitive performance and acts on amyloid- β protein precursor processing in two alzheimer's disease mouse models. *Journal of Alzheimer's Disease*, 53(3), 1193–1207.
- Bindu, S., Pillai, V.B., Kanwal, A., Samant, S., Mutlu, G.M., Verdin, E., Dulin, N. and Gupta, M.P. (2017). SIRT3 blocks myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis by preventing mitochondrial DNA damage. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 312(1), 68–78.
- Binker, M.G., Richards, D., Gaisano, H.Y. and Cosen-Binker, L.I. (2015). ER stress-associated CTRC mutants decrease stimulated pancreatic zymogen secretion through SIRT2-mediated microtubule dysregulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(3), 329–335.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, 91,179-194.
- Bobba, A., Atlante, A., Moro, L., Calissano, P. and Marra, E. (2007). Nitric oxide has dual opposite roles during early and late phases of apoptosis in cerebellar granule neurons. *Apoptosis*, 12(9), 1597–1610.

- Bobrowska, A., Donmez, G., Weiss, A., Guarente, L. and Bates, G. (2012). Sirt2 ablation has no effect on tubulin acetylation in brain, cholesterol biosynthesis or the progression of huntington's disease phenotypes in vivo. *PLoS ONE*, 7(4), e34805.
- Bordone, L. and Guarente, L. (2007). Sirtuins and beta-cell function. *Diabetes and Obesity Metabolism*, 2, 23-27.
- Braidy, N., Poljak, A., Grant, R., Jayasena, T., Mansour, H., Chan-Ling, T., Smythe, G., Sachdev, P. and Guillemin, G.J. (2015). Differential expression of sirtuins in the aging rat brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9.
- Brenner, D. and Mak, T.W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 871–877.
- Brown, J.E. (2012). The ageing pancreas. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 12(3), 141–145.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813–820.
- Brownlee, M. (2003). A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1788-1790.
- Buchwalow, I., Schnekenburger, J., Samoilova, V., Boecker, W., Neumann, J. and Tiemann, K. (2018). New Insight into the Role of Nitric Oxide Pathways in Pancreas. *Acta Histochemistry and Cytochemistry*, 51(6), 167-172.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(1), 269–290.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424, 37–49.
- Cachofeiro, V., Goicochea, M., de Vinuesa, S.G., Oubiña, P., Lahera, V. and Luño, J. (2008). Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney International*, 74, 4–9.
- Cain, K., Bratton, S.B. and Cohen, G.M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 84(2-3), 203–214.
- Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N. and Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): A novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 84(2-3), 215–222.
- Cao, C., Lu, S., Kivlin, R., Wallin, B., Card, E., Bagdasarian, A., Tamakloe, T., Wang, W.J., Song, X., Chu, W.M., Kouttab, N., Xu, A. and Wan, Y. (2009). SIRT1 confers protection against UVB- and H₂O₂-induced cell death via modulation of p53 and JNK in cultured skin keratinocytes. *Journal of Cell Molleules Medicine*, 13, 3632-3643.

- Cao, L., Leers-Sucheta, S. and Azhar, S. (2004). Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 88, 61–67.
- Cao, Y., Jiang, X., Ma, H., Wang, Y., Xue, P. and Liu, Y. (2016). SIRT1 and insulin resistance. *Journal of Diabetes Complications*, 30(1), 178-183.
- Carlsson, C., Hakan Borg, L.A. and Welsh, N. (1999). Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology*, 140(8), 3422–3428.
- Chang, H.C. and Guarente, L. (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinology Metabolism*, 25(3), 138–145.
- Chen, Q.M., Liu, J. and Merrett, J.B. (2000). Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and Bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochemistry Journal*, 347 (2), 543–551.
- Chen, X., Wales, P., Quinti, L., Zuo, F., Moniot, S., Herisson, F., Rauf, N.A., Wang, H., Silverman, R.B., Ayata, C., Maxwell, M.M., Steegborn, C., Schwarzschild, M.A., Outeiro, T.F. and Kazantsev, A.G. (2015). The sirtuin-2 inhibitor AK7 is neuroprotective in models of Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis and cerebral ischemia. *PloS One*, 10, e0116919.
- Chopra, V., Quinti, L., Kim, J., Vollar, L., Narayanan, K. L., Edgerly, C., Cipicchio, P.M., Lauver, M.A., Choi, S.H., Silverman, R.B., Ferrante, R.J. and Kazantsev, A.G. (2012). The sirtuin 2 inhibitor AK-7 is neuroprotective in huntington's disease mouse models. *Cell Reports*, 2(6), 1492–1497.
- Cuesta, S., Kireev, R. and Garcia, C. (2011). Effect of growth hormone treatment on pancreatic inflammation, oxidative stress, and apoptosis related to aging in ^L/_{SEP} SAMP8 mice. *Rejuvenation Research*, 14(5), 501-512.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., Centorrino, T., Ciccolo, A., Van de Loo, F. A., Britti, D., Caputi, A.P. and Thiernemann, C. (2002). Inducible nitric oxide synthase- deficient mice exhibit resistance to the acute pancreatitis induced by cerulein. *Shock*, 7, 416–422.
- D'Arcy, M. (2019). Cell death. A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43, 582-592.
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A. and D'Arca, D. (2016). ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–18.
- Davydov, V.V., Dobaeva, N.M. and Bozhkov, A.I. (2004). Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. *Experimental Gerontology*, 39, 11-16.
- De Fronzo, R.A. (1984). Glucose intolerance of aging. *Diabetes Care* 4,493–513.

- De Oliveira, R. M., Vicente Miranda, H., Francelle, L., Pinho, R., Szego, E. M. and Martinho, R. (2017). The mechanism of sirtuin 2-mediated exacerbation of α -synuclein toxicity in models of Parkinson disease. *PLoS Biology*, 15:e2000374.
- Dickson, L.M. and Rhodes, C.J. (2004). Pancreatic β -cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: A role for protein kinase B in the Akt? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287(2), 192–198.
- DiMagno, M.J., Williams, J. A., Hao, Y., Ernst, S. A. and Owyang, C. (2004). Endothelial nitric oxide synthase is protective in the initiation of caerulein-induced acute pancreatitis in mice. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287, 80– 87.
- Donmez, G. (2012). The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(9), 494–501.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95.
- Dryden, S. C., Nahhas, F. A., Nowak, J. E., Goustin, A.S. and Tainsky, M. A. (2003). Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(9), 3173–3185.
- Dzięgielewska-Gęsiak, S., Płóciniczak, A., Wilemska-Kucharzewska, K., Kokot, T., Muc-Wierzoń, M. and Wysocka, E. (2019). The relationship between plasma lipids, oxidant–antioxidant status, and glycated proteins in individuals at risk for atherosclerosis. *Clinical Interventions in Aging*, 14, 789–796.
- Ekert, P.G. and Vaux, D.L. (2005). The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 626–630.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Erburu, M., Muñoz-Cobo, I., Diaz-Perdigon, T., Mellini, P., Suzuki, T., Puerta, E. and Tordera, R. M. (2017). SIRT2 inhibition modulate glutamate and serotonin systems in the prefrontal cortex and induces antidepressant-like action. *Neuropharmacology*, 117, 195–208.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111.
- Finkel, T., Deng, C.X. and Mostoslavsky, R. (2009). Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 460, 587e591.
- Fischer, U., Jänicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*, 10(1), 76–100.

- Fourcade, S., Morató, L., Parameswaran, J., Ruiz, M., Ruiz-Cortés, T., Jové, M. and Pujol, A. (2017). Loss of SIRT2 leads to axonal degeneration and locomotor disability associated with redox and energy imbalance. *Aging Cell*, 16(6), 1404–1413.
- Gandarillas, A. (2000). Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: Common pathways? *Experimental Gerontology*, 35(1), 53–62.
- Gines, C., Cuesta, S., Kireev, R., García, C., Rancan, L., Paredes, S.D., Vara, E. and Tresguerres, J.A.F. (2017). Protective effect of resveratrol against inflammation, oxidative stress and apoptosis in pancreas of aged SAMP8 mice. *Experimental of Gerontology*, 90, 61–70.
- Gomes, A.P., Price, N.L., Ling, A.J., Moslehi, J.J., Montgomery, M.K., Rajman, L., White, J.P., Teodoro, J.S., Wrann, C.D., Hubbard, B.P., Mercken, E.M., Palmeira, C.M., de Cabo, R., Rolo, A.P., Turner, N., Bell, E.L. and Sinclair, D.A. (2013). Declining NAD(+) induces a Pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*, 155, 1624–1638.
- Gomes, P., Fleming-Outeiro, T. and Cavadas, C. (2015). Emerging role of sirtuin 2 in the regulation of mammalian metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(11), 756–768.
- Grootaert, M.O.J., Roth, L., Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R.Y. and Martinet, W. (2018). Defective autophagy in atherosclerosis: to die or to senesce? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–12.
- Guarente, L. and Picard, F. (2005). Calorie restriction the SIR2 connection. *Cell*, 120, 473–482.
- Guevara, R., Gianotti, M., Roca, P. and Oliver, J. (2011). Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial function. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 27, 201–206.
- Gunasekaran, U. and Gannon, M. (2011). Type 2 diabetes and the aging pancreatic beta cell. *Aging*, 3(6), 565–575.
- Haigis, M.C. and Sinclair, D.A. (2010). Mammalian sirtuins: Biological insights and disease relevance. *Annual Review of Pathology*, 5, 253–295.
- Hall, J.A., Dominy, J.E., Lee, Y. and Puigserver, P. (2013). The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 973–979.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147–1150.
- Harman, D. (2006). Free radical theory of aging: An update: Increasing the functional life span. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1), 10–21.
- Houtkooper, R.H., Pirinen, E. and Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and health-span. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 225–238.

- Ido, Y., Duranton, A., Lan, F., Weikel, K.A., Breton, L. and Ruderman, N.B. (2015). Resveratrol prevents oxidative stress-induced senescence and proliferative dysfunction by activating the AMPK-FOXO3 cascade in cultured primary human keratinocytes. *PLoS One*, 10, e0115341.
- Imai, S. and Guarente, L. (2014). NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends in Cell Biology*, 24, 464e471.
- Jęsko, H., Wencel, P., Strosznajder, R.P. and Strosznajder, J.B. (2017). Sirtuins and their roles in brain aging and neurodegenerative disorders. *Neurochemistry Research*, 42(3), 876–90.
- Jiao, F.Z., Wang, Y., Zhang, W.B., Zhang, H.Y., Chen, Q., Shi, C.X., Wang, L.W. and Gong, Z.J. (2019). Protective role of AGK2 on thioacetamide-induced acute liver failure in mice. *Life Sciences*, 230, 68–75.
- Jing, E., Gesta, S. and Kahn, R.C. (2007). Sirt2 regulates adipocyte differentiation through foxo1 acetylation/deacetylation. *Cell Metabolism*, 6, 105–114.
- Johnson, D. (2000). Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia*, 14(9), 1695–1703.
- Kanwal, A. (2018). Functional and therapeutic potential of mitochondrial SIRT3 deacetylate in disease conditions. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 11, 1151-1155.
- Kanwal, A. and Dsouza, L.A. (2019). Sirtuins and diabetes: Optimizing the sweetness in the blood. *Translational Medicine Communications*, 4, 3.
- Kassem, M., Niazi, Z.R., Abbas, M., El Habhab, A., Kreutter, G., Khemais-Benkhiat, S., Auger, C., Antal, M.C., Schini-Kerth, V.B., Toti, F. and Kessler, L. (2017). Senescence of pancreas in middle-aged rats with normal vascular function. *Annals of Transplant*, 22, 177-186.
- Katsuumi, G., Shimizu, I., Yoshida, Y. and Minamino, T. (2018). Vascular senescence in cardiovascular and metabolic diseases. *Frontiers In Cardiovascular Medicine*, 5, 18–8.
- Kehm, R., König, J., Nowotny, K., Jung, T., Deubel, S., Gohlke, S. and Höhn, A. (2018). Age-related oxidative changes in pancreatic islets are predominantly located in the vascular system. *Redox Biology*, 15, 387–393.
- Kerr, J.F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182, 471–474.
- Keskin-Aktan, A. (2018). *Hücre ölüm mekanizmaları*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 120.
- Keskin-Aktan, A., Akbulut, K. G., Yazici-Mutlu, Ç., Sonugur, G., Ocal, M. ve Akbulut, H. (2018). The effects of melatonin and curcumin on the expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats. *Brain Research Bulletin*, 137, 306–310.

- Keskin-Aktan, A., Karakaş, H., Öktem, A. ve Akbulut, K.G. (2019). Investigation of the effect of curcumin treatment on total oxidant and total antioxidant status in the gastrocnemius muscle in aged rats. *Acta Physiologica*, 6.
- Khan, R.I., Nirzhor, S.S.R. and Akter, R. (2018). A review of the recent advances made with SIRT6 and its implications on aging related processes, major human diseases, and possible therapeutic targets. *Biomolecules*, 8(3), 44.
- Kilimnik, G., Jo, J., Periwal, V., Zielinski, M.C. and Hara, M. (2012). Quantification of islet size and architecture. *Islets*, 4(2), 167–172.
- Kim, P.K.M., Kwon, Y.G., Chung, H.T. and Kim, Y.M. (2002). Regulation of caspases by nitric oxide. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 962(1), 42–52.
- Kirkland, J.L., Stout, M.B. and Sierra, F. (2016). Resilience in aging mice. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 71(11), 1407–1414.
- Krishnan, J., Danzer, C., Simka, T., Ukropec, J., Walter, K.M., Kumpf, S., Mirtschink, P., Ukropcova, B., Gasperikova, D., Pedrazzini, T. and Krek, W. (2012). Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. *Genes & Development*, 26, 259–270.
- Kucukatay, V., Bor Kucukatay, M., Gundogdu, G., Erken, G., Ozcan, T.O., Miloglu, F.D. ve Kadioglu, Y. (2012). Vitamin E treatment enhances erythrocyte deformability in aged rats. *Folia Biologica*, 58(4), 157-65.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F. and Auwerx, J. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, 127(6), 1109–1122.
- Lajoix, A.D., Reggio, H., Chardes, T., Peraldi-Roux, S., Tribillac, F., Roye, M., Dietz, S., Broca, C., Manteghetti, M., Ribes, G., Wolheim, C.B. and Gross, R. (2001). A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic β -cells controls insulin secretion. *Diabetes*, 50(6), 1311–1323.
- Lee, A.S., Jung, Y.J., Kim, D., Nguyen-Thanh, T., Kang, K.P., Lee, S., Park, S.K. and Kim, W. (2014). SIRT2 ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450 (4), 1363–1369.
- Lee, D.H., Lee, B., Park, J.S., Lee, Y.S., Kim, J.H., Cho, Y., Jo, Y., Kim, H.S., Lee, Y.H. and Nam, K.T. (2019). Inactivation of Sirtuin2 protects mice from acetaminophen-induced liver injury: Possible involvement of ER stress and S6K1 activation. *BMB reports*, 52(3), 190-195.
- Leeuwenburgh, C. and Heinecke, J.W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current. Medicinal Chemistry*, 8(7), 829 – 838.

- Lemos, V., de Oliveira, R.M., Naia, L., Szego, E., Ramos, E., Pinho, S., Magro, F., Cavadas, C., Rego, A., Costa, V., Outeiro, T.F. and Gomes, P. (2017). The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT2 attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction and improves insulin sensitivity in hepatocytes. *Human Molecular Genetics*, 26, 4105e4117.
- Li, L. Y., Luo, X. and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95–99.
- Liemburg-Apers, D.C., Wagenaars, J.A.L., Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M. and Koopman, W.J.H. (2016). Acute stimulation of glucose influx upon mitoenergetic dysfunction requires LKB1, AMPK, Sirt2 and mTOR–RAPTOR. *Journal of Cell Science*, 129(23), 4411–4423.
- Liu, T., Yang, W., Pang, S., Yu, S. and Yan, B. (2018). Functional genetic variants within the SIRT2 gene promoter in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 137, 200–207.
- Liu, Y., Ao, L., Li, Y., Zhao, Y., Wen, Y. and Ding, H. (2019). The SIRT2 inhibitor AK-7 decreases cochlear cell apoptosis and attenuates noise-induced hearing loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 509, 641–646.
- Liu, Y., Zhang, Y., Zhu, K., Chi, S., Wang, C. and Xie, A. (2020). Emerging role of sirtuin 2 in parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11.
- Loh, K., Deng, H., Fukushima, A., Cai, X. and Boivin, B. (2009). Reactive oxygen species enhance insulin ^[1]_{SEP} sensitivity. *Cell Metabolism*, 10, 260–272.
- Long, J., Gao, F., Tong, L., Cotman, C.W., Ames, B.N. and Liu, J. (2009). Mitochondrial decay in the brains of old rats: ameliorating effect of alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine. *Neurochemical Research*, 34, 755–763.
- Löhr, J.M. (2018). Weighing in on weight loss in pancreatic cancer. *Nature*, 558(7711), 526–528.
- Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.
- Luthi-Carter, R., Taylor, D.M., Pallos, J., Lambert, E., Amore, A., Parker, A., Moffitt, H., Smith, D.L., Runne, H., Gokce, O., Kuhn, A., Xiang, Z., Maxwell, M.M., Reeves, S.A., Bates, G.P., Neri, C., Thompson, L.M., Marsh, J.L. and Kazantsev, A.G. (2010). SIRT2 inhibition achieves neuro-protection by decreasing sterol biosynthesis, *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 107, 7927–7932.
- Maciejczyk, M., Zalewska, A. and Ladny, J.R. (2019). Salivary antioxidant barrier, redox status, and oxidative damage to proteins and lipids in healthy children, adults, and the elderly. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–12.
- Manes, G. and Malfertheiner, P. (2003). The pancreas and aging. Aging and the gastrointestinal tract. *Karger*, 32, 157–166.

- Masri, S. and Sassone-Corsi, P. (2014). Sirtuins and the circadian clock: Bridging chromatin and metabolism. *Science Signalling*, 7(342).
- Matsuda, Y. (2019). Age-related morphological changes in the pancreas and their association with pancreatic carcinogenesis. *Pathology International*, 1-13.
- Maxwell, M.M., Tomkinson, E.M., Nobles, J., Wizeman, J.W., Amore, A.M., Quinti, L., Chopra, V., Hersch, S.M. and Kazantsev, A.G. (2011). The Sirtuin2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Human Molecular Genetics*, 20(20), 3986–3996.
- Mimura, T., Kaji, Y., Noma, H., Funatsu, H. and Okamoto, S. (2013). The role of SIRT1 in ocular aging. *Experimental Eye Research*, 116, 17–26.
- Miranda, K.M., Espey, M.G. and Wink, D.A. (2001). A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71.
- Mizukami, H., Takahashi, K., Inaba, W., Osonoi, S., Kamata, K., Tsuboi, K. and Yagihashi, S. (2014). Age-associated changes of islet endocrine cells and the effects of body mass index in Japanese. *Journal of Diabetes Investigation*, 5, 38–47.
- Molpeceres, V., Mauriz, J.L., García-Mediavilla, M.V., González, P., Barrio, J.P. and González-Gallego, J. (2007). Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *The Journal of Gerontology: A Biology Sciences Medical Sciences*, 62(7), 687-695.
- Morgan, C.L., McEwan, P., Morrissey, M., Peters, J.R., Poole, C. and Currie, C.J. (2006). Characterization and comparison of health-related utility in people with diabetes with various single and multiple vascular complications. *Diabetic Medicine*, 23(10), 1100–1105.
- Muñoz-Cobo, I., Belloch, F.B., Díaz-Perdigón, T., Puerta, E. and Tordera, R.M. (2018). SIRT2 inhibition reverses anhedonia in the VGLUT1+/- depression model. *Behavioural Brain Research*, 335, 128–131.
- Muratoğlu, S., Akarca Dizakar, O.S., Keskin Aktan, A., Ömeroğlu, S. ve Akbulut, K.G. (2018). The protective role of melatonin and curcumin in the testis of young and aged rats. *Andrologia*, e13203, 1- 10.
- Muratoğlu, S., Keskin-Aktan, A., Akarca-Dizakar, S.Ö., Ömeroğlu, S. ve Akbulut, K.G. (2019). Oxidative and histological changes in pancreatic tissue in the aging process. *Acta-Physiologica*, 58.
- Nakagawa, T. and Guarente, L. (2011). Sirtuins at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(6), 833–838.
- Nie, H., Hong, Y., Lu, X., Zhang, J., Chen, H., Li, Y., Ma, Y. and Ying, W. (2014). SIRT2 mediates oxidative stress-induced apoptosis of differentiated PC12 cells. *Neuroreport*, 25, 838–842.

- Niles, J.C., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (2006). Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide Biology-Chemistry*, 14, 109–121.
- Nobakht-Haghighi, N., Rahimifard, M., Baeeri, M., Rezvanfar, M. A., Moini Nodeh, S., Haghi-Aminjan, H. and Abdollahi, M. (2018). Regulation of aging and oxidative stress pathways in aged pancreatic islets using alpha-lipoic acid. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 449(1-2), 267-276.
- North, B.J. and Verdin, E. (2007). Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of sirt2 during mitosis. *PLoS ONE*, 2(8), e784.
- Novelli, M. (2000). Age-dependent reduction in GLUT-2 levels is correlated with the impairment of the insulin secretory response in isolated islets of Sprague Dawley rats. *Experimental Gerontology*, 35(5), 641–651.
- Oleson, B.J., Broniowska, K.A., Naatz, A., Hogg, N., Tarakanova, V.L., Corbett, J.A. (2016). Nitric oxide suppresses β -cell apoptosis by inhibiting the DNA Damage response. *Molecular and Cellular Biology*, 36(15), 2067–2077.
- Outeiro, T.F., Kontopoulos, E., Altmann, S.M., Kufareva, I., Strathearn, K.E., Amore, A. M. and Kazantsev, A.G. (2007). Sirtuin 2 inhibitors rescue alfa-synuclein-mediated toxicity in models of parkinson's disease. *Science*, 317(5837), 516–519.
- Pais, T.F., Szego, E.M., Marques, O., Miller-Fleming, L., Antas, P., Guerreiro, P., de Oliveira, R.M., Kasapoglu, B. and Outeiro, T.F. (2013). The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglial activation and brain inflammation. *The Embo Journal*, 32(19), 2603-2616.
- Parone, P., James, D. and Martinou, J. (2002). Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie*, 84(2-3), 105–111.
- Perier, C., Bové, J., Wu, D.C., Dehay, B., Choi, D.K. and Jackson-Lewis, V. (2007). Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104, 8161–8166.
- Perl, S., Perl, S., Kushner, J.A., Buchholz, B.A., Meeker, A.K., Stein, G.M., Hsieh, M., Kirby, M., Pechhold, S., Liu, E.H., Harlan, D.M. and Tisdale, J.F. (2010). Significant human beta-cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by *in vivo* thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(10), 234 –239.
- Peter, M.E. and Krammer, P.H. (2003). The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation*, 10, 26–35.
- Pfister, J.A., Ma, C., Morrison, B.E. and D'Mello, S.R. (2008). Opposing effects of sirtuins on neuronal survival: SIRT1-mediated neuroprotection is independent of its deacetylase activity. *PLoS ONE*, 3, e4090.

- Pfluger, P.T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M., Tschop, M.H. (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28), 9793–9798.
- Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4, 89– 96.
- Pillai, V.B., Kanwal, A., Fang, Y.H., Sharp, W.W., Samant, S., Arbiser, J. and Gupta, M.P. (2017). Honokiol, an activator of Sirtuin-3 (SIRT3) preserves mitochondria and protects the heart from doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Oncotarget*, 8(21), 34082–34098.
- Poon, I.K.H., Lucas, C.D., Rossi, A.G. and Ravichandran, K.S. (2014). Apoptotic cell clearance: Basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 166–180.
- Puig, Á., Rancan, L., Paredes, S.D., Carrasco, A., Escames, G., Vara, E. and Tresguerres, J.A.F. (2016). Melatonin decreases the expression of inflammation and apoptosis markers in the lung of a senescence-accelerated mice model. *Experimental Gerontology*, 75, 1–7.
- Qui, B., Mei, Q.B., Ma, J.J. and Korsten, M.A. (2001). Susceptibility to cerulein-induced pancreatitis in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Pancreas*, 23, 89–93.
- Rajendran, R. Garva, R., Krstic-Demonacos, M. and Demonacos, C. (2011). Sirtuins: Molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling and transcription. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 368276.
- Rattan, S.I. (2006). Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radical Research*, 40,1230-1238.
- Reers, C., Erbel, S., Esposito, I., Schmied, B., Buchler, M.W., Nawroth, P.P. and Ritzel, R.A. (2009). Impaired islet turnover in human donor pancreata with aging. *European Journal of Endocrinology*, 160, 185-191.
- Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 42351–42354.
- Rodgers, J.T. and Puigserver, P. (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(31), 12861–12866.
- Saghebjo, M., Sadeghi-Tabas, S., Saffari, I., Ghane, A. and Dimauro, I. (2019). Sex differences in antiaging response to short- and long-term high-intensity interval exercise in rat cardiac muscle: Telomerase activity, total antioxidant/oxidant status. *Chinese Journal of Physiology*, 62, 261-266.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: The induced-proximity model. *Proceeding of the National Academy of Science of the America*, 96, 10964–10967. [SEP]

- Samant, S.A., Kanwal, A., Pillai, V.B., Bao, R. and Gupta, M.P. (2017). The histone deacetylase SIRT6 blocks myostatin expression and development of muscle atrophy. *Scientific Reports*, 7(1), 11877–7.
- Sarikhani, M., Mishra, S., Desingu, P.A., Kotyada, C., Wolfgeher, D., Gupta, M.P., Singh, M. and Sundaresan, N.R. (2018). SIRT2 regulates oxidative stress-induced cell death through deacetylation of c-Jun NH2-terminal kinase. *Cell Death & Differentiation*, 25(9), 1638-1656.
- Sastre, J., Pallardó, F.V. and Viña, J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *Iubmb Life*, 49(5), 427-435.
- Sawabe, M., Saito, M., Naka, M., Kasahara, I., Saito, Y., Arai, T., Hamamatsu, A. and Shirasawa, T. (2006). Standard organ weights among elderly Japanese who died in hospital, including 50 centenarians. *Pathology International*, 56, 315–323.
- Scuderi, C., Stecca, C., Bronzuoli, M. R., Rotili, D., Valente, S., Mai, A. and Steardo, L. (2014). Sirtuin modulators control reactive gliosis in an in vitro model of Alzheimers disease. *Frontiers in Pharmacology*, 5.
- Sies, H. and Jones, D.P. (2017). *Oxidative stress*. In: Encyclopedia of Stress, edited by Fink G. San Diego, CA: Academic Press, 45–47.
- Singh, C.K., Chhabra, G., Ndiaye, M.A., Garcia-Peterson, L.M., Mack, N.J. and Ahmad, N. (2018). The role of sirtuins in antioxidant and redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(8), 643–661.
- Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J.M. and Prolla, T.A. (2010). Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age- related hearing loss under caloric restriction. *Cell*, 143(5), 802–812.
- Song, J., Yang, B., Jia, X., Li, M., Tan, W., Ma, S., Shi, X. and Feng, L. (2018). Distinctive Roles of Sirtuins on Diabetes, Protective or Detrimental?. *Front Endocrinology*, 29(9), 724.
- Song, W., Kwak, H.B., Kim, J.H. and Lawler, J.M. (2009). Exercise training modulates the nitric oxide synthase profile in skeletal muscle from old rats. *The Journal of Gerontology: A Biological Science and Medical Science*, 64, 540–549.
- Spires-Jones, T.L., Fox, L.M., Rozkalne, A., Pitstick, R., Carlson, G.A. and Kazantsev, A.G. (2012). Inhibition of sirtuin 2 with sulfobenzoic acid derivative AK1 is non-toxic and potentially neuroprotective in a mouse model of frontotemporal dementia. *Frontiers in Pharmacology*, 3.
- Sun, C., Zhang, F., Ge, X., Yan, T., Chen, X., Shi, X. and Zhai, Q. (2007). SIRT1 Improves Insulin Sensitivity under Insulin-Resistant Conditions by Repressing PTP1B. *Cell Metabolism*, 6(4), 307–319.
- Suzuki, K. and Koike, T. (2007). Mammalian Sir2-related protein (SIRT) 2-mediated modulation of resistance to axonal degeneration in slow Wallerian degeneration mice: A crucial role of tubulin deacetylation. *Neuroscience*, 147, 599–612.

- Szoke, E., Shrayyef, M.Z., Messing, S., Woerle, H.J., van Haeften, T.W., Meyer, C., Mitrakou, A., Pimenta, W. and Gerich, J.E. (2008). Effect of aging on glucose homeostasis: Accelerated deterioration of beta-cell function in individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, 31(3), 539–543.
- Tafani, M., Pucci, B., Russo, A., Schito, L., Pellegrini, L., Perrone, G. A., Villanova, L., Salvatori, L., Ravenna, L., Petrangeli, E. and Russo, M. A. (2013). *Modulators of HIF1 α and NF κ B in Cancer Treatment: Is it a Rational Approach for Controlling Malignant Progression?* *Frontiers in Pharmacology*, 4.
- Tandon, R.K. and Garg, P.K. (2011). Oxidative stress in chronic pancreatitis: Pathophysiological relevance and management. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(10), 2757–2766.
- Tang, B.L. (2011). Sirt1's systemic protective roles and its promise as a target in antiaging medicine. *Translational Research*, 157(5), 276–284.
- Tresguerres J.A., Kireev, R., Forman, K., Cuesta, S, Tresguerres A.F. and Vara, E. (2012). Effect of chronic melatonin administration on several physiological parameters from old Wistar rats and SAMP8 mice. *Current of Aging Science*, 5(3), 242-253.
- Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283(5407), 1482–1488.
- Wang, F., Nguyen, M., Qin, F.X. and Tong, Q. (2007). SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell*, 6, 505–514.
- Wang, J., Koh, H.W., Zhou, L., Bae, U.J., Lee, H.S., Bang, I.H., Ka, S.O., Oh, S.H., Bae, E.J. and Park, B.H. (2016). Sirtuin 2 aggravates postischemic liver injury by deacetylating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Hepatology*, 65(1), 225–236.
- Wang, Y., Mu, Y., Zhou, X., Ji, H., Gao, X., Cai, W. W., Guan, Q. and Xu, T. (2017). SIRT2-mediated FOXO3a deacetylation drives its nuclear translocation triggering FasL-induced cell apoptosis during renal ischemia reperfusion. *Apoptosis*, 22(4), 519–530.
- Watanabe, H., Inaba, Y., Kimura, K., Matsumoto, M., Kaneko, S., Kasuga, M. and Inoue, H. (2018). Sirt2 facilitates hepatic glucose uptake by deacetylating glucokinase regulatory protein. *Nature Communication*, 9, 30.
- Watson, J.D. (2014). Type 2 diabetes as a redox disease. *Lancet*, 383, 841–843.
- Weidinger, A. and Kozlov, A.V. (2015). Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5, 472–484.
- Weinert, B.T. and Timiras, P.S. (2003). Invited review: Theories of aging. *Journal of Applied Physiology*, 95(4), 1706–1716.

- Werner, J., Fernández-del Castillo, C., Rivera, J.A., Kollias, N., Lewandrowski, K.B., Rattner, D. W. and Warshaw, A.L. (1998). On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. *Gut*, 43, 401–407.
- Willcox, J.K., Ash, S.L. and Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275–295.
- Wu, L.E. and Sinclair, D.A. (2014). SIRT2 controls the pentose phosphate switch. *The Embo Journal*, 33(12), 1287–1288.
- Xu, W.N., Yang, R.Z., Zheng, H.L., Yu, W., Zheng, X.F., Li, B., Jiang, S.D. and Jiang, L.S. (2019). PGC-1 α acts as a mediator of Sirtuin2 to protect annulus fibrosus from apoptosis induced by oxidative stress through restraining mitophagy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 1007–1017.
- Yanar, K., Simsek, B., Çaylı, N., Övül Bozkır, H., Mengi, M., Belce, A. ve Çakatay, U. (2018). Caloric restriction and redox homeostasis in various regions of aging male rat brain: Is caloric restriction still worth trying even after early-adulthood? *Journal of Food Biochemistry*, e12740.
- Yanik, M., Erel, O. and Kati, M. (2004). The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatrica*, 16(04), 200–203.
- Yoon, H.J., Cho, S.W., Ahn, B.W. and Yang, S.Y. (2010). Alterations in the activity and expression of endothelial NO synthase in aged human endothelial cells. *Mechanism of Ageing and Development*, 131, 119–123.
- Yoshizaki, T., Milne, J.C., Imamura, T., Schenk, S., Sonoda, N., Babendure, J.L., Lu, J.C., Smith, J.J., Jirousek, M.R. and Olefsky, J.M. (2009). SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Molecular Cell of Biology*, 29, 1363–1374.
- Young, I.S. and Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *The Journal of Clinical Pathology*, 54, 176–186.
- Zhang, J.H., Zhang, Y. and Herman, B. (2003). Caspase, apoptosis and aging. *Aging Research Reviews*, 2, 357–366.
- Zhang, M., Pan, Y., Dorfman, R.G., Yin, Y., Zhou, Q., Huang, S. and Zhao, S. (2017). Sirtinol promotes PEPCK1 degradation and inhibits gluconeogenesis by inhibiting deacetylase SIRT2. *Scientific Reports*, 7(1).
- Zhang, Y. and Herman, B. (2002a). Aging and apoptosis. *Mechanism of Ageing and Development*, 123, 245–260.
- Zhang, Y., Chong, E. and Herman, B. (2002b). Age-associated increases in the activity of multiple caspases in Fisher 344 rat organs. *Experimental Gerontology*, 37(6), 777–789.
- Zhao, T., Alam, H.B., Liu, B., Bronson, R.T., Nikolian, V.C., Wu, E., Chong, W. and Li, Y. (2015). Selective inhibition of sirt2 improves outcomes in a lethal septic model. *Current Molecular Medicine*, 15(7), 634–641.

Zhou, Z., Qi, J., Kim, J.-W., You, M., Lim, C. W. and Kim, B. (2020). AK-1, a Sirt2 inhibitor, alleviates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vivo and in vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 1–32.





EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 22/11/2018-E.155455



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



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

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

Araştırmacı grubu K. Gonca AKBULUT, Saide MURATOĞLU, Arzu KESKİN AKTAN ve Cansu BABAHAHAN'dan oluşan G.Ü.ET-18.079 kod numaralı ve "*Yaşlanma Sürecinde AGK-2 Uygulamasının Pankreas Dokusunda Apoptoz ve Oksidatif Strese Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-18.079 and entitled "*Effect of AGK-2 Treatment on Apoptosis and Oxidative Stress in Pancreas Tissue in Aging*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Not: Daha önce onay alan G.Ü.ET-16.008 kod numaralı çalışmada kullanılan 72 adet Wistar Albino Rat'ın 24 adetine ait pankreas dokusunun kullanılmasına onay verilmiştir.

Ek:1 Liste



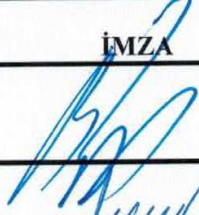
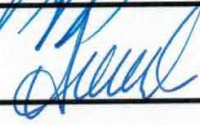
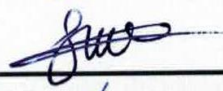
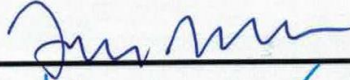
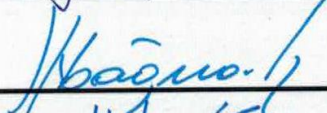
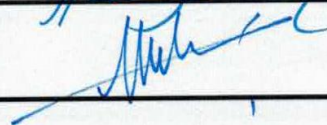
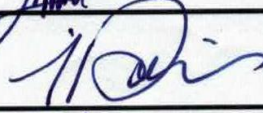
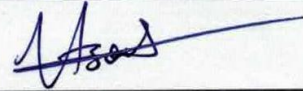
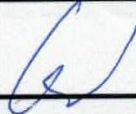
Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:03122022666

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

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ :16/11/2018		TOPLANTI SAYISI : 10	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL		KATILAMADI	
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Vet.Hek.Burcu AVCI		KATILAMADI	
Osman İÇ			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : MURATOĞLU, Saide
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 18.08.1987, Kazakistan
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 05079143633
 e-mail : saide.bakal@hotmail.com



Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/ Fizyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/ Fizyoloji Anabilim Dalı	2014
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Iğdır Anadolu Lisesi	2006

Yabancı Dil

İngilizce, Rusça

İş Deneyimi, Yıl	Yer	Görev
2017-devam ediyor	Yüksek İhtisas Üniversitesi/Ankara	Öğretim Görevlisi

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Muratoğlu, S., Akarca-Dizakar, O.S., Keskin-Aktan, A., Ömeroğlu, S. ve Akbulut, K.G. (2018). The protective role of melatonin and curcumin in the testis of young and aged rats. *Andrologia*, e13203: 1- 10 (SCI).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

Bahar, A.N., Muratoğlu, S., Keskin-Aktan, A. ve Akbulut, K.G. (2019). The effect of salermide administration on the oxidative stress in the kidney tissue during aging. *Acta-Physiologica*, 120.

Muratoğlu, S., Keskin-Aktan, A., Akarca-Dizakar, S.Ö., Ömeroğlu, S. ve Akbulut, K.G. (2019). Effect of salermide on young and aged testicular tissue. *Acta-Physiologica*, 117.

Muratoğlu, S., Keskin-Aktan, A., Akarca-Dizakar, S.Ö., Ömeroğlu, S. ve Akbulut, K.G. (2019). Oxidative and histological changes in pancreatic tissue in the aging process. *Acta-Physiologica*, 110.

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler

Usta, A. ve Muratoğlu, S. (2018). *Sağlık kurumları yönetimi, bölüm adı tıbbi terminoloji*. (1. Baskı). Editör: Yanık Oktay, Ankara:Sage Matbaacılık, 240.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

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

Bahar, A.N., Muratoğlu, S., Keskin-Aktan, A. ve Akbulut, K.G. (2019). Yaşlanmada salermide uygulamasının böbrek dokusunda oksidatif stres üzerine etkisi. Poster Sunumu, 45. Ulusal Fizyoloji Kongresi, İzmir.

Muratoğlu, S., Keskin-Aktan, A., Akarca-Dizakar, S.Ö., Ömeroğlu, S. ve Akbulut, K.G. (2019). *Yaşlanma sürecinde pankreas dokusunda oksidatif ve histolojik değişiklikler*. Poster Sunumu, 45. Ulusal Fizyoloji Kongresi, İzmir.

Muratoğlu, S., Keskin-Aktan, A., Akarca-Dizakar, S.Ö., Ömeroğlu, S. ve Akbulut, K.G. (2019). *Salermide uygulamasının genç ve yaşlı testis dokusuna etkisi*. Poster Sunumu, 45. Ulusal Fizyoloji Kongresi, İzmir.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

